

BIOTECNOLOGÍA

TORULASPORA DELBRUECKII; UN MODELO PARA EL
ESTUDIO DEL ESTRÉS POR NaCl EN LEVADURA DE
PANADERÍA

ELENA ALLER ARRANZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11 de
Marzo de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Fernando Moreno Sanz
- D. Juan Carlos Argüelles Ordóñez
- D. Francisco Estruch Ros
- Dña. Amparo Querol Simón
- D. Olivier Vincent

Va ser dirigida per:

Dña. Francisca Rández Gil
D. José Antonio Prieto Alamán

©Copyright: Servei de Publicacions
Elena Aller Arranz

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6211-X

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

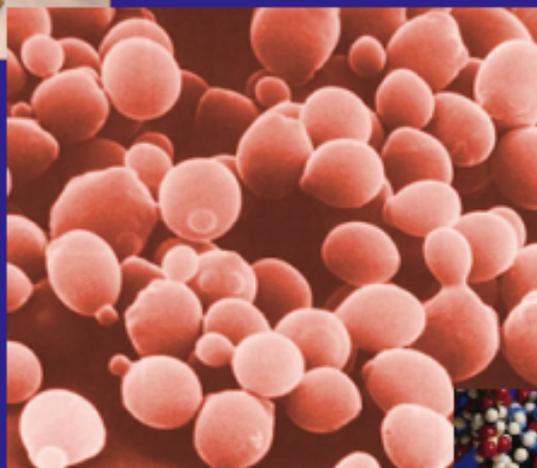


Consejo Superior de
Investigaciones
Científicas



Universitat de València

***Torulasporea delbrueckii*: un modelo para el estudio del estrés por NaCl en levadura de panadería**



Elena Aller Arranz
TESIS DOCTORAL
Valencia 2004



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

***Torulaspota delbrueckii*: un modelo para el estudio del estrés por NaCl en levadura de panadería**

Trabajo realizado por Elena Aller Arranz en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Valencia, Diciembre 2004

Los Doctores Francisca Rández Gil y Jose Antonio Prieto Alamán, científicos titulares del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos de Valencia,

Certifican:

Que D^a. Elena Aller Arranz, licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “*Torulaspota delbrueckii*: un modelo para el estudio del estrés por NaCl en levadura de panadería” que presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Valencia, 10 de Diciembre del 2004

Dra. Francisca Rández Gil

Dr. Jose Antonio Prieto Alamán

Dedico este trabajo a mi familia.

Agradecimientos

Cuando finalicé mi carrera y decidí dedicarme a la investigación, el primer paso que debía dar era el realizar una tesis doctoral. En un principio pensaba que una tesis servía para aprender a investigar, pero al menos en mi caso ha supuesto para mí mucho más que eso. Me ha enseñado a creer y confiar en mí misma y a madurar en lo personal y en lo profesional. También me ha enseñado que se puede conseguir lo que uno se propone con confianza, ilusión y en investigación sobretodo ¡mucho paciencia!. Después de mil tropiezos y de estar a punto de tirar la toalla en más de una ocasión, gracias a la perseverancia y sobretodo a la gente que ha creído en mí y ha estado a mi lado en todo momento, ya puedo por fin estar escribiendo los agradecimientos de mi tesis y así terminar el trabajo que comencé hace algo más de cuatro años.

Quiero agradecer a Paqui Rández y Jose Antonio Prieto la oportunidad que me dieron de realizar esta tesis y todo lo que me han enseñado.

A Eladio Barrio su colaboración en uno de mis trabajos y sus enseñanzas.

A Amparo Querol por sus árboles.

A Marian Carlson, Francisco Estruch, Martin Schmidt, Marta Cyert, Steve Hanes, Ramón Serrano y Jose Gimeno por los plásmidos y las cepas cedidas.

A toda la gente de otros laboratorios que me han echado una mano cuando lo he necesitado y que no nombro porque son muchos. Espero que me perdonen.

A mis compañeros de laboratorio Jaime, Sonia, Edu, Claudia, Quino, Pilar Mariajo y Amalia por que siempre habéis estado dispuestos a ayudarme y a escucharme y por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos en el laboratorio.

Y muy especialmente:

A Amalia que ha sido una buena amiga y una gran compañera en el trabajo. Gracias por escucharme, por tus consejos, por tu apoyo en los momentos malos y por todo lo que me has ayudado con mi trabajo sobretodo en este último año. Esta tesis es también un poco tuya. ¡Ah! ¡Y por las magníficas veladas culturales!

A Mariajo gracias por ayudarme a integrarme en Valencia, por estar a mi lado cuando las cosas no iban muy bien, por ser una gran compañera y amiga y por hacernos reír tantas veces.

A Claudia por sus locuras, sus gruñidos, por todos los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio, por su apoyo ¡y por los tesitos!

A Quino gracias por las tardes tan divertidas que hemos pasado, por tus consejos informáticos en la gran cantidad de veces que los he necesitado (¡qué paciencia has tenido!) y sobretodo por embarcarnos en el emocionante proyecto que tenemos entre manos y con el que estoy disfrutando tanto.

A Pilar, la última adquisición del laboratorio, quiero agradecerle su apoyo y su buen humor. Es una pena no haberte conocido antes.

A Mari Cruz y Jose tengo muchas cosas que agradecer. Para mí conoceros ha significado mucho y habéis sido un gran apoyo siempre que lo he necesitado. Gracias por haber creído en mí, por escucharme y por haberme enseñado a valorarme a mí misma y a mi trabajo. Espero que nuestra amistad dure siempre.

A mis padres gracias por estar siempre a mi lado, cuando las cosas van bien y cuando van mal, y por ayudarme a tomar decisiones, lo que nunca es fácil. Sin vuestro apoyo constante no habría podido llegar hasta aquí.

A mis hermanos Ana, Carlos y Mónica y a Nacho quiero agradecer su apoyo incondicional y todos los buenos momentos que pasamos juntos y que espero no acaben nunca.

A Teresa gracias por haber sido siempre una gran amiga, por sus buenos consejos y su optimismo, del que siempre algo me transmite.

A la “Kutxi” por su amistad, por estar a mi lado y escucharme y por los magníficos viajes que nos montamos y espero sigamos haciendo.

Y en general a todos mis amigos de Madrid, Segovia y Valencia con los que he pasado tantos buenos ratos ¡Y los que nos quedan!.

Abreviaturas

A: adenina

AMP: adenosil monofosfato

ASC: dominio C-terminal de 80 aminoácidos de las subunidades β que interacciona con Snf4p

ATP: adenosina trifosfato

BSA: seroalbúmina bovina

cAMP: adenosil monofosfato cíclico

CDRE: elemento de respuesta dependiente de calcineurina

C: citosina

cDNA: DNA copia de RNA

CO₂: dióxido de carbono

dATP: desoxi-adenina tri-fosfato

dCTP: desoxi-citosina tri-fosfato

dGTP: desoxi-guanina tri-fosfato

DIG: digoxigenina

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxi-nucleótidos tri-fosfato

dTTP: desoxi-timina tri-fosfato

DTT: DL-Ditiotreitol

dUTP: desoxi-uracilo tri-fosfato

EDTA: ácido etilén diamino tetraacético

G: guanina

HOG: ruta de respuesta a alta osmolaridad

KD: dominio catalítico

KIS: secuencia de las subunidades β que interacciona con Snf1p

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKK: quinasa de la MAPK
MAPKKK: quinasa de la MAPKK
MCS: sitio múltiple de clonación
MIPS: centro de información de secuencias de proteínas (Munich)
NADP(H): dinucleótido fosfato de β -nicotinamida-adenina (reducido)
o-NPG: o-nitrofenil-b-D-galactopiranosido
ORF: pauta de lectura abierta
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEG: polietilenglicol
PKA: proteína quinasa dependiente de cAMP
p/v: peso/volumen
PVP: polivinilpirrolidona
RD: dominio regulador
RNA: ácido ribonucleico
r.p.m.: revoluciones por minuto
SDS: dodecil sulfato sódico
SFH: homología de flancos cortos
STRE: elemento de respuesta a estrés
T: timina
TE: tampón Tris-EDTA
TOR: ruta reguladora del crecimiento celular
U: uracilo
ufc: unidades formadoras de colonias
UV: ultravioleta

ÍNDICE

Introducción	17
1.- El proceso de panificación	20
2.- Las levaduras de panadería	20
3.- El estrés osmótico en levadura	22
3.1.- Fuentes de estrés osmótico	22
3.2.- La respuesta a estrés osmótico	23
3.3.- Rutas de transducción de la señal inducidas por estrés osmótico	24
3.3.1.- La ruta HOG	25
3.3.2.- La ruta de la calcineurina	28
3.4.- Ajuste metabólico y respuesta general a estrés	29
3.4.1.- Mecanismos adicionales	31
3.5.- El proceso de represión por catabolito	33
3.5.1.- El complejo de la proteína quinasa Snf1p	33
3.5.2.- El complejo represor Mig1p-Tup1p-Ssn6p	35
3.6.- La conexión Snf1p–Msn2p/Msn4p y la respuesta a estrés osmótico	37
4.- Levaduras no-convencionales y estrés osmótico: <i>Torulaspota delbrueckii</i>	38
4.1.- Características genéticas y morfológicas	38
4.2.- <i>Torulaspota delbrueckii</i> y su papel en la industria panadera	39
4.3.- <i>Torulaspota delbrueckii</i> como organismo modelo	40
Objetivos	43
Materiales y Métodos	45
1.- Cepas	47
2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	48
2.1.- Bacterias	48
2.2.- Levaduras	49
3.- Métodos de manipulación de microorganismos	49
3.1.- Transformación de bacterias	49
3.2.- Transformación de levaduras	50
3.3.- Análisis de la inserción del casete de interrupción	50
4.- Métodos de manipulación del DNA	51
4.1.- Obtención de DNA genómico de levadura de cultivo líquido	51
4.2.- Obtención de DNA genómico de levadura de una colonia aislada	51
4.3.- Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	52
4.4.- Obtención de DNA plasmídico de levadura	52
4.5.- Reacción en cadena de la polimerasa	52
4.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	55
4.7.- Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa	56
4.8.- Clonación	56
4.9.- Secuenciación y análisis de las secuencias	58
4.10.- Rastreo de la genoteca, mediante técnicas de PCR	58
5.- Métodos de manipulación de RNA	59
5.1. Extracción de RNA	59
5.2. Transferencia de RNA a filtros de nylon (Northern)	59
5.3. Marcaje de sondas radiactivas	59
5.4. Hibridación de RNA sobre filtros y cuantificación	60
6.- Hibridación de filtros de DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60

6.1.- Crecimiento de las células y extracción de RNA	60
6.2.- Síntesis y marcaje de cDNA	61
6.3.- Hibridación de filtros	61
6.4.- Lavado, exposición y lectura de los filtros	62
7.- Determinación de actividades enzimáticas	62
7.1.- Obtención de extractos celulares	62
7.2.- Determinación de actividad β -galactosidasa	63
7.3.- Determinación de la concentración de proteínas	63
Capítulo I: Obtención de herramientas moleculares para el estudio de	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	65
1.- Análisis de una región del DNA de <i>T. delbrueckii</i> que contiene el gen <i>HIS3</i> : secuencia, orden génico y evolución	68
1.1.- Clonación del gen <i>HIS3</i> de <i>Torulaspora delbrueckii</i>	69
1.2.- Organización de la región <i>TdHIS3</i>	70
1.3.- Caracterización del gen <i>TdHIS3</i>	71
1.4.- Evolución de la región <i>HIS3</i>	74
2.- Caracterización y análisis del orden génico en la región <i>LEU2</i> de <i>Torulaspora delbrueckii</i>	77
2.1.- Clonación del gen <i>LEU2</i> de <i>Torulaspora delbrueckii</i>	78
2.2.- Análisis de la secuencia de <i>TdLEU2</i>	81
2.3.- Organización de la región <i>TdLEU2</i>	85
2.4.- Interrupción del gen <i>TdLEU2</i>	87
Capítulo II: Identificación de genes de <i>Torulaspora delbrueckii</i> que confieren	
resistencia a NaCl en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
1.- Identificación de genes de la cepa PYCC5321 que confieren mayor tolerancia a estrés salino en <i>S. cerevisiae</i>	94
1.1.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-1	94
1.1.1.- Análisis de la secuencia del gen <i>TdENAI</i>	96
1.2.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-2	97
1.2.1.- Análisis de la secuencia del gen <i>TdDED1</i>	99
1.2.2.- El gen <i>DED1</i> esta implicado en la respuesta a NaCl y frío en <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	101
1.3.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-3	103
1.3.1.- La pauta de lectura ORF1 es una forma truncada del gen <i>TdSIP1</i> homólogo a <i>SIP1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	105
1.3.2.- Interrupción del gen <i>TdSIP1</i> y análisis funcional del mutante	111
1.3.3.- La sobreexpresión de <i>TdSIP1-t</i> altera la respuesta transcripcional de <i>S. cerevisiae</i> a estrés salino	114
Capítulo III: Bases moleculares del fenotipo de resistencia a NaCl causado por	
la sobreexpresión de <i>TdSIP1-t</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>: el papel	
funcional de Snf1p	123
1.- La sobreexpresión de <i>SIP2</i> o <i>GAL83</i> no altera la resistencia a NaCl de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	125
1.1.- Análisis de la resistencia a NaCl de mutantes de <i>S. cerevisiae</i> en las subunidades β de Snf1p	128
2.- Implicación de la proteína quinasa Snf1p en el fenotipo de resistencia a NaCl causado por la sobreexpresión de <i>TdSIP1-t</i>	130

2.1- La proteína quinasa Snf1 es un regulador negativo de tolerancia a NaCl en <i>S. cerevisiae</i>	131
2.2.-La sobreexpresión de <i>TdSIP1-t</i> reduce la actividad quinasa de Snf1p	133
2.3.- La actividad de Snf1p no se modifica en respuesta a estrés osmótico	136
2.4.- La interrupción de <i>SNF1</i> incrementa la expresión de algunos genes en respuesta a estrés iónico	137
2.5.- La función de Snf1p impide la expresión de genes regulados por la ruta de la calcineurina en ausencia de estrés	140
2.6.- La sobreexpresión de cualquiera de las subunidades β de Snf1p desregula la expresión dependiente de calcineurina-Crz1p	143
Discusión	147
Conclusiones	165
Bibliografía	169

INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es probablemente el primer microorganismo que ha sido explotado por el hombre. Su habilidad para transformar diferentes azúcares en etanol y CO₂, ha sido utilizada en la producción de bebidas alcohólicas y en la fabricación de pan, constituyendo así los primeros ejemplos de la aplicación biotecnológica de un microorganismo. El uso de levadura en la fabricación del pan se comenzó a desarrollar en el antiguo Egipto, unos 4.000 años a.c. (Oliver, 1991).

En la actualidad, el gran desarrollo industrial y los cambios en los hábitos alimenticios del hombre, han generado un aumento considerable en la demanda de productos de panadería y bollería de mayor calidad, libres de aditivos y listos para su uso. Un ejemplo claro es el constante incremento en el consumo de masas congeladas. Esto ha generado una necesidad de levaduras más rápidas, resistentes a diferentes tipos de estrés o con mayor tolerancia a variaciones en las condiciones de aplicación industrial (Attfield, 1997; Rández-Gil y col., 1999; Rández-Gil y col., 2003).

Estas características parecen depender de un número muy elevado de genes bajo el control de complejos mecanismos de regulación (Estruch, 2000; Hohmann, 2002). Algunos de los fenotipos deseados podrían incluso ir contra el propio diseño biológico de *S. cerevisiae* (Attfield, 1997). Así, parece improbable que las técnicas de genética clásica, habitualmente utilizadas, puedan mejorar las características de cepas industriales de panadería. En este escenario, la incorporación de la tecnología del ADN recombinante ha abierto la posibilidad de manipular genes clave, sin alterar otros genes de valor tecnológico. La utilidad de estas técnicas requiere, sin embargo, de un profundo conocimiento de los determinantes fisiológicos y genéticos que controlan el comportamiento de estas cepas en las condiciones de su utilización industrial.

Introducción

1.-El proceso de panificación

El proceso de panificación consta básicamente de tres etapas, amasado, fermentación y cocción. El amasado permite la mezcla de los ingredientes, harina, agua, levadura y sal, la hidratación del almidón y proteínas, y la formación de la red del gluten. Esta red, formada por gliadinas y gluteninas, es básica en la estructura alveolar del pan y permite retener el gas producido durante la fermentación. En esta etapa, el cambio más notable es el incremento de volumen de la masa, resultado de la actividad metabólica de la levadura *S. cerevisiae*, que transforma los azúcares presentes en la harina, principalmente maltosa, en CO₂. Además, la levadura contribuye a las propiedades reológicas y a la textura de la miga y genera, a través de reacciones metabólicas secundarias, numerosos compuestos volátiles y precursores de aromas. Finalmente, la masa fermentada es horneada. Durante los primeros minutos, el incremento de temperatura produce un aumento en la generación de gas, hasta que tiene lugar la lisis térmica de la levadura. El horneado produce también la inactivación de las enzimas presentes en la masa y la generación de compuestos derivados del pardeamiento no enzimático de Maillard. Así, el pan adquiere el volumen, color y aroma que determinan su aceptación por el consumidor.

La actividad de la levadura es pues determinante en la moderna tecnología de la panificación y su mejora representa un objetivo prioritario de productores, panaderos y consumidores.

2.- Las levaduras de panadería

Las levaduras comerciales de panadería son cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* y optimizadas para la industria panadera. La mayoría son homotéticas con un grado alto e irregular de ploidía y baja capacidad de esporulación (Evans, 1990; Codón y col., 1998). También muestran

reordenamientos cromosómicos con múltiples translocaciones y polimorfismos en la longitud cromosómica (Codón y col., 1997). Estos rasgos característicos han sido el resultado de la selección natural por evolución adaptativa, junto a la aplicación sucesiva, de programas de mejora basados en técnicas de genética clásica (Rández-Gil y col., 2003). Además, otro factor que ha contribuido a la constitución genética de las cepas industriales ha sido su selección para características como robustez, velocidad de crecimiento o capacidad fermentativa. Aunque no existe un conocimiento exacto de qué genes determinan estas propiedades, parece claro que todas ellas resultan favorecidas por un alto nivel de ploidía (Adams y col., 1992; Bell y col., 2001), como evidencian numerosos datos experimentales. Por ejemplo, las cepas industriales muestran un mayor nivel de enzimas glicolíticas que las cepas de laboratorio (van Hoek y col., 2000). Asimismo, exhiben una mayor capacidad de transporte e hidrólisis de maltosa (Higgins y col., 1999; Higgins y col., 2001), el disacárido que sostiene mayoritariamente la fermentación panaria. Así, dotaciones cromosómicas más altas incrementan el número de copias de genes favorables. Esto no es sorprendente, ya que la duplicación de bloques enteros de genes es un hecho recurrente en la evolución genómica de levaduras (Wolfe y Shields, 1997; Friedman y Hughes, 2001). Así, la adaptación natural y la presión selectiva ejercida por el hombre han logrado transformar estirpes inoperantes, en cepas robustas, de rápido crecimiento y elevado valor tecnológico.

No obstante, hay muchas características de las levaduras industriales que necesitan ser mejoradas para su óptima utilización en diferentes procesos tecnológicos. La velocidad de producción de gas es crítica en la moderna tecnología panadera y ésta depende, entre otros, de factores intrínsecos de la levadura. Por ejemplo, su tolerancia a varios tipos de estrés, entre ellos,

Introducción

osmótico, congelación o desecación es claramente inadecuado (Attfield, 1997; Rández-Gil y col., 2003) y compromete en numerosas ocasiones la obtención de productos de calidad adecuada.

3.-El estrés osmótico en levadura

La exposición a estrés hiper-osmótico, por ejemplo en masas dulces de bollería, tiene como resultado una rápida deshidratación de las células de levadura, la cual reduce su crecimiento y su capacidad para producir gas (Attfield, 1997; Rández-Gil y col., 1999). Para aliviar este problema, es común, entre los panaderos, el empleo, para la fermentación de estos productos, de cantidades más altas de levadura, del 4 al 12%. Sin embargo, esta práctica incrementa el coste del proceso y sobretodo, tiene un efecto negativo en las características organolépticas del producto, que genera su rechazo por el consumidor. Así, el desarrollo de nuevas cepas de levadura con mayor tolerancia a estrés, y en concreto a estrés osmótico, es un objetivo prioritario de gran interés tecnológico y económico.

En los próximos apartados, enfocaremos nuestra atención en revisar los principales agentes y condiciones que generan una situación de estrés osmótico en levaduras de panadería. También analizaremos la información disponible sobre la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae* y describiremos las principales rutas reguladoras implicadas en esta respuesta.

3.1.- Fuentes de estrés osmótico

La producción de levadura de panadería se realiza a través de un proceso de cultivo continuo, utilizando melaza como fuente de nutrientes, principalmente carbohidratos (Beudeker y col., 1990; Evans, 1990; Reed y Nagodawithana, 1991). Las melazas son muy variables dependiendo de si son de caña o de remolacha y de su origen, ya que contienen diferentes

cantidades de azúcares, sales y otros solutos. Como consecuencia, las células de levadura se ven expuestas a actividades de agua bajas y exceso de sales durante el proceso de propagación industrial (Attfield, 1997). Una vez alcanzado el nivel de biomasa deseado, la levadura se separa del medio de cultivo, se lava, y se procesa para formar levadura en crema, levadura prensada o levadura seca. Para la producción de levadura prensada se elimina parte del agua intracelular mediante la adición de un 0,5% de sal. A continuación, la suspensión de células se filtra a vacío o por filtros de presión. En el caso de levadura seca, la suspensión se calienta, mediante diferentes sistemas, hasta alcanzar niveles de humedad entorno al 1-3%.

En el proceso de panificación, las levaduras se ven sometidas a estrés osmótico por la presencia de azúcares en la masa. En el caso de las masas dulces, éstas contienen hasta un 30% de sacarosa o de jarabe de glucosa/fructosa, además de grasas y leche en polvo, lo que reduce todavía más la actividad de agua de la masa. La adición de sal en masas dulces (alrededor de un 2%, base harina), incrementa también la presión osmótica. Además, la presencia de sal genera efectos adversos para la levadura distintos a los causados por el estrés osmótico. La acumulación de iones Cl^- y Na^+ en el citoplasma de las células tiene efectos dañinos que se observan a concentraciones intracelulares en el rango de 50-100 mM (Serrano, 1996). En masas dulces, estas concentraciones se alcanzan fácilmente debido a la baja actividad de agua. Así, una levadura de panadería adaptada a la fermentación de masas dulces debe mostrar una elevada tolerancia a estrés osmótico y resistencia a la toxicidad del Na^+ .

3.2.- La respuesta a estrés osmótico

Cuando las células de levadura son expuestas a condiciones de alta osmolaridad se produce de forma prácticamente instantánea una pérdida de

Introducción

agua, debido al gradiente osmótico formado a ambos lados de la membrana (Hohmann, 1997). Esta deshidratación produce una pérdida de turgencia y un cese inmediato del crecimiento. Como consecuencia, *S. cerevisiae* pone en marcha dos tipos de respuestas: una respuesta inmediata, tendente a recuperar agua, turgencia y evitar la muerte celular, y una respuesta secundaria, que permite reanudar el crecimiento en las nuevas condiciones ambientales. En la primera se movilizan diversos mecanismos de rescate, que incluyen la formación de vacuolas (Nass y Rao, 1999) y la acumulación de glicerol.

A continuación tiene lugar una respuesta secundaria, que implica la activación a medio-largo plazo de mecanismos de rescate y adaptación. En ella, se detecta un reajuste de la expresión de cientos de genes y la síntesis *de novo* de numerosas proteínas (Hohmann, 2002). Alrededor de 250 a 400 genes, implicados en una gran variedad de funciones fisiológicas, son regulados al alza en diferentes condiciones de estrés osmótico (Gasch y col., 2000; Rep y col., 2000; Causton y col., 2001; Posas y col., 2000; Yale y Bohnert, 2001). La mayoría de estos genes parece implicado en la síntesis de osmoprotectores, en particular glicerol, y en el ajuste del metabolismo energético y del equilibrio iónico de la célula a las nuevas condiciones ambientales (Hohmann, 2002). Así, *S. cerevisiae* pone en marcha mecanismos de protección y modula su actividad metabólica para reanudar el crecimiento en un medio hostil.

3.3.- Rutas de transducción de la señal inducidas por estrés osmótico

La regulación de la expresión de genes es controlada por mecanismos de señalización que detectan cambios o perturbaciones en la composición o condiciones medioambientales y los transmiten a rutas de transducción de la señal y finalmente a la maquinaria de transcripción. Varias rutas de

transducción de la señal han sido caracterizadas como implicadas en la adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces*. De ellas, dos rutas, la ruta HOG y la ruta de la calcineurina juegan un papel clave en la respuesta a estrés hiper-osmótico y a estrés iónico, respectivamente.

3.3.1.- La ruta HOG

La ruta HOG (por High Osmolarity Glicerol) es una de las cinco rutas de MAPK conocidas en *S. cerevisiae* (Gustin y col., 1998). Las rutas de las MAPK (por Mitogen Activated Protein Kinase) son rutas de señalización muy conservadas en todos los eucariotas, que controlan el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación y la respuesta a estrés (Gustin y col., 1998). En levaduras, las rutas de MAPK consisten en una cascada de fosforilaciones entre tres quinasas, denominadas MAPKKK, MAPKK y MAPK. La proteína Hog1p es la MAPK central de la ruta HOG (Figura 1). La señal es disparada por dos mecanismos independientes, que consisten, en ambos casos, de un sistema sensor y una MAPKKK, funcionalmente redundantes (van Wuytswinkel y col., 2000). En una rama, el osmosensor parece ser la proteína Sln1p. Esta proteína, junto a Ypd1p y Ssk1p, forman lo que se denomina “sistema de dos-componentes” (Maeda y col., 1994), un típico sistema de transducción de la señal encontrado en hongos, plantas y bacterias (Gustin y col., 1998), que funciona como un regulador negativo de la ruta HOG (Posas y Saito, 1998). En la otra rama, la señal parece iniciarse en la proteína transmembrana Sho1p, que fue descrita, en principio, como un osmosensor específico (Maeda y col., 1995). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que Sho1p funciona como una proteína encargada de unir a Pbs2p (Posas y Saito, 1997), la MAPKK de la ruta, la cual es a su vez activada por la MAPKKK, Ste11p (Raitt y col., 2000), en una forma complicada y no bien caracterizada, que requiere de factores adicionales

Introducción

(Figura 1). Recientemente, ha sido caracterizado un tercer osmosensor Msb2p, aunque este parece tener un papel redundante al de Sho1p (O'Rourke y Herskowitz, 2002).

La fosforilación dual de Hog1p por Pbs2p, dispara su importación transitoria al núcleo (Ferrigno y col., 1998; Reiser y col., 1999). A su vez, varias proteínas fosfatasa, entre ellas las Tyr-fosfatasas Ptp2p y Ptp3 (Wurgler-Murphy y col., 1997; Jacoby y col., 1997), y las Ser/Thr-fosfatasas del tipo 2C, Ptc1p, Ptc2p y Ptc3p (Maeda y col., 1994; Warmka y col., 2001; Young y col., 2002) regulan a la baja el nivel de fosforilación y por tanto la actividad de Hog1p (Figura 1). Además, las fosfatasas Ptp2p y Ptp3p modulan la localización subcelular de Hog1p (Mattison y Ota, 2000).

Una vez en el núcleo, Hog1p regula la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos Sko1p, Hot1p, Msn1p y Msn2p/Msn4p. Hog1p está implicado en la fosforilación de Sko1p, que en condiciones normales está unido al complejo represor Tup1p-Ssn6p (Proft y Serrano, 1999; García-Gimeno y Struhl, 2000). Esta fosforilación convierte a Sko1p de un represor a un activador (Proft y Struhl, 2002). Genes como *ENAI* son regulados de esta forma (Proft y col., 2001). Por otra parte, la activación de *GPD1* y de otros muchos genes inducidos en condiciones de estrés osmótico, depende de Hot1p y Msn1p (Rep y col., 1999; Rep y col., 2000). Hot1p es un activador transcripcional que interacciona con Hog1p y su fosforilación es dependiente de Hog1p (Rep y col., 1999; Alepuz y col., 2001). A su vez, Hot1p dirige a Hog1p y determina la unión de la MAPK al promotor de diversos genes inducidos en estas condiciones (Alepuz y col., 2001). Además, la activación vía Hog1p de numerosos genes de respuesta a estrés osmótico depende de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (Rep y col., 2000). Los factores nucleares Msn2p/Msn4p controlan la respuesta general a estrés en *Saccharomyces* (Estruch, 2000) e inducen la

transcripción durante diferentes condiciones de estrés (Gasch y col., 2000). Msn2p y Msn4p llevan tanto a Hog1p como a Hot1p a los promotores de genes como *CTT1* y *HSP12*, lo que sugiere que hay una interacción entre la ruta HOG y Msn2p/Msn4p (Alepez y col., 2001). Finalmente, un nuevo factor de transcripción Smp1p, ha sido caracterizado como diana de la MAPK Hog1p, la cual determina su activación por fosforilación y su correcta localización (De Nadal y col., 2002).

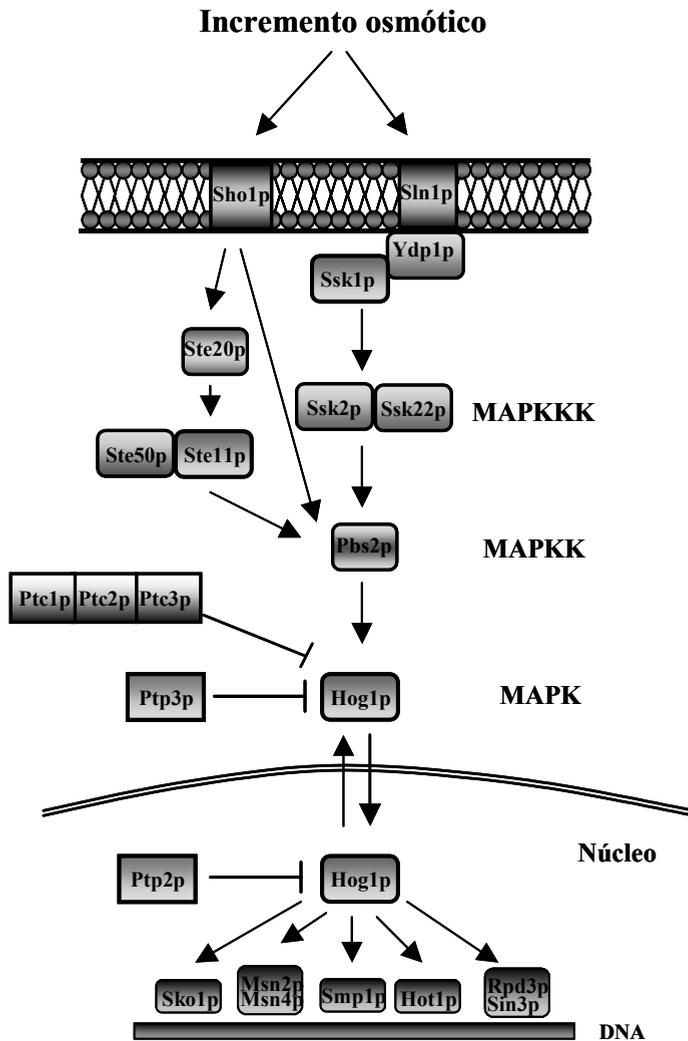


Figura 1. Representación esquemática de la ruta HOG.

Introducción

Por último, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que Hog1p regula la expresión génica, aunque trabajos recientes indican que la MAPK dirige al complejo de la histona desacetilasa Rpd3p-Sin3p a promotores de genes regulados por estrés osmótico (De Nadal y col., 2004).

3.3.2.- La ruta de la calcineurina

En la levadura *S. cerevisiae*, la proteína calcineurina, una Ser-Thr-fosfatasa, esta implicada en diferentes procesos de señalización celular y es esencial para la tolerancia a estrés iónico (Rusnak y Mertz, 2000). Su activación tiene lugar en respuesta a elevaciones del contenido intracelular de Ca^{2+} , vía calmodulina (Nakamura y col., 1993; Mendoza y col., 1994), el receptor más importante de este catión, lo que sugiere que la exposición a NaCl aumenta los niveles de Ca^{2+} (Danielsson y col., 1996).

La calcineurina es en realidad una proteína oligomérica formada por una subunidad A catalítica, codificada por dos genes funcionalmente redundantes, *CNA1* y *CNA2*, y una subunidad B reguladora, codificada por *CNBI* (Cyert y col., 1991; Cyert y Thorner, 1992; Kuno y col., 1991; Liu y col., 1991). La calcineurina controla la expresión génica a través del factor de transcripción Crz1p (Stathopoulos y Cyert, 1997; Matheos y col., 1997; Mendizábal y col., 1998). Crz1p, una proteína con dedos de Zinc, se une de forma específica al DNA, a través del elemento de respuesta dependiente de calcineurina (CDRE). Este elemento es una secuencia de 24 pares de bases que es necesario y suficiente para dirigir la expresión de genes dependientes de calcineurina (Stathopoulos y Cyert, 1997). La actividad de calcineurina defosforila a Crz1p tanto *in vitro* como *in vivo* (Stathopoulos-Gerontides y col., 1999) y determina su localización subcelular. En ausencia de estrés iónico, Crz1p está distribuida por toda la célula, pero cuando aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} se acumula rápidamente en el núcleo

(Stathopoulos-Gerontides y col., 1999). Esta transición es controlada por Nmd5p, una importina nuclear que interacciona con Crz1p (ver Figura 2). Esta unión es sensible al estado de fosforilación de Crz1p (Polizotto y Cyert, 2001). La salida de Crz1p del núcleo está también regulada por su estado de fosforilación y requiere la exportina nuclear Msn5p (Figura 2), la cual se sabe que también exporta el factor de transcripción Pho4p, el de represión Mig1p y Far1p, un regulador del ciclo celular (Boustany y Cyert, 2002; Kaffman y col., 1998; De Vit y Johnston, 1999; Blondel y col., 1999).

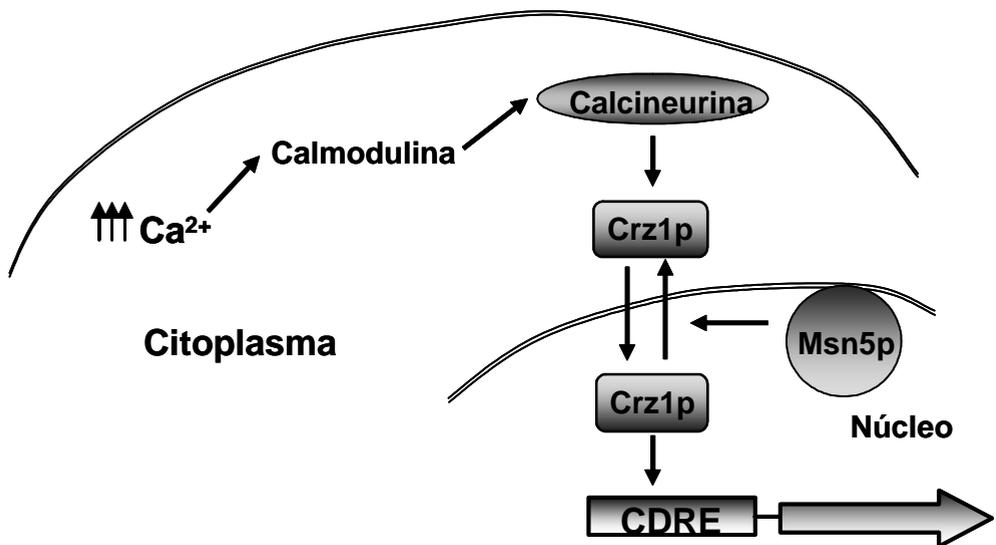


Figura 2. Representación esquemática de la ruta de la calcineurina.

3.4.- Ajuste metabólico y respuesta general a estrés

Como en otras situaciones de estrés, el incremento brusco de la presión osmótica medioambiental, provoca una parada inmediata del crecimiento de *S. cerevisiae*. En consecuencia, numerosos genes implicados en proliferación celular, transporte y anabolismo de aminoácidos (Norbeck y Blomberg, 1998), biosíntesis de nucleótidos, DNA y proteínas (Rep y col.,

Introducción

2000; Posas y col., 2000; Yale y Bohnert, 2001), en particular de proteínas ribosomales, reducen su nivel de expresión. El metabolismo energético es también regulado a la baja con el fin de ajustar la producción de ATP a las menores necesidades de biosíntesis, al igual que el metabolismo redox, ya que la generación de biomasa es la principal fuente de NADPH. Así, un gran número de genes que codifican enzimas de la ruta glicolítica, incluyendo diferentes isoenzimas, así como enzimas de rutas conexas, aparecen regulados al alza o a la baja en condiciones de estrés osmótico (Rep y col., 2000; Posas y col., 2000; Yale y Bohnert, 2001). La transcripción de una buena parte de estos genes es regulada por otras condiciones de estrés, así como por la disponibilidad, tipo y concentración de nutrientes en el medio, a través de un mecanismo de respuesta general a estrés (Estruch, 2000).

La respuesta general a estrés se caracteriza por regular la expresión de genes en cualquier condición ambiental desfavorable. Genes regulados por este mecanismo, como *CTT1*, *HSP104*, *CYC7* o *TPS1*, parecen tener en su promotor una secuencia común, llamada STRE (CCCCT, en cualquier orientación) a la que se unen los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (Martínez-Pastor y col., 1996; Görner y col., 1998). La transcripción mediada por el elemento STRE, está regulada por los niveles de cAMP a través de la ruta Ras/Proteína quinasa A (PKA) (Varela y col., 1995). Esta ruta regula el metabolismo de carbohidratos de reserva, glucógeno y trehalosa, las rutas glicolítica y gluconeogénica y la respuesta a estrés (Thevelein y col., 1994; Estruch, 2000). En condiciones óptimas de crecimiento, la activación de la ruta regula positivamente la proliferación celular y negativamente la respuesta a estrés. Así, una elevada actividad PKA parece dirigir la exportación de los factores Msn2p/Msn4p desde el núcleo al citosol, mientras que la señal de estrés dispararía la entrada de

éstos al núcleo (Görner y col., 1998). Además, en condiciones de estrés osmótico, algunos genes con elementos STRE requieren para su inducción la activación de la ruta HOG (Rep y col., 2000). Como se mencionó anteriormente, existen numerosas evidencias de una conexión funcional entre Hog1p y Msn2p/Msn4p (Alepez y col., 2001). Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de los mecanismos de respuesta a estrés y la existencia de interconexiones entre factores específicos y generales.

3.4.1.- Mecanismos adicionales

La actividad PKA aparece pues como el elemento central que conecta entre sí la respuesta a estrés y la proliferación celular. No obstante, existen numerosas evidencias de la existencia de mecanismos de regulación adicionales en la respuesta a estrés osmótico y de conexiones entre rutas de respuesta a estrés y efectores regulados por nutrientes (revisado en Hohmann, 2002). Por ejemplo, el gen *HXT1* que codifica un transportador de glucosa de baja afinidad es inducido por estrés osmótico, en una forma dependiente de la ruta HOG (Rep y col., 2000). Sin embargo su expresión no es regulada por los niveles de PKA (de Winde y col., 1996). Por el contrario, la inducción de *HXT1* por glucosa y estrés osmótico parece depender de la regulación coordinada de la ruta HOG y de la ruta general de inducción por glucosa (Tomas-Cobos y col., 2004). La primera modularía la actividad del complejo represor Sko1p-Tup1p-Ssn6p, mientras la segunda activaría el factor transcripcional Rgt1p. Esto revela que rutas caracterizadas como específicas de estrés pueden tener un papel funcional en respuesta a nutrientes y viceversa. Sin embargo, no existen evidencias de si la señal de estrés es transferida a estas rutas, a través de elementos comunes, o si la exposición a estrés osmótico genera señales de diferente naturaleza, que a su vez activan diferentes respuestas.

Introducción

La exposición a estrés osmótico genera en *S. cerevisiae* una reducción brusca en la tasa de transporte de aminoácidos (Norbeck y Blomberg, 1998). Este efecto debería disparar una señal de agotamiento de nitrógeno, y la consecuente respuesta transcripcional. Por otra parte, elementos centrales de rutas de regulación por nutrientes parecen jugar un papel fundamental en la respuesta de genes que controlan la tolerancia a estrés osmótico.

El gen *ENA1* codifica para una ATPasa involucrada en la expulsión de algunos cationes, como Li^+ y Na^+ , al exterior celular (Haro y col., 1991; Wieland y col., 1995). Su expresión está muy regulada a nivel transcripcional. Aumenta ante un estrés salino (Garcia-deblas y col., 1993), pero también por falta de glucosa en el medio (Alepez y col., 1997; Ríos y col., 1997). La inducción de *ENA1* por estrés salino está controlada por la ruta HOG, a través del represor Sko1p (Proft y Serrano, 1999) y por la ruta de la calcineurina, mediante el activador Crz1p (Stathopoulos y Cyert, 1997; Matheos y col., 1997; Mendizábal y col., 1998). Estudios recientes han demostrado la relación entre el estrés salino y la ruta TOR (Kawai y col., 2001), una ruta implicada en el control del crecimiento en respuesta a nutrientes (Beck y Hall, 1999). Además, la expresión de *ENA1* es controlada por la ruta de represión por glucosa, que modula el complejo represor general *MIG1-SSN6-TUP1* (Alepez y col., 1997; Proft y Serrano, 1999).

En consonancia con esto, el producto del gen *SNF1*, una proteína quinasa clave en el proceso de represión por glucosa (ver más adelante) parece estar también involucrado en la respuesta a estrés osmótico. Así, células de la cepa mutante *snf1*, muestran un claro defecto de crecimiento en medios conteniendo 1.2 M de NaCl (Alepez y col., 1997). En la misma línea, una cepa mutante que carece de las proteínas Std1p y Mth1p, las cuales son requeridas para la activación de Snf1p, muestra una sensibilidad exacerbada a NaCl (Schmidt y col., 1999). Por el contrario, la activación de Snf1p

debido a la ausencia de reguladores negativos como Reg1p o Hxk2p, o a la sobre-expresión de Std1p, resultan en un fenotipo de mayor tolerancia a estrés osmótico (Ganster y col., 1998). Por último, también se ha descrito que la exposición de células a altas concentraciones de NaCl induce la fosforilación de Snf1p (McCartney y Schmidt, 2001). Sin embargo, no existen evidencias de qué proteína quinasa está implicada en este proceso de activación, ni de qué proteínas modulan la actividad de Snf1p en respuesta a estrés osmótico. Tampoco es claro qué dianas moleculares son sensibles a la actividad Snf1p y cual es el origen, ni la naturaleza, de la señal que activa Snf1p.

3.5. - El proceso de represión por catabolito

La levadura *S. cerevisiae* prefiere la utilización como fuente de carbono de monosacáridos fácilmente fermentables, entre ellos glucosa, fructosa o manosa. La presencia de estos azúcares hace que la síntesis de enzimas necesarias para la utilización de otras fuentes de carbono, como maltosa, galactosa, glicerol o etanol, sea muy baja o inexistente. A este fenómeno se le denomina represión por catabolito o represión por glucosa (revisado en Gancedo, 1998).

La ruta de represión por glucosa controla además la expresión de genes implicados en la síntesis de carbohidratos de reserva, gluconeogénesis (p.e. *PYCI*, *FBP1*, *PCK1*, *CAT8*), respiración, ciclo del glioxalato, ciclo de los ácidos tricarbónicos y β -oxidación de ácidos grasos (Gancedo, 1998).

3.5.1. - El complejo de la proteína quinasa Snf1p

Snf1p es la proteína quinasa clave en la respuesta celular a cambios en la calidad y cantidad de la fuente de carbono disponible. El gen *SNF1* codifica para una Ser-Thr proteína quinasa esencial para la desrepresión de genes

Introducción

reprimidos por glucosa (Carlson y col., 1984; Ciriacy, 1979; Zimmermann y col., 1977). Forma un complejo constituido por tres subunidades, una subunidad α (catalítica) Snf1p, una subunidad β formada por Sip1p, Sip2p o Gal83p, y una subunidad γ codificada por *SNF4*. El complejo se mantiene asociado por la interacción de las subunidades β con Snf1p y Snf4p. La interacción con Snf4p se realiza a través del dominio ASC, que es una secuencia de unos 80 aminoácidos identificada en la zona c-terminal de Sip1p, Sip2p y Gal83p. Por su parte, la interacción con el dominio regulador de Snf1p se produce a través de un dominio interno, denominado KIS. Así, la pérdida de estas tres proteínas impide la asociación de Snf4p con Snf1p en extractos celulares (Yang y col., 1992, 1994; Jiang y Carlson, 1997) y la desregulación de genes reprimidos por glucosa.

Aunque cualquiera de las tres subunidades β es suficiente para dirigir la fosforilación de Mig1p, el principal factor transcripcional involucrado en el proceso de represión por catabolito, la activación de la síntesis de invertasa y el crecimiento en rafinosa (Schmidt y McCartney, 2000), cada una de ellas parece tener un papel específico en la regulación de la función del complejo Snf1p. Así, cada subunidad β regula de forma diferencial la localización subcelular de Snf1p en función de la cantidad y tipo de fuente de carbono. En células crecidas en fuentes de carbono no fermentables, como etanol o glicerol, Gal83p dirige a Snf1p al núcleo, Sip1p lo dirige a la vacuola y Sip2p lo mantiene en el citoplasma (Vincent y col., 2001). Gal83p es requerida para la activación y fosforilación, dependiente de Snf1p, de Sip4 en respuesta a condiciones limitantes de glucosa (Vincent y Carlson, 1999). Sip4p es un activador transcripcional que se une a promotores de genes gluconeogénicos (Vincent y Carlson, 1998). El complejo Snf1p-Sip2p está implicado en envejecimiento (Ashrafi y col., 2000; Lin y col., 2003) y también en crecimiento invasivo junto a Snf1p-Gal83p (Vyas y col., 2003).

Por su parte la interacción de Snf1p con Snf4p es esencial en la regulación de la actividad quinasa del complejo. Snf1p tiene dos dominios, un dominio catalítico en la zona amino terminal de la proteína (KD), y un dominio regulador en la zona carboxi-terminal (RD). En condiciones de alta concentración de glucosa el dominio regulador de Snf1p se une al catalítico inhibiendo la actividad quinasa. A bajas concentraciones de glucosa, Snf4p interacciona con el dominio regulador contrarrestando su efecto inhibitorio (Jiang y Carlson, 1996). Un mutante *snf4* es incapaz de desreprimir genes controlados por represión por catabolito (Entian y Zimmermann, 1980; Neugeborn y Carlson, 1984). La proteína fosfatasa Glc7p-Reg1p interacciona con el dominio catalítico de Snf1p cuando la quinasa está activa y facilita un cambio conformacional de la quinasa hacia el estado de autoinhibición (Ludin y col., 1998).

3.5.2.- El complejo represor Mig1p-Tup1p-Ssn6p

Una vez activado y translocado al núcleo, Snf1p fosforila y así inactiva al represor transcripcional Mig1p (Östling y Ronne, 1998; Treitel y col., 1998; Smith y col., 1999), una proteína con dedos de zinc C_2H_2 , capaz de unirse a los promotores de una gran variedad de genes reprimidos por glucosa (Gancedo, 1998). *MIG1* fue clonado como un inhibidor en multicopia de la expresión de genes *GAL* (Nehlin y Ronne, 1990) y su actividad represora depende de las proteínas Tup1p y Ssn6p (Cyc8p), con las que forma un complejo co-represor de alto peso molecular (Varanasi y col., 1996). Este complejo es transportado a los promotores de diferentes genes, interaccionando con diferentes proteínas de unión al DNA (Treitel y Carlson, 1995; Tzamarías y Struhl, 1995; Keleher y col., 1992).

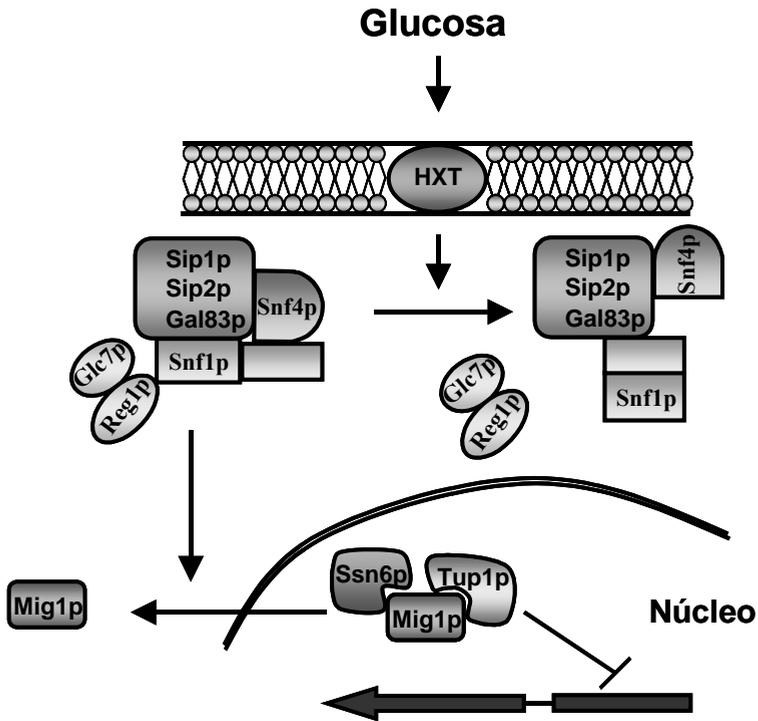


Figura 3. Representación esquemática de la ruta de represión por catabolito

La fosforilación de Mig1p es esencial para el proceso de desrepresión, ya que una forma mutada de Mig1p incapaz de ser fosforilada, mantiene el proceso de represión aún en ausencia de glucosa (De Vit y Johnston, 1999). Además, el estado de fosforilación de Mig1p determina su localización subcelular. En condiciones de alta concentración de glucosa Mig1p está localizada en el núcleo, mientras que en condiciones de baja concentración Mig1p es transportada al citoplasma. Este proceso depende de Snf1p, ya que en un mutante *snf1*, Mig1p permanece en el núcleo (De Vit y col., 1997) y de Msn5p, un miembro de la familia β -importinas de receptores de transporte nuclear. *MSN5* se identificó en un rastreo genético como supresor en multicopia de la falta de invertasa en un mutante *snf1* (Estruch y Carlson, 1990). Esta proteína media la salida del núcleo de Mig1p después de haber

sido fosforilada. La delección del gen *MSN5* permite una fosforilación normal de Mig1p, pero impide su salida del núcleo (De Vit y Johnston, 1999).

3.6.- La conexión Snf1p–Msn2p/Msn4p y la respuesta a estrés osmótico

Al igual que en el caso de *MSN5*, el gen *MSN2* fue aislado como supresor en multicopia del defecto de crecimiento en rafinosa de mutantes termosensibles del gen *SNF1*. De manera similar, la expresión en multicopia de *MSN4* también suprime el fenotipo del mutante *snf1* (Estruch y Carlson, 1993). Estos resultados sugieren que los factores Msn2p/Msn4p participan, directa o indirectamente, en la activación, dependiente de Snf1p, de genes regulados por glucosa.

Por otra parte, un buen número de genes inducidos en condiciones de estrés osmótico, por ejemplo *GLK1*, *TPS1* o *TPS2*, están regulados, a altas concentraciones de glucosa, por el mecanismo de represión por catabolito. A su vez, la inducción de la mayoría de estos genes por estrés osmótico muestra una fuerte dependencia de los factores Msn2p/Msn4p (Rep y col., 2000). De nuevo, estos resultados sugieren una conexión funcional entre Snf1p y los factores nucleares Msn2p y Msn4p en la respuesta a estrés osmótico. Esta conexión podría explicar el defecto de crecimiento mostrado por un mutante *snf1* en medios hiper-osmóticos. No obstante, estamos lejos de conocer los mecanismos que determinan el papel funcional de la proteína quinasa Snf1p, y sus subunidades reguladoras, en estrés osmótico, la posible implicación de la actividad PKA en esta función y la respuesta genética que determina su actividad.

Introducción

4.- Levaduras no-convencionales y estrés osmótico: *Torulaspora delbrueckii*

La capacidad para producir gas y dotar de volumen a la masa panaria no es exclusiva de estirpes de *S. cerevisiae*. Otras especies de levadura parecen estar dotadas de la habilidad para proliferar y desarrollar un metabolismo fermentativo en masas panarias (Hahn y Hawaii, 1990; Almeida y Pais, 1996a). Entre ellas, destacan especies como *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranaefaciens* o *Torulaspora delbrueckii*. Algunas cepas de *T. delbrueckii*, han sido caracterizadas, además, como tolerantes a la congelación (Almeida y Pais, 1996b) y son en la actualidad, comercializadas en Japón para su uso en la fermentación de masas congeladas.

4.1.- Características genéticas y morfológicas

La levadura *Torulaspora delbrueckii* se encuentra frecuentemente en bebidas alcohólicas, zumos de fruta y alimentos con alto contenido en azúcares (Esteve-Zarzoso y col., 2001). Está clasificada en un taxón distinto al de *S. cerevisiae* debido, entre otras, a las diferencias existentes en el modo de aparición de las ascas (Vaughan-Martin y Martini, 1998). Muestra, mediante técnicas electroforéticas, seis cromosomas de un tamaño que oscila entre 800 y 1600 Kb (Oda y Tonomura, 1995). Su morfología es globular-oval y es de menor tamaño que las levaduras comerciales de panadería de *S. cerevisiae*. A pesar de estas diferencias, se sabe por comparación de secuencias que *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* están relacionadas filogenéticamente (James y col., 1996; Oda y col., 1997; Belloch y col., 2000).

4.2.- *Torulaspora delbrueckii* y su papel en la industria panadera

T. delbrueckii presenta una gran variabilidad en su habilidad para fermentar y asimilar diferentes compuestos como fuente de carbono, entre ellos galactosa o maltosa (Kurtzman, 1998). Esto supone una gran desventaja, ya que un rasgo muy importante que determina la capacidad fermentativa de las cepas comerciales de panadería, es su nivel de actividad maltasa e invertasa. Esto explicaría porque cepas de *T. delbrueckii* aisladas en la naturaleza y caracterizadas como resistentes a diferentes condiciones de estrés han sido descartadas para su utilización en panadería (Oda y Tonomura, 1993). Otra desventaja para la industria es que las células de *T. delbrueckii* son, en general, de menor tamaño que las de las cepas de levadura de panadería de *S. cerevisiae*. Este menor tamaño, causa problemas para separar, mediante filtración, la biomasa producida del resto de medio de cultivo durante su propagación industrial.

A pesar de estos inconvenientes, la excepcional habilidad de algunas cepas de *T. delbrueckii* para hacer frente a diferentes situaciones de estrés, ha generado un enorme interés por caracterizar nuevos aislados que combinen resistencia a estrés y elevada capacidad fermentativa. En esta línea, dos cepas de *T. delbrueckii*, PYCC5321 e PYCC5323, aisladas de masas agrias de maíz (Almeida y Pais, 1996a) han sido caracterizadas como extraordinariamente resistentes a congelación, en comparación con cepas comerciales de panadería (Almeida y Pais, 1996b; Hernández-López y col., 2003a). Estas cepas muestran además, una elevada resistencia a estrés osmótico y a la toxicidad del Na^{2+} , unido a una alta capacidad fermentativa tanto en masas saladas como dulces (Hernández-López y col., 2003a). Además, la aplicación de esta levadura en la industria panadera tendría muchas ventajas ya que se podría usar una misma cepa para varias aplicaciones (Revisado en Rández-Gil y col., 2003).

Introducción

4.3.- *Torulaspora delbrueckii* como organismo modelo

A pesar de que la utilización en la industria panadera de nuevas levaduras resistentes a estrés resolvería muchos de los problemas actuales de este sector agroalimentario, lo cierto es que existe una resistencia latente de los industriales por alterar sus, bien establecidos, procesos de producción. La introducción de una nueva levadura en las plantas de propagación requiere de un estudio profundo de sus características fisiológicas, en particular en condiciones de fed-batch. Así, rampas de alimentación, condiciones de aireación, volúmenes de trabajo, etc. deben ser reconducidos y adaptados para producir en alto rendimiento un microorganismo de escaso valor añadido. Por otra parte, los consumidores también parecen reacios a cambios, incluso cuando los beneficios parecen claros.

En este contexto, la aplicación biotecnológica de cepas de *T. delbrueckii* en el sector de panadería y bollería está lejos de producirse, al menos en el mercado occidental. No obstante, es obvio el interés tanto industrial como académico por este organismo, y en particular por utilizarlo como organismo modelo de levadura de panadería, paradigma de la resistencia a estrés. Así, es posible identificar genes de esta levadura capaces de alterar mediante sobreexpresión, la tolerancia a estrés de levaduras de *S. cerevisiae* y crear, por tanto, cepas recombinantes adaptadas a las necesidades industriales. Es posible también, sobre la base de estos resultados, identificar nuevos genes de *S. cerevisiae*, implicados en resistencia a estrés, y estudiar el mecanismo que subyace a esta respuesta y los elementos implicados en ella. El estudio de la respuesta transcripcional a estrés en este organismo y su comparación con la observada en levaduras industriales de *S. cerevisiae*, podría permitirnos identificar grupos de genes, cuya regulación coordinada determina la capacidad para hacer frente a un estrés.

Estas posibilidades dependen, entre otras, de la existencia de herramientas moleculares que nos permitan la manipulación de *T. delbrueckii*, y de nuestro conocimiento de la fisiología y la genética de esta levadura no convencional. Sin embargo, el estudio de esta levadura se ha centrado, casi exclusivamente, en aspectos filogenéticos y biotecnológicos, dejando al margen el desarrollo de cepas y herramientas adecuadas para su transformación. Para superar este obstáculo, se ha construido en nuestro laboratorio una genoteca de este organismo, se ha aislado y clonado el gen *URA3*, usado habitualmente como marcador molecular (Hernández-López y col., 2002), y se ha llevado a cabo la interrupción de este gen, logrando seleccionar una cepa auxótrofa para uracilo de la cepa PYCC5321 (Hernández-López y col., 2003b). No obstante, es necesario seguir este camino, aislando nuevos genes que puedan ser utilizados como marcadores de selección y generando una mayor variedad de cepas auxótrofas.

Objetivos

En este trabajo nos hemos planteado la utilización de *Torulaspota delbrueckii* como modelo de levadura de panadería resistente a estrés osmótico. En primer lugar, hemos aislado y caracterizado genes que puedan ser utilizados como marcadores de selección y hemos construido las correspondientes cepas auxótrofas. Además, hemos prestado especial atención, a la identificación de genes de *T. delbrueckii* capaces de conferir resistencia a estrés osmótico en *S. cerevisiae*. Finalmente, nos hemos centrado en el fenotipo conferido por la sobreexpresión de estos genes y hemos tratado de dilucidar las bases moleculares del mismo.

Por tanto los objetivos que plantea el trabajo son los siguientes:

- 1.- Desarrollar herramientas moleculares de aplicación en la levadura *Torulaspota delbrueckii*, aislando y caracterizando genes que codifican para marcadores auxotróficos y obtener cepas de esta levadura interrumpidas para estos genes.
- 2.- Identificar genes de *Torulaspota delbrueckii* capaces de conferir, mediante sobreexpresión, resistencia a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3.- Estudiar y analizar, a nivel molecular, el fenotipo conferido en *Saccharomyces cerevisiae* por la sobreexpresión de genes de *Torulaspota delbrueckii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cepas

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para las construcciones de plásmidos ha sido la DH10B. Las cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas se detallan en la Tabla I y las de *Torulasporea delbrueckii* en la Tabla II.

Tabla I.- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia
CEN.PK2-1C	<i>MATa, ura3-52, his3-Δ1, leu2-3,112, trp1-289, MAL 2-8^c, SUC3</i>	Entian y Kötter, 1998
<i>CEN.PK130-7B snf1</i>	<i>MATα, ura3-52, his3-Δ1, leu2-3,112, trp1-289, snf1Δ::HIS3, SUC2</i>	Cedido por P. Kötter
CEN.PK2-1C <i>tup1</i>	<i>MATa, ura3-52, his3-Δ1, leu2-3,112, trp1-289, MAL 2-8^c, SUC3, tup1::loxP-kanMX-loxP</i>	Cedido por P. Kötter
ASY832	<i>MATa, lys2-801, ade2-101, trp-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, ura3::trp1-4xCDRE-lacZ</i>	Jiang y Cyert, 1999
ASY833	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp-Δ63, his3-Δ200 leu2-Δ1 cnb1::hisG</i>	Jiang y Cyert, 1999
ASY834	<i>MATa, lys2-801, ade2-101, trp-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, ura3::TRP1-4xCDRE-lacZ crz1::loxP-kanMX-loxP</i>	Jiang y Cyert, 1999
ASY832 <i>snf1</i>	<i>MATa, lys2-801, ade2-101, trp-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1, ura3::TRP1-4xCDRE-lacZ, snf1Δ::NatMx4</i>	Este trabajo
MSY182	<i>MATa ura3-52, leu2Δ1, trp1Δ63, his3Δ200</i>	Ganster y col., 1998
MSY528	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 sip1Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY520	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 sip2Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY522	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63 his3Δ200 gal83Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY558	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 sip1Δ::HIS3 sip2Δ::HIS3 gal83Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY545	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 sip1Δ::HIS3 sip2Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY552	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 sip1Δ::HIS3 gal83Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000
MSY543	<i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 sip2Δ::HIS3 gal83Δ::HIS3</i>	Schmidt y McCartney, 2000

Materiales y métodos

Tabla II.- Cepas de *Torulaspora delbrueckii* utilizadas en este trabajo.

<i>Cepa</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Procedencia</i>
PYCC5321	Aislada de masas de pan de trigo y centeno	Almeida y Pais 1996a
PYCC5323	Aislada de masas de pan de trigo y centeno	Almeida y Pais 1996a
PYCC5321 <i>leu2</i>	<i>leu2::natMx4</i>	Este trabajo
PYCC5323 <i>leu2</i>	<i>leu2::natMx4</i>	Este trabajo
PYCC5321 <i>sip1</i>	<i>sip1::natMx4</i>	Este trabajo

2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.1.- Bacterias

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C. Cuando las bacterias se crecieron en medios líquidos, se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital. Los medios utilizados fueron:

LB (Luria Bertani): extracto de levadura 0,5%, bacto triptona 1% y NaCl 1%. Si se añade al medio LB 50mg/L de ampicilina tenemos LBA, que se utiliza para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que contienen el gen de resistencia a ampicilina *Ap^R*. Para la selección de plásmidos en los que se ha clonado un fragmento de DNA y llevan como marcador de selección el gen *lacZ*, se añaden 50 mg/ml al medio LBA de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) (Promega).

SOC: extracto de levadura 0,5%, peptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM que se adiciona estéril después de haber esterilizado el medio. Se utiliza para recuperar a las bacterias después de haber sido transformadas mediante electroporación.

2.2.- Levaduras

Los cultivos de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* se incubaron a 30°C. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital. Para comparar la resistencia de distintas cepas a condiciones de estrés, las células se crecieron en medio líquido hasta la fase de crecimiento exponencial media. Se recogió una alícuota y se llevó hasta una DO_{600} de 0,25. A partir de ésta, se realizaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} . Se depositaron gotas de 2 μ l de las distintas diluciones sobre placas. Los medios utilizados fueron:

YP: extracto de levadura 1% y bactopectona 2%. Este medio ha sido suplementado con 2% glucosa: YPD, 2% glicerol y 3% etanol: YPG-E, 2% rafinosa YPR, 2% sacarosa YPS, 3% etanol YPE. También se le ha adicionado el antibiótico nourseotricina (ClonNat 50 mg/L) cuando era necesario como medio de selección.

MM (medio sintético completo): Yeast Nitrogen Base 0,2% (sin aminoácidos ni sulfato amónico), $(NH_4)_2SO_4$ 0,5%, glucosa 2%, aminoácidos requeridos por cada cepa a las concentraciones recomendadas por Sherman y col., (1995). A este medio se le ha añadido diferentes concentraciones de NaCl: 0,5 M; 0,7 M; 1,0 M; 1,2 M; 1,5 M o KCl 1,0 M o sorbitol 1,0 M o KOH hasta pH 8,3. En lugar de glucosa también se le ha añadido 2% de glicerol y 3% de etanol.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 2% de agar.

3.- Métodos de manipulación de microorganismos

3.1.- Transformación de bacterias

Células de *E. coli*. fueron previamente convertidas en competentes mediante el protocolo indicado por la casa comercial (Eppendorf) y conservadas a -

Materiales y métodos

80°C. La electroporación se realizó a voltaje constante de 1.700V en un electroporador Eppendorf 2510 con cubetas de 2 mm de separación de electrodos (Eppendorf). Posteriormente se recuperaron las células en medio SOC, para ser luego sembradas en medio LB-Ampicilina sólido, conteniendo 1 mg de X-Gal (Promega) por placa en el caso de selección por color.

3.2.- Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se realizó mediante el protocolo (LiAc/ss.-DNA/PEG) descrito por Gietz y Sugino (1988). El método está basado en la utilización de acetato de litio, DNA “carrier” y polietilenglicol. Para cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* las levaduras fueron sembradas posteriormente al choque térmico a 42° C. En el caso de cepas auxótrofas, las placas de selección fueron suplementadas con los aminoácidos o bases nitrogenadas necesarios. En el caso de transformaciones en las que se utilizaron casetes de interrupción, las levaduras fueron recuperadas tras el choque térmico en YPD durante 4 h, previamente a ser sembradas en las placas con el antibiótico para la selección dominante.

3.3.- Análisis de la inserción del casete de interrupción

Los transformantes no abortivos fueron analizados mediante PCR para comprobar si había tenido lugar la inserción en el lugar correcto del genoma y por lo tanto, la eliminación de la secuencia elegida. Se utilizan dos oligonucleótidos que hibridan en la zona del promotor y del terminador del gen a interrumpir. Si el casete se ha insertado en el lugar correcto, este amplificado tendrá un tamaño distinto al del gen original. También se utilizan oligonucleótidos del interior del casete combinados con oligonucleótidos diseñados en la región del promotor o terminador, tras la

PCR, sólo en los transformantes en los que el casete esté en el sitio correcto veremos un amplificado.

4.- Métodos de manipulación del DNA

4.1.- Obtención de DNA genómico de levadura de cultivo líquido

Para la obtención de DNA genómico, se utilizó el método descrito por Hoffman y Winston (1987) que consiste en crecer un cultivo de levadura en 10 ml de YPD o/n y recoger las células por centrifugación. Las células se resuspenden en 100 µl de agua, se les añade 200 µl de tampón de lisis [2% tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM Na₂-EDTA], 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 500 µl de perlas de vidrio (425-600 µm de diámetro, Sigma). Tras romper las células mediante agitación con el vortex a intervalos de 30 s durante 2 min dejándolo enfriar en hielo otros 30 s entre cada intervalo, se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 5 min y se recoge la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitan por adición de 1 ml de etanol absoluto frío. Se centrifuga de nuevo a 12.000 r.p.m. durante 15 min y se resuspende el precipitado en 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM) con 3 µl de RNasa A (10 mg/ml). Se incuba 30 min a 37°C. Tras añadir 4 µl de acetato amónico 4 M y 1 ml de etanol absoluto, se recoge el precipitado por centrifugación y se resuspende en 50 µl de TE.

4.2.- Obtención de DNA genómico de levadura de una colonia aislada

También se ha obtenido DNA genómico a partir de una colonia aislada de levadura para comprobar la correcta interrupción de un determinado gen. Para ello, se ha utilizado un protocolo basado en el descrito por Huxley y col. (1990) con algunas modificaciones. Una colonia se resuspenden en 50

Materiales y métodos

μl de tampón 0,01 M de Tris-HCl ajustado a pH 8,0 que contiene 1 mg/ml de zimoliasa y 5 mM de DTT. La mezcla se incuba durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifuga a 6.000 r.p.m. durante 2 min, se desecha el sobrenadante y el precipitado se hierve en un baño durante 10 min. Posteriormente se resuspende en 50 μl de tampón 0,01 M de Tris-HCl ajustado a pH 8,0. Tras centrifugar de nuevo, se recupera el sobrenadante conteniendo el DNA.

4.3.- Obtención de DNA plasmídico de *E. coli*

Se crecen las células transformadas de *E. coli* en 2 ml de medio LBA o/n y se extrae el plásmido mediante el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979). Para obtener una cantidad de plásmido mayor, se ha utilizado un procedimiento derivado de éste descrito en Sambrook y col. (1989), reajustando las cantidades de las soluciones y tampones utilizados al volumen de cultivo empleado (50 ml).

4.4.- Obtención de DNA plasmídico de levadura

Para la extracción de plásmidos de levadura, se ha seguido el método descrito por Robzyk y Kassir (1992) partiendo de 1,5 ml de un cultivo saturado en MM selectivo. En todos los casos, el DNA plasmídico obtenido se resuspende en un volumen adecuado, generalmente 20-50 μl de agua estéril.

4.5.- Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo según procedimientos estándar (Sambrook y col., 1989). Esta metodología se ha empleado para la clonación y subclonación de algunos genes, para la comprobación de

deleciones y para la síntesis de sondas que más tarde serían marcadas con ³²P. El volumen final de la reacción ha sido de 50 µl usando 100 ng de DNA genómico o plasmídico como molde, o bien 25 µl de lisado celular en el caso de PCR a partir de colonia. Por otro lado se añadía 1 µl de cada oligonucleótido (25 µM), 1 µl de dNTP (0,25 M), 2 µl de MgCl₂ y 5 µl de tampón (10X) proporcionado por la casa comercial. Tras realizar un pulso de desnaturalización inicial de 3 min a 94° C comienzan los ciclos de la PCR.

El número de ciclos, así como el tiempo y temperatura utilizados en la separación de las hebras, unión de los oligonucleótidos y elongación varía según el fragmento a amplificar. En todos los casos se realiza una elongación final de 5 min a 72°C. El resultado de la PCR es posteriormente analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. En la Tabla III se describen los distintos cebadores utilizados para las ampliificaciones.

Tabla III. - Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Uso
MJH-1	TCCAGTTTAGTGTACGGCT	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-2	TGGTCTTTGATCGTCGA	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-3	TAATGATGTGCCTTCTACCA	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-4	TTACCACGCAAATTGTAC	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-5	GTCTTCCTTGTCATGGCTC	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-6	TCGTTCTCACCAGATGCA	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-7	CAACCAGCAGATCACAAAC	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-8	CGCCTTGGGTACGATCA	Secuenciación YEpTdHIS-1
MJH-9	TACCACCGGAGGATTCAC	Secuenciación YEpTdHIS-1
EAA-1	T(AG)GT(GT)GG(AT)GGTATCTACT T	Clonación <i>TdLEU2</i>
EAA-2	AATGA(CT)AA(CT)TTCAACATCAT AGC	Clonación <i>TdLEU2</i>
EAA-3	TCGGTGAAAGAAAAGAGG	Clonación <i>TdLEU2</i>
EAA-4	AACATCATAGCTGCCGATA	Clonación <i>TdLEU2</i>
EAA-5	CTGAGGAAGCGGATGTAA	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-6	TTCACACCTTCTTGCATA	Secuenciación YEpTdLEU-1

Materiales y métodos

Tabla III- Continuación

EAA-7	TAGTCTCTGGTCTAACAA	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-8	CTGTTCCTCCTTGATGAA	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-9	GCTCATGACTAAATGGAT	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-10	CCTTTGAAGGCTCAATAC	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-11	CCTCTTTTCTTTACCGA	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-12	GTAAAGTGAACCCAGTCG	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-13	TTACCTAAGGCATGTAGA	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-14	TACACTTTATGCTTCCTG	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-15	CAGCTGCACCACTTCAAC	Secuenciación YEpTdLEU-1
EAA-16	TCATGGATCCGTTGCTA	Subclonación <i>TdLEU2</i> para comprobación funcionalidad
EAA-17	CCATCACTGCAGGTGTGA	Subclonación <i>TdLEU2</i> para comprobación funcionalidad
EAA-18	CAGATACCGGGCCGTAAC	Subclonación <i>TdLEU2</i> para delección
EAA-19	TTCATTCATGTTAAGCTA	Subclonación <i>TdLEU2</i> para delección
MJH-10	TGCTACTGAAAAGACAAGG	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-11	TGAGTCCTTGCCTATCGC	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-12	GCTTACAGGCGAGGAATT	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-13	GCTGCACCAACAGACAAAG	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-14	CCT CGTTCGCTTTGACA	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-15	CAGGATATCAAGGGTAAGCT	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-16	GCCTGTTTTGCCATTGGT	Secuenciación YEpTdSAL-1
MJH-17	TCATGCATGGAGACAAGGT	Secuenciación YEpTdSAL-2
MJH-18	CGTCTGCAGTATGAGGAAA	Secuenciación YEpTdSAL-2
MJH-19	TACCACCGGAGGATTCAC	Secuenciación YEpTdSAL-2
MJH-20	CGCCTTGGGTACGATCA	Secuenciación YEpTdSAL-2
EAA-20	TGAGCGAACAAGTGCAA	Sonda <i>DED1</i>
EAA-21	CAACATTCTATCAGCTTC	Sonda <i>DED1</i>
MJH-21	TCGGCTTCTTGATATTTG	Secuenciación YEpTdSAL-3
MJH-22	GCCATCAGCAACAGACTCC	Secuenciación YEpTdSAL-3
MJH-23	CGCTGCCTGTGATTCTTA	Secuenciación YEpTdSAL-3
MJH-24	ATTCCCAACTCCACCACC	Secuenciación YEpTdSAL-3
MJH-25	CTTGTCTGTTGGTGCAGC	Secuenciación YEpTdSAL-3
EAA-22	GGCTCACGACAATGGATCCAAT	Subclonación <i>TdSIP1-t</i>
EAA-23	CCATAGAAAGCTTGAAAAGGGT	Subclonación <i>TdSIP1-t</i>
EAA-24	GGAAGGGTCTTCAATTTG	Secuenciación YEpTdSAL-3b
EAA-25	CCCATCATCACTAATATC	Secuenciación YEpTdSAL-3b
EAA-26	GTGCTGCGAAGTGAATAA	Secuenciación YEpTdSAL-3b
EAA-27	TCGGCTTCTTGATATTTG	Comprobación interrupción <i>TdSIP1</i>
EAA-28	ACGGATTGGCTCACGACA	Comprobación interrupción <i>TdSIP1</i>
EAA-29	TCTTGCATCTGAATTCTCTACC	Clonación <i>SIP2</i>

Tabla III- Continuación

EAA-30	AAATCAATCTGCAGCTCTTCC	Clonación <i>SIP2</i>
EAA-31	CGAAATCTAGGAGGAATT	Clonación <i>GAL83</i>
EAA-32	CGGATCTTCATCTTTAGA	Clonación <i>GAL83</i>
EAA-33	CAAGTGTAATAGGCTACG	Sonda <i>CSG2</i>
EAA-34	GACTACAGCAGAATTTTC	Sonda <i>CSG2</i>
EAA-35	AACCAGAGTTTCAGCAGG	Sonda <i>GDH3</i>
EAA-36	AATGCCCGTCTCAGAGAT	Sonda <i>GDH3</i>
EAA-37	CTGATCATCCAGAAACAG	Sonda <i>MAL12</i>
EAA-38	CAACTTCACCGACTGTCA	Sonda <i>MAL12</i>
IPPI	AAGGATGGTAAGCCAGTTTCTGC C	Sonda <i>IPPI</i>
IPP2	TTGTCAATTGGAGCATCTGCC	Sonda <i>IPPI</i>
EAA-39	ATGAGCAGTAACAACAACACAAA CACAGCACCTGCCAATGCGTACG CTGCAGGTCGAC	Interrupción <i>SNF1</i>
EAA-40	AGAAACAGTAGTATCATCTCCAT AACTACTTTCCAGCCGATCGATG AATTCGAGCTCG	Interrupción <i>SNF1</i>
EAA-41	AGTCATTCAGGAAGTATA	Comprobación interrupción <i>SNF1</i>
EAA-42	CTACTCATGATGATCACC	Comprobación interrupción <i>SNF1</i>
RB-SphI	ATGACCATGATTACGCCAA	Primer universal secuenciación
Forward-20	GTAAAACGACGGCCAGT	Primer universal secuenciación
M5	TACAGATGAGATGGTCAG	Comprobación interrupciones
M6	CACTCATGGTGATTTCTC	Comprobación interrupciones
KANS2	GTCAAGGAGGGTATTCTGG	Comprobación interrupciones

4.6.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración del 1%. Los geles se prepararon en tampón TAE (Tris 40 mM; ácido acético glacial 4 M; EDTA 1 mM; pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (20% Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1% SDS; 0,25% azul de bromofenol) y su uso como patrón de tamaño molecular DNA del fago ϕ digerido con *Pst*I. El voltaje utilizado fue de entre 5-10 V/cm.

Materiales y métodos

4.7.- Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 1% y con tampón TAE. Una vez separado el bloque del resto del gel, éste se calienta a 70° C durante 5 min y a continuación se realiza la purificación mediante fenolización y precipitación del DNA.

4.8.- Clonación

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega), realizando la reacción de ligación durante 1 h a temperatura ambiente. La clonación en vectores de expresión de levadura se llevó a cabo mediante digestión enzimática del vector y del fragmento de DNA a clonar mediante endonucleasas de restricción (utilizando el tampón y las indicaciones sobre condiciones óptimas de reacción proporcionadas por la casa comercial para cada enzima). En la reacción de ligación se mezclan 50 ng del vector, al menos tres veces más cantidad de inserto, 1 µl del tampón proporcionado por el proveedor y 1 µl de DNA ligasa en un volumen final de 10 µl. La reacción se deja o/n a 16°C. La relación de plásmidos utilizados se encuentra en la Tabla IV.

Tabla IV. - Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
YEplac181	Vector episomal de expresión en levadura, Marcador <i>LEU2</i>	Gietz y Sugino, 1988
YEplac195	Vector episomal de expresión en levadura, Marcador <i>URA3</i>	Gietz y Sugino, 1988
YEplac112	Vector episomal de expresión en levadura, Marcador <i>TRP1</i>	Gietz y Sugino, 1988
YCp33	Vector centromérico de expresión en levadura, Marcador <i>URA3</i>	Gietz y Sugino, 1988
YEpTdHIS-1	Plásmido descrito en el apartado 1.1 del capítulo I que contiene los genes <i>TdHIS3</i> , <i>TdDED1</i> , <i>TdMRP51</i> y parte de <i>TdPET56</i>	Este trabajo

Tabla IV- Continuación

YE _p TdHIS-2	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>TdHIS3</i>	Este trabajo
YE _p TdLEU-1	Plásmido descrito en el apartado 2.3 del capítulo I que contiene los genes <i>TdLEU2</i> , <i>TdNFS1</i> , <i>TdRPL7</i> y parte de <i>TdPET8</i>	Este trabajo
YE _p TdLEU-2	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>TdLEU2</i>	Este trabajo
pGEM-TdLEU2-NatMX4	Plásmido que contiene el módulo de resistencia a nourseotricina con flancos del gen <i>TdLEU2</i> para su delección	Este trabajo
pFA6a-natMX4	Plásmido derivado del vector pSP72 conteniendo el módulo de resistencia a nourseotricina, natMX4	Goldstein y McCusker 1999
p-GEM-TdLEU2	Plásmido p-GEM-T (promega) conteniendo el gen <i>TdLEU2</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-1	Plásmido de la genoteca de <i>T. delbrueckii</i> descrito en el apartado 1.1 (Cap. II) que contiene parte del gen <i>TdENA1</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-2	Plásmido de la genoteca de <i>T. delbrueckii</i> descrito en el apartado 1.2 (Cap. II) que contiene el gen <i>TdDED1</i> y parte de los genes <i>TdMRP51</i> y <i>TdRNR3</i>	Este trabajo
YE _p TdDED-1	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>TdDED1</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-3	Plásmido de la genoteca de <i>T. delbrueckii</i> descrito en el apartado 1.3 (Cap. II) que contiene el gen <i>TdSIP1-t</i> y parte del gen <i>TdGIS4</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-3a	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>TdSIP1-t</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-3b	Plásmido de la genoteca de <i>T. delbrueckii</i> descrito en el apartado 1.3.1 (Cap. II) que contiene el gen <i>TdSIP1</i>	Este trabajo
YE _p TdSAL-3c	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>TdSIP1</i>	Este trabajo
YE _p TdSIP1-natMX4	Plásmido que contiene el módulo de resistencia a nourseotricina con flancos del gen <i>TdSIP1</i> para su interrupción	Este trabajo
pRS909	Plásmido centromérico que contiene una fusión entre el promotor de <i>HAL1</i> y el gen chivato <i>lacZ</i> , con el marcador de selección <i>URA3</i>	Gaxiola y col., 1992
YE _p SIP2	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>SIP2</i>	Este trabajo
YE _p GAL83	Derivado del YE _p lac195 que contiene el gen <i>GAL83</i>	Este trabajo
pRJ216	Plásmido que expresa LexA-Snf1G53R	Kuchin y col., 2000
pSH18-18	Derivado del pLRΔ1 con una fusión GAL1- <i>lacZ</i> en el que las UAS (GAL) se han sustituido por 8 copias del operador LexA	Kuchin y col., 2000
pB44	Derivado del YE _p 24 que contiene el gen <i>SIP1</i> con el marcador <i>URA3</i>	Yang y col., 1992
YE _p TdSIP1-t	Derivado del YE _p lac181 que contiene el gen <i>TdSIP1-t</i>	Este trabajo
YC _p TdSIP1-t	Derivado del YC _p 33 que contiene el gen <i>TdSIP1-t</i>	Este trabajo
YC _p TdSIP1	Derivado del YC _p 33 que contiene el gen <i>TdSIP1</i>	Este trabajo

4.9.- Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación del DNA se llevó a cabo mediante la técnica de terminación de cadena por dideoxi-nucleótidos (Sanger y col., 1977). El programa DNAMAN (Lynnon Biosoft) se utilizó para analizar las secuencias. Se realizaron búsquedas de similaridad en el Instituto Suizo de Bioinformática, usando el programa BLAST (Altschul y col., 1997).

4.10.- Rastreo de la genoteca mediante técnicas de PCR

Transformantes de *E. coli* que contienen la librería genómica de *T. delbrueckii* PYCC5321 se sembraron a una densidad de 1.000 ufc en 10 placas de 90 mm de diámetro. Tras realizar réplicas de estas placas, se recogieron las colonias con 1 ml de agua estéril, se centrifugó y resuspendió en 100 µl de agua estéril. Estas muestras se hirvieron durante 10 min, se enfriaron en hielo y se centrifugaron de nuevo. Una alícuota de 4 µl de este lisado celular se utilizó como fuente de DNA molde para una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos del gen que se quiere clonar. Tras localizar qué placas contienen colonias positivas, estas se replicaron y se procedió a un nuevo ciclo de amplificación por PCR, esta vez utilizando como DNA molde el obtenido de la lisis de células procedentes de uno de los ocho sectores en los que se dividió la placa en la que se detectó la presencia de colonias positivas. Esto nos permitió ir acotando colonias que contuvieran el gen de interés. Cuando el número de colonias en una sección fue menor a 20, se recogieron todas ellas y se comprobó por PCR que colonia contenía el gen de interés. Una vez aislado este clon, se procedió al aislamiento del plásmido siguiendo los procedimientos estándar y el inserto contenido en el plásmido fue secuenciado (Bloem y Yu, 1990).

5.- Métodos de manipulación de RNA

5.1. Extracción de RNA

El RNA total de *S. cerevisiae* se purificó siguiendo el método descrito en Sherman y col. (1986), a partir de muestras de 30 ml de cultivo en fase exponencial. La rotura celular se efectuó empleando bolas de vidrio de 0,4 mm de diámetro, mediante 4 ciclos de 30 s de agitación en un vortex separados por un intervalo de 30 s en hielo. El RNA purificado se resuspendió en 30-50 μ l de agua, y se cuantificó por medida de la absorbancia a 260 nm. El cociente de los valores de absorbancia 260/280 se utilizó como indicativo de la pureza del RNA obtenido.

5.2. Transferencia de RNA a filtros de nylon (Northern)

La separación de especies de mRNA se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, en tampón NBC (50 mM de BO_3H_3 ; 1 mM de citrato sódico, pH 7,5), conteniendo un 2,5% de formaldehído. Se aplicaron 30 μ g de RNA total por pocillo. Para la transferencia del RNA a membranas de nylon (*Hybond-N*, Amersham Pharmacia), se utilizó el método de capilaridad (según Sambrook y col., 1989). Tras secar las membranas a 37°C (30 min), el RNA se fijó mediante exposición a luz UV durante 5 min en un aparato IBI UVH (Internacional Biotechnologies, Inc).

5.3. Marcaje de sondas radiactivas

Se prepararon sondas para visualizar el nivel de transcrito de genes de interés a partir de fragmentos de DNA amplificados por PCR u obtenidos mediante digestión enzimática de plásmidos que los contienen. Estos fragmentos se marcaron con $\alpha^{32}\text{P}[\text{dCTP}]$, utilizando el *Kit* comercial High Prime (Roche) basado en la técnica de hexanucleótidos al azar (Feinberg y

Materiales y métodos

Vogelstein, 1983; 1984), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular con las columnas MicroSpinTM S-300 HR (Amersham Biosciences).

5.4. Hibridación de RNA sobre filtros y cuantificación

La hibridación se llevó a cabo o/n a 42° C con agitación lenta, en solución de hibridación, SSC (5X) (0,75 M de NaCl, 75 mM de citrato de sodio); Denhardt's (5X) (1 mg/ml de BSA, 1 mg/ml de Ficoll 400, 1 mg/ml de PVP); 50% de formamida desionizada; 0,5% de SDS y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón. Tras la hibridación, los filtros se lavaron sucesivamente con SSC (2X), SSC (2X) + 0,1% de SDS, y finalmente, con SSC (0,2X) + 0,1% de SDS. El primer lavado se efectuó a temperatura ambiente mientras que los demás se realizan a 65°C, en agitación. Las membranas se envolvieron en un plástico fino y se expusieron con pantallas Bas-IP MP 2040 (Fuji) a temperatura ambiente. La imagen digital se obtuvo con un analizador de imagen FLA-3000 (Fuji) utilizando el programa Image Gauge Version 3.12 (Fuji). La cuantificación de la señal se realizó con este mismo programa.

6.- Hibridación de filtros de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*

6.1.- Crecimiento de las células y extracción de RNA

Para este experimento utilizamos la cepa CEN.PK2-1C transformada con los plásmidos. Los transformantes crecieron en MMG hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 y se expusieron a una concentración de NaCl de 0,5 M durante 45 min. Tras recoger 15 unidades de DO₆₀₀ se procedió a la extracción de RNA de la forma descrita en el apartado 5.1.

6.2.- Síntesis y marcaje de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 10 µg de RNA total tratado previamente con DNasa RNasa-free (Roche) a 37°C durante 30 min. A la mezcla anterior se le añade 3 µl de hexanucleótidos al azar (500 u/µl) (Roche); 1 µl de inhibidor de RNasa RNAGuardTM (34,9 u/ml) (Amersham biosciences); 2 µl de mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 16 µM y dCTP 100 µM); 4 µl de [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP (10 µCi/µl, Amersham biosciences); 6 µl de tampón (5X), 3 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de transcriptasa inversa RNasaH-SuperscriptTMII (Invitrogene), en un volumen final de reacción de 30 µl.

La reacción se llevó a acabo durante 1 h a 42°C. Las sondas de cDNA se purificaron con una columna de exclusión molecular MicroSpinTM S-300 HR (Amersham Biosciences) y el porcentaje de incorporación de nucleótidos marcados se midió en un contador de centelleo (Wallac 1409). Las sondas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min.

6.3.- Hibridación de filtros

Los filtros fueron suministrados por el Servei Central de Suport a la Investigació (Universitat de València). Se prehibridaron en un horno giratorio (Amersham Pharmacia Biotech) a 42°C durante 3 h en 5 ml de solución de Prehibridación: Formamida 50%, SDS 1%, SSC (5X), Denhart (5X) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (Roche). Transcurrido el tiempo de prehibridación se añade todo el marcaje de cDNA a los tubos y se incuba en el horno giratorio durante al menos 36 h.

6.4.- Lavado, exposición y lectura de los filtros

Los filtros se lavaron primero con la solución de lavado 1 (SSC (2X), 0,1% SDS) a 65°C durante 20 min dos veces, y por último con la solución

Materiales y métodos

de lavado 2 [SSC (0,2X) y 0,1% SDS] a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, los filtros se expusieron envueltos en plástico fino, ya que es importante que no se sequen para favorecer la eliminación de la sonda posteriormente. Se mantuvieron expuestos durante 4 d en pantallas Bas-IP MP 2040.

Para eliminar la sonda de los filtros y poder volver a exponerlos de nuevo, se lavaron con una solución fosfato sódico 5 mM (pH 7) y 0,1% de SDS a 100°C.

Las imágenes se analizaron con el programa ArrayVision. La normalización de los datos se realizó utilizando el lenguaje R que tuvo que ser reprogramado siguiendo los algoritmos del programa SNOMAD (Colantuoni y col., 2002). Para el análisis de los datos obtenidos de la normalización se utilizó la herramienta de red GEPAS (Herrero y col., 2003).

7.- Determinación de actividades enzimáticas

7.1.- Obtención de extractos celulares

Las actividades enzimáticas se determinaron a partir de extractos celulares obtenidos por rotura mecánica de células de levadura. Para medir la actividad β -galactosidasa, se recogieron 10 unidades de DO_{600} de células del cultivo, se lavan con agua y se congelan. Una vez recogidas todas las muestras, se le añade 500 μ l de tampón Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) y 500 μ l de bolas de vidrio de 0,4 mm de diámetro y se agitan en un Vortex a velocidad máxima durante 4 ciclos de 30 s con alternancia en hielo. El sobrenadante obtenido es centrifugado a 12.000 r.p.m. para eliminar los restos celulares y el extracto es conservado en hielo hasta su utilización.

7.2.- Determinación de la actividad β -galactosidasa

El sustrato utilizado para medir la actividad β -galactosidasa fue el o-NPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido). Tras mezclar 100 μ l de este sustrato con 100 μ l de extracto crudo y 400 μ l de tampón Z con una concentración de 40 mM de β -mercaptoetanol, se mantiene la mezcla de reacción durante 20 min a 30°C. La reacción se para con la adición de 500 μ l de Na₂CO₃ 1 M. Se mide la absorbancia a 420 nm. La actividad específica (U/mg proteína) refleja los nanomoles de sustrato hidrolizado por min y mg de proteína. (El coeficiente de extinción molar del o-NPG a 420 nm es de 4,5 cm²/mM).

7.3.- Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos celulares se ha utilizado el reactivo comercial BioRad Protein Assay, usando BSA para la obtención de una recta patrón.

CAPÍTULO I

**Obtención de herramientas moleculares para
el estudio de *Torulaspora delbrueckii***

En los últimos años las técnicas de ingeniería genética han abierto la posibilidad de construir nuevas cepas de levadura de panadería con características mejoradas o capaces de producir proteínas que modifiquen el aroma, la reología de la masa o la vida media del pan (para una revisión ver, Rández-Gil y col., 2003). Un claro ejemplo ha sido la obtención de cepas de levadura recombinantes capaces de expresar enzimas heterólogas empleadas habitualmente como mejorantes panarios (Rández-Gil y col., 1995; Monfort y col., 1997; Monfort y col., 1999).

El empleo de cepas de *T. delbrueckii* en panificación, convierte a esta levadura en un potencial huésped para la expresión de proteínas de interés en este proceso industrial. Sin embargo, el uso de técnicas de ADN-recombinante en este microorganismo es limitado, ya que se carece de las herramientas moleculares necesarias. Sólo recientemente se ha descrito la construcción de una librería de DNA genómico de este organismo (Hernández-López y col., 2002) y su utilización en el aislamiento de genes que complementan mutaciones de interés académico y/o industrial en *S. cerevisiae*. Además, la mayoría de cepas de *T. delbrueckii* son protótrofas. En consecuencia, su transformación mediante complementación de marcadores auxótrofos, el método más común en *S. cerevisiae*, no puede ser empleado. Esto implica que la manipulación genética de estas cepas sólo pueda llevarse a cabo mediante el uso de marcadores dominantes de resistencia a drogas. Sin embargo, el uso de estos sistemas de selección está limitado por las leyes que regulan la producción, liberación y explotación comercial de organismos modificados genéticamente (Linko y col., 1997). En este escenario, la obtención de cepas auxótrofas de *T. delbrueckii* se convierte en un objetivo prioritario tanto en investigación básica como aplicada.

Capítulo I

Los genes más comúnmente utilizados como marcadores auxotróficos están implicados en etapas clave de rutas de biosíntesis de aminoácidos, como *LEU2*, *HIS3* y *TRP1*, o de biosíntesis de bases nitrogenadas, como *URA3* y *ADE1*. Recientemente, se ha aislado y caracterizado el gen *URA3* de *T. delbrueckii* (Hernández-López y col., 2002) y se han construido cepas auxótrofas Ura⁻ (Hernández-López y col., 2003b). No obstante, es necesario continuar en esta línea, mediante el aislamiento y caracterización de nuevos genes que permitan la obtención de una amplia variedad de cepas para su uso en estudios básicos.

Por otra parte, la obtención de datos de secuenciación de estos genes y de las zonas flanqueantes a ellos, ha permitido tradicionalmente, el estudio y la comparación del orden génico y su orientación transcripcional entre varias especies de levaduras. Esta información, ha permitido establecer relaciones filogenéticas, ya que la conservación del orden génico disminuye a medida que aumenta la distancia evolutiva, y descifrar los mecanismos que han dado lugar a la diversidad de especies de levaduras (Keogh y col., 1998; Langkjaer y col., 2000).

En este primer capítulo presentamos la clonación de dos marcadores auxotróficos de *T. delbrueckii* y el estudio de los genes adyacentes para establecer su relación filogenética con levaduras bien conocidas como *S. cerevisiae*.

1.- Análisis de una región del DNA de *T. delbrueckii* que contiene el gen *HIS3*: secuencia, orden génico y evolución

El producto del gen *HIS3* cataliza la conversión de imidazol-glicerol-fosfato a imidazol acetal-fosfato, séptima etapa de la ruta de biosíntesis de histidina (Alifano y col., 1996). Como otros genes esenciales implicados en rutas biosintéticas, *HIS3* ha sido utilizado frecuentemente como marcador

nutricional para la transformación de plásmidos e interrupciones génicas. En *S. cerevisiae*, *HIS3* está flanqueado por dos genes no relacionados funcionalmente, *PET56* y *DED1* (Struhl, 1985a) y separado de ellos por secuencias intergénicas cortas. Esta estructura, fuertemente empaquetada, ha convertido a esta región cromosómica, en un modelo para estudios de regulación transcripcional (Struhl, 1982; Struhl, 1985b; Chen y Struhl, 1985). Además, la comparación del orden de genes encontrado en la región *HIS3* de *S. cerevisiae* y otras levaduras, como *Saccharomyces kluyveri* (Weinstock y Strathern, 1993), *Zygosaccharomyces rouxii* (Sychrova y col., 2000) y *Candida glabrata* (Walsh y col., 2002b) ha permitido establecer la existencia de un orden génico ancestral, en el que se entremezclan porciones de los cromosomas XV y XVI de *S. cerevisiae* (Keogh y col., 1998; Sychrova y col., 2000). Esta información, junto con la obtenida en otras regiones cromosómicas de diferentes especies de Ascomicetes ha dado origen a la hipótesis de Wolfe y Shields (1997) por la que la actual constitución genética de *S. cerevisiae* se habría originado, entre otros, como resultado de un evento de duplicación de su genoma ancestral.

1.1- Clonación del gen *HIS3* de *Torulaspota delbrueckii*

El aislamiento del gen *HIS3* de *T. delbrueckii* se llevó a cabo mediante complementación de un mutante His⁻ de *S. cerevisiae* (CEN.PK2-1C), utilizando una librería genómica construida en el vector YEplac181 (Hernández-López y col., 2002). De los cerca de 30.000 transformantes obtenidos, se aislaron y analizaron, mediante restricción, varios plásmidos. Uno de ellos, al que denominamos YEpTdHIS-1 (Figura 1.1) contenía un inserto de 4,9 Kb, cuya secuenciación mostró la existencia en su extremo 5' de una pauta de lectura abierta de 672 pb, con una alta homología con genes *HIS3* de otras levaduras.

Capítulo I

Con objeto de confirmar el aislamiento del gen *HIS3*, un fragmento de restricción *Pst*I-*Eco*RV (Figura 1.1), conteniendo el promotor y el gen completo, fue subclonado en el plásmido YEplac181 e introducido en la cepa CEN.PK2-1C. El nuevo plásmido, YEpTdHIS-2, permitió el crecimiento de la cepa His⁻ en medios carentes de histidina, confirmando así la funcionalidad del gen. Así pues denominamos a esta nueva pauta de lectura abierta *TdHIS3*, el gen *HIS3* de *T. delbrueckii*.

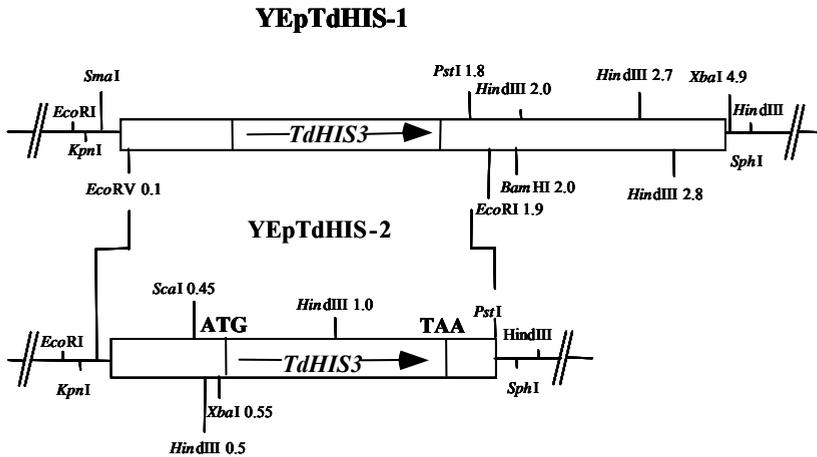


Figura 1.1. Representación esquemática del mapa de restricción del inserto contenido en los plásmidos YepTdHIS-1 y YEpTdHIS-2. Los números indican el tamaño del fragmento generado desde el sitio de restricción hasta el MCS situado a la izquierda del dibujo. Sólo se indican los sitios de restricción más relevantes. El tamaño de los fragmentos no está realizado a escala.

1.2- Organización de la región *TdHIS3*

En la figura 1.2 se muestra la secuencia completa del DNA y la secuencia deducida de aminoácidos de todas las posibles pautas de lectura abierta encontradas en el inserto del plásmido YEpTdHIS-1. Además del gen *HIS3*, el análisis mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1997), puso de manifiesto la existencia en el inserto de secuencias parciales o completas con un alto grado de homología a tres genes, *PET56*, *MRP51* y *DED1*,

previamente caracterizados en *S. cerevisiae*. Un fragmento de 476 pb, homólogo al gen *PET56*, que codifica la subunidad 21S del rRNA (guanosina-2'-O-)-metiltransferasa, se encontró a 182 pb por delante del ATG de inicio de *TdHIS3* y en la hebra opuesta. Detrás del gen *TdHIS3* y separada de éste por tan sólo 33 pb, apareció en la hebra opuesta una nueva pauta de lectura abierta (nucleótidos 1.364 al 2.389), que exhibió un 42% de identidad con la subunidad pequeña de la proteína ribosomal mitocondrial Mrp51p. Finalmente y localizada a 420 pb del gen *TdMRP51*, se detectó una pauta de lectura abierta con un 75% de identidad con el gen *DED1* de *S. cerevisiae*, que codifica una RNA helicasa dependiente de ATP.

La región *HIS3* de *T. delbrueckii* está formada por una serie de genes que no tienen relación funcional entre ellos y que están separados por regiones intergénicas muy cortas, lo que provoca que se superpongan secuencias de promotores y terminadores. Esta organización del genoma parece ser típica de regiones cromosómicas de *S. cerevisiae* y en particular de la región *HIS3* (Struhl, 1985a).

1.3.- Caracterización del gen *TdHIS3*

Para la caracterización del gen *TdHIS3*, inspeccionamos la secuencia promotora y terminadora del mismo, en busca de elementos reguladores. En la corta secuencia intergénica *PET56-HIS3*, localizamos la existencia de dos posibles cajas TATA, una que se ajusta a la secuencia consenso (TATATA) que va del nucleótido -87 al -92 y otra (TATACC) que va del nucleótido -27 al -32. Estas secuencias se encuentran frecuentemente en promotores de levadura y juegan un papel muy importante en la transcripción, como ha sido demostrado para el gen *HIS3* de *S. cerevisiae* (Struhl, 1982). En esta secuencia intergénica encontramos también un elemento consenso de unión a Gcn4p (TGACTC), del nucleótido -133 al -138. Gcn4p es un regulador

Capítulo I

general de la expresión génica en *S. cerevisiae* (Hinnebusch y Natarajan, 2002), en particular de genes implicados en rutas de biosíntesis de aminoácidos (Natarajan y col., 2001). Otras dos copias imperfectas de esta secuencia fueron localizadas en la región codificante de *TdPET56*, TGACGA, del nucleótido -236 al -241 y TGAATC, del -341 al -347. La existencia de elementos reguladores de *HIS3* situados en la región codificante de *PET56* ha sido previamente descrito para otras levaduras como *S. cerevisiae* (Struhl, 1985a), *S. kluyveri* (Weinstock y Strathern, 1993) y *Z. rouxii* (Sychrova y col., 2000a).

```

1      TTCTTCTCTGCGAGCTGGGCAATTGTCGTTGGTAAAGGCCCATGATGCGAGAAGTCTAGTAAATATTTCTCTCTTACCACCTTGTAAAGCCGCCAGAACAC
158    K E A L Q A I T T P L P G H H L L R T F Y E R K G G Q L A A L V

          #####
101    CATTGTGACCATAAACATACTCCATCAAAAGGTTTACTCTTAGACCTGTGTAGCACTTCGTTTCTCAAACCTCCCTTTCATGCTCTTGCCCTCTATTCTT
126    G N T G Y V Y E M L P N V R L G Q T A S R K E F K R E H E Q R E N K

201    CGTCTGTTTGTCAATTTGTGCCAGTTTATCAGTATGAGCTTCTTCTTCCCAAACAATCACCAGAATTTTTCTCCCTAGCATGGACATGGGCATATTTCT
92    T Q K D I Q A L K D T H A K K K G F L D G S N K E R A H V H A Y K

301    TTCTTAACCATGAATCTTTATCCTCTCCAGCCTTCTCCCATGCCTTCTTGGCAGCGATCTGCGTAGATTCTTATCCAGTTTAGTGTTACGGCTCCCCA
59    K R F W S D K D E G A K E W A K K R R I Q P L N K D L K T N R S G

          #####
401    ATCCAGCTTTCACGCGCTGACGAATGGCCAAACCACGTTTAAACACGGCGATCATCAGAGTACTACTACTTAGCATATCAACGGCCGACTAAAACGTGATA
26    L G A K V A Q R I A L G R K F V A I M L T S S S L M

          #####
501    GAGCTGGATCTTCAAGCTTTTGACTCATAGCTCATCGAATCGAGATTTTTCAGTTTCTAGAAACGATATATATCCATAGTGAAAAATTCTAATACTAA
601    ATGATGAAGATAGATTAATATCAGTTATACCAACCAACTACTGGTTGTAACGATAAGATGAGTGAACGCAAAAGCATTGTGAGCCGTATAACAAACGAA
          M S E R K A F V S R I T N E 14

701    ACCAAGATTCAAATTTGCAATTTTCGTCGAATGGTGGTCATATTTGAAATAAAGGACTCAATTTTATGTAAGAAACAGCAGGAAAATGGTAGCGATGTGGCAG
T K I Q I A I S L N G G H I E I K D S I L C K K Q Q E N G S D V A A 48

801    CCCAGACCACCAAGTCCCAAGTAGATATTTCAAACCTGGTGTAGGATTCCTGGACCACATGATTCATGCGCTGGCCAAGCACTCCGGATGGTCTTTGAT
Q T T K S Q V I D I Q T G V G F L D H M I H A L A K H S G W S L I 81

901    CGTCGAGTGTATCGGTGATTTGACACATTGACGACCACCATACCACTGAGGATTTGGTATTGCATTGGGCCAGGCATTCAAGGAAGCTTTGGGTCAAGTT
V E C I G D L H I D D H H T T E D C G I A L G Q A F K E A L G Q V 114

```

Figura 1.2. Secuencia del DNA correspondiente al inserto del plásmido YEpTdHIS-1. La secuencia de aminoácidos correspondiente a *TdHIS3* (nucleótidos 659-1330), *TdMRP51* (nucleótidos 2389-1364), *TdDED1* (nucleótidos 2810-4603) y parte de *TdPET56* (476-1), se muestra debajo de la secuencia de DNA. Las flechas indican la dirección de la transcripción. La caja TATA y los elementos TATATA en el promotor y el terminador de *TdHIS3* están marcados en negrita. Los elementos consenso de unión a Gcn4p están señalados con el signo #. Los posibles sitios de poliadenilación que coinciden con la secuencia CTTT (Mahadevan y col., 1997) están subrayados. Los codones de parada de *TdHIS3*, *TdMRP51* y *TdDED1* están marcados con el signo *.

1001 CCGGGTGTGAAAAGGTTCCGGTACTGGGTTTGACACCTTTGGACGAAGCTCTATCCAGAGCCGTTGTGGATTATCAAAACAGACCTTACCGTCTGAATTGATC 148
R G V K R F G T G F R S E S A F K A L A V A V I D L S N R P Y A V I D L

1101 TTGGTTTGAAGAGGGAGAAGATCGGCGATCTCTCGACTGAGATGCCACATTTCTGGAAAAGTTTGGCAGGCTGCTCGTTGACTATCCACGTTGA 181
G L K R E K I G D L S T E M I P H F L E S F A E A A R L T I H V D

1201 CTGTCTGAGAGGTTTAAATGATCACCCAGTACGAGAGTGCCTTTAAAGCCTTGGCAGTGGCTATTCGTGAATCATTAGCACCTAATGGTACTAATGAT 214
C L R G F N D H H R S E S A F K A L A V A I R E S L A P N G T N D

1301 GTGCCCTTCTACCAAGGTTGTGTTAATGTGAGAATAATACGTATTTATTTATATACAGGAAAACAGTGGAAATCGTCAGGATATTCAGCAACTCGTGC 223
341 V P S T K G V L M * * H F D H L I N L L E D

1401 GCTTTCATCTTTGGATCCATGGCACCAGCAGCGTTGTGCTTTTGGATCTTTTGAATAGGTCTCTGTGTATACCTTTTGCCTCGAATGGAGCGCTTTGCAC 330
A K M K P N D M A G V A N N S K S R Q I P R Q Y R K G Q I S R K A

1501 GCTGGCTCATACCACTGACGACTTGAGCCCTGACCATAACCTTCCCGCGTCATCAACAGAAACTTGTTCACATTCAAAAGGGGAATGAGTTCTCTGAT 297
R Q S M G S V V Q A R V M V K G A D D V S V Q Q V E F P F T L E R I

1601 AAAATCACCCATGTTATATGCGACTTGGGATGTCATGGCGATGAAGAAGTTGCATTGGCAACAAACCCCAACTGACGACGCTTATCGTTACCATCA 263
F D G M N Y A V Q S T M T S S D A N A V F G G V A A L R D N G D

1701 AAAATCAAGAATCTACCTGGAACAATACTCTTTTGGACCCTCCATTAAGTGAATCTTCAACTTACCAGAAATGTACGTGAGCCGCCACCCGACCCGA 230
F N L F R G P V I S K Q V V G N P S N K L K G R L N Y T L G G T G

1801 TAACCTTGCTGGAGCCAAACGACCACTTTGCTTCGAGAACGCTCACTTAAAACTGCACTGCACTTCCCTTATATCTCTAGCCGTGAATGACTGTT 197
I V K S S A L R G S Q K A S R E S L F Q V A S E K M D R A T F S K N

1901 CTTCAAAGCTTCTGGATCTTTTCAAGCAACCATTTGTCTAAATTCACCACGTAAGGCCCTTCACTGCAACCAATCTGTGCGATCGCGCTATTAGCCTTTCCA 163
K L A E P L L W Q R F E G R L A K M Q V L R L S A S N A K G

2001 GCATCGACCCGACGAAAGATGATAAAGGTGCCAAACGATCCTGACTCGATGATTCACCTTCAAACAATGGGTTGGCTCTCACAGGTTATACGATGGAG 130
A D V A L L S S L P A L R D Q S S S E G E F L P N A R G P N Y S P

2101 CAACCCCAACTCCTGGAACCTAATGCGATTCACCTGCAACACCCCCAGCTTCAAAGATGGCGATTCTCCAAAGTATCTAGCTCAATTAACCTCCAA 97
A V G L E Q F R I R N W Q S G G A E F T A I R E L T D L E N F E L

2201 ATATCTCGATTTCACACTTTTGGAAATCGTGCCTTAAGCCCTTCTCTGCTCTCGAAAGTAGCCGGCTTAGTCTCCACGACCTGGTGGCAGGGGAAA 63
Y R S K V G K P I A A K L G W E Q R E F T A P K T E V V Q H S P F

2301 TACCGTGGCTTCCGCCCCCAAAGGCTCCCGACTCTTCGCACCTGTGCCAGCTGGACCGTCTTAGCAATTGACCCAGATGCGACATACAGACTCGAT 30
Y R P K G V L P R S K A V Q A L R S R R L G L H S M

2401 CTATAGGACTAAACTATCTTCAATTCAGCTACTTTTCTTAAATATTTGTCCTATAAGTGAAAAAATAATGTCAAGTATGATATTTTAAAGCGCAC 2501
ATGAACCTATAGCAAGTCAACTCAACACACAAAGGCGATAAAAGGCTAGTAAAAATGCAAAAATTCGCCAAATTTTCAGGCTATTCATCAAGCTTGC 2601
AGATTTGCTTTATAAAGCTTAGTCTGTTTATTCAAAGAATTACGAGTTTTCAGTCTCACGCCATTTATAGCCCGGTGCTTGGCGGTGAAACT 2701
TTTCAAAGAAAGAAAGCTTGAATAATCCAATATAAGAAGACCATGACAGGAAGACAAGAATAATAGGTGTGAAAGAGGATATATTACGATTAATC 2801
AGCGACAGGATGGCAGATTTAAGTAAGAAGTAGAGAACATGAGTATCAAGGAGAAAGCGGTTACGTTCTCCACATTTGAGAAACGGTGGAGCGCTC
M A D L S K K V E N M S I K E K G G Y V P P H L R N G G A R R 31

2901 GTGCCAACAGTGGTGGATTCGGTGGATCTAGTGGTTCTGATGGTCTTCTGTTGGTGTAGTTTCTTGGGTTTAGCCGTCGTCGGGAGATTCCAACCGTGG 64
A N S G G F F G S S G S D G S S G S F F G F S G R R G D S N R G

3001 AGGACCGGTGGATTTCGTAGAAACGGCGGTGGCAGCGGTTTCCAGCCAGCTGGTACTGGTATGATGGACGGACGCTAAGCAGCTTCCAGCTGCGAGAAT 97
G R G G F A R N G G G S G F R P A G T G R W T D G K H V P A A R N

3101 GAAAAGATGGAAACAGCAGTGTGTTGTTGTCAGAAAGTCCAAATTTCCAGTCTTCCGGGATTAACTTTGACCACATGATGATATCCAGTGCATGCAT 131
E K M E Q Q L F G V A E D P N F Q S S G I N F D H Y D D I P V D A S

3201 CTGGTGAGAACGTTCCAGAACCTATTACTGAGTTTACAAGTCTCCTTTGGATGAACTATTGTGGAAAAATCAAGTTGGCTAGATTCACTAAGCTTAC 164
G E N V P E P I T E F T S P P L D E L L L E N I K L A R F T K P T

3301 TCCAGTTCAAAAGTACTCGTGCCTATTGTGCTAACGTFAGAGATTTGATGGCTGTGCCAGACGTTTCCGTTAAGACCGTGGGTTCTGTTTCTCT 197
P V Q K Y S V P I V A N G R D L M A C A Q T G S G K T G G F L F P

3401 GTGTTGTCGAAATCTTTCAGCACTGCTTCTGAGATTCAGAGAATGCTGTGGTGGTTACATGAGAAAGCCCTTCCCAACAGCTGTTGTTGGCTC 231
V L S E S F S T G P S E I P E N A R G G Y M R K A F P T A V V L A P

3501 CAACTAGAGAGTTGGCTACACAGATCTTCGACGAGGCCAAGAAGTTTACTTACAGATCGTGGTTAGAGCTACCGTTGTGTACGGTGGTCCGACGTTGG 264
T R E L A T Q I F D E A K K F T Y R S W V R A T V V Y G G A D V G

3601 TTCTCAAATGAGAGAGTTGGACCGTGGTTGTGATCTGCTGGTTGCTACTCCAGGTCGTTTGAACGATCTGTTGGAGCGTGGTAAGATCTCTTTGGCCAAG 297
S Q M R E L D R G C D L L V A T P G R L N D L L E R G K I S L A K

Figura 1.2- Continuación

La región intergénica *PET56-HIS3* en *S. cerevisiae* contiene también una secuencia poly(dA-dT) que actúa en ambas direcciones, activando la transcripción de los dos genes (Struhl, 1985b). Sin embargo, al igual que en

Capítulo I

Pichia pastoris (Cosano y col., 1998), este elemento no fue hallado en el promotor de *TdHIS3*, lo que sugiere la existencia de otras secuencias que podrían tener un papel funcional en la transcripción basal del gen.

Finalmente, analizamos la región no codificante de la zona 3' de *TdHIS3*. Además de dos codones de parada en fase, TGA y TAA, también se encontró un elemento TATATA, del nucleótido 692 al 697, implicado en dirigir la formación del extremo 3' (Abe y col., 1990; Russo y col., 1991). Esta región también contiene seis secuencias CTTT que coinciden con los sitios de poliadenilación en el gen *HIS3* de *S. cerevisiae* (Mahadevan y col., 1997) (Figura 1.2).

1.4.- Evolución de la región *HIS3*

Genes de la ruta de biosíntesis de histidina, aislados de diferentes organismos, parecen presentar un fuerte grado de conservación evolutiva (Alifano y col., 1996). Por consiguiente, hemos comparado la secuencia deducida de aminoácidos de *TdHIS3* con otras proteínas His3p previamente caracterizadas. Los valores de identidad oscilaron desde el 88,6% (con *S. kluyveri*) hasta el 72,8% (con *P. pastoris*).

La Figura 1.3 muestra el árbol filogenético de doce secuencias de His3p, obtenido por el método descrito por Saitou y Nei (1987). De acuerdo con este árbol, se puede deducir la existencia de dos grupos principales, por un lado el complejo *Saccharomyces* y por otro, el de *Candida-Pichia*. Dentro del grupo *Saccharomyces*, TdHis3p estaría incluida en un grupo monofilético (con un valor “bootstrap” del 91%), junto con las secuencias His3p de *S. kluyveri*, *Z. rouxii*, y *Z. bailii*, que parece cercano al de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

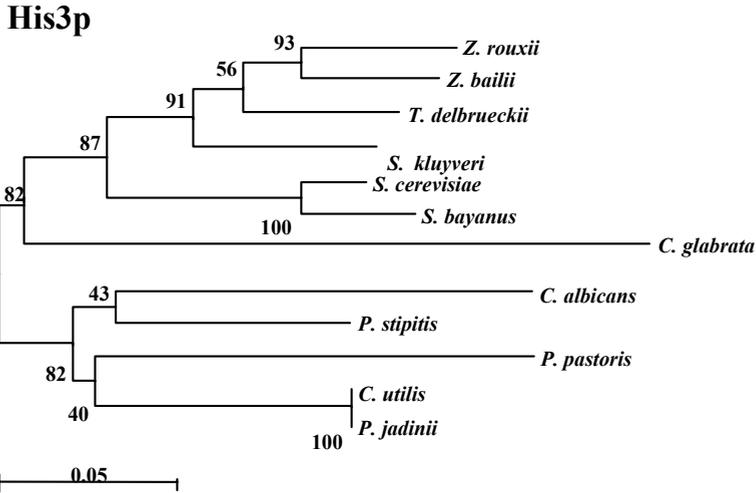


Figura 1.3. Árbol filogenético basado en las distancias corregidas Poisson entre pares de secuencias de aminoácidos de His3p. Para ello se ha empleado el algoritmo del vecino más próximo (Neighbour-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Se ha realizado un test “bootstrap” de 1.000 réplicas para analizar la robustez de las ramas del árbol. La barra corresponde a la corrección Poisson de 0,05 de reemplazamientos de aminoácidos por residuo.

Esta relación filogenética es consistente con la establecida previamente por comparación de las secuencias de otros genes (James y col., 1997; Kurtzman y Robnett, 1998, 2003b; Belloch y col., 2000; Wong y col., 2002c; Hernández-López y col., 2002). La única excepción es la posición de la secuencia His3p de *C. glabrata*. Esta levadura imperfecta se ha demostrado que pertenece al grupo *Saccharomyces sensu lato*, por lo que su posición en el árbol debería ser más cercana a *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Sin embargo, aparece como la primera especie que diverge del grupo *Saccharomyces*. Una explicación a esta discrepancia sería la existencia de un efecto “long branch attraction”, debido a la alta divergencia de la secuencia His3p de *C. glabrata*.

Capítulo I

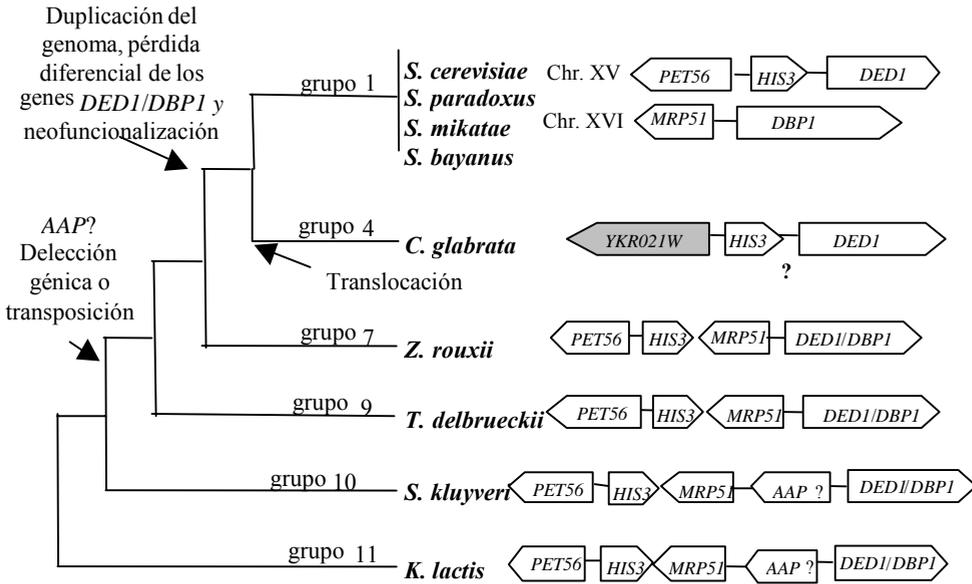


Figura 1.4. Mínimo número de sucesos requeridos para explicar la evolución del orden génico y la composición de la región *HIS3* de las especies del complejo “*Saccharomyces*”. La topología de las relaciones filogenéticas fue obtenida del árbol de máxima parsimonia generado por Kurtzman y Robnett (2003), basado en el análisis de múltiples secuencias de genes. Al final de cada rama se indica la referencia de la clada propuesta por Kurtzman y Robnett (2003). A la derecha del representante de cada clada, se indica la organización génica de la región *HIS3* correspondiente. *APP?* Corresponde a una pauta de lectura abierta que codifica una proteína con características típicas de permeasas de aminoácidos, en particular con cierta similaridad a permeasas de glutamina de *S. cerevisiae*. En el caso de la clada de *Saccharomyces sensu stricto*, la localización de las regiones de *HIS3* derivadas de la duplicación está referida a la numeración de los cromosomas de *S. cerevisiae*. En el caso de *C. glabrata* una interrogación indica que la región duplicada de *HIS3* homóloga a la localizada en el cromosoma XVI de *S. cerevisiae* no está disponible. El gen en gris corresponde a una translocación entre la región *HIS3* de *C. glabrata* y una región localizada en el cromosoma XI de *Saccharomyces* (Walsh y col., 2002).

Resulta interesante estudiar la evolución del orden génico de la región *HIS3* en especies del grupo *Saccharomyces*. En la Figura 1.4, se muestra la organización de la región *HIS3* de *T. delbrueckii* y de otras especies del grupo *Saccharomyces*. Como se ve, *T. delbrueckii* y *Z. rouxii* tienen el mismo orden génico en esta región cromosómica, *PET56-HIS3-MRP51-DED1*, el cual difiere en *K. lactis* y *S. kluyveri*, ya que ambas contienen un

gen extra localizado entre *MRP51* y *DED1*. Este gen presenta una alta homología con una proteína con características típicas de permeasas de aminoácidos, concretamente, es similar a las permeasas de glutamina Gnp1p y Agp1p de *S. cerevisiae*. En las especies de *Saccharomyces sensu stricto* los cuatro genes de la región *HIS3* están localizados en dos cromosomas distintos. De esta forma, *PET56*, *HIS3* y *DED1* están en el cromosoma XV y *MRP51* junto a *DBP1*, que es el parálogo de *DED1*, están en el cromosoma XVI. Se cree que este reordenamiento génico ha sido generado por una duplicación del genoma que ocurrió en un ancestro de *Saccharomyces* y una diferenciación posterior de genes parálogos o pérdida de genes (Wolfe y Shields, 1997; Keogh y col., 1998).

La región *HIS3* de *C. glabrata* también ha sido secuenciada (Walsh y col., 2002). Detrás de *HIS3* se encuentran, junto a *DED1* otros dos genes *YOR205c* y *NOC2*, localizados en el mismo orden en el cromosoma XV de *S. cerevisiae*. Por delante de *HIS3* existen cinco genes localizados en el cromosoma XI de *S. cerevisiae*. Esto coincide con el hecho de que *C. glabrata* y otras especies del grupo *Saccharomyces sensu lato* divergieran después de la duplicación (Wong y col., 2002c) y que una translocación posterior reordenara esta región (Walsh y col., 2002).

2. Caracterización y análisis del orden génico en la región *LEU2* de *Torulaspora delbrueckii*

La ruta de biosíntesis de leucina muestra un alto grado de conservación entre microorganismos procariotas y eucariotas. *LEU2* codifica la actividad 3-isopropilmalato deshidrogenasa, segunda etapa en la ruta de biosíntesis de leucina, la cual transforma β -isopropilmalato en α -cetoisocaproato (Hsu y Kohlhaw, 1980). El gen *LEU2* de *S. cerevisiae* fue uno de los primeros genes expresados en *E. coli* por complementación de mutantes *Leu⁻*

Capítulo I

(Ratzkin y Carbon, 1977). En consecuencia, *LEU2* ha sido comúnmente utilizado como marcador de selección, habiéndose aislado y caracterizado numerosos genes homólogos en diferentes especies de levaduras, como *Pichia stipitis* (Lu y col., 1998), *Z. rouxii* (Sychrová, 2001), *Zygosaccharomyces bailii* (Rodríguez y col., 2001) o *Pichia anomala* (de la Rosa y col., 2001). Como en el caso de *HIS3*, el análisis del orden génico y orientación transcripcional de genes situados en la vecindad de *LEU2* ha contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre especies de levaduras (Keogh y col., 1998). En particular, la denominada región *LEU2* habría contenido, en el ancestro de los Ascomycetes, un bloque de cuatro genes anexos, *LEU2*, *NFS1*, *PET8* y *RLP7*, de los que el par *LEU2-NFS1* se sitúan en el cromosoma II de *S. cerevisiae*, mientras *PET8* y *RLP7* aparecen en el cromosoma XIV (Wolfe y Shields, 1997). Sin embargo, la orientación transcripcional de *LEU2* en *S. cerevisiae* y *Candida utilis* es opuesta a la observada en otras especies de levadura (Sharp y Wolfe, 1993), lo que ha generado una gran controversia sobre el origen de estos cambios (Keogh y col., 1998). En este escenario, la obtención de nuevas secuencias derivadas de la región *LEU2* de diferentes especies de levadura, podría permitirnos avanzar en la comprensión de los mecanismos de evolución del orden génico.

2.1.- Clonación del gen *LEU2* de *Torulaspota delbrueckii*

Los resultados expuestos en relación al gen *TdHIS3* (Aller-Arranz y col., 2003), así como estudios previos de caracterización del gen *TdURA3* (Hernández-López y col., 2002) mostraron la existencia de un elevado nivel de homología entre éstos y sus correspondientes homólogos en *S. cerevisiae*. De acuerdo a esto, decidimos abordar el aislamiento del gen *LEU2* de *T. delbrueckii*, mediante su amplificación por PCR, utilizando

oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de la comparación de secuencias de proteínas Leu2 de distintas especies de levaduras (Figura 1.5). Tras alinear las secuencias de las proteínas de *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *K. lactis*, *P. augusta* y *C. boidinii*, obtenidas de la base de datos del MIPS (<http://mips.gsf.de>), se escogieron un par de secuencias, 100% homólogas en las cinco proteínas, que debían permitir amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb del correspondiente gen homólogo de *T. delbrueckii*. Así, utilizamos como directo, el oligonucleótido EAA-1, que corresponde a la secuencia de aminoácidos LVGGIYF y como oligonucleótido reverso EAA-2, el cual corresponde a la secuencia de aminoácidos AMMLKLSL. Usando DNA genómico de *T. delbrueckii* como molde, se amplificó un fragmento del tamaño esperado, que fue clonado en el vector pGEM-T. Los plásmidos rescatados de nueve transformantes de *E. coli*, fueron analizados y secuenciados. Uno de los clones contenía un inserto de 546 pb con elevada homología con el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*.

Para clonar el gen completo, se rastreó una genoteca de *T. delbrueckii* (Hernández-López y col., 2002) mediante amplificación por PCR de las correspondientes colonias de *E. coli*. Para ello, se diseñaron a partir de la secuencia parcial de *TdLEU2*, dos oligonucleótidos específicos, EAA-3 y EAA-4, que se utilizaron como cebadores para amplificar una mezcla de DNAs procedentes de la lisis de colonias de *E. coli* recogidas de placas de LB-ampicilina. Esta metodología propuesta por Bloem y Yu (1990), ha sido utilizada con éxito para aislar el gen *RPS0* de *Candida tropicalis* (Baquero y col., 2001). Tras sucesivos ciclos de rastreo por PCR, fuimos acotando y enriqueciendo el cultivo en colonias de *E. coli* que contuvieran, total o parcialmente, la secuencia del gen *TdLEU2*. Así, conseguimos aislar un plásmido con un inserto de aproximadamente 5,6 Kb (YEPTdLEU-1) que

Capítulo I

contenía el fragmento completo del gen *TdLEU2* y tres pautas de lectura adicionales.

```

S. cerevisiae      .MSAPKKIVVLPGDHVGQEITAEAIKVLKAIISDVRS...NVKFDNFENHLIGGAAIDATGVPL
Z. rouxii        ...MSKNIVVLPGDHAGQEIAQEAIKVLEAISEVSP..EAKFNFQHHLIGGAAIDATGSPL
K. lactis        ...MSKNIVVLPGDHVGKEVTDEAIKVLNATAEVRP..EIKFNFQHHLIGGAAIDATGTPL
C. boidinii      .MSIIIEKKIVLLPGDHVGVVEVVEAAVKILKLSISEVKP..EIQFKFENHLIGGAAIDATGVPL
P. angusta      ...MSKNIVLLPGDHVGPVVAE AVKVLEA...VSSAIGVKFN FSKHLIGGASIDAYGVPL

S. cerevisiae    PDEALEASKKADAVLLGAVGGPKWGTGSRPEQGLLKIRKELQLYANLRPCNFASDSLDDLS
Z. rouxii        PDDALAAAKKADAVLLGAVGGPKWGTGSRPEQGLLKIRKEL QLYANLRPCNFASESLLDLS
K. lactis        PDEALEASKKADAVLLGAVGGPKWGTGAVRPEQGLLKIRKELGLYANLRPCNFASDSLDDLS
C. boidinii      PDEALEAAKKSADAVLLGAVGGPKWGTGEVRPEQGLLKIRKELNLYANLRPCNFASDKLLDLS
P. angusta      SDEALEAAKKADAVLLGAVG GPKWGTGSRPEQGLLKIRK ELNLYANLRPCSFASDALLK LS

S. cerevisiae    PIKPQFAKGTDFVVVRE LVGGIYF GKRKEDDGDGVAWDSEQYTVP EVQRITRMAAFMALQHE
Z. rouxii        PLKPQHAKGTDFVVVRE LVGGIYF GERKEDEGDGVAWDSEKYTKPEVQRLTRMAAFALQHN
K. lactis        PLKPEYAKGTDFVVVRE LVGGIYF GERKEDEGDGVAWDSEKYSVPEVQRITRMAAFALQQN
C. boidinii      PLKSDIVKGTDFVVVRE LVGGIYF GDRVEDDGGSFASDSESYVPEVERITRMAAFSLQND
P. angusta      PLKSEIVKGTDFVVVRE LVGGIYF GDRKEDAGDGVASDTESYSVPEVQ RITRMAAFALQSD

S. cerevisiae    PPLPIWSLDKANVLASSRLWRKTVEETIKNEFPQLKLVQHQLIDSAAMILVKNPHTLNGIIT
Z. rouxii        PPLPIWSLDKANVLASSRLWRKTVEETIKNEFPQLKLNHQLIDSAAMILVKSPQTQNGIVLT
K. lactis        PPLPIWSLDKANVLASSRLWRKTVEETIKTEFPQLTVQHQLIDSAAMILVKSPTKLNQVIT
C. boidinii      PPLPIWSLDKANVLASSRLWRKTVDRIKEEFPKLTQVQHQLIDSAAMILVKS PTKLNGIVIT
P. angusta      PPLPLWSLDKANVLASSRLW RKTVEETIKNEFPQLTVQH Q LIDSAAMILVKSPTKLNQ.V IV

S. cerevisiae    .SNMFGDII SDEASVIPGSLGLLPSASLASLPDKNFAFGLYEPCHGSAPDLPKKNVNP IATI
Z. rouxii        .SNLFGDII SDEASVIPGSLGLLPSASLASLPDNTNEAFGLYEPCHGSAPDLPKGKKNP IAMI
K. lactis        .NNMFGDII SDEASVIPGSLGLLPSASLASLPDNTKAFGLYEPCHGSAPDL PANK VNP IATI
C. boidinii      .NNMFGDII SDEASVIPGSLGLLPSASLASLPDNTQAFGLYEPCHGSAPDL PKKNVNP IATI
P. angusta      .TNNMFGDII SDEASVIPGSL GLLPSASLASLPDNTKAFGL YEPCHGSAPDLGPKGNVPLA TI

S. cerevisiae    LSAAMMLKLSL NLPEEGKAIEDAVKKVLDAGIRTGDLGG SNSTTEVGDAVAEVEKKILA.
Z. rouxii        LSAAMMLKLSL NLSKEGEAVEKAVKQVLDGSGVRTGDLGG SNSTSEVGDAIAKAVKEILA.
K. lactis        LSAAMMLKLSL DLVEEGRALAEAVRNVLADAGVRTGDLGG SNSTTEVGDAIAKAVKEILA.
C. boidinii      LSAAMMLKLSL NLVKEGNAVEEAVRKVLDQGITGDLGG NNSTTEVGDAIAKAVKLLLA.
P. angusta      LSAAMMLKLSL DLVDAGRAIEQAVKNVLDAG IMTADLGG SSSTQEVGDAVAQEVAKLLK N

```

Figura 1.5. Alineamiento de varias secuencias conocidas de proteínas Leu2 de levaduras. En negrita se señalan las zonas consenso utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR del gen *TdLEU2*.

Con el fin de confirmar que, en efecto, habíamos aislado el gen *TdLEU2*, subclonamos un fragmento de restricción *Bam*HI-*Pst*I, en el plásmido YEplac195 (*URA3*) dando lugar a la construcción YEpTdLEU-2 y transformamos la cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C, auxótrofa para leucina. En efecto, la expresión de este fragmento, que contiene el gen

completo, 1.089 pb, más 537 pb del promotor y 205 pb del terminador de *TdLEU2*, complementó la mutación del gen *leu2* de *S. cerevisiae*.

2.2.- Análisis de la secuencia de *TdLEU2*

La secuencia de *TdLEU2* codifica una proteína de 363 aminoácidos (Figura 1.6), que presenta una alta homología con los productos del gen *LEU2* de otras levaduras, con valores de identidad en un rango que oscila entre el 72% (*Ashbya gossypii*) y el 88% (*Z. bailii*). Además, la secuencia TdLeu2p mostró, entre las posiciones 244 a 264, una secuencia consenso típica de isopropilmalato-deshidrogenasas y de isocitrato-deshidrogenasas (de la Rosa y col., 2001). Esto sugiere, que en efecto, el polipéptido TdLeu2p es el responsable de la actividad β -isopropilmalato deshidrogenasa en *T. delbrueckii*.

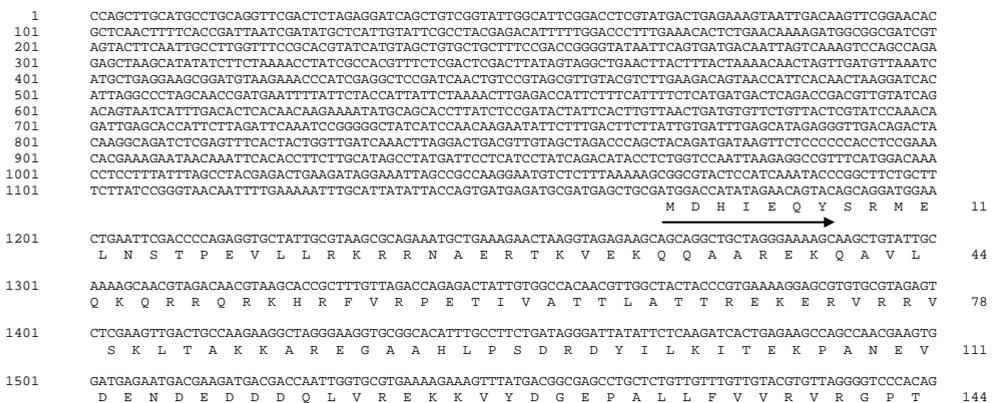


Figura 1.6. Secuencia del DNA correspondiente al inserto del plásmido YEpTdLEU-1. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia parcial o completa de *TdRlp7* (nucleótidos 1168 al 2116), *TdLEU2* (nucleótidos 4970 al 3484), *TdNFS1* (nucleótidos 4970 al 3482) y *TdPET8* (nucleótidos 5283 al 5579), están indicadas debajo de la secuencia de DNA. Las flechas señalan la dirección de la transcripción. La caja TATA y los elementos TATATA en el promotor de *TdLEU2* están marcados en negrita. La secuencia palindrómica de 10 pb rica en GC, posible sitio de unión de Leu3p está marcada con #. Los elementos consenso de unión a Gcn4p y el posible sitio de unión a Mot3p están subrayados. Los codones de parada están marcados con el signo *.

Capítulo I

1601 CGGTTAATATTCCACATAAGGCTTTTAAAGTGCTAAGTCTGCTGAGATTAGTCTCTACAAACACTGGTGTCTTTGTAAATTGACCGCATAAAGTTTACC
A V N I P H K A F K V L S L L R L V S T N T G V F V K L T D K V Y P 178

1701 TTTGCTGAAGATAATGCTCCTTATGTGCTATCGGTAGACCGTCTTTGTGATCGATCCGTTTCGCTATTGCAAAGAGAAGTACAGTGCCTCATCAAGGA
L L K I I A P Y V V I G R P S L S S I R S L L Q K R S T V L H Q G 211

1801 GAACAAGATACCGAAGCTCGTGAGATAGCTTTGAATGACAAATAACATTTGTCGAGAAAGACTAGGAGATCACGGTGTATCTGTCTGAAGATATCATT
E Q D T E P R E I A L N D N N I V E E R L G D H G V I C L E D I I 244

1901 ATGAGATAGCTACACTGGCGATTCACTTCTCAGTGTACCTTCTTTCGCAACCTTCAAGCTAAACAGAGAGATTCTGGGTTCAGCGCTGACACG
H E I A T L G D S F S Q C T F F L Q P F K L N R E I S G F S A L T R 278

2001 TTTAAAGAAGATCAACAAAGGAACAGTCTCAAGACCCGCAATTTTCTAAGCTGCGCACTGCGCACTCGAANTCGAATTTGACTTCTCATC
L K K I K Q K E Q S L K T R Q F S N A A T A P V I E I D I D S L I 311

2101 GCTAGGCTCAACTGATCTTTCGCAATATGTACCAATATACCGTATAAAACCAATTTTTCAGATACCGGCGGTAAACCGGCTGTGTTTTTTCACCGCCAGT
A R L N * ##### 316

2201 CGGCAACCAAGAAACTATATAACGATGGATCATCGAATTCACAGGCCAATCCACACATTAGCCACCATAGCTATCCATTTAGTCTCATGAGCAAGAACAT
M S K N I → 5

2301 CGTTGTGTACCGGTGACCATGTCCGGTCAAGAGATTACAGAAGAGGCCATTAAGTACTAAAGGCCATCTCTGAAGTTCGCCCTAATGGCACTTTCAC
V V L P G D H V G Q E I T E E A I K V L K A I S E V R P N A T F N 38

2401 TTCCAACATCACTTGATGGTGGTGCCTTGAAGCTACAGGTGTTCCACTACAGATGAAGCCCTTGAAGCCTCAAGAAGCCGATGCTGCTGCTGC
F Q H H L I G G A A I D A T G V P L P D E A L E A S K K A D A V L 71

2501 TCGGTGCTGTTGGTGGTCAAAATGGGTACCGCGCTGTCCAGACAGAAAGCTCTACTAAAAATCCGTAAGGAATGCAATTTGACGCTAACTTAAG
L G A V G E P K W G T G A V R P E Q G L L K I R K E L Q L Y A N L R 105

2601 GCCATGTAACCTTTGCTCCGACTCTTTATTTGAATTTGTCACCTTTGAAGGCTCAATACGCCAGGGTACCGATTTTGTGTTGTAGCGATTTAGTGGT
P C N F A S D S L L E L S P L K A Q Y A Q G T D F V V V S D L V G 138

2701 GGTATCTACTTCGGTGAAGAAAAGAGATGAAGGTGATGGTGTTCGCTGGACAGTGAACAATACTCTGTACTGAGGTGCAAGAATTTACCAGAATGG
G I Y F G E F P T L S V N H Q L I D S A A M I L V K N P V A I T R M 171

2801 CCGCTTCTGGCTTGAACAACAACCTCCATTTGCAACTCTGGTCCCTAGACAAGGCTAACGCTCCTGCTTCTCCCGTCTATGGAGAAGACCGTGA
A A F L A L Q H N P P L P I W S L D K A N V L A S S R L W R K T V E 205

2901 AAAAACCATTAAAGGAAGTTTCCAACCTTTGTCAGTAAACATCAATTTGATCGACTCTGCTGATGATTTTGGTCAAGAAGCCCAACGAAATGAACGGT
K T I K E E F P T L S V N H Q L I D S A A M I L V K N P V A I T R M 238

3001 ATCAATTCACCTCAACATGTTCCGGTATATCATCTCTGATGAAGCCTCTGTGATCCAGGTTCTTGGTCTTCTACCGTCTGCTCTTTGGCTCGT
I I I T S N M F G D I I S D E A S V I P G S L G L L P S A S L A S 271

3101 TGCCAGATACTAACACAGCTTTTGGTCTTTCAGAACCTTGTCTGATCGATCGTCCAGATTTGGCTAAGGGTAAAGTGAACCCAGTCCGCACTATCCTATC
L P D N T A T H G L Y E P C H G S A P D L A K G K V N P V A I T L S 305

3201 GGCAGCAATGATGTTGAAGCTCTCGCTAAACATGGTCAAGAAGGTGTTGCAATCGAAAAGGCGAGTAAAGAAAGTTCTTGTGATGGTATCAGAAGTGT
A A M M L K L S L N M V E E G V A I E K A V K K V L D D G I R T G 338

3301 GACTTGGGTGGTCTCAACGACTTCTGAAAGTGGTGAAGCTGTTGCCAAGCCGTTAAAGAATTTCTGGCTAGGTTAGCTTAAATGAATGAATAT
D L G G S N D I T G E D A V A K A V K E F L A * 363

3401 TTAGAATATGTATACGATAACCTTTCGCAATAGACACATAAATTTACCACAGTTGATGATTTTAAATTTGAAAATACTACTTAATGTCCGGACCACCAAT
497 * H G S W E I

3501 AGAGTTTATGATCAATACCTTCTGGACCATTTCCACAGTGGTGTAGCTCTCTTAAGAACCTCACACGTTTCAGTGTGGCTTTGATCAGGTAGTCAATT
490 S N L D I G E Q V M E W L P S L E R L F R V R E T I A K I V Y D I

3601 TCTCCGTCAGTGGTAAATCTCAACAATACCAACCTAATCGAAGAATGAGCCAGTGCCTCACTTCACTAAGGCATGTAGAATATATGTTTCCAATG
457 E G D T T F R G I G F R I S S H A L A D D K G L A H L V Y S P E L

3701 ACGCAGAAGTACACGAGAACCAGATGATGAGCGATATCTCTCAAAGCCATTAAACATGATTCACCTTCCACATATGCGAATGAAACGTTAAACGCAACC
424 S A S T C A S G S S L A I D R L A M L L S E G E V Y A K R S V N V C G

3801 TGGGTAGCGATGATCTGGTGAACCATCAAACCTGGTGGTGCATGCAAGCAAACTTGGACCAATTTCTTGGATAACCTGTTGATATGAGCAATATCA
390 P Y R H D P S G N L S T H D I A L L G Q V L K K S L R N I H A I D

3901 TTAGGGTATTCTGTTGATCAAGCGAGCAGCTTCCACAAAACCTGCGACCAAAAGCTGGAGCCAAAGTTCCCGATCTCAAACCTCTCTCTGTCACCACC
357 N P Y E Q K I L R A A E G F G A V L A P A L T G K H K R C I A V G I

4001 CGGAAATGATGGATCCAATCTAACTTAGTCTTCTTCTTACAACAATGCACCGATACCCCTTTGGTCCATAGATCTTGTGCGACGAGATGGACAGCAA
324 G S I I P D L R V R R R V F L A G I G K P G Y I K H S S I S L L

4101 ATCAATGTTCACTTTTATAACATCAATTTGAATCTTACCGTAAACCTGGCGCATCTGTGTGGAAATACACTTTATGCTTCTCGAAATAGCACCAATC
290 D I N M K N V D I P I K Y G Q A A D T H F Y V K H K R C I A V G I

4201 TCCTCCAGTGGCTGCATAACCAATTTCACTTGTTCACAGCCATCACAGAGACAAGCAAGTGTCCGGTCTGATACTAGCTTCCAACCTTTTATAGTCAA
257 E E L P Q M V G I E N N V A M V S V L C T D P R I S A E L E K L D

4301 CCAACCCATTCTCATCGAGCTTCAAAAAGTGCATCGAAACCTTCAATGATCATAGATCTCGCTGATTCAAGCACACACTTATGCTCAGTCTGATGCTG
224 V L G N E D V L F T V D F G E N I M S R A S E L V C K H E R T T

4401 TATGATGTTTCTGGTTTTTTTGAATAATCTCCCAACACCTTTGATAGCCATACTGTTGGATTCCGGTGCACCTGAAGTAAATATGATCTCTCTGGAA
190 I I H K K T K K Y F R G V G K I A M S N S E T A G S T F I I E R S

Figura 1.6- Continuación

```

4501   TTAGCATTAAATCACACTGGCAATTTGATCTCTTGCAGTTTCGATTCTTTGTTGTTCCCAACCCTATGCATGGGTATTAGAGTGTGGGTTGCCAAACA
157     N A N I V S A I Q D R A T E I E K N T E W G Y A H T N S H P N G F

4601   GGCCAGTATAAAACTTCAACATTGTGTCCAGCACTCTGGGATCAGTAGGAGTGGTAGCCTGCATGTCCAGGTAATAGGTCTTTGACCAAAACCCAGTATT
124     L G T Y F K L M T D L V R P D T P T T A Q M D L Y I P R T G F G T N

4701   CTCTGATAAGCATGCTGTAGAGCACTTGTACCAGAGTTACTCACTTCACTTTCGGTCCAGCCGCTGCACCTTCTACTCTCAGCCTTTCCCTGGCAGCT
90     E Q Y A H Q L A S T G S N S V E S A T G A A A S R S E A Q E R A A

4801   GCCTGAATATCGGTGTGTGTCTCCAACGACAAGTCATTAGCCAGTTTCACAGCAGCAGCAGCTGGTGGTAATACTTTCTAGTAGCCACACAAAGCAATC
57     A Q I D T H T E L S L D N A L K V A A A A P P S Y K R T A V C L L

4901   CACTGCGTAAAGACCGTGATGACAGTCTTGTGAGTCTGCATCTATAGTAGTTGCAGTTCTCCCAAGCATCTTGACAATAATTATCTTCTTTGTAAGTCT
24     G S R L S R S S L R T L R C G I T T A T R G L M

5001   ATATGAAGATAGGTACCTTTTGAACCCCGAAATAAACTCAAAAAGTGAATTATGATAGACCTCTTAATGTTTAAATGCGTTTAGTCATCAATCATTGAT
5101   TAAAAGTCTGTTTTGGAAGAGGCGGACTCTTTTTTCACTTGGAAACGGGTAACAAAGCGACCGTTGACAGCTTGAATACACTAAAATAGCACCCATATAA
5201   TGCCAAAGATGGCCATTGCTAGCGTCCGAATCGCTGAGAGCATCAATTGGACTGTTGTAGTGGTTAGAGAAGTGTGCGATGGACTCTGGGGGTTTT
6     M D S G G F

5301   TTTGTGCTTTGTTGAGTGGTGCAGCTGCCGGTACGTCGACAGATCTAGTATTCTTTCCATTGATACCTTTAAAGACGAGATTACAGGCTAAAGTGGGT
39     F V S L L S G A A A G T S T D L V F F P I D T L K T R L Q A K G G

5401   TTTTCGCTAATGGCGGTTACCGTGGTGTATTATAGAGGTTTGGGGAGTCTGTTGTGGCATCTGCTCCCGTGCTCGTTATTCTTTGTGAGTTATGATTA
73     F F A N G G Y R G V Y R G L G S A V V A S A P G A S L F F V S Y D Y

5501   TATGAATCTACGTTGAAGCCCAATTTCAACGGTTACTGCCAGTGCATCAGACCAGTTTCATCGACACTACTGTGCAG
99     M K S T L K P K F Q R L L P S A S D Q F I D T T V Q

```

Figura 1.6- Continuación

El análisis de la posible secuencia promotora de *TdLEU2*, reveló nuevas evidencias sobre su identidad. Entre las posiciones -106 a -118 encontramos una secuencia palindrómica de 10 pb, rica en Gs y Cs (CCGTAACCGG). Una secuencia de esta naturaleza, formada por dos tripletes CGG, orientados en direcciones opuestas y separados por 4 (Tu y Casadavan, 1990; Bergkamp y col., 1991; Agaphonov y col., 1994) o 3 nucleótidos (De la Rosa y col., 2001; Sychrova, 2001), CCG-(N4/N3)-CGG, ha sido conservada en el promotor de genes *LEU2* de varias levaduras. En *S. cerevisiae*, esta secuencia ha sido reconocida como el motivo de unión del factor transcripcional Leu3p al promotor del gen *LEU2* (Hellauer y col., 1996). El factor nuclear Leu3p regula la transcripción en esta levadura de genes implicados en la biosíntesis de leucina, isoleucina y valina (Friden y Schimel, 1987). La completa activación por Leu3p de la transcripción de *LEU2* parece requerir también una secuencia de 13 pb rica en As y Ts (Tu y Casadaban, 1990). Una región de estas características fue localizada en el promotor del gen *TdLEU2* entre las posiciones -96 y -107 (Figura 1.6).

Capítulo I

Dos factores adicionales, Gcn4p y Mot3p participan en la regulación transcripcional del gen *LEU2* de *S. cerevisiae*. Como se comentó anteriormente, Gcn4p es un factor transcripcional master, o factor de factores, el cual regula la expresión coordinada de cientos de genes, y en particular de aquellos implicados en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch y Natarajan, 2002). En consonancia con esto, la inspección pormenorizada de la secuencia del promotor del gen *TdLEU2* mostró la existencia de un motivo de unión a Gcn4p, TGACTC, entre las posiciones -194 a -199. Además, 2 secuencias imperfectas localizadas en las posiciones -253/-258 (TCATCT) y -288/-293 (TGACAC) podrían participar, directa o indirectamente, en la activación, mediada por Gcn4p, de *TdLEU2*. Finalmente, encontramos en el promotor de *TdLEU2*, del nucleótido -40 al -45, un posible sitio de unión de Mot3p (CAGGCC). Mot3p, una proteína con dedos de Zn tipo Cys2-His2, participa en la respuesta genética a feromonas, y en la activación transcripcional de numerosos genes no relacionados con esta señal, entre ellos *CYC1*, *SUC2* y *LEU2* (Grishin y col., 1998).

La inspección de la secuencia de DNA del promotor y terminador del gen *TdLEU2* mostró también la existencia de elementos bien conocidos que participan en el proceso de transcripción general. En las posiciones -144 a -138 y -71 a -65, localizamos dos posibles cajas TATA que coinciden con la secuencia consenso TATATA, junto a una secuencia no-consenso, TATACC, en este caso en las posiciones -151 a -146 (Figura 1.6). Como se mencionó anteriormente para el gen *TdHIS3*, estas secuencias se encuentran frecuentemente en promotores de levadura y juegan un papel muy importante en la transcripción (Struhl, 1982). La región flanqueante 3' al codón de parada TAG, reveló también la existencia de una secuencia rica en As y Ts, TAG-(N)-TATGT, que ha sido sugerida como una posible señal de

terminación de la transcripción para algunos genes de levaduras (Zaret y Sherman, 1982).

2.3.- Organización de la región *TdLEU2*

La Figura 1.7 muestra el árbol filogenético basado en la comparación de 16 secuencias de proteínas Leu2 de levaduras. Como en el caso de *TdHis3p*, analizado anteriormente, los resultados pusieron de manifiesto la separación de dos grupos principales, el grupo *Saccharomyces* y el grupo *Candida-Pichia*. Al igual que *TdHis3p*, *TdLeu2p* estaría incluida en un grupo monofilético junto a las proteínas de *Z. rouxii* y *Z. bailii*, todas ellas muy próximas a las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

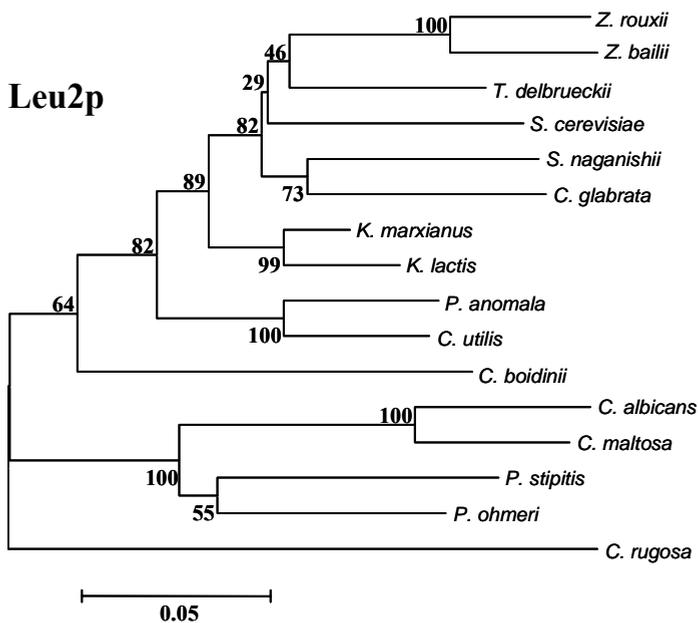


Figura 1.7. Árbol filogenético basado en las distancias corregidas Poisson entre pares de secuencias de aminoácidos de diferentes secuencias Leu2p de levaduras. Para ello se ha empleado el algoritmo del vecino más próximo (Neighbour-Joining) (Saitou y Nei, 1987). Se ha realizado un test de “bootstrap” de 1.000 réplicas para testar la robustez de las ramas del árbol. La barra corresponde a la corrección Poisson de 0,05 de reemplazamientos de aminoácidos por residuo.

Capítulo I

En la Figura 1.6, se muestra la secuencia completa del inserto contenido en el plásmido YEpTdLEU-1. Como cabría esperar, el análisis mediante el programa BLAST, reveló la existencia en este bloque de DNA cromosómico, de tres pautas de lectura abiertas colindantes con *LEU2*, y que presentan una elevada homología con los genes *NFS1*, *PET8* y *RLP7* de diferentes levaduras. En la zona 5', flanqueante al gen *TdLEU2*, y a 171 pb, encontramos una pauta de lectura abierta incompleta de 948 pb, que mostró un porcentaje de identidad del 59% con el gen *RLP7* de *S. cerevisiae*. Rlp7p, una proteína nucleolar esencial, homóloga a proteínas L7 ribosomales, participa en el procesamiento de precursores de rRNAs (Dunbar y col., 2000). Así pues, *RLP7* y *LEU2* se encuentran contiguos y con la misma orientación transcripcional en *T. delbrueckii*, una organización que se repite en *K. lactis*, *K. waltii*, *S. kluyveri* y *C. glabrata*, pero no en *C. utilis*, donde los dos genes aparecen en orientación convergente. Esto pone, de nuevo, de manifiesto la estrecha relación filogenética entre *T. delbrueckii* y las especies del complejo *Saccharomyces*.

Evidencias en esta línea fueron también encontradas del análisis de la región 3' de *TdLEU2*. En ella, encontramos otras dos pautas de lectura abierta. La primera de ellas, de 1.488 pb, separada de *TdLEU2* por una zona intergénica de 104 pb y localizada en la hebra opuesta, presenta un 77% de identidad con el gen *NFS1* de *S. cerevisiae*, cuyo producto está implicado en la toma y distribución de hierro (Li y col., 1999). La posición relativa de estos dos genes parece conservada, al menos en todas las especies de levaduras de las que se dispone de datos de la secuencia de la región *LEU2*, aunque difieren en orientación. Como en el caso de *T. delbrueckii*, en al menos siete especies del complejo *Saccharomyces*, *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, *K. lactis*, *K. waltii*, *C. glabrata*, *S. servazzii* y *Z. rouxii*, éstos muestran una orientación opuesta, compartiendo una región 3' común. Por

el contrario, en especies del complejo *Candida-Pichia*, como *P. anomala*, *C. albicans*, *C. maltosa* y *C. rugosa*, los genes *NFS1-LEU2*, muestran la misma orientación. Este hecho sugiere que la inversión de *LEU2* constituyó un episodio evolutivo posterior a la separación de las especies de ambos complejos.

La situación de la tercera pauta de lectura confirmó esta situación. En efecto, contiguo a *TdNFS1*, el análisis del inserto contenido en el plásmido YE_pTdLEU-1, mostró la existencia de una pauta de lectura incompleta de 297 pb, con una alta homología (63% de identidad) con el gen *PET8* de *S. cerevisiae*. Como cabría esperar, la orientación de *PET8* en *T. delbrueckii* es opuesta a la de *NFS1*, una situación que también se da en otras levaduras del grupo *Saccharomyces*. Por el contrario, los dos genes aparecen dispuestos en la misma orientación en *C. albicans*. Así, podemos especular con un posible orden de genes ancestral en este bloque, $\rightarrow RLP7 \rightarrow LEU2 \leftarrow NFS1 \rightarrow PET8$, similar al observado en *K. waltii*, *C. glabrata* o *T. delbrueckii*. Otras especies del grupo, como *S. kluyveri*, muestran el mismo orden de genes, aunque el bloque completo, incluyendo genes adicionales, aparece en una orientación inversa. Esto sugiere la existencia de eventos de reordenación génica, durante la evolución de estas especies, aunque no existe una explicación sencilla a estas inversiones. En este sentido sería interesante disponer de nuevos datos de la organización de genes y orientación en la vecindad de los cuatro genes identificados en este trabajo.

2.4.- Interrupción del gen *TdLEU2*

Para la interrupción del gen *TdLEU2* utilizamos, en primera instancia, un casete de disrupción con flancos cortos homólogos, generado por PCR (SFH-PCR) (Wach y col., 1994). Sin embargo, y después de sucesivos intentos, no fue posible recuperar transformantes Leu⁻. Por ello, decidimos

Capítulo I

construir un casete, mediante ligación y restricción, con flancos más largos, con el fin de aumentar la eficiencia de recombinación (Amberg y col., 1995; Wach, 1996). Siguiendo esta estrategia (ver sección de Materiales y Métodos), reemplazamos un fragmento de 450 pb del gen *TdLEU2* con el módulo de selección natMX4 (Goldstein y McCusker, 1999), que contiene el gen de resistencia a nourseotricina, originando el plásmido YEpTdLEU2-natMX4 (Figura 1.8). La digestión con *EcoRI* de este plásmido libera un casete de interrupción en el que el módulo de selección está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por 346 pb y 334 pb, respectivamente, homólogos al gen *TdLEU2*.

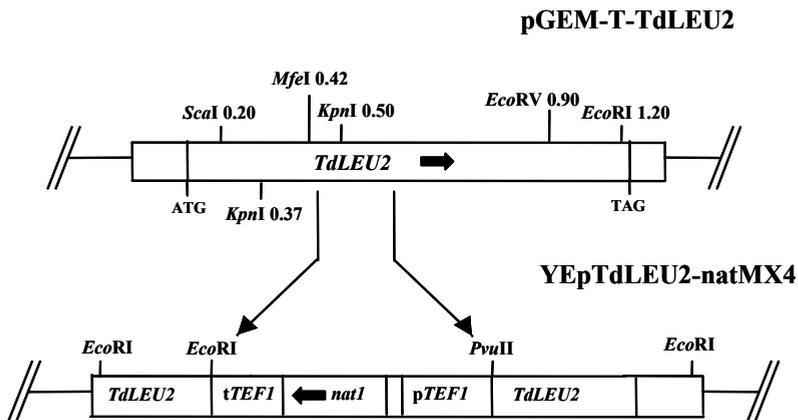
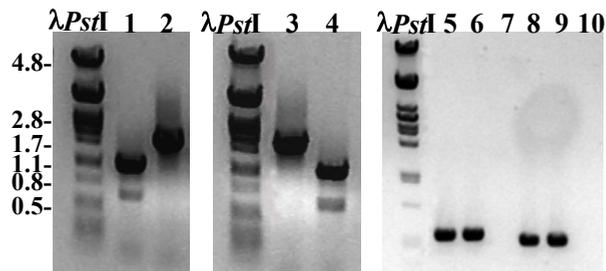


Figura 1.8. Representación esquemática del mapa de restricción del inserto de DNA subclonado en el plásmido pGEM-T-TdLEU2 y de la construcción del plásmido YEpTdLEU2-natMX4. Sólo se han indicado los sitios de restricción más relevantes. Los números indican el tamaño del fragmento generado desde el sitio de restricción hasta el MCS a la izquierda del dibujo. Las flechas indican las enzimas usadas para separar el casete de interrupción del gen *TdLEU2* del resto del plásmido.

La funcionalidad del casete de interrupción fue ensayada en dos cepas de *T. delbrueckii*, PYCC5321 e PYCC5323. La eficiencia de transformación fue similar en ambas, con valores de 50 a 100 transformantes por μg de DNA. Después de confirmar el fenotipo de resistencia al antibiótico, diez

transformantes de cada cepa fueron analizados en placas de medio mínimo, con o sin leucina. De ellos, al menos, ocho de cada estirpe mostraron un claro fenotipo Leu^- . Para comprobar si la integración del casete se había llevado a cabo en el locus *TdLEU2*, analizamos mediante PCR tres transformantes de cada cepa, utilizando oligonucleótidos diseñados para hibridar dentro o fuera de la zona reemplazada de *TdLEU2*, o dentro del módulo de selección (Figura 1.9). Como puede observarse, los transformantes analizados mostraron un perfil de bandas que se corresponde bien con la inserción del módulo de interrupción en el locus *TdLEU2*, confirmando así la obtención de mutantes *leu2* en las dos cepas de *T. delbrueckii*.



Línea	Cepa	Oligonucleótidos	Producto de PCR (Tamaño esperado, pb)
1	PYCC5321	EAA-16 - EAA-17	1.238
2	PYCC5321 Δ <i>leu2</i>	EAA-16 - EAA-17	2.041
3	PYCC5323 <i>Δleu2</i>	EAA-16 - EAA-17	2.041
4	PYCC5323	EAA-16 - EAA-17	1.238
5	PYCC5321 Δ <i>leu2</i>	EAA-16 - M7	536
6	PYCC5323 <i>Δleu2</i>	EAA-16 - M7	536
7	PYCC5321	EAA-16 - M7	-
8	PYCC5321 Δ <i>leu2</i>	EAA-16 - KanS2	493
9	PYCC5323 <i>Δleu2</i>	EAA-16 - KanS2	493
10	PYCC5321	EAA-16 - KanS2	-

Figura 1.9. Verificación por PCR de la interrupción de *TdLEU2*. Se han usado diferentes combinaciones de oligonucleótidos para comprobar la correcta integración del casete. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al un 1% de concentración. También se muestran los tamaños esperados de los productos de la PCR con ambas cepas.

CAPÍTULO II

Identificación de genes de *Torulaspora delbrueckii* que confieren resistencia a NaCl en *Saccharomyces cerevisiae*

La habilidad para transformar la levadura de panadería *S. cerevisiae*, mediante la tecnología del DNA recombinante, ha abierto la posibilidad de deletar genes indeseables o de alterar la expresión de un gen, sin modificar la de aquellos responsables de propiedades tecnológicas de interés (Rández-Gil y col., 1999; Dequin, 2001). Es posible también alterar de manera coordinada la expresión de grupos de genes implicados en una función particular, e incluso, encender o apagar la expresión de un gen dado en una etapa específica del proceso de panificación. No obstante, la aplicación de esta estrategia requiere de un profundo conocimiento de los determinantes genéticos que controlan el comportamiento tecnológico de las levaduras de panadería, en particular en condiciones de estrés.

S. cerevisiae ha sido extensamente utilizado como modelo de organismos eucariotas. La secuenciación completa de su genoma y la disponibilidad de herramientas moleculares para su manipulación, junto a la sencillez de su cultivo, permiten obtener datos experimentales, de aplicación en diferentes áreas de la ciencia, en un tiempo relativamente corto. En lo que se refiere a estrés, la situación no es, sin embargo, tan halagüeña. Esta levadura está lejos de ser un referente en lo que se refiere a su tolerancia a estrés, y en particular a estrés osmótico. Numerosas levaduras de otros géneros, como *Debariomyces*, *Zigosaccharomyces* o *Torulaspota* muestran una capacidad muy superior a la de *S. cerevisiae*, para hacer frente y proliferar en un ambiente hostil de elevada osmolaridad. En el caso de *Torulaspota* y en concreto de la especie *T. delbrueckii*, a este hecho se suma su capacidad para fermentar una masa panaria (Almeida y Pais, 1996; Hernández-López y col., 2002), una circunstancia que parecía relegada a cepas de *Saccharomyces*.

En este contexto, la utilización de este organismo como levadura modelo de resistencia a estrés osmótico, abre numerosas posibilidades para avanzar

Capítulo II

en nuestro conocimiento de las bases moleculares de la tolerancia a estrés en levadura y diseñar estrategias para la mejora de cepas industriales. En este capítulo describimos los resultados obtenidos en el rastreo de una genoteca de *T. delbrueckii*, dirigido a identificar genes, cuya expresión en un alto número de copias, permita aumentar la tolerancia a estrés de *S. cerevisiae*.

1.- Identificación de genes de la cepa PYCC5321 que confieren mayor tolerancia a estrés salino en *S. cerevisiae*

Con el objeto de identificar genes de *T. delbrueckii* cuya sobreexpresión mejore la tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae*, se transformó la cepa CEN.PK2-1C, que presenta un claro fenotipo de sensibilidad a NaCl, con una librería genómica de la cepa PYCC5321 de *T. delbrueckii*, construida anteriormente (Hernández-López y col., 2002). Los transformantes fueron seleccionados en placas de medio mínimo conteniendo glucosa como fuente de carbono y 0,5 M de NaCl. En aquellos transformantes en los que se observó un crecimiento más activo, con respecto a la cepa salvaje, se llevó a cabo el aislamiento del plásmido que contenían y tras comprobar, de nuevo, que el fenotipo observado estaba ligado a la presencia del plásmido, se procedió a su análisis. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos con tres plásmidos YEpTdSAL-1, YEpTdSAL-2 y YEpTdSAL-3.

1.1.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-1

El plásmido YEpTdSAL-1 contuvo un inserto de aproximadamente 3,1 Kb, cuya secuenciación reveló la presencia de una pauta de lectura abierta que presenta una elevada homología, en torno a un 60%, con los genes *ENA1*, *ENA2* y *ENA5* de *S. cerevisiae*. *ENA1* codifica la principal ATPasa tipo-P de *S. cerevisiae*, implicada en el flujo hacia el exterior de iones Na⁺ (Haro y col., 1991). Su expresión es inducida tanto por estrés osmótico como por

estrés iónico, confiriendo tolerancia a Na⁺ (Márquez y Serrano, 1996; Márquez y col., 1998). Por su parte, *ENA2* y *ENA5*, son homólogos a *ENA1*, 99 y 98%, respectivamente, formando parte, del denominado “cluster” de genes *ENA*. Al contrario de *ENA1*, la sobreexpresión de *ENA2* no confiere mayor tolerancia a Na⁺, sino a Li⁺, sugiriendo que los miembros de este grupo codifican transportadores funcionalmente distintos (Wieland y col., 1995), implicados en tolerancia a estrés iónico (de Jesús Ferreira y col., 2001).

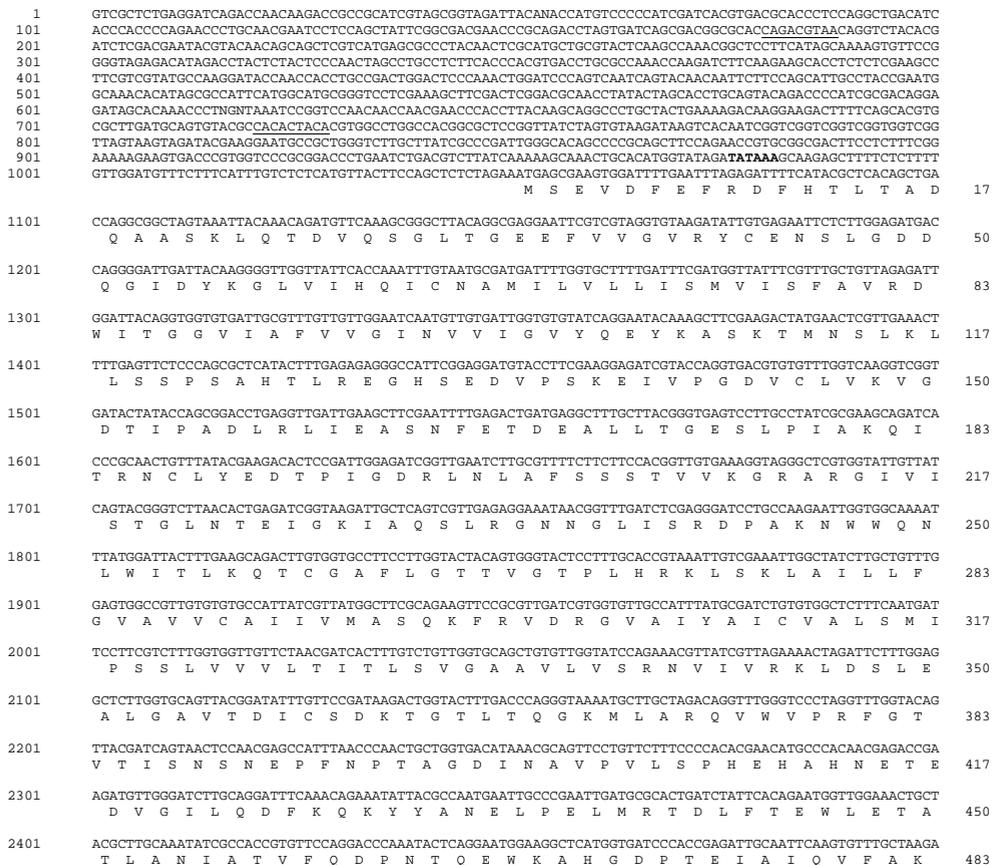


Figura 2.1. Secuencia de DNA correspondiente al inserto del plásmido YEpTdSAL-1. La posible secuencia parcial de aminoácidos de *Ena1p* de *T. delbrueckii* se muestra debajo de la secuencia de DNA. Una potencial caja TATA encontrada en el promotor del gen aparece señalada en negrita. Los elementos consenso de unión a Mig1p están subrayados.

Capítulo II

```
2501   AGATGGATATGCCTCGTTCTGCTTTGACAGGCGAAAAATCCCGTAAACGATAGTGATTCTACCTGCGATGAAAAGAAGCAAGAGCCAAATATGTTCAAGT   517
      K M D M P R S A L T G E N S R N D S D S T C D E K K Q E A K Y V Q V
2601   CGCAGAATTCCTCTTGGTCAACAATTAAGAGAATGTCTGCTGTCTACGAAAATACCCAGGATAACTCACAACCGTTTTGCGCAAGGGTGCCTTTTGAA   550
      A E F P P D S T I K R M S A V Y E N T Q D N S Q T V F A K G A F E
2701   AGTGTCTTGAAGTGTGTAATACTGGCACGGTGAACCCGGTATCGTTCGACTTGAAGATGATGATATCAATAATATAAAGGAAGAAGTTAACACCCCTTT   583
      S V L K C C K Y W H G E T G I V D L K D D D I N N I K E E V N T L
2801   CTTACAAGGTTTGAGAGTTTTAGCGTTCCCCAGAAGTTTACTACCAAGATGCTCTGAATCAGGATATCAAGGTTAAGCTATCTGAAAAGAGAGATTT   617
      S S Q G L R V L A F A K K V Y Y Q D A L N Q D I K G K L S E K R D F
2901   TGCTGGATCCGAACATATGTTTCTGGGTTTGATCGGATCTACGATCCTTCCAGAAACGAAAACCGCCGTCGCGTCCAAGAGAATTCATTATGCTGGTA   650
      A G S E L C F L G L I G I Y D P S R N E N R R C G P R E F I M L V
3001   TCAACCGTTTCGATGGTGGACAGGTGATTTCCAGACAACCTGGCAAGGCTATCGCTTCAGAAAGTCGATTTTGCAATAACCTTCCACCTTCCCCAGAA   683
      S T V R W W T G D F P R T W Q R L S L Q K V G F C N N L S T S P R
3101   AG
      K
      684
```

Figura 2.1- Continuación

1.1.1.- Análisis de la secuencia parcial del gen *TdENAI*

Como vemos en la Figura 2.1, la pauta de lectura abierta identificada en el plásmido YEpTdSAL-1 codifica un polipéptido de 684 residuos que muestra un 61% de identidad con un fragmento N-terminal de similar longitud de las proteínas Ena1, Ena2 y Ena5 de *S. cerevisiae*. Como cabía esperar, el polipéptido de *T. delbrueckii* exhibió también homología, aunque menor, con la porción amino-terminal de otras proteínas Ena de levaduras, como Ena1p de *Z. rouxii* (57% de identidad) o Ena1p de *D. hansenii* (49%) y en general con ATPasas implicadas en el transporte de cationes. En consonancia con estos datos, la búsqueda de dominios conservados (Marchler-Bauer y col., 2003) reveló la existencia de una zona, aminoácidos 1-89, con una alta homología a las cadenas α de ATPasas envueltas en el transporte de iones Na^+ y K^+ , pfam00690.11, que catalizaría la hidrólisis de ATP (Broude y col., 1989). Además, el análisis indicó la existencia de un segundo dominio (E1-E2 ATPasa, pfam00122.11), aminoácidos 89-351, característico de la superfamilia de ATPasas tipo-P o E1-E2, cuyos miembros median en el transporte a través de la membrana de todos los cationes biológicamente relevantes (Smith y col., 1993). Así pues, el inserto del plásmido YEpTdSAL-1 parece contener una forma truncada del gen

TdENAI, cuya sobreexpresión es suficiente para conferir mayor tolerancia a estrés por NaCl en *S. cerevisiae*.

Por otra parte, analizamos unas 1,000 pares de bases del promotor de *TdENAI*, con el fin de localizar secuencias consenso implicadas en la regulación de su expresión. El gen *ENAI* de *S. cerevisiae* es probablemente uno de los genes mejor conocidos en este sentido. Su expresión está fuertemente regulada y depende de varias rutas de transducción de la señal y factores de transcripción (ver el capítulo de Introducción de este trabajo), entre ellos Crz1p (Stathopoulos y Cyert, 1997) y el complejo represor Mig1p-Ssn6p-Tup1p (Alepuz y col., 1997; Proft y Serrano, 1999). Dos secuencias de unión a Crz1p, 5'-GAATGGCTG-3' y 5'-GGGTGGCTG-3', bastante alejadas del ATG de inicio, entre 713 y 820 pb, y que varían en su afinidad, han sido identificadas en el promotor de *ENAI* (Mendizábal y col., 2001). De forma similar, dos secuencias prácticamente idénticas a estas, 5'-GAATAGCTG-3' y 5'-GGGTGGGTG-3', localizadas a -912 y -943 pb del ATG, respectivamente, fueron localizadas en el promotor de *TdENAI*. Asimismo, la inspección de la secuencia reveló la existencia de dos posibles sitios de unión del factor transcripcional Mig1p, en las posiciones -323/-331 y -863/-871. Así pues, el gen *TdENAI* parece mostrar una regulación similar a la descrita previamente para *ENAI*.

1.2.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-2

La secuenciación del inserto contenido en el plásmido YEpTdSAL-2, reveló que habíamos clonado una región del genoma de *Torulaspora* ya descrita en este trabajo (Capítulo I). Como se muestra en la Figura 2.2, el fragmento obtenido mediante digestión parcial con *Sau3A*, contiene, en este caso, parte del gen homólogo a *MRP51* de *S. cerevisiae*, la secuencia completa de *DEDI* y una pauta de lectura incompleta que presenta homología con el gen

Capítulo II

RNR1/RNR3, que codifica una subunidad de la ribonucleótido reductasa de levadura (Elledge y Davis, 1990).

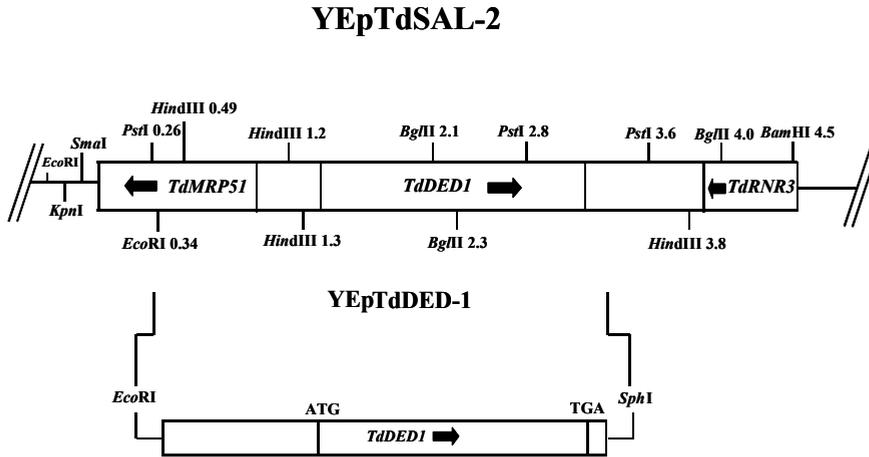


Figura 2.2. Representación esquemática del plásmido YEPTdSAL-2 y de la subclonación de *TdDED1* que da lugar al plásmido YEPTdDED-1. Los números indican el tamaño del fragmento generado desde el sitio de restricción hasta el MCS situado a la izquierda del dibujo. Sólo se indican los sitios de restricción más relevantes. El tamaño de los fragmentos está realizado a escala.

Ya que sólo el gen *TdDED1* parecía encontrarse completo en el fragmento aislado en el plásmido YEPTdSAL-2, este resultado sugería que la expresión en un alto número de copias de este gen era responsable del fenotipo observado. Para confirmar este extremo, construimos el plásmido YEPTdDED-1, que contiene el promotor, la pauta de lectura completa y el terminador de *TdDED1*, en el vector YEplac195 (Figura 2.2) y lo utilizamos para transformar la cepa salvaje CEN.PK2-1C. Como se observa en la Figura 2.3, la sobreexpresión de *TdDED1* incrementó la capacidad de crecimiento de la cepa parental en un medio conteniendo 0,5 o 1,0 M de NaCl, confirmando así la implicación de este gen en el fenotipo observado.

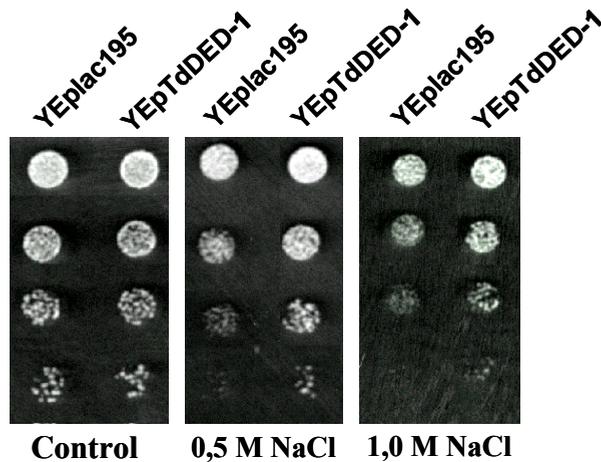


Figura 2.3. La expresión en un alto número de copias del gen *TdDED1* confiere mayor tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae*. La figura muestra el crecimiento de células de la cepa CEN.PK2-1C transformadas con el plásmido control YEplac195 o con el plásmido YEpTdDED-1. Las células se crecieron en MM-glucosa hasta una DO_{600} de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas, 10^{-1} a 10^{-4} , que se depositaron (3 μ l) en placas del mismo medio conteniendo 0 (control) 0,5 o 1,0 M de NaCl (concentración final). Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

1.2.1.- Análisis de la secuencia del gen *TdDED1*

La secuencia de nucleótidos de *TdDED1* contiene 1,795 pb correspondientes a una proteína de 597 aminoácidos que guarda una alta homología, 74,7% de identidad, con el correspondiente gen de *S. cerevisiae*, y en general con proteínas conteniendo un dominio Asp-Glu-Ala-Asp, característico de la denominada familia DEAD-box (Linder y col., 1989), la principal familia de helicasas de RNA de la superfamilia SF2 (Rocak y Linder, 2004).

Las helicasas de RNA, proteínas que requieren para su actividad ATP y que despliegan estructuras cortas de RNA, se clasifican atendiendo a la presencia en su secuencia de una serie de motivos conservados, en concreto de siete a nueve motivos que determinan su actividad y especificidad

Capítulo II

(Gorbalenya y Koonin, 1993). En la familia DEAD-box aparecen siete motivos conservados, denominados I (AxxGxGKT), Ia (ptreLaxQ), Ib (vxxTPgr), II (ixDEaD), III (sAT), IV (liF), V (aRGid) y VI (iHriGRggRxG) (Gorbalenya y col., 1989). Estos motivos se distribuyen en dos dominios funcionales característicos, el dominio DEAD, encargado de la unión e hidrólisis de ATP, y el dominio Helicasa C, implicado en la interacción con RNA. Como vemos en la Figura 2.4, el polipéptido TdDed1p contuvo los ocho motivos I, Ia, Ib y II-VI, característicos de los miembros de la familia DEAD-box. Además, todos ellos, mostraron un 100% de identidad de secuencia, respecto a los correspondientes motivos de la helicasa Ded1p de *S. cerevisiae*.

```
MADLSKKVENMSIKEKGGYVPPHLRNNGGARRANSGGFGSSGSDGSSGGS
FFGFSGRRGDSNRGGRRGGFARNGGGSGFRPAGTGRWTDGKHVPAARNEKM
EQQLFGVAEDPNFQSSGINFDHYDDIPVDASGENVPEPITEFTSPPLDEL
LLENIKLARFTKPTPVQKYSVPIVANGRDLMACAQTGSGKTGGFLFPVLS
                                                                 I
ESFSTGPSEIPENARGGYMRKAFPTAVVLAPTRELATQIFDEAKKFTYRS
                                                                 Ia
WVRATVVYGGADVGSQMRELDRCDDLVLVATPGRLNDDLLEKISLAKVKY
                                                                 Ib
LVLDEADRMLDMGFEPQIRHIVEGCDMPGVEDRQTLMFSAFFPVDIQHLA
                                                                 II
                                                                 III
RDFLSDYIFLSVGRVGGSTSENITQHVLYVEDEDKKSALLDLISSATDGLT
LIFVETKRMADQLTDFLIMQNFAATAIHGDRTQGERERALAAFRSGKANL
IV
LVATAVAARGLDIPNVTHVINYDLPSDVDDYVHRIGRTRAGNTGVSTAF
                                                                 V
                                                                 VI
FNRGNKNIVKGLVEILTEANQEVPSFLNDISRESSGIRGGGGSSFFNSRA
NSSRDYRKQGNNGSFGASRGGSSWGSSRGGSSWGESSGGNSSWW*
```

Figura 2.4. Secuencia de aminoácidos de la proteína Ded1p de *T. delbrueckii* donde aparecen señalados los siete motivos conservados que coinciden con los encontrados en la misma proteína de *S. cerevisiae*.

En consonancia con estos resultados, el análisis de dominios conservados (Marchler-Bauer y col., 2003) indicó la presencia de un dominio DEAD

(residuos 163-349) y un dominio Helicasa C (residuos 416-492) prácticamente idénticos a los encontrados en Ded1p de *Saccharomyces* (Figura 2.5). Sólo las extensiones N- y C-terminal, anexas a la región central responsable de la función helicasa, parecieron mostrar una mayor heterogeneidad. Así pues y a falta de una determinación experimental de su actividad, nuestros resultados sugieren que *TdDED1* codifica una helicasa de RNA de la familia DEAD-box.

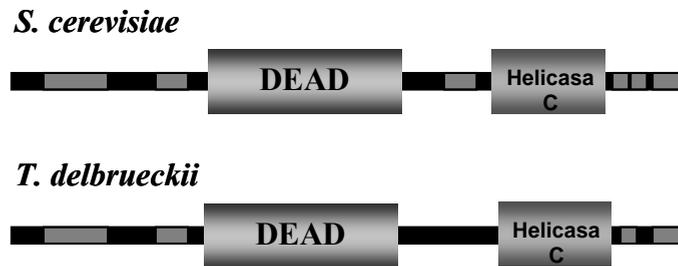


Figura 2.5. Representación esquemática de la proteína Ded1p de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Los dominios DEAD y Helicasa C aparecen señalados.

1.2.2.- El gen *DED1* está implicado en la respuesta a NaCl y frío

El aislamiento del gen *TdDED1* en el rastreo de genes de *Torulaspora* que confieren resistencia a estrés por NaCl, sugirió que el gen homólogo *DED1* de *S. cerevisiae* podía tener también un papel funcional en estas condiciones. *DED1* codifica una RNA helicasa esencial para el inicio de la traducción de mRNAs en *S. cerevisiae* (Chuang y col., 1997; Iost y col., 1999). Aunque no existen evidencias de la implicación de *DED1* en la respuesta a estrés osmótico en esta levadura, un buen número de genes inducidos en esta situación codifican proteínas ribosomales o implicadas en traducción (Rep y col., 2000). Por otra parte, se ha descrito que algunas mutaciones en este gen confieren un fenotipo de sensibilidad a frío (Chuang

Capítulo II

y col., 1997) y que el nivel de mRNA de *DED1* es mayor a 12°C que a 30°C (Sahara y col., 2002). En este sentido, un descenso brusco en la temperatura ambiental genera, al menos temporalmente, un estrés iónico (Wolfe y Bryant, 1999). Además, algunos genes implicados en tolerancia a este estrés parecen conferir también resistencia a frío (de Jesús Ferreira y col., 2001).

Así pues, decidimos analizar mediante *Northern blot*, el perfil de expresión de *DED1* en células transferidas a un medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. Como control, utilizamos células sometidas a estrés por frío. Como se observa en la Figura 2.6, el gen *DED1* aumentó su expresión bajo condiciones de estrés salino, obteniéndose niveles de inducción, en torno a 1,5 veces, similares a los observados en células sometidas a estrés por frío. Así pues, la adaptación a estrés osmótico en *S. cerevisiae* pasa, al menos en parte, por incrementar su capacidad traduccional y nuestros datos sugieren que Ded1p está implicado en esta función. Experimentos adicionales son, sin embargo, necesarios para establecer el papel exacto de esta proteína en la respuesta a estrés osmótico.

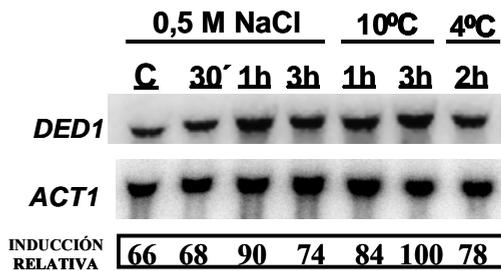


Figura 2.6. Análisis de la expresión del gen *DED1* en condiciones de estrés por NaCl y frío. Células de la cepa CEN-PK2-1C fueron crecidas en medio YPD ($DO_{600} = 0,5-0,6$), transferidas a 10 o 4°C, o al mismo medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. A los tiempos indicados, una muestra de células de cada cultivo fue colectada y procesada para la extracción de RNA total. El análisis del nivel de mRNA de *DED1* se llevó a cabo mediante *Northern blot*, utilizando una sonda de este gen marcada con ^{32}P . Para el control de carga y transferencia, la membrana se rehibridó con una sonda del gen *ACT1*. Los valores indican la inducción relativa de *DED1* con respecto a la muestra con mayor nivel de mRNA, a la que se adjudicó el valor de 100.

1.3.- Caracterización del plásmido YEpTdSAL-3

El tercer plásmido aislado en el rastreo de la genoteca de *T. delbrueckii*, YEpTdSAL-3, contenía un inserto de casi 1,9 kb, cuya secuenciación reveló la existencia de dos pautas de lectura abierta, una aparentemente completa homóloga al extremo 3' del gen *SIP1* de *S. cerevisiae*, que denominamos ORF1 y una parcial, ORF2, que presentaba homología al gen *GIS4* de esta levadura. Como se mencionó en el Capítulo de Introducción, el gen *SIP1* codifica una de las subunidades β de la proteína quinasa Snf1p implicada en represión por catabolito (Yang y col., 1994; Jiang y Carlson, 1997) mientras que el producto de *GIS4*, ha sido implicado en la ruta de señalización Ras/cAMP (Balciunas y Ronne, 1999).

En *S. cerevisiae*, los genes *SIP1* y *GIS4* se localizan en los cromosomas IV y XIII, respectivamente. Ambos, han sido implicados directa o indirectamente en la respuesta a estrés osmótico en esta levadura. Así, el análisis sistemático de una colección de mutantes nulos de *S. cerevisiae* ha identificado a *SIP1* como implicado en tolerancia a Na^+ y Li^+ (Giaever y col., 2002). Por su parte, mutantes de delección o inserción del gen *GIS4*, muestran también un claro fenotipo de sensibilidad a Na^+ y Li^+ (de Jesús Ferreira y col., 2001).

Ya que de los dos fragmentos de DNA identificados en el plásmido YEpTdSAL-3, sólo la ORF1 parecía incluir una pauta de lectura completa, centramos nuestra atención en ésta, tratando de confirmar su implicación en el fenotipo observado. Con este fin, subclonamos mediante restricción el fragmento completo de 1,197 pb, incluyendo 82 y 154 pb de las zonas flanqueantes 5' y 3', respectivamente, en el vector YEplac195 y transformamos con el plásmido resultante, YEpTdSAL-3a, la cepa parental CEN.PK2-1C. Como puede observarse en la Figura 2.7, la expresión en un

Capítulo II

alto número de copias del fragmento de DNA analizado, aumentó la tolerancia de la cepa salvaje a NaCl.

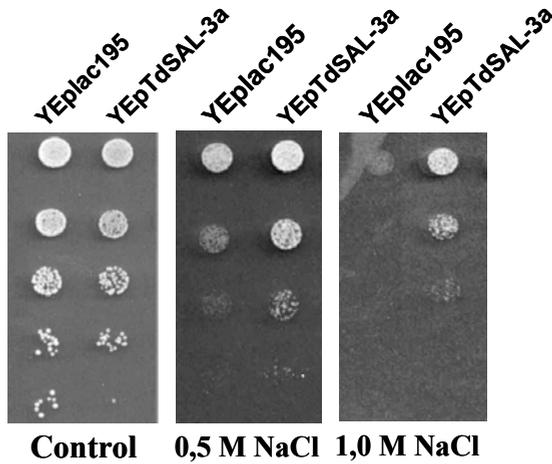


Figura 2.7. La sobreexpresión del gen truncado *TdSIP1-t* incrementa la resistencia a NaCl de *S. cerevisiae*. Células de la cepa CEN.PK2-1C transformadas con el plásmido YEplac195 (control) o YEpTdSAL-3a, el cual contiene el gen *TdSIP1-t*, se cultivaron en MM-glucosa hasta una DO₆₀₀ de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas de los cultivos, 10⁻¹ a 10⁻⁴, que se depositaron (3 μ l) en placas del mismo medio conteniendo 0 (control) 0,5 o 1,0 M de NaCl. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

Este resultado nos llevó a pensar que la sobreexpresión del gen *SIP1* de *S. cerevisiae* podría también conferir mayor resistencia a este estrés. Sin embargo, este extremo no fue confirmado en experimentos en los que se comparó el crecimiento, en condiciones de estrés salino, de células de la cepa salvaje transformadas con el plásmido pB44 (Yang y col., 1992), que contiene el gen *SIP1* bajo el control de su propio promotor, o con un plásmido vacío (Figura 2.8). Así pues y a pesar de la homología encontrada en la región C-terminal de ambas proteínas, nuestros resultados parecían indicar que nos encontrábamos ante un gen diferente a *SIP1*.

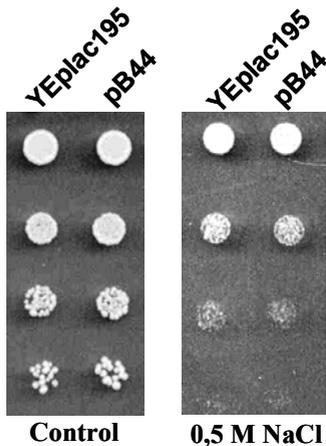


Figura 2.8. La sobreexpresión del gen *SIP1* de *S. cerevisiae* no confiere tolerancia a NaCl. Células de la cepa CEN.PK2-1C fueron transformadas con el plásmido YEplac195 (control) o con el plásmido pB44 que contiene el gen *SIP1* de *S. cerevisiae*. Las condiciones de cultivo fueron idénticas a las descritas en la Figura 2.7.

1.3.1.- La pauta de lectura ORF1, es una forma truncada del gen *TdSIP1* homólogo al gen *SIP1* de *S. cerevisiae*

El gen *SIP1* de *S. cerevisiae* tiene una longitud de 2,448 pb, frente a tan sólo 1,197 pb de la pauta ORF1. El análisis comparativo de otros genes de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*, p.e. *HIS3*, *LEU2* (este trabajo) o *URA3* (Hernández-López y col., 2002), había demostrado, sin embargo, que las proteínas de ambos organismos presentan un alto grado de homología, tanto estructural como funcional. Así pues, nos planteamos si el fragmento de DNA aislado en el plásmido YEpTdSAL-3 no sería, en realidad, una forma truncada de la proteína Sip1 de *T. delbrueckii*, capaz de conferir un fenotipo de tolerancia a estrés iónico, no asociado a su actividad natural.

Teniendo en cuenta estas evidencias, procedimos a un nuevo rastreo de la genoteca de *T. delbrueckii*, con el objeto de localizar un posible clon que contuviera el hipotético gen completo, homólogo a *SIP1* de *S. cerevisiae*. Para ello, se utilizó una estrategia idéntica a la empleada para el aislamiento del gen *TdLEU2*. Se aislaron en total cuatro plásmidos. Uno de ellos era similar al clon original analizado, conteniendo el plásmido YEpTdSAL-3, mientras que los otros tres contenían un fragmento de DNA, cuya

Capítulo II

secuenciación parcial reveló que exhibían una cierta homología con la región 5' del gen *SIP1*. El inserto de uno de estos plásmidos, al que denominamos YEpTdSAL-3b fue secuenciado hasta un pequeño fragmento de 587 pb del posible promotor, que no guarda homología con el DNA de *S. cerevisiae*. Éste contenía una pauta de lectura abierta de 1,944 pb, que codifica para un polipéptido de 648 aminoácidos (Figura 2.9), más corto pues, que el producto del gen *SIP1* de *S. cerevisiae*, cuya secuencia predice una proteína de 863 aminoácidos.

1	ATTNANGACCAAGGCCAAGTGTTCGGAGAAAGGAGTAGTCGTCGAAGCTGAGGATGTCGAGCGCTACTCGATAAGCACATGGACGTGTAATAACCTTCCT	
101	AAATATCCATTATTAFTACTATTTATGGTGTAAACCTTTTCTACTATGACGAAGCAACCCATGTCCGTCACCCGGCAAGAAAGCGTTGAAGGGGTTTAAA	
201	GCAGAGTAAATCAGAAATGCAACCACTATAACCAATAATCACTCCAAATCACCATTTCAGCCATGGGTAAATCCGCTCGGTCAAGAACATCAGCA	
301	ACACCCGACCGTGTGCTGGATGCAAAATCACCTTTCAGAGGGCGCAATTGGGGAATGAAATGAGTTCGGGAAGACACAGAGATACACGCTCACAGCTT	
401	TTCCCAAGTAGBAACTAGACATGTCGGTCCACATTCGATGAATGCCAAGAGAAATGCCATCCTCATCCGCACTCCTCCTGTTGTCAGGTCGGATTA	
501	TTCACTTCGACAGCATCGCAAGAAGAGACTCCGGCAAAACACAGGTTCCACTGAAAATATAAGAGATAAATGGCTGGATATCGTTAAAGAGTCTAATGAA	
	M A G L S L K S S N E	11
601	AATGCTCAGGTGCCTCGTTCCTGACACCGGGTCATTCTACTCCAACAGTACAACCTACGAGACAGGCTCGAGTCCGGCAGCTGATCTAAAGAATAAAT	
	N A Q V P P S F L T P G H S T P T V Q P P T R Q A A V P P A A D L K N K	44
701	TGCAGAATGGTTAAATCAACAGAAGAAATCTCATCTCATAGGTTTCAGCGTCCCAAGTGGTGAAGCTTTGAAAAGACCTTGGCTTGATGACGGTGAAT	
	L Q N G L N Q Q K E I S S H R F Q R P S V V A L K K T L L D D G E L	78
801	ACATTTCTACTAGTCAAGGTCACGTCAGGCGATGTCGTAAGCTCCGCGTCCCTAGATATATACTCTGCAATGAACTTGATTCACCAACTCAAAGTGGT	
	H S T S S R S T S T S G D V V S S A S L D I Y S A L N L D S P T Q S G	111
901	CAAGGCAAAAAGACACAGACGCCGATCCAGATACCTCGGATTCGACGATATTAGTGATGATGGGTATTTGAAAAGACCTTGGCTTGATGACGGTGAAT	
	S K A K D T D A D P D T S D F D D I S D D G Y L Q S E D V V L N Q	144
1001	CACCTTCACAGATGTTTGGAGGAGATATGAAGAGGAAAAGACCTGCAAGAAAATCCAAGGTTCCCAATACAAGTCAATGATCAAAATTTGAAAGTAGT	
	S L L Q N V L R R D M K R K R P A K K S K V P N T S H V S N L K A S	178
1101	TAGTAACCTCGCATCCTCAGGAGCTTAGAGAATGGTAACTGCGGATGCGAAAAAATCAAAATCTTTAAGTTATGACGGTCTCTACCCGATTTCCAA	
	S N S A S Y E S L E N G N V P D A K K L K S L S Y D G S L P S F Q	211
1201	CCTACCGCTCAGAAATATGATCGTTTGAACGGATTTGGCTCAGCAATGGATTCAATAGAATCGATTCTTTGAAAAGGGTCTGTCGAACATAGAGAGG	
	P T A Q N N D R L N G L A H D N G F N R I D S F E K G S V E H R E	244
1301	TCGAGACTTCCCAACAATGAGGAATTCATCGTCGGCATCACCAGTTCAGCTCATAATCTCAAATACAGAACCCAGAGAAAGTTCATGTGATTTTAAA	
	V E T S P T M R N S S S A S P S S S S I I S N T E P E K V H V I L K	278
1401	ATGGAGGACCAAAATGAAGACCCCTTCCAAATGTAATAATCTATCGTCAGTACTGATATTCGCTCAGCACTAAATTTTGATCCACTGACAAATCATT	
	W R D Q I E D P S K C K I T I V S T D I A S A L N F I D S F E Y P S D K S F	311
1501	CATGGCACCTTTCCATGAAATACGACGAGAAGGAAAACAATTTTATGTTCCAAATCTTTCATGCCACCTGGTATTACAAATTTCAATTCGTTATCA	
	H G T F S M K Y D E K E N N F Y V P N L S L P P G I Y K F Q F V I	344
1601	ATGGTGAATCAGACACTCAAACCTATTGCCATCAGCAACAGACTCCGTCGGTAACTCGTTAATGGTTCGAAGTCACTCCCTGGTTATGAAAGTGTGCA	
	N G E I R H S N L L P S A T D S V G N I V N W F E V I P G Y E S V E	378
1701	GCCTTTTAGAAAATGAAATCGACTACCATGAAAATATGGGAATCGACCCCCACAATCTGACTCAAGCACTAGTACTGGTAAACATCATGACGAATCTCCG	
	P F R N E I D Y H E N M G I D P P Q S D S S T S T G K H H D E S P	411
1801	GGCAAGTGCCTTGGTGCAGCCGTCGGGGAAGACCACCTTTAGCGGCACGTCACTTCTTCATATCCCAACAACCAAGAGAGGCTGGAACCCCTT	
	G K V P L V Q P V P G R P P L A A R H T S S Y S N S Y S D K S F	444
1901	ACTCGGATATACTGGTGAAGCAGATGTAATTCAGCGGTGAGAAAATCGCCATTAATACATCAAACACTTAGTAGCATAGATCTGGTACAGCATGCA	
	Y S D Y T G V S R C N S A V R K S P L I H Q T L S S I D L V T A L Q	478
2001	ACCCAGAAAATCAGAAATCGAATGAGATACCCGAGCTGTTTAAAGCAGTAACTGATTAGGCCAGAGTATGAAAATCAATCCCAACTCCACACCA	
	P K K Y E S N E I P E L F K A G N V L G Q S D S F G Y T P P P	511
2101	CCTCCCATGAACCCGATCATATGATCAGCCTAGTTTCTTAGAGAATGTTGTTGATTGTAATCAGGATAAATTTGTTTGTAGCCTTCAACAGGGCGGAC	
	P P M N P P S Y D Q P S F L E N V V D C N Q D N L F V S L Q Q G G	544

Figura 2.9. Secuencia de DNA del inserto contenido en el plásmido YEpTdSAL-3c. La secuencia de aminoácidos del producto del gen *TdSIP1* se muestra debajo de la secuencia de DNA. El elemento TATAAGA en el promotor del gen está marcado en negrita.

```

2201  TTCTCGATGCAGAACTGCAGAACAGTTGTTTTGGAGAATACTGTGCCAGATTACCAGTGTATCTGAACTCGACGTACTTAACAAGATCTTCAA 578
      L L D A E T A E Q L F L E K Y T V P D L P V Y L N S T Y L N K I F N
2301  CGAGTTTCAAAGCACAACTCTTTGGGAAGCAACTCCAGCGTTTGAATCATATCATCCACATGTTAACTTAAACCATCTACTGACAAGCAGTATCAGA 611
      E F Q K H N S L G S N S S G L N H I I P H V N L N H L L T S S I R
2401  GATGAAATGATCAGTGTGGCTGTACTACTAGATACGAGGGTAAATTTATCACTCAAGTAGTATACGGTCCTTGTACTACGCCAGTGGTCCAAGGCGG 644
      D E M I S V G C T T R Y E G K F I T Q V V Y A P C Y Y A S G P K A
2501  AGGGCAAGAAGTGAAGTATAGTCACTGTTATGTATGTTTGTATTAGCATCTATGTATTTAATGATGAATGACCGATAAGATTAACCAAATATCAAGAAGA 649
      E G K K *
2601  CGATGGTTATTGAAATATTGTTATCTTGTATTACATAAATTATACAACCCTTTTCATGCTGTCTATGGTCTTCTTCA

```

Figura 2.9.- Continuación

El alineamiento de las dos proteínas reveló una identidad global del 31,8%, aunque este valor se incrementa hasta un 48,1% en la zona C-terminal, residuos 255 a 638 de la proteína de *T. delbrueckii* y 482 a 854 de Sip1p (Figura 2.10). Además, la proteína presenta homología, aunque menor, con las otras dos subunidades β de Snf1p, Sip2p (21,9% de identidad total) y Gal83p (21,4%), aunque de nuevo, la homología aumenta cuando se compara únicamente la porción C-terminal de estas proteínas. En esta zona residen los dominios ASC (Figura 2.10, aminoácidos subrayados) y KIS (Figura 2.10, aminoácidos en negrita) responsables de la interacción de Sip1p con Snf4p y Snf1p, respectivamente (Yang y col., 1992, 1994; Jiang y Carlson, 1997). Además, la región KIS se encuentra en miembros de la familia de proteínas pfam04739.5, recibiendo el nombre de AMPKBI, debido a que está presente en la subunidad β de la proteína quinasa activada por 5'-AMP de humanos, homóloga a Snf1p de *S. cerevisiae*. Así pues, nuestros datos sugerían que el gen aislado en el plásmido YEpTdSAL-3b codifica la proteína homóloga a Sip1p de *S. cerevisiae*, de la que difiere mayoritariamente, en una extensión N-terminal de unos 180 aminoácidos, presente en Sip1p. Una representación esquemática de ambas proteínas con los dominios ASC y KIS se muestra en la Figura 2.11.

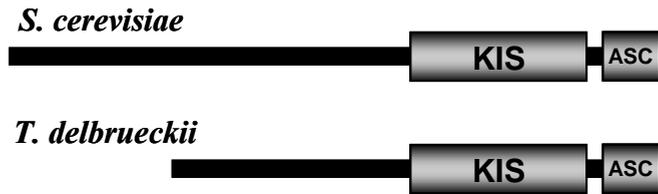


Figura 2.11. Representación esquemática de las proteínas Sip1 de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Los dominios KIS y ASC aparecen destacados. La funcionalidad de estos dominios se explica en el texto.

Con el objeto de confirmar la homología funcional de este gen con *SIP1*, transformamos una cepa mutante (*sip1Δ sip2Δ gal83Δ*) de *S. cerevisiae* (MSY558, Schmidt y McCartney, 2000) con el plásmido YEpTdSAL-3c y comprobamos el crecimiento de los transformantes en medios con una fuente de carbono no fermentable. Este plásmido contiene un fragmento de restricción, *MfeI-BamHI* de 2,430 pb, del plásmido YEpTdSAL-3b, correspondientes al gen completo, 168 pb del promotor y 164 pb del terminador. Se ha descrito que las células del triple mutante son incapaces de crecer en rafinosa o glicerol-etanol, aunque la sobreexpresión de cualquiera de las subunidades revierte este fenotipo (Hedbacker y col., 2004; Schmidt y McCartney, 2000). Como se observa en la Figura 2.12, transformantes YEpTdSAL-3c de la cepa MSY558 mostraron un crecimiento similar al de la cepa salvaje (MSY182) en un medio conteniendo una mezcla de glicerol y etanol como fuente de carbono. El mismo resultado se obtuvo cuando se sobreexpresó, en este fondo, la proteína truncada correspondiente al fragmento de DNA incluido en el plásmido YEpTdSAL-3a, de manera similar a lo descrito anteriormente para la sobreexpresión de la porción C-terminal de las subunidades β , Sip2p y Gal83p de *S. cerevisiae* (Schmidt y McCartney, 2000).

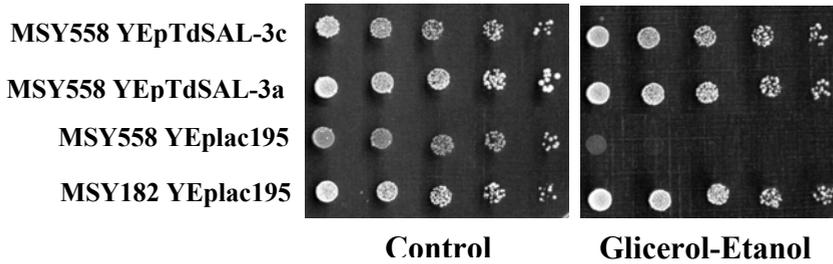


Figura 2.12. La sobreexpresión de *TdSIP1* complementa la función de las subunidades β de Snf1p. Las células del triple mutante *sip1* Δ *sip2* Δ *gal83* Δ (cepa MSY558) transformadas con los plásmidos YEplac195 (control), YEpTdSAL-3a (*TdSIP1*-t) o YEpTdSAL-3c (*TdSIP1*) fueron cultivadas en placas de MM conteniendo 2% de glucosa (control) o una mezcla de glicerol-etanol como fuente de carbono. La figura muestra también el crecimiento de células de la cepa salvaje MSY182 (*SIP1 SIP2 GAL83*) transformadas con el plásmido control YEplac195. En todos los casos, las células fueron crecidas en MM-glucosa líquido hasta una DO₆₀₀ de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas de los cultivos, 10⁻¹ a 10⁻⁵, que se depositaron (3 μ l) en las placas. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

Finalmente, analizamos si la sobreproducción de la proteína nativa de *Torulaspora* confería resistencia a NaCl en *S. cerevisiae*. Para comprobar este extremo, transformamos con el plásmido YEpTdSAL-3c, células de la cepa salvaje de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C y analizamos su crecimiento en medios conteniendo diferentes concentraciones de NaCl. En consonancia con el resultado descrito para el gen *SIP1* de *S. cerevisiae*, la sobreexpresión de este gen no alteró el fenotipo de la cepa parental (Figura 2.13). Los mismos resultados fueron obtenidos cuando la expresión se llevó a cabo en un plásmido centromérico (datos no mostrados). Así pues, todos los datos, tanto estructurales como funcionales, descritos en este apartado, indican que el gen contenido en el plásmido YEpTdSAL-3c es el homólogo al gen *SIP1* de *S. cerevisiae*, *TdSIP1*. En consonancia a esto, denominaremos de aquí en adelante *TdSIP1*-t al fragmento del gen *TdSIP1*

aislado en el plásmido YEpTdSAL-3a y que es capaz de conferir mayor tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae*.

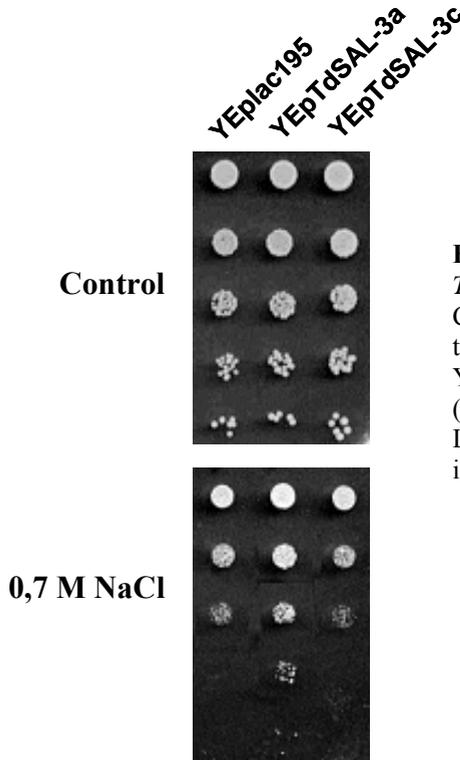


Figura 2.13. La sobreexpresión del gen *TdSIP1* no confiere tolerancia a NaCl. Células de la cepa CEN.PK2-1C fueron transformadas con los plásmidos YEpTdSAL-3a (control), YEpTdSAL-3b (*TdSIP1-t*) o YEpTdSAL-3c (*TdSIP1*). Las condiciones de cultivo fueron idénticas a las descritas en la Figura 2.7.

1.3.2.- Interrupción del gen *TdSIP1* y análisis funcional del mutante

La delección o interrupción de las tres subunidades β presentes en el genoma de *S. cerevisiae*, *SIP1*, *SIP2* y *GAL83* inactiva a la proteína quinasa Snf1p, impidiendo la normal desrepresión de genes regulados por glucosa y por tanto el crecimiento en fuentes de carbono como rafinosa, glicerol o etanol (Schmidt y McCartney, 2000). Sin embargo, los mutantes simples, no muestran este fenotipo, sugiriendo, al menos en parte, una redundancia funcional. No obstante, esta situación podía ser distinta en *T. delbrueckii*. Así pues, decidimos analizar si la disrupción del gen *TdSIP1* en esta levadura confería el fenotipo de un mutante de desrepresión. Para la

Capítulo II

interrupción del gen, construimos mediante restricción, un casete de interrupción, que contiene el módulo de resistencia a nourseotricina, *natMX4* flanqueado por fragmentos largos homólogos al gen *TdSIP1* (Figura 2.14) y lo utilizamos para transformar la cepa PYCC5321. La verificación de la correcta interrupción del gen se llevó a cabo por PCR, de manera similar a la descrita anteriormente para el gen *TdLEU2* (Apdo. 2.4 del capítulo I).

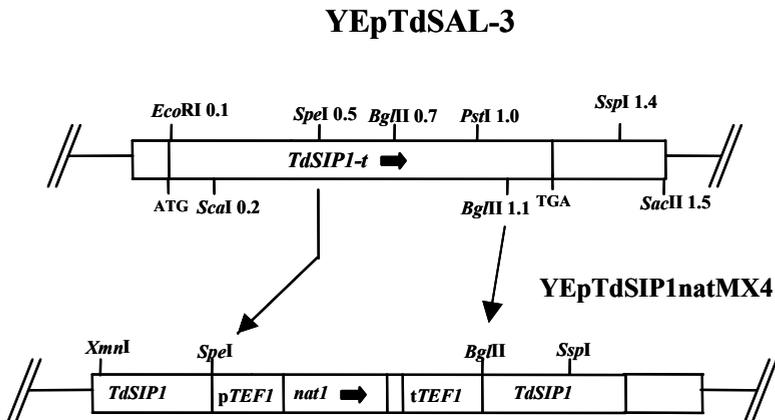


Figura 2.14. Representación esquemática de la construcción del casete de interrupción del gen *TdSIP1*. Las flechas indican las enzimas de restricción empleadas para reemplazar un fragmento del gen *TdSIP1* por el módulo *natMX4* (Goldstein y McCusker, 1999) que genera el plásmido YEpTdSIP1natMX4. La digestión posterior de éste con las enzimas *XmnI/SspI* libera el módulo de selección flanqueado por fragmentos largos homólogos a *TdSIP1*. Sólo se han indicado los sitios de restricción más relevantes. Los números indican el tamaño del fragmento generado desde el sitio de restricción hasta el MCS situado a la izquierda del dibujo. El tamaño de los fragmentos está realizado a escala.

Como puede verse en la Figura 2.15, células del mutante *Tdsip1* Δ fueron capaces de crecer en medios conteniendo rafinosa, glicerol o etanol como única fuente de carbono, a un ritmo similar al observado para la cepa parental. Sorprendentemente, la interrupción de *TdSIP1* tampoco alteró la resistencia a estrés de esta levadura (Figura 2.15). Como se mencionó anteriormente, un análisis sistemático del fenotipo de una colección

completa de mutantes de delección de *S. cerevisiae* (Giaever y col., 2002) había implicado al gen *SIP1* en tolerancia a este estrés. Para clarificar este punto, analizamos el crecimiento en medios conteniendo NaCl, de un mutante *sip1Δ* construido en la cepa MSY182 de *S. cerevisiae* (Schmidt y McCartney, 2000). Como se observa en la Figura 2.15, la cepa mutante mostró una capacidad de crecimiento similar a la cepa parental. Así pues, nuestros datos sugieren la existencia en *T. delbrueckii* de posibles subunidades β adicionales a TdSip1p. Además, la carencia de la función TdSip1p no altera la tolerancia a estrés por NaCl en esta levadura, de manera similar a lo observado para la proteína de *S. cerevisiae*.

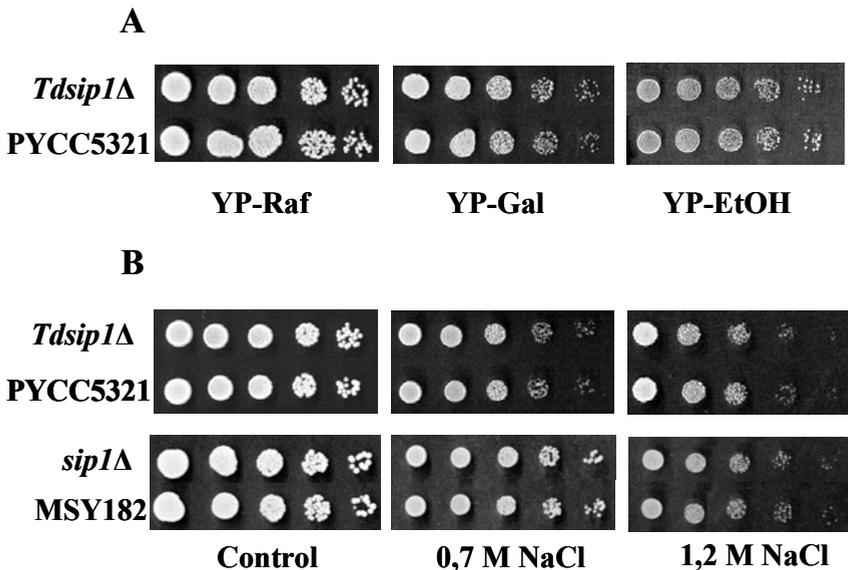


Figura 2.15. La interrupción del gen *TdSIP1* no altera el crecimiento de *T. delbrueckii* en fuentes de carbono no fermentables, ni su resistencia a estrés salino. (A) Crecimiento de células de la cepa salvaje de *T. delbrueckii* PYCC5321 y del correspondiente mutante *Tdsip1Δ* en placas de medio YP conteniendo 2% de rafinosa (YP-Raf), 2% de galactosa (YP-Gal) o 3% de etanol (YP-EtOH) como fuente de carbono. (B) Crecimiento de las cepas mencionadas en (A) y de las cepas de *S. cerevisiae* MSY182 y *sip1Δ* (fondo MSY182) en medio YPD conteniendo 0 (Control), 0,7 o 1,2 M de NaCl. En todos los casos, las células fueron precultivadas en medio YPD líquido hasta una DO_{600} de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas de los cultivos, 10^{-1} a 10^{-5} , que se depositaron (3 μ l) en las placas. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

1.3.3.- La sobreexpresión de *TdSIP1-t* altera la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a estrés salino

Los resultados expuestos anteriormente demostraron que la sobreexpresión del gen truncado *TdSIP1-t* en células de la cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C confería mayor tolerancia a estrés osmótico. El producto del gen *SIP1* de *S. cerevisiae*, participa en la modulación de la actividad Snf1p en esta levadura. Dada la importancia de esta proteína quinasa en la regulación de varios procesos celulares, cabía pensar que el fenotipo observado pudiera deberse a una alteración de la respuesta transcripcional de *Saccharomyces* bajo estas condiciones de estrés. Con esta idea, analizamos los cambios en el transcriptoma de células que sobreexpresan el gen truncado *TdSIP1-t*, después de una transferencia de 45 min a un medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. Como control, empleamos células de la cepa salvaje transformadas con un plásmido sin inserto (YEplac195). Los niveles de mRNA fueron analizados mediante el uso de filtros de DNA preparados en el Servicio Central de Soporte a la Investigación de la Universidad de Valencia, de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

La Figura 2.16, muestra una representación del perfil global de expresión de células control y transformantes *TdSIP1-t*, antes y después de su exposición durante 45 min a estrés salino. Sólo aquellos genes que muestran un cambio al alza o a la baja, de más de dos veces, aparecen representados como inducidos o reprimidos, respectivamente. Como cabía esperar, la exposición a estrés salino alteró de manera importante el nivel de expresión de decenas de genes. Un total de 428 genes, 265 inducidos y 163 reprimidos, aparecieron regulados por estrés salino en células control (Figura 2.16, panel A). Este número parece similar al descrito en otros trabajos (Rep y col., 2000; Causton y col., 2001; Posas y col., 2000), si bien las comparaciones en este punto son difíciles, dado que muchos genes

muestran una alteración transitoria que depende de la cepa analizada, del medio de cultivo, YPD o MM, de la concentración de NaCl y del tiempo de exposición (Posas y col., 2000).

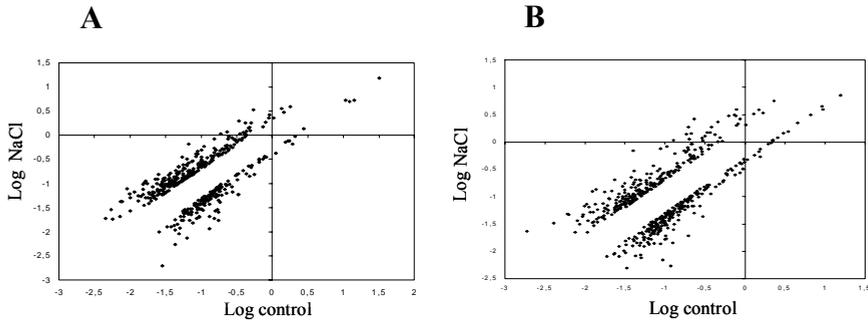


Figura 2.16. La expresión del gen *TdSIP1-t* altera la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a estrés salino. La Figura muestra la comparación del perfil global de expresión génica de células transformadas con los plásmidos YEplac195 (A) y YEpTdSAL-3a (B), que contiene el gen truncado *TdSIP1-t*, después de 45 min de exposición a estrés salino. Las células fueron cultivadas en MM-glucosa hasta DO_{600} de 0,3-0,5 y transferidas al mismo medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. Las gráficas muestran sólo los puntos cuya inducción o represión es significativa, es decir, superior o inferior a dos veces. Los puntos que quedan por encima de la diagonal representan los genes inducidos, y los que quedan por debajo los genes reprimidos.

Más significativo es, sin embargo, el análisis pormenorizado de la identidad de aquellos genes regulados. Aunque con las dificultades relatadas anteriormente, el análisis global indicó una gran variación entre nuestros resultados (datos no mostrados) y aquellos publicados anteriormente. En particular, genes bien conocidos como inducidos por estrés salino, p.e. *GPD1*, *GPP1*, *GPP2* o *GLO1*, implicados en el metabolismo de glicerol; *TPS1*, *TPS2*, *TSL1* o *NTH1*, en el metabolismo de la trehalosa; *GSY1*, *GSY2* o *GLC3*, en el de glucógeno; *ALD2*, *ALD4*, *ALD6* y *GRE2*, involucrados en el metabolismo redox o chaperonas como *HSP26*, *HSP42*, *HSP104*, *SSA3* y *SSA4*, no aparecieron como regulados en nuestro análisis. Además, la inducción de otros genes como *DAK1*, *STL1*, *ALD3*, *HSP12*, *DDR2*, *CTT1*,

Capítulo II

GRE2 o *SPS100*, por citar alguno, fue muy inferior a lo esperado. Por ejemplo, *HSP12* ha sido descrito como inducido más de cien veces en células de la cepa W303-1A estresadas durante 30 min a concentraciones del 0,7 M de NaCl (Rep y col., 2000). Sin embargo, en nuestro análisis, el nivel de inducción de este gen fue tan solo de seis veces. Estas diferencias podrían atribuirse a la cepa utilizada en este estudio, CEN.PK2-1C, mucho más sensible a estrés osmótico y en particular a estrés salino que, por ejemplo W303-1A, y a las condiciones de crecimiento, MM frente a YPD, habitualmente empleado.

A pesar de estas importantes diferencias, el análisis comparativo de células control y células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*, bajo las condiciones experimentales utilizadas, permitió identificar cambios de expresión atribuibles a la presencia del producto de *TdSIP1-t*. En efecto, la Figura 2.16 (panel B) muestra aquellos genes regulados más de dos veces en células transformantes sometidas a estrés por NaCl. En este caso, 511 genes mostraron una expresión alterada frente a la observada en condiciones normales de crecimiento. De ellos, 264 fueron inducidos, un número prácticamente idéntico al observado en células control transformadas con el plásmido vacío, mientras que 247 fueron reprimidos. Así, en términos generales, la sobreexpresión del gen *TdSIP1-t* pareció aumentar el número de genes regulados a la baja.

Para analizar con mayor detalle los cambios de expresión inducidos por la presencia de *TdSIP1-t*, comparamos el transcriptoma de ambos tipos de transformantes en condiciones de estrés salino. En total, 412 genes mostraron un nivel de mRNA alterado en más de dos veces. En concreto, 172 genes exhibieron un nivel de mRNA superior en células conteniendo el gen *TdSIP1-t*, mientras que 240 genes mostraron una expresión reducida frente a la observada en células control. Esto implica un cambio mucho más

drástico en la respuesta a estrés osmótico del que parecía indicar la simple comparación del número de genes inducidos y reprimidos.

En este escenario, la asignación del fenotipo observado a la variación de la expresión de un gen en particular o de un grupo pequeño de genes es ciertamente complicado, por no decir imposible. No obstante, puede señalarse que en general la expresión de *TdSIP1-t* incrementó el nivel de inducción de algunos genes, como *ALD3*, *HSP12*, *YHR087W*, *MSC1*, *SOLA*, *CTT1*, *DAK1*, *YKL151C*, *YMR090W*, *YML131W*, *YBL064C*, *MCRI* o *PHM8* que han sido descritos como fuertemente dependientes de Hog1p para su respuesta a estrés osmótico (Rep y col., 2000). La presencia del producto de *TdSIP1-t* también aumentó, en torno a dos veces, el nivel de mRNA de *HALI*. Aunque esta variación podría parecer escasa, es similar a la inducción observada para este gen bajo condiciones de estrés por NaCl (Causton y col., 2001), en consonancia con su papel como efector. *HALI* parece codificar una proteína reguladora, que controla, vía Ena1p, la principal ATPasa acoplada al movimiento de Na⁺ en *S. cerevisiae*, la homeostasis iónica en respuesta a NaCl (Gaxiola y col., 1992; Rios y col., 1997). Además, Hal1p controla la toma de K⁺ (Gaxiola y col., 1992), un proceso dependiente de los genes *TRK1* y *TOK1* (Gaber, 1992). Mutantes nulos en este gen exhiben un fenotipo de sensibilidad osmótica (Tsuji y col., 1996), mientras su sobreexpresión mejora la tolerancia a NaCl (Gaxiola y col., 1992) y revierte el fenotipo de un mutante en la subunidad reguladora de calcineurina, *cnb1* (Rios y col., 1997). Como se mencionó en el capítulo de Introducción, la ruta de la calcineurina-Crz1 controla la expresión de un elevado número de genes de respuesta a estrés por Na⁺ (Yoshimoto y col., 2002), entre ellos Ena1p (Stathopoulos y Cyert, 1997; Mendizábal y col., 2001) y es esencial para la tolerancia a estrés iónico (Mendoza y col., 1994; Rusnak y Mertz, 2000). Así, la variación observada en la expresión de

Capítulo II

HAL1 podría ser relevante en términos fisiológicos y determinante, al menos en parte, del fenotipo observado.

De los 412 genes identificados como regulados al alza o a la baja en células transformantes *TdSIP1-t* expuestas a NaCl, 54 mostraron una variación en el nivel de mRNA superior o inferior a cuatro veces. Este grupo de genes, que se recoge en las Tablas 2.1 y 2.2, fue estudiado en mayor detalle. Elegimos este valor umbral para simplificar el análisis y al mismo tiempo incrementar el nivel de confianza en que dichas variaciones podrían tener un efecto fisiológico. Como vemos, estos genes se engloban en la mayoría de categorías funcionales del MIPS, si bien predominan genes de función desconocida. La mayoría de ellos, han sido descritos previamente como inducidos en condiciones de estrés osmótico, si bien ninguno aparece como fuertemente regulado (Causton y col., 2001) y sólo siete (marcados con el símbolo #), han sido asociados a un fenotipo de sensibilidad a NaCl (Giaever y col., 2002). Curiosamente, 10 de los 54 genes que aparecen en las Tablas 2.1 y 2.2, han sido identificados, mediante un programa de bioinformática, como posibles dianas de Ste12p (Qian y col., 2003) un factor de transcripción implicado en la respuesta a feromonas (Bardwell y col., 1994). Esta ruta es activada por NaCl en un mutante *hog1* (O'Rourke y Herskowitz, 1998) y comparte elementos comunes, Ste20p, Ste50p y Ste11p, con la ruta HOG (Gustin y col., 1998). Así, la identificación de al menos 10 posibles dianas de Ste12p entre los genes descritos en las Tablas 2.1 y 2.2, podría indicar una actividad anormal de la ruta HOG en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*. Otras evidencias podrían ir también en esta línea. Así, cuatro de los genes descritos, *TPK1*, *CAT8*, *DIG2* y *REG2*, codifican proteínas reguladoras y/o factores de transcripción con un papel funcional relacionado, directa o indirectamente, con tolerancia a estrés.

TABLA 2.1. Genes que muestran un nivel de transcrito menor en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t* en comparación con células control después de 45 min de transferencia a un medio conteniendo 0,5 M de NaCl*.

Categoría funcional	Gen	ORF	Nº de veces	Comentarios
Ciclo celular	<i>NFI1</i>	<i>YOR156C</i>	4,4	Proteína implicada en la conjugación de otras proteínas
	<i>PRK1</i>	<i>YIL095W</i>	4,6	Ser/Thr-proteína quinasa. Organización del citoesqueleto. Actina
	<i>MDM1</i>	<i>YML104C</i>	4,9	Constituyente estructural del citoesqueleto
	<i>NGL3</i>	<i>YML118W#</i>	4,4	Posible DNAsa/RNAsa
	<i>CDC14</i>	<i>YFR028C</i>	4,3	Fosfatasa implicada en la regulación del ciclo celular
	<i>FKH1</i>	<i>YIL131C</i>	4,4	Represor transcripcional. Regulación del ciclo celular
Biogénesis de componentes celulares	<i>MBA1</i>	<i>YBR185C</i>	5,9	Proteína que participa en el ensamblaje de la cadena respiratoria
Transcripción	<i>RME1</i>	<i>YGR044C</i>	11,4	Activador transcripcional. Meiosis
	<i>REG2</i>	<i>YBR050C</i>	4,7	Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa Glc7p. Control de Snf1p/Unión a calmodulina. Reprimido por Mig1p
	<i>DIG2</i>	<i>YDR480W</i>	8,6	Represor transcripcional del crecimiento invasivo. Diana de Ssk1p. Ruta de respuesta a feromonas
Metabolismo	<i>PYC2</i>	<i>YBR218C</i>	4,5	Piruvato carboxilasa. Gluconeogénesis
	<i>LYS5</i>	<i>YGL154C</i>	6,8	Cataliza la sexta etapa en la ruta de biosíntesis de lisina
Transporte celular	<i>SEC9</i>	<i>YGR009C#</i>	8,0	Implicado en el transporte de vesículas
	<i>ARN2</i>	<i>YHL019C</i>	5,7	Transporte vacuolar
	<i>SPF1</i>	<i>YEL031W</i>	4,0	ATPasa del tipo P. Transporte de Ca ²⁺ . Regula a la baja el nivel de mRNA de <i>ENA1</i> , <i>GSC2</i> y <i>PMC1</i>
	<i>APM2</i>	<i>YHL047C#</i>	7,2	Posible miembro de la familia de proteínas de resistencia a multidroga
	<i>TRS31</i>	<i>YDR472W</i>	4,9	Transporte vacuolar
	<i>AZR1</i>	<i>YGR224W#</i>	5,6	Miembro de la familia de proteínas de múltiple resistencia a drogas
	Síntesis de	<i>MRPL9</i>	<i>YGR220C</i>	5,3
Sin clasificación	<i>YIR042C</i>		4,4	Miembro de la familia de acetil-transferasas GNAT
	<i>YJL086C</i>		4,7	
	<i>YPL109C</i>		5,5	Posible localización en mitocondria
	<i>YCL056C</i>		6,6	
	<i>YIM2</i>	<i>YMR151W</i>	6,6	
		<i>YLR030W</i>	4,2	
		<i>YJL049W</i>	6,7	Posible miembro de la familia <i>SNF7</i> de transportadores. Snf7p esta implicado en el proceso de desrepresión.
		<i>YKR064W</i>	6,4	Posible factor de transcripción
		<i>YOL101C#</i>	4,9	Podría funcionar en la homeostasis de iones Zn
		<i>YGL159W</i>	6,5	
		<i>YOR093C#</i>	19,8	
		<i>YOR255W</i>	5,7	
		<i>YGL034C</i>	4,2	
	<i>YML108W</i>	4,2		
	<i>YEL023C</i>	5,5		

* Los genes han sido clasificados de acuerdo a la base de datos del MIPS (<http://mips.gsf.de>). En los comentarios, también se incluye información de la base de datos YPD (<http://proteome.incyte.com>). La tabla muestra únicamente aquellos genes cuyo nivel de mRNA es al menos 4 veces inferior en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*. El símbolo # señala aquellos genes en los que el correspondiente mutante nulo muestra un fenotipo de sensibilidad a NaCl.

Capítulo II

TABLA 2.2. Genes que muestran un nivel de transcrito mayor en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t* en comparación con células control después de 45 min de transferencia a un medio conteniendo 0,5 M de NaCl*.

Categoría funcional	Gen	ORF	Nº de veces	Comentarios
Transducción de la señal	<i>TPK1</i>	<i>YJL164C</i>	4,4	Subunidad catalítica de la proteína quinasa A, PKA, que regula el crecimiento y la respuesta general a estrés. Su promotor contiene 3 elementos STRE
	Transcripción	<i>TAD2</i>	<i>YJL035C</i>	4,6
		<i>YGR067C</i>	6,4	Posible factor de transcripción, regulado por Cat8p.
<i>CAT8</i>		<i>YMR280C</i>	6,0	Factor de transcripción requerido para la desrepresión de genes gluconeogénicos. Reprimido por Mig1p. Posible sustrato de Snf1p
Metabolismo	<i>TFB5</i>	<i>YDR079C-A</i>	5,5	Componente de la maquinaria transcripcional
	<i>FMN1</i>	<i>YDR236C</i>	14,0	Proteína quinasa implicada en la biosíntesis de riboflavina
	<i>PHO12</i>	<i>YHR215W</i>	4,6	Fosfatasa ácida
Transporte celular	<i>ENB1</i>	<i>YOL158C</i>	4,6	Implicada en el transporte de Fe
	<i>PDR10</i>	<i>YOR328W#</i>	4,5	Actividad ATPasa
Sin clasificación		<i>YNL024C</i>	4,7	
		<i>YMR018W</i>	4,3	
		<i>YGL074C</i>	4,1	
		<i>YJL038C</i>	4,8	
		<i>YNL260C</i>	6,3	Proteína esencial
		<i>YDL118W</i>	4,2	
		<i>YBR144C</i>	6,7	
		<i>YGR219W</i>	5,0	
		<i>YBR004C</i>	5,5	
		<i>YPR114W</i>	4,1	
	<i>YPL162C</i>	6,7		

* Los genes han sido clasificados de acuerdo a la base de datos del MIPS (<http://mips.gsf.de>). En los comentarios, también se incluye información de la base de datos YPD (<http://proteome.incyte.com>). La tabla muestra únicamente aquellos genes cuyo nivel de mRNA es al menos 4 veces superior en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*. El símbolo # señala aquellos genes en los que el correspondiente mutante nulo muestra un fenotipo de sensibilidad a NaCl.

En efecto, *DIG2* y *REG2*, aparecieron regulados a la baja en células del transformante *TdSIP1-t*. El gen *DIG2* codifica un factor transcripcional implicado, de nuevo, en la respuesta a feromonas (Tedford y col., 1997), mientras *REG2* codifica una proteína reguladora de la actividad de Glc7p (Frederick y Tatchell, 1996), una proteína fosfatasa del tipo PP1, implicada entre otros, en el proceso de represión por catabolito (Tu y Carlson, 1994). Además, Reg2p ha sido identificada, en un rastreo de chips de proteínas, como una posible proteína de unión a calmodulina (Zhu y col., 2001). Junto al producto del gen *REG1*, también implicado en represión por catabolito

(Tu y Carlson, 1995), Reg2p parece dirigir la actividad de Glc7p hacia substratos fosforilados por Snf1p (Frederick y Tatchell, 1996). A su vez, la expresión de *REG2* parece controlada por la actividad Snf1p/Mig1p (Lutfiyya y col., 1998) sugiriendo que la sobreexpresión de *TdSIP1-t* altera la actividad de la proteína quinasa.

Por otra parte, *CAT8* codifica un factor de transcripción requerido para la desrepresión de genes gluconeogénicos (Hedges y col., 1995), cuya actividad parece también mediada por Snf1p (Rández-Gil y col., 1997). Finalmente, el gen *TPK1* codifica la subunidad catalítica de la proteína quinasa A, PKA. Esta actividad regula negativamente los factores de respuesta general a estrés Msn2p/Msn4p (Estruch, 2000), de los que depende la inducción de un gran número de genes regulados por estrés osmótico (Rep y col., 2000), entre ellos *TPK1*, cuyo promotor contiene tres posibles elementos STRE (Martínez-Pastor y col., 1996) funcionales. Aunque la activación o inactivación de un factor transcripcional no suele coincidir temporalmente con la regulación al alza o a la baja de los genes que controla, el mayor nivel de mRNA de este gen podría indicar una mayor actividad de los factores nucleares Msn2p/Msn4p en células conteniendo el producto del gen *TdSIP1-t*. Como se mencionó en el Capítulo de Introducción, Msn2p y Msn4p dirigen a Hog1p a los promotores de genes como *CTT1* y *HSP12* (Alepuz y col., 2001), dos de los genes identificados en nuestro estudio como regulados al alza.

Así, nuestros resultados parecen indicar que la expresión de *TdSIP1-t* altera la funcionalidad de la proteína quinasa Snf1p. Además, dos rutas de transducción de la señal implicadas en la respuesta a estrés por NaCl, la ruta calcineurina-Crz1 y la ruta HOG, podrían estar siendo afectadas, de manera directa o indirecta, por la presencia de la proteína truncada de *T. delbrueckii*.

CAPÍTULO III

Bases moleculares del fenotipo de resistencia a NaCl causado por la sobreexpresión de *TdSIP1-t* en *Saccharomyces cerevisiae*: el papel funcional de Snf1p

Los resultados expuestos en el capítulo anterior demostraron que la sobreexpresión del gen heterólogo *TdSIP1-t*, una forma truncada del gen *TdSIP1*, homólogo a *SIP1* de *S. cerevisiae*, que codifica una de las subunidades β de la proteína quinasa Snf1p, confiere mayor tolerancia a NaCl en este organismo. Nuestros resultados también mostraron que la producción de TdSip1-t altera la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* en células expuestas a NaCl. En particular, el rastreo de genes regulados diferencialmente en células productoras de TdSip1-t sugirió que la proteína recombinante podía alterar la funcionalidad de Snf1p y de algunas rutas de transducción de la señal implicadas en la respuesta a estrés por NaCl, en particular de la ruta calcineurina-Crz1 y de la ruta HOG. La importancia de estas rutas en la respuesta de *S. cerevisiae* a estrés iónico y la posibilidad de descubrir un papel funcional, hasta ahora no caracterizado, de Snf1p en el mecanismo de adaptación de esta levadura a variaciones medioambientales en la concentración de Na^+ , nos ha llevado a explorar las bases moleculares del fenotipo producido por la expresión en un alto número de copias de *TdSIP1-t*.

1.- La sobreexpresión de *SIP2* o *GAL83* no altera la resistencia a NaCl de *S. cerevisiae*

Sip2p y Gal83p son junto a Sip1p, las tres subunidades β pertenecientes al complejo de la proteína quinasa Snf1p. Las dos primeras tienen un tamaño de 415 y 417 aminoácidos respectivamente, mientras que la secuencia primaria de Sip1p consta de 863 residuos. Considerando los datos de secuencia presentados en el capítulo anterior, *TdSIP1-t* es una pauta de lectura abierta de 1.197 pb que codifica un polipéptido de 399 aminoácidos, muy similar por tanto, al tamaño de Sip2p y Gal83p. Además, al comparar

Capítulo III

la secuencia de TdSip1p con la base de datos, la máxima homología se corresponde con el extremo C-terminal de Sip1p, esencialmente con las cajas KIS y ASC. Esta homología también se encuentra lógicamente con Sip2p y Gal83p (Figura 3.1).

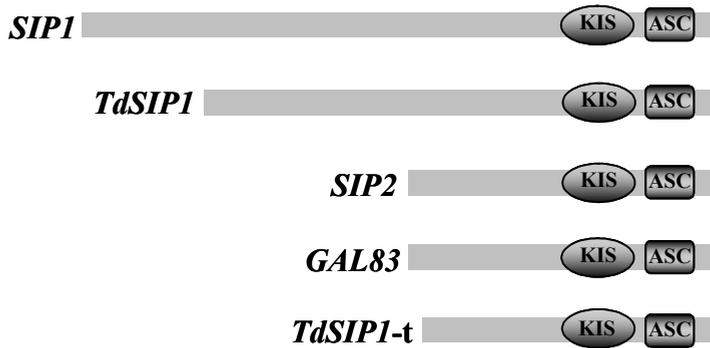


Figura 3.1. Representación esquemática de los genes de *S. cerevisiae* *SIP1*, *SIP2* y *GAL83*, y del gen completo, *TdSIP1* y truncado, *TdSIP1-t*, de *T. delbrueckii*. Los dominios KIS y ASC de cada gen aparecen resaltados.

Estas evidencias, junto a la ausencia de un fenotipo causado por la sobreexpresión de los genes *TdSIP1* o *SIP1*, nos llevó a pensar en la posibilidad de que TdSip1-t fuera una proteína quimera de Sip2p y/o Gal83p, capaz de mimetizar una función de estas proteínas, hasta ahora no caracterizada, en respuesta a estrés por NaCl. Para confirmar esta hipótesis, se decidió sobreexpresar ambos genes en la cepa CEN.PK2-1C y analizar el fenotipo de los transformantes en medios con NaCl. Utilizando como molde DNA genómico, se amplificó mediante PCR dos fragmentos de DNA que contenían los genes *SIP2* y *GAL83*, bajo el control de sus respectivos promotor y terminador. Los fragmentos obtenidos se subclonaron en el plásmido YEplac195, dando lugar a los plásmidos YEplacSIP2 y YEplacGAL83, que se utilizaron para transformar células de las cepas MSY182 (cepa

salvaje), MSY558 (MSY182 *sip1*Δ *sip2*Δ *gal83*Δ) y CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae*. Las dos primeras (cedidas por Martin Schmidt) se han utilizado para comprobar la funcionalidad de los genes clonados.

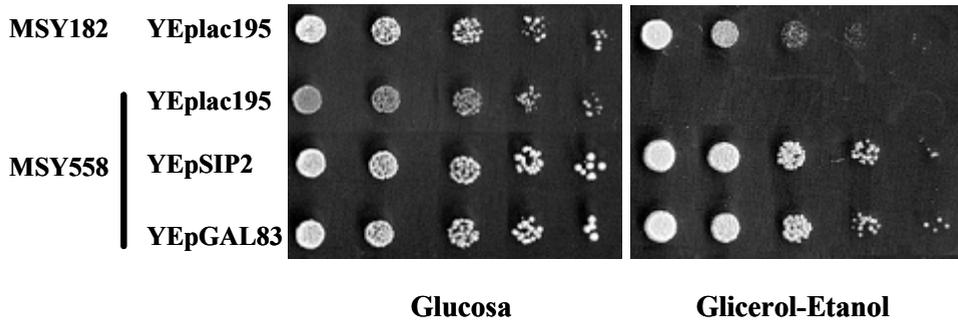


Figura 3.2. Funcionalidad de los genes *SIP2* y *GAL83*. Células de la cepa salvaje MSY182 y del triple mutante *sip1*Δ *sip2*Δ *gal83*Δ (MSY558) fueron transformadas con los plásmidos YEplac195 (control), YEpSIP2 o YEpGAL83 (sólo MSY558) y su crecimiento analizado en condiciones de represión y desrepresión. En todos los casos, las células se cultivaron en MM-glucosa líquido hasta una DO₆₀₀ de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas, 10⁻¹ a 10⁻⁵, que se depositaron (3 μl) en placas de medio agar-MM conteniendo un 2% de glucosa o una mezcla del 2% de glicerol y 3% de etanol. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

Como se ha descrito previamente, las células del triple mutante son incapaces de proliferar en un medio conteniendo una mezcla del 2% de glicerol y 3% de etanol como única fuente de carbono, si bien la sobreexpresión de cualquiera de las subunidades β revierte este fenotipo (Schmidt y McCartney, 2000). Como se muestra en la Figura 3.2, el triple mutante fue, en efecto, incapaz de crecer en este medio, mientras que células de los transformantes YEpSIP2 o YEpGAL83 mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental. Por consiguiente, los dos genes clonados son funcionales.

Capítulo III

Una vez comprobado este extremo, se procedió a determinar el efecto de la sobreexpresión de estos genes en la resistencia a NaCl. Como se muestra en la Figura 3.3, la sobreexpresión de cualquiera de estos genes no alteró la tolerancia de la cepa CEN.PK2-1C a estrés iónico.

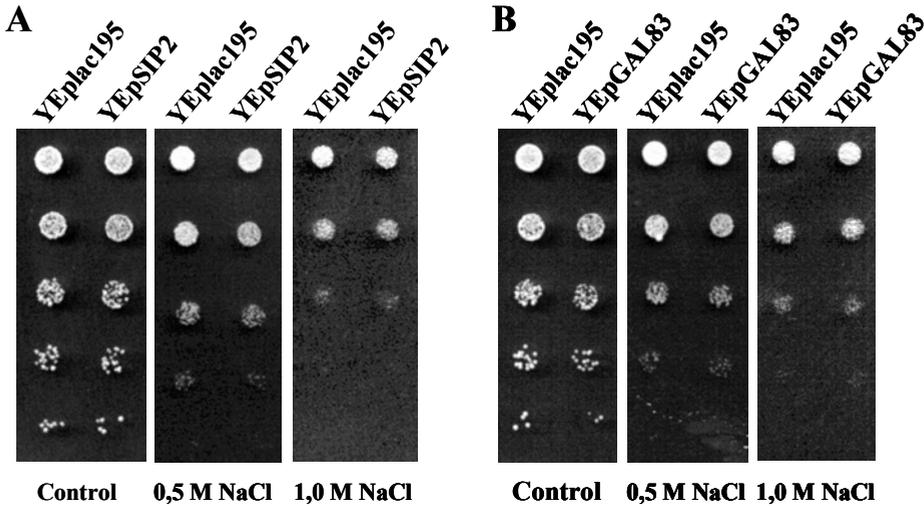


Figura 3.3. La sobreexpresión de *SIP2* o *GAL83* no altera la tolerancia a NaCl de *S. cerevisiae*. La Figura muestra el crecimiento de células de la cepa CEN.PK2-1C transformadas con el plásmido YEpsIP2 (A) o YEpsGAL83 (B). Como control se muestra el crecimiento de células de la misma cepa conteniendo el plásmido YEplac195. En todos los casos, las células fueron cultivadas en medio MM-glucosa líquido hasta una DO_{600} de 0,3-0,5. Para el crecimiento en placa, se efectuaron diluciones seriadas, 10^{-1} - 10^{-5} , que se depositaron (3 μ l) en placas de agar-MM-glucosa conteniendo 0 (Control), 0,5 o 1,0 M de NaCl. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

1.1.- Análisis de la resistencia a NaCl de mutantes de *S. cerevisiae* en las subunidades β de Snf1p

Se ha descrito que un mutante nulo en *SIP1* o *SIP2* tiene un defecto de crecimiento en presencia de 1 M de NaCl (Giaever y col., 2002). Por consiguiente, decidimos comprobar el fenotipo de los mutantes simples *sip1* Δ , *sip2* Δ y *gal83* Δ , así como el de los dobles mutantes *sip1* Δ *sip2* Δ , *sip1* Δ *gal83* Δ y *sip2* Δ *gal83* Δ , y el del triple mutante *sip1* Δ *sip2* Δ *gal83* Δ , todos ellos gentilmente cedidos por el Dr. Martin Schmidt. Contrariamente a

los resultados descritos por Giaever y col. (2002), ni los mutantes simples, ni los dobles mostraron una inhibición de su crecimiento, en presencia de NaCl (Figura 3.4). Únicamente el triple mutante exhibió un claro defecto respecto a la cepa salvaje (Figura 3.4). Estos resultados sugerían que, en efecto, las subunidades β del complejo Snf1p-Snf4p podían tener un papel funcional en tolerancia a NaCl. La ausencia de un fenotipo en los mutantes sencillos y dobles podría indicar, no obstante, una redundancia funcional entre las tres subunidades. Esto podría a su vez justificar la diferencia de los resultados encontrados con los publicados por Giaever y col. (2002). Así, diferentes cepas de *S. cerevisiae* podrían mostrar diferentes niveles de expresión de los genes *SIP1*, *SIP2* y *GAL83*, y por tanto diferente sensibilidad a la interrupción de cualquiera de ellos.

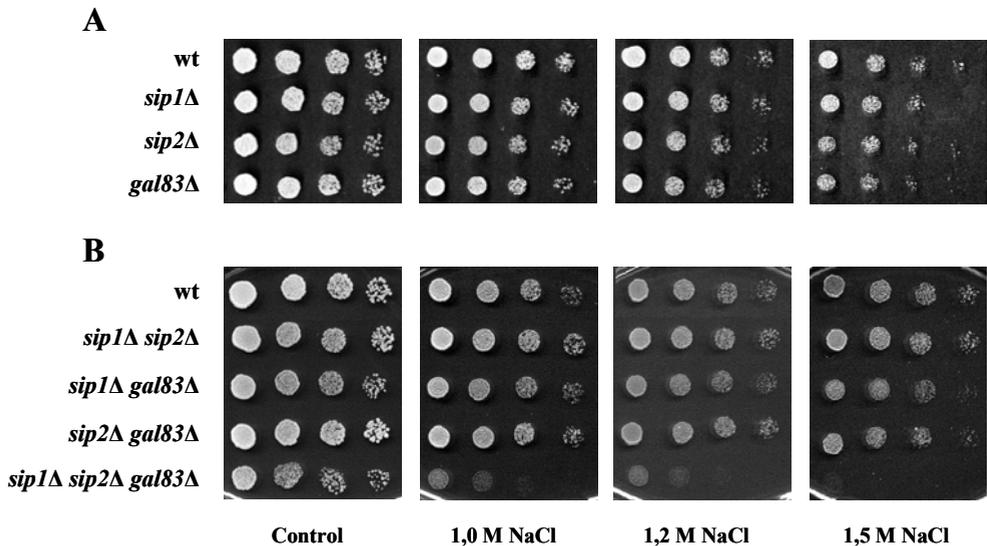


Figura 3.4. La interrupción múltiple de todas las subunidades β determina sensibilidad a NaCl en *S. cerevisiae*. La Figura muestra el crecimiento de células de las cepas, (A) MSY182 (salvaje, wt), MSY528 (*sip1* Δ), MSY520 (*sip2* Δ) y MSY522 (*gal83* Δ); (B) wt, MSY545 (*sip1* Δ *sip2* Δ), MSY552 (*sip1* Δ *gal83* Δ), MSY543 (*sip2* Δ *gal83* Δ) y MSY558 (*sip1* Δ *sip2* Δ *gal83* Δ). En todos los casos, las células fueron cultivadas como se describe en la Figura 3.3 y analizadas para su crecimiento en placas de agar-MM-glucosa conteniendo 0 (Control), 1,0, 1,2 o 1,5 M de NaCl. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

2.- Implicación de la proteína quinasa Snf1p en el fenotipo de resistencia a NaCl causado por la sobreexpresión de *TdSIP1-t*

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, las subunidades β y entre ellas Sip1p, son esenciales para dirigir la actividad del complejo proteína quinasa Snf1p-Snf4p. Aunque la sobreexpresión de *SIP1*, *SIP2* o *GAL83* no parecía conferir mayor tolerancia a NaCl, el fenotipo observado en el triple mutante *sip1 Δ sip2 Δ gal83 Δ* , contrario al de la sobreexpresión de *TdSIP1-t*, sugería que estos efectos podían depender y/o estar mediados por una alteración de la actividad de Snf1p. En este sentido, cabe recordar que el papel funcional de esta proteína quinasa en estrés osmótico es controvertido (Alepez y col., 1997; Ganster y col., 1998), si bien existen evidencias de una modificación por fosforilación de Snf1p en respuesta a este estrés (McCartney y Schmidt, 2001).

Para aclarar esta situación, estudiamos los efectos en tolerancia a NaCl de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* en un mutante *snf1 Δ* . Como control utilizamos transformantes de la cepa salvaje CEN.PK2-1C y de un mutante *tup1 Δ* obtenido en el mismo fondo génico. El producto del gen *TUPI* forma junto a Sko1p y Ssn6p un complejo implicado en la represión de varios genes de respuesta a estrés osmótico (Proft y Serrano, 1999) y en consecuencia mutantes en este gen muestran una mayor resistencia a este estrés. Sin embargo, la regulación del complejo no parece depender de la proteína quinasa Snf1p, sino de Hog1p (Proft y Struhl, 2002), pese a que la primera controla el proceso de represión por catabolito en el que también participa Tup1p junto a Mig1p/Mig2p y Ssn6p (Keleher y col., 1992).

Como vemos en la Figura 3.5, células de la cepa *tup1 Δ* mostraron, como se esperaba, una mayor tolerancia a NaCl que las de la cepa salvaje en las dos concentraciones de sal ensayadas. Por su parte, la interrupción de *SNF1* mejoró también, aunque en menor medida, el crecimiento a concentraciones

de NaCl del 0,5 M. Sin embargo, no tuvo efectos ante un estrés severo. Por otra parte, la sobreexpresión de *TdSIP1-t* reveló claras evidencias sobre la implicación de Snf1p en la resistencia a NaCl de estos transformantes. Al contrario de la cepa salvaje, células del mutante *snf1Δ* transformadas con el plásmido YEpTdSIP1-t no mostraron una mayor tolerancia a NaCl respecto a aquellas transformadas con el plásmido control. Sin embargo, en un mutante *tup1Δ* el efecto de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* fue aditivo con respecto al crecimiento observado en la cepa salvaje (Figura 3.5). Así pues, nuestros resultados indican que el fenotipo asociado a la sobreexpresión de *TdSIP1-t* depende de la existencia de una proteína quinasa Snf1 funcional.

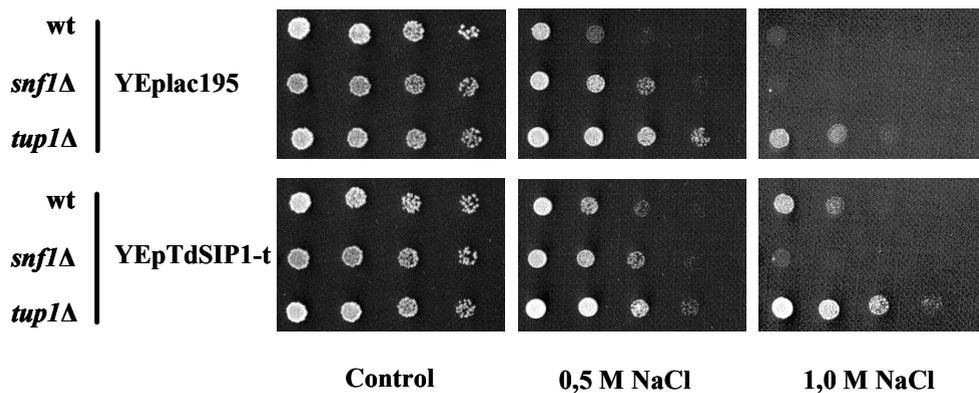


Figura 3.5. El efecto de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* depende de la función Snf1p. La imagen muestra el crecimiento de transformantes YEplac195 (plásmido control) y YEpTdSIP1-t de las cepa salvaje CEN.PK2-1C (wt) y de los correspondientes mutantes *snf1Δ* y *tup1Δ*. En todos los casos, las células fueron cultivadas como se describe en la Figura 3.3 y analizadas para su crecimiento en placas de agar-MM-glucosa conteniendo 0 (Control), 0,5 o 1,0 M de NaCl. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

2.1- La proteína quinasa Snf1 es un regulador negativo de tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae*

El resultado mostrado en la Figura 3.5 para un mutante *snf1Δ* (0,5 M de NaCl) difiere de los descritos previamente por Alepuz y col. (1997) y Ganster y col. (1998) quienes sostienen que la falta de Snf1p tiene efectos

Capítulo III

negativos o neutros en la tolerancia a estrés por NaCl en *S. cerevisiae*. En estos casos, el fenotipo había sido ensayado en medio YPD y MM, respectivamente, y para un mutante *snf1Δ* Leu⁻, His⁻, Trp⁻ y Ura⁻. Por el contrario, el crecimiento mostrado en la Figura 3.5, corresponde a la de células *snf1Δ* YEplac195 (*URA3*) cultivadas en MM-glucosa. Para investigar la causa de estas diferencias, comenzamos por confirmar el fenotipo descrito anteriormente.

La Figura 3.6 muestra el crecimiento del mutante *snf1Δ* (*ura3*) en YPD y MM, suplementados con 0,5 M de NaCl. Como vemos, la ausencia de la función Snf1p en células cultivadas en YPD, causó una drástica reducción de la tolerancia a NaCl de la cepa salvaje. Cuando las mismas células fueron analizadas en MM, el crecimiento fue sin embargo similar, confirmando la controversia antes mencionada. Se ha descrito que la exposición a estrés osmótico afecta negativamente a la capacidad de transporte de diferentes compuestos, entre ellos aminoácidos y bases nitrogenadas (Norbeck y Blomberg, 1998; Volland y col., 1994). Esta evidencia explica porque el crecimiento de células de la cepa salvaje expuestas a un estrés moderado es mayor en MM que en YPD (Figura 3.6), en el que la disponibilidad de estos nutrientes es menor. Así, las diferencias de crecimiento entre la cepa parental y el mutante *snf1Δ*, más acusadas en YPD, podrían sugerir que *SNF1* está implicado, directa o indirectamente, en la toma de leucina, triptófano, histidina y/o uracilo. El hecho de que el mutante Ura⁺ muestre un mejor crecimiento que la correspondiente cepa salvaje, también protótrofa para uracilo (Figura 3.5), apoya esta hipótesis. Además, este resultado sugiere que Snf1p es un regulador negativo de la tolerancia a NaCl y que este efecto es enmascarado, al menos, en cepas auxótrofas para uracilo.

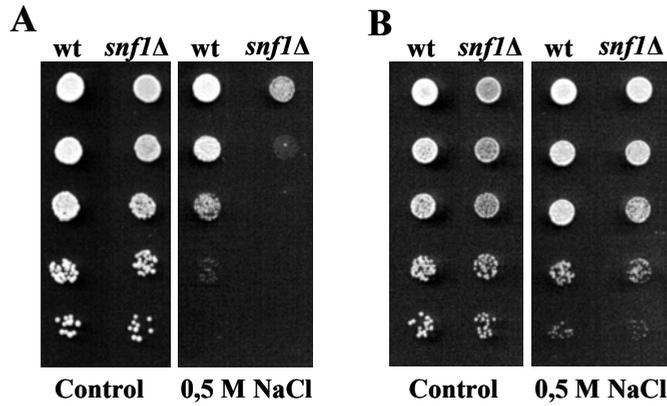


Figura 3.6. El efecto sobre la resistencia a NaCl de la ausencia de Snf1p depende de la disponibilidad de requerimientos auxotróficos. El crecimiento de células de la cepa salvaje CEN.PK2-1C (wt) y del correspondiente mutante *snf1Δ* fue ensayado como se describe en la Figura 3.3 en placas de agar-YPD (A) o agar-MM-glucosa (B) conteniendo 0 (Control) o 0,5 M de NaCl. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

2.2.-La sobreexpresión de *TdSIP1-t* reduce la actividad quinasa de Snf1p

Los resultados mostrados en la Figura 3.5 revelaron una conexión funcional entre Snf1p y TdSip1p-t. Además, tanto la delección de *SNF1* como la sobreexpresión de *TdSIP1-t* confieren un fenotipo, no idéntico, pero si en la misma línea, de mayor tolerancia a estrés por NaCl. Esto nos hizo pensar en que de algún modo, la sobreexpresión de la proteína de *T. delbrueckii* podía alterar la actividad de la proteína quinasa. Esta idea cobraba fuerza ante evidencias de algún caso similar descrito previamente; por ejemplo el de *STD1/MSN3*. Este gen había sido aislado como un supresor en multicopia del defecto de crecimiento en rafinosa de un mutante *snf4* (Hubbard y col., 1994). Std1p interacciona tanto con Snf1p (Hubbard y col., 1994), como con TBP (“TATA binding protein”) (Tillman y col., 1995), sugiriendo la posibilidad de que Std1p acople la señal de desrepresión mediada por Snf1p con la maquinaria transcripcional. Así, se ha demostrado que la sobreexpresión de *STD1* aumenta la actividad quinasa de Snf1p cuando las

Capítulo III

células están creciendo en medios con alta concentración de glucosa (Kuchin y col., 2003). Por otra parte, la sobreexpresión de este gen incrementa la resistencia a estrés por NaCl y la expresión de *HAL1* en una forma independiente de calcineurina (Ganster y col., 1998), mientras que la delección de *STD1* la disminuye (Ganster y col., 1998; Giaever y col., 2002).

De acuerdo a todo esto, decidimos determinar el efecto de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* sobre la actividad quinasa de Snf1p. Para ello, utilizamos como herramienta una fusión LexA-Snf1-G53R (Kuchin y col., 2000). Estos autores, habían demostrado que la holoenzima RNA polimerasa II es una diana de la cascada de transducción de la señal mediada por Snf1p. Así, este resultado permitía establecer una metodología para medir *in vivo* la actividad quinasa de Snf1p, utilizando una fusión LexA-Snf1-G53R, que activa la transcripción del gen chivato *lacZ* de *E. coli*, cuya expresión está controlada por secuencias de unión a LexA en su promotor/operon. Además, la isoforma de Snf1p, Snf1-G53R, presenta en su dominio N-terminal-quinasa, la substitución de un residuo de glicina por uno de arginina. Este cambio aumenta significativamente la actividad catalítica de la enzima, pero no afecta a su regulación en respuesta a la disponibilidad de glucosa en el medio (Kuchin y col., 2000). Para el análisis propuesto transformamos las células de la cepa salvaje CEN.PK2-1C con tres plásmidos, pRJ216 que contiene la fusión LexA-Snf1G53R (kuchin y col., 2000), pSH18-34 que contiene el gen chivato *lacZ* bajo el control de 8 copias del operón LexA y el plásmido YEpTdSIP1-t, o como plásmido control YEplac181.

Como cabía esperar, la actividad quinasa de Snf1p fue baja en células crecidas en glucosa (Tabla 1). Por el contrario, la actividad se incrementó notablemente cuando las células fueron cultivadas en un medio conteniendo galactosa, maltosa, rafinosa y en especial una mezcla de glicerol-etanol,

como única fuente de carbono. Excepto en glucosa, la sobreexpresión de *TdSIP1-t* disminuyó drásticamente la actividad de Snf1p en todas las fuentes de carbono ensayadas. Por ejemplo en un medio con glicerol-etanol, la actividad Snf1p fue tan sólo un 7% de la observada en células control (Tabla 1). Este resultado es similar al descrito con el mismo tipo de ensayo por Vincent y col. (2001) en células que sobreexpresan la subunidad β *SIP2*. Estos autores justifican el resultado en base a una posible competición entre Gal83p y Sip2p por unir a Snf1p. Recordemos que la interacción Gal83p con Snf1p permite la translocación al núcleo de la proteína quinasa y su acceso a dianas en el proceso de desrepresión. Así, la sobreexpresión de *SIP2* disminuiría la cantidad de LexA-Snf1G53R en el núcleo y con ello, la tasa de transcripción del gen chivato (Vincent y col., 2001). En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que TdSip1p-t interacciona con Snf1p inhibiendo su función en respuesta a la ausencia de glucosa.

Tabla 1. La activación transcripcional de *lacZ* por LexA-Snf1G53R disminuye en presencia de un alto número de copias de *TdSIP1-t*.

Fuente de carbono	Actividad β -galactosidasa (unidades/mg de proteína)*	
	YEplac181	YEpTdSIP1-t
Glucosa	1,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,9
Galactosa	9,8 \pm 5,6	1,5 \pm 0,7
Maltosa	68,1 \pm 15,4	6,6 \pm 1,0
Rafinosa	89,5 \pm 9,3	12,0 \pm 6,1
Glicerol-Etanol	253,5 \pm 87,8	18,1 \pm 7,2

*Células de la cepa CEN.PK2-1C fueron transformadas con los plásmidos pRJ216 que contiene la fusión LexA-Snf1G53R, pSH18-34 que contiene el gen chivato *lacZ* bajo el control de 8 copias del operón LexA y con los plásmidos, YEplac181 o YEpTdSIP1-t. Las células fueron crecidas en MM-glucosa hasta una DO₆₀₀ de 0,5 y transferidas al mismo medio conteniendo las fuentes de carbono indicadas. Después de 3 h, las células fueron colectadas y se determinó el nivel de actividad β -galactosidasa en los correspondientes extractos. Los valores representan la media \pm el error standard, de al menos tres experimentos independientes. Para más detalles ver el Capítulo de Materiales y Métodos.

Capítulo III

2.3.- La actividad de Snf1p no se modifica en respuesta a estrés osmótico

Llegados a este punto decidimos medir si la actividad quinasa de Snf1p se ve afectada en respuesta a una exposición a estrés por NaCl. Así, células transformantes conteniendo los plásmidos pRJ216, pSH18-34 y YEplac181 fueron cultivadas en MM-glucosa y transferidas al mismo medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. A diferentes tiempos, de 15 min a 3 h, una alícuota de estas células fue recogida y la actividad β -galactosidasa determinada. En ningún momento, la actividad de Snf1p, medida por el nivel de expresión del gen *lacZ*, se vio alterada por la exposición de las células a estrés salino. Así, todos los valores de la cinética, se situaron en torno a las 2-4 unidades de actividad/mg de proteína, de manera similar a lo descrito en la Tabla 1 para células crecidas en glucosa. Tampoco la sobreexpresión de *TdSIP1-t* modificó dicha actividad en respuesta a NaCl (datos no mostrados).

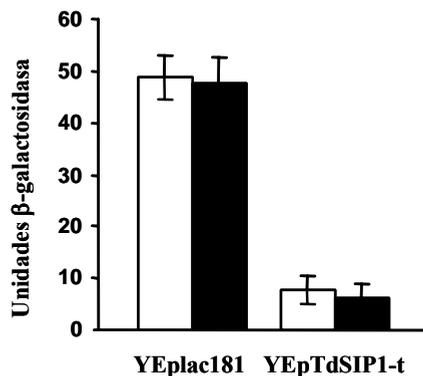


Figura 3.7. La actividad Snf1p no se altera en células expuestas a NaCl. Células de la cepa CEN.PK.2-1C transformadas con los plásmidos pRJ216, pSH18-34 y YEplac181 (control) o YEpTdSIP1-t fueron cultivadas en MM conteniendo un 2% de maltosa hasta una DO_{600} de 0,5 (barras con fondo blanco) y transferidas durante 3 h al mismo medio conteniendo un 0,5 M de NaCl (barras con fondo negro). La gráfica representa el nivel de actividad específica, unidades de β -galactosidasa por mg de proteína, en las muestras analizadas. Los valores representan la media \pm el error standard, de al menos tres experimentos independientes. Para más detalles ver el Capítulo de Materiales y Métodos.

Para descartar que el resultado anterior fuera consecuencia del bajo nivel de actividad Snf1p en condiciones de represión, repetimos el mismo experimento con células crecidas en maltosa (Figura 3.7). Sin embargo, los resultados fueron similares. Por consiguiente, nuestros datos sugieren que Snf1p podría tener una función citoplasmática en la respuesta de *S. cerevisiae* a NaCl, no determinada por la activación de su función quinasa y/o de su importación al núcleo.

2.4.- La interrupción de *SNF1* incrementa la expresión de algunos genes en respuesta a estrés iónico

Como se ha descrito en el capítulo II, el análisis global de la expresión génica mostró que la inducción de *HAL1* en respuesta a NaCl es mayor en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t* que en células control. Parecía lógico pues comparar, en este punto del trabajo, el nivel de expresión de este gen diana en la cepa salvaje y en un mutante *snf1Δ*. Para ello, transformamos la cepa salvaje CEN.PK2-1C y el mutante *snf1Δ* con el plásmido pRS909 que contiene la fusión entre el promotor del gen *HAL1* y el gen chivato *lacZ* (Gaxiola y col., 1992).

Como se muestra en la Figura 3.8, la exposición a estrés salino indujo la expresión de *HAL1* en células de la cepa salvaje, en correspondencia con los resultados publicados previamente (Gaxiola y col., 1992). Esta fue también la situación en un mutante *snf1Δ*, aunque el nivel de inducción fue significativamente más alto después de 4 y 6 h de transferencia a un medio conteniendo un 0,5 M de NaCl (Figura 3.8). Este resultado sugería de nuevo que *SNF1* es un regulador negativo de la respuesta a NaCl y que el fenotipo de mayor tolerancia a este estrés, observado en un mutante *snf1Δ*, podía ser consecuencia del incremento en la expresión de genes que, como *HAL1*, han

Capítulo III

sido implicados en la capacidad de *S. cerevisiae* para hacer frente a un medio hostil hiper-iónico.

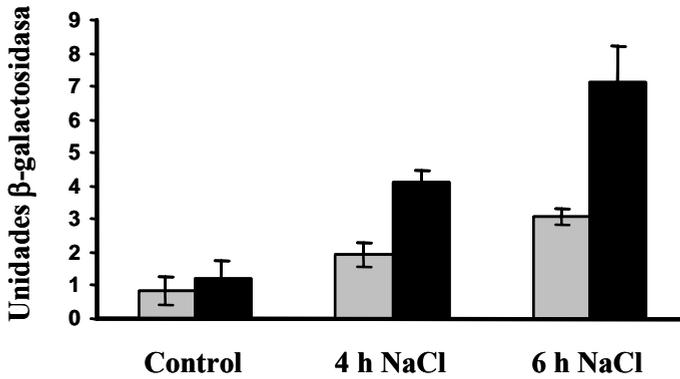


Figura 3.8. La inducción de *HAL1* en respuesta a NaCl se incrementa en un mutante *snf1Δ*. Células de la cepa salvaje CEN.PK2-1C (fondo gris) y del correspondiente mutante *snf1Δ* (fondo negro) fueron transformadas con el plásmido pRS909 (Gaxiola y col., 1992), que contiene una fusión del promotor de *HAL1* con el gen chivato *lacZ* de *E. coli*, cultivadas en MM-glucosa hasta una DO_{600} de 0,5 (Control) y transferidas al mismo medio suplementado con NaCl (0,5 M, concentración final). A los tiempos indicados se prepararon extractos celulares y se determinó el nivel de actividad β-galactosidasa por mg de proteína. Los valores representan la media ± el error standard, de al menos tres experimentos independientes. Para más detalles ver el Capítulo de Materiales y Métodos

Para confirmar esta hipótesis, y la conexión entre *SNF1* y *TdSIP1-t*, procedimos a analizar en un mutante *snf1Δ*, el nivel de mRNA de algunos genes identificados en el Capítulo II de este trabajo como regulados al alza en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*. Si el efecto de *TdSip1-t* depende, como sugieren las evidencias presentadas en este trabajo, de la inhibición de la actividad de *Snf1p*, cabía entonces esperar, que la delección de *SNF1* pudiera tener un resultado similar en el nivel de expresión de genes diana. Elegimos tres genes, *MAL12*, *CSG2* y *GDH3*. *CSG2* parece codificar un transportador, localizado en el retículo endoplásmico (Takita y col., 1995), implicado en la homeostasis de iones Ca^{2+} (Beeler y col., 1994).

MAL12 es el responsable de la actividad α -glucosidasa asociada al locus *MAL1* (Charron y col., 1986), mientras *GDH3* codifica una isoenzima de la glutamato deshidrogenasa de levadura (Avendano y col., 1997). Todos ellos han sido descritos como reprimidos por glucosa y/o regulados por fuente de carbono (DeLuna y col., 2001; Ohlmeier y col., 2004) e inducidos por NaCl o LiCl (Yale y Bohnert, 2001; Bro y col., 2003). Además, su nivel de inducción (45 min, 0,5 M NaCl) en células que sobreexpresan el gen heterólogo *TdSIP1-t* es al menos dos veces superior al observado en células de la cepa salvaje y todos ellos mostraban en los filtros de DNA un nivel de mRNA que debía, en principio, permitir su detección mediante *Northern blot*.

La Figura 3.9 muestra el perfil de expresión de los tres genes en células de la cepa salvaje y del mutante *snf1 Δ* expuestas a NaCl (0,5 M). Como vemos, tanto *CSG2*, como *MAL12* y *GDH3*, aumentaron su nivel de expresión en respuesta a NaCl, aunque su cinética de inducción fue bastante diferente. El nivel de transcrito de *CSG2* y *GDH3* aumentó rápidamente en células de la cepa salvaje expuestas a NaCl, cayó de nuevo después de 60 min y volvió a aumentar a tiempos más largos (Figura 3.9). Por el contrario, *MAL12* mostró únicamente un pico de inducción, con su máximo a las 6 h. En el mutante *snf1 Δ* el patrón de expresión de los tres genes fue similar al observado para la cepa salvaje a tiempos cortos. Sin embargo, la acumulación de mRNA en el tramo de inducción tardía fue sensiblemente mayor, en especial para *MAL12* y *GDH3*, en torno a 5 y 3 veces, respectivamente. Por consiguiente, nuestros resultados indican que, en efecto, Snf1p funciona como un regulador negativo de la expresión de genes de respuesta a NaCl.

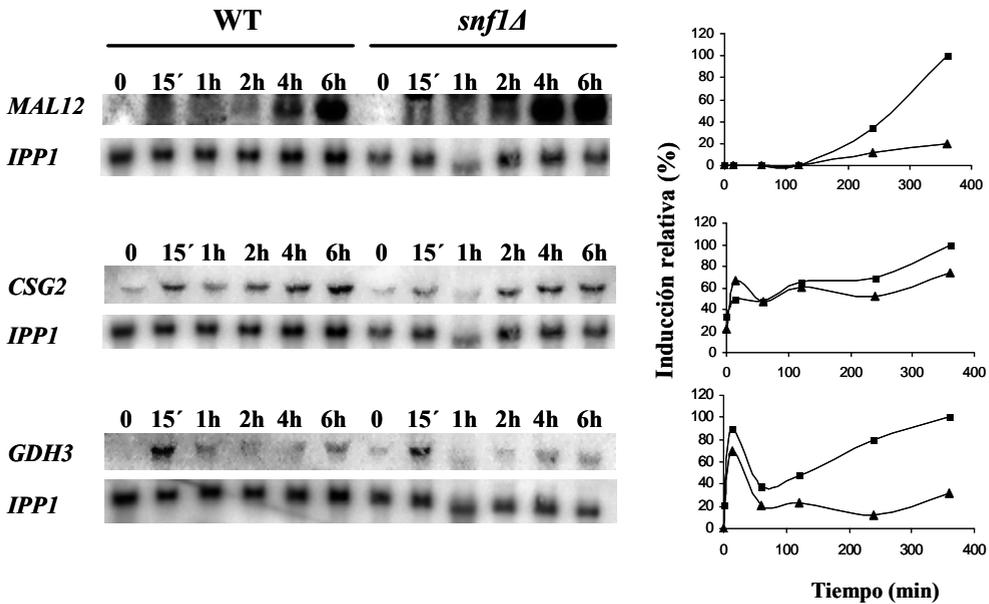


Figura 3.9. La delección de *SNF1* incrementa la inducción por NaCl de algunos genes diana. Células de la cepa CEN-PK2-1C (▲) y del correspondiente mutante *snf1Δ* (■) fueron crecidas en medio YPD ($DO_{600} = 1,0$) y transferidas al mismo medio conteniendo un 0,5 M de NaCl. A los tiempos indicados, una muestra de células de cada cultivo fue colectada y procesada para la extracción de RNA total. El análisis del nivel de mRNA de *CSG2*, *MAL12* y *GDH3* se llevó a cabo mediante *Northern blot*, utilizando una sonda de cada uno de estos genes marcada con ^{32}P . Para el control de carga y transferencia, la membrana se rehibridó con una sonda del gen *IPP1*. Los valores en cada grafica indican la inducción relativa de cada gen con respecto a la muestra con mayor nivel de mRNA, a la que se adjudicó el valor de 100.

2.5.- La función de Snf1p impide la expresión de genes regulados por la ruta de la calcineurina en ausencia de estrés

Los resultados anteriores revelaron que la inducción de *HAL1* en respuesta a estrés por NaCl era mayor en células del mutante *snf1Δ*. Similares resultados habían sido obtenidos en células que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t*. Se ha descrito que el aumento del número de copias de *HAL1* incrementa la expresión de *ENA1* y suprime el defecto de crecimiento en

NaCl de mutantes de la ruta de la calcineurina (Rios y col., 1997), la cual controla a su vez la expresión de *ENAI* a través del factor transcripcional Crz1p (Stathopoulos y Cyert, 1997; Mendizábal y col., 1998). Como se mencionó en el Capítulo de Introducción, Crz1p se une al DNA, a través del elemento de respuesta dependiente de calcineurina (CDRE), una secuencia de 24 pares de bases que es necesaria y suficiente para dirigir la expresión de genes dependientes de calcineurina (Stathopoulos y Cyert, 1997).

De acuerdo a todo esto, nos pareció oportuno investigar si existía una conexión entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y la actividad de la ruta calcineurina-Crz1p. Para ello, utilizamos como gen chivato el gen *lacZ* de *E. coli* fusionado a un promotor sintético formado por 4 repeticiones de la secuencia CDRE (4xCDRE) (Stathopoulos y Cyert, 1997) que permite amplificar la expresión dependiente de Crz1p, respecto a la observada, por ejemplo, con una fusión del promotor de *ENAI* a *lacZ*. La inducción del gen chivato por NaCl se determinó en células de la cepa ASY832 (fondo YPH499), la cual presenta una integración en copia única del gen chivato (Stathopoulos y Cyert, 1997). Además, analizamos el efecto de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* y/o de la interrupción de *SNFI* en esta cepa.

En consonancia con lo descrito por otros autores (Stathopoulos y Cyert, 1997), la exposición durante 45 min a un estrés moderado de NaCl (0,8 M), indujo, entre 3 y 4 veces, la expresión del gen chivato en células de la cepa ASY832 (Figura 3.10). La sobreexpresión de *TdSIP1-t* no alteró significativamente el nivel de inducción del gen *lacZ* observado en la cepa transformada con el plásmido control. Sin embargo, los valores de expresión, tanto en ausencia, 56 unidades, como en presencia de NaCl, 198 unidades, fueron sensiblemente más altos (Figura 3.10).

La interrupción de *SNFI* tuvo efectos más acusados. Así, en células del mutante *snf1Δ* no expuestas a NaCl, el nivel de actividad β-galactosidasa se

Capítulo III

incrementó en torno a 40 veces respecto a los observados en la cepa control ASY832. Además, este nivel no fue alterado cuando las células fueron transferidas a un medio conteniendo NaCl. Finalmente, la sobreexpresión de *TdSIP1-t* en un fondo *snf1Δ* no tuvo efectos en el nivel de transcripción del gen chivato en células expuestas o no expuestas a NaCl.

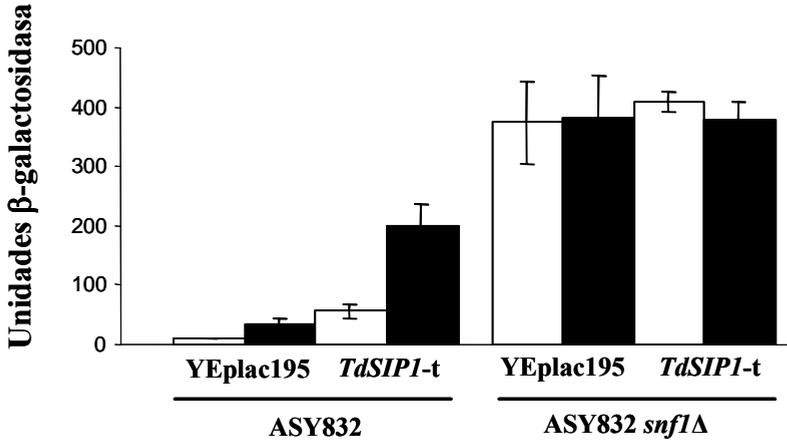


Figura 3.10. La función Snf1p regula negativamente la expresión mediada por elementos CDRE en respuesta a NaCl. Células de la cepa ASY832 (cepa salvaje YPH4999) y del correspondiente mutante *snf1Δ* fueron transformadas con el plásmido YEplac195 (control) o con un plásmido conteniendo el gen *TdSIP1-t*. La cepa ASY832 (fondo YPH499) presenta una integración en copia única del gen chivato *lacZ* de *E. coli* dirigido por un promotor sintético formado por 4 copias del elemento CDRE (Stathopoulos y Cyert, 1997). Células de los correspondientes transformantes fueron cultivadas en MM-glucosa hasta una DO_{600} de 0,2, transferidas a medio YPD hasta una DO_{600} de 0,5 (barras con fondo blanco) y de nuevo transferidas durante 45 min al mismo medio conteniendo NaCl (0,8 M) (barras con fondo negro). En todos los casos, se prepararon extractos celulares y se determinó el nivel de actividad β-galactosidasa por mg de proteína. Los valores representan la media ± el error standard, de al menos tres experimentos independientes. Para más detalles ver el Capítulo de Materiales y Métodos

Por otra parte, ninguna actividad β-galactosidasa pudo ser detectada en mutantes *crz1Δ* o *cnb1Δ* que sobreexpresan el gen *TdSIP1-t* o en un doble mutante *cnb1Δ snf1Δ* (datos no mostrados). Por consiguiente, nuestros resultados confirman, de nuevo, que los efectos de *TdSip1p-t* dependen de la existencia de una proteína quinasa Snf1p funcional. Esta parece mantener reprimida la expresión mediada por el elemento CDRE en ausencia de estrés

por NaCl. Además, Snf1p también parece controlar, directa o indirectamente, el nivel de transcripción en condiciones de estrés, puesto que en su ausencia los niveles de actividad β -galactosidasa se multiplican varias veces en condiciones de inducción (Figura 3.10). Estos efectos dependen de la existencia de una ruta calcineurina-Crz1 funcional. Ya que Crz1p es el único factor transcripcional que parece mediar en la señal Ca^{2+} -calcineurina a través del elemento CDRE, nuestros resultados sugieren también una conexión funcional entre Snf1p y Crz1p.

2.6.- La sobreexpresión de cualquiera de las subunidades β de Snf1p desregula la expresión dependiente de calcineurina-Crz1p

De acuerdo a los resultados descritos en el apartado anterior, decidimos investigar si la desregulación y/o el incremento de la expresión mediada por los elementos CDRE podía ser el origen del fenotipo de mayor tolerancia a NaCl asociado a la sobreexpresión de *TdSIP1-t*. Para ello, seguimos dos aproximaciones. Primero, determinamos si la sobreexpresión de alguna de las subunidades β de Snf1p alteraba la transcripción inducida por la ruta de la calcineurina-Crz1p. Como se describió en este capítulo la expresión en un alto número de copias de *SIP1*, *SIP2* o *GAL83* no altera la resistencia a NaCl de *S. cerevisiae*. Como puede observarse en la Figura 3.11, la sobreexpresión de cualquiera de las subunidades β incrementó la expresión dirigida por el promotor 4xCDRE tanto en presencia como en ausencia de NaCl. Además, los niveles alcanzados en células expuestas fueron del mismo orden, e incluso mayores (*SIP2*, *GAL83*) que los observados para *TdSIP1-t* (Figura 3.10). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se analizó la actividad β -galactosidasa en células que sobreexpresan el gen de *T. delbrueckii TdSIP1*.

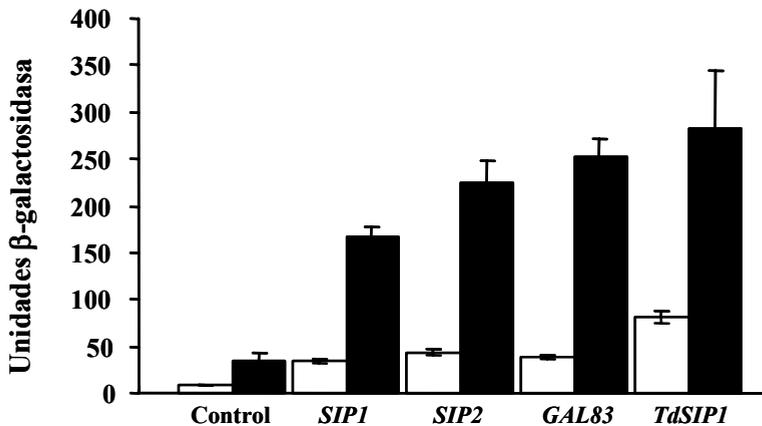


Figura 3.11. La sobre-expresión de cualquiera de las subunidades β regula la actividad de Crz1p. Células de la cepa ASY832 (Stathopoulos y Cyert, 1997) transformadas con los plásmidos YEplac195 (Control), pB44 (*SIP1*), YEpSIP2 (*SIP2*), YEpGAL83 (*GAL83*) o con un plásmido multicopia conteniendo el gen de *T. delbrueckii* *TdSIP1* fueron cultivadas y la expresión del gen *lacZ* determinada como medida de la actividad β -galactosidasa. La actividad específica en células no expuestas (barras con fondo blanco) y expuestas a NaCl (0,8 M) durante 45 min (barras con fondo negro) se determinó como se describe en la Figura 3.10. Los valores representan la media \pm el error standard, de al menos tres experimentos independientes. Para más detalles ver el Capítulo de Materiales y Métodos

En segundo lugar, analizamos si el fenotipo observado por la sobreexpresión de *TdSIP1-t* dependía de la funcionalidad de la ruta de la calcineurina-Crz1p. Como vemos en la Figura 3.12, la expresión en un alto número de copias del gen truncado de *T. delbrueckii* incrementó la tolerancia a NaCl tanto del mutante *crz1Δ*, como del mutante *cnb1Δ*. El mismo fenotipo fue observado cuando células de la cepa salvaje CEN.PK2-1C transformadas con un plásmido control YEplac195 o un plásmido conteniendo el gen *TdSIP1-t* fueron expuestas a NaCl (0,5 M) en la presencia de FK506 (datos no mostrados), un inmunodepresor que forma un complejo con calcineurina, inhibiendo la señal dependiente de Ca^{2+} (Foor y col., 1992). Así pues, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de

cualquier subunidad β de Snf1p dispara la desregulación de la expresión dirigida por el elemento CDRE y amplifica la inducción en células expuestas a NaCl. No obstante, este efecto no parece ser el origen del fenotipo asociado a la sobreexpresión de *TdSIP1-t*. En consonancia con esto, la interrupción de la señal por Ca^{2+} , bien por delección de *CNB1* o de *CRZ1*, o por exposición a FK506 no elimina el fenotipo de tolerancia a sal.

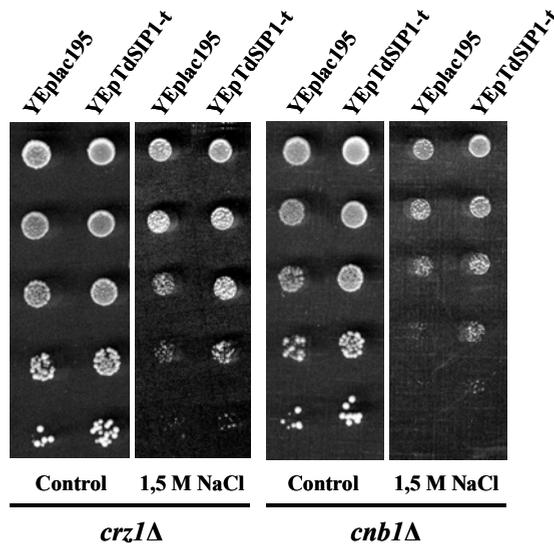


Figura 3.12. El efecto de la sobreexpresión de *TdSIP1-t* en la tolerancia a NaCl de *S. cerevisiae* es independiente de Crz1p o Cnb1p. Células de las cepas mutantes *crz1Δ* (ASY472, fondo YPH499) y *cnb1Δ* (DD12, fondo YPH499) (Stathopoulos y Cyert, 1997) fueron transformadas con los plásmidos YEplac195 o YEpTdSIP1-t y su crecimiento ensayado en placas de agar-MM-glucosa conteniendo 0 (Control) o 1,5 M de NaCl como se describe en la Figura 3.3. Las células fueron incubadas a 30°C durante 2 a 5 días.

DISCUSIÓN

Marcadores auxotróficos de T. delbrueckii

La carencia de cepas auxótrofas de *T. delbrueckii*, y en particular de cepas con aplicación industrial, nos llevó a plantearnos como punto de partida de este trabajo, la clonación de genes que codifican elementos esenciales en las rutas de biosíntesis de bases nitrogenadas o de aminoácidos. Para ello, utilizamos una librería de DNA genómico de este organismo y las herramientas moleculares habitualmente utilizadas en *S. cerevisiae*. Plásmidos de expresión, tanto episomales (YEp) como centroméricos (YCp), casetes de integración, marcadores de selección dominantes y protocolos de transformación fueron de aplicación práctica en este organismo, con rendimientos similares a los observados en *S. cerevisiae*. Así, logramos aislar y caracterizar los genes *TdHIS3* y *TdLEU2*. Junto a *TdURA3* aislado anteriormente (Hernández-López y col., 2002), estos son los primeros genes implicados en rutas metabólicas, caracterizados en este organismo, del que tan solo se conoce una parte ínfima de su genoma. Además de confirmar su funcionalidad mediante complementación de cepas auxótrofas de *S. cerevisiae*, hemos obtenido mutantes *leu2* en dos cepas de *T. delbrueckii* PYCC5321 y PYCC5323. Estos mutantes, junto a otros Ura^- previamente construidos (Hernández-López y col., 2003a) deben ser de gran utilidad para la expresión de proteínas heterólogas y para la realización de estudios básicos en este organismo. Conviene recordar que las dos cepas de *T. delbrueckii* utilizadas en esta investigación han demostrado su utilidad en la fermentación de productos de panadería y bollería (Hernández-López y col., 2003b) y que la construcción de cepas recombinantes de levaduras industriales es una estrategia útil para modificar sus propiedades funcionales e incrementar su valor añadido (Rández-Gil y col., 1999). Estudios preliminares, actualmente en marcha en nuestro laboratorio, han confirmado la producción de una xilanasas activa de *A. nidulans* en una cepa Leu^- de *T.*

Discusión

delbrueckii y se está trabajando en la obtención de mutantes de este organismo que combinen varios marcadores auxotróficos.

La comparación de secuencias de His3p y Leu2p de *T. delbrueckii* con las correspondientes proteínas homólogas de otras levaduras ha revelado una elevada homología entre estas. Este resultado viene a confirmar el conocido postulado de que la divergencia evolutiva en levaduras y en general en otros organismos, ha sido menor entre genes esenciales que entre los no esenciales (Decottignies y col., 2003; Veiga-Crespo y col., 2004). Este hecho se pone también de manifiesto en el análisis de la región promotora de estos genes. Junto a elementos comunes implicados en la regulación general de la maquinaria transcripcional (Struhl, 1982), la inspección pormenorizada de la región flanqueante 5' de TdHis3p y TdLeu2p puso de manifiesto la existencia en ambas proteínas, de secuencias consenso de unión a Gcn4p. El producto del gen *GCN4* es un factor transcripcional que regula la expresión coordinada de cientos de genes, y en particular de aquellos implicados en la biosíntesis de aminoácidos, en respuesta a la disponibilidad y calidad de la fuente de nitrógeno (Hinnebusch y Natarajan, 2002). El análisis del promotor de TdLeu2p reveló también la existencia de secuencias, que han sido reconocidas como el motivo de unión de Leu3p (Hellauer y col., 1996) y Mot3p (Grishin y col., 1998), dos factores transcripcionales que regulan la activación del gen *LEU2* de *Saccharomyces*. Así, la divergencia evolutiva entre *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* parece haber conservado secuencias y factores implicados en la regulación, al menos de genes esenciales con funciones en biosíntesis.

Relaciones filogenéticas entre T. delbrueckii y otras levaduras

El análisis del orden génico y orientación transcripcional de genes situados en la región *TdHIS3* y *TdLEU2* ha contribuido al esclarecimiento de las

relaciones filogenéticas entre este organismo y otras levaduras. Bloques enteros de genes habrían sido conservados durante la evolución de estas especies, marcada por un episodio singular, la duplicación completa del genoma de un ancestro de *Saccharomyces* y la posterior pérdida de genes o diferenciación de genes parálogos (Wolfe y Shields, 1997; Keogh y col., 1998). La secuenciación de los fragmentos cromosómicos adyacentes a *TdHIS3* y *TdLEU2*, mostró la presencia de varios genes fuertemente empaquetados. Aunque numerosas regiones cromosómicas de *S. cerevisiae* muestran una organización similar (Struhl, 1985a), esta característica parece más acusada en *Torulaspota*. Un claro ejemplo es la existencia de un espaciador intergénico de tan sólo 33 pb, entre *TdHIS3* y *TdMRP51*. Como consecuencia, promotores que se solapan dirigen la transcripción de genes divergentes. Esta organización conservada, mantiene unidos genes en un contexto funcional, algo característico de genes esenciales (Eisenberg y Levanon, 2003; Lercher y col., 2002). Como ha sido propuesto por Nelson y col. (2004), la distancia intergénica y por ende la arquitectura del genoma en los metazoos no es un hecho al azar. En general, genes con funciones complejas están flanqueados por regiones no-codificantes más largas que genes con funciones simples, como el caso de *HIS3* o *LEU2*. Además, la cantidad de DNA no-codificante es proporcional a la complejidad evolutiva del organismo estudiado y por tanto, de la presencia de elementos reguladores (Nelson y col., 2004). Así, la mayor densidad génica en *T. delbrueckii* en comparación con *S. cerevisiae* predice probablemente una pérdida de información reguladora no esencial. No obstante, es claro la cercanía filogenética entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*.

El análisis y comparación de las secuencias de proteínas His3 y Leu2 de diferentes levaduras reveló, que en efecto, estas pueden dividirse en dos grupos, *Saccharomyces* y *Candida-Pichia*. El análisis filogenético demostró

Discusión

también, en consonancia con estudios previos (James y col., 1997; Kurtzman y Robnett, 1998; Belloch y col., 2000; Wong y col., 2002; Hernández-López y col., 2002) que *T. delbrueckii* está situada en un grupo separado del denominado *Saccharomyces sensu stricto*, que incluiría por ejemplo especies como *Z. rouxii*. Esta información es contrastada por el análisis del orden génico y orientación transcripcional en estas regiones. Así, *T. delbrueckii* y *Z. rouxii* muestran el mismo orden de genes en la región *HIS3*, *PET56-HIS3-MRP51-DED1*, los cuales se sitúan en dos cromosomas diferentes en las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Una situación idéntica es observada en la región *LEU2* para el bloque formado por *RLP7*, *LEU2*, *NFS1* y *PET8*. Así, el análisis de la evolución del orden de genes en estas regiones parece apoyar la hipótesis de Wong y col. (2002), según el cual el evento de poliplolidización habría ocurrido después de que las especies *K. lactis*, *S. kluyveri*, *Z. rouxii* y *T. delbrueckii* hubieran divergido de las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

***T. delbrueckii* como organismo modelo para el estudio de la respuesta a estrés iónico**

La extraordinaria resistencia de *T. delbrueckii* a variaciones de su entorno medioambiental y en particular su capacidad para hacer frente y desarrollarse en un entorno de elevada presión osmótica, hacen de esta levadura un potencial modelo para la identificación de genes implicados en la respuesta a estrés iónico y el esclarecimiento de las bases moleculares de este fenotipo.

Como estrategia para identificar genes de *T. delbrueckii* implicados en tolerancia a sal, realizamos un rastreo de una genoteca de esta levadura (Hernández-López y col., 2002) en una cepa de *S. cerevisiae*, CEN.PK2-1C,

caracterizada por su elevada sensibilidad a NaCl. Usando esta metodología, hemos aislado numerosos plásmidos que confieren mayor capacidad de crecimiento en presencia de NaCl. Por razones obvias, hemos centrado nuestra atención en sólo unos cuantos, por lo que el trabajo ahora iniciado debe permitir en un futuro la identificación de otros genes y quizás nuevas funciones a los descritos en este manuscrito.

El aislamiento de *TdENAI*, un gen con una alta homología con *ENAI*, *ENA2* y *ENA5* de *S. cerevisiae*, indicó que la estrategia empleada era correcta. Estos genes codifican ATPasas implicadas en el bombeo de iones Na^+ hacia el exterior celular y cuya función determina resistencia a estrés iónico (de Jesús Ferreira y col., 2001). Se ha descrito que la sobreexpresión de *ENAI*, mejora el crecimiento en presencia de Na^+ , pero sobre todo de Li^+ (Benito y col., 1997). Además, todas aquellas mutaciones que afectan al nivel de expresión de esta proteína, tienen un claro efecto en el fenotipo de tolerancia a estrés iónico en la célula (Betz y col., 2002). Del análisis de secuencias *ENAI* de levaduras, resulta interesante resaltar la alta homología encontrada entre proteínas de diferentes especies, lo cual indica que los genes *ENA* cumplen una función primordial para la célula. Respecto a su promotor, la presencia de secuencias consenso de unión a Mig1p y Crz1p, indica una regulación similar a la descrita para el gen *ENAI* de *S. cerevisiae*. No obstante, es necesaria una confirmación experimental de la funcionalidad de los elementos reguladores identificados y de los posibles factores transcripcionales implicados en la regulación de este gen.

Otro de los genes encontrados muestra una alta homología con la RNA helicasa *DED1*. Las RNA helicasas pertenecientes a la familia DEAD-box son requeridas para muchos procesos en los que se ven involucradas moléculas de RNA. Están formadas por un dominio, bastante conservado en la evolución, rodeado por dominios de aminoácidos no conservados que

Discusión

determinan la especificidad de sustrato, su interacción con otros componentes celulares, la existencia de actividades enzimáticas adicionales y su localización subcelular (de la Cruz y col., 1999; Tanner y Linder, 2001). En *S. cerevisiae*, Ded1p es una proteína que modifica su conformación cuando la levadura es expuesta a estrés por altas temperaturas o en respuesta al agotamiento de fuentes de carbono (Liu y col., 2002). En otros organismos se ha descrito la presencia de RNA helicasas, que se inducen a bajas temperaturas. Esta respuesta no es de extrañar, ya que uno de los efectos de las bajas temperaturas es la reducción en la eficiencia de la traducción, debida a la formación de estructuras secundarias en el RNA y la inactivación de los ribosomas (Jones y Inouye, 1996). Así, encontramos ejemplos de la presencia de estas proteínas en la cianobacteria *Anabaena* sp., codificada por el gen CrhC (Chamot y col., 1999; Chamot y Owtrim, 2000), en *Escherichia coli*, CsdA (Jones y Inouye, 1996) o en *Methanococcoides burtonii* (Lim y col., 2000). Aunque existían datos de la inducción en condiciones de estrés iónico y osmótico de RNA-helicasas de levadura (Causton y col., 2001), su funcionalidad en la respuesta y tolerancia a estos estreses no había sido confirmada. No existía tampoco información sobre su posible regulación en células expuestas a bajas temperaturas. Los resultados obtenidos en este trabajo, parecen indicar que Ded1p y posiblemente otras RNA-helicasas, podrían tener una función más amplia en la respuesta a estrés en *Saccharomyces*, confirmando así la importancia de la maquinaria traduccional para hacer frente a variaciones hostiles en las condiciones medioambientales.

El último de los plásmidos estudiado en este rastreo, contuvo una pauta de lectura abierta que presentaba una gran homología con la zona C-terminal de la proteína Sip1, una de las subunidades β de la proteína quinasa Snf1p. Esto parecía indicar que habíamos clonado una de las subunidades β

de *T. delbrueckii*, en concreto *TdSIP1*. Sin embargo, la proteína de *Torulaspora* era sensiblemente más corta y la sobreexpresión del gen *SIP1* no confería fenotipo alguno en términos de resistencia a NaCl. Estas evidencias nos llevaron a pensar que estábamos trabajando con una proteína truncada de *T. delbrueckii*. En efecto, un rastreo pormenorizado mediante una amplificación selectiva por PCR nos permitió aislar el gen *TdSIP1*. Aunque menor en tamaño que su homólogo de *S. cerevisiae*, la proteína codificada por este gen exhibió propiedades funcionales similares, siendo capaz de complementar el fenotipo de un triple mutante *sip1Δ sip2Δ gal83Δ* de *S. cerevisiae* en fuentes de carbono gluconeogénicas. Además, la sobreexpresión de este gen no alteró la tolerancia a NaCl. Finalmente, la interrupción de *TdSIP1* no tuvo efectos en su capacidad de crecimiento en ninguna de las fuentes de carbono analizadas, en consonancia con lo descrito para un mutante *sip1Δ* (Schmidt y McCartney, 2000). Así, nuestros resultados indican que el producto del gen *TdSIP1* es la proteína homóloga a Sip1p de *S. cerevisiae*. Como en esta levadura, nuestros resultados también sugieren la existencia en *Torulaspora* de subunidades β adicionales con funciones redundantes, al menos respecto al crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. Aunque no existen muchos datos al respecto, tres proteínas con similitud a Sip1p, Sip2p y Gal83p han sido identificadas en la cepa CBS138 de *Candida glabrata*, una levadura imperfecta muy cercana filogenéticamente a *T. delbrueckii* del grupo *Saccharomyces sensu lato* (Belloch y col., 2000; Kurtzman y Robnett, 2003). Es interesante señalar que en esta levadura, la proteína homóloga a Sip1 tiene un tamaño de 744 residuos, frente a 863 de la proteína de *S. cerevisiae* y 648 de TdSip1p, mientras que los homólogos a Sip2p y Gal83p son más similares. La porción NH₂-terminal de Sip1p y en concreto un sitio consenso de miristoilación, ha sido implicado en la regulación de la localización subcelular de esta proteína

Discusión

en respuesta al tipo de fuente de carbono (Hedbacker y col., 2004). Ya que este sitio está ausente en TdSip1p, nuestros datos sugieren una regulación distinta de la actividad proteínica quinasa de Snf1p en esta levadura.

Resultados anteriores habían establecido que la delección de *SIP1* tenía efectos negativos en el crecimiento de células de *S. cerevisiae* expuestas a un estrés severo (1,0 M) de NaCl (Giaever y col., 2002). Sin embargo, este no resultó ser el caso en mutantes *sip1Δ* de la cepa MSY182. Tampoco un mutante *Tdsip1Δ* mostró un crecimiento menor respecto a la cepa parental PYCC5321 bajo estas condiciones. No obstante, nuestros datos indican que Snf1p juega un papel importante en la regulación de la respuesta a NaCl y que las subunidades β de esta proteína quinasa son requeridas para hacer frente y proliferar en presencia de concentraciones elevadas de NaCl. Es fascinante pensar, como la sobreexpresión de una proteína truncada, un artefacto encontrado en nuestro laboratorio, nos ha llevado a interesarnos por Snf1p y a desenmarañar un nuevo papel funcional de este elemento central de la regulación de *S. cerevisiae*.

El papel funcional de SNF1 en la respuesta a estrés por NaCl

El aislamiento, en el rastreo de genes que confieren tolerancia a estrés iónico en *S. cerevisiae*, de un gen de *T. delbrueckii*, homólogo a *SIP1* y en menor medida a *SIP2* y *GAL83*, nos llevó a plantearnos el posible papel de *SNF1*, en la respuesta a estrés iónico en levadura. La proteína quinasa Snf1p es bien conocida por su función en la regulación de diversos procesos activados por la limitación de nutrientes en el medio (Gancedo, 1998; Rolland y col., 2001). Trabajos previos habían implicado también a Snf1p en tolerancia a sal, si bien las conclusiones a este respecto parecían depender del fondo genético analizado y de las condiciones del ensayo (Alepuz y col., 1997; Ganster y col., 1998). Como se desprende de nuestros

resultados, la pérdida de la actividad de Snf1p en una cepa Ura⁺, mejora el crecimiento de células expuestas a un estrés moderado de NaCl. Así, en cepas protótrofas, Snf1p parece actuar como un regulador negativo de la resistencia a este estrés. Por el contrario, células de la misma cepa CEN.PK2-1C *snf1Δ (ura3)* exhiben una resistencia similar al de la cepa parental en medio mínimo y sensiblemente inferior en YPD. Así, el fenotipo parece depender no del fondo génico, sino de las condiciones de crecimiento y en particular de la disponibilidad de uracilo y de la capacidad para su síntesis. Trabajos previos han mostrado que la capacidad de transporte de *S. cerevisiae* se ve afectada de manera negativa por la exposición a estrés osmótico (Volland y col., 1994; Norbeck y Blomberg, 1998), un factor que contribuye a la inhibición del crecimiento en estas condiciones. Por consiguiente, nuestros resultados sugieren también un papel funcional de Snf1p en la toma y/o biosíntesis de aminoácidos y/o bases nitrogenadas en células expuestas a NaCl.

Si Snf1p participa en la regulación de la tolerancia a NaCl en *S. cerevisiae*, cabía esperar que su ausencia tuviera efectos en el nivel de expresión de genes inducidos por este estrés. Para comprobar este extremo, elegimos cuatro genes, *MAL12*, *CSG2*, *GDH3* y *HAL1*, todos ellos regulados por disponibilidad de glucosa en el medio y/o estrés salino (DeLuna y col., 2001; Yale y Bohnert, 2001; Bro y col., 2003; Ohlmeier y col., 2004). La expresión de los tres primeros fue analizada mediante *Northern blot*, mientras que la de *HAL1* fue investigada mediante el uso de una fusión de su promotor con el gen chivato *lacZ*. En coincidencia con el fenotipo descrito, la pérdida de la función Snf1p incrementó, de 2 a 3 veces, la acumulación de mRNA de *MAL12*, *CSG2* y *GDH3*, respecto a la observada en células de la cepa salvaje expuestas a NaCl (0,5 M). De la misma forma, la inducción de *HAL1* fue superior en células del mutante

Discusión

snf1Δ. Así, Snf1p funciona como un regulador negativo de la expresión de genes de respuesta a sal.

Estudios previos de Alepuz y col. (1997) habían mostrado que Snf1p no juega un papel funcional en la respuesta a estrés osmótico, sugiriendo que la proteína quinasa podría estar implicada específicamente en la tolerancia a estrés iónico. La exposición a NaCl genera en *S. cerevisiae* dos efectos distintos derivados por una parte, del incremento de la presión osmótica y por otra, de la sensibilidad de esta levadura a la toxicidad del ión Na⁺. Estas evidencias nos hicieron pensar que la actividad de Snf1p podría estar involucrada en la regulación, directa o indirecta, de la ruta de la calcineurina-Crz1p. Esta ruta responde específicamente a incrementos en la concentración de NaCl y resulta esencial para la tolerancia a este estrés (Rusnak y Mertz, 2000). Así, comparamos el nivel de expresión regulado por la ruta de la calcineurina-Crz1p en células de la cepa salvaje y del correspondiente mutante *snf1Δ*. Como mostramos en este estudio, la interrupción de *SNF1* incrementó en más de 40 veces la expresión del gen chivato *lacZ*, dirigido por cuatro repeticiones de la secuencia CDRE (Stathopoulos y Cyert, 1997), en células crecidas en condiciones normales. Estos efectos dependen de la existencia de una ruta intacta, ya que en un mutante *crz1Δ* o *cnb1Δ*, no se detecta actividad β-galactosidasa. Por consiguiente, la función de Snf1p reprime la expresión de genes regulados por la ruta de la calcineurina-Crz1p en ausencia de estrés. Además, el nivel de actividad β-galactosidasa en células expuestas a NaCl fue muy superior en el mutante *snf1Δ* que en la cepa salvaje. Así, nuestros resultados parecen indicar que Snf1p es también funcional en estas condiciones, ya que su actividad reduce la magnitud de la expresión disparada por la señal de Ca²⁺. Pero ¿cómo regula Snf1p la actividad de la ruta de la calcineurina-Crz1p? Como es sabido, la proteína fosfatasa calcineurina media la respuesta

transcripcional a través del factor Crz1p, el cual se une específicamente a los elementos CDRE presentes en los promotores de genes regulados por esta ruta, entre ellos *ENAI* (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997; Mendizabal y col., 2001). En condiciones normales de crecimiento, Crz1p es una fosfo-proteína de localización citosólica. Su defosforilación mediada por calcineurina promueve tanto su activación, como su translocación al núcleo (Stathopoulos-Gerontides y col., 1999). Por el contrario, la fosforilación de Crz1p por Hrr25p, una proteína homóloga a la caseína quinasa I, inhibe su actividad y su importación al núcleo (Kafadar y col., 2003). No obstante, Hrr25p no sería la única proteína quinasa involucrada en la fosforilación de Crz1p. Recientemente, se ha propuesto que la proteína quinasa A, PKA, junto a proteínas quinasa no identificadas hasta el momento, participaría en la regulación *in vivo* de la actividad de Crz1p y en su localización subcelular (Kafadar y Cyert, 2004).

En este escenario, podemos especular con un papel funcional de Snf1p en la fosforilación de Crz1p, representado esquemáticamente en la Figura 1. En este modelo, Crz1p es un sustrato de la actividad de Snf1p, la cual inhibiría la inapropiada expresión de genes regulados por la ruta de la calcineurina en condiciones normales de crecimiento. Como en el caso de Hrr25p, la función de Snf1p se localizaría en el citosol, impidiendo la importación al núcleo del factor transcripcional en estas condiciones. Esto es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que se observa la ausencia de inducción controlada por LexA-Snf1-G53R del gen chivato *lacZ*, en células de la cepa salvaje expuestas a NaCl. En efecto, este resultado podría ser interpretado como una evidencia de que Snf1p no se importa al núcleo en respuesta a estas condiciones de estrés. De hecho, se ha descrito que Snf1p se fosforila en respuesta a la presencia de sal en el medio, aunque el grado de fosforilación es menor que el detectado en

Discusión

células transferidas a un medio con baja concentración de glucosa. Además, esta señal no implica la posterior fosforilación de proteínas como Mig1p (McCartney y Schmidt, 2001).

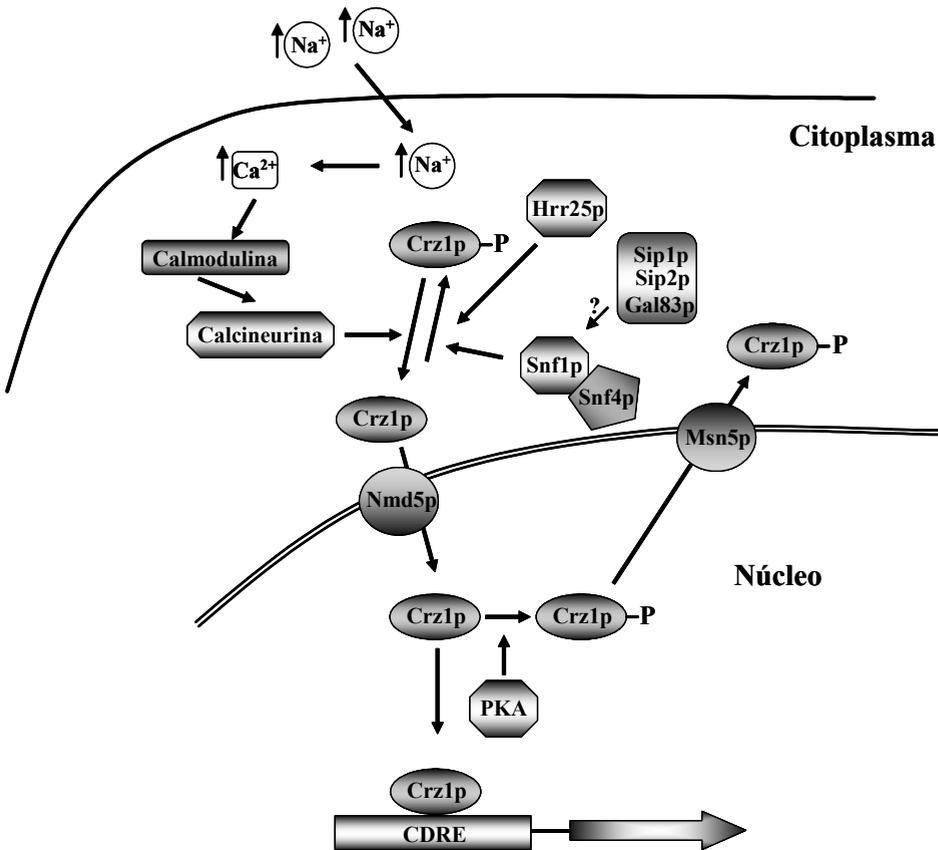


Figura 1. Representación esquemática del posible papel funcional de Snf1p en la regulación de la ruta de la calcineurina-Crz1p. La proteína-fosfatasa calcineurina es activada por Ca^{2+} , via calmodulina, en respuesta a un incremento de la concentración de iones Na^+ . La activación de calcineurina defosforila al factor transcripcional Crz1p, lo cual dispara su translocación al núcleo (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997), un proceso facilitado por Nmd5p (Polizotto y Cyert, 2001). En ausencia de estrés, Snf1p, Hrr25p y posiblemente otras proteínas quinasa (Kafadar y Cyert, 2004) mantienen el estado de fosforilación de Crz1p, mientras que PKA estaría implicada en su desactivación nuclear, favoreciendo su exportación via Msn5p (Boustany y Cyert, 2002). El papel de las subunidades β de Snf1p, Sip1p, Sip2p y Gal83p en este proceso de regulación necesita ser clarificado.

Por otra parte, el hecho de que el nivel de expresión de una fusión 4xCDRE-*lacZ* en el mutante *snf1Δ* sea muy superior en condiciones normales de crecimiento, al alcanzado en células de la cepa salvaje expuestas a NaCl, sugiere que Snf1p juega un papel principal en la fosforilación de Crz1p. En consonancia con esto, la actividad β-galactosidasa fue indiferente a la exposición a NaCl en células del mutante *snf1Δ*. No se puede descartar, que Snf1p sea un regulador de la actividad de Hrr25p y quizás de otras proteínas quinasas no identificadas hasta el momento implicadas en esta cascada de señalización.

En conjunto, los resultados descritos podían hacer pensar que el fenotipo de mayor tolerancia a sal observado en un mutante *snf1Δ*, podía ser el resultado del aumento de la expresión de genes regulados por Crz1p. Aunque, es obvio que esta alteración debe contribuir al fenotipo mostrado, nuestros resultados sugieren la existencia de mecanismos adicionales. En efecto, la sobreexpresión de cualquiera de las subunidades β de Snf1p o del gen *TdSIP1* incrementó en condiciones de estrés iónico, la expresión dirigida por el promotor sintético 4xCDRE en una forma similar a la observada para el mutante *snf1Δ*. Este resultado es consistente con la inhibición de la actividad proteína quinasa de Snf1p o de su importación al núcleo, descrita para células que sobreexpresan el gen *SIP2* (Vincent y col., 2001). Sin embargo, la expresión en un alto número de copias de cualquiera de estos genes no alteró la tolerancia a sal de *S. cerevisiae*.

Una evidencia de que Snf1p participa en la regulación de mecanismos adicionales de respuesta a sal, fue la observación de que la sobreexpresión del gen truncado *TdSIP1-t* confería una ventaja de crecimiento en estas condiciones. Como en el caso de *SIP2* (Vincent y col., 2001), la expresión en un alto número de copias de este gen, inhibió la actividad de Snf1p en respuesta a la ausencia de glucosa e incrementó la expresión dirigida por el

Discusión

promotor 4xCDRE. Sin embargo, sólo la sobreexpresión de *TdSIP1-t* confirió un fenotipo en sal similar al observado en un mutante *snf1Δ*. Además, este efecto fue totalmente dependiente de la presencia de una proteína Snf1p funcional. Así, la proteína TdSip1-t parece alterar de un modo específico la actividad de Snf1p hacia substratos independientes de la ruta calcineurina-Crz1p. En consonancia con esto, la expresión en un alto número de copias del gen truncado de *T. delbrueckii* incrementó la tolerancia a NaCl de los mutantes sencillos *crz1Δ* y *cnb1Δ* o de células de la cepa salvaje tratadas con FK506, un inmunodepresor que inhibe la señal dependiente de Ca^{2+} (Foor y col., 1992).

Ganster y col. (1998) han identificado una ruta independiente de calcineurina requerida para la respuesta a estrés iónico. Elementos implicados en esta nueva ruta de transducción de la señal son los sensores de glucosa Snf3p y Rgt2p, además de Std1p, una proteína implicada en el proceso de represión por glucosa (Kuchin y col., 2003). Curiosamente, la sobreexpresión de *STD1* tiene efectos en la respuesta a estrés salino similares a los observados para *TdSIP1-t*. Así, el aumento en el número de copias de este gen confiere un fenotipo de mayor tolerancia a sal, independiente de Cnb1p o Crz1p, e incrementa el nivel de expresión de *HAL1* respecto al observado en una cepa salvaje (Kuchin y col., 2003). Además, induce la expresión en ausencia de estrés, del gen chivato *lacZ* controlado por el promotor de *ENAI*, el cual contiene, al menos, un elemento CDRE funcional (Mendizábal y col., 1998). Finalmente, la sobreexpresión de *STD1* altera la actividad de Snf1p en condiciones normales de crecimiento (Kuchin y col., 2003).

A pesar de estas similitudes, *STD1* no guarda homología con *TdSIP1-t*. Además, existen diferencias importantes en los efectos de ambas proteínas sobre la actividad de Snf1p. En efecto, *STD1/MSN3* fue aislado como un

supresor en multicopia del defecto de crecimiento en rafinosa de un mutante *snf4Δ* (Hubbard y col., 1994). Sin embargo, la sobreexpresión de *TdSIP1-t* no revierte el fenotipo de este mutante (datos no mostrados). Además, la expresión en un alto número de copias de *STD1* incrementa la actividad de Snf1p en glucosa (Ganster y col., 1998), mientras que como se describe en este trabajo, la expresión de *TdSIP1-t* disminuye drásticamente la actividad quinasa en otras fuentes de carbono, pero no la altera en glucosa. Así, podemos especular que ambas proteínas interactúan con Snf1p en una forma no idéntica, pero que determina en los dos casos una alteración de dianas de respuesta a sal reguladas por Snf1p. En este sentido, la expresión de la proteína recombinante TdSip1-t podría ser utilizada como una herramienta molecular para identificar funciones de Snf1p en estrés iónico.

Como demostró el análisis de la expresión global, la expresión en un alto número de copias de *TdSIP1-t* alteró respecto a la cepa salvaje, el nivel de mRNA de 412 genes en respuesta a NaCl. Aunque, la asignación del fenotipo observado a variaciones en la expresión de un gen o genes concretos resultó imposible, se pudo apreciar una serie de tendencias que nos permite implicar, en el fenotipo observado, a rutas de señalización de estrés osmótico, como por ejemplo la ruta HOG. Si estos cambios obedecen a una alteración por TdSip1-t de la actividad Snf1p, los mismos implicarían que la proteína quinasa tiene funciones mucho más amplias de las descritas hasta ahora, regulando múltiples procesos y funciones que contribuyen a la capacidad de *S. cerevisiae* para hacer frente y adaptar su crecimiento a condiciones de estrés iónico.

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo y su discusión posterior, han permitido extraer las siguientes conclusiones:

Se han secuenciado, identificado y caracterizado, de forma parcial o total, doce genes de *T. delbrueckii*, que suponen en torno a 15 Kb del genoma de esta levadura y se han construido mutantes Leu⁻ en dos cepas de interés tecnológico.

El análisis filogenético de las proteínas Leu2 e His3 de diferentes levaduras y el estudio del orden y orientación transcripcional en estas regiones cromosómicas, indican que *T. delbrueckii* está estrechamente relacionada a especies del complejo *Saccharomyces*, en particular a *Zygosaccharomyces rouxii* y *Saccharomyces kuyveri*, con las que forma un grupo monofilético separado del denominado *Saccharomyces sensu stricto*.

T. delbrueckii es un modelo útil para la identificación de genes, como *DED1*, implicados en tolerancia a estrés iónico en *S. cerevisiae*. La homología entre proteínas reguladoras, como *SIP1*, de ambos organismos es menor que la observada entre proteínas esenciales, sugiriendo que estas diferencias podrían estar en la base del comportamiento de estas levaduras ante un estrés iónico.

La proteína quinasa Snf1 es un regulador negativo de la tolerancia a concentraciones moderadas de NaCl en *S. cerevisiae*. Este efecto es enmascarado en mutantes auxotróficos, sugiriendo también un papel funcional de esta proteína en el transporte de aminoácidos y/o bases nitrogenadas.

La actividad quinasa de Snf1p no se altera en respuesta a un estrés por NaCl. Ya que la regulación al alza de esta actividad implica su importación al núcleo en condiciones de desrepresión, este resultado sugiere que Snf1p tiene una función citosólica.

Snf1p, impide la inadecuada activación de genes regulados por elementos CDRE en condiciones normales de crecimiento y controla la magnitud de la inducción transcripcional en células expuestas a NaCl. Este resultado sugiere una implicación, directa o indirecta, de Snf1p en el nivel de fosforilación y localización subcelular de Crz1p.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe A, Hiraoka Y y Fukasawa T. 1990. Signal sequence for generation of mRNA 3' end in the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL7* gene. *EMBO J* 9:3691-3697.
- Adams J, Puskas-Rozsa S, Simlar J y Wilke CM. 1992. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22:13-19.
- Agaphonov MO, Poznyakovski AI, Bogdanova AI y Ter-Avanesyan MD. 1994. Isolation and characterization of the *LEU2* gene of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 10:509-513.
- Alepuz PM, Cunningham KW y Estruch F. 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* 26:91-98.
- Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V y Ammerer G. 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 7:767-777.
- Alifano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS y Bruni CB. 1996. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* 60:44-69.
- Aller-Arrenz E, Randez-Gil F, Barrio E y Prieto JA. 2003. A DNA region of *Torulaspota delbrueckii* containing the *HIS3* gene: sequence, gene order and evolution. *Yeast* 20:1359-1368.
- Almeida MJ y Pais C. 1996a. Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Appl Environ Microbiol* 62:4401-4404.
- Almeida MJ y Pais CS. 1996b. Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Lett Appl Microbiol* 23:154-158.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Amberg DC, Botstein D y Beasley EM. 1995. Precise gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* by double fusion polymerase chain reaction. *Yeast* 11:1275-1280.
- Ashrafi K, Lin SS, Manchester JK y Gordon JI. 2000. Sip2p and its partner Snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 14:1872-1885.
- Attfield PV. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol* 15:1351-1357.
- Avendano A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L y Gonzalez A. 1997. *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179:5594-5597.
- Baquero C, Montero M, Sentandreu R y Valentin E. 2001. Molecular cloning of the *RPS0* gene from *Candida tropicalis*. *Yeast* 18:971-980.

Bibliografía

- Balciunas D y Ronne H. 1999. Yeast genes *GIS1-4*: multicopy suppressors of the Gal-phenotype of *snf1 mig1 srb8/10/11* cells. *Mol Gen Genet* 262(4-5):589-99.
- Bardwell L, Cook JG, Inouye CJ y Thorner J. 1994. Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev Biol* 166:363-379.
- Beck T y Hall MN. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402:689-692.
- Beeler T, Gable K, Zhao C y Dunn T. 1994. A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269:7279-7284.
- Bell M, Capone R, Pashtan I, Levitzki A y Engelberg D. 2001. Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation. *J Biol Chem* 276:25351-25358.
- Belloch C, Querol A, Garcia MD y Barrio E. 2000. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 1:405-416.
- Benito B, Quintero FJ y Rodriguez-Navarro A. 1997. Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and Pi. *Biochim Biophys Acta* 1328:214-226.
- Bergkamp RJ, Geerse RH, Verbakel JM, Musters W y Planta RJ. 1991. Cloning and disruption of the *LEU2* gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Yeast* 7:963-970.
- Betz C, Zajonc D, Moll M y Schweizer E. 2002. ISC1-encoded inositol phosphosphingolipid phospholipase C is involved in Na⁺/Li⁺ halotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 269:4033-4039.
- Beudeker RF, Van Dam HM, Van Der Plaats JB y Vellenga K. 1990. Developments in baker's yeast production., pp. 103-146. En: *Yeast Biotechnology Biocatalysis*. Verachert H, De Mot R (eds). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Birnboim HC y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bloem LJ y Yu L. 1990. A time-saving method for screening cDNA or genomic libraries. *Nucleic Acids Res* 18:2830.
- Blondel M, Alepuz PM, Huang LS, Shaham S, Ammerer G y Peter M. 1999. Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev* 13:2284-2300.
- Boustany LM y Cyert MS. 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev* 16:608-619.

- Bro C, Regenbreg B, Lagniel G, Labarre J, Montero-Lomeli M y Nielsen J. 2003. Transcriptional, proteomic, and metabolic responses to lithium in galactose-grown yeast cells. *J Biol Chem* 278:32141-32149.
- Broude NE, Modyanov NN, Monastyrskaya GS y Sverdlov ED. 1989. Advances in Na⁺, K⁺-ATPase studies: from protein to gene and back to protein. *FEBS Lett* 257:1-9.
- Carlson M, Osmond BC, Neigeborn L y Botstein D. 1984. A suppressor of *SNF1* mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics* 107:19-32.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES y Young RA. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12:323-337.
- Chamot D, Magee WC, Yu E y Owtrim GW. 1999. A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *J Bacteriol* 181:1728-1732.
- Chamot D y Owtrim GW. 2000. Regulation of cold shock-induced RNA helicase gene expression in the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 182:1251-1256.
- Charron MJ, Dubin RA y Michels CA. 1986. Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6:3891-3899.
- Chen W y Struhl K. 1985. Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA element. *EMBO J* 4:3273-3280.
- Chuang RY, Weaver PL, Liu Z y Chang TH. 1997. Requirement of the DEAD-Box protein Ded1p for messenger RNA translation. *Science* 275:1468-1471.
- Ciriacy M. 1979. Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 176:427-431.
- Codon AC, Benitez T y Korhola M. 1997. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr Genet* 32:247-259.
- Codon AC, Benitez T y Korhola M. 1998. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:154-163.
- Colantuoni C, Henry G, Zeger S y Pevsner J. 2002. SNOMAD (Standardization and Normalization of MicroArray Data): web-accessible gene expression data analysis. *Bioinformatics* 18:1540-1541.
- Cosano I, Alvarez P, Molina M y Nombela C. 1998. Cloning and sequence analysis of the *Pichia pastoris* *TRP1*, *IPP1* and *HIS3* genes. *Yeast* 14:861-867.

Bibliografía

Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D y Thorner J. 1991. Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7376-7380.

Cyert MS y Thorner J. 1992. Regulatory subunit (*CNBI* gene product) of yeast Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol Cell Biol* 12:3460-3469.

Danielsson A, Larsson C, Larsson K, Gustafsson L y Adler L. 1996. A genetic analysis of the role of calcineurin and calmodulin in Ca^{++} -dependent improvement of NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 30:476-484.

de Jesús Ferreira MC, Bao X, Laize V y Hohmann S. 2001. Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr Genet* 40:27-39.

de la Cruz J, Kressler D y Linder P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* 24:192-198.

de la Rosa JM, Perez JA, Gutierrez F, Gonzalez JM, Ruiz T y Rodriguez L. 2001. Cloning and sequence analysis of the *LEU2* homologue gene from *Pichia anomala*. *Yeast* 18:1441-1448.

de Vit MJ, Waddle JA y Johnston M. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* 8:1603-1618.

de Winde JH, Crauwels M, Hohmann S, Thevelein JM y Winderickx J. 1996. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur J Biochem* 241:633-643.

de Nadal E, Alepuz PM y Posas F. 2002. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* 3:735-740.

de Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G y Posas F. 2004. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmo-responsive genes. *Nature* 427:370-374.

decottignies A, Sanchez-Perez I y Nurse P. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study. *Genome Res* 13:399-406.

Deluna A, Avendano A, Riego L y González A. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276:43775-43783.

Dequin S. 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:577-588.

De Vit MJ y Johnston M. 1999. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 9:1231-1241.

- Dunbar DA, Dragon F, Lee SJ y Baserga SJ. 2000. A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13027-13032.
- Eisenberg E y Levanon EY. 2003. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 19:362-365.
- Elledge SJ y Davis RW. 1990. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* 4:740-751.
- Entian KD y Kötter P. (ed.). 1998. *Yeast gene analysis*, vol. 26. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Entian KD y Zimmermann FK. 1980. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 177:345-350.
- Esteve-Zarzoso B, Peris-Toran MJ, Garcia-Maiquez E, Uruburu F y Querol A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol* 67:2056-2061.
- Estruch F y Carlson M. 1990. Increased dosage of the *MSN1* gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the Snf1 protein kinase. *Nucleic Acids Res* 18:6959-6964.
- Estruch F y Carlson M. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13:3872-3881.
- Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469-486.
- Evans IH. 1990. Yeast strains for baking, pp. 13-45. En *yeast technology*. Spencer JFT and Spencer DM (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Feinberg AP y Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Feinberg AP y Vogelstein B. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137:266-267.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H y Silver PA. 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin beta homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO J* 17:5606-5614.
- Foor F, Parent SA, Morin N, Dahl AM, Ramadan N, Chrebet G, Bostian KA y Nielsen JB. 1992. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature* 360:682-684.

Bibliografía

Frederick DL y Tatchell K. 1996. The *REG2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol Cell Biol* 16:2922-2931.

Friden P y Schimmel P. 1987. *LEU3* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a factor for control of RNA levels of a group of leucine-specific genes. *Mol Cell Biol* 7:2708-2717.

Friedman R y Hughes AL. 2001. Pattern and timing of gene duplication in animal genomes. *Genome Res* 11:1842-1847.

Gaber RF. 1992. Molecular genetics of yeast ion transport. *Int Rev Cytol* 137:299-353.

Gancedo JM. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:334-361.

Ganster RW, McCartney RR y Schmidt MC. 1998. Identification of a calcineurin-independent pathway required for sodium ion stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150:31-42.

García-Gimeno MA y Struhl K. 2000. *Aca1* and *Aca2*, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. *Mol Cell Biol* 20:4340-4349.

Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Banuelos MA, Haro R y Rodriguez-Navarro A. 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 236:363-368.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D y Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11:4241-4257.

Gaxiola R, de Larrinoa IF, Villalba JM y Serrano R. 1992. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J* 11:3157-3164.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B y col. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387-391.

Gietz RD y Sugino A. 1988. New yeast *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74:527-534.

Goldstein AL y McCusker JH. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1541-1553.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP y Blinov VM. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17:4713-4730.

- Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H y Schuller C. 1998. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12:586-597.
- Gorbalenya AE y Koonin E V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct Biol* 3: 419-429.
- Grishin AV, Rothenberg M, Downs MA y Blumer KJ. 1998. Mot3, a Zn finger transcription factor that modulates gene expression and attenuates mating pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149:879-892.
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M y Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1264-1300.
- Hahn YS y Kawai H. 1990. Isolation and characterization of freeze tolerant yeasts from nature available from frozen-dough method. *Agric Biol Chem* 54:829-831.
- Haro R, Garciadeblas B y Rodriguez-Navarro A. 1991. A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291:189-191.
- Hedbacker K, Hong SP y Carlson M. 2004. Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase. *Mol Cell Biol* 24:8255-8263.
- Hedges D, Proft M y Entian KD. 1995. *CAT8*, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15:1915-1922.
- Hellauer K, Rochon MH y Turcotte B. 1996. A novel DNA binding motif for yeast zinc cluster proteins: the Leu3p and Pdr3p transcriptional activators recognize everted repeats. *Mol Cell Biol* 16:6096-6102.
- Hernández-López MJ, Prieto JA y Ráñez-Gil F. 2002. Isolation and characterization of the gene *URA3* encoding the orotidine-5'-phosphate decarboxylase from *Torulaspora delbrueckii*. *Yeast* 19:1431-1435.
- Hernández-López MJ, Prieto JA y Ráñez-Gil F. 2003a. Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84:125-134.
- Hernández-López MJ, Blasco A, Prieto JA, Ráñez-Gil F. 2003b. Ura⁻ host strains for genetic manipulation and heterologous expression of *Torulaspora delbrueckii*. *Int J Food Microbiol* 86:79-86.
- Herrero J, Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J y Dopazo J. 2003. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3461-3467.
- Higgins VJ, Braidwood M, Bell P, Bissinger P, Dawes IW y Attfield PV. 1999. Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed by

Bibliografía

MALx3-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. *Appl Environ Microbiol* 65:680-685.

Higgins VJ, Bell PJ, Dawes IW y Attfield PV. 2001. Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. *Appl Environ Microbiol* 67:4346-4348.

Hinnebusch AG y Natarajan K. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* 1:22-32.

Hoffman CS y Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.

Hohmann S. 1997. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. En: "Yeast Stress Responses". Hohmann S y Mager WH (eds). Springer. New York, N.Y. pp101-146.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372.

Hsu YP y Kohlhaw GB. 1980. Leucine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of beta-isopropylmalate dehydrogenase. *J Biol Chem* 255:7255-7260.

Hubbard EJ, Jiang R y Carlson M. 1994. Dosage-dependent modulation of glucose repression by *MSN3 (STD1)* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14:1972-1978.

Huxley C, Green ED y Dunham I. 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet* 6:236.

Iost I, Dreyfus M y Linder P. 1999. Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* 274:17677-17683.

Jacoby T, Flanagan H, Faykin A, Seto AG, Mattison C y Ota I. 1997. Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* 272:17749-17755.

James SA, Collins MD y Roberts IN. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *Int J Syst Bacteriol* 46:189-194.

James SA, Cai J, Roberts IN y Collins MD. 1997. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:453-460.

- Jiang B y Cyert MS. 1999. Identification of a novel region critical for calcineurin function in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 274:18543-18551.
- Jiang R y Carlson M. 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast *SNF1* protein kinase complex. *Genes Dev* 10:3105-3115.
- Jiang R y Carlson M. 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* 17:2099-2106.
- Jones PG y Inouye M. 1996. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol Microbiol* 21:1207-1218.
- Kafadar KA, Zhu H, Snyder M y Cyert MS. 2003. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev* 17:2698-2708.
- Kafadar KA y Cyert MS. 2004. Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell* 3:1147-1153.
- Kaffman A, Rank NM, O'Neill EM, Huang LS y O'Shea EK. 1998. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 396:482-486.
- Kawai M, Nakashima A, Ueno M, Ushimaru T, Aiba K, Doi H y Uritani M. 2001. Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet* 39:166-174.
- Keleher CA, Redd MJ, Schultz J, Carlson M y Johnson AD. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68:709-719.
- Keogh RS, Seoighe C y Wolfe KH. 1998. Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14:443-457.
- Kuchin S, Treich I y Carlson M. 2000. A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7916-7920.
- Kuchin S, Vyas VK, Kanter E, Hong SP y Carlson M. 2003. Std1p (Msn3p) positively regulates the Snf1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163:507-514.
- Kuno T, Tanaka H, Mukai H, Chang CD, Hiraga K, Miyakawa T y Tanaka C. 1991. cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1159-1163.
- Kurtzman CP. 1998. *Torulaspora* Lidner. En Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts. A taxonomic study*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 404-408.
- Kurtzman CP y Robnett CJ. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371.

Bibliografía

- Kurtzman CP y Robnett CJ. 2003b. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* 3:417-432.
- Langkjaer RB, Nielsen ML, Daugaard PR, Liu W y Piskur J. 2000. Yeast chromosomes have been significantly reshaped during their evolutionary history. *J Mol Biol* 304:271-288.
- Lercher MJ, Urrutia AO y Hurst LD. 2002. Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nat Genet* 31:180-183.
- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D y Dancis A. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* 274:33025-33034.
- Lim J, Thomas T y Cavicchioli R. 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J Mol Biol* 297:553-567.
- Lin SS, Manchester JK y Gordon JI. 2003. Sip2, an N-myristoylated beta subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *J Biol Chem* 278:13390-13397.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J y Slonimski PP. 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121-122.
- Linko Y-Y, Javanainen P y Linko S. 1997. Biotechnology of breadbaking. *Trends Food Sci Technol* 8:339-344.
- Liu HY, Nefsky BS y Walworth NC. 2002. The Ded1 DEAD box helicase interacts with Chk1 and Cdc2. *J Biol Chem* 277:2637-2643.
- Liu Y, Ishii S, Tokai M, Tsutsumi H, Ohki O, Akada R, Tanaka K, Tsuchiya E, Fukui S y Miyakawa T. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol Gen Genet* 227:52-59.
- Lu P, Davis BP, Hendrick J y Jeffries TW. 1998. Cloning and disruption of the beta-isopropylmalate dehydrogenase gene (*LEU2*) of *Pichia stipitis* with *URA3* and recovery of the double auxotroph. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:141-146.
- Ludin K, Jiang R y Carlson M. 1998. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6245-6250.
- Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO y Johnston M. 1998. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150:1377-1391.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM y Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369:242-245.

- Maeda T, Takekawa M y Saito H. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269:554-558.
- Mahadevan S, Raghunand TR, Panicker S y Struhl K. 1997. Characterisation of 3' end formation of the yeast *HIS3* mRNA. *Gene* 190:69-76.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Weese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ y col. 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res* 31:383-387.
- Marquez JA y Serrano R. 1996. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* 382:89-92.
- Marquez JA, Pascual-Ahuir A, Proft M y Serrano R. 1998. The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J* 17:2543-2553.
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H y Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15:2227-2235.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US y Cunningham KW. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11:3445-3458.
- Mattison CP y Ota IM. 2000. Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* 14:1229-1235.
- McCartney RR y Schmidt MC. 2001. Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276:36460-36466.
- Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R y De Larrinoa I. 1998. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* 425:323-328.
- Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Serrano R y De Larrinoa I. 2001. Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENAI* gene. *Mol Genet Genomics* 265:801-811.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A y Pardo JM. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269:8792-8796.
- Monfort A, Blasco A, Prieto JA y Sanz P. 1997. Construction of Baker's Yeast Strains that Secrete Different Xylanolytic Enzymes and their use in Bread Making. *J Cereal Science* 26: 195-199.

Bibliografía

Monfort A, Blasco A, Sanz P y Prieto JA. 1999. Expression of *LIP1* and *LIP2* genes from *Geotrichum* species in Baker's yeast strains and their application to the bread-making process. *J Agric Food Chem* 47:803-808.

Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S, Hirokawa T y Miyakawa T. 1993. Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* 12:4063-4071.

Nass R y Rao R. 1999. The yeast endosomal Na^+/H^+ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology* 145:3221-3228.

Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG y Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21:4347-4368.

Nehlin JO y Ronne H. 1990. Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J* 9:2891-2898.

Neigeborn L y Carlson M. 1984. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108:845-858.

Nelson CE, Hersh BM y Carroll SB. 2004. The regulatory content of intergenic DNA shapes genome architecture. *Genome Biol* 5:R25.

Norbeck J y Blomberg A. 1998. Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol Lett* 158:121-126.

O'Rourke SM y Herskowitz I. 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 12:2874-2886.

O'Rourke SM y Herskowitz I. 2002. A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol* 22:4739-4749.

Oda Y y Tonomura K. 1993. Selection of a novel baking strain from the *Torulaspora* yeasts. *Biosci Biotech Biochem* 57:1320-1322.

Oda Y y Tonomura K. 1995. Electrophoretic karyotyping of the yeast genus *Torulaspora*. *Lett Appl Microbiol* 21:190-193.

Oda Y, Yabuki M, Tonomura K y Fukunaga M. 1997. A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions. *Yeast* 13:1243-1250.

Ohlmeier S, Kastaniotis AJ, Hiltunen JK y Bergmann U. 2004. The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem* 279:3956-3979.

- Oliver G y Tuite F. 1991. Biotechnology hand books – 4. Tuite MF y Oliver SG (eds). Plenum Press. New York and London.
- Ostling J y Ronne H. 1998. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur J Biochem* 252:162-168.
- Polizotto RS y Cyert MS. 2001. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol* 154:951-960.
- Posas F y Saito H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276:1702-1705.
- Posas F y Saito H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 17:1385-1394.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, De Nadal E y Arino J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275:17249-17255.
- Proft M y Serrano R. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 19:537-546.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, De Nadal E, Arino J, Serrano R y Posas F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20:1123-1133.
- Proft M y Struhl K. 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* 9:1307-1317.
- Qian J, Lin J, Luscombe NM, Yu H y Gerstein M. 2003. Prediction of regulatory networks: genome-wide identification of transcription factor targets from gene expression data. *Bioinformatics* 19:1917-1926.
- Raitt DC, Posas F y Saito H. 2000. Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* 19:4623-4631.
- Rández-Gil F, Prieto JA, Murcia A y Sanz P. 1995. Construction of Baker's Yeast Strains that Secrete *Aspergillus oryzae* Alpha-amylase and their Use in Bread Making. *J Cereal Science* 21:185-193
- Rández-Gil F, Bojunga N, Proft M y Entian KD. 1997. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol Cell Biol* 17:2502-2510.
- Rández-Gil F, Sanz P y Prieto JA. 1999. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol* 17:237-244.

Bibliografía

Rández-Gil F, Aguilera J, Codón A, Rincón AM, Estruch F y Prieto JA. 2003. Baker's yeast: challenges and future prospects. En: *Functional Genetics of Industrial Yeast*. De Winde JH (ed). *Topics in Current Genetics*. Elsevier. Springer-Verlag, Heidelberg. pp. 57-85.

Ratzkin B y Carbon J. 1977. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:487-491.

Reed G y Nagodawithana TW. 1991. *Yeast technology*. Nostrand Reinhold, New York.

Reiser V, Ruis H y Ammerer G. 1999. Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10:1147-1161.

Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G y Ruis H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* 19:5474-5485.

Rep M, Krantz M, Thevelein JM y Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275:8290-8300.

Rios G, Ferrando A y Serrano R. 1997. Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the *HAL1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:515-528.

Robzyk K y Kassir Y. 1992. A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* 20:3790.

Rocak S y Linder P. 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:232-241.

Rodrigues F, Zeeman AM, Alves C, Sousa MJ, Steensma HY, Corte-Real M y Leao C. 2001. Construction of a genomic library of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* and isolation of the beta-isopropylmalate dehydrogenase gene (*ZbLEU2*). *FEMS Yeast Res* 1:67-71.

Rolland F, Winderickx J y Thevelein JM. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26:310-317.

Rusnak F y Mertz P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.

Russo P, Li WZ, Hampsey DM, Zaret KS y Sherman F. 1991. Distinct cis-acting signals enhance 3' endpoint formation of *CYCI* mRNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 10:563-571.

Sahara T, Goda T y Ohgiya S. 2002. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem* 277:50015-50021.

- Saitou N y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (New York).
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Schmidt MC, McCartney RR, Zhang X, Tillman TS, Solimeo H, Wolfi S, Almonte C y Watkins SC. 1999. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:4561-4571.
- Schmidt MC y McCartney RR. 2000. beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J* 19:4936-4943.
- Serrano R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* 165:1-52.
- Sharp PM y Wolfe KH. 1993. Identification of a *Candida utilis* gene encoding ribosomal protein L7: evidence for two divergent subclasses of the eukaryotic ribosomal protein L7 family. *Nucleic Acids Res* 21:3577.
- Sherman F, Fink GR y Hicks JB. 1995. *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (New York).
- Smith DL, Tao T y Maguire ME. 1993. Membrane topology of a P-type ATPase. The MgtB magnesium transport protein of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 268:22469-22479.
- Smith FC, Davies SP, Wilson WA, Carling D y Hardie DG. 1999. The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. *FEBS Lett* 453:219-223.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ y Cyert MS. 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* 13:798-803.
- Stathopoulos AM y Cyert MS. 1997. Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* 11:3432-3444.
- Struhl K. 1982. The yeast his3 promoter contains at least two distinct elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7385-7389.
- Struhl K. 1985a. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast pet56-his3-ded1 gene region. *Nucleic Acids Res* 13:8587-8601.

Bibliografía

Struhl K. 1985b. Negative control at a distance mediates catabolite repression in yeast. *Nature* 317:822-824.

Sychrova H, Braun V y Souciet JL. 2000. Sequence and organization analyses of a *Zygosaccharomyces rouxii* DNA fragment containing the *HIS3* gene. *Yeast* 16:581-587.

Sychrova H. 2001. Molecular cloning and sequence analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* *LEU2* gene encoding a beta-isopropylmalate dehydrogenase. *Yeast* 18:989-994.

Takita Y, Ohya Y y Anraku Y. 1995. The *CLS2* gene encodes a protein with multiple membrane-spanning domains that is important Ca^{2+} tolerance in yeast. *Mol Gen Genet* 246:269-281.

Tanner NK y Linder P. 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8:251-262.

Tedford K, Kim S, Sa D, Stevens K y Tyers M. 1997. Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr Biol* 7:228-238.

Thevelein JM. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* 10:1753-1790.

Tillman TS, Ganster RW, Jiang R, Carlson M y Schmidt MC. 1995. *STD1* (*MSN3*) interacts directly with the TATA-binding protein and modulates transcription of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23:3174-3180.

Tomas-Cobos L, Casadome L, Mas G, Sanz P y Posas F. 2004. Expression of the *HXT1* low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signalling pathways. *J Biol Chem* 279:22010-22019.

Treitel MA y Carlson M. 1995. Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3132-3136.

Treitel MA, Kuchin S y Carlson M. 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18:6273-6280.

Tsuji E, Tsuji Y, Misumi Y, Fujita A, Sasaguri M, Ideishi M y Arakawa K. 1996. Molecular cloning of a novel rat salt-tolerant protein by functional complementation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 229:134-138.

Tu H y Casadaban MJ. 1990. The upstream activating sequence for L-leucine gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18:3923-3931.

Tu J y Carlson M. 1994. The *GLC7* type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14:6789-6796.

Tu J y Carlson M. 1995. *REG1* binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:5939-5946.

- Tzamarias D y Struhl K. 1995. Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev* 9:821-831.
- van HP, van Dijken JP y Pronk JT. 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 26:724-736.
- van Wuytswinkel O, Reiser V, Siderius M, Kelders MC, Ammerer G, Ruis H y Mager WH. 2000. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* 37:382-397.
- Varanasi US, Klis M, Mikesell PB y Trumbly RJ. 1996. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol Cell Biol* 16:6707-6714.
- Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ y Mager WH. 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 15:6232-6245.
- Vaughan-Martin A y Martini A. 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. En Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts. A taxonomic study*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 358-371.
- Veiga-Crespo P, Poza M, Prieto-Alcedo M y Villa TG. 2004. Ancient genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150:2221-2227.
- Vincent O y Carlson M. 1998. Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J* 17:7002-7008.
- Vincent O y Carlson M. 1999. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J* 18:6672-6681.
- Vincent O, Townley R, Kuchin S y Carlson M. 2001. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15:1104-1114.
- Volland C, Galan JM, Urban-Grimal D, Devilliers G y Haguenuer-Tsapis R. 1994. Endocytose and degradation of the uracil permease of *S. cerevisiae* under stress conditions: possible role of ubiquitin. *Folia Microbiol (Praha)* 39:554-557.
- Vyas VK, Kuchin S, Berkey CD y Carlson M. 2003. Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol Cell Biol* 23:1341-1348.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R y Philippsen P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793-1808.

Bibliografía

Walsh DW, Wolfe KH y Butler G. 2002b. Genomic differences between *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* around the *MRPL28* and *GCN3* loci. *Yeast* 19:991-994.

Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D y Ota I. 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 21:51-60.

Weinstock KG y Strathern JN. 1993. Molecular genetics in *Saccharomyces kluyveri*: the *HIS3* homolog and its use as a selectable marker gene in *S. kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9:351-361.

Wieland J, Nitsche AM, Strayle J, Steiner H y Rudolph HK. 1995. The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14:3870-3882.

Wolfe J y Bryant G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology* 39:103-129.

Wolfe KH y Shields DC. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708-713.

Wong S, Butler G y Wolfe KH. 2002. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9272-9277.

Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA y Saito H. 1997. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* mitogen-activated protein kinase by the *PTP2* and *PTP3* protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* 17:1289-1297.

Yale J y Bohnert HJ. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem* 276:15996-16007.

Yang X, Hubbard EJ y Carlson M. 1992. A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257:680-682.

Yang X, Jiang R y Carlson M. 1994. A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast *SNF1* protein kinase complex. *EMBO J* 13:5878-5886.

Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO y Cyert MS. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:31079-31088.

Young C, Mapes J, Hanneman J, Al-Zarban S y Ota I. 2002. Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot Cell* 1:1032-1040.

Zaret KS y Sherman F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* 28:563-573.

Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M y Snyder M. 2001. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293:2101-2105.

Zimmermann FK, Kaufmann I, Rasenberger H y Haubetamann P. 1977. Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. *Mol Gen Genet* 151:95-103.

