



Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular

**Caracterización de la ruta de señalización de la
quinasa SNF1 y su relación con otras vías de
señalización en la levadura *Kluyveromyces lactis***

TESIS DOCTORAL

Lucía Mojardín Menéndez

OVIEDO, 2015

**RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL**

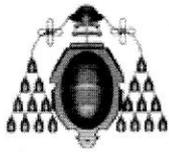
1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: CARACTERIZACION DE LA RUTA DE SEÑALIZACION DE LA QUINASA SNF1 Y SU RELACION CON OTRAS VIAS DE SEÑALIZACION EN LA LEVADURA KLUYVEROMYCES LACTIS	Inglés: : CHARACTERIZATION OF THE SNF1 PATHWAY AND CROSSTALK WITH OTHER SIGNALING PATHWAYS IN THE YEAST <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i>
2.- Autor	
Nombre: LUCIA MOJARDIN MENENDEZ	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: Biología Funcional y Molecular	
Órgano responsable: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR	

RESUMEN (en español)

La represión por glucosa afecta a la expresión de los genes que participan en la utilización de otras fuentes alternativas de carbono y energía. En levaduras, el elemento clave de la ruta de represión por glucosa es el complejo de la proteína quinasa SNF1. Snf1 pertenece a una familia de serina/treonina proteínas quinasas, muy conservadas en todos los organismos eucariotas, cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis celular. Además esta quinasa participa en otras rutas de señalización que permiten a las células adaptarse a diferentes situaciones de estrés. En este trabajo se ha estudiado la regulación por fuente de carbono de la ruta de señalización SNF1 utilizando como modelo la levadura *Kluyveromyces lactis*.

En la primera parte del presente trabajo hemos caracterizado el complejo KISNF1 y cómo actúa sobre los factores de transcripción KICat8 y KISip4. Para ello se han analizado mutantes y se ha estudiado la regulación y localización subcelular de los componentes en presencia de diferentes fuentes de carbono. Encontramos que una fracción de la quinasa Snf1 está activada y presente en el núcleo en células crecidas en etanol pero también bajo condiciones de represión. En esta última condición las subunidades β y γ permanecen citosólicas. Se ha estudiado como tiene lugar la activación de la ruta identificando dominios y aminoácidos esenciales en la quinasa Snf1 y de los dos factores de transcripción. También se ha estudiado la especificidad de KICat8 y KISip4 por los elementos CSRE reguladores de los promotores de los genes que regulan, encontrando que reconocen variantes diferentes. Esto puede explicar por qué ambos factores son esenciales para la utilización de etanol en esta levadura. Finalmente, se han caracterizado las quinasas y la fosfatasa responsables de la activación y desactivación del complejo SNF1 en esta levadura.

En la segunda parte del trabajo hemos estudiado la función del gen *KIGPD1* que codifica la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (KIGpd1). Este enzima pertenece a la ruta de síntesis de glicerol y participa en el mantenimiento del balance redox y en la respuesta celular en condiciones de estrés osmótico. KIGpd1 es esencial durante el crecimiento en etanol y al estudiar a qué nivel actúa hemos encontrado que regula la activación del factor KISip4 de la ruta de señalización de la quinasa KISNF1. Hemos encontrado que además KIGpd1 regula la expresión de genes que participan en el mantenimiento del balance redox como *KIADH3*. También hemos investigado la activación de la síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico y su dependencia de la MAP quinasa Hog1. En relación a la regulación de KIGpd1 hemos encontrado que el gen *KIGPD1* se expresa formando dos transcritos que codifican proteínas que difieren en su extremo N-terminal. Mediante el estudio de mutantes *in vitro* se han identificado y caracterizado las regiones importantes para la función y localización subcelular



del enzima encontrándose que presenta una doble localización citosólica y peroxisomal.

Finalmente, hemos demostrado que las cepas deficientes en la deshidrogenasa KIGpd1 desvían el metabolismo produciendo etanol, lo cual tiene repercusiones importantes desde el punto de vista biotecnológico.

RESUMEN (en Inglés)

Glucose repression regulates the expression of genes involved in the utilization of alternative carbon and energy sources. In yeasts, the key component in signaling glucose repression is the SNF1 protein kinase complex. Snf1 is a member of the family of serine/threonine protein kinases, which is highly conserved in all eukaryotes and basically ensures cellular homeostasis. In addition, this kinase contributes to other signaling pathways, allowing the cells to adapt to a variety of stress conditions. In this work the regulation of the SNF1 signaling pathway in response to the carbon source has been studied in the model yeast *Kluyveromyces lactis*.

In the first part of this thesis, we characterized the KISNF1 complex and its action on the transcription factors KICat8 and KISip4. For this purpose, mutants were employed to study the regulation and subcellular localization of the pathway components in the presence of different carbon sources. As expected we found that a fraction of the Snf1 kinase is activated and located in the nucleus in cells grown on ethanol but also under repression conditions. In the latter condition the β and γ subunits KISnf4 y KIGal83 remain cytosolic. Evidence for how the pathway is activated was obtained by the identification of protein domains and essential amino acids in the Snf1 kinase and the two transcriptional factors. Also, we demonstrated that KICat8 y KISip4 recognize different variants of the regulatory CSRE elements in the promoters of the genes under their control. This may explain why both KICat8 and Sip4 are essential for growth of *K. lactis* on non-fermentable carbon sources. Finally, the kinases and the phosphatase responsible for the activation and deactivation of the KISNF1 complex were characterized.

In the second part of this work, we studied the function of the *KIGPD1* gene, which encodes the NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase (KIGpd1). This enzyme belongs to the glycerol synthesis pathway and is involved in the maintenance of the redox balance and the cellular response to osmotic stress. KIGpd1 is essential for growth on ethanol and we revealed that it activates the transcription factor KISip4 in the KISNF1 kinase signaling pathway. We found that KIGpd1 regulates the expression of genes which also participate in the maintenance of the redox balance, such as *KIADH3*. We also investigated the activation of glycerol synthesis under osmotic stress conditions and its dependence on the MAP kinase Hog1. With regard to the regulation of KIGpd1 we found that the *KIGPD1* gene forms two different transcripts, encoding proteins which differ at their N-terminal ends. Using *in vitro* mutagenesis, regions important for the function and subcellular localization of the enzyme were identified and characterized, revealing its localization both in the cytosol and in peroxisomes.

Finally, we demonstrated that the strains lacking the KIGpd1 dehydrogenase redirected the metabolism into producing ethanol, with important consequences from a biotechnological point of view.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Los años que he empleado en realizar esta tesis me han permitido formarme no sólo como científico, sino también como persona. Por ambas cosas me gustaría agradecer a todos aquellos que me han ofrecido su apoyo y ayuda durante este tiempo, y que me gustaría que guardasen de mí un recuerdo tan bueno como yo de ellos.

A la Dra. Rosaura Rodicio y al Dr. Fernando Moreno por darme una oportunidad, por su confianza y por su constante ayuda.

A la Dra. Pilar Herrero por su disponibilidad, por su colaboración y por darme ánimos para continuar.

Al Dr. D. Jürgen Heinisch por habernos facilitado algunas de las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo, por sus consejos y por su ayuda.

A Montse por su constante ayuda, por sus consejos y sobre todo por las conversaciones hilarantes que mantenemos. A Ale por haberme ayudado desde el primer día que llegué al laboratorio y por seguir ayudándome, por todas las conversaciones científicas y no científicas en nuestros tea-times dentro y fuera del laboratorio, por su interminable paciencia y por preocuparse por mí. A David, Poly, Lucía y Eric por su ayuda y por haber hecho que las horas de laboratorio fueran más amenas. Sin vosotros no hubiera sido lo mismo.

A mi madre Amparo, por haberme transmitido sus valores, por la confianza que tiene en mí y por animarme a continuar adelante. A mi padre Eduardo por enseñarme que merece la pena sacrificarse para conseguir tus metas. A mis abuelos por todo lo que he aprendido de ellos. A mi abuela Ángeles por ser una persona tan positiva y darme siempre ánimos para continuar.

A mi hermana Laura por ser mi mejor amiga, por haberme transmitido el interés por la ciencia y por todas las experiencias que hemos compartido juntas y que nos quedan por compartir. Por sus sugerencias, consejos, discusiones científicas, por confiar en mí, por animarme y por ser como es.

A mis amigos por todos los buenos momentos compartidos, por su apoyo y comprensión. A mis compañeras de piso porque siempre me hacen reír con sus historias y por enseñarme que hay vida más allá de la Bioquímica. A mis profesores de inglés por su ayuda, por su paciencia y por aguantar estoicamente mis presentaciones.

A la universidad de Oviedo que me concedió la Beca que me ha permitido desarrollar este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	13
I. Ruta de señalización por glucosa de la quinasa Snf1 en <i>S. cerevisiae</i>	13
1. Características y regulación del complejo SNF1 de <i>S. cerevisiae</i>	14
2. Utilización de fuentes de carbono fermentables: represión por glucosa del gen <i>SUC2</i> por la ruta SNF1-Hxk2-Mig1	16
3. Utilización de fuentes de carbono no fermentables.....	17
3.1. Utilización del etanol.....	18
3.1.1. Regulación mediada por la ruta SNF1-Cat8-Sip4	19
3.1.2. Regulación mediada por los factores Cat8 y Adr1 dependientes de SNF1 .	22
3.2. Utilización de los ácidos grasos: regulación mediada por Adr1 y Oaf1/Pip2.....	22
3.3. Utilización del glicerol	23
II. El enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.....	25
1. Localización subcelular de los enzimas Gpd1 y Gpd2	26
2. Regulación de la activación de los enzimas Gpd1 y Gpd2	28
3. El enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y la respuesta al estrés osmótico	29
3.1. Síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico	29
3.2. Regulación de la síntesis del glicerol: ruta HOG.....	30
3.3. Papel de la G 3-P deshidrogenasa en el mantenimiento del balance redox.....	32
3.3.1 El mantenimiento del balance redox en condiciones anaeróbicas y la síntesis de glicerol	32
3.3.2. Importancia de la lanzadera del G 3-P en condiciones aeróbicas.....	33
III. La levadura <i>K. lactis</i>	36
1. Diferencias entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i>	36
2. Aplicaciones biotecnológicas del género <i>Kluyveromyces</i>	37
3. Ruta de señalización por glucosa en <i>K. lactis</i>	38
4. Mantenimiento del balance redox en <i>K. lactis</i>	39
5. Regulación de la síntesis del glicerol: ruta HOG en <i>K. lactis</i>	40
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. Microorganismos utilizados	49

1.1.	Bacterias	49
1.2.	Levaduras	49
2.	Medios y condiciones de cultivo	51
2.1.	Bacterias	51
2.2.	Levaduras	51
3.	Vectores de clonación, plásmidos y oligonucleótidos	52
3.1.	Vectores de clonación	52
3.2.	Plásmidos	53
3.2.1.	Clonación de genes silvestres.....	53
3.2.2.	Clonación de promotores.....	54
3.2.3.	Etiquetado de genes.....	55
3.2.4.	Construcción de mutantes	57
3.2.5.	Plásmidos para el experimento de un híbrido	57
3.3.	Oligonucleótidos	58
4.	Técnicas de manipulación del ADN	62
4.1.	Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	62
4.2.	Aislamiento de ADN plasmídico de levaduras.....	63
4.3.	Análisis de restricción de ADN y construcción de plásmidos.....	63
4.4.	Construcción de plásmidos	63
4.5.	Electroforesis en geles de agarosa	63
4.6.	Transformación de bacterias.....	63
4.7.	Transformación de levaduras.....	64
4.8.	Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	64
4.9.	Mutagénesis dirigida por PCR	64
4.10.	Secuenciación.....	65
5.	Métodos bioquímicos.....	65
5.1.	Obtención de extractos proteicos libres de células	65
5.2.	Determinación de la cantidad de proteína	65
5.3.	Determinación de actividades enzimáticas.....	65
5.3.1.	Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	65
5.3.2.	Determinación de la actividad isocitrato liasa	66
5.3.3.	Determinación de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa	66
5.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	66

5.5.	Trasferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (Polyvinylidene Fluoride).....	67
6.	Técnicas inmunológicas.....	67
6.1.	Inmunodetección de antígenos: <i>Western Blot</i>	67
6.2.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIp)	67
7.	Microscopía de fluorescencia.....	69
7.1.	Preparación de muestras	69
7.2.	Observación de las muestras y grabación de imágenes	69
	RESULTADOS	73
I.	Ruta de señalización SNF1-Cat8/Sip4 en <i>Kluyveromyces lactis</i>	73
1.	Regulación del complejo KISNF1	73
1.1.	Caracterización de mutantes en los genes <i>KISNF4</i> , <i>KISNF1</i> y <i>KIGAL83</i>	73
1.2.	Expresión de los genes <i>KISNF1</i> , <i>KIGAL83</i> y <i>KISNF4</i>	77
1.3.	Nivel de proteína de las subunidades del complejo KISNF1	78
1.4.	Importancia del residuo Thr 190 de la subunidad KISnf1	81
1.5.	Nivel de activación del complejo KISNF1	85
1.6.	Localización subcelular del complejo KISNF1.....	86
2.	Caracterización de los factores de transcripción KICat8 y KISip4	89
2.1.	Análisis de cepas mutantes en los genes <i>KICAT8</i> y <i>KISIP4</i>	89
2.2.	Expresión de los genes <i>KICAT8</i> y <i>KISIP4</i>	90
2.3.	Nivel de las proteínas KICat8 y KISip4	92
2.4.	Localización subcelular de KICat8 y KISip4	93
2.5.	Nivel de activación de KICat8 y KISip4.....	94
2.6.	Identificación del dominio de activación de KISip4 dependiente de KISnf1	98
2.7.	Especificidad de KICat8 y KISip4 por diferentes variantes de elementos CSRE ..	98
2.8.	Estudio de supresores de la ruta de señalización KISnf1-KICat8/KISip4	100
3.	Función de las proteínas KISak1 y KISreg1	103
3.1.	Caracterización de los mutantes <i>KISreg1Δ</i> y <i>KISak1Δ</i>	103
3.2.	Nivel de proteína de KICat8 y KISip4 en los mutantes <i>KISreg1Δ</i> y <i>KISak1Δ</i>	105
3.3.	Análisis de la expresión del gen <i>KISIP4</i> en el mutante <i>KISreg1Δ</i>	106
3.4.	Localización de KICat8 y KISip4 en el mutante <i>KISreg1Δ</i>	107
3.5.	Nivel de activación de KICat8 y KISip4 en el mutante <i>KISreg1Δ</i>	108
II.	Papel de KIGpd1 en la regulación de la vía KISNF1-Cat8/Sip4 y otras rutas de señalización	109
1.	Caracterización del mutante <i>KIGpd1Δ</i>	109

3. Conexión entre la ruta KISNF1-KICat8/KISip4 y la deshidrogenasa KIGpd1	113
4. Análisis de la secuencia de KIGpd1	118
5. Balance redox y la deshidrogenasa KIGpd1	119
6. Papel de KIGpd1 durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico.....	123
7. Regulación de KIGpd1	125
8. Estudio de la localización de KIGpd1.....	127
9. Producción de etanol en el mutante <i>Klgpd1Δ</i>	131
DISCUSIÓN.....	135
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA.....	155

RESUMEN

RESUMEN

La represión por glucosa afecta a la expresión de los genes que participan en la utilización de otras fuentes alternativas de carbono y energía. En levaduras, el elemento clave de la ruta de represión por glucosa es el complejo de la proteína quinasa SNF1. Snf1 pertenece a una familia de serina/treonina proteínas quinasas, muy conservadas en todos los organismos eucariotas, cuya función principal es el mantenimiento de la homeostasis celular. Además esta quinasa participa en otras rutas de señalización que permiten a las células adaptarse a diferentes situaciones de estrés. En este trabajo se ha estudiado la regulación por fuente de carbono de la ruta de señalización SNF1 utilizando como modelo la levadura *Kluyveromyces lactis*.

En la primera parte del presente trabajo hemos caracterizado el complejo K1SNF1 y cómo actúa sobre los factores de transcripción K1Cat8 y K1Sip4. Para ello se han analizado mutantes y se ha estudiado la regulación y localización subcelular de los componentes en presencia de diferentes fuentes de carbono. Encontramos que una fracción de la quinasa Snf1 está activada y presente en el núcleo en células crecidas en etanol pero también bajo condiciones de represión. En esta última condición las subunidades β y γ permanecen citosólicas. Se ha estudiado como tiene lugar la activación de la ruta identificando dominios y aminoácidos esenciales en la quinasa Snf1 y de los dos factores de transcripción. También se ha estudiado la especificidad de K1Cat8 y K1Sip4 por los elementos CSRE reguladores de los promotores de los genes que regulan, encontrando que reconocen variantes diferentes. Esto puede explicar por qué ambos factores son esenciales para la utilización de etanol en esta levadura. Finalmente, se han caracterizado las quinasas y la fosfatasa responsables de la activación y desactivación del complejo SNF1 en esta levadura.

En la segunda parte del trabajo hemos estudiado la función del gen *K1GPD1* que codifica la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (K1Gpd1). Este enzima pertenece a la ruta de síntesis de glicerol y participa en el mantenimiento del balance redox y en la respuesta celular en condiciones de estrés osmótico. K1Gpd1 es esencial durante el crecimiento en etanol y al estudiar a qué nivel actúa hemos encontrado que regula la activación del factor K1Sip4 de la ruta de señalización de la quinasa K1SNF1. Hemos encontrado que además K1Gpd1 regula la expresión de genes que participan en el mantenimiento del balance redox como *K1ADH3*. También hemos investigado la activación de la síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico y su dependencia de la MAP quinasa Hog1. En relación a la regulación de K1Gpd1 hemos encontrado que el gen *K1GPD1* se expresa formando dos transcritos que codifican proteínas que difieren en su extremo N-terminal. Mediante el estudio de mutantes *in vitro* se han

Resumen

identificado y caracterizado las regiones importantes para la función y localización subcelular del enzima encontrándose que presenta una doble localización citosólica y peroxisomal.

Finalmente, hemos demostrado que las cepas deficientes en la deshidrogenasa K1Gpd1 desvían el metabolismo produciendo etanol, lo cual tiene repercusiones importantes desde el punto de vista biotecnológico.

Glucose repression regulates the expression of genes involved in the utilization of alternative carbon and energy sources. In yeasts, the key component in signaling glucose repression is the SNF1 protein kinase complex. Snf1 is a member of the family of serine/threonine protein kinases, which is highly conserved in all eukaryotes and basically ensures cellular homeostasis. In addition, this kinase contributes to other signaling pathways, allowing the cells to adapt to a variety of stress conditions. In this work the regulation of the SNF1 signaling pathway in response to the carbon source has been studied in the model yeast *Kluyveromyces lactis*.

In the first part of this thesis, we characterized the K1SNF1 complex and its action on the transcription factors K1Cat8 and K1Sip4. For this purpose, mutants were employed to study the regulation and subcellular localization of the pathway components in the presence of different carbon sources. As expected we found that a fraction of the Snf1 kinase is activated and located in the nucleus in cells grown on ethanol but also under repression conditions. In the latter condition the β and γ subunits K1Snf4 y K1Gal83 remain cytosolic. Evidence for how the pathway is activated was obtained by the identification of protein domains and essential amino acids in the Snf1 kinase and the two transcriptional factors. Also, we demonstrated that K1Cat8 y K1Sip4 recognize different variants of the regulatory CSRE elements in the promoters of the genes under their control. This may explain why both K1Cat8 and Sip4 are essential for growth of *K. lactis* on non-fermentable carbon sources. Finally, the kinases and the phosphatase responsible for the activation and deactivation of the K1SNF1 complex were characterized.

In the second part of this work, we studied the function of the *K1GPD1* gene, which encodes the NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase (K1Gpd1). This enzyme belongs to the glycerol synthesis pathway and is involved in the maintenance of the redox balance and the cellular response to osmotic stress. K1Gpd1 is essential for growth on ethanol and we revealed that it activates the transcription factor K1Sip4 in the K1SNF1 kinase signaling pathway. We found that K1Gpd1 regulates the expression of genes which also participate in the maintenance of the redox balance, such as *K1ADH3*. We also investigated the activation of glycerol synthesis under osmotic stress conditions and its dependence on the MAP kinase Hog1. With regard to the regulation of K1Gpd1 we found that the *K1GPD1* gene forms two different transcripts, encoding proteins which differ at their N-terminal ends. Using *in vitro* mutagenesis, regions important for the function and subcellular localization of the enzyme were identified and characterized, revealing its localization both in the cytosol and in peroxisomes.

Resumen

Finally, we demonstrated that the strains lacking the K1Gpd1 dehydrogenase redirected the metabolism into producing ethanol, with important consequences from a biotechnological point of view.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AIS	(<i>Autoinhibitory Sequence</i>) Secuencia de autoinhibición
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grado centígrado
C	Citosina
CBS	(<i>Cystathionine Beta-Synthase</i>) Cystationina-beta-sintasa
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CSRE	(<i>Carbon Source Response Element</i>) Elemento de respuesta a fuente de carbono
C-terminal	Carboxilo terminal
Da	Dalton
DIC	(<i>Differential Interference Contrast</i>) Contraste interdifereencial
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F 6-P	Fructosa 6-fosfato
F 1,6-bP	Fructosa 1,6-bisfosfato
G	Guanina
GBD	(<i>Glycogen-Binding Domain</i>) Dominio de unión a glucógeno
GFP	(<i>Green Fluorescent Protein</i>) Proteína verde fluorescente
Glucosa-6P	Glucosa 6 fosfato
GST	Glutation S-Transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperacina etanesulfónico

Abreviaturas

LB	Medio de cultivo <i>Lysogeny broth</i>
Leu	Leucina
M	Molar
Met	Metionina
MOPS	Ácido 3-(N-formilo)-propanosulfónico
N	Normal
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBD	(<i>Nucleotide-Binding Domain</i>) Dominio de unión a nucleótidos
NES	(<i>Nuclear Export Signal</i>) Señal de exportación nuclear
NLS	(<i>Nuclear Localization Sequence</i>) Secuencia de localización nuclear
nm	Nanómetro
N-terminal	Amino terminal
ONPG	Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
ORE	(<i>Oleate Response Element</i>) Elemento de respuesta a oleato
ORF	(<i>Open Reading Frame</i>) Pauta abierta de lectura.
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	(<i>Polimerase Chain Reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	(<i>Polyvinylidene Fluoride</i>) Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina

SC	(<i>Sintetic Culture</i>) Medio sintético
SCD	(<i>Sintetic Culture Dextrose</i>) Medio sintético con glucosa
SCE	(<i>Sintetic Culture Ethanol</i>) Medio sintético con etanol
SCG	(<i>Sintetic Culture Glycerol</i>) Medio sintético con glicerol
SDS	(Sodium dodecyl sulfate) Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	(SDS polyacrylamide gel electrophoresis) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
T	Timina
TAE	Tris-acetato EDTA
TBE	Tampón Tris Borato EDTA
TBS	Tampón Tris Salino
TE	Tampón Tris EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad enzimática
UAS	(<i>Upstream Activating Sequences</i>) Secuencias activadoras aguas arriba
ura	Uracilo
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido
YEP	(<i>Yeast Extract Pectone</i>) Medio complejo con extracto de levadura y peptona
YEPD	(<i>Yeast Extract Pectone Dextrose</i>) Extracto de levadura, peptona y glucosa
YNB	(<i>Yeast Nitrogen Base</i>) Medio mínimo para levaduras

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Ruta de señalización por glucosa de la quinasa Snf1 en *S. cerevisiae*

La capacidad de captar y responder de forma rápida y eficaz a los cambios ambientales, es una propiedad muy conservada en todos los organismos, desde las bacterias hasta eucariotas superiores. Un buen ejemplo de adaptación a las condiciones ambientales es la represión por glucosa.

Las levaduras pueden utilizar una amplia gama de sustratos como fuente de carbono; sin embargo los azúcares glucosa y fructosa son los que se utilizan de forma preferente. En presencia de glucosa, la expresión de los genes que codifican numerosos enzimas que participan en la utilización de otras fuentes alternativas de carbono y energía se encuentra inhibida. Este fenómeno se conoce con el nombre de represión por glucosa. En levaduras, el elemento clave de la ruta de represión por glucosa es el complejo de la proteína quinasa SNF1.

Snf1 pertenece a una familia de serina/treonina proteínas quinasas, muy conservadas en todos los organismos eucariotas, cuya función es el mantenimiento de la homeostasis celular. La quinasa activada por AMP (AMPK), su homólogo en mamíferos, participa en la activación de rutas catabólicas y en la inhibición del crecimiento y de la división celular en condiciones en las que el nivel de ATP es limitante (Hardie y col., 1998; Hedbacker y Carlson, 2008; Hardie, 2015). En mamíferos, el estado de activación de la AMPK no sólo está regulado por la razón AMP/ATP celular, sino que las hormonas también son capaces de controlar el nivel de activación de la quinasa. Esto implica que la AMPK además de regular el estado energético celular también participa en el mantenimiento del balance energético a nivel global (Hardie y Ashford, 2014). Debido a ello no es de extrañar que la AMPK se haya relacionado con diversas enfermedades humanas tales como la diabetes, la obesidad, la hipertrofia cardiaca y también el cáncer (Hardie, 2014; Woods y col., 2003). Así, ya en el año 2003, Woods y col., demostraron que el supresor tumoral LKB1 era capaz de fosforilar a la AMPK en el residuo Thr 172 del dominio catalítico, que juega un papel clave en la activación de la quinasa. Una vez activada, la AMPK es capaz de frenar la proliferación celular mediante la inactivación de numerosas rutas que controlan el crecimiento celular (Hardie, 2014). Estudios recientes indican que la metformina, un activador de la AMPK que se utiliza en el tratamiento de la diabetes tipo 2, tiene propiedades antitumorales. Aunque este fármaco actúa sobre diferentes vías, los estudios indican que su efecto antitumoral reside principalmente en su capacidad de activar a la AMPK (Gong y col., 2014).

1. Características y regulación del complejo SNF1 de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, Snf1 es esencial durante el crecimiento en fuentes de carbono alternativas a la glucosa tanto fermentables (sacarosa, maltosa, galactosa) como no fermentables (etanol, glicerol) y regula la actividad de enzimas implicados en el metabolismo del glucógeno y de los ácidos grasos (Santangelo, 2006; Hedbacker y Carlson, 2008). Asimismo, también participa en la regulación de otros procesos, como la biogénesis de peroxisomas (Hardie y col., 1998), el envejecimiento celular (Ashrafi y col., 2000, Lu y col., 2011), el crecimiento filamentoso (Orlova y col., 2010) o la respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental como por ejemplo el estrés oxidativo o el estrés de la pared celular (Hong y Carlson, 2007; Backhaus y col., 2013).

La quinasa Snf1, al igual que el resto de los miembros de la familia de AMPK, desempeña su función en forma de heterotrímero. En *S. cerevisiae* este heterotrímero se denomina complejo SNF1 y está compuesto por una subunidad α catalítica (Snf1), una subunidad γ reguladora (Snf4) y una subunidad β de las tres alternativas: Gal83, Sip1 y Sip2 (Jiang y Carlson, 1997) (figura 1).

La subunidad Snf1 presenta dos dominios bien diferenciados: un dominio quinasa en la región N-terminal cuya activación viene determinada por la fosforilación del residuo Thr210 y un dominio regulador en el extremo C-terminal. Este último dominio incluye una secuencia de autoinhibición denominada AIS (AutoInhibitory Sequence), que puede unirse tanto al dominio quinasa como a Snf4, seguida por un dominio a través del cual Snf1 interactúa con la subunidad β (McCartney y Schmidt, 2001).

Snf4 contiene dos pares de repeticiones cystationina-beta-sintasa (CBS), denominados dominios de Bateman. En algunas proteínas estos dominios se han relacionado con la unión de derivados de la adenosina. Aunque, a diferencia de la AMPK de mamíferos, el complejo SNF1 no es activado alostéricamente por AMP *in vitro*, se ha demostrado que el ADP protege frente a la desfosforilación de la Thr210 de la subunidad Snf1 (Wilson y col., 1996; Rudolph, 2006). Además, Snf4 también juega un papel crucial en la regulación de la autoinhibición del complejo SNF1 (Leech y col., 2003).

La presencia de tres subunidades β alternativas permite la existencia de tres complejos SNF1 diferentes. El extremo C-terminal es la región más conservada de las subunidades β y media la interacción con Snf1 y Snf4. La región N-terminal determina la localización del complejo en función de la disponibilidad de sustratos (Vincent y col., 2001). Las subunidades β poseen un dominio de unión a glucógeno (GBD: Glycogen-Binding Domain). La delección del dominio GBD de Gal83 causa una regulación al alza de algunos de los procesos regulados por el complejo SNF1, como por ejemplo la acumulación de glucógeno, la activación del factor de

transcripción Sip4 o la expresión de *SUC2*, debido a la activación constitutiva de Snf1 (Wiatrowski y col., 2004; Mangat y col., 2010). En cambio, la delección de los respectivos dominios de Sip1 y Sip2 sólo produce ligeros cambios en la expresión de los genes regulados por el complejo SNF1. Sip1 y Sip2 poseen una secuencia de N-miristoilación en su extremo N-terminal. En el caso de Sip1, la alteración de esta secuencia de N-miristoilación impide la localización vacuolar de Sip1, mientras que la modificación de la secuencia de Sip2 produce un aceleramiento del envejecimiento (Hedbacker y col., 2004; Lin y col., 2003). Aunque las subunidades β comparten algunas de sus funciones, su papel no es totalmente equivalente (Schmidt y col., 2000). Así, el doble mutante *gal83 Δ sip2 Δ* en el que Sip1 es la única subunidad β presente, es incapaz de crecer en etanol y en glicerol (Zhang y col., 2010); Sip2 participa en el proceso de envejecimiento celular (Ashrafi y col., 2000) y Gal83 media la interacción entre Snf1 y el factor transcripcional Sip4 implicado en la regulación del metabolismo de fuentes de carbono no fermentables (Vincent y Carlson, 1999).

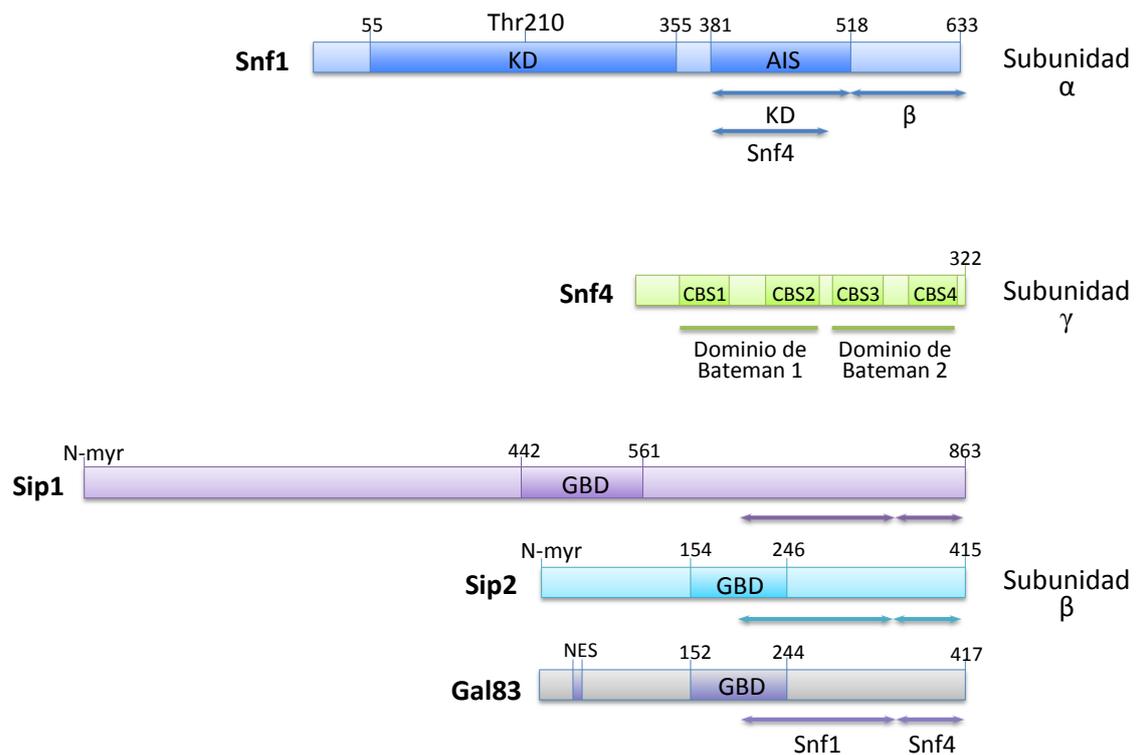


Figura 1. Estructura de las subunidades del complejo SNF1. Los números representan la posición de los residuos aminoacídicos. Las regiones que se delimitan por flechas indican las secuencias que son necesarias y suficientes para interactuar con el dominio quinasa de la subunidad catalítica (KD), la subunidad β , Snf4 o Snf1 en cada caso. Abreviaturas; AIS: secuencia de autoinhibición; CBS: repetición cistationina β -sintasa; N-myr: secuencia consenso de miristoilación; NES: señal de exportación nuclear; GBD: dominio de unión a glucógeno. Modificado de Hedbacker y Carlson (2008).

La activación del complejo SNF1 depende del estado de fosforilación/desfosforilación del dominio catalítico de la subunidad Snf1. En presencia de glucosa, la subunidad Snf1 se encuentra autoinhibida debido a la interacción entre el dominio quinasa y la secuencia AIS del dominio regulador. El complejo de la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) Reg1-Glc7, formado por una subunidad reguladora (Reg1) y por una subunidad con actividad catalítica (Glc7), mantiene a la subunidad Snf1 desfosforilada. En estas condiciones la localización del complejo es fundamentalmente citosólica (Hedbacker y Carlson, 2008).

Al disminuir la glucosa en el medio, o en presencia de fuentes de carbono alternativas, el complejo SNF1 se activa mediante la fosforilación del residuo Thr210 de la subunidad Snf1. Asimismo, la interacción de la subunidad Snf4 con el dominio AIS impide la autoinhibición del complejo. La localización del complejo activo depende del tipo de subunidad β . El complejo Snf1-Sip1 se localiza en la vacuola, Snf1-Gal83 se acumula en el núcleo y Snf1-Sip2 permanece en el citosol (Hedbacker y Carlson, 2006; Vincent y col., 2001).

Existen tres quinasas capaces de fosforilar el residuo Thr210: Sak1, Elm1 y Tos3. Este hecho determina que sólo el triple mutante *sak1 Δ elm1 Δ tos3 Δ* muestre un fenotipo equivalente al mutante *snf1 Δ* durante el crecimiento en fuentes de carbono alternativas a la glucosa (McCartney y col., 2005). La quinasa Sak1 se considera el principal activador del complejo SNF1 puesto que no sólo es capaz de activar a todas las isoformas del complejo, sino que también es capaz de unirse de forma estable con SNF1 y de promover la localización nuclear del complejo Snf1-Gal83, permitiendo de esta forma la desrepresión de los genes sujetos a represión por glucosa (Hedbacker y col., 2004). Tos3 tiene una importancia minoritaria ya que su ausencia solo parece afectar de forma importante el crecimiento continuado en fuentes de carbono no fermentables (Kim y col., 2005). Finalmente, aunque Elm1 puede fosforilar Snf1, su función principal es la regulación de la citocinesis a través de la fosforilación de proteínas que participan en la formación del septo (Bouquin y col., 2000).

Una de las principales funciones del complejo SNF1 activado es la regulación de la actividad de factores de transcripción como el represor Mig1 que controla principalmente la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes de carbono fermentables alternativas a la glucosa y el control de los activadores Cat8, Sip4 y Adr1, implicados en el metabolismo de compuestos no fermentables tales como etanol, ácido oleico o glicerol.

2. Utilización de fuentes de carbono fermentables: represión por glucosa del gen *SUC2* por la ruta SNF1-Hxk2-Mig1

SUC2 codifica, a través de dos ARNm, dos isoformas del enzima invertasa, una exocelular y otra intracelular. La primera es la importante fisiológicamente, tiene una

localización periplásmica e hidroliza la sacarosa presente en el medio para generar glucosa y fructosa.

En *S. cerevisiae* existen tres actividades capaces de llevar a cabo la fosforilación de hexosas, hexoquinasa 1 (Hxk1), hexoquinasa 2 (Hxk2) y glucoquinasa (Glk1), codificadas por los genes *HXK1*, *HXK2* y *GLK1*, respectivamente. En células que están creciendo en presencia de glucosa, Hxk2 es el enzima mayoritario. Hxk2, además de su actividad catalítica, presenta una función reguladora ya que mutantes que carecen de esta actividad tienen afectada la represión por glucosa de los sistemas de utilización de sacarosa, maltosa y galactosa (Moreno y col., 2005). Hxk2 no regula el uso de fuentes de carbono no fermentables (Belinchón y Gancedo, 2007).

La expresión del gen *SUC2* se regula por un proceso de represión por glucosa en el que participan el complejo SNF1, el represor Mig1, el enzima Hxk2 y la fosfatasa Reg1-Glc7.

El factor de transcripción Mig1 pertenece a una familia de proteínas que contienen un motivo de dedos de zinc de tipo C_2H_2 en su estructura. Se une a los promotores de los genes que controla en secuencias ricas en GC, que a su vez tienen que estar precedidas por una región rica en AT que da estabilidad a la unión (Lundin y col., 1994). La represión ejercida por Mig1 requiere el complejo correpresor Cyc8-Tup1, el cual participa además en la regulación de un gran número de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos (Malavé y Dent, 2006).

En alta glucosa el complejo de la fosfatasa Reg1-Glc7 mantiene a Mig1, Snf1 y Hxk2 desfosforilados (McCartney y Schmidt, 2001; Fernández-García y col., 2012). En estas condiciones Mig1, se encuentra en el núcleo unido al promotor *SUC2* formando un complejo represor activo con Hxk2 y Snf1, lo cual impide la transcripción del gen. La interacción de Hxk2 con Mig1 es necesaria para que la hexoquinasa 2 permanezca en el núcleo (Moreno y col., 2005). En ausencia de glucosa, el complejo SNF1 citosólico es activado y una fracción muy importante del mismo pasa a localizarse en el núcleo. Snf1 fosforila a Hxk2 y al represor Mig1 provocando su salida hacia el citosol (Peláez y col., 2009; Fernández-García y col., 2012) con lo cual tiene lugar la expresión del gen *SUC2*.

3. Utilización de fuentes de carbono no fermentables

Como ya se comentó anteriormente, *S. cerevisiae* puede utilizar fuentes de carbono no fermentables como el etanol y el glicerol producidos durante la fermentación o adicionados directamente al medio. SNF1 juega un papel esencial durante la adaptación al uso de fuentes no fermentables. El complejo regula este proceso fundamentalmente induciendo cambios en la expresión de genes claves de rutas metabólicas como la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato

y de otros genes que codifican enzimas específicos involucrados en la utilización de las fuentes de carbono correspondientes.

3.1. Utilización del etanol

La regulación del metabolismo del etanol mediada por el complejo SNF1 ha sido objeto de numerosos estudios (Schüller, 2003; Turcotte y col., 2010). Su utilización comienza con dos reacciones de oxidación en las que el NAD^+ funciona como aceptor de electrones. El acetato formado es transformado en acetil-CoA que puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico para obtener energía o al ciclo del glioxilato que juega un papel clave suministrando ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos a la célula que sirven de precursores para la síntesis de azúcares fosfato. En la [figura 2](#) se muestra un esquema del metabolismo del etanol.

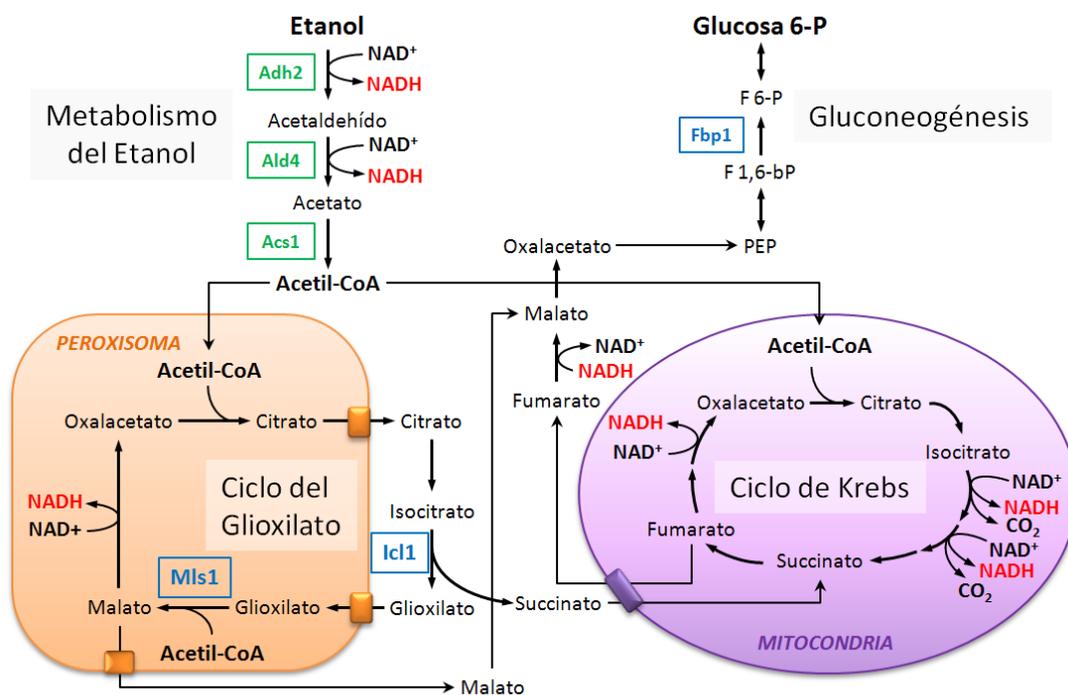


Figura 2. Representación esquemática del metabolismo del etanol. El etanol es una molécula polar de pequeño tamaño y sin carga neta que difunde libremente a través de las membranas biológicas. Una vez en el interior celular, el etanol se convierte en acetaldehído y éste en acetato en reacciones catalizadas por los enzimas alcohol deshidrogenasa (Adh2) y aldehído deshidrogenasa (Ald4). Por último, el acetato es transformado por una acetil-CoA sintetasa (Acs1) en acetil-CoA el cual puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico para obtener energía o bien al ciclo del glioxilato. Dicho ciclo consiste en cinco reacciones, siendo los enzimas isocitrato liasa y malato sintasa los específicos de la ruta. A partir de dos moléculas de acetil-CoA se forma una de succinato que es convertido en oxalacetato y utilizado para la síntesis de glucosa 6-fosfato por la ruta gluconeogénica, con la fructosa 1,6-bisfosfatasa (Fbp1) como enzima regulador clave. En las reacciones en las que procede, se indican cuales son los isoenzimas fundamentales implicados: en azul los enzimas cuyos genes están regulados por Cat8 y Sip4, y en verde los enzimas cuyos genes están regulados por Cat8 y Adr1. También se muestra la localización subcelular de las diferentes etapas. Modificado de Turcotte y col., 2010.

3.1.1. Regulación mediada por la ruta SNF1-Cat8-Sip4

En *S. cerevisiae* el ciclo del glioxilato y la ruta gluconeogénica están regulados de forma coordinada a través de secuencias denominadas CSRE (Carbon Source Response Element; secuencia consenso YCCRTTNRNCGG), presentes en los promotores de genes claves de estas rutas, como el gen *FBPI* que codifican la fructosa 1,6-bisfosfatasa de la ruta gluconeogénica y los genes del ciclo del glioxilato *ICLI* y *MLS1* que codifican la isocitrato liasa y la malato sintasa, respectivamente (Schüller, 2003; Turcotte y col., 2010). La expresión de estos genes depende de los factores de transcripción Cat8 y Sip4 los cuales se unen a los elementos CSRE (Rahner y col., 1999; Vincent y Carlson, 1998). Estos factores pertenecen a una familia de proteínas de unión a ADN con dedos de zinc de tipo $Zn(II)_2 Cys_6$ y su síntesis y actividad está regulada por el complejo SNF1.

El gen *CAT8* fue identificado en una búsqueda de mutantes incapaces de desreprimir la expresión del gen *ICLI* (Hedges y col., 1995), mientras que *SIP4* se identificó como un activador transcripcional que interacciona con la subunidad Snf1 (Lesage y col., 1996; Fields y Song, 1989). Los mutantes *cat8Δ*, a diferencia de los mutantes *sip4Δ*, son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables como el etanol y el glicerol (Vincent y Carlson, 1998). Esto es debido a que Cat8 y Sip4 no contribuyen por igual a la activación de los genes dependientes de CSREs. Mientras que la ausencia de Cat8 produce una importante disminución de la expresión de los genes diana del ciclo del glioxilato y de la ruta gluconeogénica, la ausencia de Sip4 sólo la disminuye levemente. Así, Sip4 es responsable del 15 y 50% de la desrepresión de *ICLI* y *FBPI*, respectivamente (Hiesinger y col., 2001; Vincent y Carlson, 1998). De acuerdo con ello, se ha demostrado que los dominios de unión a ADN de Cat8 y Sip4 se unen a las diferentes variantes de las secuencias CSRE con diferente afinidad. De los dos factores de transcripción, Sip4 es el que reconoce secuencias más específicas (secuencia de reconocimiento de Sip4: TCCATTSRTCCGR; secuencia de reconocimiento de Cat8: YCCNYTNRKCCG) (Roth y col., 2004).

Los factores de transcripción de la familia $Zn(II)_2 Cys_6$, a la que pertenecen Cat8 y Sip4, presentan un dominio de dimerización que permite que puedan unirse al ADN en forma de monómeros, homodímeros o heterotrímeros (Hellauer y col., 1996; MacPherson y col., 2006). Se ha sugerido que Cat8 y Sip4 interaccionan de forma independiente con el ADN, puesto que cada uno de ellos es capaz de unirse a los elementos CSREs en ausencia del otro (Roth y Schüller, 2001; Hiesinger y col., 2001). Esto se ha confirmado mediante el análisis de doble híbrido en células que expresaban las proteínas de fusión LexA-Cat8/LexA-Sip4 y GAD-Cat8/GAD-Sip4. Además Sip4 y Cat8 son capaces de interaccionar formando heterodímeros, siendo la interacción mayor que entre la encontrada para los respectivos homodímeros (Vincent y col., 2001).

Introducción

La expresión de *CAT8* y *SIP4* está sujeta a represión por glucosa (Hedges y col, 1995; Lesage y col., 1996). Sin embargo, el mecanismo que regula la transcripción de estos genes es diferente. La actividad de las proteínas, una vez sintetizadas, depende de su fosforilación mediada por el complejo SNF1.

El factor de transcripción Mig1 juega un papel fundamental en la represión del gen *CAT8*. En alta glucosa Mig1 se encuentra unido al promotor de *CAT8* formando un complejo represor con Cyc8-Tup1. Cuando la glucosa disminuye en el medio o durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, el complejo SNF1 activo fosforila a Mig1 provocando su salida hacia el citosol, lo que permite la expresión del gen *CAT8* (Papamichos-Chronakis y col., 2004). Cat8 es entonces fosforilado por SNF1 en el residuo Ser 562 lo cual lleva a su activación y en consecuencia a la expresión de los genes regulados mediante elementos CSRE (Charbon y col., 2004) (Figuras 3 y 4).

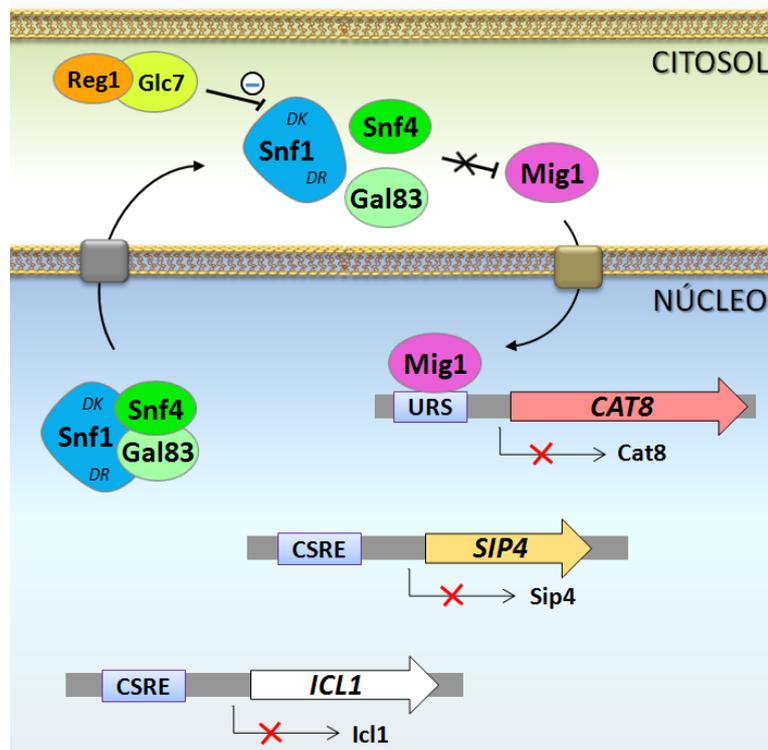


Figura 3. Regulación de la ruta SNF1-Cat8-Sip4 en presencia de glucosa. En presencia de glucosa, la fosfatasa Reg1-Glc7 mantiene al complejo SNF1 desfosforilado el cual se encuentra inactivo principalmente en el citosol. Mig1 está activo en el núcleo formando parte del complejo represor de *CAT8* impidiendo su transcripción. En consecuencia, la expresión de los genes regulados a través de elementos CSRE, entre ellos Sip4, no tiene lugar. Modificado de Schüller, 2003.

La expresión de *SIP4* depende de Cat8 debido a que su promotor también está regulado a través de elementos CSRE (Vincent y Carlson, 1998). En presencia de fuentes de carbono no fermentables Cat8 induce la síntesis de Sip4 que es activado por fosforilación dependiente de

SNF1 (Hedges y col, 1995; Lesage y col., 1996). Además se ha identificado una segunda quinasa capaz de interactuar con Sip4, se trata de la proteína quinasa dependiente de ciclina denominada Srb10. Se ha demostrado que Snf1 y Srb10 interactúan con regiones de Sip4 diferentes y que la fosforilación dependiente de Srb10 contribuye a la activación de Sip4 durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Vincent y col., 2001). En el sistema de utilización de galactosa, esta quinasa participa en la activación transcripcional de los genes del sistema *GAL*, mediante la fosforilación directa del factor de transcripción Gal4 (Hirst y col., 1999; Sadowski y col., 1996). Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los sitios de fosforilación de Sip4 dependientes tanto de Srb10 como de Snf1 y si la fosforilación es directa. La síntesis de Sip4 y su posterior activación le permite activar la expresión de los genes que controla, contribuyendo en menor grado que Cat8 a su expresión según se comentó anteriormente (Figuras 3 y 4).

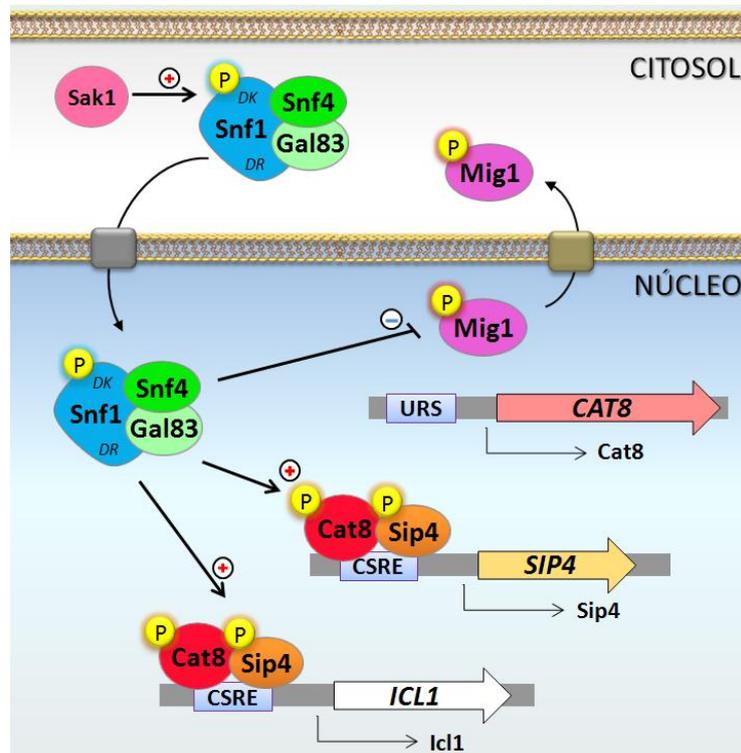


Figura 4. Regulación de la ruta SNF1-Cat8-Sip4 en presencia de fuentes de carbono no fermentables. En ausencia de glucosa, la quinasa Sak1 fosforila a la subunidad Snf1. Una vez activo, el complejo puede translocarse al núcleo y fosforilar a Mig1, el cual se disocia del complejo represor y se dirige al citosol permitiendo la expresión de *CAT8*. El complejo SNF1 fosforila a Cat8, que se une a los promotores de los genes regulados mediante elementos CSRE entre ellos *ICL1* y *SIP4*, activando su expresión. La fosforilación y activación de Sip4 mediada por el complejo le permite activar la expresión de los genes con elementos CSRE. Modificado de Schüller, 2003.

3.1.2. Regulación mediada por los factores Cat8 y Adr1 dependientes de SNF1

En *S. cerevisiae* los enzimas que catalizan las primeras etapas en la utilización del etanol presentan numerosos isoenzimas que difieren en la afinidad por los sustratos, en su regulación y/o localización. De ellos Adh2, Ald4 y Acs1 parecen ser los isoenzimas principales durante la utilización de esta fuente de carbono. Su expresión depende de los factores de transcripción Cat8 que se une a elementos CSRE y de Adr1 que se une a la denominada UAS_{ADR1} (Biddick y col., 2008; Tachibana y col., 2005). Adr1 pertenecen a una familia de proteínas de unión a ADN con dedos de zinc de tipo Cys₂ His₂ que interviene en la expresión de algunos genes sujetos a represión por glucosa. Adr1 se expresa de forma constitutiva y, a diferencia de lo que ocurre con Cat8, Snf1 da lugar a su activación promoviendo su desfosforilación (Ratnakumar y col., 2009). Aunque Adr1 se une a los promotores en forma de monómero, Adr1 interactúa con otros factores de transcripción como Cat8 (y también con las proteínas reguladoras Oaf1/Pip2, como se verá en el siguiente apartado) para activar la expresión de los genes que regula.

3.2. Utilización de los ácidos grasos: regulación mediada por Adr1 y Oaf1/Pip2

En *S. cerevisiae* la β -oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en los peroxisomas y, las reacciones de cada ciclo, están catalizadas por los enzimas Fox1 (acil-CoA oxidasa), Fox2 (bifuncional: 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa y enoil-CoA hidratasa) y Fox3 (3-cetoacil-CoA tiolasa). El acetil-CoA formado puede incorporarse al ciclo del ácido cítrico o bien al ciclo del glioxilato como se comentó anteriormente (Roermund y col., 2003).

Los genes *FOX1*, *FOX2*, *FOX3* y algunos de los genes involucrados en la proliferación de los peroxisomas poseen dos secuencias consenso de unión en sus promotores: una UAS_{ADR1} para la unión de Adr1 y un elemento de respuesta a ácido oleico (ORE: Oleate Response Element) que media la regulación a través de los factores de transcripción Oaf1/Pip2. Normalmente, las secuencias UAS_{ADR1} y ORE se encuentran próximas en los promotores de los genes diana (Ratnakumar y Young, 2010).

Oaf1, al igual que Adr1, se expresa de forma constitutiva. Sin embargo, la activación de Oaf1 no es dependiente de Snf1, sino de su unión a ácidos grasos (Ratnakumar y col., 2009; Phelps y col., 2006). En el promotor del gen Pip2 existe una secuencia UAS_{ADR1} y un elemento ORE, y por lo tanto, en presencia de ácidos grasos su expresión está regulada por Adr1 y Oaf1. Los factores de transcripción Oaf1 y Pip2 se unen a los elementos ORE principalmente en forma de heterodímero y, junto con Adr1, activan la transcripción de los genes de la β -oxidación y de la proliferación peroxisomal (Ratnakumar y col., 2009; Rottensteiner y col., 1997) (figura 5).

El mutante *adr1Δ* posee un único peroxisoma de pequeño tamaño, mientras que el mutante *snf1Δ* carece de peroxisomas (Simon y col., 1992). Aunque la acción de Snf1 sobre la expresión de los genes peroxisomales tiene lugar principalmente a través de Adr1, este factor de transcripción no es la única diana de Snf1 involucrada en la regulación, ya que el fenotipo del mutante *adr1Δ* no es el mismo que el del mutante *snf1Δ* (Ratnakumar y Young, 2010). Hasta la fecha no se conoce ningún otro regulador controlado por Snf1 involucrado en la proliferación de los peroxisomas.

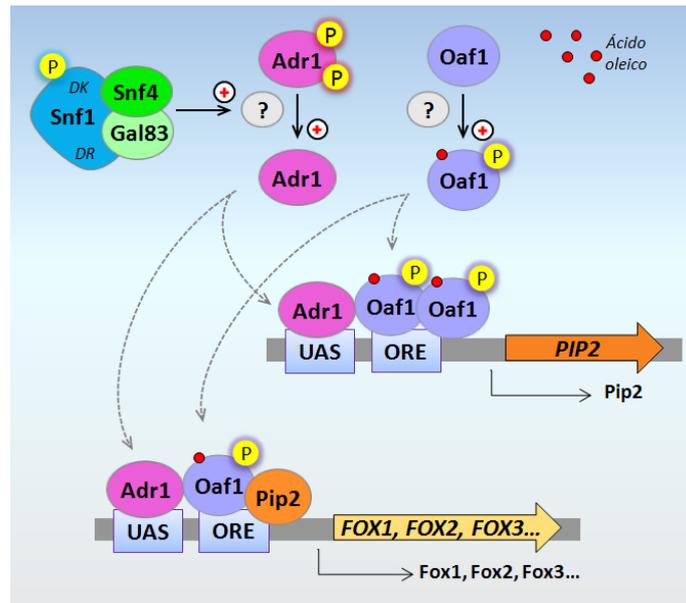


Figura 5. Regulación del metabolismo del ácido oleico por los factores de transcripción Adr1 y Oaf1/Pip2. En ausencia de glucosa Adr1 se encuentra activo en forma desfosforilado lo que permite su unión a los elementos UAS_{ADR1}. Aunque hasta el momento se desconoce cuál es la fosfatasa implicada, se sabe que es un proceso dependiente de Snf1. Durante el crecimiento en ácido oleico, Oaf1 es activado por fosforilación (en este caso también se desconoce la quinasa implicada) y por la unión del ácido graso con lo cual tiene lugar la expresión del gen *PIP2*. Pip2 puede entonces formar heterodímeros con Oaf1 que se unen a las secuencias ORE de los promotores de los genes de la β -oxidación y de algunos de los genes involucrados en la proliferación de los peroxisomas, y activan, junto con Adr1, su expresión. Los círculos rojos representan el ácido oleico. Modificado de Ratnakumar y Young, 2010.

3.3. Utilización del glicerol

S. cerevisiae es capaz de utilizar glicerol como fuente de carbono y energía. El metabolismo del glicerol tiene lugar en dos pasos; en primer lugar el glicerol es convertido en glicerol 3-fosfato (glicerol 3-P) por la glicerol quinasa Gut1 y a continuación, el producto de esta reacción es oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en la mitocondria por la glicerol 3-P deshidrogenasa dependiente de FAD Gut2. La DHAP formada puede utilizarse en la glucólisis para obtener energía o bien en la gluconeogénesis para sintetizar los azúcares-fosfato necesarios para el crecimiento celular.

Introducción

El enzima glicerol quinasa está codificado por el gen *GUT1*. Durante el crecimiento en glucosa, la expresión de *GUT1* se encuentra reprimida, mientras que el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, como el glicerol y el etanol, induce su transcripción. El análisis del promotor del gen *GUT1* demostró la existencia de secuencias de activación UAS_{ADRI} y UAS_{INO} (Upstream Activation Sequence), que son responsables de aproximadamente un 90% de la expresión durante el crecimiento en glicerol. A estas secuencias se unen los factores de transcripción Adr1 y Ino2/Ino4 (involucrados en la regulación de genes que participan en la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos), respectivamente. La represión de *GUT1* está mediada por el regulador negativo Opi1. El factor de transcripción Mig1 también es capaz de unirse al promotor de *GUT1*, sin embargo tiene un efecto mínimo sobre su expresión (Grauslund y col., 1999).

De la misma forma que ocurre con *GUT1*, la expresión de *GUT2* depende de la fuente de carbono disponible. En concreto, la desrepresión de este gen tiene lugar en fuentes de carbono no fermentables y es dependiente del complejo HAP (involucrado en el control de los genes que codifican proteínas con funciones mitocondriales) y del complejo SNF1. Por el contrario, para que tenga lugar la represión del gen es necesaria la presencia de Opi1 (Grauslund y col., 2000). Además de su papel como enzima implicado en la degradación del glicerol, Gut2 también participa en la lanzadera del glicerol 3-fosfato, que constituye uno de los sistemas de mantenimiento del balance redox durante el crecimiento aeróbico (apartado II.3.3.2 de la Introducción) (Larsson y col., 1998).

II. El enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

El enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Gpd) cataliza la reducción del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato, utilizando NADH citosólico como donador de electrones. Esta reacción representa el primer paso de la ruta de biosíntesis de glicerol, muy conservada en todos los organismos eucariotas.

El glicerol desempeña diferentes funciones en el contexto celular (figura 6). En condiciones de estrés osmótico la síntesis y acumulación de glicerol juega un papel clave durante la osmoadaptación (Blomberg y Adler, 1992; Brewster y Gustin, 2014). Asimismo, en ausencia de oxígeno la síntesis de glicerol es el único proceso capaz de mantener el balance redox celular mediante la reoxidación del NADH citosólico (Björkqvist y col., 1997).

Gpd forma parte, junto con el enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial dependiente de FAD (Gut2), de la lanzadera del G 3-P. En condiciones aeróbicas la transferencia a la cadena respiratoria de los electrones del NADH citosólico tiene lugar a través de una NADH deshidrogenasa mitocondrial o bien a través de sistemas lanzadera, como por ejemplo la lanzadera del G 3-P (Larsson y col., 1998).

Por otra parte, Gpd disminuye la acumulación de DHAP, reduciendo a su vez la producción del metabolito tóxico metilglioxal, del cual es precursor la DHAP (Martins y col., 2001). Por último, el glicerol 3-fosfato es un precursor de la biosíntesis de glicéridos y fosfolípidos (Daum y col., 1998).

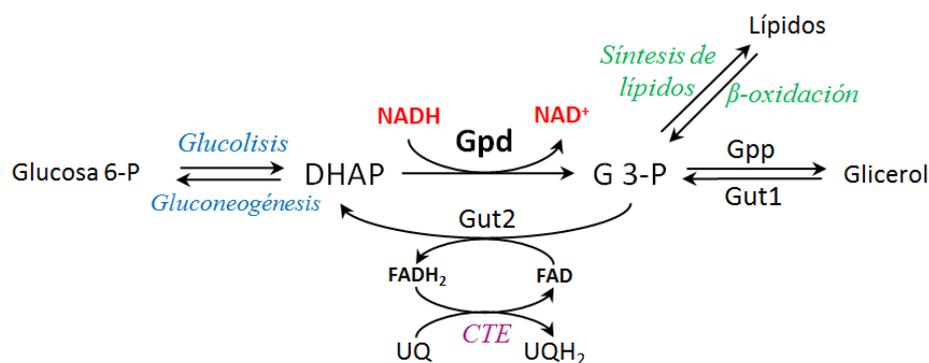


Figura 6. Papel del enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa Gpd en el metabolismo. El enzima Gpd cataliza la conversión de DHAP a G 3-P, el cual puede ser utilizado por el enzima Gpp para sintetizar glicerol o bien puede utilizarse como precursor en la síntesis de lípidos. A su vez el G 3-P fruto de la β -oxidación o de la degradación del glicerol puede ser oxidado por el enzima Gut2 que transfiere electrones a la ubiquinona de la cadena de transporte de electrones para producir ATP. Abreviaturas: DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G 3-P: glicerol 3-fosfato; Gpd: G 3-P deshidrogenasa dependiente de NAD; Gpp: G 3-P fosfatasa; Gut1: glicerol quinasa; Gut2: G 3-P deshidrogenasa dependiente de FAD, UQ: ubiquinona; UQH₂: ubiquinona reducida; CTE: cadena de transporte de electrones (más detalles en el texto). Modificado de Alarcón y col. (2012).

En *S. cerevisiae* la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD presenta dos isoformas codificadas por los genes *GPD1* y *GPD2*. Gpd1 y Gpd2 son proteínas de 391 y 440 aminoácidos, respectivamente, que presentan entre ellas una identidad en su secuencia aminoacídica del 69%. Al igual que el resto de los miembros de la familia de glicerol fosfato deshidrogenasas, estas enzimas tienen dos dominios claramente diferenciados: un dominio de Rossmann amino-terminal que incluye la secuencia consenso GXGXXG a través de la cual interactúa con el NAD(P)⁺/NAD(P)H y un dominio catalítico carboxi-terminal a través del cual se une a los sustratos (Alarcón y col., 2012).

A pesar de catalizar la misma reacción y de presentar un valor K_m muy similar, Gpd1 y Gpd2 no desempeñan las mismas funciones en el contexto celular. Gpd1 juega un papel más importante durante la adaptación al estrés osmótico y en la reoxidación del NADH citosólico en condiciones aeróbicas (a través de la lanzadera del G 3-P), mientras que Gpd2 resulta imprescindible para mantener el nivel redox celular en ausencia de oxígeno (Albertyn y col., 1994; Larsson y col., 1998; Ansell y col., 1997). La diferente contribución de estas isoenzimas a estos procesos es un reflejo de su diferente regulación a nivel transcripcional y postranscripcional, y de su diferente patrón de localización.

1. Localización subcelular de los enzimas Gpd1 y Gpd2

Tanto durante el crecimiento en glucosa como durante el crecimiento en ácido oleico Gpd1 presenta una doble localización citosólica y peroxisomal, mientras que en altas concentraciones de sal Gpd1 se localiza en el citoplasma y en el núcleo. Por el contrario, Gpd2 se puede encontrar en el citoplasma y en la mitocondria (Jung y col., 2009; Valadi y col., 2004).

La región más apical del extremo N-terminal, inmediatamente anterior al dominio de Rossmann, juega un papel clave en la localización de estas proteínas. Gpd1 presenta una señal de localización peroxisomal de tipo 2 (PTS2: peroxisomal targeting signal type 2) situada entre los residuos 7 y 15 (secuencia consenso: (R/K)(L/V/I)X₅(G/H)(L/A/I)) y de la misma forma que ocurre con el resto de las proteínas con secuencias PTS2 la importación a los peroxisomas está mediada por el receptor citosólico Pex7, el cual conduce al cargo hacia el subcomplejo de anclaje peroxisomal formado por las proteínas integrales de membrana Pex13 y Pex14 (Grunau y col., 2009; Valadi y col., 2004; Jung y col., 2009). La peroxina Pex7 no actúa en solitario, sino que necesita la participación de proteínas auxiliares, denominadas correceptores (Pex18 y Pex21 en levaduras). Tras la unión del complejo cargo-receptor-correceptor al subcomplejo de anclaje el cargo es transportado desde el citoplasma hasta la matriz peroxisomal, donde posteriormente tiene lugar su liberación. Finalmente, Pex7, Pex18 y Pex21 son transportados de vuelta al citosol completando el ciclo (revisión Lanyon-Hogg y col., 2010; [figura 7](#)).

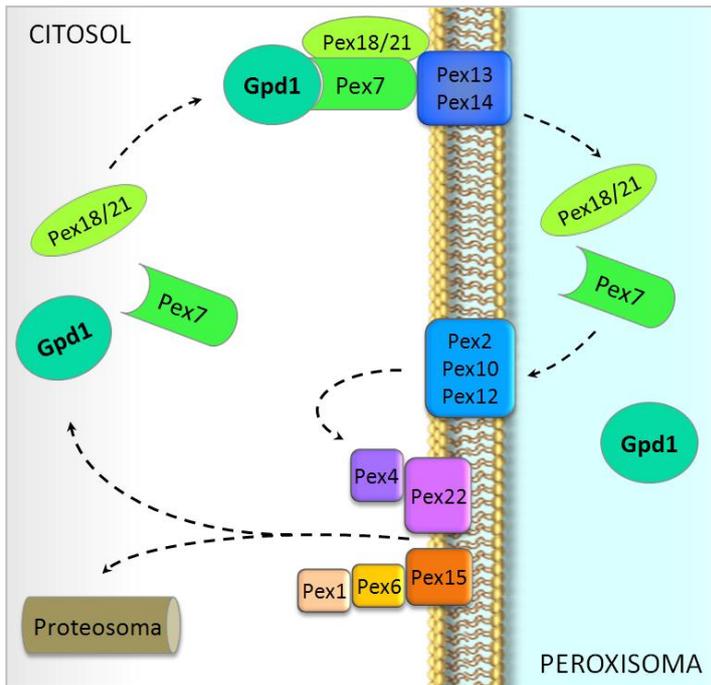


Figura 7. Transporte peroxisomal de proteínas con secuencia PTS2. Pex7 y el correceptor (Pex18 o Pex21) se unen al cargo (Gpd1) en el citosol. El complejo cargo-receptor-correceptor se ancla a la membrana a través de su unión con las proteínas Pex13/14. Posteriormente, tiene lugar la translocación del complejo. El receptor y el correceptor son reciclados a través de un mecanismo en el que están involucradas Pex2, Pex10 y Pex12, el complejo Pex4-Pex22 y las ATPasas Pex1 y Pex6 que a su vez están unidas a la proteína integral de membrana Pex15. Finalmente, el receptor y el correceptor son liberados en el citoplasma donde pueden ser utilizados para un nuevo ciclo o bien son degradados por el proteosoma. Modificado de Lanyon-Hogg y col. (2010).

Aunque el mecanismo que regula el transporte a los peroxisomas de Gpd1 aún es desconocido, se ha observado que la fosforilación de los residuos Ser24 y Ser27 favorece la acumulación peroxisomal de esta proteína (Jung y col., 2009), probablemente facilitando el reconocimiento por parte de Pex7 o estabilizando su unión.

¿Qué función desempeña Gpd1 en los peroxisomas? Se ha sugerido que Gpd1 podría ayudar a reoxidar el NADH producido durante la β -oxidación, de forma análoga al enzima malato deshidrogenasa Mdh3 (Valadi y col., 2004; Jung y col., 2009). No obstante, su papel no sería imprescindible puesto que ni Gpd1 es capaz de suplir la ausencia de Mdh3 durante el crecimiento en ácido oleico, ni la ausencia de Gpd1 altera el crecimiento durante el uso de esta fuente de carbono. Una hipótesis alternativa propone que Gpd1 participa en el metabolismo del NAD⁺ regulando el nivel de sustrato del enzima peroxisomal Npy1, el cual se encarga de hidrolizar el enlace pirofosfato del NADH. Por último, también se ha sugerido que el transporte a los peroxisomas podría ser una forma de “secuestrar” a Gpd1 para que no estuviese disponible en el citoplasma (Jung y col., 2009).

También se ha descrito que Gpd1 se acumula en el núcleo (además de en el citoplasma) durante el crecimiento en altas concentraciones de sal. Sin embargo, la proteína de fusión Gpd1-GFP-SKL, que además de la secuencia PTS2 contiene una señal de localización peroxisomal tipo 1 (SKL) y confiere una localización exclusivamente peroxisomal, reveló que la presencia de Gpd1 en el núcleo no es esencial durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico (Jung y col., 2009). En este caso se desconoce tanto la función que desempeña Gpd1 en el núcleo como la secuencia que podría mediar en su transporte desde el citosol.

Por su parte, la proteína Gpd2 posee una secuencia de localización mitocondrial en el extremo N-terminal rica en aminoácidos básicos, hidrofóbicos e hidroxilados. Aunque la doble localización citosólica y mitocondrial de esta proteína dificulta la visualización de la señal mitocondrial, la construcción de una fusión que contiene los diecisiete primeros aminoácidos de Gpd2 unidos a la proteína GFP permitió demostrar que esta secuencia es suficiente para conferir una localización mitocondrial (Valadi y col., 2004). Si bien aún se desconoce el mecanismo a través del cual las proteínas con presecuencias alcanzan el espacio intermembrana mitocondrial, esta parece la distribución más probable para Gpd2 en el interior de la mitocondria. Según Valadi y col., la localización mitocondrial de Gpd2 juega un papel clave durante el crecimiento en condiciones anaeróbicas. Según estos autores Gpd2 crea un gradiente NAD^+/NADH , que genera una fuerza motriz capaz de permitir a la lanzadera etanol-acetaldehído exportar equivalentes reducidos desde la matriz mitocondrial hasta el citoplasma (Valadi y col., 2004).

2. Regulación de la activación de los enzimas Gpd1 y Gpd2

Como se comentó anteriormente Gpd1 y Gpd2 participan en la respuesta a diferentes tipos de estrés. Durante estas circunstancias la supervivencia celular depende en gran medida de la capacidad de regular el nivel de activación de estos enzimas de forma inmediata. En este sentido, la fosforilación de residuos serina adyacentes al dominio catalítico de dichos enzimas es una modificación postraduccional de gran importancia reguladora. En ambos casos, esta fosforilación supone una disminución del nivel de activación del enzima; sin embargo, las vías implicadas en su regulación son diferentes.

La disponibilidad de glucosa determina el nivel de fosforilación de Gpd2 y su actividad. Durante el crecimiento en glucosa Gpd2 se encuentra activo y participa en la reoxidación del NADH, contribuyendo de esta forma al mantenimiento del equilibrio redox celular. Por el contrario, en ausencia de glucosa la activación del complejo SNF1 provoca la fosforilación del residuo Ser72 de Gpd2, disminuyendo a la mitad la actividad del enzima (Lee y col., 2012). También se observó que tras la fosforilación de la serina 72 por parte de SNF1, el residuo Ser75 era susceptible a fosforilarse. Dado que los miembros de la familia de caseína quinasas I (CKI) prefieren sustratos que han sido previamente fosforilados en la posición P -3, se postuló que la quinasa Yck1 podría ser la responsable de dicha fosforilación. Esta hipótesis se confirmó mediante experimentos *in vitro* en los que Yck1 fue capaz de fosforilar a Gpd2, pero solamente en presencia de la quinasa Snf1 (Lee y col., 2012).

El estudio de los fosfopéptidos de Gpd2 mediante espectrofotometría de masas, determinó la existencia de otro residuo susceptible de ser fosforilado, la serina 70; sin embargo, aún se desconoce la quinasa que lleva a cabo dicha fosforilación.

Durante el crecimiento en glucosa, el residuo Ser24 de Gpd1 se encuentra fosforilado, siendo las quinasas Ypk1 e Ypk2 las responsables de dicha fosforilación (secuencia consenso de fosforilación: R-X-R-X-X-S) (Lee y col., 2012). Ypk1 e Ypk2 son a su vez sustratos de la quinasa Tor2 que forma parte del complejo TORC2. Una vez activos Ypk1 e Ypk2 controlan procesos relacionados con el crecimiento celular tales como la polarización del citoesqueleto de actina, la endocitosis mediada por receptor y la biosíntesis de esfingolípidos (Niles y col., 2014a, b; Loewith y Hall, 2011).

Como ya se comentó, en condiciones de estrés osmótico el enzima Gpd1 juega un papel clave en la síntesis de glicerol. En este sentido, se ha observado que la adición de sal en el medio provoca una rápida desfosforilación de Gpd1 (Lee y col., 2012); sin embargo, todavía no se ha identificado la proteína fosfatasa que actúa sobre Gpd1. Por otra parte, el aumento de la transcripción del gen *GPD1* junto con la disminución del nivel de activación de Ypk1 debido a la desfosforilación del residuo Thr662, tiene como resultado no sólo el incremento de la cantidad total de Gpd1, sino también el aumento de la proporción de enzima que se encuentra desfosforilado y por lo tanto activo (Rep y col., 2000; Lee y col., 2012).

3. El enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y la respuesta al estrés osmótico

3.1. Síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico

En condiciones hiperosmóticas la disminución del potencial hídrico del medio de crecimiento produce una salida de agua intracelular que pone en peligro la supervivencia de la célula. En estas condiciones las levaduras acumulan glicerol, molécula que funciona como osmolito (Nevoigt y Stahl, 1997).

La biosíntesis de glicerol tiene lugar en dos pasos a partir del intermediario glucolítico DHAP. La primera reacción está catalizada por una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y consiste en la reducción de la DHAP a G 3-P. En segundo lugar el G 3-P es defosforilado por una enzima glicerol 3-fosfato fosfatasa (Gpp) para dar lugar a glicerol.

En *S. cerevisiae* el enzima Gpp tiene dos isoformas (Gpp1 y Gpp2) codificadas por los genes *GPP1* y *GPP2* (Norbeck y col., 1996). De la misma forma que ocurre con las isoformas de la deshidrogenasa Gpd, existen importantes diferencias en la función y en la regulación de Gpp1 y Gpp2. En condiciones de estrés hiperosmótico tanto la expresión de *GPP1* como la de *GPP2* aumenta (no obstante el aumento es más acusado en el caso de *GPP2*), es decir, en estas circunstancias ambos isoenzimas desempeñan un papel equivalente (Norbeck y col., 1996; Pahlman y col., 2001). Por el contrario, en condiciones anaeróbicas el mutante *gpp1* crece lentamente, mientras que la ausencia del enzima Gpp2 no altera el crecimiento. Asimismo, en

ausencia de oxígeno la expresión del gen *GPP1* se induce de forma transitoria, mientras que la expresión de *GPP2* no se ve afectada (Pahlman y col., 2001).

3.2. Regulación de la síntesis del glicerol: ruta HOG

La ruta HOG es un sistema de transducción de señales mediado por MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases). Esta ruta se activa principalmente en condiciones de estrés hiperosmótico y regula tanto la síntesis como la acumulación de glicerol. La activación de la ruta HOG está controlada por dos ramas, la rama Sln1 y la rama Sho1, que convergen en la MAPKK Pbs2 (figura 6.A) (Hohmann, 2002; Brewster y Gustin, 2014).

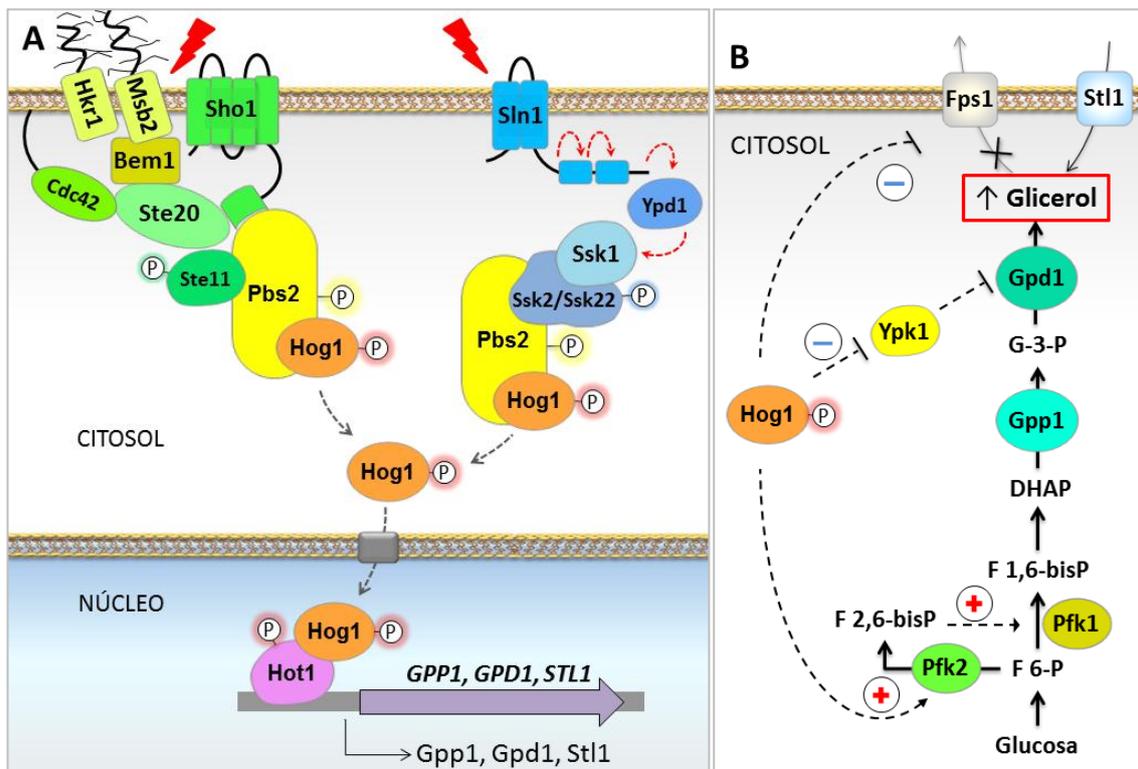


Figura 6. Regulación de la síntesis de glicerol. **A. Activación de la ruta HOG.** Existen dos ramas capaces de activar a Hog1. La rama Sho1 está controlada por los osmosensores transmembrana Hkr1 y Msb2. En condiciones hiperosmóticas Pbs2 se une a la proteína de membrana Sho1. A su vez Mbs2 interactúa con la proteína citosólica Bem1 para reclutar a Ste20, lo que permite la activación de Ste11. A continuación, Ste11 fosforila y activa a Pbs2. La rama Sln1 está formada por tres proteínas quinasas: Sln1, Ypd1 y Ssk1. Las flechas rojas indican la fosfotransferencia que tiene lugar en condiciones osmóticas constantes. En condiciones hiperosmóticas Ssk1 se inactiva y se une a Ssk2, lo que desencadena su autofosforilación y la posterior fosforilación de Pbs2. Finalmente, la fosforilación de Hog1 por Pbs2, permite su transporte al núcleo. Una vez en el núcleo, Hog1 puede unirse al factor de transcripción Hot1, al cual fosforila. El resultado final es la activación de la expresión de algunos de los genes involucrados en el acumulación intracelular de glicerol como por ejemplo *GPP1*, *GPD1* y *STL1*. Modificado de O'Rourke y col. (2002) **B. Regulación de las dianas citosólicas de Hog1.** Durante el crecimiento en un medio hiperosmótico la inhibición por fosforilación de la gliceroporina Fps1 favorece la acumulación de glicerol en el interior celular. En estas condiciones, la desfosforilación del residuo Thr662 de Ypk1 disminuye el nivel de activación de dicho enzima, lo que a su vez se traduce en que la proporción de Gpd1 que se encuentra fosforilada es menor. Asimismo, la estimulación de la ruta HOG aumenta la actividad de Pfk2, lo que a su vez produce un aumento del metabolito F 2,6-bisP, que estimula la activación de Pfk1. Estos cambios producen un aumento del flujo glucolítico que permite cubrir la demanda de DHAP necesaria durante la síntesis de glicerol. Modificado de Brewster y Gustin (2014).

Se considera que la rama Sln1 juega un papel más importante en la regulación de la ruta HOG, puesto que es más sensible a cambios osmóticos (O'Rourke y Herskowitz, 2004). Esta vía consiste en un osmosensor (Sln1), una proteína intermediaria (Ypd1) y un regulador de respuesta (Ssk1).

Sln1 tiene dos regiones transmembrana y un dominio histidina quinasa. Cuando las condiciones osmóticas son constantes, Sln1 está activo y fosforila a la proteína intermediaria Ypd1, que a su vez transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta Ssk1 inactivándolo (Posas y col., 1996). En este estado Ssk1 no interacciona con las MAPKKKs Ssk2 y Ssk22, y en consecuencia el resto de los componentes de la rama Sln1 permanecen inactivos. En condiciones hiperosmóticas el osmosensor Sln1 se inactiva y los componentes del sistema son defosforilados. La proteína reguladora Ssk1 se une a Ssk2/Ssk22, lo que desencadena su activación y autofosforilación (Posas y Saito, 1998). Finalmente Ssk2/Ssk22 fosforila a Pbs2 activándolo.

La rama Sho1 está controlada por dos osmosensores transmembrana, Hkr1 y Msb2, que son capaces de detectar movimientos entre la pared celular y la membrana plasmática (Tatebayashi y col., 2007). Aunque inicialmente se pensaba que la proteína transmembrana Sho1 era el sensor de esta rama (Maeda y col., 1995), su función principal parece ser el anclaje de otros elementos de la ruta a través de su dominio SH3 carboxi terminal. En condiciones hiperosmóticas Pbs2 es recluido en la membrana plasmática por Sho1 (Reiser y col., 2000). A su vez, Pbs2 conduce a la MAPKKK Ste11 hasta la membrana, donde es fosforilado por la quinasa Ste20 que se encuentran asociadas a la proteína-G Cdc42. Finalmente, Ste11 fosforila y activa a Pbs2 (Saito y Tatebayashi, 2004).

Cuando Pbs2 está activo, fosforila al elemento central de la ruta HOG, la MAPK Hog1. Una vez fosforilado, la quinasa Hog1 es transportada al núcleo, donde regula la expresión de numerosos genes mediante su unión a diferentes factores de transcripción (Ferrigno y col., 1998; Mas y col., 2009). No obstante, Hog1 también actúa sobre dianas citoplasmáticas (Thorsen y col., 2006).

El factor de transcripción Hot1 regula la activación de algunas de las dianas génicas de la quinasa Hog1, como es el caso de los genes de la ruta de biosíntesis de glicerol *GPD1* y *GPP2*, y del gen *STL1* que codifica para un transportador de glicerol. En el caso de *GPP1* la inducción es dependiente de Hog1 e independiente de Hot1 (Rep y col., 2000). En condiciones de estrés osmótico Hog1 se une al promotor *GPD1* a través de Hot1, el cual se encuentra unido de forma constitutiva al promotor (Alepez y col., 2001). Aunque la activación de la transcripción es dependiente de la actividad quinasa de Hog1, la fosforilación de Hot1 no es

necesaria para que dicho proceso tenga lugar. Esto podría deberse a que Hog1 es capaz de interactuar directamente con la maquinaria transcripcional (Alepez y col., 2003).

De la misma forma, también existen otros mecanismos dependientes de Hog1 que participan en la respuesta a estrés osmótico, como por ejemplo la regulación del flujo de glicerol a través de la membrana plasmática mediante la fosforilación de la gliceroporina Fps1 (Babazadeh y col., 2014) y la activación del enzima fosfofructosaquinasa (Pfk2) cuya consecuencia es el aumento de la síntesis del activador alostérico de la glucólisis fructosa 2,6-bisfosfato (Dihazi y col., 2004). El resultado final es un aumento del flujo glucolítico que permite cubrir la demanda de DHAP necesaria durante la síntesis de glicerol y la retención de dicho osmolito en el interior celular (figura 6.B).

3.3. Papel de la G 3-P deshidrogenasa en el mantenimiento del balance redox

El balance redox está determinado principalmente por la razón NADH/NAD^+ (y en menor medida por la razón $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$) y su mantenimiento resulta esencial para sostener el metabolismo y el crecimiento celular. El coenzima NAD (Nicotinamín Adenín Dinucleótido) actúa como transportador de electrones en numerosas reacciones de oxido-reducción; en consecuencia, las variaciones en el nivel NADH/NAD^+ conllevan profundos cambios en el metabolismo celular. Asimismo, el hecho de que el NAD no pueda atravesar la membrana interna mitocondrial, determina que este coenzima deba ser reoxidado en el compartimento en el que ha sido producido.

Durante el crecimiento, la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos produce un excedente de NADH citoplasmático (Nissen y col., 1997), que puede ser reoxidado de dos formas diferentes en función de la disponibilidad de oxígeno.

3.3.1 El mantenimiento del balance redox en condiciones anaeróbicas y la síntesis de glicerol

La fermentación alcohólica es un proceso neutro desde el punto de vista redox, puesto que el NADH formado durante la glucólisis se reoxida a NAD^+ por la conversión de piruvato a etanol; sin embargo, el nivel total de NADH citosólico aumenta en estas circunstancias debido a la producción de biomasa.

En condiciones anaeróbicas, la síntesis de glicerol es el único mecanismo capaz de restaurar el balance redox (Nordström, 1966; Bakker y col., 2000), es decir, la oxidación del exceso de NADH citosólico se acopla a la reducción del precursor glucolítico DHAP. Como ya

se comentó, esta reacción está catalizada por el enzima G 3-P deshidrogenasa (Gpd). Finalmente, el G 3-P es convertido en glicerol por el enzima G 3-P fosfatasa (Gpp).

En estas circunstancias, el isoenzima Gpd2 juega un papel clave. Mientras que el mutante *gpd1Δ* presenta un comportamiento equivalente a la cepa silvestre, el crecimiento del mutante *gpd2Δ* disminuye considerablemente en ausencia de oxígeno. Por su parte, el doble mutante *gpd1Δgpd2Δ* es incapaz de crecer salvo en presencia de agentes oxidantes de NADH como la acetoína o al acetaldehído (Ansell y col., 1997; Björkqvist y col., 1997).

Ensayos *Northern* pusieron de manifiesto que la expresión del gen *GPD2* aumenta de forma transitoria en condiciones anaeróbicas; sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo encargado de regular este proceso. Curiosamente, al contrario de lo que ocurre en la cepa silvestre, en el mutante *gpd2Δ* la expresión de *GPD1* se vuelve parcialmente sensible a los cambios en la concentración de oxígeno. Esto pone de manifiesto que el isoenzima Gpd1 es capaz de sustituir, al menos parcialmente, a Gpd2; lo que a su vez explica el crecimiento del mutante *gpd2Δ* en condiciones anaeróbicas (a medio camino entre la cepa silvestre y el doble mutante) (Ansell y col., 1997).

3.3.2. Importancia de la lanzadera del G 3-P en condiciones aeróbicas

En condiciones aeróbicas los electrones del NADH citosólico pueden ser transferidos a la cadena respiratoria mitocondrial; bien a través de una de las deshidrogenasas externas mitocondriales dependientes de NADH (Nde1 y Nde2) localizadas en la membrana interna mitocondrial con el dominio catalítico dirigido hacia el espacio intermembrana, o bien a través de sistemas lanzadera, como la lanzadera del G 3-P (figura 7).

La lanzadera del G 3-P está formada por el enzima G 3-P deshidrogenasa (Gpd) y por la G 3-P deshidrogenasa dependiente de FAD Gut2, situada en la membrana interna mitocondrial. El primer enzima cataliza la síntesis de G 3-P a partir de DHAP, reacción en la cual se oxida el NADH citosólico. Posteriormente, Gut2 transfiere los electrones del G 3-P a la ubiquinona y la DHAP formada vuelve al citosol para comenzar un nuevo ciclo.

Durante el crecimiento en glucosa, la lanzadera del G 3-P no es funcional debido a que el gen *GUT2* sufre represión por glucosa y la reoxidación del exceso de NADH se acopla a la síntesis de glicerol. En cambio, cuando la glucosa se hace limitante la desrepresión de *GUT2* permite el uso del glicerol producido en la primera fase como fuente de carbono y la lanzadera del G 3-P participa activamente en el mantenimiento del balance redox celular (Grauslund y Ronnow, 2000; Larsson y col., 1998).

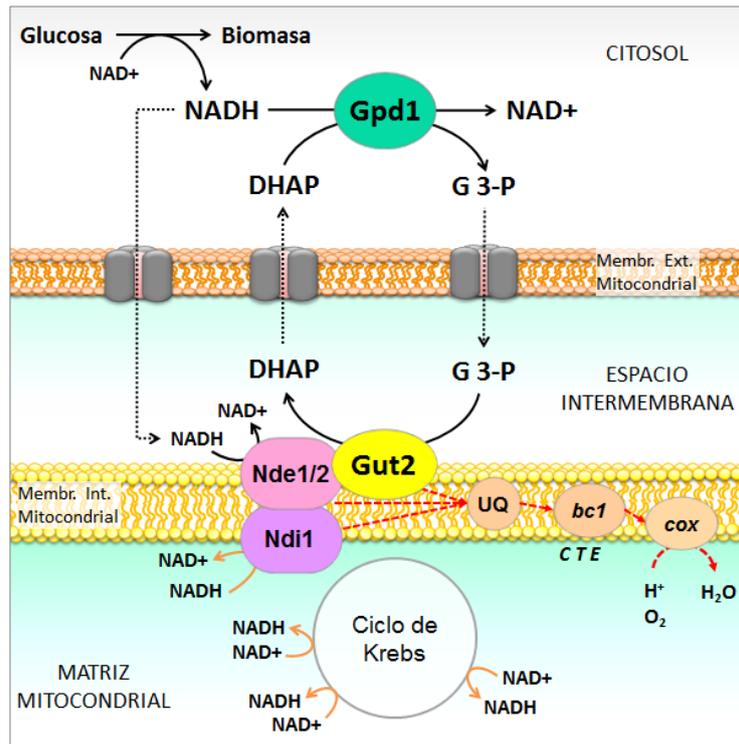


Figura 7. Reoxidación del NADH en condiciones aeróbicas. Durante el crecimiento la síntesis de biomasa produce un exceso de NADH citosólico. En condiciones aeróbicas los electrones del NADH citosólico pueden ser transferidos a la cadena respiratoria a través de las deshidrogenasas Nde1 y Nde2 o a través de la lanzadera del G 3-P. Gpd1 acopla la reoxidación del NADH a la síntesis de G 3-P y Gut2 transfiere los electrones del G 3-P directamente a la ubiquinona. El ciclo de Krebs y la síntesis de aminoácidos produce un exceso de NADH mitocondrial. La reoxidación del NADH mitocondrial corre a cargo de la deshidrogenasa mitocondrial interna Ndi1. Abreviaturas: DHAP: dihidroxiacetona fosfato; G 3-P: glicerol 3-fosfato; Gpd1: glicerol 3-P deshidrogenasa dependiente de NAD; Gut2: glicerol 3-P deshidrogenasa dependiente de FAD; Nde: deshidrogenasa externa mitocondrial; Ndi: deshidrogenasa interna mitocondrial; UQ: ubiquinona; bc1: complejo bc1; cox: citocromo c oxidasa; CTE: cadena de transporte de electrones.

El análisis de los mutantes *gpd1Δgut2Δ* y *gpd2Δgut2Δ* puso de manifiesto que el isoenzima Gpd1 es el segundo componente de esta lanzadera. El doble mutante *gpd2Δgut2Δ* presenta el mismo fenotipo que el mutante sencillo *gut2Δ*, es decir, en ambos mutantes el glicerol se produce tanto en la primera fase en la que se fermenta la glucosa como en la fase respiratoria (utilizándose en este caso el etanol como fuente de carbono en lugar del glicerol). Por el contrario, la producción de glicerol del mutante *gpd1Δgut2Δ* es prácticamente nula. Estos resultados indican que en estas circunstancias el responsable de la síntesis de glicerol y por lo tanto de la reoxidación del NADH es el enzima Gpd1 (Larsson y col., 1998).

En la mitocondria Gut2 forma parte de un complejo supramolecular de deshidrogenasas. Este complejo está formado por cinco deshidrogenasas cuyo dominio catalítico está dirigido hacia el espacio intermembrana (Gut2, Nde1, Nde2 y las lactato deshidrogenasas Dld1 y Cyb2), la deshidrogenasa interna Ndi1 y cuatro de los enzimas del ciclo del ácido cítrico (Sdh1, Fum1,

Mdh1 y Cit1) (Grandier-Vazeille y col., 2001). Algunas evidencias sugieren que la interacción entre enzimas permite regular el nivel de activación de dichas enzimas. Por ejemplo, se sabe que la ausencia de Nde1 y Nde2 provoca un aumento de la afinidad de Gut2 por el sustrato y por lo tanto un aumento de su eficiencia; asimismo, la ausencia de Gut2 se traduce en un aumento de la eficiencia de las deshidrogenasas externas (Pahlman y col., 2002).

La alcohol deshidrogenasa mitocondrial Adh3 forma parte junto con las alcohol deshidrogenasas citosólicas Adh1 y Adh2 de la lanzadera del etanol-acetaldehído, la cual participa en la reoxidación del NADH mitocondrial durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Puesto que tanto el etanol como el acetaldehído difunden libremente a través de las membranas, el resultado neto de esta lanzadera es el intercambio del NADH desde la mitocondria hasta el citosol (Bakker y col., 2000).

III. La levadura *K. lactis*

Aunque *S. cerevisiae* y *K. lactis* están próximas desde un punto de vista filogenético, existen importantes diferencias en la regulación de su metabolismo central. Estas diferencias convierten a *K. lactis* en un interesante modelo de estudio.

1. Diferencias entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*

El metabolismo energético es uno de los aspectos determinantes que diferencian a estas dos especies. *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva, ya que su metabolismo es fundamentalmente fermentativo incluso en condiciones aeróbicas. En consecuencia, durante el crecimiento en glucosa, este monosacárido es fermentado a través de la glucólisis, obteniéndose como producto final etanol. Por el contrario, *K. lactis* es una levadura Crabtree negativa, lo cual implica que el piruvato de la glucólisis es convertido en acetil-CoA (reacción catalizada por una piruvato deshidrogenasa: Pdh) que posteriormente se incorporará al ciclo de Krebs; es decir, esta levadura utiliza preferencialmente la respiración como fuente de energía (Van Urk y col., 1990; Díaz-Ruiz y col., 2011; Merico y col., 2009). Resulta interesante el hecho de que los mutantes de *K. lactis* en los que la actividad Pdh se encuentra bloqueada se comportan como Crabtree positivos (Zeeman y col., 1998). Este hecho pone de manifiesto que el mecanismo a través del cual se metaboliza el piruvato es dependiente de la actividad de la Pdh o del ciclo de Krebs, de la regulación del flujo glucolítico o bien a una combinación de ambas.

La búsqueda de mutantes incapaces de crecer en glucosa en presencia del inhibidor de la respiración antimicina A, permitió la identificación de los genes *RAG* (Resistant against Antimycin A on Glucose), los cuales han resultado de gran utilidad para determinar las bases moleculares que gobiernan algunas de las diferencias entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

La mayoría de los genes *RAG* están involucrados en el control del flujo glucolítico. En concreto, estos genes codifican para enzimas, transportadores y reguladores de la glucólisis (Breunig y col., 2000). En ausencia de inhibidores de la respiración la mayoría de los mutantes *rag* de *K. lactis* crecen de forma normal. Esto pone de manifiesto que la disminución del flujo glucolítico no tiene un efecto negativo en esta levadura, al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Wesolowski-Louvel y col., 1992). Dos son las claves del comportamiento de los mutantes *rag*: en primer lugar en *K. lactis* no existe fuerte represión por glucosa de los enzimas respiratorios (Mulder y col., 1995a, b) y en segundo lugar la mayor parte de la glucosa es metabolizada en esta levadura a través de la ruta de las pentosas fosfato (Jacoby y col., 1993; Tarrío y col., 2006a).

La ruta de señalización por glucosa ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae*. La levadura *K. lactis* representa un valioso modelo alternativo no solo por poseer un metabolismo preferentemente respiratorio, sino también por la ausencia de redundancia en los genes que intervienen tanto en la represión por glucosa como en el propio metabolismo de dicho azúcar (Wolfe y Shields, 1997). Estudios iniciales llevados a cabo sobre la represión por glucosa en *K. lactis* pusieron de manifiesto importantes diferencias entre cepas (Breunig, 1989). En trabajos posteriores se demostró que estas diferencias se deben en parte a los genes que codifican transportadores de glucosa.

Los genes *KIHGT1* y *KIRAG1* de *K. lactis* codifican dos de los transportadores de hexosas más importantes de esta levadura. *KIHGT1* codifica para una permeasa de alta afinidad y se expresa de forma constitutiva, mientras que *KIRAG1* codifica una permeasa de baja afinidad cuya expresión se induce en respuesta a altas concentraciones de glucosa (Wesolowski-Louvel y col., 1992; Billard y col., 1996). Algunas cepas de *K. lactis* no contienen el gen *KIHGT1* y en lugar del gen *KIRAG1* poseen dos genes en tándem: *KIKHT1* y *KIKHT2* (Weirich y col., 1997; Betina y col., 2001). Al igual que *KIRAG1*, la expresión de *KIKHT1* se activa cuando la concentración de glucosa es elevada. Por el contrario, *KIKHT2* se activa cuando la concentración de glucosa es baja y se reprime cuando la concentración de glucosa es elevada (Milkowski y col., 2001). La secuencia de *KIRag1* es idéntica a la de *KIKht1* salvo en su extremo 3' (K-A-M-L en *KIRag1* y K-R-F en *KIKht1*), siendo este idéntico al de *KIKht2*. La presencia de los transportadores de hexosas *KIKht1* y *KIKht2* se correlaciona con una elevada sensibilidad a la represión por glucosa, o lo que es lo mismo, en las cepas que contienen estos transportadores la expresión de los genes gluconeogénicos y de los genes implicados en el uso de fuentes de carbono alternativas es muy baja en presencia de glucosa (Schaffrath y Breunig, 2000).

2. Aplicaciones biotecnológicas del género *Kluyveromyces*

Tanto *S. cerevisiae* como *K. lactis* han desarrollado mecanismos específicos para obtener galactosa a partir de la hidrólisis de disacáridos. Sin embargo, la adaptación de estas levaduras a sus respectivos medios ha determinado la especialización en el uso de diferentes disacáridos. En *S. cerevisiae* la hidrólisis del disacárido melibiosa (6-O- α -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa) está catalizada por una α -galactosidasa secretable codificada por el gen *MEL1*. Posteriormente, la galactosa es transportada al interior celular a través de la galactosa permeasa Gal2. En cambio, *K. lactis* normalmente encuentra la galactosa en forma de lactosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa). La capacidad de esta levadura de metabolizar este disacárido viene determinada por la presencia de los genes *LAC12* y *LAC4* que codifican una lactosa/galactosa permeasa y una β -galactosidasa, respectivamente. Por último, la galactosa es

metabolizada por la ruta Leloir, cuyo producto final es glucosa 6-fosfato que entra en la glucólisis (revisión Rubio-Teixeira, 2005).

El enzima β -galactosidasa de *K. lactis* ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria (Panesar y col., 2010). Entre sus aplicaciones cabe destacar su uso en la obtención de alimentos libres de lactosa. La intolerancia a la lactosa se debe a una deficiencia de enzima β -galactosidasa, que conduce a una digestión incompleta de la lactosa de la dieta, apareciendo entonces los trastornos intestinales. La eliminación parcial o total de la lactosa de la dieta conduce a un alivio de los síntomas de la enfermedad.

Asimismo, el enzima β -galactosidasa también es capaz de realizar reacciones de transgalactosidación para formar galactooligosacáridos (GOS). Los GOS son carbohidratos no digeribles constituidos principalmente por galactosa que estimulan el crecimiento y la actividad de bacterias beneficiosas en el colon (Rodríguez-Colinas y col., 2014).

El tratamiento de los efluentes de la industria alimentaria supone un coste adicional sobre el precio final de los alimentos. En concreto, el suero producido en la industria quesera posee un elevado poder contaminante debido a su elevada DBO (Demanda Biológica de Oxígeno). La mejor solución a la hora de eliminar este residuo es su conversión en productos de valor añadido. Dicha conversión puede ser llevada a cabo mediante microorganismos capaces de asimilar la lactosa como es el caso de *K. lactis* (Prazeres y col., 2012).

El uso de *Kluyveromyces* no se limita a la producción de β -galactosidasa, ya que esta levadura ha resultado ser un hospedador eficiente de proteínas heterólogas. De hecho, más de cuarenta proteínas han sido producidas por *Kluyveromyces* (Van Ooyen y col, 2006). Como ejemplo se puede mencionar la expresión a escala industrial de la proquimosina bovina que se utiliza en la elaboración de quesos. Por otra parte, el promotor del gen que codifica la β -galactosidasa de *K. lactis* es uno de los que más se emplea para la expresión de genes heterólogos.

3. Ruta de señalización por glucosa en *K. lactis*

La mayoría de los genes involucrados en el metabolismo central y sus respectivos reguladores muestran un elevado grado de conservación en *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Wésolowski-Louvel y col., 1996). Aun así, como ya hemos introducido, existen importantes diferencias en los mecanismos que gobiernan el metabolismo central de estas levaduras. La ruta de señalización por glucosa representa un buen ejemplo de dichas diferencias. Durante la caracterización de mutantes afectados en la desrepresión se identificaron los genes *FOG1* y *FOG2* (Fermentative and Oxidative Growth). Los mutantes *fog* son incapaces de crecer en fuentes de carbono tales como la galactosa, el etanol y el glicerol (Goffrini y col., 1996). El gen

FOG2 codifica para una serina/treonina proteína quinasa homóloga a la proteína Snf1 de *S. cerevisiae* tanto a nivel estructural como funcional, mientras que el gen *FOG1* codifica para una proteína que presenta elevada homología con los miembros de la familia génica de *S. cerevisiae* *GAL83/SIP1/SIP2*. Como se comentó anteriormente, en *S. cerevisiae* las tres subunidades β son capaces de constituir un heterotrímero funcional. Sin embargo, en *K. lactis* la presencia de Fog1 es necesaria para que se pueda formar un complejo funcional, lo que indica que en esta levadura sólo existe una única subunidad β y por lo tanto sólo existe un complejo SNF1 (Goffrini y col., 1996).

La proteína activadora KICat8 representa otro buen ejemplo de las diferencias existentes en la regulación de esta ruta. Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la expresión de *KICAT8* es independiente del represor KIMig1 (Hedges y col, 1995; Charbon y col., 2004). Aunque al igual que ScCat8, también KICat8 es necesario para el uso de sustratos con esqueleto de dos carbonos como el etanol o el acetato; sin embargo, su presencia no es indispensable durante el crecimiento en glicerol. En relación a este comportamiento, también se ha observado que el nivel de activación de KICat8 es menor en glicerol que en etanol, debiéndose estas diferencias, probablemente, a un diferente nivel de activación del complejo o a una diferente localización del mismo en ambas fuentes de carbono (Georis y col., 2000; Charbon y col., 2004). Otra importante diferencia consiste en que en *K. lactis* la expresión de los enzimas claves de la ruta gluconeogénica, fructosa 1,6-bisfosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa no está mediada por KICat8, lo que implica que en esta levadura la ruta gluconeogénica y el ciclo del glioxilato no están regulados de forma coordinada (Georis y col., 2000). Mientras que en *S. cerevisiae* la ausencia de la proteína activadora Sip4 no altera significativamente el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Vincent y Carlson, 1998), el mutante *Klsip4A* es incapaz de crecer en etanol, lo cual pone de manifiesto que este factor de transcripción juega un papel más importante en *K. lactis* (Rodicio y col., 2008).

En nuestro laboratorio se está estudiando la ruta de señalización por utilizando el gen *KIICL1* como marcador. En el promotor del gen *KIICL1* se han identificado dos elementos CSRE cuya actividad es dependiente de KICat8 y KISip4; aunque hasta el momento sólo se ha podido demostrar la unión del segundo a dichas secuencias. Asimismo, también se sabe que la expresión del gen está sujeta tanto a represión por glucosa como a represión por glicerol; y que en ambos casos la regulación actúa a nivel de los elementos CSRE (López y col., 2004; Rodicio y col., 2008).

4. Mantenimiento del balance redox en *K. lactis*

En *K. lactis* la glucosa es metabolizada principalmente a través de la ruta de las pentosas fosfato (Jacoby y col., 1993), en la cual las reacciones de oxidación utilizan NADP^+

como cofactor. Esto implica que la relación NADPH/NADP⁺ juega un papel más importante en esta levadura; de hecho muchos de los enzimas que en *S. cerevisiae* son NADH-dependientes, en *K. lactis* pueden utilizar ambos cofactores.

La reoxidación del NAD(P)H citosólico puede tener lugar a través de KINde1, una deshidrogenasa mitocondrial dependiente de NAD(P)H que transfiere electrones directamente a la ubiquinona (Tarrío y col., 2005, 2006a). Al analizar el nivel de acumulación de glicerol en la cepa *KInde1Δ* se observó que este mutante produce más glicerol que la cepa silvestre. Esto indica que el mutante sintetiza glicerol para mantener el balance redox y también pone de manifiesto la incapacidad de la lanzadera del G 3-P para reoxidar el exceso de NAD(P)H. La falta de operatividad de la lanzadera hizo sospechar que la ausencia de *KINDE1* podría afectar a la expresión del gen *KIGUT2*. En este sentido, el análisis Northern demostró que el nivel de ARNm de *KIGUT2* disminuye considerablemente en el mutante *KInde1Δ*, mientras que el nivel de ARNm de *KIADH3* (enzima que participa en la lanzadera del etanol-acetaldehído) no se ve afectado (Saliola y col., 2010). De forma similar la ausencia de *KIGUT2* disminuye el nivel de ARNm de *KINDE1* y aumenta el de *KIADH3*, lo que sugiere que la oxidación del etanol tiene lugar en la mitocondria en el mutante *Klgut2Δ* (Saliola y col., 2008).

En *K. lactis* se han identificado cuatro alcohol deshidrogenasas. Dos de ellas son citosólicas, KIAdh1 y KIAdh2 y son las responsables de la producción de etanol durante la fermentación. La expresión de los enzimas mitocondriales KIAdh3 y KIAdh4 es dependiente de fuente de carbono. En concreto, KIAdh4 se expresa en etanol, mientras que KIAdh3 se expresa durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables pero no en etanol (Saliola y col., 1990, 2006).

5. Regulación de la síntesis del glicerol: ruta HOG en *K. lactis*

Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en donde la respuesta a estrés osmótico ha sido ampliamente estudiada, se sabe poco sobre la ruta de señalización en condiciones de elevada osmolaridad en *K. lactis*. Hasta el momento se sabe que alguno de los elementos de la rama Sho1 de *S. cerevisiae* (apartado 3.3.2.) también forma parte de esta vía de señalización, como por ejemplo las quinasas KISte11, KISte20 y KISte50; y que la quinasa KIPbs2 juega un papel clave en la fosforilación de KIHog1. Sorprendentemente, la quinasa Ste7, involucrada en la vía de señalización por feromonas, es capaz de fosforilar a Hog1; sin embargo el análisis del mutante *Klpbs2Δ* puso de manifiesto que la fosforilación por parte de Ste7 es dependiente de KIPbs2 (Kawasaki y col., 2008).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La levadura *K. lactis* representa un interesante modelo para el estudio de la ruta de señalización por glucosa debido a algunas de sus características como su metabolismo típicamente respiratorio y sus aplicaciones biotecnológicas.

En este trabajo nos proponemos profundizar en la regulación de la vía de señalización KISNF1-KICat8/KISip4 en la levadura *K. lactis*. De esta forma, trataremos de concretar el papel de los factores de transcripción KICat8 y KISip4 en esta ruta, para lo cual, utilizaremos como modelo el sistema de regulación del gen *KIICLI*. También estudiaremos el papel que juegan en la regulación de la vía otros elementos como la quinasa KISak1 y la fosfatasa KIReg1, responsables del estado de activación de KISnf1.

Asimismo, intentaremos valorar si existe conexión entre el complejo de la quinasa SNF1 y el enzima glicerol 3-P deshidrogenasa KIGpd1, para lo cual estudiaremos su influencia sobre la ruta de señalización KISNF1-KICat8/KISip4. Finalmente, valoraremos la participación de esta deshidrogenasa en otros procesos celulares.

Para llevar a cabo este trabajo, nos proponemos los objetivos enumerados a continuación, los cuales se encuentran divididos en dos bloques:

- I. Ruta de señalización KISNF1-Cat8/Sip4 en *Kluyveromyces lactis*
 1. Caracterizar la regulación y distribución de las subunidades del complejo KISNF1.
 2. Analizar la regulación y distribución de los factores de transcripción KICat8 y KISip4, y estudiar su papel concreto en la vía de señalización KISNF1-KICat8/KISip4.
 3. Determinar si KISak1 y KIReg1 participan en la ruta de señalización KISNF1-KICat8/KISip4.

- II. Papel de KIGpd1 en la regulación de la vía KISNF1-Cat8/Sip4 y otras rutas de señalización
 4. Analizar si existe conexión entre la deshidrogenasa KIGpd1 y la vía de señalización KISNF1-KICat8/KISip4.
 5. Investigar el papel de KIGpd1 en la regulación del balance redox y en la respuesta a estrés osmótico.
 6. Analizar la regulación y la distribución de KIGpd1 en diferentes condiciones fisiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados

1.1. Bacterias

Se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* (Hanahan y col. 1991) para la amplificación y manipulación de todos los vectores y plásmidos requeridos en este trabajo.

1.2. Levaduras

Durante el desarrollo de esta investigación se han utilizado dos levaduras diferentes, con objeto de diferenciar los genes provenientes de cada una de ellas, siempre que nos refiramos a un gen de la levadura *K. lactis* se utilizará utilizará como nomenclatura el nombre de dicho gen precedido de *Kl*, mientras que en el caso de los genes de *S. cerevisiae* aparecerán precedidos de *Sc*.

Las cepas de *K. lactis* utilizadas en el presente trabajo se muestran en la siguiente tabla. Todas estas cepas pertenecen a la serie congénita MW270-7B o CBS2359. Los mutantes se obtuvieron mediante la sustitución del gen de interés por el marcador correspondiente. En el caso de la serie congénita CBS2359, los mutantes se obtuvieron a partir de una cepa *Klku80 Δ . *KlKu80* participa en la reparación del ADN, y su delección aumenta la frecuencia de recombinación homóloga. Posteriormente, los mutantes se cruzaron con una cepa silvestre, se seleccionaron diploides y una vez esporulados se separaron las esporas con un micromanipulador. Una vez analizados los segregantes, se eligió la cepa mutante de interés sin la mutación *Klku80 Δ de su fondo genético. Para la obtención de dobles mutantes se realizó el mismo proceso de cruzamiento. Dado que en nuestro laboratorio carecemos de micromanipulador, la obtención de segregantes ha sido llevada a cabo por J. Heinisch.**

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
Cepas derivadas de la serie MW270-7B		
MW270-7B	<i>MATa ura3(A1-1) leu2 met1-1</i>	Wesolowski-Louvel
RRO-69	<i>Klsnf4::KanMx</i> isogénica con MW270-7B	Este trabajo
RRO-73	<i>Klsnf1::KanMx</i> isogénica con MW270-7B	Este trabajo
RRO-113	<i>Klgal83::KanMx</i> isogénica con MW270-7B	Este trabajo
Cepas derivadas de la serie CBS2359		
RRO.114	<i>Klsnf4::KanMx</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.115	<i>Klgal83::HIS3</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo

RRO.116	<i>Klcat8::HIS3</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo
RRO.117	<i>Klsip4::KanMx</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.118	<i>Klsip4::KanMx</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo
RRO.119	<i>Klsak1::LEU2</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.120	<i>Klreg1::LEU2</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo
RRO.121	<i>Klgut1::HIS3</i> isogénica con KHO.75-11A	Este trabajo
RRO.122	<i>Klgsd1::LEU2</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.123	<i>Klgut2::KanMx</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.124	<i>Kladh3::HIS3</i> isogénica con KHO.70	Este trabajo
RRO.125	<i>Klgpp1::KanMX</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo
RRO.126	<i>Klhog1:: KanMX</i> isogénica con KHO.86-9A	Este trabajo
KDR1-1D	<i>Klsnf1::KanMX Kllac4::loxP MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	D. Rippert
KHO70	<i>MATa/MATa ura3/ura3 leu2/leu2 ku80::loxP/ku80::loxP HIS3/his3::loxP ADE2/ade2::loxP</i>	J. Heinisch
KHO46-12A	<i>MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO75-11A	<i>Kllac4::loxP MATa ura3 leu2 his3</i>	J. Heinisch
KHO86-9A	<i>Kllac4::loxP ku80::loxP MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KES2	<i>Kllac9::loxP MATa ura3 leu2 ade4 his3</i>	J. Heinisch
KHO197-1B	<i>Klsak1::ScLEU2 MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO91-4B	<i>Klgsd1::LEU2 MATa ura leu2 his3::loxP ade2::loxP</i>	J. Heinisch
KHO201-1C	<i>Klgsd1::LEU2 MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO141-6C-1	<i>Klgsd1::loxP Kllac9::loxP MATa ura3 leu 2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO91-10A	<i>Klgut2:KanMx MATa ura leu2 his::loxP</i>	J. Heinisch
KHO91-10C	<i>Klgsd1::LEU Klgut2::KanMx MATa ura leu2 his ade</i>	J. Heinisch
KHO118-1D	<i>Klgsd1::LEU2 Klgut2::KanMx Kladh3::HIS3</i>	J. Heinisch
KHO118-2B	<i>Kladh3::HIS3 MATa ura3 leu2</i>	J. Heinisch
KHO122-1D	<i>Klreg1::LEU2 Kllac4::loxP MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO132-1A	<i>Klreg1::LEU2 Kllac9::loxP MATa ura3 leu2</i>	J. Heinisch
KHO104-8A	<i>Klsip4::KanMx Kllac4::loxP MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO180-3C	<i>Klsip4::KanMx Kllac9::loxP MATa ura3 leu2</i>	J. Heinisch
KHO111-2A	<i>Klcat8::HIS3 Kllac4::loxP MATa ura3 leu2</i>	J. Heinisch
KHO181-10C	<i>Klcat8::ScHIS3 Kllac9::loxP MATa ura3 leu2</i>	J. Heinisch
KHO111-1B	<i>Klcat8::HIS3 Klsip4::KanMX Kllac4::loxP MATa ura3 leu2 his3::loxP</i>	J. Heinisch
KHO103-5B	<i>Klgpp1:: KanMx Kllac4::loxP MATa ura leu2 his</i>	J. Heinisch
KHO143-1C	<i>Klsnf1:: KanMX Kllac9::loxP MATa ura3 leu 2</i>	J. Heinisch

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo fueron:

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
HOD114-9B	<i>MATα ura3-52 his3ΔI leu2-3,112</i>	J. Heinisch
HOD114-2B	<i>Scgpd1::KanMX MATα ura3-52 his3ΔI leu2-3,112</i>	J. Heinisch
HOD114-9B	<i>Scgpd2::KanMX MATα ura3-52 his3ΔI leu2-3,112</i>	J. Heinisch
HOD120-1C	<i>Scgpd1::KanMX Scgpd2::KanMX MATα ura3-52 his3ΔI leu2-3,112</i>	J. Heinisch

2. Medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron tanto medios líquidos como medios sólidos, siendo la preparación y composición igual en ambos casos. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar al 2%.

La incubación de cultivos bacterianos se realizó a 37° C, mientras que los cultivos de levadura fueron crecidos a 28° C, teniendo lugar en ambos casos en un agitador orbital a 200 rpm cuando se trataba de medios líquidos o en una cámara de incubación para el caso de cultivos en placa. En medio líquido, las células se crecieron en matraces *Erlenmeyer* conteniendo el medio correspondiente un volumen no superior al 20% del recipiente, con el fin de conseguir una buena aireación. El crecimiento celular se determinó midiendo la turbidez del cultivo a una DO de 600 nm.

La esterilización de los medios se realizó en un autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos a 120° C.

2.1. Bacterias

Para el cultivo de bacterias se empleó medio L-Broth (LB), que está compuesto de triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 0,5%, a un pH de 7,5. En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, se adicionó el correspondiente antibiótico: ampicilina (100 mg/l) o kanamicina (25 mg/l).

2.2. Levaduras

Los medios utilizados para su cultivo fueron los siguientes:

YEP (Yeast Extract Peptone): medio complejo cuya composición incluye extracto de levadura al 1% y peptona al 2%, suplementado con glucosa al 4% (YEPD).

SC (Synthetic Complete): medio sintético que consta de YNB (Yeast Nitrogen Base: medio base nitrogenado con sulfato amónico y sin aminoácidos) al 0,67%, al cual se le añaden los aminoácidos y las bases nitrogenadas requeridas. Como fuente de carbono y energía se

suministró glucosa al 4% (SCD), etanol al 3% (SCE), glicerol al 3% (SCG), ácido oleico al 0,1 % (SCO), lactosa al 2 % (SCL). El pH se igualó a 6.

Para crecer las levaduras en condiciones anaeróbicas se utilizó una jarra de anaerobisis de la marca comercial Oxoid. En el caso de *K. lactis* al medio mínimo con glucosa se le añadió ergosterol al 0,5%.

En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, diferente a las auxotroffias clásicas, se utilizó el antibiótico geneticina (G418) en una concentración 200 mg/l para el crecimiento de *S. cerevisiae* y 100 mg/l en el caso de *K. lactis*.

3. Vectores de clonación, plásmidos y oligonucleótidos

3.1. Vectores de clonación

Los vectores de clonación utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pUK1921	Plásmido multicopia en <i>E. coli</i> . Contiene el gen de resistencia a kanamicina y el fragmento α del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> que permite la selección de colonias β -galactosidasa positivas con X-Gal.	Heinisch, 1993
pCXJ18	Plásmido monocopia en <i>K. lactis</i> . Contiene el gen <i>URA3</i> como marcador para levaduras. Multicopia en <i>E. coli</i> , contiene el gen de resistencia a ampicilina.	Chen, 1996
pCXJ22	Plásmido multicopia en <i>K. lactis</i> y monocopia en <i>S. cerevisiae</i> . Contiene el gen <i>URA3</i> como marcador para levaduras. Multicopia en <i>E. coli</i> , contiene el gen de resistencia a ampicilina.	Chen, 1996
pXW3	Posee un sitio de clonación múltiple localizado antes del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , que permite la clonación de promotores de levadura que contengan un ATG iniciador, en pauta de lectura con la β -galactosidasa.	Chen y col., 1992
pUG6	Plásmido empleado para generar por PCR un casete para sustituir un gen por el gen <i>KanMX</i> .	Güldener y col., 1996
pFAa-13Myc-KanMX	Plásmido empleado para generar por PCR un casete para etiquetar el extremo C-terminal de un gen con Myc.	Longtine y col., 1998
pFAa-GFP(S65T)-KanMX	Plásmido empleado para generar por PCR un casete para etiquetar el extremo C-terminal de un gen con GFP.	Wach y col., 1997

pJJH1570	Plásmido para el ensayo de un híbrido que lleva incorporado un fragmento que codifica el dominio de unión al ADN del gen <i>GAL4</i> . Se expresa bajo el control del promotor constitutivo <i>KIPGK1</i> . Porta un origen de replicación para <i>E. coli</i> junto con el marcador de resistencia a ampicilina. Contiene el gen <i>LEU2</i> como marcador para levaduras.	J. Heinisch
-----------------	---	-------------

3.2. Plásmidos

A continuación se describe como se obtuvieron los plásmidos utilizados en este trabajo. Hemos dispuesto esta descripción en bloques diferentes según haya sido la estrategia utilizada para la obtención de los plásmidos.

3.2.1. Clonación de genes silvestres

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pKISNF1	Expresa el gen <i>KISNF1</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.250 y 07.251.	Este trabajo
pKISNF4	Expresa el gen <i>KISNF4</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/EcoRI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.248 y 07.249.	Este trabajo
pKIGAL83	Expresa el gen <i>KIGAL83</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/EcoRI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos Ovi.199 y 06.158.	Este trabajo
pKICAT8	Expresa el gen <i>KICAT8</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/XbaI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.16 y 06.17.	Este trabajo
pKISIP4	Expresa el gen <i>KISIP4</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/PstI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.135 y 06.143.	S. Cuadrado
pCXJ22-KISIP4	Expresa el gen <i>KISIP4</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pCXJ22. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.135 y 06.143.	S. Cuadrado
pKIGPD1	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.54 y 06.61.	S. Cuadrado
pCXJ22-KIGPD1	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ22. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.54 y 06.61.	Este trabajo
pScGPD1	Expresa el gen <i>ScGPD1</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.001 y 14.002.	Este trabajo
pScGPD2	Expresa el gen <i>ScGPD2</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/PstI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.003 y 14.004.	Este trabajo

pCXJ22- ScGPD1	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del vector pCXJ22. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.001 y 14.002.	Este trabajo
pCXJ22- ScGPD2	Expresa el gen <i>ScGPD2</i> bajo el control de su propio promotor. Integrado en el sitio <i>BamHI/PstI</i> del vector pCXJ22. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.003 y 14.004.	Este trabajo

3.2.2. Clonación de promotores

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pKISNF1p-lacZ	Inicialmente, se amplificó por PCR el promotor y las primeras bases del gen <i>KISNF1</i> utilizando los oligos 07.251 y 07.290. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKISNF4p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KISNF4</i> utilizando los oligos 07.249 y Ovi.198. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKIGAL83p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIGAL83</i> utilizando los oligos Ovi.199 y Ovi.200. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKICAT8p-lacZ	Inicialmente, se amplificó por PCR el promotor y las primeras bases del gen <i>KICAT8</i> utilizando los oligos 06.18 y 06.20. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKISIP4p-lacZ	Inicialmente, se amplificó por PCR el promotor y las primeras bases del gen <i>KISIP4</i> utilizando los oligos 06.13 y 06.25. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKIGPD1pM1-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIGPD1</i> utilizando los oligos 06.61 y 06.62. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKIGPD1pM52-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIGPD1</i> utilizando los oligos 06.61 y 14.306. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKIICL1p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIICL1</i> utilizando los oligos OLI.13 y OLI.26. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	R. Rodicio

pKIMLS1p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIMLS1</i> utilizando los oligos 14.246 y 14.247. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pKIACS2p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIACS1</i> utilizando los oligos OLI.76 y OLI.77. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/HindIII</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	R. Rodicio
pKIACS2p-CSRE-lacZ	Mediante PCR se amplificó el la secuencia del elemento CSRE-B de <i>KIICL1</i> , que posteriormente se clonó en el sitio <i>BamHI/XbaI</i> del plásmido pKIACS2p-lacZ.	R. Rodicio
pKIGPP1p-lacZ	Mediante PCR se amplificó el promotor y las primeras bases del gen <i>KIGPDI</i> utilizando los oligos Ovi.140 y Ovi.153. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pXW3, en pauta con el gen <i>lacZ</i> .	D. Ríos

3.2.3. Etiquetado de genes

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pKISNF1-Myc	Expresa el gen <i>KISNF1</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.253 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF4-Myc	Expresa el gen <i>KISNF4</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.252 y 07.289.	Este trabajo
pKIGAL83-Myc	Expresa el gen <i>KIGAL83</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.136 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF1-T190A-Myc	Expresa el gen <i>KISNF1-T190A</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.253 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF1-T190D-Myc	Expresa el gen <i>KISNF1-T190D</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 07.253 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF1-GFP	Expresa el gen <i>KISNF1</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.83 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF4-GFP	Expresa el gen <i>KISNF4</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.82 y 07.289.	Este trabajo
pKIGAL83-GFP	Expresa el gen <i>KIGAL83</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.27 y 06.28.	Este trabajo
pCXJ22-KISNF1-GFP	Plásmido multicopia. Expresa el gen <i>KISNF1</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.83 y 07.247.	Este trabajo

pCXJ22- KISNF4-GFP	Plásmido multicopia. Expresa el gen <i>KISNF4</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.82 y 07.289.	Este trabajo
pCXJ22- KIGAL83-GFP	Plásmido multicopia. Expresa el gen <i>KIGAL83</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.27 y 06.28.	Este trabajo
pKICAT8-Myc	Expresa el gen <i>KICAT8</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.03 y 07.247.	Este trabajo
pKISIP4-Myc	Expresa el gen <i>KISIP4</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.01 y 07.247.	Este trabajo
pKICAT8-GFP	Expresa el gen <i>KICAT8</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.03 y 06.04.	Este trabajo
pKISIP4-GFP	Expresa el gen <i>KISIP4</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Para su obtención se utilizaron los oligos 06.01 y 06.02.	Este trabajo
pGAL4BD- mCherry	Expresa el dominio de unión a ADN y la secuencia de localización nuclear de <i>GAL4</i> , fusionado a mCherry y bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGK1</i> .	J. Heinisch
pKIGPD1-Myc	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos Ovi.179 y 07.247	Este trabajo
pKIGUT2-Myc	Expresa el gen <i>KIGUT2</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 11.165 y 07.289.	Este trabajo
pKIADH3-Myc	Expresa el gen <i>KIADH3</i> , bajo su propio promotor, fusionado a Myc. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.342 y 07.247.	Este trabajo
pKIGPD1-GST	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GST. Para su obtención se utilizaron los oligos Ovi.179 y 07.247.	Este trabajo
pmCherry-SKL	Expresa el gen que codifica para la proteína fluorescente mCherry fusionada a la secuencia de localización peroxisomal SKL, y bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGK1</i> .	J. Heinisch
pMit-mCherry	Expresa la secuencia que codifica para la señal mitocondrial de Cox4 fusionada a mCherry, y bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGK1</i> .	J. Heinisch
pKIGPD1-N37- mCherry	Expresa la secuencia del gen <i>KIGPD1</i> que codifica para los primeros 37 aminoácidos, bajo su propio promotor, fusionado a mCherry.	Este trabajo
pKIGPD1-N70- mCherry	Expresa la secuencia del gen <i>KIGPD1</i> que codifica para los primeros 70 aminoácidos, bajo su propio promotor, fusionado a mCherry.	Este trabajo
pKIGPD1- ΔPTS2-GFP	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la secuencia PTS2 delecionada, y fusionado a GST.	Este trabajo

3.2.4. Construcción de mutantes

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pKISNF1-T190A	Expresa el gen <i>KISNF1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación T190A. Integrado en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.342 y 07.247.	Este trabajo
pKISNF1-T190D	Expresa el gen <i>KISNF1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación T190D. Integrado en el sitio <i>Sall/HindIII</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.342 y 07.247.	Este trabajo
pKICAT8-S661E	Expresa el gen <i>KICAT8</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación S661E. Integrado en el sitio <i>Sall/XbaI</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 13.242 y 13.241.	Este trabajo
pKIGPD1-S53A	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación S53A. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.014 y 14.015.	Este trabajo
pKIGPD1-S53E	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación S53E. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ18. Para su obtención se utilizaron los oligos 14.016 y 14.017.	Este trabajo
pKIGPD1-SSAA	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación S63/64/67/69A. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ18.	Este trabajo
pKIGPD1-SSEE	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la mutación S63/64/67/69E. Integrado en el sitio <i>BamHI/Sall</i> del vector pCXJ18.	Este trabajo
pKIGPD1-Δ37	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la secuencia que codifica para los primeros 37 aminoácidos delecionada.	Este trabajo
pKIGPD1-ΔPTS2	Expresa el gen <i>KIGPD1</i> , bajo el control de su propio promotor, con la secuencia PTS2 delecionada.	Este trabajo

3.2.5. Plásmidos para el experimento de un híbrido

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE
pKIGALABD-KICAT8AD	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado con la ORF del gen <i>KICAT8</i> (salvo el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-1	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (salvo el dominio de unión a ADN, sin la secuencia que codifica para los 139 aminoácidos iniciales de KISip4), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo

pKIGALABD-KISIP4AD-2	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 235 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-3	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 508 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-4	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 617 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-5	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 649 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-6	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 677 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-7	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 391 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN), bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo
pKIGALABD-KISIP4AD-8	Contiene el dominio de unión a ADN de Gal4, fusionado la ORF del gen <i>KISIP4</i> (sin la secuencia que codifica para los 235 aminoácidos iniciales de <i>KISip4</i> que incluye el dominio de unión a ADN) y bajo la expresión del promotor constitutivo <i>KIPGKI</i> .	Este trabajo

3.3.Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados durante la realización de este trabajo fueron suministrados por la compañía Sigma-Aldrich. Su secuencia se muestra en la siguiente tabla.

OLIGO	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
Ovi.198 <i>KISNF4</i> pXW3- <i>HindIII</i> 3'	GGCGAAGCTTAGCTCAATGGTCTGCTGATC	Subclonación del promotor del gen <i>KISNF4</i>
Ovi.199 <i>KIGAL83</i> pXW3- <i>Sall</i> 5'	GGCAGTCGACATCCAGATCATCCAGTCAGG	Subclonación del promotor del gen <i>KIGAL83</i>
Ovi.200 <i>KIGAL83</i> pXW3- <i>HindIII</i> 3'	GGCGAAGCTTCTAACGTTCTGAGACATAGTTG	Subclonación del promotor del gen <i>KIGAL83</i>
Ovi.237 <i>KIGALBD KICAT8</i> 5'	GAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTG TATCGCCGTATAGTAACAGCAAGGACGAA	Subclonación de <i>KICAT8</i> sin los 259 aa iniciales en el plásmido pJH1570

Ovi.238 <i>KIGALBD KISIP4 5'</i>	GAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTG TATCGCCGACTGCACAGACGGGTGTTATT	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 140 aa iniciales en el plásmido pJH1570
03.44	GTATTGATGTTGGACGAGTCGG	Chequeos
03.45	GGAATTTAATCGCGCCTCG	Chequeos
06.01 <i>KISIP4 5'</i>	ACTGATTTTTCACTTTTCAACAATAAGATCGAC CACATCATAATCAAGGAGCGGATCCCCGGGTT AATTAA	Etiquetado del gen <i>KISIP4</i> usando como molde los vectores pFAa
06.02 <i>KISIP4 GFP 3'</i>	CTAGTGAACAGAATAAATATAGTAATAATTAT CATGAAAGGACTGAAGAGGAGATGACACGAA TTCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado del gen <i>KISIP4</i> con GFP
06.03 <i>KICAT8 5'</i>	CCCTAATTCTGCTGGTGATTCATCAGTGTCCGA TTTGCTGCGCTGGCAAATGGAAATCGGATCC CCGGTTAATTAA	Etiquetado del gen <i>KICAT8</i> usando como molde los vectores pFAa
06.04 <i>KICAT8 3'</i>	GTGTATATGTATTATTATACTTCTTATCCAATG CTATATACAGGATAGTACTTGGGAATTTCGAGC TCGTTTAAAC	Etiquetado del gen <i>KICAT8</i> usando como molde los vectores pFAa
06.13 <i>KISIP4 BamHI 5'</i>	GGGCGGATCCTATGCCAAGTGTTTCGCAGG	Subclonación de la ORF del gen <i>KISIP4</i>
06.16 <i>KICAT8 HindIII 5'</i>	GGGCTCTAGATGGTCGAGAAGAAAGATTCAGC	Subclonación de la ORF del gen <i>KICAT8</i>
06.17 <i>KICAT8 Sall 3'</i>	GGCAGTCGACGCTATATACAGGATAGTACTTG G	Subclonación de la ORF del gen <i>KICAT8</i>
06.18 <i>KICAT8 BamHI 5'</i>	GGGCGGATCCTCTAGACCAGTTCATGGAAGTA CCATCGG	Subclonación del promotor del gen <i>KICAT8</i>
06.20 <i>KICAT8 pXW3 HindIII 3'</i>	GGCGAAGCTTCGGCCAGCTGAATCTTTCTTC	Subclonación del promotor del gen <i>KICAT8</i>
06.27 <i>KIGAL83 GFP 5'</i>	GCTAGCATCGTTAGATACAAAAGAAAATATGC AACACAGATACTATATGCGCCATTGCAACGGA TCCCCGGGTTAATTAA	Etiquetado del gen <i>KIGAL83</i> con GFP
06.28 <i>KIGAL83 GFP 3'</i>	GCGGTATTATTAGCACGCGACTCAAAGTCTAC GTTTTTTTTGCTGCATTTTATTGAAATTCGGGA ATTTCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado del gen <i>KIGAL83</i> con GFP
06.54 <i>KIGPD1 Sall 3'</i>	GGCAGTCGACGGGTCCACCGTGCATGCCATTG	Subclonación de la ORF del gen <i>KIGPD1</i>
06.61 <i>KIGPD1 pXW3 BamHI 5'</i>	GGACGGATCCACGTGATGTGAAATCCCTCGC	Subclonación del promotor del gen <i>KIGPD1</i>
06.82 <i>KISNF4 GFP 5'</i>	TCCTAACTGGTGTCTCACTCTAAGCGATATCC TAAAATACATACTATTCGCAGAATCACGGATC CCCCGGTTAATTAA	Etiquetado del gen <i>KISNF4</i> con GFP
06.83	ACCCCTTTCTACATTTAGCAACCAGGCTGATTA	Etiquetado del gen

Materiales y Métodos

<i>KISNF1</i> GFP 5'	TGGAACTTGCAGTGAATAGCCAAGGAAGTCGG ATCCCCGGGTAAATTA	<i>KISNF1</i> con GFP
06.135 <i>KISIP4</i> BglIII 5'	GGCAAGATCTGACACATCATCACCATTC	Subclonación del promotor del gen <i>KISIP4</i>
06.136 <i>KIGAL83</i>	GCTAGCATCGTTAGATACAAAAGAAAATATGC AACACAGATACTATATGCGCCATTGCAACGGA TCCCCGGGTAAATTA	Etiquetado del gen <i>KIGAL83</i>
06.143 <i>KISIP4</i> 3'	ACACTTGGTCATGGATATAGTTTGGG	Subclonación del promotor del gen <i>KISIP4</i>
06.148 <i>KICAT8</i> 3'	GGTGAAGGCGCAGTGATTGCCAC	Subclonación del promotor del gen <i>KICAT8</i>
06.158 <i>KIGAL83</i> HindIII 3'	CGGCAAGCTTATTATGACCTCGATCACTTCC	Subclonación del promotor y la secuencia codificante del gen <i>KIGAL83</i>
07.247 pCXJ18 3'	GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA GCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTGAATTC GAGCTCGTTTAAAC	Casete de etiquetado usando como molde los vectores pFAa
07.248 <i>KISNF4</i> EcoRI 3'	GGCGGAATTCGTCAGACAGACGAAGCTGGAG	Subclonación del promotor y la secuencia codificante del gen <i>KISNF4</i>
07.249 <i>KISNF4</i> pXW3-Sall 5'	GGCAGTCGACCAGGAAATGTGAGCAAATCCAC	Subclonación del promotor del gen <i>KISNF4</i>
07.250 <i>KISNF1</i> HindIII 3'	GGCGAAGCTTCGAGTGTTGTGAGCTAAGAGTA	Subclonación del promotor y la secuencia codificante del gen <i>KISNF1</i>
07.251 <i>KISNF1</i> pXW3-Sall 5'	GGCAGTCGACACCTATCTGCATATCTGGATAG	Subclonación del promotor del gen <i>KISNF1</i>
07.252 <i>KISNF4</i>	TCCTAACTGGTGTCTCACTCTAAGCGATATCC TAAAATACATACTATTCGCAGAATCACGGATC CCCCGGGTAAATTA	Etiquetado del gen <i>KISNF4</i>
07.253 <i>KISNF1</i>	ACCCCTTTCTACATTTAGCAACCAGGCTGATTA TGGAACTTGCAGTGAATAGCCAAGGAAGTCGG ATCCCCGGGTAAATTA	Etiquetado del gen <i>KISNF1</i>
07.289 pCXJ18 3'	TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC AGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGGAATTCGA GCTCGTTTAAAC	Casete de etiquetado usando como molde los vectores pFAa
07.290 <i>KISNF1</i> pXW3-HindIII 3'	GGCGAAGCTTGTCAGCTGGCGTTGGTGAT	Subclonación del promotor del gen <i>KISNF1</i>
07.304 <i>KISNF4</i> del 5'	ACAGATGCCTGCAAGCAGTGATAAACTTCAAC CGAAAGATCAGCAGACCATTGAGCTCTTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Sustitución del gen <i>KISNF4</i> por el gen <i>KanMX</i>
07.305 <i>KISNF4</i> del 3'	AGGATATCGCTTAGAGTGAGAACACCAGTTAG GAATCCGTTTGAATCGACGACCCGCATAGGC	Sustitución del gen <i>KISNF4</i> por el gen <i>KanMX</i>

	CACTAGTGGATCTG	
12.434 <i>KISIP4</i> 3'	TTGAAGTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTATCTA CGATTACTACTCCTTGATTATGATGTGGTTCG	Subclonación de <i>KISIP4</i> en el plásmido pJH1570
12.435 <i>KICAT8</i> 3'	TTGAAGTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTATCTA CGATTATCAATTTCCATTTTGCCAGCGCAG	Subclonación de <i>KICAT8</i> en el plásmido pJH1570
13.241 <i>KICAT8-S661E</i> 5'	ACCACCTAGTACAGCTTCAGGACATCGATGTA ACCTTAGT	Sustitución del residuo Ser 661 de <i>KICAT8</i> por Glu
13.242 <i>KICAT8-S661E</i> 3'	ACTAAGGTTACATCGATGTCCTGAAGCTGTAC TAGGTGGT	Sustitución del residuo Ser 661 de <i>KICAT8</i> por Glu
13.243 <i>KIGALBD KISIP4</i> 1H 237 5'	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGGTTCTATCGTACCTTAACCG	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 236 aa iniciales en el plásmido pJH1570
13.244 <i>KIGALBD KISIP4</i> 1H 510 5'	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGGGTATCACTTTGGTATACCTCG	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 509 aa iniciales en el plásmido pJH1570
14.001 <i>ScGPD2 Sall</i> 3'	GAGCGTCGACGATAACAGAAAAGGTTATGGC	Subclonación de la ORF del gen <i>ScGPD2</i>
14.002 <i>ScGPD2 BamHI</i> 5'	GCGCGGATCCTATGTGCAATCACCAAGGTCG	Subclonación de la ORF del gen <i>ScGPD2</i>
14.003 <i>ScGPD1 Sall</i> 3'	GAGCGTCGACGATAACAGAAAAGGTTATGGC G	Subclonación de la ORF del gen <i>ScGPD1</i>
14.004 <i>ScGPD2 BamHI</i> 5'	GCGCGGATCCTATGTGCAATCACCAAGGTCG	Subclonación de la ORF del gen <i>ScGPD1</i>
14.014 <i>KIGPD1-S53A</i> 5'	CACAAACACGATTTCCAACATGGCTCCAGCTT CCGATAGATTAAGC	Sustitución del residuo Ser 53 de <i>KIGPD1</i> por Ala
14.015 <i>KIGPD1-S53A</i> 3'	GCTTTAATCTATCGGAAGCTGGAGCCATGTTG GAAATCGTGTTTGTG	Sustitución del residuo Ser 53 de <i>KIGPD1</i> por Ala
14.016 <i>KIGPD1-S53E</i> 5'	CACAAACACGATTTCCAACATGGAACCAGCTT CCGATAGATTAAGC	Sustitución del residuo Ser 53 de <i>KIGPD1</i> por Glu
14.017 <i>KIGPD1-S53E</i> 3'	GCTTTAATCTATCGGAAGCTGGTTCCATGTTGG AAATCGTGTTTGTG	Sustitución del residuo Ser 53 de <i>KIGPD1</i> por Glu
14.065 <i>KISNF1-T190A</i> 5'	AATGACAGATGGTAACTTTTTGAAGGCTTCAT GTGGATCCCCAAATTATGCGGCCCCAGA	Mutagénesis dirigida
14.066 <i>KISNF1-T190A</i> 3'	TCTGGGGCCGCATAATTTGGGGATCCACATGA AGCCTTCAAAAAGTTACCATCTGTCATT	Mutagénesis dirigida
14.246 <i>KIMLS1 pXW3-Sall</i> 5'	GGCAGTCGACACAAGCTGACGTTACTCAAGC	Subclonación del promotor del gen <i>KIMLS1</i>
14.247 <i>KIMLS1 pXW3-HindIII</i> 3'	GGCGAAGCTTGGAGAGAATTGAGGTTTGGT	Subclonación del promotor del gen <i>KIMLS1</i>

14.261 <i>KISNF1-T190D 5'</i>	AATGACAGATGGTAACTTTTTGAAGGATTCAT GTGGATCCCCAAATTATGCGGCCCCAGA	Mutagénesis dirigida
14.262 <i>KISNF1-T190D 3'</i>	TCTGGGGCCGCATAATTTGGGGATCCACATGA ATCCTTCAAAAAGTTACCATCTGTCATT	Mutagénesis dirigida
14.263 <i>KIGALBD KISIP4 1H 619 5'</i>	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGGGCATGTCAGATATTTACCAACCAT	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 618 aa iniciales en el plásmido pJJH1570
14.264 <i>KIGALBD KISIP4 1H 651 5'</i>	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGGACGATGCCAATGATAACATAAT	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 650 aa iniciales en el plásmido pJJH1570
14.306 <i>KIGPDI pXW3 Sali 3'</i>	GGCGGTTCGACAGAAAGAATCGAGGAAGTTTG C	Subclonación del promotor del gen <i>KIGPDI</i>
15.072 <i>KIGALBD KISIP4 1H 679</i>	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGAAGAGGCGAAGCATGGGTCA	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 678 aa iniciales en el plásmido pJJH1570
15.087 <i>KIGALBD KISIP4 H 552R</i>	TTGAAGTGAACCTGCGGGTTTTTTCAGTATCTA CGATTactaCGAATTTATTGGTTTCACGTTTGA	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 165 aa finales en el plásmido pJJH1570
15.088 <i>KIGALBD KISIP4 H 393</i>	GTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGTCAACGTCAAAGGTTATTAGGC	Subclonación de <i>KISIP4</i> sin los 392 aa iniciales en el plásmido pJJH1570
15.070 <i>KISIP4 ChIp 5'</i>	TACACCATTTCGGACTTGTGACTT	Experimento ChIp. Promotor <i>KISIP4</i>
15.071 <i>KISIP4 ChIp 3'</i>	GCGTTAGTAGTGTGTAATTCAG	Experimento ChIp. Promotor <i>KISIP4</i>
15.089 <i>KIICLI ChIp 5'</i>	ACAGAACGCTCACACGGTTGA	Experimento ChIp. Promotor <i>KIICLI</i>
15.090 <i>KIICLI ChIp 3'</i>	GTCCAGATCCCAGTATGCCTA	Experimento ChIp. Promotor <i>KIICLI</i>

4. Técnicas de manipulación del ADN

4.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

Se empleó de forma rutinaria el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979, cuya base es la desnaturalización del ADN cromosómico mediante la alcalinización con NaOH en condiciones en las que el ADN plasmídico permanece inalterado.

Para la obtención de un ADN más purificado se utilizó el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation* de Roche, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

4.2. Aislamiento de ADN plasmídico de levaduras

Para la obtención de ADN plasmídico de levaduras se empleó el kit comercial *High Pure Plasmid Isolation* de Roche. Inicialmente se añadieron 250 µl de la solución de ARNasa y la misma cantidad de *Ballotini* a las células de levadura. Las células se rompieron en tres tandas de 60 segundos de ruptura y 60 segundos en hielo. El resto del protocolo se realizó como está descrito por la casa comercial.

4.3. Análisis de restricción de ADN y construcción de plásmidos

La digestión del ADN se llevó a cabo mediante las endonucleasas de restricción suministradas por Roche y Fermentas, siguiendo las indicaciones recomendadas por las casas comerciales.

4.4. Construcción de plásmidos

La construcción de los distintos plásmidos recombinantes se realizó mediante la subclonación de fragmentos de ADN en los vectores descritos anteriormente. Tanto el fragmento a subclonar como el vector se digirieron con los enzimas de restricción adecuados. Cuando el vector se digirió con un solo enzima se trató a continuación con fosfatasa alcalina para evitar así su religación.

La purificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial *High Pure PCR Product Purification* de Roche.

Las ligaciones se realizaron en un volumen de 50 µl añadiendo 1 U de ADN ligasa del fago T4 (Roche) para una proporción de vector-inserto de 1:25 a 1:50. Se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

4.5. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles horizontales de agarosa siguiendo el protocolo de Meyers y col. (1976). Para ello se emplearon geles al 1% de agarosa disuelto en TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 2 mM, a pH 8,3). Las bandas se visualizaron por tinción de los geles con bromuro de etidio. Como patrón de los tamaños de fragmentos de ADN se utilizó el ADN del fago λ (Roche) digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

4.6. Transformación de bacterias

Se prepararon células competentes de *E. coli* siguiendo el método descrito por Hanahan (1985) con algunas modificaciones. En primer lugar las células son tratadas con solución RF1 (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato potásico 30 mM y glicerol 10 mM, a pH 5,8) y en segundo lugar con solución RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 15%,

a pH 6,8), para a continuación almacenarlas a -70°C hasta el momento de su uso. Se añadió ADN plasmídico en una proporción de 50 ng de ADN por cada 2×10^8 células, sembrándose a continuación en medio de cultivo selectivo. Los plásmidos recombinantes derivados del vector pUK1921 se seleccionaron adicionando al medio el sustrato cromogénico X-Gal.

4.7. Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras se siguió en método descrito por Klebe y col. (1983). Las células se hicieron competentes a partir de un cultivo en fase exponencial tratándolas con una solución compuesta por sorbitol 1 M, bicina 10 mM y etilenglicol al 3%, a pH 8,35. A continuación se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

La cantidad de ADN plasmídico empleado para transformar fue de entre 5 y 20 μg de ADN por cada 2×10^8 células y 5 μl de ADN de salmón 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se añadió 5 μl de solución RF2 para la transformación de competentes de *K. lactis*. A continuación se incubaron una hora en presencia de PEG 1000 al 40%. La selección de levaduras transformadas se llevó a cabo mediante crecimiento en medio selectivo.

4.8. Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El protocolo a seguir fue diseñado por Mullis y col (1986) y modificado por Innis y col. (1990), empleando 1 μg de ADN molde, 0,1 μg de los oligonucleótidos correspondientes, 2,5 U de Taq ADN polimerasa (*High Fidelity Taq DNA polimerase 5 Prime* para clonar y DreamTaq polimerasa para chequeos) y 0,2 mM de dNTPs en un volumen final de 50 μl , sometidos a un proceso de 35 ciclos (20'' a 94° , 20'' a 58° , 120'' a 72°), que fue modificado dependiendo de la temperatura de fusión de los oligonucleótidos utilizados y del tamaño del producto de PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TPersonal de Biometra.

4.9. Mutagénesis dirigida por PCR

Para la obtención de mutaciones puntuales se siguió la siguiente metodología de mutagénesis: utilizando como molde un plásmido que contenía el gen completo, se prepararon dos mezclas de reacción; la primera incluía un oligo mutante *antisense* (M2) y un oligo externo 5' *sense*, la segunda contenía un oligo mutante *sense* (M1) y un oligo externo 3' *antisense*. Seguidamente, se realizó la primera PCR con el programa (20'' a 94° , 90'' a 55° , 60'' a 72°) y 35 ciclos. Posteriormente, los fragmentos de las dos PCRs se purificaron con el kit comercial *High Pure PCR Product Purification* de Roche.

A continuación se realizó una segunda PCR usando usando 5 μl de cada uno de las preparaciones de la primera PCR como molde y utilizando el programa: 20'' a 94° , 20'' a 58° ,

120'' a 72° y 35 ciclos. Después de 5 ciclos se paró la PCR y se añadieron los oligos externos 5' sense y 3' antisense, tras lo cual, se continuó la PCR. El producto obtenido se purificó, se digirió con los enzimas correspondientes a los sitios de restricción S1 y S2 y se subclonó en el plásmido adecuado.

4.10. Secuenciación

La determinación de la secuencia nucleotídica del ADN clonado se llevó a cabo por el método de Sanger (Servicio de Secuenciación de Secugen).

5. Métodos bioquímicos

5.1. Obtención de extractos proteicos libres de células

Se inocularon células de levadura en los medios requeridos y se crecieron a una temperatura de 28° C con una agitación de 200 rpm hasta una DO₆₀₀ de 2. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en primer lugar con agua y a continuación con tampón fosfato 50 mM a pH 7. Posteriormente, se rompieron con bolas de vidrio *Ballotini* (0,50 mm de diámetro) durante 10 minutos a 4° C en un IKA-VIBRAX-VXR, tras lo cual las muestras se pasaron a hielo y se les añadió 1,5 ml del mismo tampón fosfato. La suspensión obtenida se recogió y centrifugó a 4° C durante 20 minutos a 13.000 rpm.

5.2. Determinación de la cantidad de proteína

La cuantificación de proteína se realizó según el método de Zamenhof (1957). La recta patrón se obtuvo con seroalbúmina bovina.

5.3. Determinación de actividades enzimáticas

5.3.1. Determinación de la actividad β -galactosidasa

Se valoró siguiendo el método descrito por Miller (1972). La reacción se realizó en tampón Z (Na₂HPO₄H₂O 60 mM, NaH₂PO₄H₂O 40 mM, KCl 10 mM y MgSO₄7H₂O 1 mM ajustado a pH 7). La reacción enzimática se inició añadiendo el sustrato o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) a una concentración final de 0,8 mg/ml, siendo el volumen final de la reacción 1 ml. Las muestras se incubaron a 30° C durante un mínimo de 10 minutos, hasta la aparición de color. Posteriormente, se detuvo la reacción añadiendo 500 μ l de Na₂CO₃ 1 M. A continuación, se midió la absorbancia a 420 nm. La unidad de actividad específica se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar un μ mol de ONPG por minuto y por mg de proteína en las condiciones de ensayo descritas. El coeficiente de extinción molar para el o-nitrofenol es de $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.3.2. Determinación de la actividad isocitrato liasa

La actividad isocitrato liasa se valoró mediante el método descrito por Dixon y Kornberg (1959), modificado posteriormente por Herrero y col. (1985). La mezcla de ensayo contiene MgCl_2 5 mM, fenilhidracina-HCl 33 mM, cisteína 2 mM y DL-isocitrato 10 mM, disuelto en tampón fosfato potásico 60 mM a pH 7. La reacción se comenzó adicionando el extracto libre de células a la mezcla anterior. La formación inicial de glioxilato-fenilhidrazona se midió siguiendo el incremento en la absorción a 324 nm durante 5 minutos a 30° C. Definimos una unidad de actividad específica como la cantidad de enzima que transforma un μmol de DL-isocitrato por minuto y por miligramo de proteína en las condiciones de ensayo descritas. El coeficiente de extinción molar para el glioxilato-fenilhidrazona es de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.3.3. Determinación de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa

La determinación de la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa se ha realizado según el método descrito por Gancedo y Gancedo en 1971. La mezcla de reacción contiene KCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 10 mM, fructosa 1,6-bisfosfato 0,1 mM, NADP^+ 0,25 mM, 0,5 U de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 0,5 U de fosfoglucosa isomerasa por ensayo, todo ello en tampón imidazol-HCl 50 mM a pH 7. La reacción se comenzó adicionando extracto libre de células a la mezcla anterior. La formación de NADPH se midió siguiendo el incremento en la absorbancia a 340 nm, durante 5 minutos a 30° C. La unidad de actividad específica se define como la cantidad de enzima capaz de transformar un μmol de fructosa 1,6-bisfosfato por minuto y por miligramo de proteína en las condiciones de ensayo descritas anteriormente. El coeficiente de extinción molar del NADPH es de $6,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas presentes en los extractos libres de células se separaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol siguiendo, fundamentalmente, el método descrito por Britton y col. (1982). El gel de empaquetamiento se preparó a partir de una disolución de acrilamida 30% y N-N'-metilen-bisacrilamida al 0,8%. El gel de separación se elaboró a partir de la misma disolución al 10%.

El método se basa en que, en presencia del detergente aniónico SDS, las cadenas polipeptídicas se despliegan y unen cantidades de SDS proporcionales a su peso, de manera que la densidad de carga negativa es idéntica para todas las moléculas. Bajo la influencia de un campo eléctrico, éstas tenderán a migrar hacia el polo positivo, siendo el desplazamiento de las mismas inversamente proporcional al logaritmo de su masa molecular.

5.5. Tráferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (Polyvinylidene Fluoride)

La transferencia de proteínas separadas en geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) se llevó a cabo según el método descrito por Burnette (1981), utilizando el equipo comercializado por Bio-Rad. La transferencia se efectuó en un tampón que contiene Tris-HCl 25 mM a pH 8,8; glicina 192 mM y metanol al 20% v/v, aplicándose una diferencia de potencial constante de 100 V durante una hora.

6. Técnicas inmunológicas

6.1. Inmunodetección de antígenos: Western Blot

Para la obtención de los extractos proteicos libres de células se siguió el método descrito por Orlova y col. en 2008.

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una vez transferidas las proteínas al filtro, éste se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con la solución de bloqueo TBS-Tween (HCl 20 mM a pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,1%) más un 5% de leche desnatada en polvo. A continuación se añadió el anticuerpo primario (en la dilución correspondiente) a una nueva solución de bloqueo con leche, se desechó la que bañaba la membrana de PVDF y se adicionó la nueva con el anticuerpo sobre la misma, con la que permaneció en incubación durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se eliminó la solución con el anticuerpo primario y se lavó la membrana de PVDF durante media hora con TBS-Tween limpio sin leche (2 lavados de 15 ml y 15 minutos cada uno). Tras este tiempo, se adicionó el anticuerpo secundario (1:10.000) a una nueva solución de bloqueo con leche al 2,5% y se incubó con ella la membrana de PVDF durante una hora.

Posteriormente, la membrana se lavó de nuevo con TBS-Tween dos veces, se secó levemente y se reveló según las instrucciones de Pierce para el kit *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*.

6.2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIp)

Se siguió la metodología descrita en Alepuz y col. (2001) con las siguientes modificaciones: las células se crecieron en 50 ml de medio SC con los requerimientos nutricionales adecuados en cada caso. Cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀ de 2 se adicionaron 200 µl de formaldehído y se incubó durante una hora a temperatura ambiente

con agitación. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción agregando glicina a una concentración final de 125 mM y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos más.

Las células se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 5 veces con 25 ml de TBS frío (Tris HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µl de tampón de lisis (Hepes KOH 50 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato sódico 0,1%; PMSF 1 mM) y se rompió en un FastPrep tras adicionarle 400 µl de *ballotini*. El lisado celular se transfirió a tubos *Eppendorf* limpios y se sonicó en un *Bioruptor* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Después, el contenido del tubo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante (ADN-proteína solubilizado).

En este punto, se tomó una alícuota de 15 µl de cada muestra para utilizarla como control. A 200 µl del sobrenadante se adicionaron 2 µl del anticuerpo específico y se dejó en la noria toda la noche a 4°C. Posteriormente se agregaron 200 µl de la resina proteína *A-sepharosa* y se dejó la muestra en una noria durante 4 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con 1ml de PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM a pH 7,5), se resuspendió la resina en 100 µl de tampón de elución (SDS 1%; NaH₂CO₃ 100 mM) y se mantuvo en un bloque a 65°C durante 10 minutos. Después, se centrifugó 3 minutos a 1.500 rpm, se recogió el eluido y se incubó toda la noche a 65°C para revertir la unión de las proteínas al ADN (el control también se resuspendió en 100 µl de tampón de elución y siguió el mismo tratamiento. A partir de este punto, se manejó al igual que la muestra). Se centrifugó de nuevo un minuto a 1.500 rpm y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 100 µl de tampón TE (TrisHCl 10 mM a pH 8,0; EDTA 1 mM), 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 6 µl de glicógeno (10 mg/ml), incubándose una hora a 37°C.

Finalmente, se realizaron 2 extracciones con 300 µl de fenol/cloroformo y se precipitó el ADN con NaCl 5 M (4 µl por cada 100 µl de muestra) y un volumen de isopropanol durante 15 minutos a -20°C. El precipitado se resuspendió en 30 µl de TE y se realizó una PCR tomando 1µl de muestra y otro del control correspondiente (35 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 55°C y 30' a 72°C).

7. Microscopía de fluorescencia

7.1.Preparación de muestras

Las células se crecieron durante toda la noche en medio selectivo SCD, en agitación a 28° C. A continuación, las células se recogieron y se pasaron a los medios correspondientes, en donde permanecieron en agitación. Las preparaciones de muestras se elaboraron depositando 2 µl de cada cultivo sobre un portaobjetos y posteriormente, se colocó un cubreobjetos que se fijó con Fixogum.

7.2.Observación de las muestras y grabación de imágenes

La adquisición de las imágenes de microscopía in vivo se realizó utilizando un Zeiss Axioplan2e equipado con un objetivo 100x alpha-Plan Fluar y contraste de interferencia diferencial. La cámara utilizada fue una Photometrics CoolSNAP HQ. En cuanto a la microscopía de fluorescencia, se usó una lámpara Xenon, ajustándose las longitudes de onda de emisión y excitación a través del *filterset* (ajuste de filtro) 41-001. El programa usado fue el Metamorph v6.2. Las imágenes de campo claro se hicieron usando un objetivo de contraste de fases. El procesamiento de las imágenes así como la adición de barras de escala se realizó usando los programas Metamorphs y Huygens.

Las imágenes se escalan utilizando el comando Metamorphs Scale Image y se deconvolucionaron utilizando el software Huygens Essential (Scientific Volume Imaging BV, Hilversum, Netherlands).

RESULTADOS

RESULTADOS

I. Ruta de señalización SNF1-Cat8/Sip4 en *Kluyveromyces lactis*

El complejo SNF1 es un elemento clave en el mantenimiento de la homeostasis celular. Su función resulta esencial durante el crecimiento en fuentes de carbono alternativas a la glucosa.

La ruta de señalización KISNF1-KICat8/KISip4 regula la expresión de genes con elementos CSRE en sus promotores, como es el caso del gen *KIICL1*, enzima clave del metabolismo del etanol. En *S. cerevisiae*, el análisis de los elementos CSRE a los cuales se unen KICat8 y KISip4, demostraron que ambos factores de transcripción se unen a las diferentes variantes con diferente afinidad. Esto implica que estos factores de transcripción no poseen un papel equivalente en la activación de los genes que se regulan a través de elementos CSRE.

La quinasa KISak1 y la fosfatasa KIREg1 son dos elementos clave en la señalización por glucosa puesto que controlan el estado de fosforilación (y por lo tanto también el estado de activación) de la quinasa KISnf1. La delección de *KISAK1* y *KIREG1* permite valorar el efecto de la quinasa KISnf1 hipo e hiperfosforilada.

Debido a la importancia de los mecanismos de regulación por glucosa para la supervivencia celular y a la escasa información existente sobre la ruta de señalización SNF1-Cat8/Sip4 en *K. lactis*, en este trabajo nos hemos propuesto ampliar los conocimientos acerca de esta vía, centrándonos en el papel concreto de KICat8 y KISip4, y en la búsqueda de otros posibles elementos que afecten a la señalización.

1. Regulación del complejo KISNF1

1.1. Caracterización de mutantes en los genes *KISNF4*, *KISNF1* y *KIGAL83*

Como se comentó en la introducción, los mutantes *Klsnf1Δ* y *Klgal83Δ* fueron identificados por Goffrini y col., por su incapacidad de crecer en numerosas fuentes de carbono, tanto fermentables como no fermentables alternativas a la glucosa y posteriormente, los genes *KISNF1* y *KIGAL83* fueron clonados por su capacidad para complementar a los mutantes respectivos (Goffrini y col., 1996). Hasta el momento no se ha descrito la obtención y caracterización del mutante *Klsnf4Δ*.

En la actualidad se conoce el genoma completo de la levadura *K. lactis* (Dujon y col., 2004). Esto nos permitió realizar una búsqueda de genes que presentasen homología con el gen *SNF4* de *S. cerevisiae* (www.genolevures.org). El análisis llevó a la identificación de un

Resultados

candidato que denominamos *KISNF4* (número de acceso XP-455570.1). Este gen se encuentra en el cromosoma F y codifica una proteína de 328 aminoácidos que presenta una identidad del 75% con la proteína Snf4 de *S. cerevisiae* (www.sgdatabase.org) (figura 1).

Con el fin de estudiar la función del gen *KISNF4*, se procedió a la obtención de mutantes en dicho gen. La estrategia utilizada consistió en la sustitución del gen *KISNF4* por el marcador *KanMX* en el genoma de la levadura.



Figura 1. Alineamiento de la secuencia de la proteína KlSnf4 con su ortólogo en *S. cerevisiae*. Las proteínas KlSnf4 y ScSnf4 presentan un 75% de identidad. Los aminoácidos idénticos se señalan con un asterisco azul. En verde se indica la secuencia del dominio CBS1, en rosa el CBS2, en naranja en CBS3 y en rojo el CBS4.

En primer lugar, se obtuvo un fragmento de ADN mediante PCR que contiene el gen *KanMx* (que confiere resistencia al antibiótico G418) flanqueado por las secuencias anterior y posterior de la ORF (pauta abierta de lectura) del gen *KISNF4*. El producto de PCR obtenido se transformó en la cepa silvestre MW270-7B, realizándose la selección en placas YEPD que contenían el antibiótico G418 (figura 2).

Los transformantes se sembraron en medio SCD y se replicaron a SCE. Una de las colonias que no creció en etanol se analizó por PCR, para lo cual se utilizaron las parejas de oligonucleótidos 07.249-03.45 y 07.248-03.44 según se muestra en la figura 3.A. El tamaño de los fragmentos es el esperado para la correcta sustitución de la ORF del gen *KISNF4* por el marcador *KanMX* en el genoma de la levadura figura 3.B.

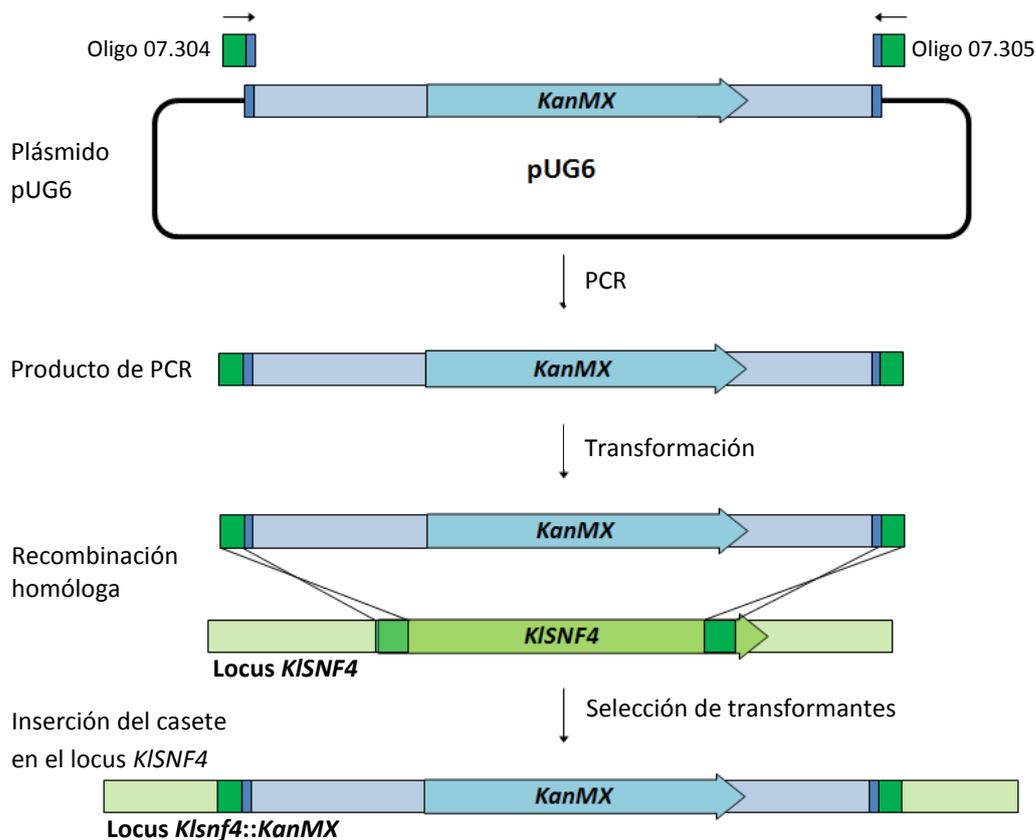


Figura 2. Esquema del proceso de obtención del mutante *Klsnf4A*. Los oligos 07.304 y 07.305 (cada uno conteniendo 40 bases de la secuencia del gen *KISNF4* y 20 bases del plásmido pUG6) se utilizaron para amplificar el casete con el gen *KanMX* a partir del vector pUG6. El fragmento de ADN obtenido se utilizó para transformar la cepa silvestre MW270-7B. Se muestran los sitios de recombinación entre las secuencias homólogas del locus *KISNF4* y las correspondientes presentes en el plásmido (en color verde oscuro). Tras el proceso de recombinación algunos de los transformantes presentarán la inserción en el lugar correcto.

El uso de cepas isogénicas en *K. lactis* resulta especialmente importante debido a la gran variabilidad existente entre diferentes fondos genéticos. Por ello, y con el fin de profundizar en el estudio del complejo *KISNF1* se construyeron cepas mutantes en los genes *KISNF1* y *KIGAL83*, a partir de la misma cepa silvestre (MW270-7B) utilizando la estrategia acabada de describir para la cepa *Klsnf4A*. Una vez obtenidas se analizó su crecimiento en diferentes fuentes de carbono. Para ello se crecieron las cepas *Klsnf1A*, *Klgal83A* y *Klsnf4A* en 15 ml de medio SCD durante toda la noche en agitación hasta una DO_{600nm} de alrededor de 2. El cultivo se resuspendió a una DO_{600nm} de 0,3 (10^0) y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Finalmente, se sembraron 3 μ l de cada dilución en las placas correspondientes. Como control se utilizó una cepa silvestre.

Resultados

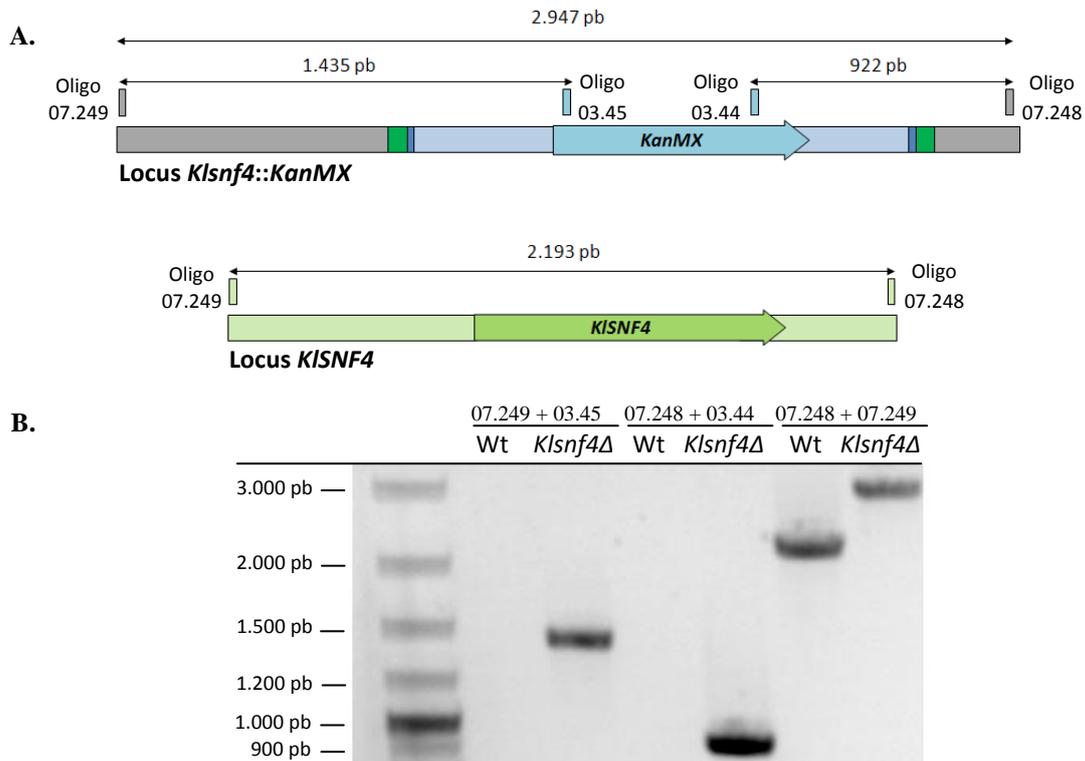


Figura 3.A. Análisis del locus *Klsnf4::kanMx* mediante PCR. **A.** Se muestra el esquema del locus *KISNF4* silvestre y del locus *Klsnf4::kanMx* indicando los sitios de unión de los oligos empleados en las reacciones de PCR para el análisis del transformante seleccionado incapaz de crecer en etanol, así como el tamaño de los fragmentos esperados en las amplificaciones. **B.** Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. El tamaño de los fragmentos obtenidos concuerda con el esperado verificando la correcta inserción del casete *KanMx* en el locus *KISNF4*.

Como se puede observar en la [figura 4](#) el mutante *Klsnf4Δ* no crece en ni en etanol ni en glicerol. Este resultado pone de manifiesto que *KISnf4*, al igual que las subunidades *KISnf1* y *KIGal83*, también es imprescindible durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Por otra parte, aunque los mutantes de las subunidades del complejo crecen en glucosa, el crecimiento es menor que el de la cepa silvestre. Este retraso en el crecimiento sugiere que, el complejo *KISNF1* también desempeña alguna función durante el crecimiento en este azúcar.

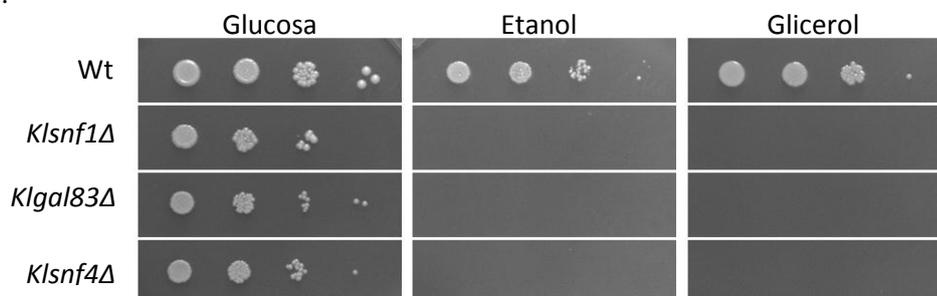


Figura 4. Análisis fenotípico de las cepas mutantes en las subunidades del complejo en diferentes fuentes de carbono. Las cepas MW270-7B (silvestre) y los mutantes RRO73 (*Klsnf1Δ*), RRO113 (*Klgal83Δ*) y RRO69 (*Klsnf4Δ*), fueron crecidas en medio mínimo con glucosa (SCD). A continuación se diluyeron a una DO_{600nm} de 0,3 (10^0) y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Se sembraron 3 μ l de cada dilución en placas de medio mínimo con glucosa (SCD), etanol (SCE) y glicerol (SCG) como fuente de carbono. Las imágenes se obtuvieron a los tres días de incubación.

También se analizaron mutantes en el complejo SNF1 contruidos en el fondo genético de la cepa CBS2359, obteniéndose resultados similares. Solamente cabe indicar que el retraso en el crecimiento en glucosa no fue tan manifiesto (datos no mostrados).

1.2. Expresión de los genes *KISNF1*, *KIGAL83* y *KISNF4*

Con el fin de analizar si el nivel de expresión de los genes que codifican para las subunidades del complejo KISNF1 está regulada por fuente de carbono, se procedió al estudio del promotor de los genes correspondientes. Para ello se construyeron plásmidos que llevan los promotores respectivos fusionados a la secuencia codificante del gen *lacZ* de *E. coli*. Puesto de *K. lactis* es una levadura β -galactosidasa positiva, los plásmidos deben ser analizados en una cepa mutante para el gen *LAC4*, que codifica para dicho enzima de *K. lactis*. Así, a partir de los niveles de actividad β -galactosidasa se puede inferir los niveles de expresión de los genes correspondientes.

Para la construcción de los plásmidos, en primer lugar, se amplificó por PCR el promotor y el ATG iniciador de cada una de las subunidades. Posteriormente, el fragmento de PCR se subclonó en el vector pXW3 que contiene el gen *lacZ*. Las tres construcciones obtenidas se denominaron *KISNF1p-lacZ*, *KISNF4p-lacZ* y *KIGAL83p-lacZ* (Materiales y Métodos apartado 3.2.2.).

En la [figura 5.A](#) se muestra un esquema del plásmido *KISNF1p-lacZ*. Los plásmidos fueron introducidos en la cepa β -galactosidasa negativa KHO75-11A y los transformantes obtenidos se crecieron en medio SCD sin uracilo durante toda la noche hasta una DO_{600nm} de alrededor de 2. Las células del cultivo inicial se recogieron por centrifugación y se transfirieron a los medios SCDura, SCEura y SDGura. Los tres cultivos permanecieron en las nuevas condiciones durante seis horas. Una vez pasado este tiempo las células se recogieron por centrifugación y se procesaron como se describe en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. Finalmente, se valoró la actividad β -galactosidasa (según se describió en el apartado 5.4.1. de Materiales y Métodos) y la proteína total (apartado 5.3. de Materiales y Métodos).

Los datos obtenidos indican que la síntesis de las tres subunidades es constitutiva puesto que no existen diferencias significativas en el nivel de actividad β -galactosidasa obtenido de cada construcción en las fuentes de carbono ensayadas ([figura 5.B](#)). Al comparar los resultados se observa que la fuerza de los tres promotores es diferente. Así, el gen que más se expresa es *KISNF1*, seguido de *KIGAL83* con aproximadamente la mitad de actividad y por último *KISNF4* que presenta del orden de un tercio.

Resultados

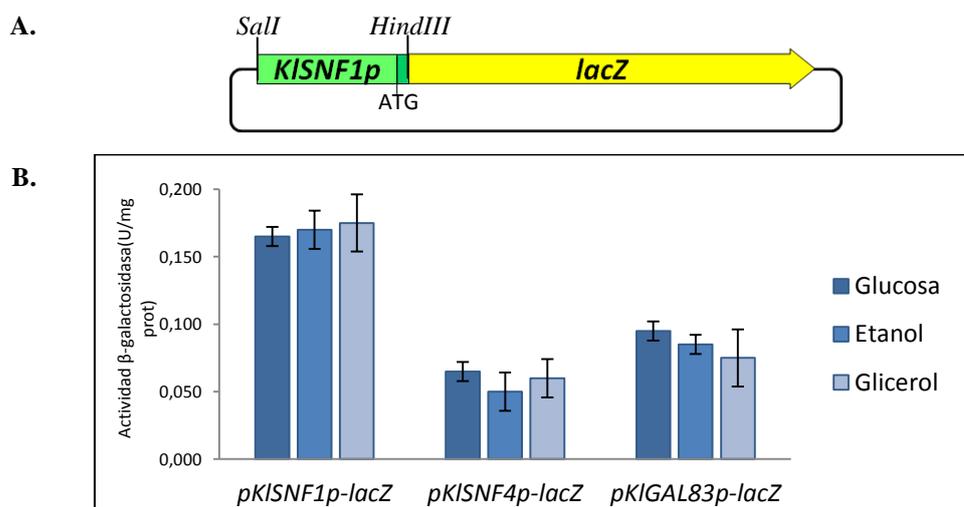


Figura 5. Esquema del plásmido pKISNF1p-lacZ y nivel de expresión de los genes KISNF1, KIGAL83 y KISNF4 en diferentes fuentes de carbono. **A.** Para obtener el plásmido pKISNF1p-lacZ, se amplificó por PCR el promotor y las primeras 72 bases del gen KISNF1 utilizando los oligos 07.251 y 07.290. Este fragmento de ADN se clonó en el sitio Sall/HindIII del vector pXW3, en pauta con el gen lacZ. La construcción se transformó en E.coli. La selección se realizó en medio LB ampicilina con el sustrato cromogénico X-Gal. Cuando se fusiona el promotor al gen lacZ en pauta el transformante puede sintetizar β-galactosidasa y el sustrato X-Gal es hidrolizado dando un compuesto azul. Los plásmidos pKISNF1p-lacZ y pKIGAL83p-lacZ se construyeron de forma similar utilizando las parejas de oligos 07.249-Ovi.198 y Ovi.199-Ovi.200, respectivamente. **B.** La cepa β-galactosidasa negativa KHO75-11A se transformó con los plásmidos pKISNF1p-lacZ, pKISNF4p-lacZ y pKIGAL83p-lacZ. Los transformantes se crecieron en medio SCD sin uracilo hasta una DO_{600nm} de 2. Las células del cultivo inicial se recogieron por centrifugación y se transfirieron a los medios SCDura, SCEura y SCGura. Los cultivos se mantuvieron en agitación y se recogieron muestras a las seis horas a partir de las cuales se prepararon extractos libres de células en los cuales se valoró la actividad β-galactosidasa y la proteína total. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes.

1.3. Nivel de proteína de las subunidades del complejo KISNF1

Los niveles de actividad β-galactosidasa no siempre se corresponden con la proteína presente en las células. Por ello nos planteamos averiguar si existen modificaciones post-transcripcionales que pudieran afectar al nivel de proteína presente en las células. Para ello se construyeron plásmidos monocopia que contienen la secuencia codificante de cada una de las proteínas del complejo KISNF1, bajo la expresión de su propio promotor, fusionado en pauta con las secuencias del epítipo Myc en el extremo 3'. La proteína de fusión generada contiene el epítipo Myc en el extremo C-terminal y puede ser detectada mediante análisis *Western*. Inicialmente, se construyeron los plásmidos pCXJ18-KISNF1, pCXJ18-KISNF4 y pCXJ18-KIGAL83 que permiten expresar los genes que codifican las proteínas del complejo. Para ello, a partir de ADN genómico se amplificaron por PCR el promotor y la secuencia codificante de cada gen. Los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector monocopia pCXJ18 y se procedió a su secuenciación para descartar la posibilidad de que se hubiera producido alguna mutación en el proceso de amplificación. Estos plásmidos sirvieron como base para la obtención de los derivados pKISNF1-Myc, pKISNF4-Myc y pKIGAL83-Myc por recombinación in vivo. En la [figura 6](#) se describe la estrategia utilizada para la obtención de pKISNF1-Myc.

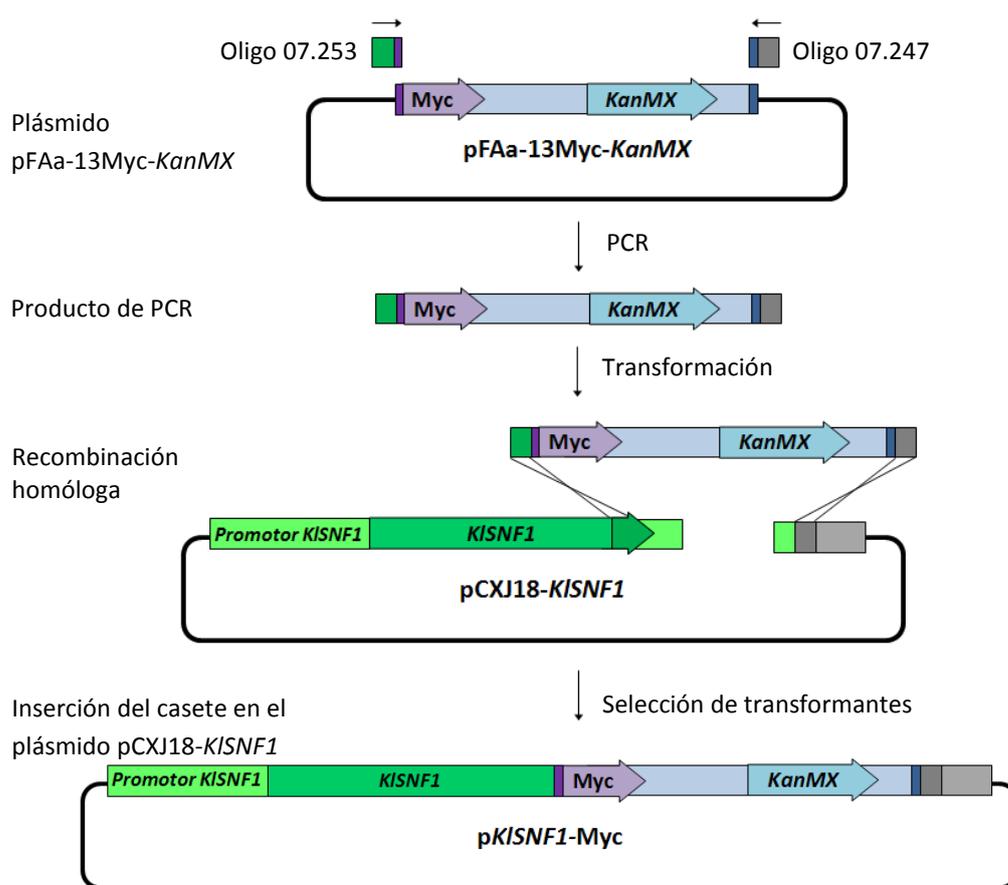


Figura 6. Esquema de la construcción del plásmido pKISNF1-Myc. Los oligos 07.253 (contiene las 40 bases finales de la secuencia del gen *KISNF1* seguidas de 20 bases del vector pFAa-13Myc-KanMX) y 07.247 (lleva, en dirección 3'→5', 20 bases del vector pFAa-13Myc-KanMX seguidas de 40 bases del vector pCXJ18) se utilizaron para amplificar un casete que contiene las 40 pares de bases finales del gen *KISNF1* en pauta con 13 epítomos Myc, el marcador *KanMX* y 40 pares de bases del plásmido receptor. Este casete se obtuvo a partir del vector pFAa-13Myc-KanMX. El fragmento de PCR obtenido y el plásmido pCXJ18-KISNF1 (digerido previamente con *HindIII* para facilitar la recombinación) se transformaron conjuntamente en la cepa silvestre KHO46-12A, realizándose la selección en placas YEPD que contenían el antibiótico G418. Se espera que algunos de los plásmidos incorporen el fragmento de PCR mediante recombinación. La extracción de plásmido de los transformantes se realizó según se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.2.). La preparación se transformó en *E. coli* para su amplificación. La identificación de los plásmidos adecuados se realizó mediante la digestión y posterior visualización en gels con bromuro de etidio. El mismo procedimiento se utilizó para obtener los plásmidos pKISNF4-Myc y pKIGAL83-Myc.

Para investigar si los plásmidos construidos eran funcionales, se transformaron en las cepas mutantes correspondientes y se analizó su comportamiento en diferentes fuentes de carbono. Según se observa en la [figura 7](#), las construcciones son funcionales ya que complementan el fenotipo de las cepas mutantes correspondientes en etanol.

Resultados

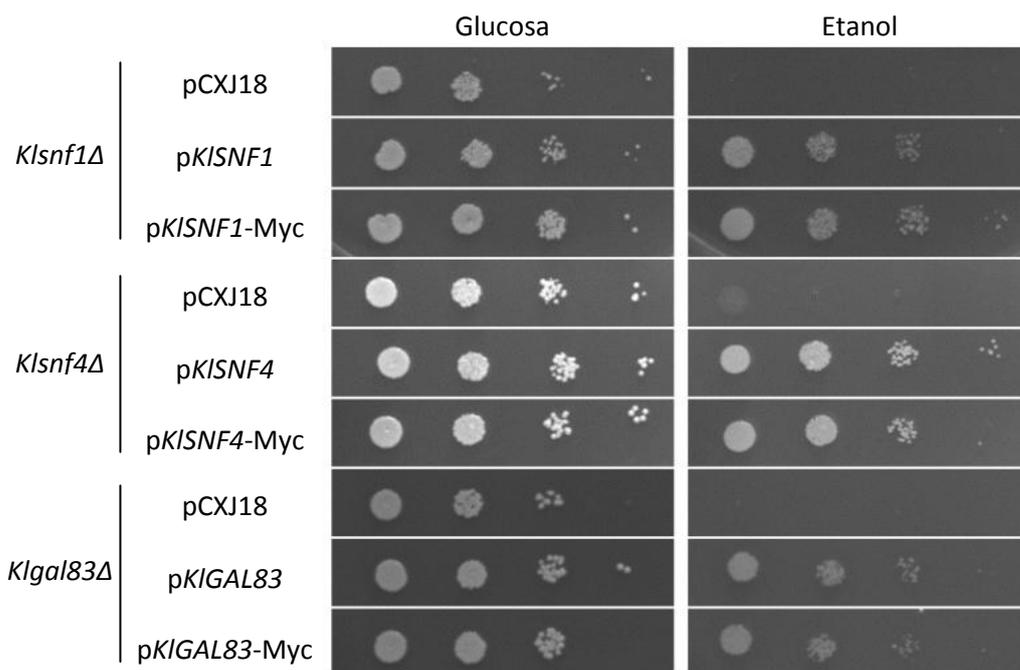


Figura 7. Análisis de complementación de los plásmidos pKISNF1-Myc, pKISNF4-Myc y pKIGAL83-Myc. Los plásmidos indicados se transformaron en las cepas RRO73 (*Klsnf1Δ*), RRO69 (*Klsnf4Δ*) y RRO113 (*Klgal83Δ*). Las colonias obtenidas fueron crecidas en medio SCD sin uracilo para posteriormente realizar un ensayo de la gota. A continuación se diluyeron a una DO_{600nm} de 0,3 (10^0) y se prepararon diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Se sembraron 3 μ l en placas de medio mínimo con glucosa y etanol. Las imágenes se obtuvieron a los tres días de incubación. Como control se transformó cada uno de los mutantes con el vector pCXJ18 y con el plásmido monocopia que codifica el gen correspondiente en cada caso. Los plásmidos que contienen los genes silvestres y los alelos que codifican las proteínas de fusión son funcionales.

Una vez comprobada la funcionalidad de las fusiones procedimos a detectar la cantidad de proteína total de cada una de las subunidades del complejo KISNF1 en diferentes fuentes de carbono mediante los análisis *Western* que nos permiten detectar la cantidad y la cantidad relativa de cada subunidad. Los transformantes se crecieron inicialmente en medio SCD sin uracilo y, posteriormente, se transfirieron a los medios SCDura, SCEura y SCGura. A las tres horas de incubación se tomaron muestras de cada cultivo las cuales se procesaron según se describe en el apartado 6.1. de Materiales y Métodos. Las proteínas presentes en los extractos se separaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Finalmente, las muestras se analizaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-Myc.

Los resultados obtenidos indican que el nivel de proteína de cada una de las subunidades del complejo no cambia significativamente en función de la fuente de carbono ensayada (figura 8.A, B y C), siendo KISnf1 la subunidad más abundante seguida de KIGal83 y en último lugar KISnf4 (figura 8.D). La cantidad de proteína detectada se corresponde con el nivel actividad β -galactosidasa encontrado para las diferentes subunidades (figura 5) y por tanto no parecen existir modificaciones que cambien la cantidad de proteína sintetizada.

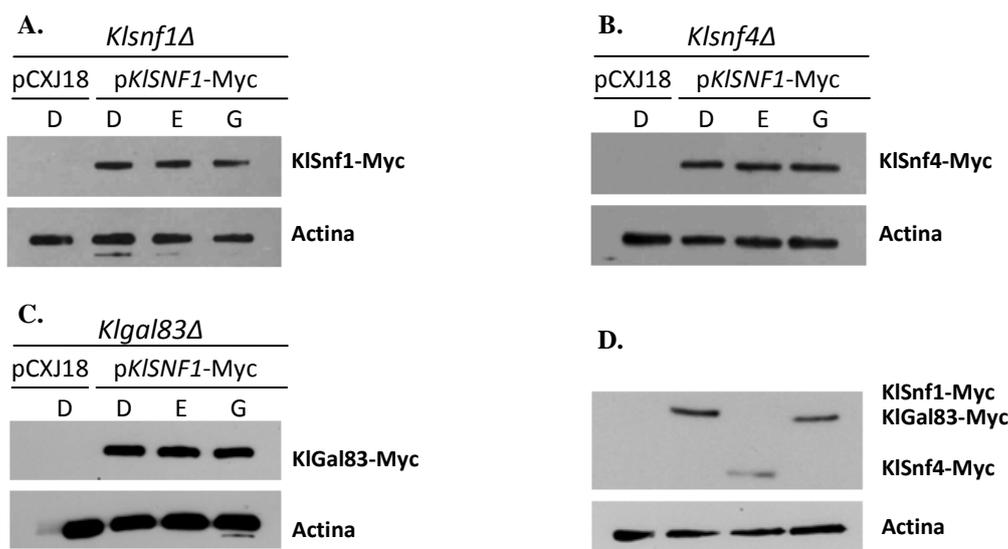


Figura 8. Detección de las subunidades del complejo KISNF1 en diferentes fuentes de carbono. A, B y C. Detección de las proteínas de fusión KISnf1-Myc, KISnf4-Myc y KIGal83-Myc mediante análisis *Western*. Los transformantes descritos en la leyenda de la figura 7 se crecieron inicialmente en medio SCD sin uracilo y, posteriormente, se transfirieron a los medios SCDura, SCEura y SCGura. Se tomó una muestra de cada cultivo de 5 ml a las tres horas las cuales se procesaron según se describe en el apartado 6.1. de Materiales y Métodos. Las proteínas presentes en los extractos se separaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas de fusión se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control negativo se utilizó la cepa mutante correspondiente transformada con el vector pCXJ18 (primera calle). Como control interno de la cantidad de proteína total presente en los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina. Los resultados obtenidos indican que el nivel de proteína de las diferentes subunidades del complejo no cambia en función de la fuente de carbono analizada. **D.** Nivel relativo de las subunidades del complejo KISNF1 en glucosa. Muestras procedentes de transformantes con los plásmidos p*KISNF1*-Myc, p*KISNF4*-Myc y p*KIGAL83*-Myc crecidos en glucosa se separaron en un gel de poliacrilamida y se analizaron mediante análisis *Western* con los anticuerpos mencionados anteriormente. La subunidad más abundante es KISnf1, seguida de KIGal83 y de KISnf4. Los mismos resultados se obtuvieron con extractos obtenidos después de 6h de incubación en las diferentes fuentes de carbono (datos no mostrados).

1.4. Importancia del residuo Thr 190 de la subunidad KISnf1

Como ya se comentó en la introducción (apartado 1), en *S. cerevisiae* la fosforilación del residuo Thr210 localizado en el dominio quinasa de la subunidad Snf1 determina la activación del complejo. Con el fin de determinar si este residuo se encuentra conservado en *K. lactis* realizamos un alineamiento de la secuencia de la proteína KISnf1 con su ortólogo en *S. cerevisiae*. Las proteínas KISnf1 y ScSnf1 presentan un 72% de identidad. En el caso del dominio quinasa la identidad aumenta hasta el 94%. Esta elevada similitud nos permitió identificar al residuo Thr190 de la subunidad KISnf1 como candidato a regular el nivel de activación del complejo en *K. lactis* (figura 9).

La construcción de mutantes puntuales es una herramienta de gran utilidad a la hora de establecer la función que cumple la fosforilación de un determinado residuo. Una de las estrategias consiste en sustituir el residuo que se fosforila por una alanina, para que la proteína no pueda ser fosforilada en ese residuo. Esta técnica ya ha sido empleada por Estruch y col.

Resultados

(1992) en el estudio del residuo Thr210 de la subunidad Snf1 de *S. cerevisiae*, demostrando que la sustitución del residuo treonina 210 por una alanina impide la activación del complejo. El procedimiento complementario consiste en la obtención de mutantes en los que el residuo que se fosforila es sustituido por un residuo aspartato o glutamato. En ocasiones estos aminoácidos son capaces de mimetizar el efecto de la fosforilación debido a su carga negativa y a su tamaño. Sin embargo, en este caso, la sustitución del residuo treonina 210 por aspartato o por glutamato impide la activación de la quinasa ScSnf1 (Estruch y col., 1992; Ludin y col., 1998).

KlSnf1	YQIIKTLGEGSFGKVKLAYHISTGQKVALKIINKKVLAKSDMQGRIEREISYLRLLRHPH	95
ScSnf1	YQIVKTLGEGSFGKVKLAYHTTTGQKVALKIINKKVLAKSDMQGRIEREISYLRLLRHPH	115
	*** *****	
KlSnf1	I IKLYDVIKSKDEIIMVIEYAGNELFDYIVQRDKMPEQEARRFFQQIIISAVDYCHRHKIV	155
ScSnf1	I IKLYDVIKSKDEIIMVIEYAGNELFDYIVQRDKMSEQEARRFFQQIIISAVEYCHRHKIV	175

KlSnf1	HRDLKPENLLLEHNLVVKIADFGLSNIMTDGNFLK*SCGSPNYAAPEVISGKLYAGPEVD	215
ScSnf1	HRDLKPENLLLEHNLVVKIADFGLSNIMTDGNFLK*SCGSPNYAAPEVISGKLYAGPEVD	235

KlSnf1	VWSSGVILYVMLCRRLPFDDDESIPVLFKNISNGVYTI PNFLSQGAASLIKKMLIVNPVNR	275
ScSnf1	VWSCGVILYVMLCRRLPFDDDESIPVLFKNISNGVYTL PKFLSPGAAGLIKRMILIVNPLNR	295
	*** ***** * ** * ** * ** * **	
KlSnf1	ITVHEIMQDEWF	335
ScSnf1	ISIHEIMQDDWF	355
	* ***** **	

Figura 9. Alineamiento de la secuencia del dominio quinasa de la proteína KlSnf1 con su ortólogo en *S. cerevisiae*. El dominio quinasa de las proteínas KlSnf1 y ScSnf1 presenta un 94% de identidad. Los aminoácidos idénticos se señalan con un asterisco azul. Los residuos Thr 190 de KlSnf1 y Thr 210 de ScSnf1 están indicados en verde.

Para verificar que el residuo Thr190 de KlSnf1 cumple un papel equivalente en la regulación de la activación del complejo SNF1 de *K. lactis* se obtuvo una construcción KlSnf1-Thr190Ala y otra KlSnf1-Thr190Asp. La estrategia seguida para la obtención del plásmido KlSnf1-Thr190Ala se describe en la leyenda de la [figura 10](#).

Para analizar el impacto de la sustitución del residuo Thr190 durante el uso de fuentes de carbono no fermentables, se transformaron tres alícuotas de la cepa mutante *KlSnf1Δ* con el vector pCXJ18 y las construcciones KlSnf1-Thr190Ala y KlSnf1-Thr190Asp. Finalmente, se valoró el crecimiento de los transformantes en glucosa, etanol y glicerol, mediante un ensayo de la gota. Como se puede apreciar en la [figura 11.A](#) la sustitución de la Thr190 por un residuo Ala impide el crecimiento en etanol y en glicerol. El hecho de que el transformante KlSnf1-Thr190Ala muestre un fenotipo equivalente al mutante *KlSnf1Δ* confirma que la Thr 190 es un residuo clave de la subunidad KlSnf1.

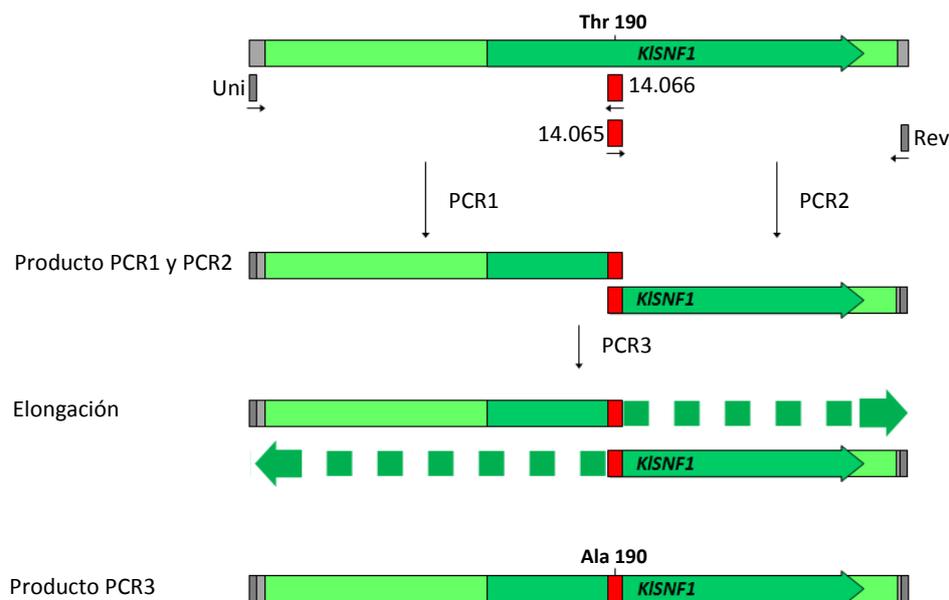


Figura 10. Esquema de la metodología de mutagénesis dirigida por PCR para la obtención de la construcción KISnf1-Thr190Ala. Inicialmente, se diseñaron dos oligos, uno directo (14.065) y otro reverso (14.066), de 60 nucleótidos, en los que el nucleósido adenosina del codón ACT que codifica para la Thr190 se cambió por un nucleósido de guanosina, codificando en este caso una alanina. Asimismo, también se cambió un nucleósido de timidina (en la posición 579), por una adenosina y otro de timidina (posición 582) por una citosina para crear un sitio de corte *BamHI*. A continuación, se realizaron dos PCR, una con los oligos 14.065 y reverso (PCR 1), y otra con 14.066 y universal (PCR 2), utilizando en ambos casos el plásmido pKISNF1 como molde. Los productos de PCR 1 y 2 se utilizaron como molde en una tercera PCR con los oligos universal y reverso, obteniéndose un fragmento de ADN de 3,16 Kb. En último lugar, el fragmento amplificado en la tercera PCR se clonó en el sitio *SacI/HindIII* del vector pCXJ18. Finalmente la construcción fue secuenciada.

De la misma forma, el transformante KISnf1-Thr190Asp fue incapaz de crecer en las fuentes de carbono no fermentables analizadas. Este resultado indica que la modificación de la Thr190 por un residuo aspartato no sólo no es capaz de mimetizar la fosforilación del residuo treonina, sino que determina una subunidad KISnf1 inactiva. A la vista de estos datos se construyó un nuevo plásmido en el que el residuo Thr190 se cambió por un residuo glutamato. Los resultados obtenidos fueron idénticos a los de la construcción KISnf1-Thr190Asp (datos no mostrados) demostrando que, al igual que en *S. cerevisiae*, el residuo Thr190 es esencial para la actividad del enzima.

Finalmente, con el fin de demostrar que la alteración del residuo Thr190 determina la inactivación de la quinasa KISnf1 procedimos a valorar la actividad isocitrato liasa en la cepa *Klsnf1Δ* transformada con el plásmido KISnf1-Thr190Ala. El gen que codifica este enzima está regulado a través de elementos CSRE y por ello se utiliza de forma rutinaria como marcador para estudiar la ruta de regulación KISNF1-KICat8/KISip4 esencial para la utilización de etanol (Rodicio y col., 2008; Rodríguez y col., 2003). La preparación de los extractos se realizó según se describió para los ensayos de β -galactosidasa (apartado 1.2.) y en ellos se valoró la actividad isocitrato liasa (apartado 5.4.2. de Materiales y Métodos) y la proteína total.

Resultados

Como se puede observar en la [figura 11.B](#), de acuerdo con lo esperado los diferentes transformantes no presentan actividad isocitrato liasa durante el crecimiento en glucosa. En etanol, el mutante transformado con el plásmido que contiene el gen *KISNF1* muestra unos niveles elevados de actividad isocitrato liasa debido a que la presencia del complejo KISNF1 en estado activo permite la desrepresión del gen *KIICLI*. En cambio, el mutante *Klsnf1Δ* transformado con la proteína KISnf1-Thr190Ala presenta unos valores muy bajos de actividad (equivalentes a los del mutante transformado con vector), lo que indica que la expresión del gen *KIICLI* no tiene lugar.

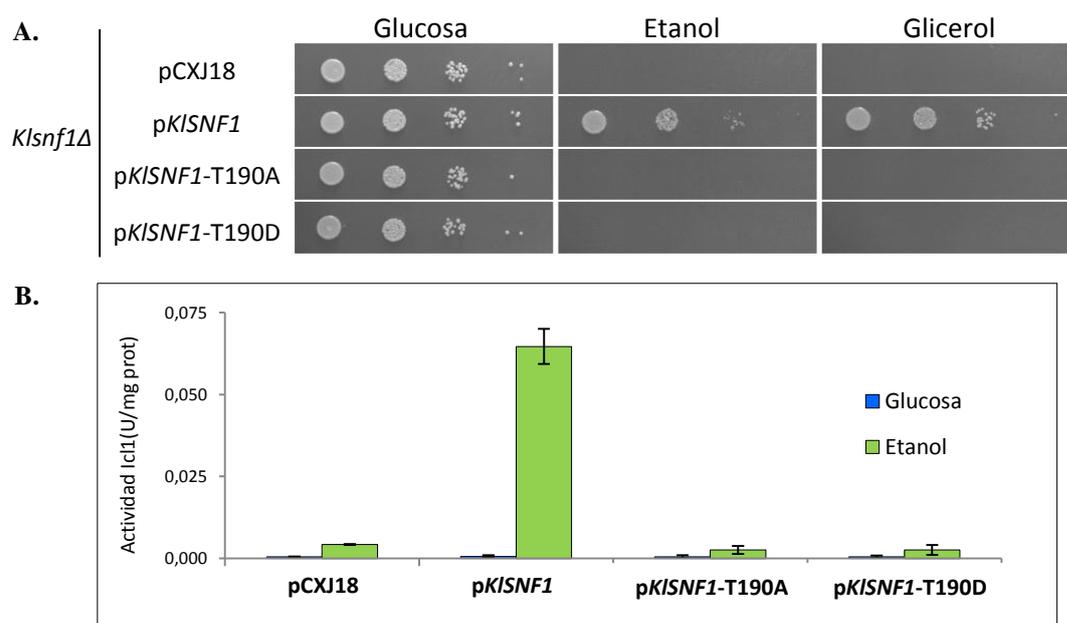


Figura 11. Análisis fenotípico de los alelos mutantes que codifican las proteínas KISnf1-Thr190Ala y KISnf1-Thr190Asp. **A.** Análisis de complementación de una cepa *Klsnf1Δ* con las plásmidos pKISNF1-Thr190Ala y pKISNF1-Thr190Asp. La cepa RRO73 (*Klsnf1Δ*) fue transformada con los plásmidos indicados. Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 7. La modificación del residuo Thr190 de KISnf1 impide el crecimiento en etanol y en glicerol. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klsnf1Δ* transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pKISNF1. **B.** Actividad isocitrato liasa de los transformantes pKISNF1-Thr190Ala y pKISNF1-Thr190Asp. Los transformantes se crecieron en medio SCD sin uracilo durante toda la noche hasta una $DO_{600\text{ nm}}$ de alrededor de 2. El cultivo inicial se dividió en dos. El primer cultivo se continuó creciendo en glucosa y el segundo se pasó a etanol. A las 6 horas se sacaron muestras de los dos cultivos. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con tampón fosfato. Los extractos se obtuvieron como se describe en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. Por último, se valoró la actividad isocitrato liasa de los extractos (apartado 5.4.2. de Materiales y Métodos). La expresión del gen *KIICLI* no se desreprime en el mutante *Klsnf1Δ* transformado con las construcciones pKISNF1-Thr190Ala y pKISNF1-Thr190Asp. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klsnf1Δ* transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pKISNF1.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto que la desrepresión de los genes con elementos CSRE no tiene lugar en el mutante *Klsnf1Δ* transformado con la construcción pKISNF1-Thr190Ala. Este resultado confirma que el residuo Thr190 es esencial para que el complejo KISNF1 sea funcional.

A la vista de estos resultados, y con el fin de confirmar la presencia de las proteínas en las muestras, se planteó un ensayo *Western*. Para ello, las proteínas K1Snf1-Thr190Ala y K1Snf1-Thr190Asp se etiquetaron con el epítipo Myc según se describió para K1Snf1 silvestre, dando lugar a las proteínas de fusión K1Snf1-Thr190Ala-Myc y K1Snf1-Thr190Asp-Myc. Las nuevas construcciones se transformaron en un mutante *K1snf1Δ* y se analizaron según se describió anteriormente (leyenda figura 7). Como se puede observar en la figura 12, los niveles de proteína detectados para las construcciones p*K1SNF1*-Thr190Ala-Myc y p*K1SNF1*-Thr190Asp-Myc son similares a los encontrados para la proteína silvestre demostrando que la expresión de los alelos mutantes no se encuentra alterada, ni las proteínas sufren ningún tipo de degradación proteolítica al menos en glucosa.

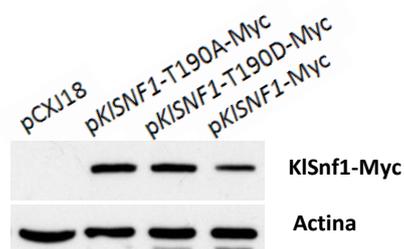


Figura 12. *Western blot* del nivel de proteína de las fusiones K1Snf1-Thr190Ala-Myc y K1Snf1-Thr190Asp-Myc en glucosa. La cepa RRO73 (*K1snf1Δ*) se transformó con los plásmidos indicados. Las proteínas de fusión K1Snf1-Thr190Ala-Myc y K1Snf1-Thr190Asp-Myc se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control negativo se utilizó la cepa mutante transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con la proteína de fusión K1Snf1-Myc. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

1.5. Nivel de activación del complejo K1SNF1

Los estudios llevados a cabo con cepas mutantes indican que la proteína K1Snf1 es esencial para la utilización de fuentes de carbono no fermentables, pero que también se requiere durante el crecimiento en glucosa (apartado 1.1 de Resultados). Esto significaría que K1Snf1 debería estar activa con independencia de la fuente de carbono. Para investigar esta hipótesis se llevó a cabo un análisis *Western* utilizando anticuerpos monoclonales anti fosfo-AMPK α (Thr172) de mamíferos, que permiten la detección de la Thr190 de la subunidad K1Snf1 cuando está fosforilada. Para poder determinar la cantidad total de proteína K1Snf1 se utilizó la construcción p*K1SNF1*-Myc transformada en la cepa *K1snf1Δ*. También se transformó en la misma cepa el plásmido p*K1SNF1*-Thr190Ala, que servirá de control negativo del experimento.

Posteriormente, las células transformadas se crecieron durante toda la noche en medio SCD sin uracilo hasta una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 2. Las células del cultivo inicial se recogieron por centrifugación y se continuaron creciendo en glucosa y etanol. Se tomó una muestra de 10 ml de cada cultivo a los 30 minutos. Los extractos obtenidos se analizaron mediante *Western blot*.

Resultados

Como se observa en la [figura 13](#), la proteína Snf1 se encuentra fosforilada tanto durante el crecimiento en etanol como en glucosa, aunque la señal detectada en esta última condición es significativamente menor. De acuerdo con lo esperado no se detectó ninguna señal en la muestra correspondiente a la proteína KISnf1-Thr190Ala confirmando que este residuo es el susceptible de fosforilación.

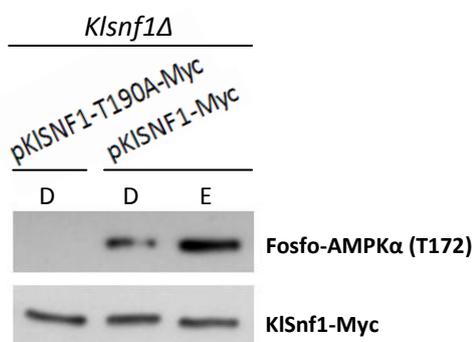


Figura 13. Western blot del nivel de fosforilación de la Thr190 de la subunidad KISnf1 etiquetada con Myc. La proteína KISnf1-Myc fosforilada se detectó utilizando un anticuerpo anti fosfo-AMPK α . Como control negativo se utilizó la cepa mutante *KISnf1Δ* (RRO.73) transformada con el plásmido pKISNF1-Thr190Ala-Myc (primera calle). Como control para comprobar que la cantidad total de proteína KISnf1 era similar en todos los extractos se realizó un stripping, para lo cual la membrana se lavó con TBS tween, se incubó 5 minutos en glicina 0,2 M pH 2,5 y por último se volvió a lavar con TBS tween. Posteriormente se detectó KISnf1-Myc con un anticuerpo anti-Myc.

1.6. Localización subcelular del complejo KISNF1

Con el fin de analizar si la localización subcelular del complejo KISNF1 está regulada por fuente de carbono, se construyeron plásmidos monocopia pKISNF1-GFP, pKISNF4-GFP y pKIGAL83-GFP que expresan la secuencia codificante de cada una de las subunidades, bajo el control de su propio promotor, fusionada en pauta con el gen que codifica para la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) en el extremo 3', que permite la producción de una proteína de fusión fluorescente. Estos plásmidos fueron capaces de complementar el fenotipo etanol-negativo de los mutantes respectivos demostrando que las que las proteínas etiquetadas eran funcionales (datos no mostrados).

Como marcador nuclear se utilizó un plásmido que expresa, bajo el control del promotor constitutivo *KIPGKI*, la secuencia correspondiente al dominio de unión a ADN y la secuencia de localización nuclear del factor de transcripción *GALA* de *S. cerevisiae* fusionado en pauta al gen que codifica la proteína fluorescente mCherry.

Las construcciones pKISNF1-GFP, pKISNF4-GFP y pKIGAL83-GFP se cotransformaron junto con el plásmido pGALBD-mCherry en una cepa silvestre. Los transformantes se crecieron en medio selectivo conteniendo las diferentes fuentes de carbono y las células se recogieron en fase exponencial temprana para examinar la fluorescencia in vivo como se describe en Materiales y Métodos (apartado 7.2). Las imágenes obtenidas indican que

KISnf1-GFP se localiza tanto en el citosol como en el núcleo en ambas condiciones siendo la proporción de la proteína de fusión que se encuentra en el núcleo mayor durante el crecimiento en etanol que en glucosa (figura 14.A). Durante el crecimiento en glucosa las señales de KISnf4-GFP y de KIGal83-GFP parecen limitarse al citosol, mientras que en etanol también se pueden detectar en el núcleo (figura 14.B y C).

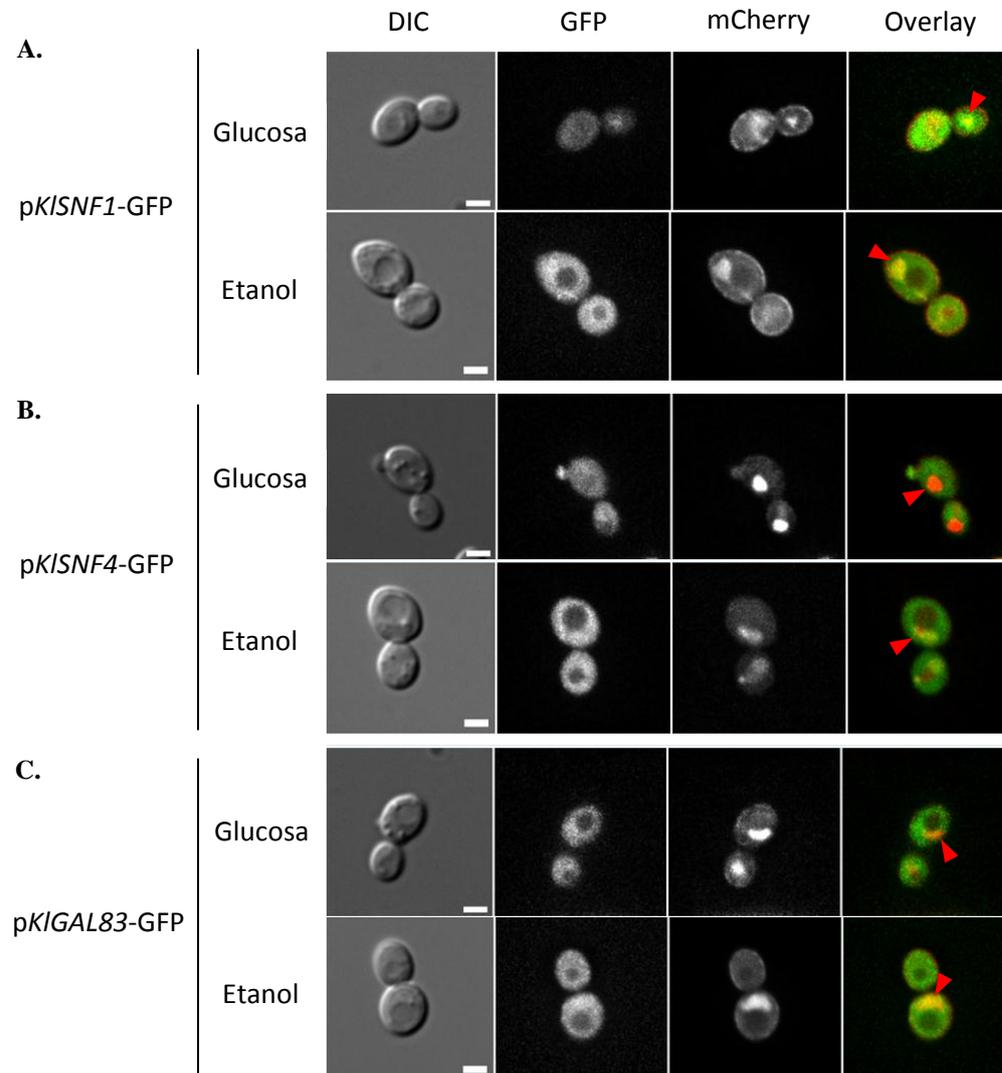


Figura 14. Localización de las subunidades del complejo SNF1 sintetizadas a partir de plásmidos monocopia.

En la figura se muestra la imagen (de izquierda a derecha): en contraste interferencial (DIC), la señal asociada a GFP, la señal asociada al marcador mCherry y la superposición de la señal de GFP y de mCherry (Overlay, en la que las flechas rojas señalan los núcleos). **A.** Localización de la proteína KISnf1-GFP. La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos *pKISNF1-GFP* y *pGAL4BD-mCherry*. Tanto en glucosa como en etanol, KISnf1-GFP presenta una doble localización citosólica y nuclear. **B.** Localización de la proteína KISnf4-GFP. La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos *pKISNF4-GFP* y *pGAL4BD-mCherry*. Durante el crecimiento en glucosa la señal de KISnf4-GFP parece limitarse al citosol, mientras que en etanol también podemos encontrar a KISnf4-GFP en el núcleo. **C.** Localización de la proteína KIGal83-GFP. La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos *pKIGAL83-GFP* y *pGAL4BD-mCherry*. En el caso de KIGal83-GFP, la señal en glucosa parece fundamentalmente citosólica. En etanol KIGal83-GFP se localiza tanto en el citosol como en el núcleo. La barra blanca en las imágenes DIC corresponde a 2µm.

Resultados

Es importante mencionar la señal GFP es más fuerte para KISnf1-GFP que para KIGal83-GFP y KISnf4-GFP correspondiéndose con los niveles de expresión de los genes que codifican las subunidades del complejo, aunque en ningún caso es demasiado intensa. Por ello, decidimos construir nuevas fusiones GFP de los genes que codifican para las subunidades del complejo KISNF1, pero en este caso utilizamos el plásmido multicopia pCXJ22 como receptor. Las nuevas construcciones se transformaron en los mutantes correspondientes.

Confirmando los resultados obtenidos con los plásmidos monocopia, KISnf1-GFP presenta claramente una doble localización nuclear y citosólica tanto en las muestras de etanol como de glucosa aunque en las últimas la fracción nuclear es menos abundante. Las otras dos subunidades del complejo también muestran doble localización en células crecidas en etanol siendo la señal nuclear menos manifiesta que la de KISnf1-GFP en esa misma condición. Por último, las proteínas KISnf4-GFP y KIGal83-GFP parecen ser exclusivamente citosólicas en glucosa (figura 15).

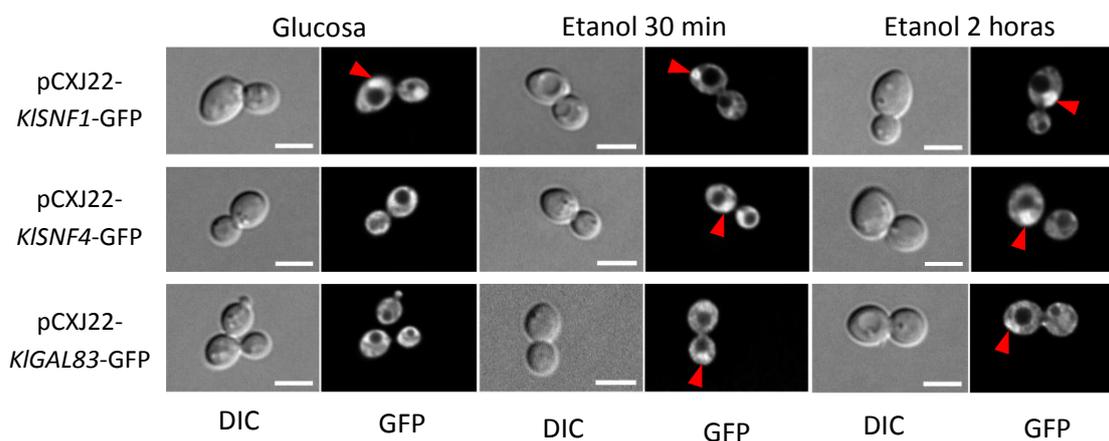


Figura 15. Localización de las proteínas KISnf1-GFP, KISnf4-GFP y KIGal83-GFP sintetizadas a partir de plásmidos multicopia. Los plásmidos pCXJ22-KISNF1-GFP, pCXJ22-KISNF4-GFP y pCXJ22-KIGAL83-GFP se transformaron en las cepas mutantes RRO.73 (*Klsnf1Δ*), RRO.69 (*Klsnf4Δ*) y RRO.113 (*Klga183Δ*), respectivamente. Los transformantes se crecieron en medio SCDura hasta una DO_{600nm} de 0,5 tomándose una muestra para su visualización. A partir de las células restantes se inoculó un cultivo que contenía medio SCEura a una DO_{600nm} aproximada de 0,5 obteniéndose muestras al cabo de 30 minutos y 2 horas antes de proceder a su visualización. KISnf1-GFP presenta una doble localización nuclear y citosólica tanto en glucosa como en etanol. KISnf4-GFP y KIGal83-GFP parecen excluidas del núcleo en glucosa, sin embargo en etanol se puede observar la presencia de estas proteínas en el núcleo. En la figura se muestra la imagen en contraste interferencial (DIC) y la señal asociada a GFP. Las flechas rojas señalan los núcleos. La barra blanca en las imágenes DIC corresponde a 5 μm .

2. Caracterización de los factores de transcripción KICat8 y KISip4

En *S. cerevisiae*, la regulación de los enzimas claves del ciclo del glioxilato y de la ruta gluconeogénica tiene lugar de forma coordinada a través de la quinasa SNF1 y los factores de transcripción Cat8 y Sip4 (Schüller, 2003; Turcotte y col., 2010). En esta levadura, el mutante *cat8Δ* no crece en etanol y glicerol, mientras que el mutante *sip4Δ* si puede utilizar estas fuentes de carbono no fermentables (Vincent y Carlson, 1998).

Estudios llevados a cabo en *K. lactis* indican que el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis no presentan una regulación coordinada. Así, KICat8 es esencial durante el crecimiento en etanol y se ha demostrado que este factor es necesario para que tenga lugar la expresión de *KIICLI* (Hedges y col., 1995). Sin embargo, los mutantes *Klcat8Δ* pueden crecer en medios que contienen glicerol como única fuente de carbono y energía y la expresión de los enzimas gluconeogénicos Pck1 y Fbp1 no se ve afectada en dicho mutante (Georis y col., 2000). Por su parte, en nuestro grupo se ha demostrado que KISip4 se une al promotor del gen *KIICLI* (Rodicio y col., 2008) aunque hasta la fecha no se ha descrito un estudio detallado de este factor. En este apartado se describe la caracterización molecular del factor de transcripción KISip4. Además, también se analiza la función y regulación de KICat8 en el fondo genético CBS2359, dada la variabilidad entre cepas mencionada anteriormente.

2.1. Análisis de cepas mutantes en los genes *KICAT8* y *KISIP4*

Comenzamos el estudio de los factores de transcripción con la obtención de mutantes en los genes *KISIP4* y *KICAT8* en la serie CBS2359 y su análisis en diferentes fuentes de carbono. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas *Klsip4Δ* y *Klcat8Δ* no pueden crecer en etanol y de acuerdo con ello, no sintetizan el enzima isocitrato liasa (figura 16 y 17.A).

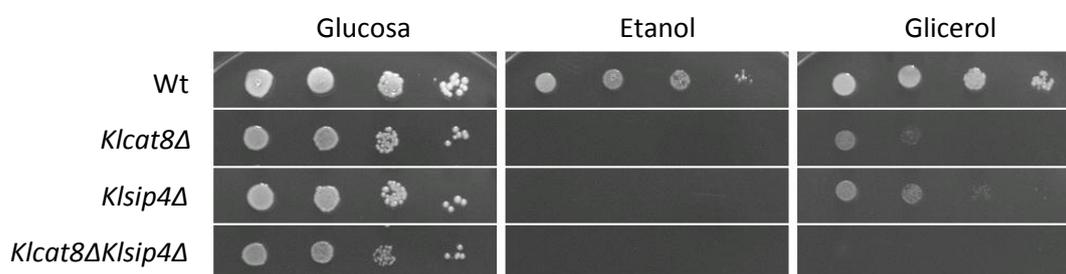


Figura 16. Análisis fenotípico de los mutantes KHO111-2A (*Klcat8Δ*), KHO104-8A (*Klsip4Δ*) y KHO111-1B (*Klcat8ΔKlsip4Δ*). La cepa KHO46-12A (Wt) y los mutantes fueron crecidos como se describe en la figura 4. Los mutantes *Klcat8Δ* y *Klsip4Δ* no crecen en etanol y crecen lentamente en glicerol. El doble mutante no creció en ninguna de las dos fuentes de carbono no fermentables analizadas.

Resultados

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en *K. lactis* el gen que codifica para la fructosa 1,6-bisfosfatasa no está regulado a través de elementos CSRE y su expresión sólo se reduce a la mitad en presencia de glucosa (Zaror y col., 1993; Georis y col., 2000). De acuerdo con lo publicado, nuestros datos indican que la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa no cambia significativamente en los mutantes *Klcat8Δ*, *Klsip4Δ* y *Klcat8ΔKlsip4Δ* de la serie congénica CBS2359, en relación a la cepa silvestre, ni en glucosa ni en etanol (figura 17.B).

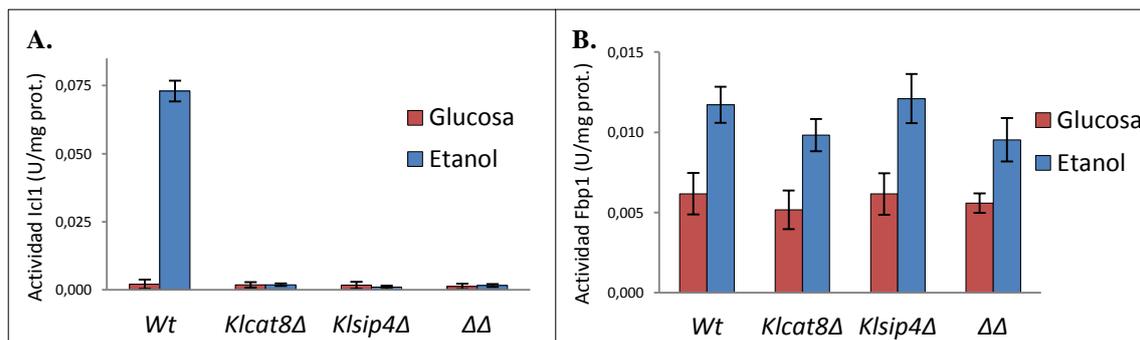


Figura 17. Actividad isocitrato liasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa de los mutantes KHO111-2A (*Klcat8Δ*), KHO104-8A (*Klsip4Δ*) y KHO111-1B (*Klcat8ΔKlsip4Δ*). **A.** La expresión del gen *KLIC1* no tiene lugar en los mutantes *Klcat8Δ*, *Klsip4Δ* y *Klcat8ΔKlsip4Δ*. Como control se utilizó la cepa silvestre KHO46-12A. **B.** El nivel de actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa no cambia significativamente en los mutantes *Klcat8Δ*, *Klsip4Δ* y *Klcat8ΔKlsip4Δ* ni en glucosa ni en etanol.

Por otra parte, cuando se utiliza glicerol como única fuente de carbono y de energía, el crecimiento de las cepas *Klsip4Δ* y *Klcat8Δ* se encuentra significativamente afectado y un doble mutante *Klcat8ΔKlsip4Δ* no muestra ningún crecimiento (figura 16). Estos resultados demuestran que en este fondo genético ambos factores de transcripción también participan en la regulación de genes esenciales para el metabolismo del glicerol.

2.2. Expresión de los genes *KICAT8* y *KISIP4*

Según se comentó en la introducción de este trabajo, en *S. cerevisiae* la expresión del gen *CAT8* está sujeta a represión por glucosa mediada por el represor Mig1 mientras que la de *SIP4* está regulada a través de elementos CSRE (Hedges y col, 1995; Vincent y Carlson, 1998). En *K. lactis* estudios previos pusieron de manifiesto que la expresión de *KICAT8* es constitutiva (Charbon y col., 2004). Hasta la fecha no se ha estudiado la regulación de la expresión del gen *KISIP4*.

Con el fin de estudiar la expresión del gen *KICAT8* en la serie congénica se construyó el plásmido *pKICAT8p-lacZ* y se analizó en una cepa silvestre y en el mutante *Klsnf1Δ* (figura 18). Los resultados obtenidos indican que en la cepa silvestre la expresión de *KICAT8* es independiente de la fuente de carbono de acuerdo con lo publicado. La expresión de *KICAT8* en el mutante *Klsnf1Δ* es ligeramente inferior a la cepa silvestre, aunque esto podría ser debido a algún efecto indirecto, ya que la falta de actuación de KISnf1 o de algún factor de transcripción regulado por Klsnf1 produciría cambios más drásticos de la actividad.

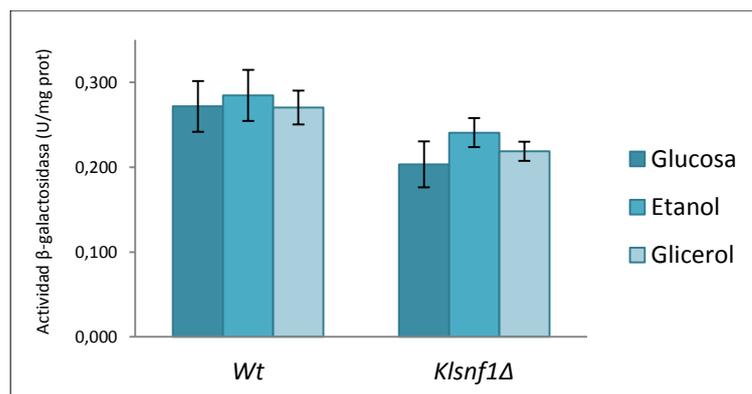


Figura 18. Expresión del gen *KICAT8* en la cepa KHO75-11A (*lac4A*; Wt) y en el mutante KDR1-1D (*Klsnf1Δ lac4A*) en diferentes fuentes de carbono. La cepa silvestre KHO75-11A y el mutante *Klsnf1ΔKllac4A* se transformaron con el plásmido *pKICAT8p-lacZ*. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B preparándose extractos donde se valoró la actividad β -galactosidasa. Los resultados indican que la expresión de *KICAT8* es constitutiva e independiente de *Klsnf1Δ*. Al comparar las muestras de la cepa KHO46-12A y de la cepa KDR1-1D el p valor fue mayor de 0,1 en las tres condiciones analizadas.

El análisis del promotor *KISIP4* llevó a la identificación de dos posibles elementos CSRE (Rodicio y col., 2008). Si este gen *KISIP4* está regulado exclusivamente a través de estos elementos se espera que, al igual que *KIICLI*, se exprese en etanol pero no en glicerol ni glucosa. Además, la expresión debe ser dependiente del complejo KISNF1 y de los factores KICat8 y KISip4. Con el fin de investigarlo, se procedió al estudio del promotor *KISIP4* analizando el plásmido *pKISIP4p-lacZ* en una cepa silvestre y en cepas mutantes en los genes que codifican las proteínas reguladoras mencionadas.

Como se puede observar en la figura 19, en la cepa silvestre se induce la expresión del gen *KISIP4* durante el crecimiento en etanol, alcanzando niveles de actividad β -galactosidasa similares a los detectados para *pKICAT8-lacZ* en estas condiciones, mientras que en glucosa o glicerol son unas 8 veces inferiores. En ausencia de KISnf1 y de proteína activadora KICat8 la expresión del gen *KISIP4* es prácticamente nula con independencia de la fuente de carbono utilizada demostrando que ambas proteínas son esenciales para la desrepresión del gen *KISIP4*. Sin embargo, cuando el promotor *KISIP4* se analiza en el mutante *Klsip4Δ* se encuentran unos

Resultados

niveles de actividad β -galactosidasa similares a los de la cepa silvestre en etanol, e incluso algo superiores en glucosa y en glicerol. El patrón de expresión encontrado en las diferentes fuentes de carbono y la dependencia del complejo KISnf1 y de KICat8 coincide con lo descrito para el gen *KIICLI* (figura 17.A; Rodicio y col., 2008) y está de acuerdo con que la expresión de *KISIP4* está regulada por los elementos CSRE. El hecho de que KISip4 no se requiera para su propia síntesis podría deberse a que KISip4 no sea capaz de unirse a los elementos CSRE de su propio promotor y por tanto la expresión sea dependiente únicamente de KICat8. Esta hipótesis se analizará posteriormente (apartado 2.7 de Resultados).

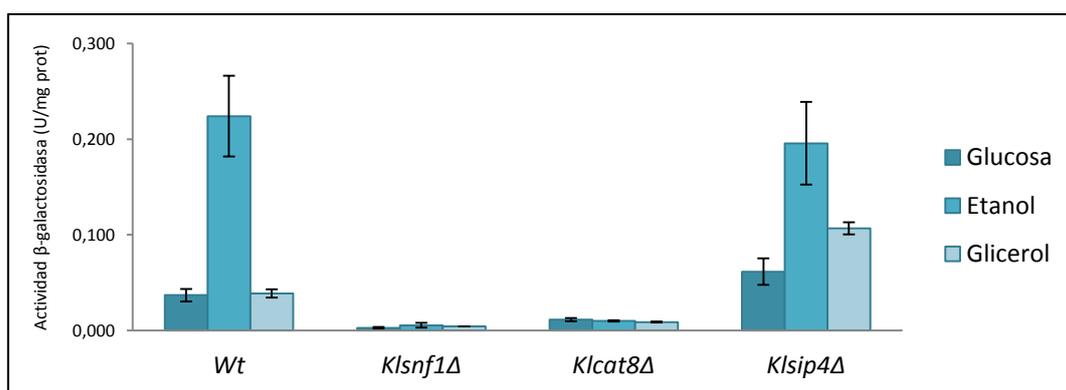


Figura 19. Expresión del gen *KISIP4* en la cepa KHO75-11A (*lac4*Δ; Wt) y en los mutantes KDR1-1D (*Klsnf1*Δ*lac4*Δ), KHO111-2A (*Klcat8*Δ*lac4*Δ) y KHO104-8A (*Klsip4*Δ*lac4*Δ) en diferentes fuentes de carbono. Las cepas β -galactosidasa negativas KHO75-11A y *Klsnf1*Δ se transformaron con el plásmido p*KISIP4p-lacZ*. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B. En la cepa silvestre los niveles de expresión son máximos en etanol y unas cinco veces inferior en glucosa y en glicerol. Tanto en la cepa *Klsnf1*Δ como en la cepa *Klcat8*Δ, los niveles de expresión son prácticamente nulos. En el mutante *Klsip4*Δ los niveles de actividad β -galactosidasa son similares a los de la cepa silvestre en etanol, e incluso algo superiores en glucosa y en glicerol.

2.3. Nivel de las proteínas KICat8 y KISip4

Los niveles de actividad β -galactosidasa no siempre reflejan el nivel de proteína total presente en las células. Ante la posibilidad de que existieran modificaciones post-transcripcionales o que pudieran afectar al nivel de proteína final, se procedió a la detección de las proteínas KICat8 y KISip4 mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos monoclonales anti-Myc. Para ello se construyeron los plásmidos p*KICAT8*-Myc y p*KISIP4*-Myc funcionales que complementaron el defecto de las cepas mutantes *Klcat8*Δ y *Klsip4*Δ, respectivamente, en etanol (datos no mostrados) (figura 20).

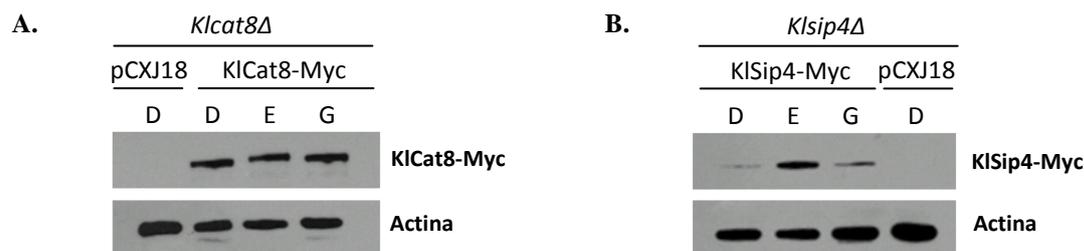


Figura 20. Western blot del nivel de las proteínas de fusión KICat8-Myc y KISip4-Myc. Los plásmidos se transformaron en las cepas mutantes KHO111-2A (*Klcat8Δ*) y KHO104-8A (*Klsp4Δ*) y se demostró su funcionalidad en un ensayo de la gota (datos no mostrados). A continuación los transformantes se crecieron en las fuentes de carbono de interés. Las muestras se procesaron según se describe en el apartado 6.1. de Materiales y Métodos. Los extractos obtenidos se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-Myc. Como control negativo se utilizó la cepa mutante correspondiente transformada con el vector pCXJ18. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina. **A.** El nivel de proteína de KICat8-Myc no cambia significativamente en las diferentes fuentes de carbono analizadas. **B.** El nivel de proteína KISip4-Myc es elevado en etanol y considerablemente menor tanto en glucosa como en glicerol.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de los promotores correspondientes. Así, el nivel de proteína total KICat8-Myc no cambia significativamente en las diferentes fuentes de carbono ensayadas mientras que el de KISip4-Myc es elevado en etanol y considerablemente menor tanto en glucosa como en glicerol. Por tanto los factores de transcripción, una vez sintetizados no parecen sufrir modificación que afecta su estabilidad o tamaño.

2.4. Localización subcelular de KICat8 y KISip4

Con el fin de investigar si la localización subcelular depende de la fuente de carbono, se construyeron plásmidos que contienen la ORF de *KICAT8* y *KISIP4* en pauta con GFP. Como marcador nuclear se utilizó el plásmido pGAL4BD-mCherry.

Los resultados obtenidos indican que la localización de la proteína de fusión KICat8-GFP es nuclear independientemente de la fuente de carbono (figura 21.A). Igualmente, durante el crecimiento en etanol, única condición en la que se forma suficiente proteína KISip4-GFP para ser detectada, también se detectó en el núcleo (figura 21.B) y por tanto la localización subcelular no está regulada por la fuente de carbono.

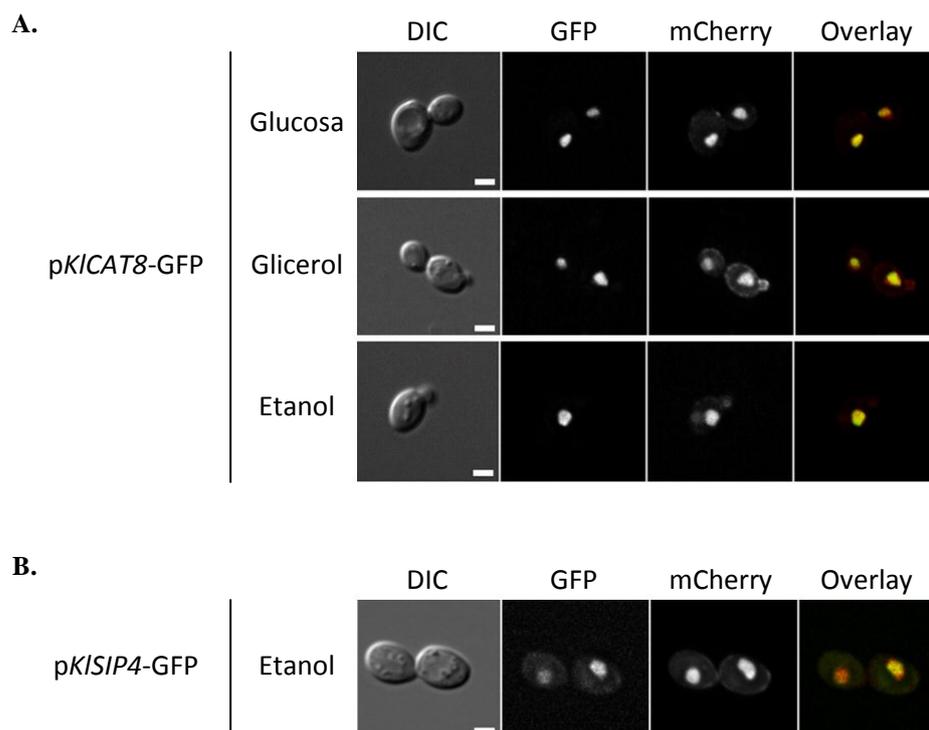


Figura 21. Localización de las proteínas KICat8-GFP y KISip4-GFP en la cepa KHO46-12A (Wt). En la figura se muestra la imagen (de izquierda a derecha): en contraste interferencial (DIC), la señal asociada a GFP, la señal asociada al marcador mCherry y la superposición de la señal de GFP y de mCherry (Overlay). Las construcciones pKICAT8-GFP y pKISIP4-GFP, se cotransformaron junto con el plásmido pGAL4BD-mCherry en la cepa silvestre KHO46-12A. Los transformantes se crecieron como se describe en Materiales y Métodos (apartado 7.1.). **A.** KICat8-GFP se localiza en el núcleo independientemente de la fuente de carbono. **B.** Durante el crecimiento en etanol KISip4-GFP se localiza en el núcleo.

2.5. Nivel de activación de KICat8 y KISip4

Estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* con la proteína Cat8 de *K. lactis* permitieron localizar el dominio de activación de la transcripción en el extremo C-terminal. Además demostraron que la fosforilación dependiente de SNF1 del residuo Ser 661 de KICat8 es responsable de su activación. Dicho residuo se encuentra en una secuencia que se ajusta a la consenso de fosforilación por Snf1 y está conservado en diferentes ortólogos de levaduras (Charbon y col., 2004). Estudios llevados a cabo en esta levadura identificaron al dominio de activación de Sip4 también en el extremo C-terminal, pero no se conoce el residuo implicado en la regulación. Tampoco existen estudios sobre este factor en *K. lactis*.

Con el fin de localizar el dominio de activación de KISip4 y el residuo responsable de su activación primero analizamos su actividad mediante la técnica de un híbrido. Para ello obtuvimos el plásmido pGAL4BD-KISIP4AD que codifica una proteína que contiene el dominio de unión a ADN del factor de transcripción Gal4 de *S. cerevisiae*, fusionado con la ORF del gen KISIP4 (salvo el extremo 5' que contiene el dominio de unión a ADN) y su síntesis depende del

promotor constitutivo *KIPGK1*. La proteína de fusión Gal4BD-KISip4AD se puede unir al promotor del gen *LAC4* presente en la cepa receptora, a través del dominio de unión a ADN del factor de transcripción Gal4 induciéndose la síntesis de β -galactosidasa del gen en función del estado del dominio de activación de KISip4. Para poder analizar esta construcción la cepa receptora debe carecer además del gen *LAC9* que codifica la proteína reguladora Lac9 (= KIGal4) que normalmente controla la expresión de *LAC4*. Así, la actividad β -galactosidasa detectada en los transformantes reflejará el nivel de activación de KISip4.

El plásmido pGAL4BD-KISIP4AD se transformó en una cepa silvestre y en un mutante *Klsnf1 Δ* . Como control se utilizó el vector pJH1570 que codifica el dominio de unión a ADN de Gal4 bajo el control del promotor *KIPGK1* (pGAL4BD). Los resultados obtenidos al valorar la actividad β -galactosidasa en los transformantes crecidos en diferentes fuentes de carbono se muestran en la [figura 22](#). Como se puede observar, en la cepa silvestre, la proteína KISip4 se encuentra activa en todas las fuentes de carbono aunque los niveles de β -galactosidasa son algo inferiores en glicerol y se reducen a la mitad en glucosa. Sin embargo, es importante mencionar que la activación en glucosa y en glicerol, podría no ser muy significativa *in vivo* ya que la síntesis de la proteína de fusión en la construcción pGAL4BD-KISIP4AD en este análisis es constitutiva a diferencia de lo que ocurre con el gen *KISIP4* cuya expresión es muy baja en dichas fuentes de carbono. En la cepa *Klsnf1 Δ* los niveles son muy bajos, lo que demuestra que la activación de KISip4 es dependiente de KISnf1.

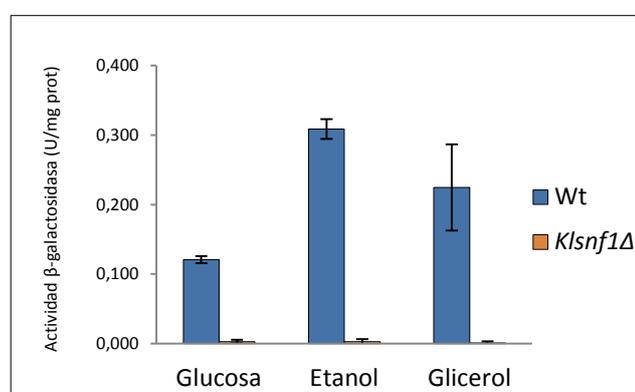


Figura 22. Nivel de activación de KISip4 en la cepa KES2 (*lac9 Δ* ; Wt) y en el mutante KHO143-1C (*Klsnf1 Δ lac9 Δ*). Los transformantes se crecieron en medio SCD sin leucina hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 2. Las células del cultivo inicial se recogieron por centrifugación y se transfirieron a los medios SCDleu, SCEleu y SCGLEu. Los cultivos se mantuvieron en agitación y se recogieron muestras a las seis horas a partir de las cuales se prepararon extractos libres de células en los cuales se valorará la actividad β -galactosidasa y la proteína total. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes. El nivel de activación en cada caso se obtuvo restando la actividad β -galactosidasa del plásmido pGAL4BD-KISIP4AD al valor de actividad del plásmido control. En la cepa silvestre, durante el crecimiento en etanol el nivel de activación de KISip4 es unas dos veces superior al nivel observado en glucosa, pero similar al nivel de activación en glicerol. En la cepa mutante *Klsnf1 Δ* el nivel de activación de KISip4 fue prácticamente nulo en todas las fuentes de carbono ensayadas.

Resultados

Una vez demostrada la actividad transcripcional de KISip4 analizamos la secuencia de la proteína en busca de posibles residuos susceptibles de fosforilación. El residuo Ser 612 se encuentra en el entorno FSRLISHYQL que se ajusta a la secuencia consenso descrita para AMPK (Φ XRXXSXXX Φ , siendo Φ un aminoácido hidrofóbico y X cualquier aminoácido; Dale y col., 1995). Para proceder a su estudio obtuvimos los plásmidos pKISIP4-S612E y pKISIP4-S612A que codifican las proteínas KISip4-S612E y KISip4-S612A que mimetizan la forma fosforilada y la no fosforilada, respectivamente, y valoramos la capacidad de ambas construcciones para revertir el fenotipo de *Klsip4* Δ en diferentes fuentes de carbono. Los resultados obtenidos demuestran que ambas construcciones muestran un crecimiento equivalente al de la proteína silvestre (figura 23), indicando que el residuo Ser612 no es un residuo clave para la activación de KISip4. Una posible explicación sería que este residuo participara en la adaptación inicial al uso de fuentes de carbono no fermentables.

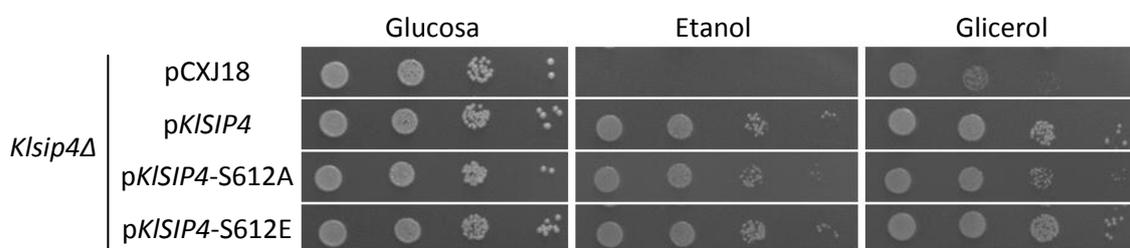


Figura 23. Análisis fenotípico de los alelos mutantes que codifican las proteínas KISip4-Ser612Ala y KISip4-Ser612Glu. Análisis de complementación de la cepa (*Klsip4* Δ) con los plásmidos pKISIP4-S612E y pKISIP4-S612A. Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 7. La modificación del residuo Ser 612 de KISip4 no afecta al crecimiento en etanol y en glicerol. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klsip4* Δ transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pKISIP4.

De modo paralelo también analizamos el estado de activación de la proteína KICat8 utilizando el plásmido pGAL4BD-KICAT8AD. Los resultados obtenidos al valorar la actividad β -galactosidasa en los transformantes crecidos en diferentes fuentes de carbono se muestran en la figura 24. Como se puede observar, en la cepa silvestre, la proteína KICat8 se encuentra activa en todas las fuentes de carbono aunque los niveles de β -galactosidasa son inferiores en glicerol (la mitad que en etanol) y en glucosa (aproximadamente 5 veces menos) y en la cepa *Klsnf1* Δ los niveles de activación son muy bajos, lo que confirma que la activación de KICat8 es dependiente de KISnf1.

Los resultados encontrados en cuanto a la activación de KICat8 concuerdan con los estudios de activación de la proteína realizados en *S. cerevisiae* (Charbon y col., 2004). Además, la actividad transcripcional en glucosa está de acuerdo con los resultados de

fosforilación de KISnf1 (apartado 1.6 de Resultados) en los que se demostró que una porción de ella se encuentra fosforilada durante el crecimiento en esta fuente de carbono pudiendo por tanto mediar la activación de KICat8.

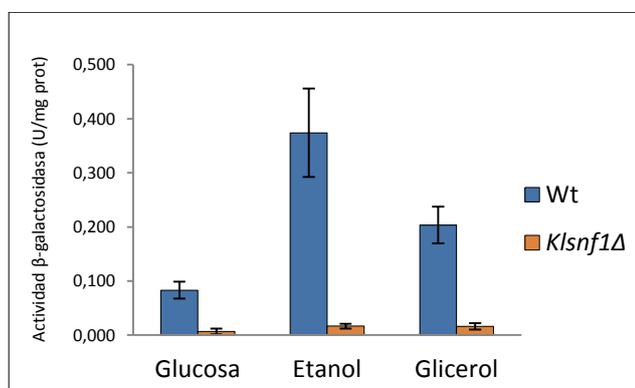


Figura 24. Nivel de activación de KICat8 en la cepa KES2 (*lac9Δ*; Wt) y en el mutante KHO143-1C (*Klsnf1Δlac9Δ*). Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 22. En la cepa silvestre, durante el crecimiento en etanol el nivel de activación de KICat8 es aproximadamente cuatro veces superior que durante el crecimiento en glucosa y dos veces superior que en glicerol. En la cepa mutante *Klsnf1Δ* el nivel de activación de KICat8 fue prácticamente nulo en todas las fuentes de carbono ensayadas. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes.

Análisis de dos híbridos llevados a cabo con las proteínas Cat8 y Sip4 de *S. cerevisiae* demostraron que pueden interactuar formando heterodímeros (Vincent y col., 2001). Por ello consideramos importante determinar si la ausencia de KICat8 afecta al nivel de activación de KISip4, y viceversa. Los datos indican que el nivel de activación de estos factores de transcripción no cambia significativamente en ausencia del otro figura 25 indicando que estos factores pueden actuar al menos como homodímeros.

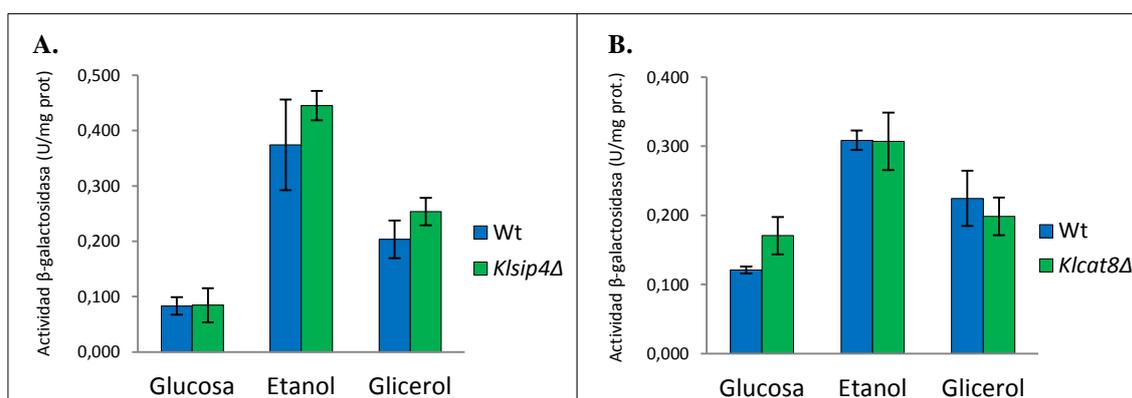


Figura 25. Nivel de activación de KICat8 y KISip4 en las cepas mutantes KHO180-3C (*Klsip4Δ*) y KHO181-10C (*Klcats8Δ*). Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 22. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes. **A.** El nivel de activación de KICat8 en la cepa *Klsip4Δ* no cambia significativamente en relación a los valores obtenidos en la cepa silvestre. **B.** El nivel de activación de KISip4 en la cepa *Klcats8Δ* no cambia significativamente en relación a los valores obtenidos en la cepa silvestre.

2.6. Identificación del dominio de activación de KISip4 dependiente de KISnf1

Los estudios acabados de describir no permitieron identificar de ningún residuo aminoacídico responsable de la activación de KISip4. Por ello consideramos importante acotar de forma más precisa los dominios de esta proteína esenciales para su actividad transcripcional. Para ello se fusionaron diferentes fragmentos de la proteína KISip4 al dominio de activación de Gal4 y se valoró su capacidad para activar la transcripción del gen *LAC4*.

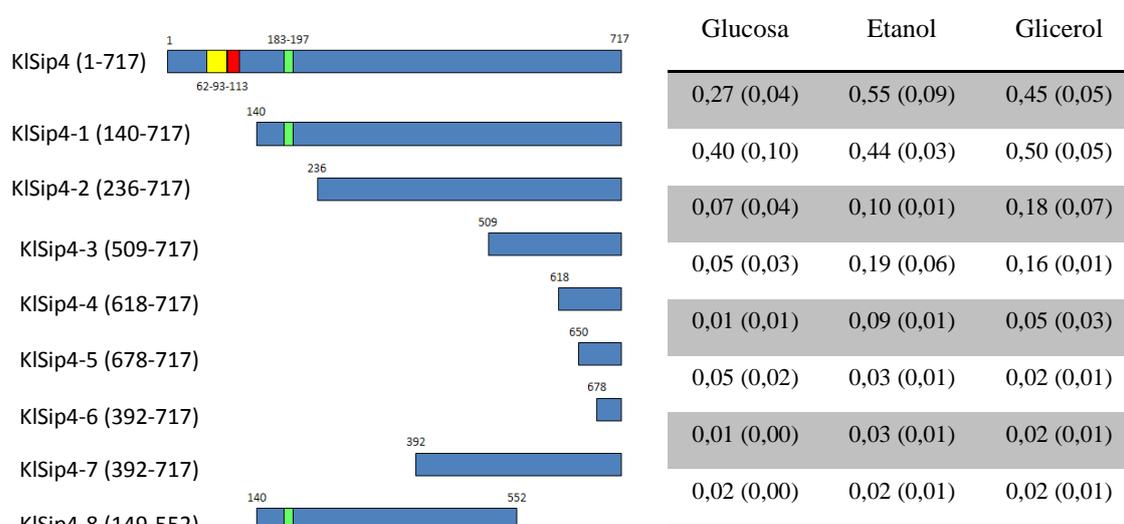


Figura 26. Nivel de activación de las construcciones pGALABD-KISIP4AD en la cepa KES2 (*lac9A*; Wt). **A.** Esquema de las construcciones utilizadas para el ensayo de un híbrido. La secuencia de KISip4 se representa en azul, en amarillo se indica el dominio de unión a ADN (dedos de zinc de tipo Zn(II)₂ Cys₆), en rojo la secuencia *linker* y en verde el dominio de dimerización (*coiled coil*). **B.** Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 22. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes. Para más detalles ver texto.

2.7. Especificidad de KICat8 y KISip4 por diferentes variantes de elementos CSRE

Estudios llevados a cabo con el gen *KIICLI* demostraron que solamente KISip4 es capaz de unirse a los elementos CSRE de su promotor (Rodicio y col., 2008). Por otro lado, la expresión de *KISIP4* depende únicamente del factor KICat8 sugiriendo que ésta proteína es la que reconoce a los elementos CSRE del promotor KISip4 (apartado 2.2 de Resultados).

Para investigar esta hipótesis se realizó un experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para ello se utilizó la cepa *Klcat8Δ* transformada con el plásmido pKICAT8-

Myc. Las células crecidas en glucosa se transfirieron a medios con el mismo azúcar y con etanol y se mantuvieron durante 3 horas antes de realizar la fijación (*crosslinking*) con formaldehído. La inmunoprecipitación de la cromatina sonicada se llevó a cabo con anticuerpos anti-Myc y anti-PFK2, este último para ser utilizado como control negativo del experimento (apartado 6.2 de Materiales y Métodos). Finalmente, la cromatina inmunoprecipitada se utilizó como ADN molde del experimento.

Para realizar el análisis de PCR se utilizó una pareja de oligos que amplifican un fragmento de ADN que va de la posición -642 hasta -421 y contiene los dos elementos CSRE del promotor de *KISIP4*, así como dos oligos flanqueantes de los elementos CSRE del promotor del gen *KIICL1* correspondientes a la región -900 hasta -648 que también incluye los dos elementos reguladores de este promotor para ser utilizados como control y la cromatina purificada sin inmunoprecipitar (Input) para valorar la cantidad de ADN de partida. La [figura 27](#) corresponde al gel de agarosa obtenido al analizar los productos de PCR. De acuerdo con lo esperado para los elementos CSRE del promotor *KIICL1* (Rodicio y col., 2008), no se encontró ninguna señal en las muestras correspondientes a este promotor tanto de etanol como de glucosa. La amplificación obtenida con los oligos específicos de *KISIP4* demuestra que K1Cat8 se une directamente a los elementos CSRE de este promotor.

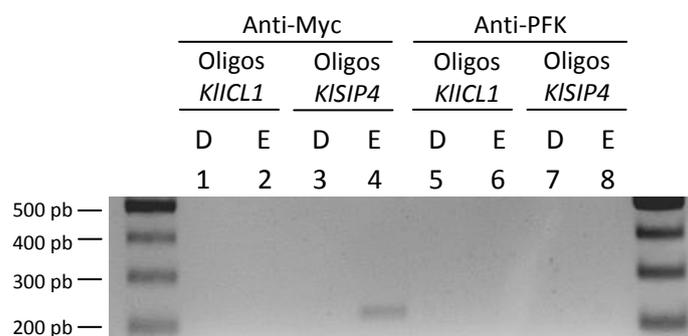


Figura 27. Ensayo de ChIP entre la proteína K1Cat8 y los elementos CSRE del promotor del gen *KIICL1* y *KISIP4*. La cepa KHO111-2A (*K1cat8Δ*) se transformó con el plásmido p*K1CAT8*-Myc. El transformante se creció en medio SCD sin uracilo hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 2. Las células del cultivo inicial se recogieron por centrifugación y se transfirieron a los medios SCDura y SCEura. Las muestras se obtuvieron como se describe en el apartado 6.2 de Materiales y Métodos. La imagen muestra una electroforesis (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean los dos elementos CSRE en el promotor de *KIICL1* (como control) y los dos elementos CSRE del promotor de *KISIP4*. Como se puede observar en la calle 4, K1Cat8 se une a los elementos CSRE del promotor del gen *KISIP4* durante el crecimiento en etanol, sin embargo no es capaz de unirse a los elementos CSRE del promotor del gen *KIICL1* ni en glucosa ni en etanol (calles 1 y 2). A modo de control negativo se realizaron dos muestras que se procesaron de forma idéntica, pero se les añadió anticuerpo anti-PFK2 en lugar de anticuerpo anti-Myc (calles 5, 6, 7 y 8).

Resultados

También se investigó si la proteína KISip4 es capaz de unirse a los elementos CSRE su propio promotor. Para ello se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación de cromatina similar al descrito anteriormente, utilizando la cepa *Klsip4Δ* transformada con el plásmido p*KISIP4*-Myc. Los resultados se muestran en la [figura 28](#).

Utilizando los oligos del promotor *KIICLI* se observa una banda en la muestra de etanol, pero no en la de glucosa. Este resultado concuerda con lo descrito en Rodicio y col. (2008). Asimismo, también se observa amplificación al utilizar los oligos del promotor del gen *KISIP4* durante el crecimiento en etanol, pero no en la muestra de glucosa. Este experimento demuestra que la proteína KISip4 es capaz de unirse a los elementos CSRE del promotor del gen *KISIP4* aunque la eficiencia de la unión parece ser mucho menor que en el caso del promotor *KIICLI*.

El hecho de que la afinidad de KICat8 por el promotor *KISIP4* sea muy superior a la que presenta KISip4 podría explicar por qué la expresión de *KISIP4* solo depende de KICat8 (apartado 2.2 de Resultados).

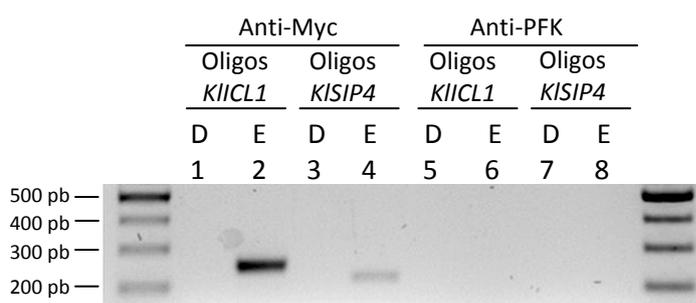


Figura 28. Ensayo de ChIP entre la proteína KISip4 y los elementos CSRE del promotor del gen *KIICLI* y *KISIP4*. La cepa KHO104-8A (*Klsip4Δ*) se transformó con el plásmido p*KISIP4*-Myc. Las muestras se obtuvieron como se describe en la figura 27. La imagen muestra una electroforesis (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean los dos elementos CSRE en el promotor de *KIICLI* (como control) y los dos elementos CSRE del promotor de *KISIP4*. Como se puede observar en la calle 2, KISip4 se une a los elementos CSRE del promotor del gen *KIICLI* durante el crecimiento en etanol. Aunque KISip4 también es capaz de unirse a los elementos CSRE de su propio promotor (calle 4), lo hace en menor medida. A modo de control negativo se realizaron dos muestras que se procesaron de forma idéntica, pero se les añadió anticuerpo anti-PFK2 en lugar de anticuerpo anti-Myc.

2.8. Estudio de supresores de la ruta de señalización KISnf1-KICat8/KISip4

Los experimentos de ChIP realizados con los promotores *KISIP4* y *KIICLI* indican que los factores KICat8 y KISip4 se unen a variantes diferentes de elementos CSRE con diferente afinidad ([figuras 27 y 28](#); Rodicio y col., 2008). Esto podría explicar por qué en *K. lactis* ambos

factores son esenciales para la utilización de etanol (figura 16). En *S. cerevisiae*, K1Sip4 se une a secuencias mucho más específicas que K1Cat8 explicando por qué solo este último es esencial para la utilización de etanol y glicerol (Vincent y Carlson, 1998). En *K. lactis* parece ser la situación contraria ya que K1Sip4 puede unirse tanto al promotor *KISIP4* como a *KIICLI* mientras que K1Cat8 solo reconoce al primero. Si en *K. lactis* K1Sip4 es el factor fundamental para controlar la regulación mediada por elementos CSRE podría esperarse que su superproducción suprimiera el fenotipo del mutante *Klcat8Δ*. Para investigar la importancia relativa de los factores K1Sip4 y K1Cat8 en el metabolismo del etanol se llevó a cabo un análisis de supresores. Para ello se utilizó un plásmido que permite la síntesis de proteína K1Cat8-S661E constitutivamente activa.

Para disponer de las herramientas moleculares necesarias, en primer lugar, construimos un plásmido que expresa el alelo mutante *KICAT8-S661E*. Según se comentó anteriormente, el residuo serina 661 juega un papel clave en la activación de este factor de transcripción y su sustitución por glutamato activa de forma constitutiva a K1Cat8 (Charbon y col., 2004). Puesto que aún se desconoce cuál es el residuo clave en la activación de K1Sip4, en este caso se utilizó un plásmido que contiene el gen *KISIP4* clonado en el vector multicopia pCXJ22.

Como se puede ver en la figura 29, la superproducción de K1Sip4 permite al mutante *Klcat8Δ* crecer en etanol, mientras que, por el contrario, la activación constitutiva de K1Cat8 no revierte el fenotipo del mutante *Klsip4Δ*.

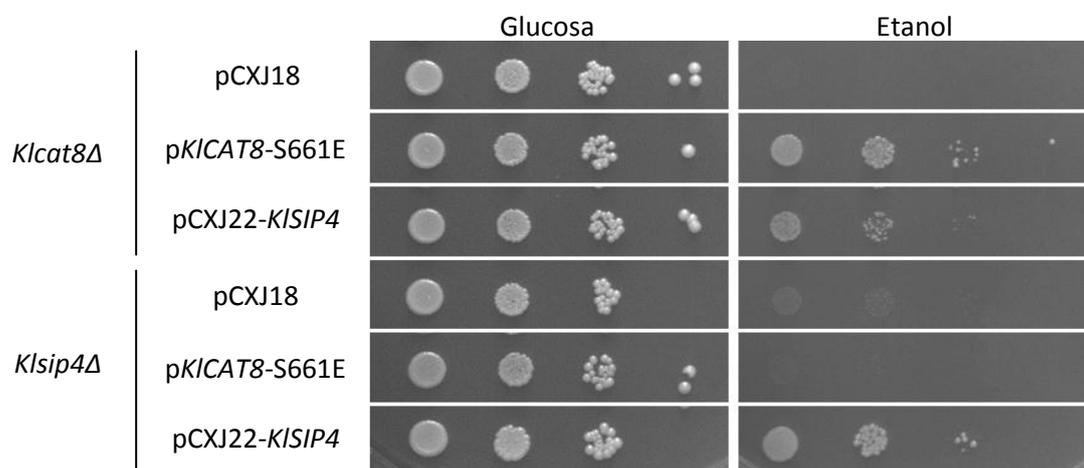


Figura 29. Estudio de supresores. Los mutantes KHO111-2A (*Klcat8Δ*) y KHO104-8A (*Klsip4Δ*) se transformaron con las construcciones pKICAT8-S661E y pCXJ22-KISIP4. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7. Como control negativo se transformó cada uno de los mutantes con el vector pCXJ18. La presencia de la construcción pCXJ22-KISIP4 permite el crecimiento del mutante *Klcat8Δ* en etanol, en cambio la activación constitutiva de K1Cat8 no revierte el fenotipo del mutante.

Resultados

Con el fin de descartar la posibilidad de que en la construcción obtenida por nosotros KICat8 no se encontrase realmente activado se estudió su actividad mediante análisis de un híbrido. Con el fin de disponer de las herramientas moleculares necesarias, obtuvimos un plásmido pGALABD-KICAT8AD-S661E. Los resultados obtenidos (figura 30) indican que realmente nuestra construcción codifica para una proteína KICat8 activa de forma constitutiva. Por tanto estos resultados demuestran que en *K. lactis* KISip4 es el factor principal para la regulación dependiente de elementos CSRE.

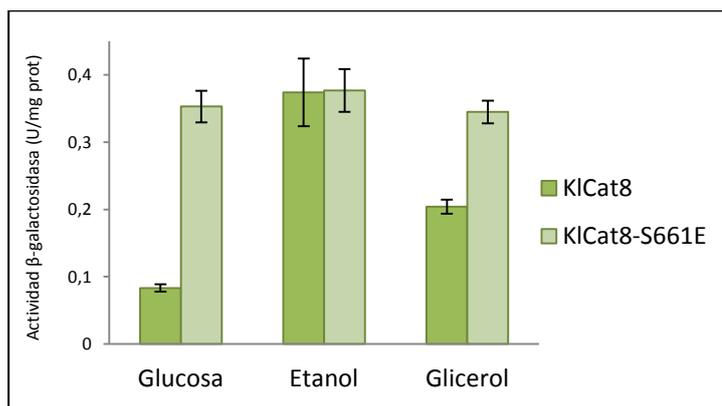


Figura 30. Nivel de activación de la proteína mutante KICat8-S661E en la cepa KES2 (*lac9Δ*; Wt). Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 22. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes. En las tres condiciones analizadas el nivel de activación de la construcción pGALABD-KICAT8AD-S661E es similar al de la proteína silvestre en etanol (condición en la que se observa el mayor nivel de activación de KICat8).

3. Función de las proteínas KISak1 y KIReg1

Como se comentó en la introducción, en *S. cerevisiae* el nivel de activación de Snf1 se regula por un proceso de fosforilación/defosforilación controlado por las quinasas Sak1, Tos1, Elm1 y por la fosfatasa Reg1-Glc7. Estudios con cepas mutantes demostraron que Sak1 es la quinasa fundamental durante la activación de Snf1 en presencia de fuentes de carbono no fermentables. Por otra parte, los mutantes *reg1Δ* se utilizan con frecuencia para estudiar el efecto de la activación constitutiva de Snf1. Por ello, consideramos importante estudiar el papel que desempeñan estas proteínas en la regulación de la ruta SNF1-Cat8/Sip4 de *K. lactis*.

3.1. Caracterización de los mutantes *Klreg1Δ* y *Klsak1Δ*

El análisis del genoma de *K. lactis* nos permitió identificar los genes *KISAK1* y *KIELM1* que codifican para proteínas que presentan una identidad del 36% y 31%, respectivamente con las proteínas Sak1 y Elm1 de *S. cerevisiae*. No se encontró ningún posible ortólogo de *TOS1*. Asimismo, identificamos el gen *KIREG1* que codifica una proteína que presenta una identidad del 39% con la proteína Reg1 de *S. cerevisiae*.

Con el fin de estudiar la participación de las proteínas que regulan el estado de activación de KISnf1 en la ruta KISNF1-KICat8/KISip4 se procedió a la obtención de mutantes en los genes correspondientes. Para obtener el mutante *Klelm1Δ*, en primer lugar, se delecionó el gen *KIELM1* en la cepa diploide KHO.70, obteniéndose un mutante heterocigótico que se sembró en medio de esporulación (acetato potásico al 1%). Posteriormente, las esporas se separaron en un micromanipulador. Después de varios días de incubación se observó que, de cada tétrada, germinaron como máximo dos esporas lo cual indica que la delección del gen *KIELM1* en esta levadura es letal. Se empleó el mismo proceso para la obtención de los mutantes *Klreg1Δ* y *Klsak1Δ*, encontrándose numerosas tétradas que presentaban una segregación 4:0, indicando que las delecciones de los genes *KIREG1* y *KISAK1* son ambas viables.

Comenzamos analizando el fenotipo de los mutantes obtenidos en las fuentes de carbono de interés. Como se puede observar en la [figura 31.A](#) el mutante *Klsak1Δ* crece en las tres fuentes de carbono analizadas, aunque en etanol y glucosa lo hace algo más lentamente que la cepa silvestre. Por otro lado, la cepa *Klreg1Δ* muestra un crecimiento en glucosa y en glicerol similar al de la cepa silvestre aunque es incapaz de utilizar el etanol como única fuente de carbono y energía. El hecho de que la cepa *Klreg1Δ* crezca en glicerol pone de manifiesto que en dicho mutante tanto la ruta gluconeogénica como la respiración son funcionales y por lo tanto la ausencia de crecimiento en etanol se debe a algún paso específico del metabolismo del etanol o del ciclo del glioxilato.

Resultados

Con el fin de analizar si el fenotipo en etanol del mutante *Klreg1Δ* se debe a la falta de expresión del gen *KIICLI* analizamos su actividad isocitrato liasa. Los datos obtenidos (figura 31.B) indican que la ausencia de crecimiento en etanol no se debe a la ausencia de este enzima, puesto que aunque el nivel de actividad isocitrato liasa se reduce a la mitad, el mismo nivel de actividad permite un crecimiento del mutante *Klsak1Δ* en etanol bastante similar al de la cepa control.

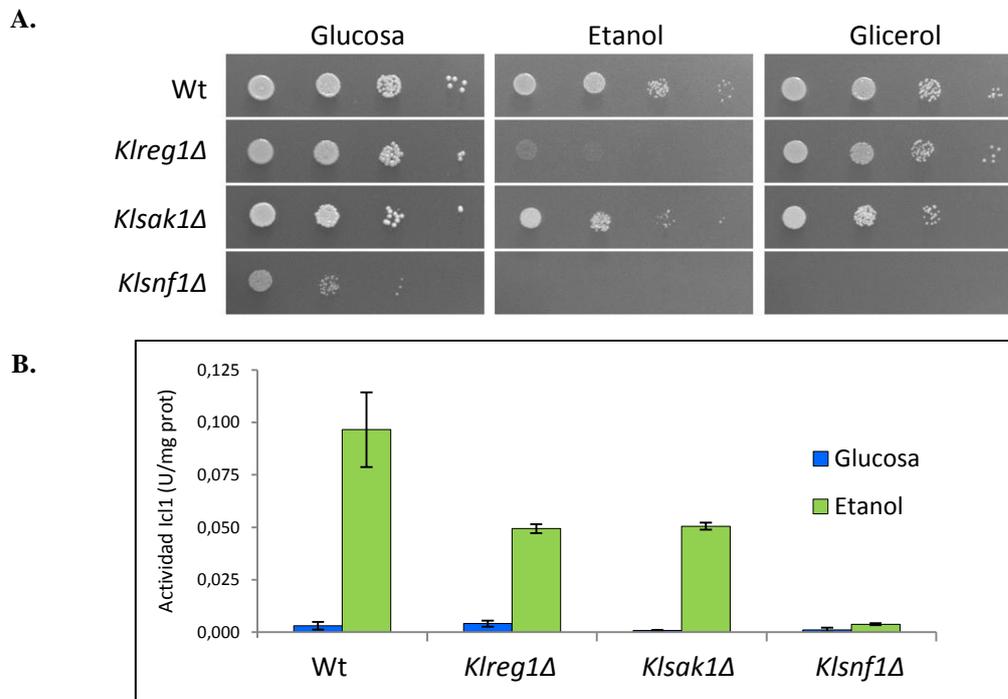


Figura 31. Análisis de las cepas mutantes KHO122-1D (*Klreg1Δ*) y KHO197-1B (*Klsak1Δ*). **A.** Análisis fenotípico de las cepas mutantes *Klreg1Δ* y *Klsak1Δ* en diferentes fuentes de carbono. Los mutantes se crecieron como se describe en la figura 4. La cepa silvestre KHO46-12A y la cepa mutante KDR1-1D (*Klsnf1Δ*) se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. **B.** Actividad isocitrato liasa de las cepas mutantes *Klreg1Δ* y *Klsak1Δ*. Los resultados indican que la actividad isocitrato liasa se reduce a la mitad en ambos mutantes. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klsnf1Δ* y como control positivo se utilizó la cepa silvestre KHO46-12A.

El fenotipo que presenta la cepa *Klreg1Δ* en etanol es sorprendente si se tiene en cuenta que en dicho mutante se espera que Snf1 esté constitutivamente activa. Por ello, procedimos a analizar si en dicho mutante, KISnf1 se encontraba realmente fosforilada realizando un ensayo *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti fosfo-AMPK α (Thr172). Los resultados obtenidos demuestran que en ausencia de K1Reg1, KISnf1 se encuentran fosforilado siendo el grado de fosforilación mayor en etanol que en glucosa (figura 32). Además es significativamente superior al detectado en la cepa silvestre al igual que se ha descrito para los mutantes de *S. cerevisiae* (Ruiz y col., 2011). Por tanto el hecho de que cepa *Klreg1Δ* sea incapaz de utilizar etanol no puede ser atribuido a la ausencia de fosforilación de KISnf1 en la cepa construida.

Para averiguar la contribución de la Snf1 quinasas a la activación de la ruta, también se incluyó en este análisis la cepa *Klsak1Δ*. Aunque en este mutante existe una porción de Snf1 fosforilada, la señal detectada es similar en glucosa y en etanol. Este hecho pone de manifiesto que otra quinasa, posiblemente KIElm1, también puede actuar sobre KISnf1. Dado que la fosforilación de KISnf1 es independiente de la fuente de carbono, KISak1 sería la quinasa encargada de activar al complejo KISNF1 durante el crecimiento en etanol al igual que en *S. cerevisiae*. En consecuencia para este mutante si se podría establecer una correlación entre los niveles de actividad isocitrato liasa y los de fosforilación de KISnf1, siendo ambos inferiores a los de la cepa silvestre en etanol.

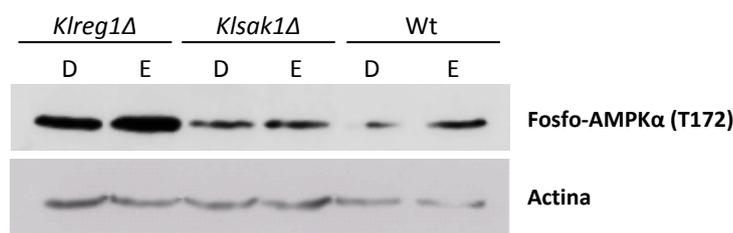


Figura 32. Western blot del nivel de fosforilación de la Thr190 de la subunidad KISnf1 en los mutantes KHO122-1D (*Klreg1Δ*) y KHO197-1B (*Klsak1Δ*). En el mutante *Klreg1Δ* el nivel de activación de KISnf1 es superior al de la cepa silvestre KHO46-12A en ambas fuentes de carbono. En la cepa *Klsak1Δ* el nivel de fosforilación de KISnf1 es independiente de la fuente de carbono. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

3.2. Nivel de proteína de KICat8 y KISip4 en los mutantes *Klreg1Δ* y *Klsak1Δ*

Con el fin de determinar a qué se debe la disminución de actividad isocitrato liasa en el mutante *Klreg1Δ*, en primer lugar, analizamos la presencia de los factores de transcripción KICat8 y KISip4 mediante *Western blot*. Los resultados obtenidos indican que el nivel de proteína KICat8-Myc no se ve afectado por la falta de la proteína KIReg1 durante el crecimiento en las fuentes de carbono ensayadas (figura 33). Por el contrario, la señal correspondiente a KISip4-Myc disminuye significativamente en etanol no detectándose ninguna proteína en la muestra de glucosa. Así, la disminución de los niveles de proteína KISip4 podría explicar la disminución en los niveles de actividad isocitrato liasa en ausencia de KIReg1.

Al analizar los niveles de KICat8-Myc en la cepa *Klsak1Δ* no se encontraron diferencias en relación a cepa silvestre, al igual que lo encontrado para el mutante *Klreg1Δ*. Sin embargo, tampoco varió la cantidad de KISip4-Myc en etanol y por tanto la disminución de la actividad isocitrato liasa en este mutante no se debe a cambios en los niveles de la proteína de KISip4. Al igual que lo descrito para *Klreg1Δ* no se detectó KISip4-Myc en glucosa.

Resultados

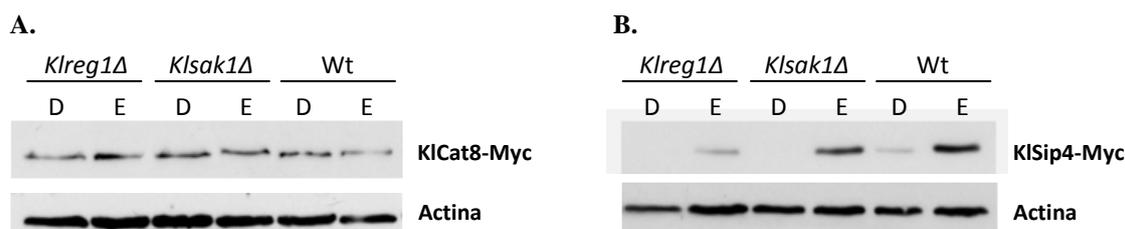


Figura 33. Western blot del nivel de proteína de las fusiones KICat8-Myc y KISip4-Myc. **A.** El plásmido pKICAT8-Myc se transformó en los mutantes KHO122-1D (*Kreg1Δ*) y KHO197-1B (*Ksak1Δ*), y en la cepa silvestre KHO46-12A. Los resultados indican que el nivel de proteína KICat8-Myc no cambia significativamente en los mutantes *Kreg1Δ* y *Ksak1Δ* en relación a la cepa silvestre. **B.** El plásmido pKISIP4-Myc se transformó en los mutantes *Kreg1Δ* y *Ksak1Δ* y en una cepa silvestre. Los resultados indican que el nivel de proteína KISip4-Myc disminuye en el mutante *Kreg1Δ* tanto en glucosa como en glicerol. En el mutante *Ksak1Δ* el nivel de KISip4-Myc es similar al de la cepa silvestre, pero no se detectó proteína en la muestra de glucosa. Las proteínas de fusión se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

3.3. Análisis de la expresión del gen *KISIP4* en el mutante *Kreg1Δ*

La disminución del nivel de proteína KISip4 en el mutante *Kreg1* puede deberse a una disminución de la transcripción del gen *KISIP4*. Por ello se procedió al estudio del promotor de este gen en el mutante *Kreg1Δ* utilizando la construcción pKISIP4p-lacZ.

Los datos obtenidos indican que la expresión de *KISIP4* cambia significativamente en el mutante *Kreg1Δ* durante el crecimiento en etanol en relación a la cepa silvestre y explican la disminución del nivel de proteína KISip4-Myc en el mutante *Kreg1Δ*. Sin embargo, no se ven alterados durante el crecimiento en glucosa a pesar de que no se había detectado proteína en el análisis Western (figura 34).

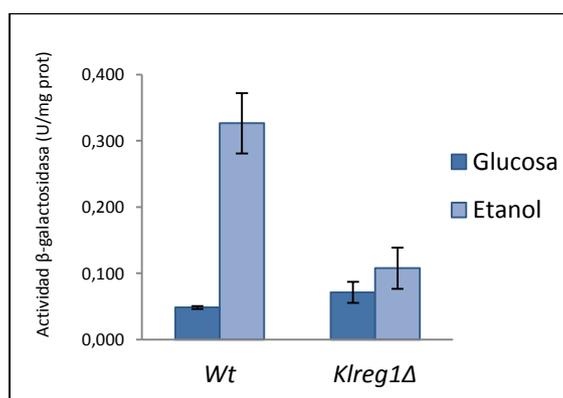


Figura 34. Expresión del gen *KISIP4* en la cepa silvestre KHO75-11A y en el mutante KHO122-1D (*Kreg1ΔKilac4A*) en glucosa y en etanol. La cepa β-galactosidasa negativa KHO75-11A y el mutante *Kreg1ΔKilac4A* se transformaron con el plásmido pKISIP4p-lacZ. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B. Los resultados indican que la expresión de *KISIP4* disminuye significativamente en ausencia de KReg1.

Si el papel que desempeña KIReg1 en la regulación del metabolismo del etanol es una consecuencia directa de la disminución de los niveles de la proteína KISip4 se esperara que la superproducción de este factor de transcripción suprima el fenotipo del mutante *Klreg1Δ*. Para investigar esta hipótesis se transformó la cepa mutante con el plásmido multicopia pCXJ22-*KISIP4*. Como control también se transformaron el vector pCXJ18 y el plásmido que codifica el alelo constitutivo de KICat8. Como se puede ver en la [figura 35](#), la superproducción de KISip4 es capaz de revertir el fenotipo del mutante *Klreg1Δ* permitiéndole crecer en etanol. Por otro lado, la presencia de alelo constitutivo de *KICAT8* no presentó ningún efecto confirmando que KIReg1 actúa regulando los niveles del factor de transcripción KISip4.

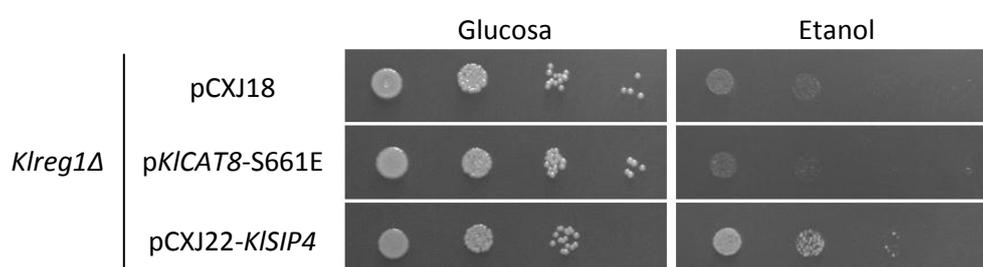


Figura 35. Estudio de supresores. El mutante *Klreg1Δ* (KHO122-1D) se transformó con las construcciones pKICAT8-S661E y pCXJ22-*KISIP4*. Como control negativo se transformó el mutante con el vector pCXJ18. La activación constitutiva de KICat8 no es capaz de revertir el fenotipo del mutante *Klreg1Δ* en etanol. La presencia de la construcción pCXJ22-*KISIP4* permite el crecimiento del mutante *Klreg1Δ* en etanol. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

3.4. Localización de KICat8 y KISip4 en el mutante *Klreg1Δ*

Según acabamos de demostrar, KIReg1 regula la expresión de *KISIP4*. Sin embargo, esta no parece ser la única vía de actuación ya que según se demostró anteriormente los niveles de KISip4 obtenidos en su ausencia permiten obtener el mismo nivel de actividad isocitrato liasa que el detectado en los mutantes *Klsak1Δ* que sí pueden utilizar el etanol. Con el fin de profundizar en el mecanismo de regulación de KIReg1 analizamos si la localización subcelular de KICat8 y KISip4 se ve alterada en ausencia de la proteína KIReg1 durante el crecimiento en etanol.

Como se puede observar en la [figura 36](#), las proteínas de fusión KISip4-GFP y KICat8-GFP están presentes en el núcleo al igual que se había observado en la cepa silvestre ([figura 21](#)). Es importante mencionar que en el caso de KISip4 aparece bastante fluorescencia en la vacuola sugiriendo que se puede ver afectada la estabilidad de la proteína.

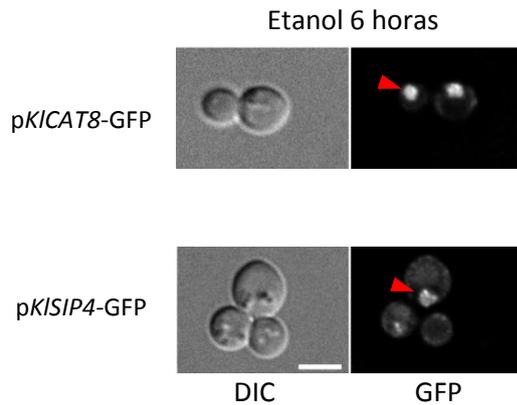


Figura 36. Localización de las proteínas KICat8-GFP y KISip4-GFP en el mutante KHO122-1D (*Klreg1Δ*). En la figura se muestra la imagen en contraste interferencial (DIC) y la señal asociada a GFP. Las flechas rojas señalan los núcleos. La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos pKICAT8-GFP y pKISIP4-GFP. Los resultados obtenidos indican que KICat8-GFP se localiza en el núcleo tanto en glucosa como en etanol en el mutante *Klreg1Δ*. Durante el crecimiento en etanol KISip4-GFP se localiza en el núcleo.

3.5. Nivel de activación de KICat8 y KISip4 en el mutante *Klreg1Δ*

Los resultados obtenidos al valorar la actividad β -galactosidasa en los transformantes crecidos en diferentes fuentes de carbono se muestran en la [figura 37](#). Como se puede observar, en el mutante *Klreg1Δ*, las proteínas KICat8 y KISip4 se encuentran inactivas en todas las fuentes de carbono.

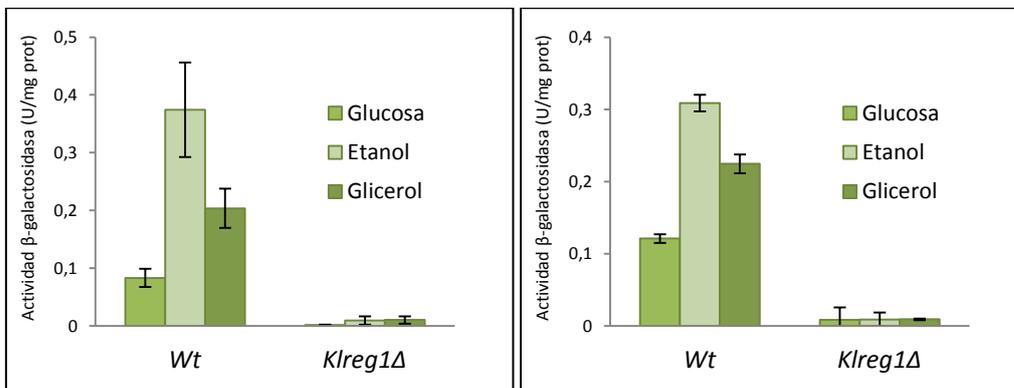


Figura 37. Nivel de activación de KICat8 y KISip4 en la cepa KHO122-1D (*Klreg1Δlac9Δ*). La cepa silvestre *Klreg1Δlac9Δ* se transformó con los plásmidos pGALABD-KICAT8AD y pGALABD-KISIP4AD. Los valores de la cepa silvestre KES2 se utilizaron como control. Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 22. En la cepa silvestre el nivel de activación de KICat8 y de KISip4 fue prácticamente nulo en todas las fuentes de carbono ensayadas. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes.

II. Papel de KlGpd1 en la regulación de la vía KISNF1-Cat8/Sip4 y otras rutas de señalización

En *S. cerevisiae* la expresión en etanol del gen *ICLI* y otros genes regulados a través de elementos CSRE no se ve afectada de modo importante en la presencia de glicerol. Al contrario ocurre en la levadura *K. lactis* donde la síntesis de isocitrato liasa y el factor transcripcional KISip4 no tiene lugar cuando se crecen las levaduras en un medio que contiene glicerol además de etanol (Rodicio y col., 2008). Estudios encaminados a investigar las bases moleculares de este mecanismo de regulación demostraron que el glicerol actúa regulando la actividad de los elementos CSRE y que tiene que ser metabolizado para ejercer su acción (Rodicio y col., 2008). Además, llevaron a identificar al gen *KIGPDI* que codifica la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ como un gen esencial para el metabolismo del etanol (Ríos, 2010). En *S. cerevisiae* para esta actividad existen dos isoenzimas que participan en la regulación del mantenimiento del balance redox durante el crecimiento celular y en situaciones de estrés osmótico. En este apartado se describen los estudios llevados a cabo para estudiar cuales son los mecanismos que permiten al único isoenzima Gpd de *K. lactis* poder participar en la regulación de diferentes rutas de señalización.

1. Caracterización del mutante *Klgpd1Δ*

Según se acaba de comentar, la caracterización inicial de un mutante en el gen *KIGPDI* en la serie isogénica MW270-7B demostró que es esencial para el crecimiento en etanol y en situaciones de estrés osmótico (Ríos, 2010). Con el fin de estudiar la función del gen *KIGPDI*, en estas situaciones consideramos importante obtener un mutante en el fondo genético de la cepa CBS2359. La estrategia utilizada consistió en la sustitución de la secuencia codificadora del gen *KIGPDI* por el marcador *LEU2* en el genoma de la levadura. Finalmente, se analizó el fenotipo del mutante *Klgpd1Δ* en diferentes condiciones (figura 38).

Como se puede observar en la, el mutante *Klgpd1Δ* muestra un ligero retraso en el crecimiento tanto en glucosa como en glicerol comparado con la cepa silvestre y no crece ni en etanol ni en ácido oleico. El fenotipo de *Klgpd1Δ* en estas fuentes de carbono está probablemente relacionado con su papel en la regulación del balance redox sugiriendo que KlGpd1 participa en la reoxidación del NADH tanto durante el crecimiento en glucosa como en glicerol, pero su papel no es determinante para la supervivencia celular. En cambio durante el crecimiento en etanol y en ácido oleico la actividad KlGpd1 si resulta esencial para poder sostener el crecimiento celular.

Resultados

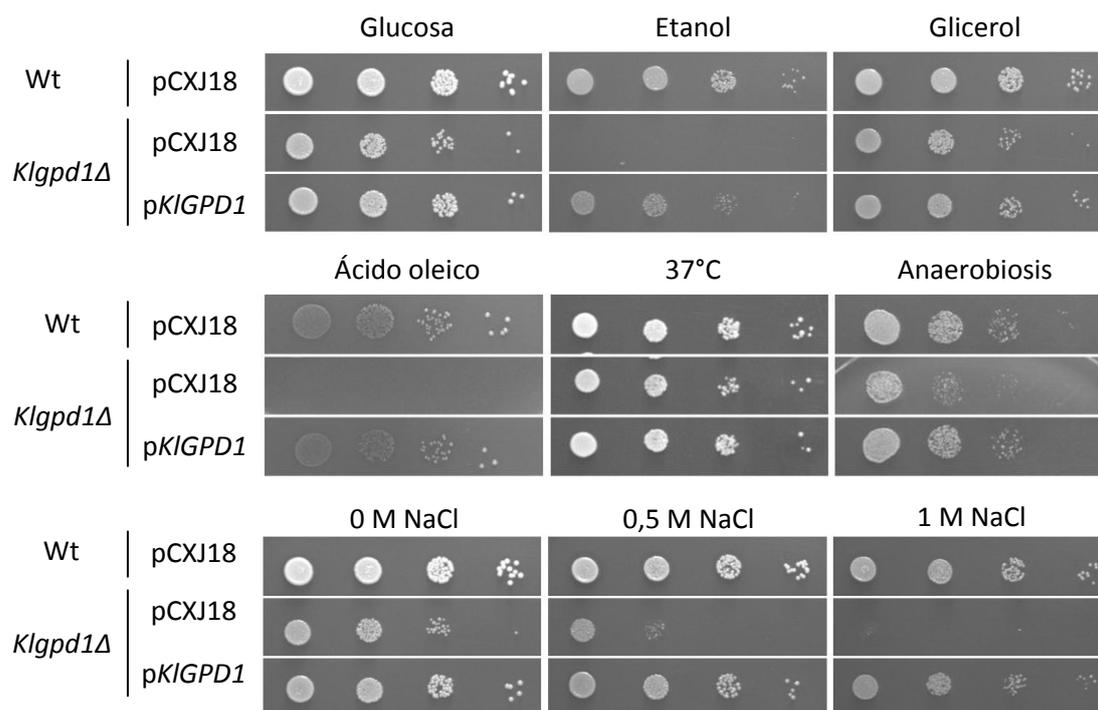


Figura 38. Análisis fenotípico del mutante KHO201-1C (*Klgpd1Δ*) en diferentes condiciones. La cepa *Klgpd1Δ* se transformó con el plásmido *pKIGPD1* para posteriormente analizar su comportamiento en las indicadas condiciones. Como control negativo se transformó dicha cepa con el vector *pCXJ18* y como control positivo se usó la cepa silvestre KHO46-12A (Wt) que contenía el mismo vector. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7 tomándose las fotos después de 3 días de incubación a excepción de la placas de ácido oleico y en condiciones anaeróbicas que se tuvieron 3 y 4 días, respectivamente.

K. lactis no puede crecer en condiciones estrictamente anaeróbicas (Snoek y Steensma, 2006). Por ello analizamos el crecimiento del mutante *Klgpd1Δ* en condiciones limitantes de oxígeno y observamos un retraso significativo en relación al silvestre. Esto indica que en estas condiciones la síntesis de glicerol es importante para reoxidar el NADH citosólico aunque no es el único mecanismo existente (figura 38). En *S. cerevisiae*, la ruta de síntesis de glicerol se activa al aumentar la temperatura a 37°C (Wojda y col., 2007). Nuestros resultados no indican cambios significativos en ausencia de *KIGpd1* durante el crecimiento a 37° C, lo que indica que *K. lactis* no activa la ruta de síntesis de glicerol en respuesta a estrés térmico (figura 38). A temperaturas superiores (39°C) ya no crece la cepa silvestre (dato no mostrado). Finalmente, estudiamos la participación de *KIGPD1* en la respuesta a estrés osmótico. Según se observa en la figura 38, tanto la cepa silvestre, como el mutante transformado con el plásmido *pKIGPD1* son capaces de crecer en las diferentes concentraciones de NaCl, Por el contrario, el crecimiento del mutante *Klgpd1Δ* se ve afectado de forma que el retraso en el crecimiento es mayor a medida que aumenta la concentración de sal y a una concentración de NaCl 1M ya no se detecta ninguno. Por tanto *KIGpd1* también es esencial durante la respuesta a estrés osmótico.

2. Complementación funcional de la cepa mutante *gpd1Δgpd2Δ* de *S. cerevisiae* con el gen *KIGPD1*

Como se comentó en la introducción, los genes *ScGPD1* y *ScGPD2* poseen diferente regulación, y los isoenzimas ScGpd1 y ScGpd2, también desempeñan funciones específicas en la célula, el primero es el principal responsable de la adaptación en situaciones de estrés osmótico y el segundo del mantenimiento del balance NAD^+/NADH durante condiciones anaeróbicas.

Primero investigamos si *KIGPD1* se expresa en *S. cerevisiae* y produce una proteína funcional capaz de realizar las funciones de los isoenzimas de ScGpd1 y ScGpd2. Para ellos se eligió la cepa doble mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* debido a que muchos de los fenotipos asociados con la deficiencia de actividad glicerol 3-fosfato deshidrogenasa no se observan en los mutantes sencillos. Los plásmidos utilizados fueron derivados del vector pCXJ22 que se comporta como monocopia en *S. cerevisiae* y cada gen se expresa bajo el control de su propio promotor.

Como se puede observar en la [figura 39](#), durante el crecimiento en glucosa, etanol, ácido oleico y condiciones limitantes de oxígeno, el mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* crece más lentamente que la cepa silvestre y la presencia de *KIGPD1*, al igual que la de *ScGPD1* y *ScGPD2*, revierte estos fenotipos. Al igual que lo descrito para el mutante de *K. lactis*, el doble mutante de *S. cerevisiae* puede crecer en glicerol y de acuerdo con ello, no se encontraron diferencias entre los diferentes transformantes analizados. En relación a la sensibilidad a altas temperaturas, el mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* no crece cuando la temperatura aumenta a 39° C y el gen *KIGPD1* fue capaz de complementar dicho fenotipo al igual que los dos genes que codifican para los isoenzimas de *S. cerevisiae*.

Finalmente, encontramos que la sensibilidad frente a estrés osmótico del doble mutante de *S. cerevisiae* es mayor que la del de *K. lactis* y así, cuando la concentración de NaCl en el medio es de 0,5 M ya no se observa crecimiento. En todo caso, el gen *KIGPD1* es capaz de revertir el fenotipo tanto si la concentración de NaCl es 0,5M o si se aumenta hasta 1 M y lo mismo ocurre para el gen *ScGPD2*. Sin embargo, a esta última concentración de sal los transformantes con el gen *ScGPD2* crecen más lentamente que ellos y que la cepa silvestre. Esto no es de extrañar dado que el gen ScGpd1 es el principal isoenzima responsable de sintetizar glicerol en situaciones de estrés osmótico.

Los resultados acabados de describir ponen de manifiesto que el único isoenzima de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa citosólica presente en *K. lactis* es capaz de desempeñar las funciones que realizan dos isoenzimas de *S. cerevisiae* ensayadas.

Resultados

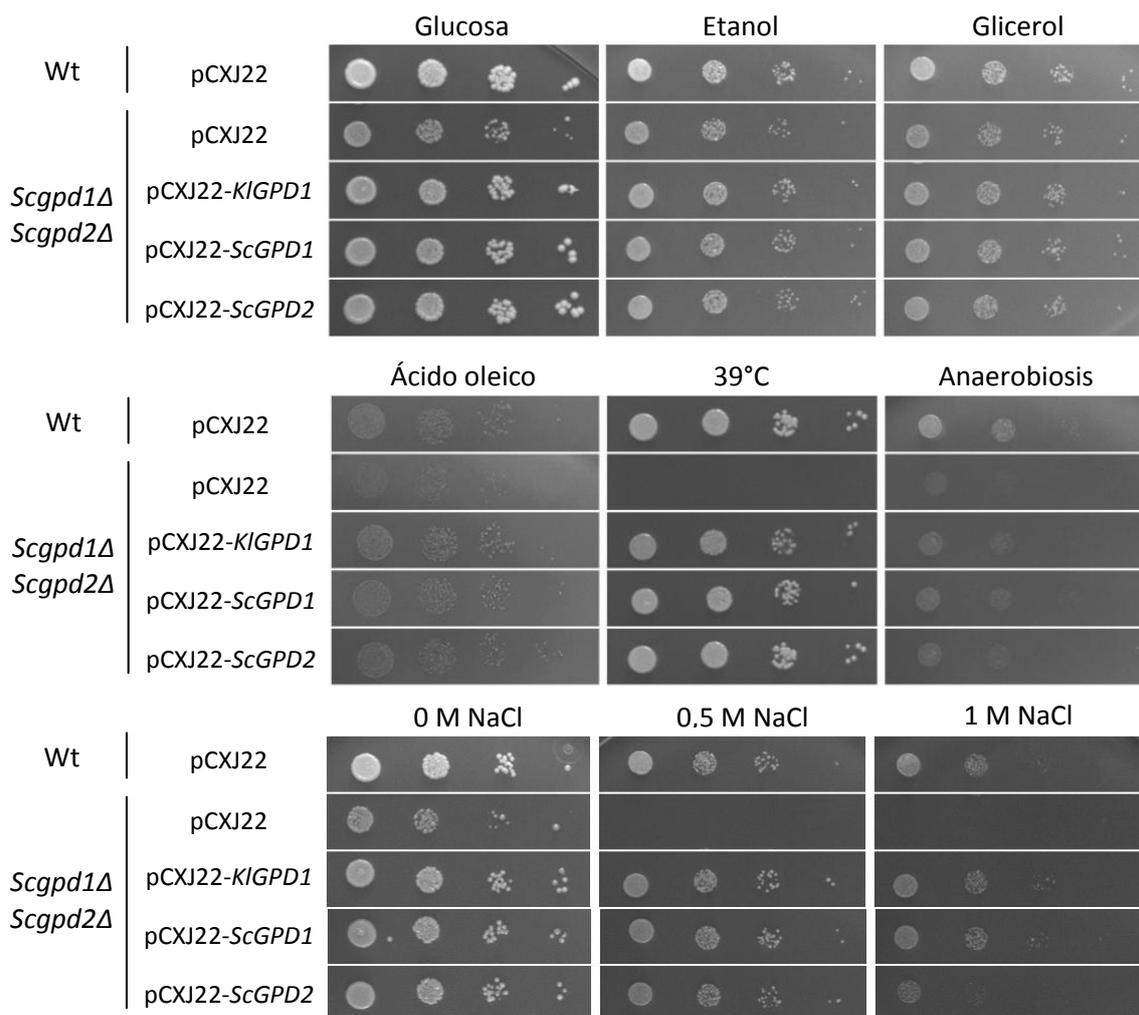


Figura 39. Complementación heteróloga del mutante *gpd1Δgpd2Δ* (HOD120-1C) de *S. cerevisiae* con el gen *GPD1* de *K. lactis*. Las células procedentes de la transformación de la cepa *Scgpd1Δ Scgpd2Δ* con las construcciones pCXJ22-*KIGPD1*, pCXJ22-*ScGPD1* y pCXJ22-*ScGPD2*, se creció en las condiciones indicadas. Como control negativo se utilizó el doble mutante transformado con el vector pCXJ22 y como control positivo se usó una cepa silvestre HOD114-9B (Wt) transformada con el mismo vector. El gen *KIGPD1* es capaz de revertir el fenotipo del mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* en las diferentes condiciones analizadas. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

También investigamos si los genes *ScGPD1* y *ScGPD2* son capaces de revertir las deficiencias del mutante *Klgsd1Δ* transformando dicha cepa con plásmidos monocopia y multicopia. Según se observa en la [figura 40](#), los dos genes de *S. cerevisiae* pueden complementar todos los fenotipos analizados aunque el crecimiento es ligeramente inferior al correspondiente al gen homólogo con ambos tipos de construcciones. Solamente cabe destacar que el gen *ScGPD2* solo puede revertir la sensibilidad del mutante *Klgsd1Δ* a concentraciones elevadas si se sobreproduce ([figura 40](#)). Este resultado no es sorprendente si se tiene en cuenta que es ScGpd1 el isoenzima principal durante esta situación de estrés.

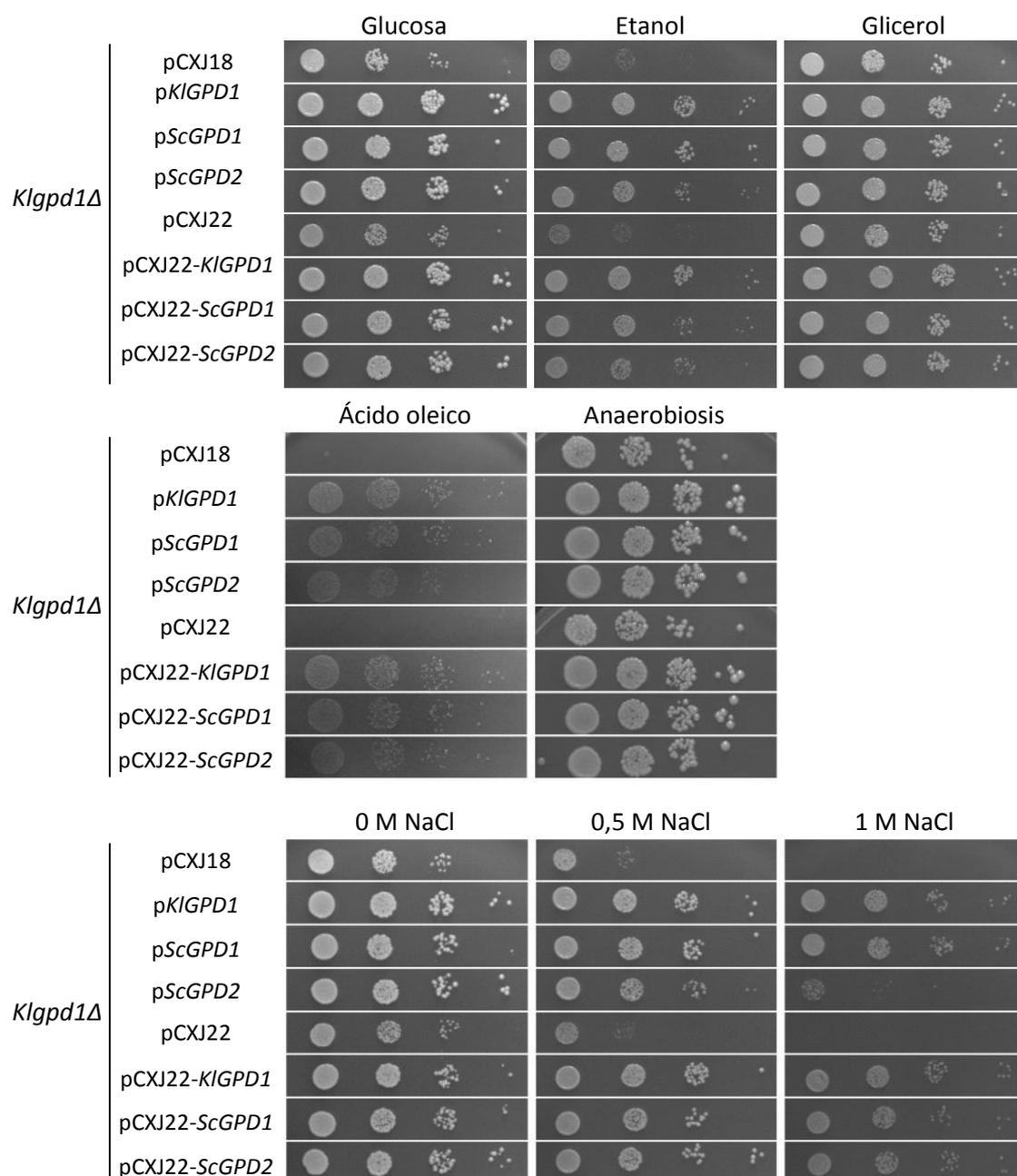


Figura 40. Análisis fenotípico del mutante *Klgpd1Δ* (KHO201-1C) transformado con las construcciones portadoras de los genes heterólogos de *S. cerevisiae* pCXJ18-*ScGPD1* y pCXJ18-*ScGPD2*, crecido en diferentes condiciones. Para más detalles ver texto. Como control negativo se transformó al mutante *Klgpd1Δ* con el vector pCXJ18 y como control positivo se transformó la misma cepa con el plásmido p*KIGPD1*. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

3. Conexión entre la ruta KISNF1-KICat8/KISip4 y la deshidrogenasa KIGpd1

Como se describió en el apartado anterior, el mutante *Klgpd1Δ* no crece en etanol. Este fenotipo podría deberse a la alteración de la ruta de señalización KISNF1-KICat8-KISip4. En

Resultados

este supuesto la expresión de los genes regulados a través de elementos CSRE como los del ciclo del glioxilato *KIICL1* y *KIMLS1*, debería encontrarse afectada.

Comenzamos valoramos la actividad isocitrato liasa en el mutante *Klgpd1Δ*. Los resultados obtenidos (figura 41.A.) indican que el nivel de actividad es del orden de 8-10 veces inferior durante el crecimiento en etanol confirmando la hipótesis. Con el fin de investigar si este efecto también tiene lugar en *S. cerevisiae* y de ser así, si es dependiente de alguno de los isoenzimas en particular, analizamos la actividad Icl1 del doble mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* y de los mutantes sencillos *Scgpd1Δ* y *Scgpd2Δ*. Al igual que lo observado en *K. lactis*, en el doble mutante los niveles de actividad disminuyen significativamente demostrando que Gpd1 regula la ruta K1SNF1-K1Cat8/K1Sip4 en ambas especies. Sin embargo, los mutantes sencillos presentan valores de actividad Icl1 equivalentes a los de la cepa silvestre. Esto indica que la ausencia de actividad Icl1 no es dependiente de alguna de las funciones específicas de los isoenzimas como podrían ser las relacionadas con su localización subcelular (ScGpd1 nuclear y peroxisomal y Gpd2 mitocondrial).

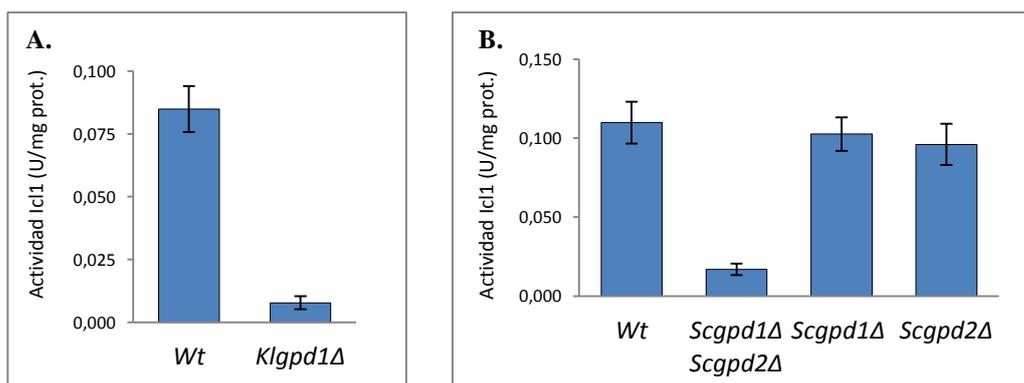


Figura 41. Actividad isocitrato liasa de los mutantes en los genes que codifican las actividades Gpd de *K. lactis* y *S. cerevisiae* en etanol. **A.** El nivel de actividad isocitrato liasa es muy bajo en el mutante *Klgpd1Δ* (KHO91-4B). Como control se utilizó la cepa silvestre KHO46-12A. **B.** El nivel de actividad Icl1 es muy bajo en el mutante *Scgpd1ΔScgpd2Δ* (HOD120-1C). Por el contrario los mutantes *Scgpd1Δ* (HOD114-2B) y *Scgpd2Δ* (HOD114-9B) presentan un nivel de actividad similar al de la cepa silvestre.

Con el fin de confirmar que la pérdida de actividad Icl1 en el mutante *Klgpd1Δ* se debe a una disminución de la expresión de *KIICL1*, a continuación, se utilizó la construcción pXW-KIICL1 que contiene el promotor del gen fusionado a *lacZ*, descrita en Rodicio y col. (2008). También se analizó la expresión del gen *KIMLS1*. Como se puede observar en la figura 42.A., la actividad β -galactosidasa en etanol para a ambos promotores es significativamente menor en la cepa mutante que en la cepa silvestre mientras que en glucosa y glicerol sólo se encontraron los niveles basales esperados.

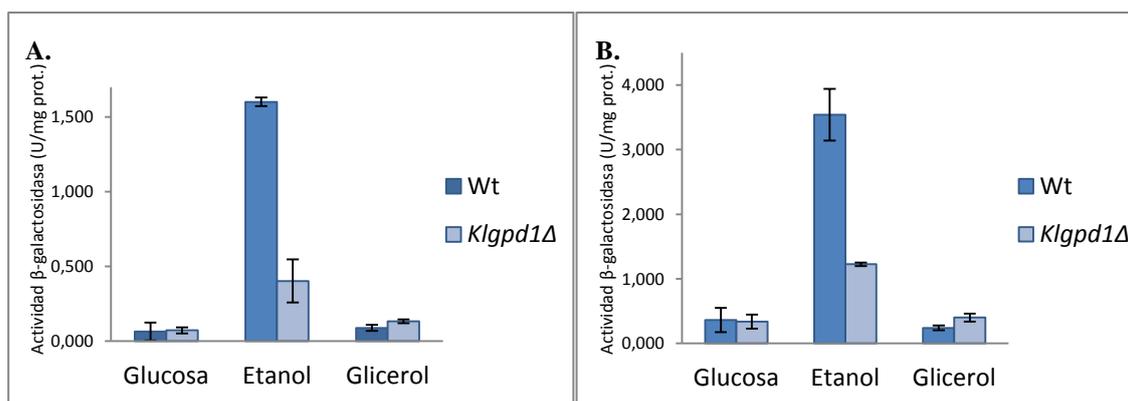


Figura 42. Expresión de los genes *KIICL1* y *KIMLS1* en el mutante *Klgpd1Δlac4A* en diferentes fuentes de carbono. La cepa KHO75-11A (*lac4Δ*; Wt) y el mutante KHO91-4B (*Klgpd1Δlac4Δ*) se transformaron con los plásmidos p*KIICL1p-lacZ* (A) y p*KIMLS1p-lacZ* (B). El nivel de expresión del gen *KIICL1* y de *KIMLS1* no cambia durante el crecimiento en glucosa y en glicerol, sin embargo, en etanol se puede observar una disminución significativa de la expresión en el mutante *Klgpd1Δ* en relación a la cepa silvestre. Los transformantes se crecieron y analizaron como se describió en la figura 5.B.

Finalmente demostramos que KIGpd1 actúa a través de los elementos CSRE analizando la fusión *lacZ* pXW-ACS2 que lleva el promotor del gen *KIACS2*, cuya expresión es independiente de la fuente de carbono para ser utilizado como control y la pXW-*KIACS2*-CSRE-B que deriva del anterior por clonación de uno de los elementos CSRE del promotor de *KIICL1* en el promotor constitutivo del gen *KIACS2* (descritos en Rodicio y col., 2008). Como se puede observar en la gráfica (figura 43), en la cepa silvestre el plásmido que contiene la inserción del elemento CSRE se produce un aumento del nivel de expresión durante el crecimiento en etanol. En cambio, en la cepa mutante no se observa dicho aumento siendo el nivel de actividad similar para ambas construcciones.

Los resultados descritos hasta el momento en este apartado demuestran que KIGpd1 es esencial durante el crecimiento en etanol para activar la ruta SNF1-Cat8/Sip4 regulando la transcripción de los genes regulados por elementos CSRE durante el crecimiento en etanol.

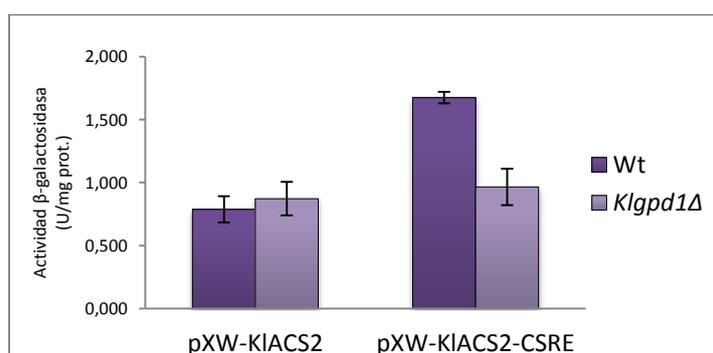


Figura 43. Nivel de expresión de la construcción pXW-*KIACS2*-CSRE en el mutante *Klgpd1Δ* (KHO91-4B) y en la cepa silvestre KHO75-11A (*lac4Δ*; Wt) en etanol. La cepa β-galactosidasa negativa KHO75-11A y el mutante *Klgpd1Δ* se transformaron con los plásmidos pXW-*KIACS2* y pXW-*KIACS2*-CSRE. En la cepa silvestre el nivel de actividad β-galactosidasa aumenta en la construcción que contiene el elemento CSRE del gen *KIICL1*. Por el contrario, en el mutante *Klgpd1Δ* el nivel de actividad es similar con ambas construcciones. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B.

Resultados

Puesto que los elementos CSRE están regulados a través de los factores de transcripción KICat8 y KISip4, pasamos a estudiar si la ausencia de KIGpd1 afecta una o varias de las etapas que van desde la transcripción génica hasta el destino final de estas proteínas.

Para analizar la expresión de los genes *KICAT8* y *KISIP4* analizamos las construcciones *pKICAT8p-lacZ* y *pKISIP4p-lacZ* en la cepa *Klgpd1Δ*. Los resultados obtenidos indican que la expresión de los genes que codifican para estos factores de transcripción no se ve afectada por la ausencia de KIGpd1 (figura 44.A). Asimismo, el nivel de expresión de *KISIP4* en etanol del mutante *Klgpd1Δ* indica que el factor de transcripción KICat8 se encuentra al menos parcialmente activo.

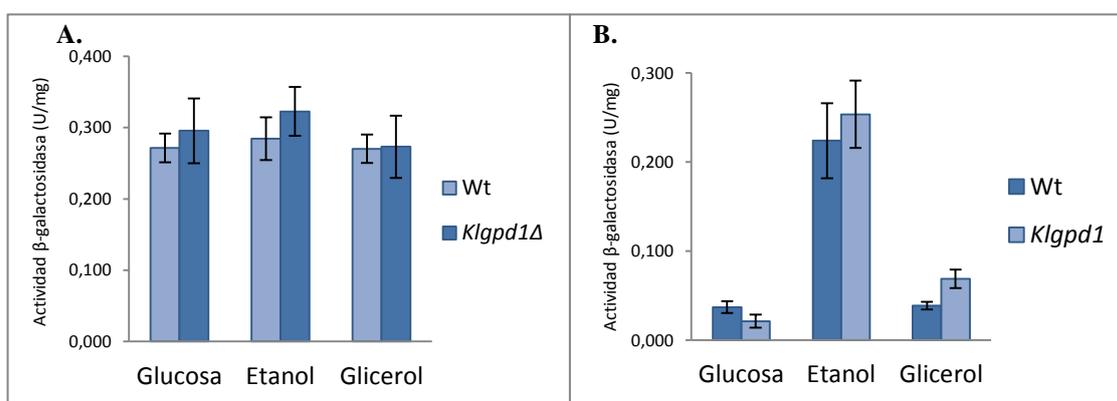


Figura 44. Expresión de los genes *KICAT8* y *KISIP4* en la cepa silvestre KHO75-11A (*lac4Δ*; Wt) y en el mutante *Klgpd1Δ* (KHO.91-4B) en diferentes fuentes de carbono. **A.** La cepa β-galactosidasa negativa KHO75-11A y el mutante *Klgpd1Δ* se transformaron con el plásmido *pKICAT8p-lacZ*. Los resultados indican que la expresión de *KICAT8* es constitutiva y no existen diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante *Klgpd1Δ*. **B.** El nivel de expresión del gen *KISIP4* no cambia en el mutante *Klgpd1Δ*. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B.

Los resultados obtenidos en el análisis del nivel de proteína coinciden con los estudios de expresión. El nivel de proteína KICat8-Myc sigue siendo el mismo en las diferentes fuentes de carbono y el nivel de KISip4-Myc sigue siendo elevado en etanol y disminuye considerablemente en glucosa y en glicerol.

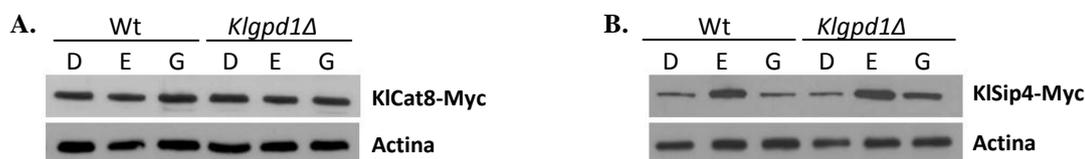


Figura 45. Western blot del nivel de proteína de las fusiones KICat8-Myc y KISip4-Myc en el mutante *Klgpd1Δ* (KHO.91-4B). **A.** El nivel de proteína de KICat8-Myc no cambia significativamente en las diferentes fuentes de carbono analizadas en el mutante *Klgpd1Δ* en relación a la cepa silvestre. **B.** El nivel de proteína KISip4-Myc es elevado en etanol y considerablemente menor tanto en glucosa como en glicerol tanto en la cepa silvestre y como en el mutante *Klgpd1Δ*. Las proteínas de fusión se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control negativo se utilizó la cepa mutante correspondiente sin transformar. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

Con el fin de analizar la localización subcelular de estos factores de transcripción, se cotransformaron las construcciones p*KICAT8*-GFP y p*KISIP4*-GFP, junto con el plásmido p*GAL4BD*-mCherry en la cepa mutante *Klgpd1Δ*. Los transformantes se crecieron como se describe en Materiales y Métodos (apartado 7.1.). Como se puede observar en las imágenes (figura 46), la localización de las proteínas de fusión KICat8-GFP y KISip4-GFP en el mutante *Klgpd1Δ* sigue siendo nuclear.

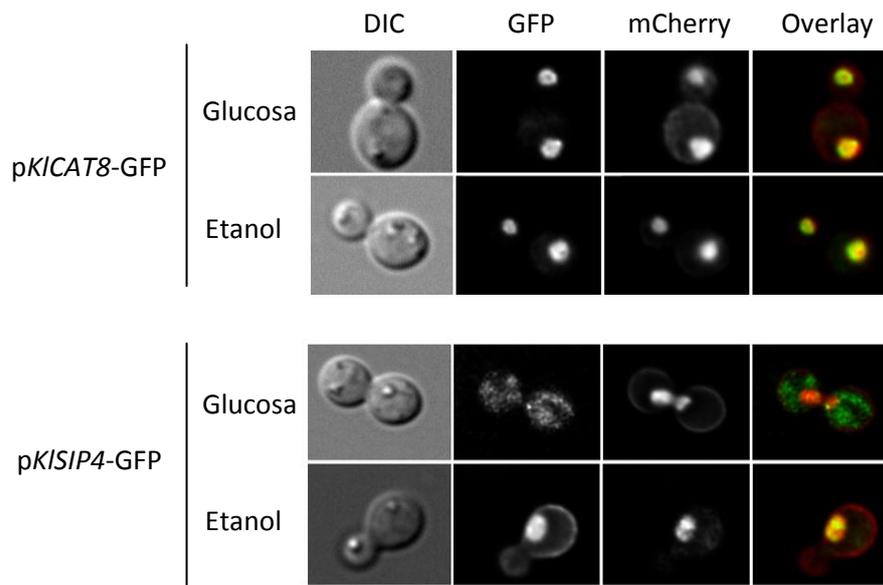


Figura 46. En la figura se muestra la imagen (de izquierda a derecha): en contraste interferencial (DIC), la señal asociada a GFP, la señal asociada al marcador mCherry y la superposición de la señal de GFP y de mCherry (Overlay). **A. Localización de las proteínas KICat8-GFP y KISip4-GFP en el mutante *Klgpd1Δ*.** La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos p*KICAT8*-GFP y p*GAL4BD*-mCherry. KICat8-GFP se localiza en el núcleo independientemente de la fuente de carbono. **B.** La cepa silvestre KHO46-12A se transformó con los plásmidos p*KISIP4*-GFP y p*GAL4BD*-mCherry. Durante el crecimiento en etanol KISip4-GFP se localiza en el núcleo.

Con el fin de valorar el nivel de activación de KICat8 y KISip4 en ausencia de la deshidrogenasa KIGpd1, se construyó una cepa *Klgpd1ΔKllac9Δ* y posteriormente se transformó con los plásmidos p*GAL4BD*-*KICAT8AD* y p*GAL4BD*-*KISIP4AD*. Los datos obtenidos (figura 47) indican que tanto el nivel de activación de KICat8 y KISip4 disminuye en el mutante *Klgpd1Δ*, aunque en el caso de KISip4 el descenso de actividad es más acusado. Esta disminución de la actividad no afecta a su capacidad para activar la expresión del gen *KISIP4*. Por el contrario la reducción en el nivel de activación de KISip4 podría estar relacionado con los bajos niveles de expresión de *KIICL1* en el mutante *Klgpd1Δ* en etanol.

Resultados

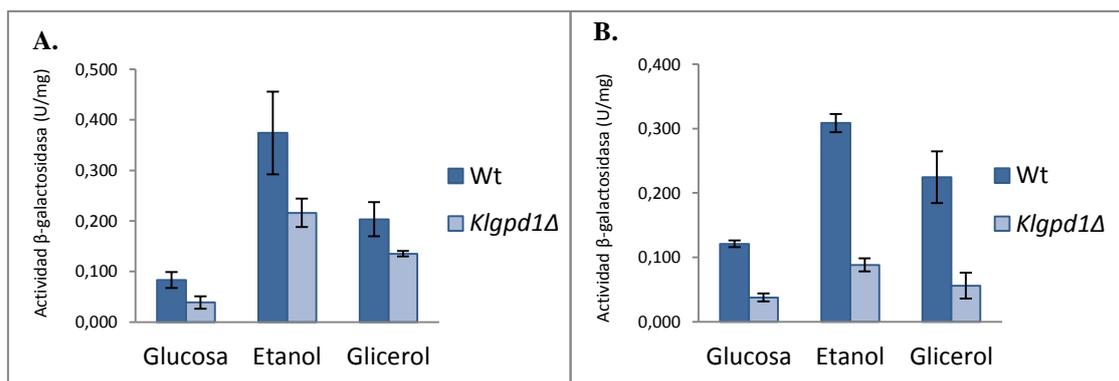


Figura 47. Nivel de activación de KICat8 y de KISip4 en la cepa silvestre KES2 y en el mutante *KlGpd1Δ* (KHO141-6C-1). **A.** En la cepa mutante *KlGpd1Δ* el nivel de activación de KICat8 fue inferior que en la cepa silvestre en todas las fuentes de carbono ensayadas. **B.** En la cepa mutante *KlGpd1Δ* el nivel de activación de KISip4 fue prácticamente nulo en todas las fuentes de carbono ensayadas.

Para analizar si los cambios en el nivel de activación de Cat8 y de Sip4 se deben a un cambio en el estado de activación de la subunidad KISnf1, seguidamente, analizamos el nivel de fosforilación de esta subunidad en el mutante *KlGpd1Δ*. Como se puede observar en la [figura 48](#), tanto en glucosa como en etanol la proporción de KISnf1 que se encuentra fosforilada es equivalente mayor en el mutante *KlGpd1Δ* que en la cepa silvestre.

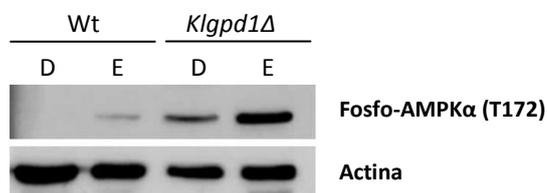


Figura 48. Western blot del nivel de fosforilación de la Thr190 de la subunidad KISnf1 en el mutante *KlGpd1Δ* (KHO91-4B). La proteína KISnf1-Myc fosforilada se detectó utilizando un anticuerpo anti Fosfo-AMPKα. Como control se utilizó una cepa silvestre (primera calle). Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

4. Análisis de la secuencia de KIGpd1

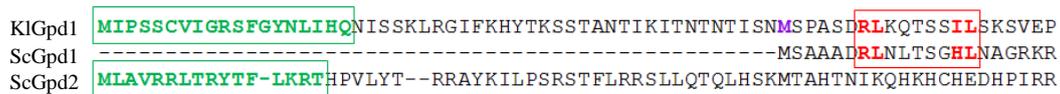
Como se comentó en la introducción, el extremo N-terminal de ScGpd1 y ScGpd2, está involucrado en la localización de estas enzimas. El estudio de la secuencia N-terminal de KIGpd1 llevó a la identificación de una hipotética secuencia de localización mitocondrial y otra peroxisomal ([figura 49](#)); sin embargo, nuestros estudios de localización (apartado 2.7 de Resultados) indican que KIGpd1 no se encuentra en la mitocondria en ninguna de las condiciones analizadas. Por otra parte, los estudios del promotor indicaron que el nivel de

expresión del gen *KIGpd1* era muy bajo, mientras que el estudio del nivel de proteína indicó que la cantidad de *KIGpd1* en la célula era elevada (apartado 2.5 de Resultados).

A partir del alineamiento de la secuencia amino-terminal de la proteína *KIGpd1* con sus ortólogos en *S. cerevisiae* observamos que a pesar de que esta región es la que presenta más diferencias, existe cierta identidad entre la secuencia inmediatamente posterior a la metionina 52 de *KIGpd1* y la posterior a la metionina 1 de *ScGpd1*.

Con el fin de identificar cual es la metionina inicial decidimos purificar la proteína *KIGpd1*, para lo cual obtuvimos una construcción que expresa el gen *KIGPD1* bajo su propio promotor fusionado en pauta con GST en el extremo 3'. Para que la proteína contenga las modificaciones post-transcripcionales convenientes, la producción de proteína se realizó en levadura tal como se describe en Materiales y Métodos. La obtención de proteína purificada se confirmó mediante un gel de poliacrilamida, teñido posteriormente con azul de Coomassie (figura 49) y mediante *western blot* utilizando anticuerpos anti-GST.

A.



B.

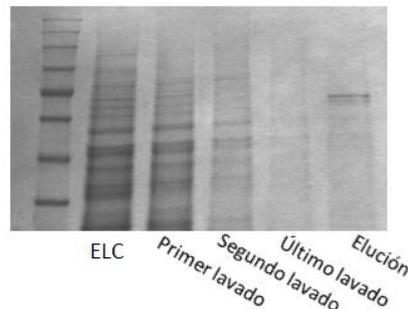


Figura 49.A. Alineamiento de la secuencia N-terminal de la proteína *KIGpd1* con sus ortólogos en *S. cerevisiae*.

En verde se señala la secuencia de localización mitocondrial *ScGpd2* y en rojo la secuencia de localización peroxisomal tipo 2 de *ScGpd1* (secuencia consenso PTS2: (R/K)(L/V/I)X₅(G/H)(L/A/I)). La proteína *KIGpd1* presenta una hipotética secuencia de localización mitocondrial (en verde) y una hipotética secuencia de localización peroxisomal (en rojo). **B.** Purificación de *KIGpd1*-GST en gel teñido con azul de Coomassie y *Western blot* revelado con el anticuerpo anti-GST. En la primera calle se ve el extracto libre de células, en las calles 2, 3 y 4 los lavados y se ve el eluido con glutatión reducido en la última calle.

5. Balance redox y la deshidrogenasa *KIGpd1*

La deshidrogenasa *Gpd1* está involucrada en el mantenimiento del balance redox celular, tanto en condiciones aeróbicas como durante el crecimiento en anaerobiosis.

Resultados

Con el fin de valorar la importancia de la lanzadera del glicerol 3-P, analizamos el crecimiento de los mutantes sencillos *Klgpd1Δ* (KHO91-4B) y *Klgut2Δ* (KHO91-10A), y del doble mutante *Klgpd1Δ Klgut2Δ* (KHO91-10C). Asimismo, también valoramos el crecimiento de una cepa que carece del gen *KIADH3* (cepa KHO118-2B) que codifica para una alcohol deshidrogenasa involucrada en la lanzadera etanol-acetaldehído, y el crecimiento de un triple mutante *Klgpd1ΔKlgut2ΔKladh3Δ* (KHO118-1D).

La ausencia de al menos una de las deshidrogenas de la lanzadera del glicerol 3-fosfato, impide el crecimiento en etanol de los respectivos mutantes. También se observa una disminución del crecimiento de estos mutantes en glucosa y en glicerol. Por el contrario, el mutante *Kladh3Δ* muestra un crecimiento equivalente al de la cepa silvestre en todas las fuentes de carbono analizadas (figura 50).

Estos resultados indican que la lanzadera del glicerol 3-fosfato participa en la reoxidación del NADH durante el crecimiento en las diferentes condiciones analizadas. En concreto, cuando el crecimiento tiene lugar en etanol, la lanzadera resulta imprescindible para la supervivencia celular. Por el contrario, la lanzadera del etanol-acetaldehído no parece participar en la regulación del balance redox en estas condiciones.

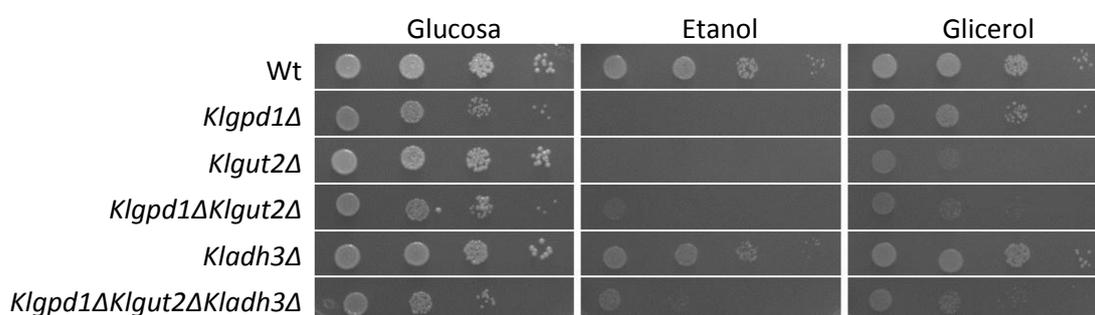


Figura 50. Análisis fenotípico de los mutantes de la lanzadera del glicerol 3-P y del mutante *Kladh3Δ*, crecidos en diferentes condiciones. Los enzimas de la lanzadera del glicerol 3-P son imprescindibles durante el crecimiento en etanol. Por el contrario el mutante *Kladh3Δ* creció en las tres fuentes de carbono analizadas. Como control se usó la cepa silvestre KHO46-12A. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

Puesto que nuestros datos indican que la importancia de la presencia de *KIGpd1* depende de la condición de crecimiento, nos propusimos valorar si existe una regulación diferencial de *KIGPD1* en estas fuentes de carbono. Para analizar el nivel de expresión del gen *KIGPD1* construimos dos plásmidos que contienen el promotor de este gen fusionado al gen *lacZ*. El primero contiene los nucleótidos que codifican para los primeros 6 aminoácidos de *KIGpd1*, mientras que la segunda construcción contiene los nucleótidos que codifican para los primeros 67 aminoácidos de *KIGpd1*. Las construcciones se denominaron *pKIGPD1pM1-lacZ* y

pKIGPD1pM52-lacZ, respectivamente. En la [figura 51.A](#) se muestra un esquema de las construcciones.

Como se puede observar en la [figura 51.B](#), el nivel de activación transcripcional es muy bajo en la construcción *pKIGPD1pM1-lacZ*, mientras que en la construcción *pKIGPD1pM52-lacZ* el nivel de expresión aumenta considerablemente. Por otra parte, el nivel de expresión no cambió en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que indica que la expresión de *KIGPD1* no está regulada por fuente de carbono.

Posteriormente, procedimos a la detección de la proteína KIGpd1. Para ello se construyó un plásmido que contiene la secuencia codificante KIGpd1, bajo la expresión de su propio promotor, fusionado en pauta con el epítipo Myc en el extremo 3'. El plásmido *pKIGPD1-Myc* se transformó en la cepa mutante *Klgpd1Δ*. Los resultados obtenidos indican que el nivel de proteína KIGpd1-Myc también es independiente de la fuente de carbono ([figura 51.C](#)).

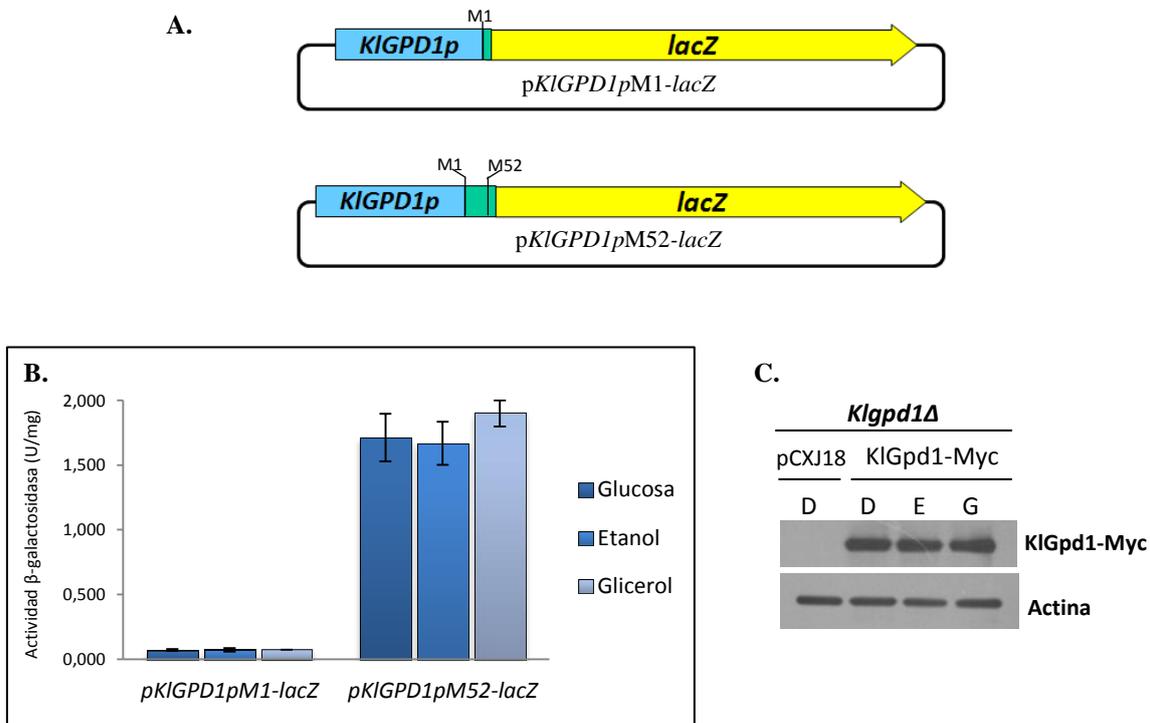


Figura 51. Regulación de la expresión del gen *KIGPD1* y de la proteína para la que codifica en diferentes fuentes de carbono. **A.** Esquema de los plásmidos *pKIGPD1pM1-lacZ* y *pKIGPD1pM52-lacZ*. **B.** La cepa β-galactosidasa negativa KHO.75-11A se transformó con los plásmidos *pKIGPD1pM1-lacZ* y *pKIGPD1pM52-lacZ*. Los resultados indican que la expresión de *KIGPD1* es constitutiva. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B. **C.** La cepa *Klgpd1Δ* se transformó con el plásmido *pKIGPD1-Myc*. El nivel de proteína de KIGpd1-Myc no cambia significativamente en las diferentes fuentes de carbono analizadas. La proteína de fusión se detectó utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control negativo se utilizó la cepa mutante correspondiente transformada con el vector pCXJ18. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

Resultados

La ausencia de las deshidrogenasas involucradas en la reoxidación del Nadh, podría alterar el equilibrio redox celular. Con el fin de valorar esta hipótesis analizamos si el nivel de proteína KlGpd1-Myc cambia en los mutantes *Klglut2Δ* y *Kladh3Δ*. El análisis *western blot* indica que el nivel de proteína no cambia en estos mutantes (figura 52.C y D).

A continuación, nos propusimos valorar si el nivel de proteína KlGut2 y KlAdh3 cambia en el mutante *Klglpd1Δ*, para lo cual obtuvimos un plásmido que contiene la ORF de cada uno de estas proteínas fusionada en pauta con el epítipo Myc en el extremo 3'. En la cepa silvestre el nivel de proteína KlGut2-Myc es bajo en glucosa debido a que el gen sufre represión por glucosa y la mayor cantidad de proteína se observa en etanol. En el mutante *Klglpd1Δ* se observa un aumento de KlGut2-Myc durante el crecimiento en glucosa (figura 52.A). En la cepa silvestre el mayor nivel de KlAdh3-Myc se observa en glucosa, sin embargo en el mutante *Klglpd1Δ* el nivel de esta proteína disminuye no sólo en glucosa sino también en etanol (figura 52.B).

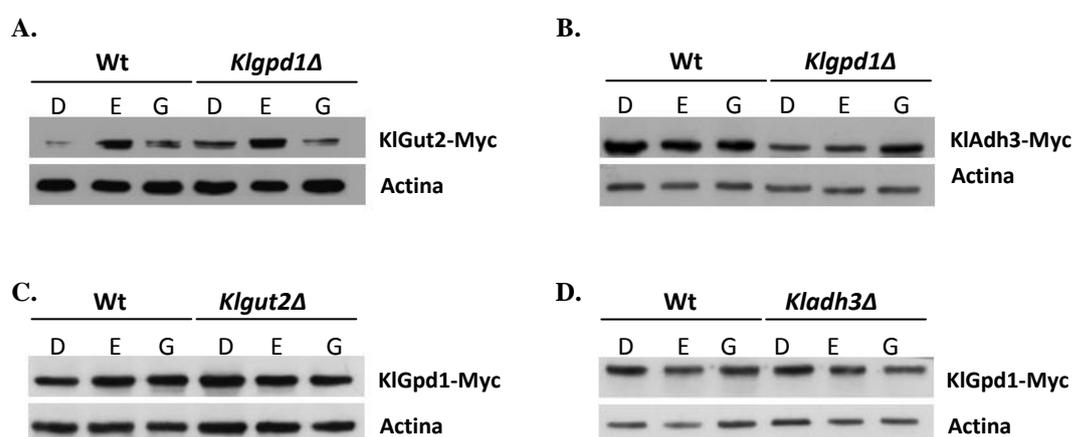


Figura 52. *Western blot* del nivel de proteína de las fusiones KlGpd1-Myc en los mutantes *Klglut2Δ* y *Kladh3Δ*, y de las fusiones KlGut2-Myc y KlAdh3-Myc en el mutante *Klglpd1Δ*. **A.** Los mutantes *Klglut2Δ* y *Kladh3Δ* fueron transformados con el plásmido pKlGPD1-Myc. Los resultados obtenidos indican que el nivel de proteína KlGpd1-Myc no cambia en estos mutantes en las diferentes fuentes de carbono analizadas. **B.** El mutante *Klglpd1Δ* se transformó con los plásmidos pKlGUT2-Myc y pKlADH3-Myc. Los resultados obtenidos indican que el nivel de estas proteínas cambia en el mutante *Klglpd1Δ* en las diferentes fuentes de carbono analizadas. Las proteínas de fusión se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Myc. Como control interno para comprobar que la cantidad de proteína era similar en todos los extractos se utilizó un anticuerpo anti-actina.

6. Papel de *Klgpd1* durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico

Los genes que participan en la síntesis de glicerol en *S. cerevisiae* están implicados en la respuesta celular a estrés osmótico (Rigoulet y col., 2004). Como ya demostramos, el mutante *Klgpd1Δ* es sensible a estrés osmótico. En este análisis fenotípico incluimos al mutante *Klgpp1Δ*, deficiente en el enzima que cataliza el segundo paso de la síntesis del glicerol y al mutante *Klhog1Δ* que carece de la quinasa clave de la ruta HOG. Como se puede observar en la [figura 53](#), el mutante *Klgpp1Δ* crece lentamente en sal y el mutante *Klhog1Δ* no crece. Esto demuestra la participación de estos genes en la regulación de la respuesta a estrés osmótico. Asimismo, resulta curioso el hecho de que el mutante *Klgpd1Δ* sea más sensible que *Klgpp1Δ*, puesto que en ninguna de las cepas puede tener lugar la síntesis de glicerol. Una posible explicación sería que el mutante además de estar sometido al estrés osmótico, sufre un desequilibrio redox por la acumulación de NADH citosólico.

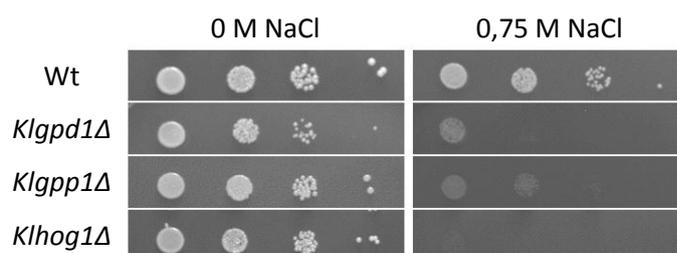


Figura 53. Análisis fenotípico de los mutantes de la ruta de síntesis de glicerol y del mutante *Klhog1Δ*, crecidos en NaCl. Los enzimas de la ruta de síntesis de glicerol y la quinasa KlHog1 son imprescindibles durante el crecimiento condiciones de estrés osmótico. Como control se usó la cepa silvestre KHO.46-12A. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

Una vez demostrado el papel de estos genes en la respuesta a estrés osmótico pasamos a estudiar el nivel de expresión de *KIGPD1* y *KIGPPI* en estas condiciones.

Como ya se describió en el apartado anterior, los niveles de expresión de la construcción *pKIGPD1pM1-lacZ* son muy bajos y esta circunstancia no cambia durante el crecimiento en NaCl ([figura 54.A](#)). De la misma forma, aunque los niveles de expresión de la construcción *pKIGPD1pM52-lacZ* son mayores, durante el crecimiento en NaCl la expresión de *KIGPD1* no aumenta en relación al control sin sal ([figura 54.B](#)). En el caso de *KIGPPI*, durante el crecimiento en NaCl hay un periodo de adaptación inicial tras el cual la expresión del gen se activada ([figura 54.C](#)).

Resultados

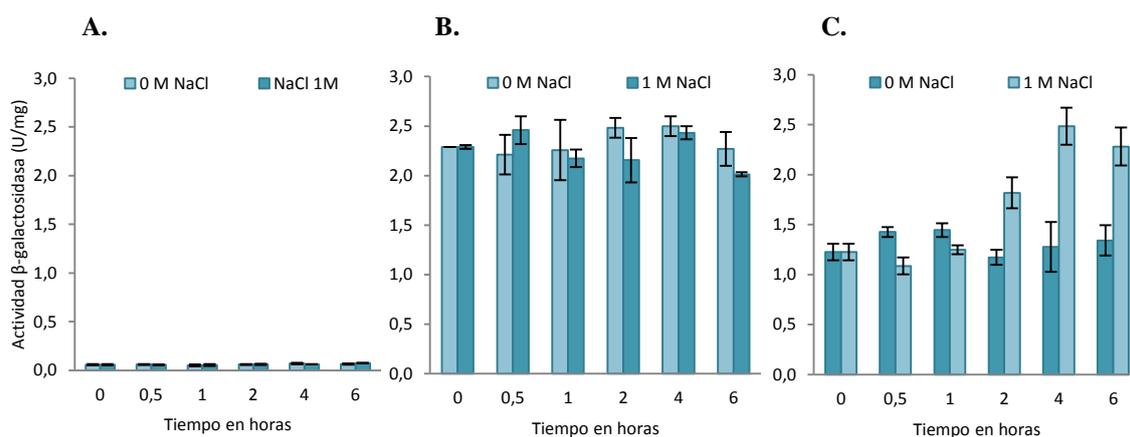


Figura 54. Expresión de los genes *KIGPDI* y *KIGPPI* en la cepa silvestre (KHO.75-11A) en condiciones de estrés osmótico. **A y B.** La cepa β-galactosidasa negativa KHO.75-11A se transformó con los plásmidos p*KIGPDI*pM1-*lacZ* y p*KIGPDI*pM52-*lacZ*. Los niveles de expresión de la construcción p*KIGPDI*pM1-*lacZ* son muy bajos en comparación con los de la construcción p*KIGPDI*pM52-*lacZ*, sin embargo los resultados indican que en ambos casos la expresión de *KIGPDI* no aumenta en condiciones de estrés osmótico. **C.** La cepa β-galactosidasa negativa KHO.75-11A se transformó con el plásmido p*KIGPPI*-*lacZ*. Los resultados obtenidos indican que la expresión de *KIGPPI* aumenta durante el crecimiento en NaCl 1 M a partir de las 2 horas. Como control se crecieron los mismos transformantes en un medio sin sal. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B.

Con el fin de analizar si la activación de la expresión de *KIGPPI* es dependiente de la ruta HOG, a continuación, valoramos el nivel de activación de las construcciones en el mutante *Klhog1Δ*. Los resultados obtenidos indican que en ausencia de KlHog1 la activación de *KIGPPI* sigue teniendo lugar, pero tarda más en aparecer (figura 55). Estos datos sugieren que aunque la respuesta inicial a estrés osmótico es dependiente de KlHog1 existe otra respuesta independiente de la ruta HOG capaz de activar la expresión de *KIGPPI*.

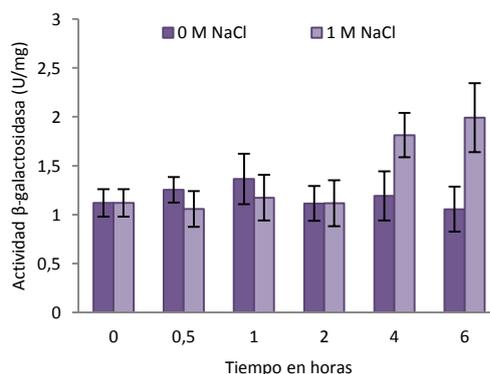


Figura 55. Expresión del gen *KIGPPI* en el mutante *Klhog1Δ* (KHO.116-2A) en condiciones de estrés osmótico. La cepa β-galactosidasa negativa *Klhog1Δ* se transformó con el plásmido p*KIGPPI*-*lacZ*. Los resultados obtenidos indican que la expresión de *KIGPPI* aumenta durante el crecimiento en NaCl 1 M a partir de las 4 horas. Como control se crecieron los mismos transformantes en un medio sin sal. Los transformantes se crecieron como se describió en la figura 5.B.

7. Regulación de KIGpd1

Hasta el momento nuestros resultados indican que el nivel de expresión de *KIGPD1* no cambia y el nivel de la proteína para la que codifica tampoco depende de las condiciones de crecimiento que hemos analizado. Una posible explicación sería la existencia de modificaciones post-traduccionales que controlen el nivel de activación de la proteína KIGpd1. Como se comentó en la introducción, la deshidrogenasa Gpd2 de *S. cerevisiae* está regulada a través de la fosforilación del residuo 72 por Snf1 y a su vez esta fosforilación posibilita la fosforilación del residuo 75 por Yck1. ScGpd1 es fosforilado en el residuo Ser 24 por las quinasas Ypk1 e Ypk2 (Lee y col., 2012).

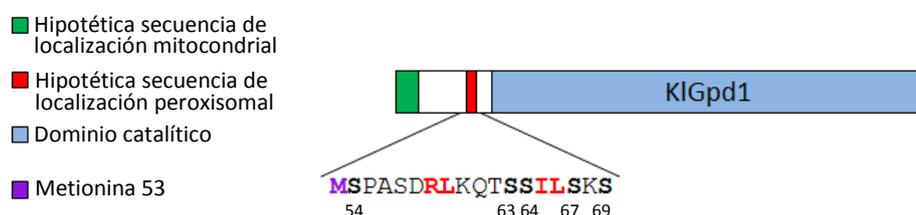


Figura 56. Esquema de la secuencia de KIGpd1. En la figura se muestran en negrita los residuos identificados como posibles dianas de fosforilación.

Con el fin de encontrar residuos candidatos a ser fosforilados analizamos de secuencia de KIGpd1 con el programa NetPhosYeast (Ingrell y col, 2007). Según esta aplicación la probabilidad de que el residuo Ser 53 de KIGpd1 se fosforile es del 0.95. Este residuo serina forma parte de una secuencia consenso de fosforilación de MAP quinasas.

Para verificar que el residuo Ser53 de KIGpd1 participa en la regulación de la activación de esta deshidrogenasa se obtuvo una construcción KIGpd1-Ser53Ala y otra KIGpd1-Ser53Asp. La estrategia seguida para la obtención de mutantes puntuales se describe en el apartado 3.2.4 de Materiales y Métodos.

Para analizar el impacto de la sustitución del residuo Ser 53 durante el crecimiento en condiciones en las que KIGpd1 es imprescindible, analizamos la capacidad de las proteínas mutantes KIGpd1-Ser53Ala y KIGpd1-Ser53Asp de revertir el fenotipo del mutante *KlGpd1Δ*, en glucosa, etanol y NaCl 1M, mediante un ensayo de la gota. Como se puede apreciar en la figura 57.A, tanto la sustitución de la Ser 53 por un residuo Ala como por un residuo Asp no afecta al crecimiento. El hecho de que estos transformantes muestren un fenotipo equivalente al mutante *KlGpd1Δ* indica que la Ser 53 no es un residuo clave. Otra posibilidad sería que la

Resultados

fosforilación del residuo Ser 53 fuera biológicamente significativa en la respuesta a corto plazo en condiciones de estrés. Para estudiar esta hipótesis valoramos el crecimiento de los transformantes durante 12 horas. En las tres condiciones analizadas el crecimiento fue menor cuando la Ser 53 está mutada. El hecho de que la sustitución de la Ser por una Ala o por un Asp muestre el mismo fenotipo indica que en ambos casos la sustitución implica que KIGpd1 esté menos activa.

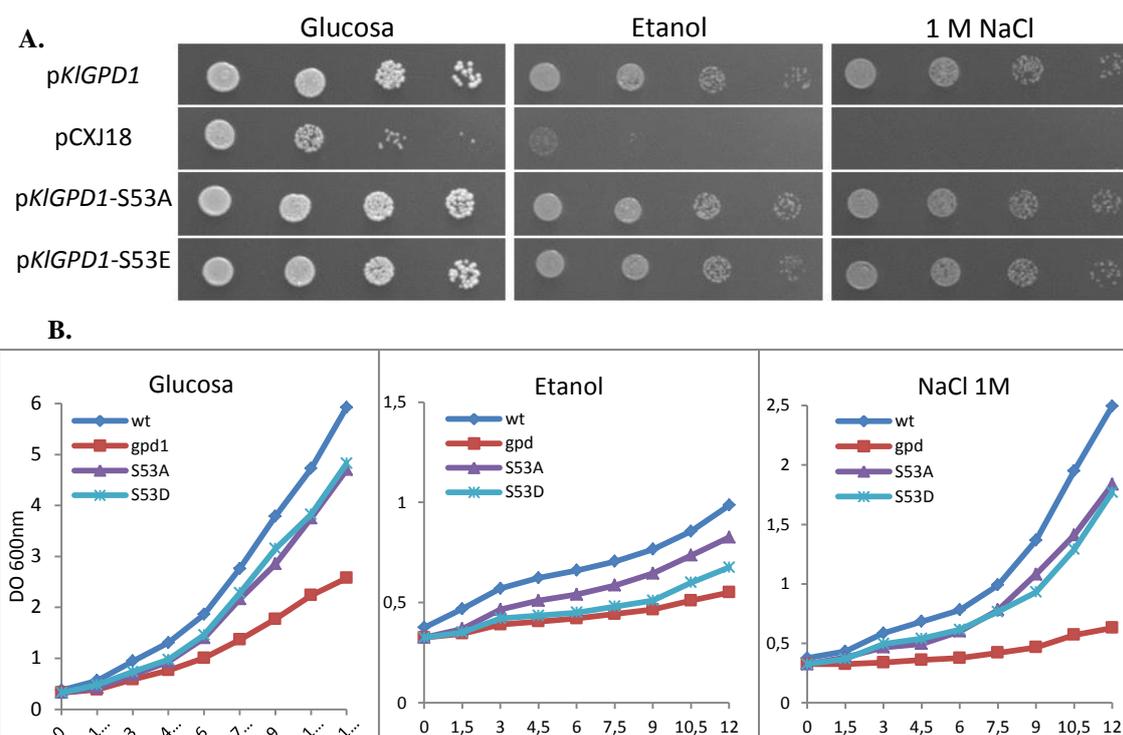


Figura 57. Análisis fenotípico de los alelos mutantes que codifican las proteínas KIGpd1-Ser53Ala y KIGpd1-Ser53Asp. **A.** Análisis de complementación de una cepa *Klglpd1Δ* con las plásmidos pKIGPD1-Ser53Ala y pKIGPD1-Ser53Asp. La cepa *Klglpd1Δ* fue transformada con los plásmidos indicados. Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 7. La modificación del residuo Ser53 de KIGpd1 no altera el crecimiento en las condiciones analizadas. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klglpd1Δ* transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pKIGPD1. **B.** Curvas de crecimiento de los transformantes pKIGPD1-Ser53Ala y pKIGPD1-Ser53Asp. La sustitución de la Ser 53 ralentiza el crecimiento en las condiciones analizadas.

Oliveira y col. (2012) demostraron que la sustitución de los residuos Ser 23, 24 25 y 27 del extremo amino-terminal de KIGpd1 disminuye 6 veces la activación de KIGpd1 durante el crecimiento en glucosa. En la secuencia de KIGpd1 existen cuatro residuos serina que por su localización podrían desempeñar un papel homólogo. Para confirmar esta hipótesis construimos un mutante en el que se sustituyeron las serinas 63, 64, 67 y 69 por residuos alanina y otro en el los residuos serina fueron sustituidos por glutamato. El fenotipo de los mutantes es equivalente al del gen silvestre en las condiciones analizadas (figura 58.A). De la misma forma, las curvas

de crecimiento indican que estas serinas no afectan a la adaptación inicial en las condiciones de estrés analizadas.

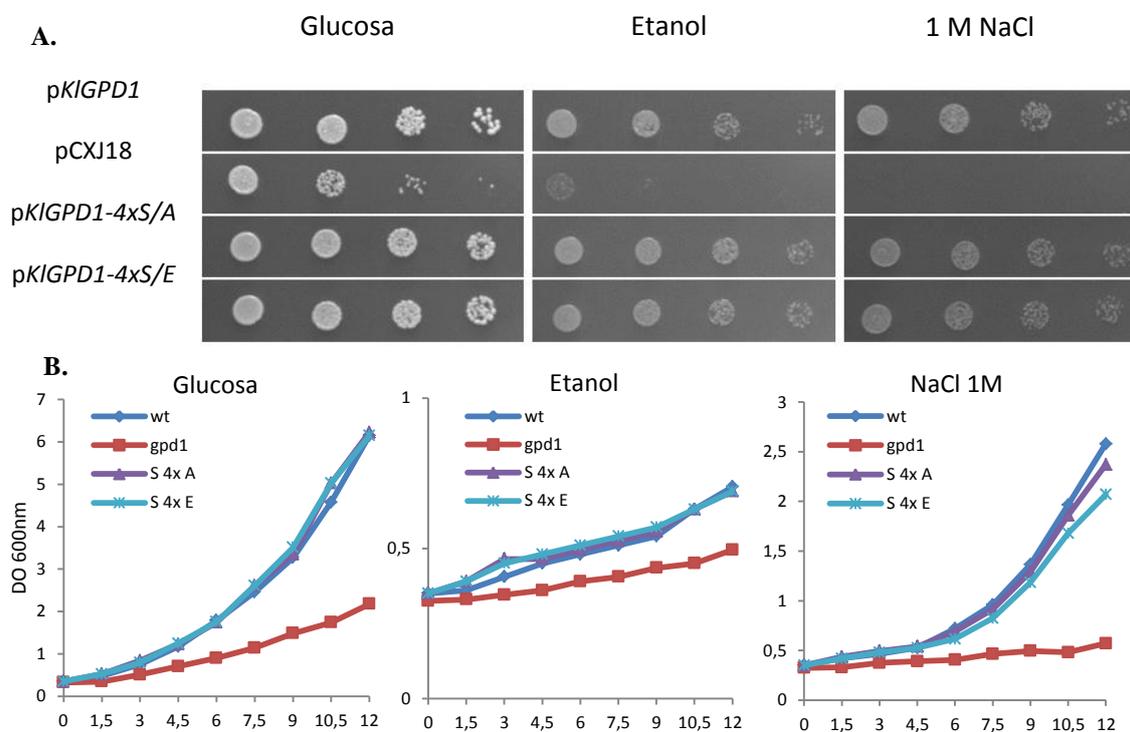


Figura 58. Análisis fenotípico de los alelos mutantes que codifican las proteínas KIGpd1-SSEE y KIGpd1-SSAA. A. Análisis de complementación de una cepa *Klgpd1Δ* con las plásmidos pKIGPD1-SSAA y pKIGPD1-SSEE. La cepa *Klgpd1Δ* fue transformada con los plásmidos indicados. Los transformantes fueron analizados como se describió en la leyenda de la figura 7. La modificación de los residuos Ser 63, 64, 67 y 69 de KIGpd1 no altera el crecimiento en las condiciones analizadas. Como control negativo se utilizó la cepa mutante *Klgpd1Δ* transformada con el vector pCXJ18 y como control positivo se utilizó la misma cepa transformada con el plásmido pKIGPD1. **B.** Curvas de crecimiento de los transformantes pKIGPD1-SSAA y pKIGPD1-SSEE. La sustitución de de los residuos Ser 63, 64, 67 y 69 de KIGpd1 no modifica el crecimiento en las condiciones analizadas.

8. Estudio de la localización de KIGpd1

El programa MitoProt II (Claros y col., 1996) identifica una hipotética señal de localización mitocondrial de 19 aminoácidos en el extremo amino-terminal de KIGpd1. Esta secuencia está enriquecida en aminoácidos básicos, hidrofóbicos e hidroxilados y según el programa la probabilidad de exportación a la mitocondria es del 92%. Asimismo, el estudio de la secuencia amino-terminal llevó a la identificación de una secuencia altamente similar a la secuencia consenso de localización peroxisomal tipo II de *S. cerevisiae* (secuencia consenso PTS2: (R/K)(L/V/I)X₅(G/H)(L/A/I)). Con el fin de valorar la importancia de estas secuencias, obtuvimos dos construcciones, el primer plásmido codifica para una proteína KIGpd1 que

Resultados

carece de los 37 primeros aminoácidos ($pKIGPD1-\Delta 37$) y en la segunda construcción se deletó la hipotética secuencia PST2 ($pKIGPD1-\Delta PTS2$). El fenotipo de estos mutantes se valoró en diferentes condiciones de crecimiento (figura 59).

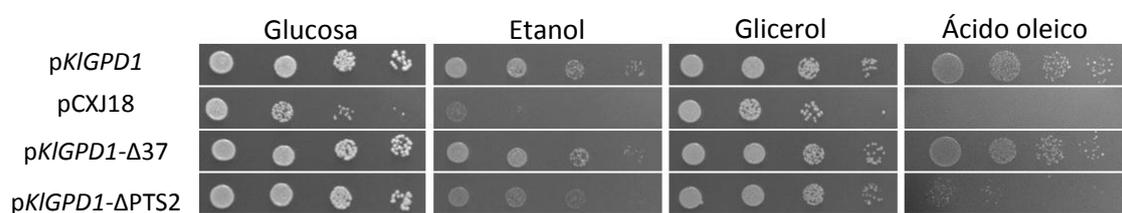


Figura 59. Análisis fenotípico de las construcciones $pKIGPD1-\Delta 37$ y $pKIGPD1-\Delta PTS2$ en el mutante *Klgd1A* en diferentes condiciones. Las construcciones $pKIGPD1-\Delta 37$ y $pKIGPD1-\Delta PTS2$. Los transformantes fueron crecidos como se describió en la figura 7.

La delección de los primeros 37 aminoácidos de la secuencia de *KIGpd1* no alteró el crecimiento en ninguna de las condiciones analizadas. Por el contrario la delección de la presunta secuencia de localización peroxisomal determina una menor tasa de crecimiento tanto en etanol como en ácido oleico. Estos datos indican que aún en el caso de que *KIGpd1* se localice en la mitocondria, esta distribución no juega un papel clave durante el crecimiento en las condiciones analizadas. En cambio la secuencia de la hipotética secuencia *PTS2* parece desempeñar algún tipo de función biológica durante el uso del etanol y del ácido oleico, probablemente relacionada con la localización peroxisomal de la proteína.

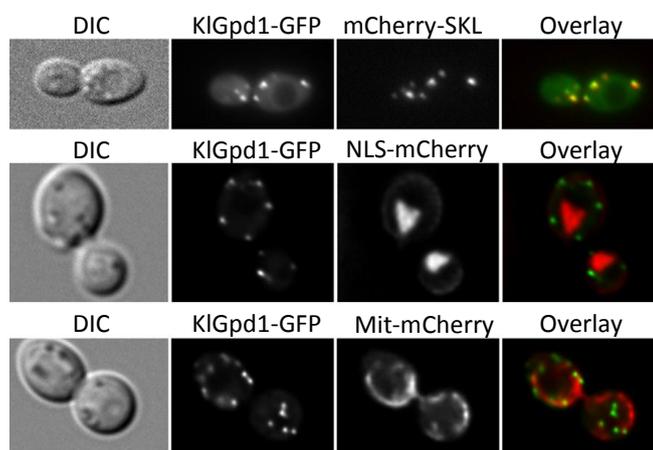


Figura 60. Localización de la proteína *KIGpd1-GFP* en la cepa silvestre (*KHO46-12A*) en glucosa. En la figura se muestra la imagen (de izquierda a derecha): en contraste interferencial (DIC), la señal asociada a GFP, la señal asociada al marcador mCherry y la superposición de la señal de GFP y de mCherry (Overlay). *KIGpd1-GFP* se localiza en el citosol y en los peroxisomas. Como control peroxisomal se utilizó la proteína mCherry fusionada a la secuencia de localización peroxisomal tipo I SKL, como control nuclear se usó una proteína de fusión que contiene la secuencia de localización nuclear NLS de Gal4 unida a mCherry y como control mitocondrial se utilizó la secuencia mitocondrial de Cox4 fusionado a mCherry.

Para comprobar esta hipótesis, inicialmente, estudiamos la distribución de una proteína de fusión KIGpd1-GFP durante el crecimiento en glucosa (figura 60). Como se puede observar en las imágenes KIGpd1 se localiza tanto en los peroxisomas y como en el citosol, pero no se distribuye ni en la mitocondria ni en el núcleo.

Para demostrar que la hipotética secuencia PTS2 es la responsable de la localización peroxisomal, construimos dos plásmidos; el primero contiene la secuencia que codifica para los 70 primeros aminoácidos de KIGpd1 (que incluyen la secuencia PTS2 propuesta) fusionada en pauta con mCherry (*pKIGPD1-N70-mCherry*) y en el segundo se deleccionó la señal PTS2 de la secuencia codificante que en este caso se fusionó en pauta con GFP (*pKIGPD1-ΔPTS2-GFP*) (figura 61). La distribución peroxisomal de la construcción *pKIGPD1-N70-mCherry* demuestra que los 70 primeros aminoácidos son suficientes para que la proteína se distribuya en los peroxisomas. La pérdida de la localización peroxisomal de la proteína de fusión KIGpd1- Δ PTS2-GFP demuestra que la secuencia PTS2 de KIGpd1 es funcional y es la responsable de la distribución en este orgánulo. Cuando la construcción *pKIGPD1-ΔPTS2-GFP* fue transformada en una cepa silvestre, se observó la recuperación de la señal peroxisomal. Este fenómeno ya se ha descrito en *S. cerevisiae* y parece deberse a la formación de dímeros entre la proteína silvestre KIGpd1 y la proteína de fusión KIGpd1- Δ PTS2-GFP (figura 61.C; Jung y col., 2010). Aunque los datos obtenidos hasta el momento parecen indicar que la secuencia de localización mitocondrial no es funcional, si la distribución en este orgánulo fuese minoritaria, la señal mitocondrial podría estar enmascarada por la señal peroxisomal y citosólica. Para estudiar esta hipótesis se construyó un plásmido que codifica para una proteína de fusión que contiene los 37 primeros aminoácidos de KIGpd1 fusionados en pauta con la proteína fluorescente mCherry. Sin embargo, la señal de esta construcción fue citosólica, descartándose la localización mitocondrial (figura 61.A).

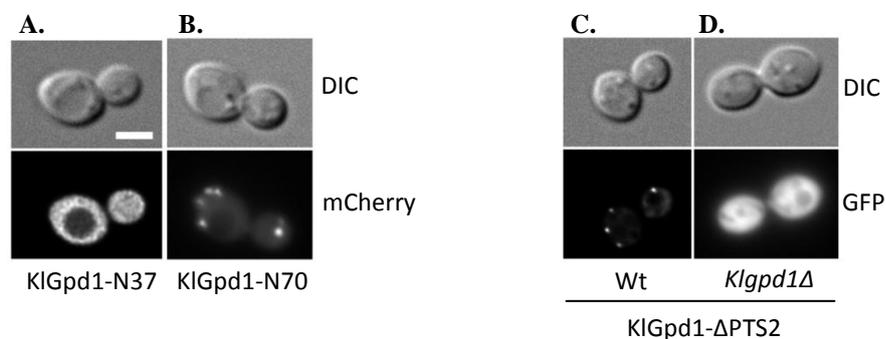


Figura 61. Estudio de la funcionalidad de las hipotéticas secuencias de localización mitocondrial y peroxisomal de la proteína KIGpd1 en la cepa silvestre (KHO46-12A) en glucosa. En la figura se muestra la imagen (de arriba a abajo): en contraste interferencial (DIC) y la señal asociada a GFP de las diferentes construcciones. **A.** La hipotética secuencia de localización mitocondrial de KIGpd1 no es funcional. **B.** KIGpd1 tiene una PTS2 funcional. Los primeros 70 aminoácidos son suficientes para dirigir a KIGpd1 a los peroxisomas. **C.** La deleción de la PTS2 propuesta impide que KIGpd1 migre a peroxisomas.

Resultados

Por último, con el fin de analizar si la distribución de KIGpd1 es dependiente de las condiciones de crecimiento valoramos la localización de esta proteína en etanol, ácido oleico y en NaCl 0,5 M. Durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico se observa una doble localización citosólica y peroxisomal, mientras que tanto en etanol como en ácido oleico la distribución es fundamentalmente peroxisomal. La localización no cambia en función de la fuente de carbono ni en respuesta a estrés osmótico.

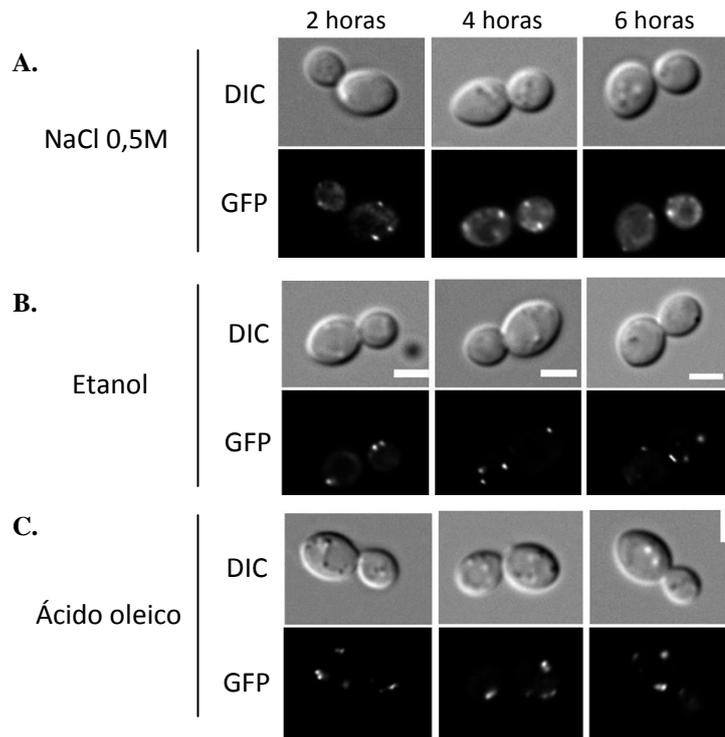


Figura 62. Estudio de la localización de KIGpd1-GFP en la cepa silvestre (KHO46-12A) en glucosa. En la figura se muestra la imagen (de arriba a abajo): en contraste interferencial (DIC) y la señal asociada a GFP de las diferentes construcciones. **A.** En condiciones de estrés osmótico KIGpd1 se localiza tanto en los peroxisomas como en el citosol. **B y C.** KIGpd1 se localiza fundamentalmente en los peroxisomas tanto en etanol como en glicerol.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que KIGpd1 comienza a localizarse en el núcleo a partir de las 2 horas en condiciones de estrés osmótico (Jung y col., 2009). Con el fin de determinar si KIGpd1 también se redistribuye en el núcleo en estas circunstancias valoramos si la señal de KIGpd1-GFP colocaliza con el marcador nuclear pGAL4BD-mCherry. Como se puede observar en las imágenes (figura 63.A), KIGpd1 no se redistribuye en el núcleo en condiciones de estrés osmótico.

Asimismo, decidimos valorar si KIGpd1 colocaliza con el marcador mitocondrial. En la figura 63.B se observa la localización peroxisomal de KIGpd1 en verde y la señal del marcador

mitocondrial en rojo, pero no se observa colocalización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos hasta el momento y demuestran que KIGpd1 no se localiza en la mitocondria.

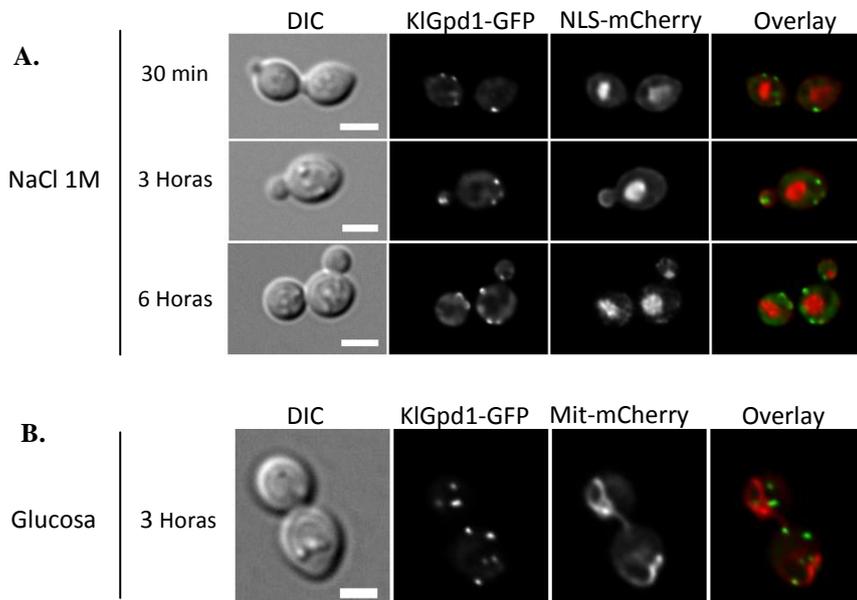


Figura 63. Estudio de la posible localización nuclear y mitocondrial de KIGpd1-GFP en la cepa silvestre (KHO46-12A). En la figura se muestra la imagen (de izquierda a derecha): en contraste interferencial (DIC), la señal asociada a GFP, la señal asociada al marcador mCherry y la superposición de la señal de GFP y de mCherry (Overlay). **A.** KIGpd1-GFP se localiza en el citosol y en los peroxisomas en condiciones de estrés osmótico, pero en ningún caso se observó colocalización en el núcleo. Como control nuclear se usó una proteína de fusión que contiene la secuencia de localización nuclear NLS de Gal4 unida a mCherry. **B.** KIGpd1 no se localiza en las mitocondrias. Como control mitocondrial se utilizó la secuencia mitocondrial de Cox4 fusionado a mCherry.

9. Producción de etanol en el mutante *Klgpd1Δ*

En último lugar decidimos valorar si en el mutante *Klgpd1Δ* la incapacidad de sintetizar glicerol durante el crecimiento en glucosa, se traduce en un aumento de la producción de etanol. Para ello, crecimos en medio SCD una cepa silvestre como control y la cepa mutante *Klgpd1Δ* hasta una densidad óptica aproximada de 2. A partir del cultivo inicial inoculamos nuevo medio a una densidad óptica aproximada de 0,5 y valoramos el crecimiento y la producción de etanol. Los resultados obtenidos se muestran en la [figura 64](#).

Resultados

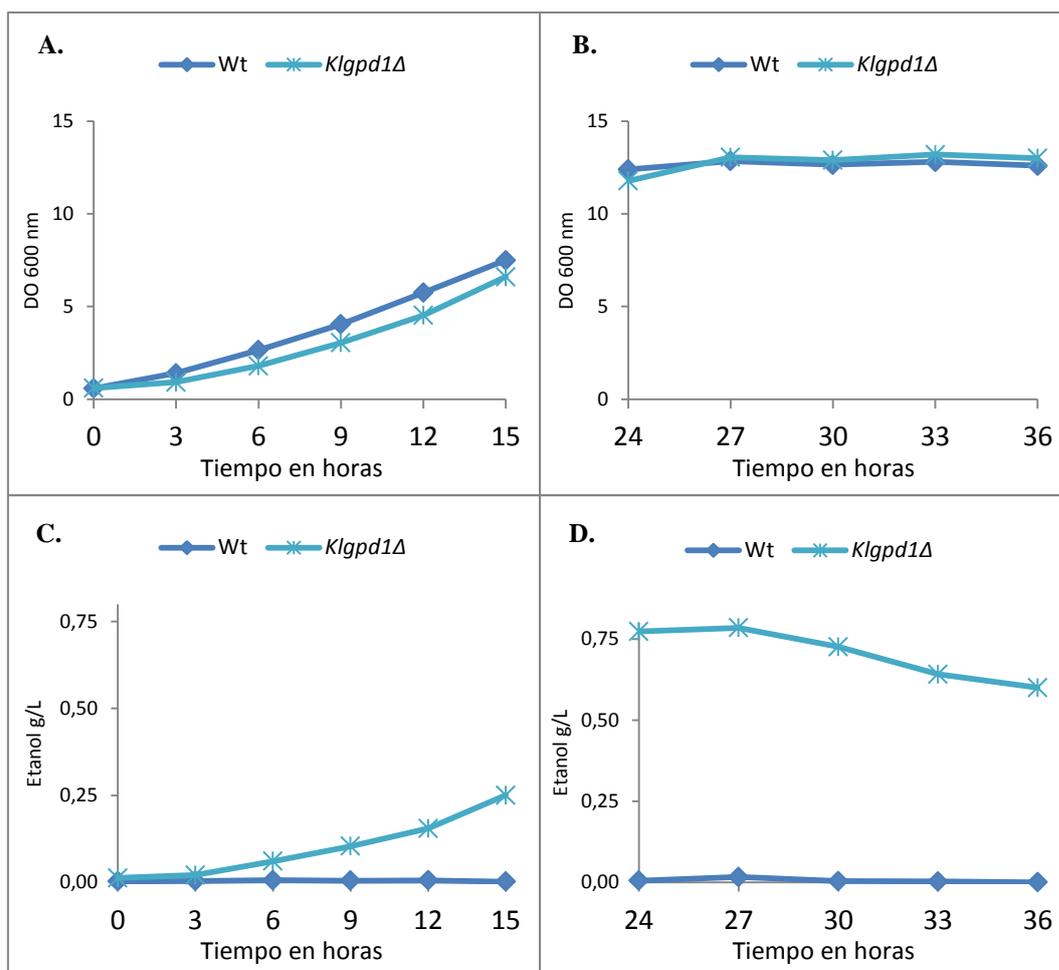


Figura 64. Estudio de la producción de etanol en la cepa *Klgpd1Δ*. **A y B.** Crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *Klgpd1Δ*. **B.** La cepa silvestre no produce etanol, pero el mutante *Klgpd1Δ* produce una considerable cantidad de etanol durante el crecimiento en glucosa.

Nuestros datos indican que la producción de etanol aumenta considerablemente en el mutante *Klgpd1Δ*. esta circunstancia podría aprovecharse para la producción de bioetanol (producto de valor añadido) a partir de suero lácteo, un subproducto de la industria quesera que se produce en grandes cantidades.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La capacidad de responder de forma rápida y efectiva a los cambios en las condiciones físico-químicas y nutricionales resulta crucial para la supervivencia celular. La glucosa es el monosacárido más abundante en la naturaleza y para la mayoría de los organismos es el nutriente de uso preferente. De esta forma, los cambios en su disponibilidad producen profundos cambios en el metabolismo celular.

En levaduras, el elemento clave de la ruta de represión por glucosa es el complejo de la proteína quinasa SNF1. Snf1 pertenece a una familia de serina/treonina proteínas quinasas, muy conservadas en todos los organismos eucariotas, cuya función es el mantenimiento de la homeostasis celular. La ruta de señalización K1SNF1-K1Cat8/K1Sip4 se ha utilizado de forma tradicional como modelo en el estudio de la represión por glucosa.

La discusión del trabajo se va a desarrollar siguiendo el mismo esquema que se siguió en la exposición de los resultados.

I. Ruta de señalización SNF1-Cat8/Sip4 en *K. lactis*

1. Regulación del complejo K1SNF1

La búsqueda de genes homólogos a SNF4 nos permitió identificar un gen que codifica para una proteína que presenta una identidad del 75% con la proteína Snf4 de *S. cerevisiae*. Para estudiar la función de dicho gen comenzamos obteniendo un mutante en dicho gen. En paralelo construimos y analizamos mutantes en los genes *K1SNF1* y *K1GAL83*. De la misma forma que ocurre en *S. cerevisiae* (ref) los mutantes de las subunidades del complejo K1SNF1 son incapaces de crecer en etanol y en glicerol como única fuente de carbono y energía. Sorprendentemente, estos mutantes no sólo son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables sino que también muestran un retraso en el crecimiento durante el uso de glucosa, lo que nos hizo pensar que la presencia del complejo K1SNF1 también es necesaria durante el crecimiento en este azúcar. Aunque se ha demostrado que existen diferentes condiciones de estrés como por ejemplo la caspofungina (afecta a la pared celular) o el crecimiento en un medio con bajos niveles de nitrógeno (induce la aparición de pseudohifas) que son capaces de activar a la quinasa Snf1 incluso durante el crecimiento en glucosa (Backhaus y col., 2014; Orlova y col., 2010), sin embargo, se considera que en condiciones normales la quinasa Snf1 de *S. cerevisiae* se encuentra defosforilada durante el uso de este azúcar (Ruiz y col., 2011).

Nuestros estudios de expresión indican que la expresión de los genes que codifican para las subunidades del complejo es independiente de la fuente de carbono y del la misma forma los análisis *Western* demuestran que el nivel de proteína tampoco se regula de forma diferencial en

Discusión

glucosa, etanol y glicerol. Estos datos indican que las subunidades del complejo están presentes en glucosa, requisito imprescindible en el caso de que realmente KISNF1 sea funcional en esta condición. Asimismo, función diferencial del complejo durante el uso de fuentes de carbono no fermentables no se debe a un aumento en el nivel de expresión sino que la función de KISNF1 se regula por modificaciones post-transcripcionales. La subunidad presente en mayor cantidad es KISnf1, seguida de KIGal83 y por último KISnf4 (1:1/2:1/3). La diferente abundancia podría estar relacionada con la función específica de cada una de las subunidades, sin embargo resulta curioso que en *S. cerevisiae* la cantidad relativa de estas proteínas es completamente diferente, siendo en este caso la subunidad con actividad catalítica Snf1 la menos abundante, seguida de Gal83 y por último Snf4 (1:6:20) (Ghaemmaghami y col., 2003).

La funcionalidad de Snf1 se asocia a la activación del residuo Thr210 presente en el dominio catalítico de la proteína (Estruch y col., 1998). La elevada similitud que presenta el dominio catalítico de la subunidad Snf1 de *S. cerevisiae* y *K. lactis* (94%) nos permitió identificar a la Thr190 como candidato a regular el nivel de activación de KISnf1. La obtención de una construcción *KISNF1*-Thr190Ala nos permitió comprobar que el fenotipo del mutante es equivalente al de la cepa *Klsnf1Δ* durante el uso de fuentes de carbono no fermentables. Por otra parte, el estudio de la actividad isocitrato liasa nos permitió comprobar que la activación de los genes con elementos CSRE no tiene lugar en el mutante Thr190Ala. Igualmente quisimos comprobar si la sustitución del residuo Thr190 por un residuo Asp era capaz de mimetizar la forma fosforilada de la Thr190, sin embargo el fenotipo de este mutante también fue equivalente al de la cepa *Klsnf1Δ*. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten afirmar que el residuo Thr190 un residuo clave en la activación de la quinasa KISnf1.

Al comprobar la presencia de las proteínas mutantes mediante *Western blot*, pudimos observar que la cantidad de proteína mutante es mayor que la cantidad de proteína silvestre. Recientemente, se ha propuesto un modelo de retroalimentación que controla el nivel y la activación de Snf1 (Hsu y col., 2015). Según este modelo, cuando el nivel de proteína Snf1 disminuye la subunidad restante se encuentra hiperfosforilada, para que de esta forma poder contrarrestar el nivel de Snf1 en caso de tener que responder a una situación. La existencia de este *feedback* podría explicar el elevado nivel de proteína de los mutantes en el residuo Thr190. De esta forma, la incapacidad para fosforilar a KISnf1 podría inducir un aumento en la cantidad total de proteína KISnf1 en un intento para compensar la pérdida de actividad catalítica.

El hecho de que KISNF1 sea esencial durante el crecimiento en glucosa, nos hizo pensar en la posibilidad de que KISnf1 esté activa durante el crecimiento en glucosa. El grado de conservación del dominio quinasa de la subunidad catalítica nos permitió utilizar un anticuerpo anti fosfo-AMPK (Thr172) para valorar el nivel de fosforilación de la subunidad quinasa. Los

resultados obtenidos indican que K1Snf1 no sólo está fosforilada durante el crecimiento en etanol sino que existe una porción de la proteína que se encuentra fosforilada en glucosa.

La regulación de la distribución celular de SNF1 es un mecanismo complejo controlado por diferentes factores y que resulta clave a la hora de determinar la disponibilidad de sustratos. En *S. cerevisiae*, la subunidad β del complejo es la responsable de la localización. De esta forma en condiciones de desrepresión SNF1 puede localizarse en el núcleo, en la vacuola o en el citosol, en función de cuál de las tres subunidades β , Gal83, Sip1 o Sip2, forme parte del complejo (Hedbacker y Carlson, 2006). En *K. lactis* sólo se ha identificado una subunidad β que presenta una elevada homología con la proteína K1Gal83 (Goffrini y col., 1995). Nuestros estudios de localización indican que K1Snf1 presenta una doble localización citosólica y nuclear tanto en glucosa como en citosol, aunque en el caso del etanol la proporción nuclear parece aumentar. K1Gal83 y K1Snf4 están excluidas del núcleo durante el crecimiento en glucosa, pero muestran una doble localización citosólica y nuclear en etanol. El enriquecimiento en el núcleo se correlaciona con el papel de K1SNF1 en la regulación de la expresión de numerosos genes. El hecho de que K1Snf1 esté presente en ambas condiciones tanto en el citosol como en el núcleo puede deberse a una estrategia para poder responder de forma rápida a una situación de estrés.

2. Caracterización de los factores de transcripción K1Cat8 y K1Sip4

En *S. cerevisiae* el ciclo del glioxilato y la ruta glucogeogénica están regulados de forma coordinada de forma que los genes implicados se expresan en fuentes de carbono no fermentables y están sujetos a represión por glucosa. Esta regulación está mediada por secuencias específicas presentes en los promotores de los genes de estas rutas que se conocen como elementos CSRE (Gancedo, 1998; Schüller, 2003). Estos elementos fueron descritos inicialmente para el gen *ICL1* que codifica para el enzima isocitrato liasa.

Cat8 y Sip4 son proteínas de unión a ADN con motivos de dedos de zinc de tipo $\text{Cys}_6\text{Zn(II)}_2$. Ambos se unen a los elementos CSRE presentes en los promotores de los genes que controlan y activan su transcripción (Roth y col., 2004)

En *K. lactis* la expresión de los enzimas claves de la ruta gluconeogénica no está mediada por los elementos CSRE y por lo tanto esta ruta no está regulada de forma coordinada con el ciclo del glioxilato (Georis y col., 2000). En cuanto a la regulación, se ha demostrado que K1Cat8 se sintetiza de forma constitutiva y que en ausencia de glucosa es fosforilada por K1Snf1 (Charbon y col., 2004). Los mutantes *K1sip4Δ* son incapaces de crecer en etanol, a diferencia del mutante de *S. cerevisiae* que no tiene afectado el crecimiento en etanol, indicando que Sip4 juega un papel más importante en *K. lactis*. La presencia de dos elementos CSRE en el

promotor de *KISIP4* sugiere que su expresión está regulada por glucosa a través de la ruta KISNF1-KICat8/KISip4.

El estudio de la expresión del gen *KISIP4* nos permitió demostrar que los elementos CSRE de su promotor son funcionales. En primer lugar, la expresión de *KISIP4* se encuentra sometida a represión por glucosa y por glicerol, pero se desreprime en presencia de etanol como única fuente de carbono y energía. Además, el nivel de expresión de este gen es dependiente de KICat8 y de KISnf1. Curiosamente, la ausencia de KISip4 no afecta a la expresión, lo cual nos hizo pensar en la posibilidad de que esta proteína reguladora no sea capaz de unirse a los elementos CSRE de su propio promotor, siendo en tal caso la expresión dependiente únicamente de KICat8. En este sentido, Roth y col. (2004) demostraron que ScCat8 y ScSip4 se unen con diferente afinidad a las diferentes secuencias CSRE y por lo tanto no contribuyen por igual a la activación de los genes que se regulan a través de estos elementos.

El análisis *Western* indica que el nivel de proteína KISip4 se corresponde con el nivel de expresión, elevado en etanol y considerablemente menor tanto en glucosa como en glicerol, lo que indica que no existen modificaciones que afecten a la estabilidad de la proteína. Lo mismo ocurre con KICat8.

Aunque KICat8 está presente de forma constitutiva, la expresión de *KISIP4* sólo se activa durante el crecimiento en etanol. Una posible explicación sería que KICat8 se encontrara excluido del núcleo cuando el crecimiento tiene lugar en glucosa y en glicerol. Sin embargo, nuestros resultados indican que la localización de KICat8 es nuclear independientemente de la fuente de carbono y por lo tanto la distribución de KICat8 no es la encargada de regular la expresión de *KISIP4*. La proteína KISip4 también presentó una distribución nuclear en etanol, única condición en la que se detectó su señal.

Con frecuencia los procesos de fosforilación/desfosforilación se encargan de regular el estado de activación de los factores de transcripción y por lo tanto su capacidad para activar la expresión de los genes que controlan. Se ha descrito que la fosforilación dependiente de KISnf1 del residuo Ser661 de KICat8 incrementa considerablemente su nivel de activación (Charbon y col., 2004). Nuestros estudios de activación de la proteína KICat8 indican que el nivel máximo de activación tiene lugar durante el crecimiento en etanol, condición en la que tiene lugar la desreprésión de *KISIP4*. La presencia de una porción activa de KICat8 en glucosa está de acuerdo con el hecho de que KISnf1 está parcialmente activa durante el uso de este azúcar.

Mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina confirmamos que tanto KICat8 como KISip4 son capaces de unirse a los elementos CSRE del promotor de *KISIP4*, sin embargo, la afinidad de KISip4 es considerablemente inferior que la de KICat8. Este hecho podría explicar por qué la expresión de *KISIP4* sólo depende de KICat8. Por otra parte, es

probable que la unión de KICat8 a los elementos CSRE tenga lugar en forma de homodímero puesto que la capacidad de KICat8 de activar la expresión génica no se ve afectada en un mutante *Klsip4Δ*.

Durante el crecimiento en etanol, la expresión de *KISIP4* tiene lugar. En estas condiciones, la proteína reguladora es fosforilada de forma dependiente de KISnf1. En *S. cerevisiae* se ha descrito la existencia de una segunda quinasa capaz de fosforilar a ScSip4 (Vincent y col., 2001). Sin embargo, nuestros resultados indican que o bien la activación de KISip4 es dependiente únicamente de KISnf1 o bien existen más elementos que participan en la regulación de la activación de KISip4, pero dependientes a su vez de KISnf1. En este trabajo hemos descartado que serina 612 sea un residuo clave en la función de KISip4, sin embargo no se puede descartar que participe en la respuesta a estrés a corto plazo.

Mediante experimentos ChIp pudimos comprobar que KISip4 se une a los elementos CSRE de *KIICLI* permitiendo la expresión de dicho gen (Rodicio y col., 2008). De la misma forma que ocurre con KICat8, nuestros resultados indican que la unión de KISip4 tiene lugar en forma de homodímero.

El estudio de supresores demuestra que KISip4 es el último elemento de la ruta de señalización puesto que el mutante constitutivo KICat8-S661E no es capaz de complementar el defecto en el crecimiento del mutante *Klsip4Δ*, la superproducción de KISip4 revierte parcialmente el fenotipo del mutante *Klcat8Δ* en etanol.

3. Función de KISak1 y KIReg1

El análisis del genoma de *K. lactis* nos permitió identificar los genes *KISAK1* y *KIELM1* que codifican para proteínas que presentan una identidad del 36% y 31%, respectivamente con las proteínas Sak1 y Elm1 de *S. cerevisiae*. No se encontró ningún posible ortólogo de *TOS1*. Asimismo, identificamos el gen *KIREG1* que codifica una proteína que presenta una identidad del 39% con la proteína Reg1 de *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* la quinasa Elm1 además de participar en la fosforilación de KISnf1 también participa en la regulación de la citocinesis (de forma independiente de Snf1). En *K. lactis* la delección del gen *KIELM1* resultó ser letal.

Nuestros resultados indican que el mutante *Klreg1Δ* no crece en etanol, pero crece en glicerol. El hecho de que este mutante sea capaz de crecer en glicerol indica que la ruta gluconeogénica y la respiración son funcionales, y por lo tanto la incapacidad de utilizar el etanol como fuente de carbono y energía tiene que deberse a la alteración de algún paso específico del metabolismo del etanol o del ciclo del glioxilato.

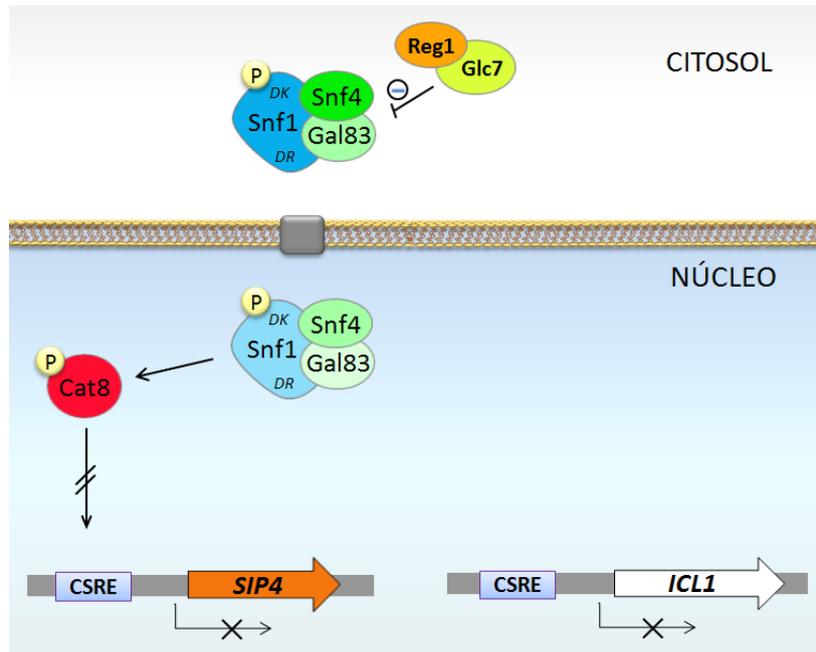


Figura 65. Modelo de regulación de la ruta KISNF1-KICat8/KISip4 en condiciones de represión.

Cuando la glucosa está presente en el medio, KICat8 se encuentra hipofosforilada y es incapaz de unirse a los elementos CSRE. Este nivel de fosforilación basal está relacionado con la presencia en el núcleo de KISnf1 el cual se encuentra parcialmente activo (la fosfatasa Klreg1 es la encargada de mantener). En estas condiciones la expresión de los genes con elementos CSRE, como es el caso de *KISIP4* y *KIICL1*, no tiene lugar.

El estudio de la actividad isocitrato liasa indica que la ausencia de crecimiento no se debe a la ausencia de este enzima, puesto que aunque el nivel de actividad se reduce a la mitad, el mismo nivel de enzima permite un crecimiento en etanol muy similar al de la cepa silvestre en el mutante *Klsak1Δ*. Este hecho sugiere que además de la disminución en la actividad KIICl1 existen otros mecanismos involucrados en el fenotipo del mutante. Con el fin de analizar a qué se debe la disminución de la actividad isocitrato liasa, decidimos valorar la ruta de señalización en el mutante *Klreg1Δ*. La presencia de KISip4 disminuye considerablemente en el mutante *Klreg1Δ* durante el crecimiento en etanol, y esta disminución se correlaciona con una disminución en la expresión del gen *KISIP4*. Puesto que la expresión de este gen está regulada por KICat8, a continuación valoramos la presencia y el estado de activación de esta proteína. Los resultados indican que aunque la cantidad de KICat8 en el mutante *Klreg1Δ* no cambia en relación a la cepa silvestre, el nivel de activación de KICat8 es prácticamente nulo. La inactividad de KICat8 explica los bajos niveles de expresión del gen *KISIP4*. De esta forma podemos concluir que la reducción de la actividad isocitrato liasa se debe a la disminución del nivel de KISip4, debido a la inactivación de KICat8 que impide la expresión normal del gen *KISIP4* en etanol. En este sentido, el análisis de supresores demostró que la superproducción de KISip4 revierte parcialmente el fenotipo del mutante *Klreg1Δ*.

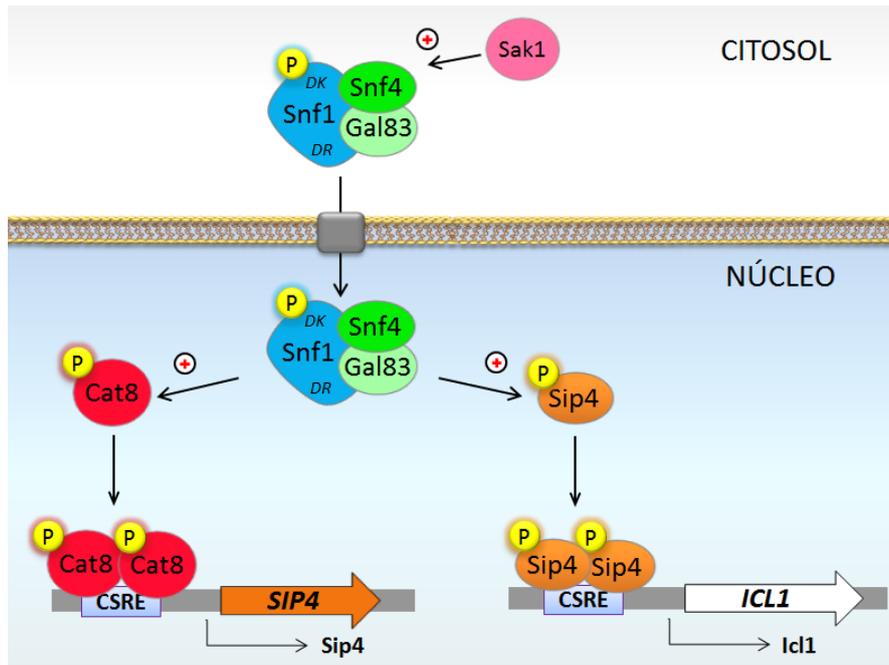


Figura 66. Modelo de regulación de la ruta KISNF1-KICat8/KISip4 en condiciones desrepresoras.

Durante el crecimiento en etanol, la quinasa KISak1 es la responsable de fosforilar a KISnf1 en su residuo Thr190 (apartado x de Resultados) y se produce un enriquecimiento del complejo KISNF1 en el núcleo (apartado 1.6 de Resultados). En estas condiciones el nivel de activación de KICat8 aumenta de forma dependiente de KISnf1 (apartado 2.5 de Resultados) mediante la fosforilación del residuo Ser661 (apartado 2.8 de Resultados; Charbon y col., 2004) que permite su unión en forma de homodímero a los elementos CSRE del promotor del gen *KISIP4* y la expresión del gen tiene lugar (apartados 2.5, 2.7 y 2.1 de Resultados). Una vez presente, KISip4 es fosforilado y activado por KISnf1 permitiendo su unión en forma de homodímero a los elementos CSRE del promotor de *KIICL1*, cuya expresión tiene lugar.

Finalmente, con el fin de valorar por qué KICat8 se encuentra inactivo en el mutante *Klreg1Δ*, valoramos el estado de fosforilación de KISnf1 en este mutante y, en paralelo, en la cepa *KISak1Δ*. El nivel de fosforilación de KISnf1 en el mutante *Klreg1Δ* es superior al detectado en la cepa silvestre tanto en etanol como en glucosa. Aunque este resultado es el esperado teniendo en cuenta que la función de KIReg1 es defosforilar a KISnf1, no explica la falta de activación de KICat8.

Los resultados obtenidos en este apartado nos han permitido resolver algunas de las incógnitas que aún existen en relación a la ruta de señalización KISNF1-KICat8/KISip4, como por ejemplo el papel diferencial de KICat8 y KISip4. Con los datos obtenidos hemos elaborado el modelo que se desarrolla en las figuras 65 y 66.

II. Papel de KIGpd1 en la regulación de la vía KISNF1-Cat8/Sip4 y otras rutas de señalización

1. Caracterización del mutante *Klgsd1Δ*

En *S. cerevisiae* el enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa participa en numerosos procesos celulares. En condiciones de estrés osmótico Gpd juega un papel clave durante la osmoadaptación (Blomberg y Adler, 1992; Brewster y Gustin, 2014). Asimismo, en ausencia de oxígeno la síntesis de glicerol es el único proceso capaz de mantener el balance redox celular mediante la reoxidación del NADH citosólico (Björkqvist y col., 1997). Gpd forma parte, junto con el enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial dependiente de FAD (Gut2), de la lanzadera del G 3-P. En condiciones aeróbicas la transferencia a la cadena respiratoria de los electrones del NADH citosólico tiene lugar a través de una NADH deshidrogenasa mitocondrial o bien a través de sistemas lanzadera, como por ejemplo la lanzadera del G 3-P (Larsson y col., 1998).

Nuestros resultados indican que el mutante *Klgsd1Δ* no crece en etanol ni en ácido oleico. Este hecho probablemente se deba a la incapacidad de reoxidar el exceso de NADH en ausencia de KIGpd1, produciéndose un desequilibrio redox que impide el crecimiento celular. De forma similar, aunque el mutante *Klgsd1Δ* es capaz de crecer en glucosa, en glicerol y en condiciones de oxígeno limitante, el crecimiento es menor que el de la cepa silvestre, lo que indica que KIGpd1 participa en la reoxidación del NADH en estas condiciones, pero existen mecanismos alternativos capaces de suplir su ausencia.

A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, el mutante *Klgsd1Δ* crece normalmente a 37°C indicando que en condiciones de estrés térmico en *K. lactis* no se activa la ruta de síntesis de glicerol. Por el contrario, en condiciones de estrés osmótico el crecimiento del mutante *Klgsd1Δ* disminuye a medida que aumenta la concentración de sal, lo que demuestra que la síntesis de glicerol es esencial en estas condiciones.

2. Complementación funcional de la cepa mutante *gpd1Δgpd2Δ* de *S. cerevisiae* con el gen *KIGPD1*

El gen *KIGPD1* revierte el fenotipo del mutante *gpd1Δgpd2Δ* de *S. cerevisiae*. esto demuestra que el gen *KIGPD1* es capaz de expresarse y que codifica para una proteína activa que es capaz de llevar a cabo todas las funciones que desempeñan los isoenzimas ScGpd1 y ScGpd2.

De la misma forma los genes *ScGPD1* y *ScGPD2* fueron capaces de revertir el fenotipo del mutante *Klgpd1Δ*.

3. Conexión entre la ruta KISNF1-KlCat8-KISip4 y la deshidrogenasa KlGpd1

Puesto que el mutante *Klgpd1Δ* no crece en etanol decidimos valorar si la ruta de señalización se encuentra alterada, para lo cual comenzamos por analizar si los valores de actividad Icl1 son normales en este mutante. Nuestros datos indican que la actividad isocitrato liasa en ausencia de KlGpd1 es considerablemente menor que en la cepa silvestre durante el crecimiento en etanol.

El análisis de la expresión de los genes *KIICL1* y *KIMLS1* y el estudio de la construcción pXW-ACS2_{CSRE-B} indica que el efecto de la ausencia de KlGpd1 actúa sobre los elementos CSRE. No se observaron cambios significativos en el nivel de expresión de *KICAT8* y *KISIP4*, ni en el nivel de proteína, ni en la localización. El estudio de la activación de estos factores de transcripción indica que el nivel de activación de KlCat8 disminuye ligeramente, aunque como hemos visto esta disminución no afecta a su capacidad para activar la expresión de *KISIP4*. En cambio, el nivel de activación de KISip4 (tres veces menor que en la cepa silvestre) parece ser el responsable de la pérdida de expresión de los genes con elementos CSRE.

Puesto que el nivel de activación de KISip4 es dependiente de KISnf1, decidimos valorar el estado de activación de esta quinasa en el mutante *Klgpd1Δ*. Al contrario de lo esperado, tanto en glucosa como en etanol el nivel de fosforilación de KISnf1 es mayor en el mutante *Klgpd1Δ* que en la cepa silvestre.

4. Análisis de la secuencia de KlGpd1

El estudio de la secuencia N-terminal de KlGpd1 llevó a la identificación de una hipotética secuencia de localización mitocondrial y otra peroxisomal; sin embargo, nuestros estudios de localización indican que KlGpd1 no se encuentra en la mitocondria en ninguna de las condiciones analizadas. Por otra parte, los estudios del promotor indicaron que el nivel de expresión del gen KlGpd1 era muy bajo, mientras que el estudio del nivel de proteína indicó que la cantidad de KlGpd1 en la célula era elevada.

A partir del alineamiento de la secuencia amino-terminal de la proteína KlGpd1 con sus ortólogos en *S. cerevisiae* observamos que a pesar de que esta región es la que presenta más diferencias, existe cierta identidad entre la secuencia inmediatamente posterior a la metionina 52 de KlGpd1 y la posterior a la metionina 1 de ScGpd1.

Nuestros resultados indican que el gen *KIGPD1* se expresa formando dos transcritos que codifican proteínas que difieren en su extremo N-terminal. Estudios con mutantes demostraron que la proteína codificada por el ARN de menor tamaño es más abundante e importante desde un punto de vista fisiológico.

5. Balance redox y la deshidrogenasa KIGpd1

La deshidrogenasa KIGpd1 de *S. cerevisiae* forma parte de la lanzadera del glicerol 3-fosfato, junto con la deshidrogenasa mitocondrial dependiente de FAD Gut2, que participa en el mantenimiento del balance redox celular en condiciones aeróbicas.

Con el fin de valorar el papel de la lanzadera del glicerol 3-fosfato en *K. lactis* construimos y analizamos mutantes en los genes que codifican para las proteínas de esta lanzadera. En paralelo decidimos estudiar el mutante *Kladh3Δ* que carece de una de las alcohol deshidrogenasas que forma parte de la lanzadera del etanol-acetaldehído.

Nuestro resultados indican que la lanzadera del glicerol 3- fosfato es imprescindible durante el crecimiento en etanol. En estas condiciones parece no existir un mecanismo alternativo para la reoxidación del NADH citosólico. Por el contrario, la ausencia de K1Adh3, no alteró en crecimiento en etanol, indicando que la lanzadera del etanol-acetaldehído no juega un papel importante en la reoxidación del MADH en estas circunstancias.

Puesto que KIGpd1 es fundamental para el crecimiento en etanol, nos propusimos valorar si en estas condiciones el nivel de expresión aumenta o bien si aumenta el nivel de acumulación de la proteína en relación a otras fuentes de carbono. Sin embargo, tanto el nivel de expresión como el nivel de proteína fue idéntico en glucosa, etanol y glicerol

Se ha descrito que la ausencia de KIGut2, afecta al nivel final de otras deshidrogenasas. Por ello, decidimos valorar si ocurre lo mismo en el caso del mutante *Klgpd1Δ* o bien si la deleción de *KIGUT2* y *KIADH3* cambia el nivel de proteína KIGpd1. Nuestros resultados indican que ni la ausencia de KIGut2 ni la de K1Adh3 afectan al nivel de KIGpd1. Por el contrario en el mutante *Klgpd1Δ* el nivel de K1Adh3 disminuye tanto en glucosa como en etanol y se mantiene en glicerol. Estos datos parecen indicar que en ausencia de KIGpd1 existe una reorganización de los mecanismos de reoxidación del NADH citosólico.

6. Papel de KIGpd1 durante el crecimiento en condiciones de estrés osmótico

En *S. cerevisiae*, el estrés osmótico produce un aumento de la síntesis de los genes que codifican para los enzimas de la ruta de síntesis de glicerol, siendo este aumento dependiente de la MAP quinasa Hog1.

Con el fin de analizar el papel de los genes *KIGPDI* y *KIGPPI*, inicialmente analizamos el comportamiento de los mutantes en estos genes en condiciones de estrés osmótico. En paralelo se estudió el comportamiento del mutante *Klhog1Δ*. Ninguno de los tres mutantes creció en una concentración 0,75 M de NaCl, indicando que en *K. lactis* la ruta de síntesis de glicerol también participa en la respuesta a estrés osmótico. Asimismo, resulta curioso el hecho de que el mutante *Klgpd1Δ* sea más sensible a sal que *Klgpp1Δ*, puesto que en ninguna de las cepas puede tener lugar la síntesis de glicerol. Una posible explicación sería que el mutante *Klgpd1Δ* además de estar sometido al estrés osmótico, sufre un equilibrio redox por la acumulación de NADH citosólico.

La expresión de *KIGPDI* no aumenta en condiciones de estrés osmótico. Por el contrario, la expresión de *KIGPPI* aumenta a partir de las dos horas. Aunque la respuesta inicial de *KIGPPI* es dependiente KIHog1, existe otro mecanismo capaz de activar la expresión en ausencia de KIHog1.

7. Regulación de KIGpd1

Se sabe que los isoenzimas Gpd1 y Gpd2 de *S. cerevisiae* están regulados por la fosforilación de residuos serina presentes en el extremo amino-terminal.

Con el fin de encontrar residuos candidatos a ser fosforilados analizamos de secuencia de KIGpd1 con el programa NetPhosYeast. Según esta aplicación la probabilidad de que el residuo Ser 53 de KIGpd1 se fosforile es del 0.95. Este residuo serina forma parte de una secuencia consenso de fosforilación de MAPK de tipo prolina dependiente. Aunque la mutación del residuo Ser53 no impide el crecimiento en las condiciones analizadas, nuestros resultados indican que la mutación de este residuo afecta a la adaptación inicial a condiciones de estrés.

Oliveira y col. (2012) demostraron que la sustitución de los residuos Ser 23, 24 25 y 27 del extremo amino-terminal de KIGpd1 disminuye 6 veces la activación de KIGpd1 durante el crecimiento en glucosa. En la secuencia de KIGpd1 existen cuatro residuos serina que por su localización podrían desempeñar un papel homólogo. Para confirmar esta hipótesis construimos un mutante en el que se sustituyeron las serinas 63, 64, 67 y 69 por residuos alanina y otro en el los residuos serina fueron sustituidos por glutamato. Sin embargo, la mutación de estos residuos no afectó al crecimiento ni a la adaptación inicial a condiciones de estrés.

8. Estudio de la localización de KlGpd1

El estudio de la secuencia amino-terminal de KlGpd1 nos permitió identificar una hipotética señal de localización mitocondrial y una hipotética señal de localización peroxisomal de tipo PTS2. Inicialmente, para valorar si estas secuencias desempeñan alguna función en el contexto celular procedimos a su delección. La delección de la hipotética señal mitocondrial no mostró ningún fenotipo en las condiciones de crecimiento valoradas, sin embargo, el mutante KIGPD1- Δ PTS2 crece más lentamente en etanol y en ácido oleico. Estos resultados ponen de manifiesto que durante el uso de estas fuentes de carbono la presencia de KlGpd1 en los peroxisomas resulta esencial. Probablemente, su papel en este orgánulo está relacionado con el mantenimiento del balance redox.

Para estudiar la localización, construimos una proteína de fusión KlGpd1-GFP. Los estudios preliminares indicaron que KlGpd1 presenta una doble localización citosólica y peroxisomal durante el crecimiento en glucosa. En ningún caso se pudo observar señal en la mitocondria ni en el núcleo.

Con el fin de demostrar que la presunta señal PTS2 es funcional, construimos una proteína de fusión que contiene los primeros 70 aminoácidos de KlGpd1 (incluyendo la secuencia PTS2) fusionada en pauta a GFP. Esta proteína presentó una localización peroxisomal. A continuación construimos una proteína que contiene la secuencia de KlGpd1 con la señal PTS2 delecionada e igualmente fusionada a GFP. Esta construcción presenta una localización citosólica en el mutante *Klgpd1 Δ* lo que demuestra que la secuencia PTS2 del extremo amino-terminal de KlGpd1 es funcional y es la responsable de su transporte a los peroxisomas. Cuando esta última construcción se transforma en una cepa silvestre, se puede observar que KlGpd1 recupera la localización peroxisomal. Esto ya ha sido descrito por Jung y col. (2009) y se cree que está relacionado con la formación de dímeros entre la proteína silvestre y la proteína mutante.

Aunque los datos obtenidos hasta el momento indican que la secuencia mitocondrial no es funcional, ante la posibilidad de que la localización en este orgánulo fuera minoritaria y su señal estuviera enmascarada por la señal citosólica y peroxisomal, decidimos construir una proteína de fusión que contiene los primeros 37 aminoácidos del extremo amino-terminal de KlGpd1 (que incluyen la hipotética secuencia de localización mitocondrial) fusionados a GFP. Sin embargo, la distribución de esta proteína fue únicamente citosólica, lo que indica que esta secuencia no es funcional.

Además de valorar la distribución en glucosa, decidimos analizar la distribución de KlGpd1 en otras fuentes de carbono y en condiciones de estrés osmótico. En condiciones de estrés osmótico KlGpd1-GFP presenta una doble localización citosólica y peroxisomal, y la

proporción citosólica aumenta con el tiempo. Este enriquecimiento en el citosol probablemente está relacionado con la necesidad de sintetizar y acumular glicerol en este compartimento para poder sobrevivir a las condiciones de estrés. Por el contrario, tanto en etanol como en ácido oleico la localización es fundamentalmente peroxisomal. En estas condiciones la distribución de Klgpd1 se correlaciona con el mantenimiento del balance redox.

9. Producción de etanol en el mutante *Klgpd1Δ*

En último lugar decidimos valorar si en el mutante *Klgpd1Δ* la incapacidad de sintetizar glicerol durante el crecimiento en glucosa, se traduce en un aumento de la producción de etanol. Nuestros datos indican que la producción de etanol aumenta considerablemente en el mutante *Klgpd1Δ*. esta circunstancia podría aprovecharse para la producción de bioetanol (producto de valor añadido) a partir de suero lácteo, un subproducto de la industria quesera que se produce en grandes cantidades.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han obtenido mutantes en los genes que codifican las subunidades del complejo SNF1 de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Su caracterización demostró que el complejo SNF1 es esencial durante el crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables, pero además se requiere durante la utilización de glucosa.
2. La comparación de la proteína Snf1 de *K. lactis* con la de su ortóloga de *S. cerevisiae* permitió identificar a la Thr190 como el posible residuo implicado en la activación de la proteína. Esto se confirmó mediante estudios de mutagénesis dirigida y análisis *Western* con anticuerpos específicos frente a AMPK-fosforiladas ya que la sustitución del residuo Thr190 por uno de alanina determina una proteína no fosforilada e inactiva.
3. Durante el crecimiento en etanol, la subunidad KISnf1 está fosforilada y se localiza en el núcleo y el citosol. Las otras dos subunidades del complejo KIGal83 y KISnf4 también muestran una doble localización subcelular en estas condiciones.
4. Bajo condiciones de represión, la proteína KISnf1 se encuentra fosforilada aunque la proporción detectada es menor que la encontrada en etanol. En presencia del azúcar, esta subunidad mantiene su localización, nuclear y citosólica mientras que las subunidades KIGal83 y KISnf4 están excluidas del núcleo.
5. En *K. lactis* los genes *KICAT8* y *KISIP4* son esenciales para la utilización de etanol y glicerol. Así, mutantes sencillos en estos genes presentan un retraso en el crecimiento en estas fuentes de carbono, mayor en el caso del mutante deficiente en KISip4. Una cepa doble mutante *Klcat8ΔKlkip4Δ* no muestra ningún crecimiento.
6. El gen *KISIP4* presenta unos niveles de expresión muy elevados en etanol y reducidos en glucosa y glicerol. La expresión de *KISIP4* en etanol está regulada a través de elementos CSRE presentes en su promotor y es dependiente de KISnf1 y KICat8 pero no del propio KISip4.
7. La localización de KICat8 y KISip4 es nuclear independientemente de la fuente de carbono. Sin embargo, la activación de estos factores solo es máxima durante el crecimiento en etanol y es dependiente de la quinasa KISnf1. Esto estará de acuerdo con que KISnf1 desencadene la activación de estas proteínas en el núcleo.
8. KICat8 se une a los elementos CSRE del promotor *KISIP4*, probablemente en forma de homodímero. KISip4 también se une a los elementos CSRE de su propio promotor pero la afinidad es menor que la de KICat8. Por su parte, KISip4, pero no KICat8, se une a los elementos CSRE del promotor *KIICLI* demostrando que los dos factores de transcripción reconocen variantes de elementos CSRE diferentes.
9. La delección del gen que codifica la fosfatasa *KIReg1* da lugar a la fosforilación constitutiva de la quinasa KISnf1. Sin embargo, esta cepa es incapaz de crecer en etanol y muestra niveles de expresión de los genes *KISIP4* y *KIICLI* reducidos. La falta de la

Conclusiones

SNF1 quinasa KISac1 también presenta niveles reducidos de genes regulados por elementos CSRE pero puede crecer en etanol como única fuente de carbono y energía.

10. El gen *KIGPDI* que codifica la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa es esencial durante el crecimiento en etanol y ácido oleico y en menor grado para la utilización de glucosa demostrando que esta deshidrogenasa participa en el mantenimiento del balance $NAD^+/NADH$ en estas condiciones. Además también se requiere para la respuesta celular en situaciones de estrés osmótico.
11. El gen *KIGPDI* es activo cuando se expresa en la levadura *S. cerevisiae*. De la misma forma los genes *ScGPD1* y *ScGPD2* son capaces de revertir el fenotipo del mutante *Klgsd1Δ*.
12. La proteína KIGpd1 regula el metabolismo del etanol controlando el nivel de activación de la quinasa Snf1 y del factor de transcripción KISip4.
13. KIGpd1 regula la expresión de genes que participan en el mantenimiento del balance redox como *KIADH3*.
14. El gen *KIGPDI* se expresa formando dos transcritos que codifican proteínas que difieren en su extremo N-terminal. Estudios con mutantes demostraron que la proteína codificada por el RNA de menor tamaño es más abundante e importante desde un punto de vista fisiológico.
15. En condiciones de estrés osmótico la expresión de *KIGPP1* es dependiente de KIHog1 aunque puede existir otro mecanismo alternativo capaz de activar su expresión independiente de esta MAP quinasa.
16. La mutación del residuo Ser53 afecta a la respuesta a corto plazo a condiciones de estrés de KIGpd1. Sin embargo la sustitución de las serinas 63, 64, 67 y 69, posibles sitios de fosforilación conservadas en el isoenzima Gpd1 de *S. cerevisiae*, no tiene ningún efecto en las condiciones analizadas.
17. En condiciones de estrés osmótico KIGpd1 presenta una localización fundamentalmente citosólica mientras que en etanol y en ácido oleico se encuentra mayoritariamente en los peroxisomas. La presencia de la proteína en estos orgánulos no es esencial para su función en ninguna de las condiciones estudiadas.
18. Las cepas deficientes en la deshidrogenasa KIGpd1 desvían el metabolismo produciendo etanol, lo cual tiene repercusiones importantes desde el punto de vista biotecnológico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcon, D. A., M. Nandi, et al. (2012). "Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.45 Å resolution." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 68(Pt 11): 1279-1283.
- Albertyn, J., S. Hohmann, et al. (1994). "GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway." *Mol Cell Biol* 14(6): 4135-4144.
- Alepuz, P. M., E. de Nadal, et al. (2003). "Osmostress-induced transcription by Hog1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II." *EMBO J* 22(10): 2433-2442.
- Alepuz, P. M., A. Jovanovic, et al. (2001). "Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes." *Mol Cell* 7(4): 767-777.
- Ansell, R., K. Granath, et al. (1997). "The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation." *EMBO J* 16(9): 2179-2187.
- Ashrafi, K., S. S. Lin, et al. (2000). "Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*." *Genes Dev* 14(15): 1872-1885.
- Babazadeh, R., T. Furukawa, et al. (2014). "Rewiring yeast osmostress signalling through the MAPK network reveals essential and non-essential roles of Hog1 in osmoadaptation." *Sci Rep* 4: 4697.
- Backhaus, K., D. Rippert, et al. (2013). "Mutations in SNF1 complex genes affect yeast cell wall strength." *Eur J Cell Biol* 92(12): 383-395.
- Bakker, B. M., C. Bro, et al. (2000). "The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* 182(17): 4730-4737.
- Betina, S., P. Goffrini, et al. (2001). "RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*." *Genetics* 158(2): 541-548.
- Biddick, R. K., G. L. Law, et al. (2008). "Adr1 and Cat8 mediate coactivator recruitment and chromatin remodeling at glucose-regulated genes." *PLoS One* 3(1): e1436.
- Billard, P., S. Menart, et al. (1996). "Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the HGT1 gene in glucose transport." *J Bacteriol* 178(20): 5860-5866.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-1523.
- Bjorkqvist, S., R. Ansell, et al. (1997). "Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *Appl Environ Microbiol* 63(1): 128-132.

Bibliografia

- Blomberg, A. and L. Adler (1992). "Physiology of osmotolerance in fungi." *Adv Microb Physiol* 33: 145-212.
- Bouquin, N., Y. Barral, et al. (2000). "Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* 113 (Pt 8): 1435-1445.
- Breunig, K. D. (1989). "Glucose repression of LAC gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9." *Mol Gen Genet* 216(2-3): 422-427.
- Breunig, K. D., M. Bolotin-Fukuhara, et al. (2000). "Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*." *Enzyme Microb Technol* 26(9-10): 771-780.
- Brewster, J. L. and M. C. Gustin (2014). "Hog1: 20 years of discovery and impact." *Sci Signal* 7(343): re7.
- Britton, P., D. Murfitt, et al. (1982). "Phosphotransferase-mediated regulation of carbohydrate utilisation in *Escherichia coli* K12: identification of the products of genes on the specialised transducing phages lambda iex (crr) and lambda gsr (tgs)." *EMBO J* 1(8): 907-911.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112(2): 195-203.
- Caspary, F., A. Hartig, et al. (1997). "Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene *MLS1*." *Mol Gen Genet* 255(6): 619-627.
- Charbon, G., K. D. Breunig, et al. (2004). "Key role of Ser562/661 in Snf1-dependent regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*." *Mol Cell Biol* 24(10): 4083-4091.
- Chen, X. J. (1996). "Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*." *Gene* 172(1): 131-136.
- Chen, X. J., M. M. Bianchi, et al. (1989). "The host range of the pKD1-derived plasmids in yeast." *Curr Genet* 16(2): 95-98.
- Chen, X. J., M. Wesolowski-Louvel, et al. (1992). "Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*." *Mol Gen Genet* 233(1-2): 97-105.
- Dale, S., W. A. Wilson, et al. (1995). "Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I." *FEBS Lett* 361(2-3): 191-195.
- Daum, G., N. D. Lees, et al. (1998). "Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 14(16): 1471-1510.
- de Smidt, O., J. C. du Preez, et al. (2012). "Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res* 12(1): 33-47.

- Diaz-Ruiz, R., M. Rigoulet, et al. (2011). "The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression." *Biochim Biophys Acta* 1807(6): 568-576.
- Dihazi, H., R. Kessler, et al. (2004). "High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress." *J Biol Chem* 279(23): 23961-23968.
- Dixon, G. H. and H. L. Kornberg (1959). "Assay methods for key enzymes of the glyoxilate cycle." *Biochem J* 72: 3p.
- Dujon, B., D. Sherman, et al. (2004). "Genome evolution in yeasts." *Nature* 430(6995): 35-44.
- Estruch, F., M. A. Treitel, et al. (1992). "N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function." *Genetics* 132(3): 639-650.
- Fernandez-Garcia, P., R. Pelaez, et al. (2012). "Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling." *J Biol Chem* 287(50): 42151-42164.
- Ferrigno, P., F. Posas, et al. (1998). "Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1." *EMBO J* 17(19): 5606-5614.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340(6230): 245-246.
- Gancedo, J. M. and C. Gancedo (1971). "Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeasts." *Arch Mikrobiol* 76(2): 132-138.
- Georis, I., J. J. Krijger, et al. (2000). "Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of PCK1 and FBP1 genes in *Kluyveromyces lactis*." *Mol Gen Genet* 264(1-2): 193-203.
- Goffrini, P., A. Ficarelli, et al. (1996). "FOG1 and FOG2 genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to GAL83 and SNF1 of *saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 29(4): 316-326.
- Gong, J., L. A. Robbins, et al. (2014). "Diabetes, pancreatic cancer, and metformin therapy." *Front Physiol* 5: 426.
- Grandier-Vazeille, X., K. Bathany, et al. (2001). "Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex." *Biochemistry* 40(33): 9758-9769.
- Grauslund, M., J. M. Lopes, et al. (1999). "Expression of GUT1, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion." *Nucleic Acids Res* 27(22): 4391-4398.
- Grauslund, M. and B. Ronnow (2000). "Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*." *Can J Microbiol* 46(12): 1096-1100.
- Grunau, S., W. Schliebs, et al. (2009). "Peroxisomal targeting of PTS2 pre-import complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Traffic* 10(4): 451-460.

Bibliografía

- Guldener, U., S. Heck, et al. (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." *Nucleic Acids Res* 24(13): 2519-2524.
- Hanahan, D., J. Jessee, et al. (1991). "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Methods Enzymol* 204: 63-113.
- Hardie, D. G. (2014). "AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels." *Annu Rev Nutr* 34: 31-55.
- Hardie, D. G. (2015). "AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis." *Curr Opin Cell Biol* 33: 1-7.
- Hardie, D. G. and M. L. Ashford (2014). "AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels." *Physiology (Bethesda)* 29(2): 99-107.
- Hardie, D. G., D. Carling, et al. (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" *Annu Rev Biochem* 67: 821-855.
- Hedbacker, K. and M. Carlson (2006). "Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase." *Eukaryot Cell* 5(12): 1950-1956.
- Hedbacker, K. and M. Carlson (2008). "SNF1/AMPK pathways in yeast." *Front Biosci* 13: 2408-2420.
- Hedbacker, K., S. P. Hong, et al. (2004). "Pak1 protein kinase regulates activation and nuclear localization of Snf1-Gal83 protein kinase." *Mol Cell Biol* 24(18): 8255-8263.
- Hedges, D., M. Proft, et al. (1995). "CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 15(4): 1915-1922.
- Heinisch, J. J. (1993). "PFK2, ISP42, ERG2 and RAD14 are located on the right arm of chromosome XIII." *Yeast* 9(10): 1103-1105.
- Hellauer, K., M. H. Rochon, et al. (1996). "A novel DNA binding motif for yeast zinc cluster proteins: the Leu3p and Pdr3p transcriptional activators recognize everted repeats." *Mol Cell Biol* 16(11): 6096-6102.
- Herrero, P., R. Fernandez, et al. (1985). "Differential sensitivities to glucose and galactose repression of gluconeogenic and respiratory enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*." *Arch Microbiol* 143(3): 216-219.
- Hiesinger, M., S. Roth, et al. (2001). "Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements." *Curr Genet* 39(2): 68-76.
- Hirst, M., M. S. Kobor, et al. (1999). "GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8." *Mol Cell* 3(5): 673-678.
- Hohmann, S. (2002). "Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts." *Microbiol Mol Biol Rev* 66(2): 300-372.
- Hong, S. P. and M. Carlson (2007). "Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress." *J Biol Chem* 282(23): 16838-16845.

- Innis, M. A., D. H. Gelfand, et al. (1990). "PCR protocols. A guide to methods and applications." San Diego, Ca.
- Jacoby, J., C. P. Hollenberg, et al. (1993). "Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway." *Mol Microbiol* 10(4): 867-876.
- Janssen, M. J., F. van Voorst, et al. (2002). "Photolabeling identifies an interaction between phosphatidylcholine and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gut2p) in yeast mitochondria." *Biochemistry* 41(18): 5702-5711.
- Jiang, R. and M. Carlson (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(4): 2099-2106.
- Jung, S., M. Marelli, et al. (2010). "Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress." *J Biol Chem* 285(9): 6739-6749.
- Kawasaki, L., M. Castaneda-Bueno, et al. (2008). "Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*." *Eukaryot Cell* 7(1): 78-85.
- Kim, M. D., S. P. Hong, et al. (2005). "Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources." *Eukaryot Cell* 4(5): 861-866.
- Klebe, R. J., J. V. Harriss, et al. (1983). "A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast." *Gene* 25(2-3): 333-341.
- Lanyon-Hogg, T., S. L. Warriner, et al. (2010). "Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes." *Biol Cell* 102(4): 245-263.
- Larsson, C., I. L. Pahlman, et al. (1998). "The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 14(4): 347-357.
- Lee, Y. J., J. W. Jang, et al. (2011). "TCA cycle-independent acetate metabolism via the glyoxylate cycle in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 28(2): 153-166.
- Lee, Y. J., G. R. Jeschke, et al. (2012). "Reciprocal phosphorylation of yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenases in adaptation to distinct types of stress." *Mol Cell Biol* 32(22): 4705-4717.
- Leech, A., N. Nath, et al. (2003). "Isolation of mutations in the catalytic domain of the snf1 kinase that render its activity independent of the snf4 subunit." *Eukaryot Cell* 2(2): 265-273.
- Lesage, P., X. Yang, et al. (1996). "Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response." *Mol Cell Biol* 16(5): 1921-1928.
- Lo, W. S. and A. M. Dranginis (1998). "The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* 9(1): 161-171.
- Loewith, R. and M. N. Hall (2011). "Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control." *Genetics* 189(4): 1177-1201.

Bibliografía

- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, et al. (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 14(10): 953-961.
- Lopez, M. L., B. Redruello, et al. (2004). "Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation." *Curr Genet* 44(6): 305-316.
- Lu, J. Y., Y. Y. Lin, et al. (2011). "Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic aging independently of caloric restriction." *Cell* 146(6): 969-979.
- Ludin, K., R. Jiang, et al. (1998). "Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6245-6250.
- Lundin, M., J. O. Nehlin, et al. (1994). "Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1." *Mol Cell Biol* 14(3): 1979-1985.
- MacPherson, S., M. Larochelle, et al. (2006). "A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins." *Microbiol Mol Biol Rev* 70(3): 583-604.
- Maeda, T., M. Takekawa, et al. (1995). "Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor." *Science* 269(5223): 554-558.
- Malave, T. M. and S. Y. Dent (2006). "Transcriptional repression by Tup1-Ssn6." *Biochem Cell Biol* 84(4): 437-443.
- Mangat, S., D. Chandrashekarappa, et al. (2010). "Differential roles of the glycogen-binding domains of beta subunits in regulation of the Snf1 kinase complex." *Eukaryot Cell* 9(1): 173-183.
- Martins, A. M., C. A. Cordeiro, et al. (2001). "In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 499(1-2): 41-44.
- Mas, G., E. de Nadal, et al. (2009). "Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes." *EMBO J* 28(4): 326-336.
- McCartney, R. R., E. M. Rubenstein, et al. (2005). "Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases." *Curr Genet* 47(6): 335-344.
- McCartney, R. R. and M. C. Schmidt (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(39): 36460-36466.
- Merico, A., S. Galafassi, et al. (2009). "The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 9(5): 749-756.
- Meyers, J. A., D. Sanchez, et al. (1976). "Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid." *J Bacteriol* 127(3): 1529-1537.
- Milkowski, C., S. Krampe, et al. (2001). "Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake." *J Bacteriol* 183(18): 5223-5229.

- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics." Cold Spring Harbor Laboratory: 403.
- Moreno, F., D. Ahuatzi, et al. (2005). "Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway." *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1): 265-268.
- Mulder, W., I. H. Scholten, et al. (1995). "Carbon catabolite regulation of transcription of nuclear genes coding for mitochondrial proteins in the yeast *Kluyveromyces lactis*." *Curr Genet* 28(3): 267-273.
- Mulder, W., I. H. Scholten, et al. (1995). "Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* despite similar promoter structures." *Mol Microbiol* 17(5): 813-824.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Nevoigt, E. and U. Stahl (1997). "Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev* 21(3): 231-241.
- Niles, B. J., A. C. Joslin, et al. (2014). "TOR complex 2-Ypk1 signaling maintains sphingolipid homeostasis by sensing and regulating ROS accumulation." *Cell Rep* 6(3): 541-552.
- Nissen, T. L., U. Schulze, et al. (1997). "Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology* 143 (Pt 1): 203-218.
- Norbeck, J., A. K. Pahlman, et al. (1996). "Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." *J Biol Chem* 271(23): 13875-13881.
- Nordstrom, K. (1966). "Yeast growth and glycerol formation." *Acta Chem Scand* 20(4): 1016-1025.
- Orlova, M., H. Ozcetin, et al. (2010). "Roles of the Snf1-activating kinases during nitrogen limitation and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eukaryot Cell* 9(1): 208-214.
- O'Rourke, S. M. and I. Herskowitz (2004). "Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis." *Mol Biol Cell* 15(2): 532-542.
- O'Rourke, S. M., I. Herskowitz, et al. (2002). "Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response." *Trends Genet* 18(8): 405-412.
- Pahlman, A. K., K. Granath, et al. (2001). "The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress." *J Biol Chem* 276(5): 3555-3563.

Bibliografía

- Pahlman, I. L., C. Larsson, et al. (2002). "Kinetic regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase by the external NADH dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 277(31): 27991-27995.
- Panesar, P. S., S. Kumari, et al. (2010). "Potential Applications of Immobilized beta-Galactosidase in Food Processing Industries." *Enzyme Res* 2010: 473137.
- Papamichos-Chronakis, M., T. Gligoris, et al. (2004). "The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor." *EMBO Rep* 5(4): 368-372.
- Pelaez, R., P. Herrero, et al. (2009). "Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway." *J Biol Chem* 284(31): 20548-20555.
- Phelps, C., V. Gburcik, et al. (2006). "Fungi and animals may share a common ancestor to nuclear receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7077-7081.
- Posas, F. and H. Saito (1998). "Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator." *EMBO J* 17(5): 1385-1394.
- Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, et al. (1996). "Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor." *Cell* 86(6): 865-875.
- Rahner, A., M. Hiesinger, et al. (1999). "Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* 34(1): 146-156.
- Ratnakumar, S., N. Kacherovsky, et al. (2009). "Snf1 controls the activity of *adr1* through dephosphorylation of Ser230." *Genetics* 182(3): 735-745.
- Ratnakumar, S. and E. T. Young (2010). "Snf1 dependence of peroxisomal gene expression is mediated by *Adr1*." *J Biol Chem* 285(14): 10703-10714.
- Reiser, V., S. M. Salah, et al. (2000). "Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42." *Nat Cell Biol* 2(9): 620-627.
- Rep, M., M. Krantz, et al. (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(12): 8290-8300.
- Rodicio, R., M. L. Lopez, et al. (2008). "Differential control of isocitrate lyase gene transcription by non-fermentable carbon sources in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*." *FEBS Lett* 582(5): 549-557.
- Rodriguez, C., P. Sanz, et al. (2003). "New mutations of *Saccharomyces cerevisiae* that partially relieve both glucose and galactose repression activate the protein kinase Snf1." *FEMS Yeast Res* 3(1): 77-84.
- Rodriguez-Colinas, B., L. Fernandez-Arrojo, et al. (2014). "Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: towards a prebiotic-enriched milk." *Food Chem* 145: 388-394.
- Roth, S., J. Kumme, et al. (2004). "Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive

- promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 45(3): 121-128.
- Roth, S. and H. J. Schuller (2001). "Cat8 and Sip4 mediate regulated transcriptional activation of the yeast malate dehydrogenase gene MDH2 by three carbon source-responsive promoter elements." *Yeast* 18(2): 151-162.
- Rottensteiner, H., A. J. Kal, et al. (1997). "A heterodimer of the Zn₂Cys₆ transcription factors Pip2p and Oaf1p controls induction of genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* 247(3): 776-783.
- Rubio-Teixeira, M. (2005). "A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 5(12): 1115-1128.
- Rudolph, M. G., R. Heissmann, et al. (2006). "Crystal structure and nucleotide binding of the *Thermus thermophilus* RNA helicase Hera N-terminal domain." *J Mol Biol* 361(4): 731-743.
- Sadowski, I., C. Costa, et al. (1996). "Phosphorylation of Ga14p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription." *Mol Cell Biol* 16(9): 4879-4887.
- Saito, H. and K. Tatebayashi (2004). "Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast." *J Biochem* 136(3): 267-272.
- Saliola, M., S. D'Amici, et al. (2010). "The transdehydrogenase genes KINDE1 and KINDI1 regulate the expression of KIGUT2 in the yeast *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 10(5): 518-526.
- Saliola, M., I. De Maria, et al. (2006). "KIADH3, a gene encoding a mitochondrial alcohol dehydrogenase, affects respiratory metabolism and cytochrome content in *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 6(8): 1184-1192.
- Saliola, M., J. R. Shuster, et al. (1990). "The alcohol dehydrogenase system in the yeast, *Kluyveromyces lactis*." *Yeast* 6(3): 193-204.
- Saliola, M., M. Sponziello, et al. (2008). "Characterization of KIGUT2, a gene of the glycerol-3-phosphate shuttle, in *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 8(5): 697-705.
- Santangelo, G. M. (2006). "Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* 70(1): 253-282.
- Schaffrath, R. and K. D. Breunig (2000). "Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*." *Fungal Genet Biol* 30(3): 173-190.
- Schmidt, M. C. and R. R. McCartney (2000). "beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition." *EMBO J* 19(18): 4936-4943.
- Scholer, A. and H. J. Schuller (1994). "A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 14(6): 3613-3622.
- Schuller, H. J. (2003). "Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 43(3): 139-160.

Bibliografía

- Simon, M., M. Binder, et al. (1992). "Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by ADR1, SNF1 (CAT1, CCR1) and SNF4 (CAT3)." *Yeast* 8(4): 303-309.
- Snoek, I. S. and H. Y. Steensma (2006). "Why does *Kluyveromyces lactis* not grow under anaerobic conditions? Comparison of essential anaerobic genes of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Kluyveromyces lactis* genome." *FEMS Yeast Res* 6(3): 393-403.
- Tachibana, C., J. Y. Yoo, et al. (2005). "Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by *Adr1* and *Cat8*." *Mol Cell Biol* 25(6): 2138-2146.
- Tarrio, N., M. Becerra, et al. (2006). "Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 6(3): 371-380.
- Tarrio, N., S. Diaz Prado, et al. (2005). "The nuclear genes encoding the internal (KINDI1) and external (KINDE1) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*." *Biochim Biophys Acta* 1707(2-3): 199-210.
- Tatebayashi, K., K. Tanaka, et al. (2007). "Transmembrane mucins *Hkr1* and *Msb2* are putative osmosensors in the *SHO1* branch of yeast HOG pathway." *EMBO J* 26(15): 3521-3533.
- Thorsen, M., Y. Di, et al. (2006). "The MAPK *Hog1p* modulates *Fps1p*-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast." *Mol Biol Cell* 17(10): 4400-4410.
- Treitl, M. A., S. Kuchin, et al. (1998). "*Snf1* protein kinase regulates phosphorylation of the *Mig1* repressor in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 18(11): 6273-6280.
- Turcotte, B., X. B. Liang, et al. (2010). "Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast." *FEMS Yeast Res* 10(1): 2-13.
- Valadi, A., K. Granath, et al. (2004). "Distinct intracellular localization of *Gpd1p* and *Gpd2p*, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production." *J Biol Chem* 279(38): 39677-39685.
- van Ooyen, A. J., P. Dekker, et al. (2006). "Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*." *FEMS Yeast Res* 6(3): 381-392.
- van Roermund, C. W., H. R. Waterham, et al. (2003). "Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Mol Life Sci* 60(9): 1838-1851.
- Van Urk, H., W. S. Voll, et al. (1990). "Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts." *Appl Environ Microbiol* 56(1): 281-287.
- Vincent, O. and M. Carlson (1998). "*Sip4*, a *Snf1* kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes." *EMBO J* 17(23): 7002-7008.
- Vincent, O. and M. Carlson (1999). "*Gal83* mediates the interaction of the *Snf1* kinase complex with the transcription activator *Sip4*." *EMBO J* 18(23): 6672-6681.

- Vincent, O., R. Townley, et al. (2001). "Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism." *Genes Dev* 15(9): 1104-1114.
- Weirich, J., P. Goffrini, et al. (1997). "Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*." *Eur J Biochem* 249(1): 248-257.
- Wesolowski-Louvel, M. and H. Fukuhara (1995). "A map of the *Kluyveromyces lactis* genome." *Yeast* 11(3): 211-218.
- Wesolowski-Louvel, M., P. Goffrini, et al. (1992). "Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene." *Mol Gen Genet* 233(1-2): 89-96.
- Wiatrowski, H. A., B. J. Van Denderen, et al. (2004). "Mutations in the gal83 glycogen-binding domain activate the snf1/gal83 kinase pathway by a glycogen-independent mechanism." *Mol Cell Biol* 24(1): 352-361.
- Wilson, W. A., S. A. Hawley, et al. (1996). "Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio." *Curr Biol* 6(11): 1426-1434.
- Wojda, I., J. P. Bebelman, et al. (2007). "Thermosensitivity of the *Saccharomyces cerevisiae* gpp1gpp2 double deletion strain can be reduced by overexpression of genes involved in cell wall maintenance." *Arch Microbiol* 188(2): 175-184.
- Wolfe, K. H. and D. C. Shields (1997). "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome." *Nature* 387(6634): 708-713.
- Woods, A., D. Vertommen, et al. (2003). "Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 278(31): 28434-28442.
- Zamenhof, S., G. Leidy, et al. (1957). "Differential stabilities of individual heredity determinants in transforming principle." *J Bacteriol* 74(2): 194-199.
- Zaror, I., F. Marcus, et al. (1993). "Fructose-1,6-bisphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*." *Eur J Biochem* 212(1): 193-199.
- Zeeman, A. M., M. A. Luttik, et al. (1998). "Inactivation of the *Kluyveromyces lactis* KIPDA1 gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcoholic fermentation." *Microbiology* 144 (Pt 12): 3437-3446.
- Zhang, J., L. Olsson, et al. (2010). "The beta-subunits of the Snf1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, Gal83 and Sip2, but not Sip1, are redundant in glucose derepression and regulation of sterol biosynthesis." *Mol Microbiol* 77(2): 371-383.