

No consta

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Don Jose Enrique Pérez Pérez, Profesor Titular del Departament de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

CERTIFICA que Don Juan Carlos Igual García ha realizado bajo su dirección en este laboratorio el trabajo con el título de "Identificación del gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio de su regulación

**IDENTIFICACION DEL GEN DE LA 3-OXOACIL-CoA TIOLASA  
PEROXISOMAL DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. ESTUDIO  
DE SU REGULACION.**

José E. Pérez  
Pdo. José Enrique Pérez

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES
Nº Registre 23824
DATA 7-X-05
SIGNATURA
TD-Q 616
Nº LIBIS: c. 190866/1

b. 16832857.

30 aut.

Trabajo presentado por  
**JUAN CARLOS IGUAL GARCIA**  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas.



UMI Number: U607195

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607195

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

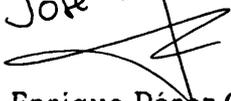


Don José Enrique Pérez Ortín, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor Titular del Departament de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València.

CERTIFICA: que Don Juan Carlos Igual García ha realizado bajo su dirección en este laboratorio el trabajo con el título de "Identificación del gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio de su regulación".

Valencia, 30 de Mayo de 1991

José E. Pérez



Fdo: José Enrique Pérez Ortín

a Mari Carmen

Quisiera expresar mi agradecimiento a todos aquellos que de una forma u otra han colaborado en la realización de esta tesis.

En primer lugar a José Enrique, por su dedicación, ayuda y consejo en todo momento.

A Luis Franco, por su apoyo y su confianza.

A Carmen, por aparecer en el momento oportuno.

A Ximo Dopazo, sin cuya colaboración a esta Tesis le faltaría un apartado.

A Marce, que evitó que viniera más sábados a trabajar.

A Emilia, que me convenció para que me embarcara en este trabajo.

A Cristina, profesional en la extracción de plásmidos.

A Carlos, Ismael, Pino, Quique y Ramón por hacer del Departamento y especialmente del Despacho de Becarios un lugar divertido (y de trabajo, por supuesto).

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica i Biología Molecular que han compartido mis alegrías y mis muchas tristezas, especialmente a la gente de mi Laboratorio, Paco, Merxe, Marce, Emilia, Carmen y José Enrique.

Como no, a Juanjo y Paco por compartir conmigo "fantásticas" comidas.

Y especialmente a Mari Carmen, por todo.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una beca del Programa de Fomento de la Investigación de la Consellería de Cultura, Educación y Ciencia de la Generalitat de Valencia y una de Formación de Personal Investigador de Ministerio de Educación y Ciencia.

## **ABREVIATURAS**

- Bisacrilamida:	N, N' metilen-bis-acrilamida.
- BSA:	Seroalbúmina bovina.
- CoA	Coenzima A.
- d:	dalton
- DNasa I:	Desoxirribonucleasa I.
- D.O.:	Densidad óptica.
- DTT:	Ditiotreitol.
- EDTA:	Etilén diamino tetraacético, sal sódica.
- IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.
- kb:	Kilo pares de bases.
- MNasa:	Nucleasa de micrococo.
- mRNA:	RNA mensajero.
- ORF:	Pauta abierta de lectura.
- pb:	Pares de bases.
- p/v:	Peso/volumen.
- PVP:	Polivinilpirrolidona.
- RNA:	Acido ribonucleico.
- RNasa:	Ribonucleasa.
- SDS:	Dodecil sulfato sódico.
- TCA:	Acido tricloroacético.
- TEMED:	N, N, N',N'-tetrametil etilén diamino.
- Tris:	Tris(hidroximetil)amino metano.
- v/v:	Volumen/volumen.
- X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## INDICE

### I. INTRODUCCION

1. La cromatina .....	2
1.1. Consideraciones generales .....	2
1.2. Sensibilidad a nucleasas de la cromatina .....	3
1.3. Estructura de la cromatina en genes de levadura. Mecanismos moleculares de la regulación trans- cripcional .....	5
1.4. Estructura de la cromatina del gen <i>SUC2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
2. El peroxisoma.....	10
2.1. Aspectos generales.....	10
2.2. El sistema de la $\beta$ -oxidación peroxisomal .....	12
2.3. La levadura en el estudio de los peroxisomas.....	15
3. La familia de las tiolasas .....	16
4. Objetivos .....	20

### II. MATERIALES Y METODOS

1. Materiales .....	22
1.1. Productos de especial interés .....	22
1.2. Medios de cultivo .....	23
1.3. Cepas y plásmidos .....	25
2. Preparación del material biológico .....	27
2.1. Construcción de plásmidos .....	27
2.1.1. Rellenado de extremos por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I .....	27
2.1.2. Reacción de ligamiento .....	27
2.2. Transformación de <i>E. coli</i> .....	28
2.3. Aislamiento de plásmidos .....	29
2.4. Transformación de levaduras .....	30
2.5. Obtención de protoplastos de levadura .....	31
2.6. Extracción de DNA genómico .....	31
2.7. Digestiones con nucleasas y extracción del DNA de las muestras .....	32
2.8. Extracción de RNA total de levadura .....	32
2.9. Extracción de proteínas .....	33
3. Técnicas analíticas .....	33
3.1. Valoración de proteínas .....	33
3.2. Ensayos de actividad tiolasa .....	34
3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	34
3.4. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes .....	35
3.5. Electroforesis en poliacrilamida .....	35

3.6. Geles de secuenciación .....	36
3.7. Densitometrado y cálculo de tamaño de los fragmentos .....	36
4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos .....	37
4.1. Digestión con endonucleasas de restricción .....	37
4.2. Obtención de series de deleciones solapadas .....	38
4.3. Aislamiento de DNA a partir de geles .....	38
4.4. Marcaje radiactivo de DNA .....	39
4.5. Transferencia de DNA y de RNA a filtros .....	39
4.6. Hibridación de DNA y de RNA sobre filtros con sondas radiactivas .....	40
4.7. Reacciones de secuenciación .....	41
4.8. Autorradiografía de los filtros hibridados .....	42
5. Métodos informáticos .....	42
5.1. Análisis de secuencias .....	42
5.2. Comparación y alineamientos de secuencias .....	43
5.3. Construcción de árboles filogenéticos .....	44
5.4. Fiabilidad de los árboles construidos .....	44
5.5. Test F-ratio de las desigualdades en las velocidades evolutivas .....	45

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Identificación del gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	47
1.1. ¿Hay un gen regulado por glucosa en el flanco 3' próximo al gen <i>SUC2</i> ? .....	47
1.2. Estructura primaria y disrupción del gen <i>POT1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
1.3. Estructura primaria de la ORF de 705 pb .....	61
2. Análisis filogenético de la familia de las tiolasas .....	69
2.1. Comparación de la secuencia de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de <i>S. cerevisiae</i> con otras tiolasas .....	69
2.2. Árboles filogenéticos de las secuencias de DNA y proteínas .....	77
3. Regulación del gen <i>POT1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	86
3.1. Represión por glucosa e inducción por ácido oleico del gen <i>POT1</i> .....	86
3.2. El gen <i>POT1</i> se activa específicamente en la fase estacionaria de crecimiento .....	91
3.3. En la represión por glucosa del gen <i>POT1</i> intervienen los productos de los genes <i>SNIF1</i> y <i>SSN6</i> .....	99

4. Estructura de la cromatina del gen <i>POT1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	103
4.1. Consideraciones generales sobre la metodología .....	103
4.2. Localización de zonas hipersensibles a la DNasaI en el gen <i>POT1</i> .....	106
4.3. Posicionamiento de nucleosomas en el gen <i>POT1</i> y sus flancos .....	112
I.V. CONCLUSIONES .....	124
V. BIBLIOGRAFIA .....	127

# **Introducción**

## **1. LA CROMATINA.**

### **1.1. Consideraciones generales.**

Los estudios sobre la cromatina se centraron fundamentalmente al principio en el aspecto estructural de la misma. Hoy en día se dispone de una buena aproximación de los diferentes niveles de estructuración que presenta el DNA en organismos eucarióticos. En estos organismos el DNA se encuentra confinado en el núcleo celular gracias a su empaquetamiento en una compleja estructura, denominada cromatina, de la que también forman parte proteínas (fundamentalmente histonas) y probablemente RNA (Igo-Kemenes *et al.*, 1982). La cromatina permite una enorme reducción de la longitud del DNA debido al alto grado de compactación que se consigue a través de los sucesivos niveles de organización, desde los nucleosomas, pasando por nucleofilamentos, hasta las estructuras de orden superior (Kornberg, 1974, 1977; Finch y Klug, 1976; McGhee *et al.*, 1983; Paulson y Laemmli, 1977).

Sin embargo, no hay que olvidar que la cromatina constituye en último término un complejo supramolecular dinámico, ya que es necesario que el DNA sea accesible a la maquinaria de replicación al menos una vez durante el ciclo celular y que varios genes activen y/o repriman su transcripción varias veces. Además, procesos como la reparación del DNA, recombinación y separación mitótica también reflejan el comportamiento dinámico de los componentes de la cromatina. Toda esta dinámica de la cromatina es un hecho plenamente demostrado que ha llevado a distinguir entre cromatina activa (o potencialmente activa) y cromatina inactiva en función de una serie de características distintivas que se refieren fundamentalmente a su estructura pero que también parecen afectar a su composición (Reeves, 1984).

De todos los aspectos, la comprensión de los mecanismos que gobiernan la regulación de la expresión génica en organismos eucarióticos se ha convertido en uno de los grandes objetivos actuales de la investigación en Biología Molecular. El desarrollo de las técnicas de DNA recombinante ha contribuido enormemente a la ampliación de nuestros

codificación de la información genética sino también en la regulación de su expresión de acuerdo con las necesidades fisiológicas a lo largo de la vida de las células. Dichos elementos constituyen el "promotor" de los genes, una región del DNA localizada normalmente delante de la región codificante que contiene las secuencias de reconocimiento necesarias para que la RNA polimerasa inicie correctamente la transcripción del mRNA así como las secuencias a las que se unen los factores activadores o represores responsables de la expresión regulada del gen. Es fácil imaginar la importancia que la estructura de la cromatina debe tener en regiones como ésta donde existe un continuo recambio de factores proteicos unidos al DNA. La unión de estas proteínas no solo depende de la estructura de la cromatina como determinante de la accesibilidad al DNA, sino que de manera recíproca influye en dicha estructura, poniendo de manifiesto la estrecha relación entre la estructura y la función de la cromatina.

## **1.2. Sensibilidad a nucleasas de la cromatina.**

La metodología mas utilizada en el estudio de la estructura de la cromatina activa ha sido su digestión con nucleasas. Entre los diferentes enzimas existentes, la DNasaI y la nucleasa de micrococo (MNasa) son las más utilizadas.

La primera de ellas se ha utilizado para obtener una idea de la accesibilidad global que presenta un dominio de cromatina. La sensibilidad a la nucleasa DNasaI varía a lo largo del genoma de una célula. Las regiones activas o potencialmente activas son mas sensibles a la digestión, siendo este efecto todavía mayor en el momento mismo de la transcripción (para una revisión Reeves, 1984). Además de esta propiedad, la DNasaI ha permitido identificar regiones del DNA cercanas a los genes activos especialmente susceptibles de degradación a las que se ha denominado sitios hipersensibles (Wu, 1980). Estas regiones se han encontrado en todos los genes de eucariotas estudiados, tanto de células animales como en vegetales y hongos (Eissenberg *et al.*, 1985). Se localizan preferentemente en la zona del promotor aunque también se han descrito en el flanco 3' de los genes e incluso en la región codificante.

Respecto a la organización molecular de los sitios hipersensibles, se piensa que se originan por la interacción de una o varias proteínas con regiones específicas de DNA (Wu, 1984; Emerson y Felsenfeld, 1984), excluyendo nucleosomas (McGhee *et al.*, 1981) y por tanto dejando tramos adyacentes de DNA accesibles a nucleasas. En algunos casos también se ha propuesto que puedan estar originados por estructuras anómalas del DNA (Fragelius *et al.*, 1987). Por su amplia distribución y por su asociación con zonas implicadas en la regulación génica se les ha otorgado un papel importante en el reconocimiento por la maquinaria transcripcional y por las proteínas reguladoras aunque es posible que intervengan en otros procesos relacionados con el funcionamiento general del material genético puesto que también se han encontrado en zonas no génicas como orígenes de replicación (Fragelius y Livingston, 1984) y centrómeros (Bloom y Carbon, 1982).

Por lo que respecta a la MNasa, su utilización ha permitido estudiar el posicionamiento de nucleosomas, entendiendo por posicionamiento la localización precisa con respecto a la secuencia de los nucleosomas sobre el DNA no repetitivo. El estudio de las posiciones de los nucleosomas se aborda mediante digestión de la cromatina con nucleasa de micrococo, que corta preferentemente en el DNA espaciador entre nucleosomas, y la utilización de la técnica del marcaje terminal indirecto, puesta a punto por Wu (1980) para la localización de sitios hipersensibles a la DNasa I y adaptada por Nedospasov y Georgiev (1980) para la localización de puntos de corte de la nucleasa de micrococo.

Respecto a las causas moleculares del posicionamiento de los nucleosomas se han planteado varias hipótesis (Simpson, 1986). En algunos casos se ha encontrado una localización de los nucleosomas dependiente de la secuencia de DNA (Drew y Calladine, 1981; Mengeritsky y Trifonov, 1983; Bloom y Carbon, 1982) mientras que en otros, y de forma no excluyente, resulta de la existencia de proteínas específicas que, de forma indirecta, obligan a los nucleosomas a situarse fuera de ciertas regiones del DNA por un mecanismo estocástico (Kornberg y Stryer, 1988). Más recientemente se ha postulado un tercer mecanismo dependiente de la formación de estructuras de orden superior en ciertas regiones de la cromatina y no excluyente con los dos anteriores (Thoma y Zatchej, 1988).

dependiente de la secuencia de DNA (Drew y Calladine, 1981; Mengeritsky y Trifonov, 1983; Bloom y Carbon, 1982) mientras que en otros, y de forma no excluyente, resulta de la existencia de proteínas específicas que, de forma indirecta, obligan a los nucleosomas a situarse fuera de ciertas regiones del DNA por un mecanismo estocástico (Kornberg y Stryer, 1988). Más recientemente se ha postulado un tercer mecanismo dependiente de la formación de estructuras de orden superior en ciertas regiones de la cromatina y no excluyente con los dos anteriores (Thoma y Zatchej, 1988).

### **1.3. Estructura de la cromatina en genes de levadura. Mecanismos moleculares de la regulación transcripcional.**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo idóneo para el estudio de los aspectos dinámicos de la cromatina (Gross *et al.*, 1985). Entre las ventajas que presenta destaca en primer lugar el gran desarrollo de su genética y de técnicas de DNA recombinante, lo que permite disponer fácilmente de cepas mutantes, sistemas de selección sencillos, clones de genes individuales y posibilidad de modificar el genoma voluntariamente. Además, hay que resaltar que su genoma es pequeño, lo que permite detectar fácilmente secuencias de una sola copia, y que es capaz de existir en forma haploide, lo que evita artefactos debidos a la existencia de dos alelos. La importancia de los estudios en levadura para la comprensión de los procesos dinámicos de la cromatina se realiza con la similitud existente entre los elementos característicos de los promotores y la regulación de la transcripción en la levadura y en los eucariotas superiores (Struhl, 1987).

Una característica particular de la cromatina de levadura es su alta tasa de transcripción que la convierte en el organismo ideal para estudiar este proceso. En condiciones normales de crecimiento hasta el 40% del DNA se transcribe (Hereford y Rosbash, 1977). Posee una estructura nucleosomal aunque el tamaño medio del nucleosoma es relativamente pequeño, entre 160 y 165 pb (Nelson *et al.*, 1977). Su estructura menos condensada que la de eucariotas

superiores se ha relacionado con su elevada tasa de transcripción y también con la carencia de histona H1 y por tanto de partículas tipo cromatosoma (Szent-Györgyi e Isenberg, 1983).

Las ventajas de *S.cerevisiae* como modelo de organismo eucariótico en el estudio de la cromatina se han visto reflejadas en la enorme cantidad de datos obtenidos por estudios de la cromatina en genes concretos que han permitido profundizar en la relación estructura/función de la misma (para una revisión Pérez-Ortín *et al.*, 1989; Struhl, 1989).

En la mayoría de los genes de levadura existen sitios hipersensibles que aunque se detectan tanto en estado activo y reprimido presentan características diferentes. Así, los sitios hipersensibles en los promotores de los genes sufren un ensanchamiento con la inducción del gen (Almer *et al.*, 1986; Pérez-Ortín *et al.*, 1986). La existencia constitutiva de dichos sitios podría interpretarse como la necesidad de dejar unas secuencias de DNA abiertas para su interacción con proteínas reguladoras (Struhl, 1987).

En cuanto al posicionamiento nucleosomal, se ha encontrado tanto en regiones codificantes como en sus flancos. En las primeras ocurre en genes que se transcriben a un bajo nivel, aunque un posicionamiento parcial se observa en genes más activos. La observación más importante respecto al posicionamiento de nucleosomas es el cambio que sufre en las regiones del promotor con la activación de los genes y que se interpreta como la eliminación de nucleosomas existentes en condiciones de represión (Almer *et al.*, 1986; Szent-Györgyi *et al.*, 1987; Pérez-Ortín *et al.*, 1987; Lohr, 1984). Los trabajos del grupo de Grunstein (Han *et al.*, 1988) con mutantes en histona H4 refuerzan la idea de que los elementos del promotor responsables del inicio de la transcripción son activados directamente por la pérdida de nucleosomas.

En *S.cerevisiae* se han caracterizado en los últimos años una gran cantidad de factores proteicos que mediante su interacción con secuencias diana en el DNA del promotor originarían en último

término la activación o represión del gen (Verdier, 1990). Los promotores de levadura contienen tres elementos característicos (Struhl, 1987; Guarente, 1988). Por un lado, las secuencias denominadas UAS son regiones de 10-30 pb situadas relativamente lejos del sitio de inicio de la transcripción, responsables de la activación del gen en función de las condiciones fisiológicas. Además, la mayoría de los genes necesitan de una caja TATA para el inicio de la transcripción. En tercer lugar existe un elemento iniciador que determina el punto concreto donde empieza la transcripción. Adicionalmente algunos genes particulares disponen de un cuarto elemento (el operador) similar a la UAS pero responsable en este caso de reprimir el inicio de la transcripción.

La unión de factores a estas secuencias sería condición necesaria pero no suficiente para la regulación del gen (Keegan *et al.*, 1986). La unión al DNA y la activación de la transcripción son dos funciones distintas que están localizadas en diferentes partes de la proteína (Hope y Struhl, 1985). Se han descrito diferentes mecanismos mediante los cuales las células regulan la actividad de factores de transcripción específicos. Así, la actividad de una proteína de unión a DNA se modifica mediante la unión de pequeñas moléculas, como en el caso de HAP1 (Pfeifer *et al.*, 1987), o por la interacción con otras proteínas, como ocurre con GAL4 (Johnston, 1987; Chasman y Kornberg, 1990) o por modificación covalente del factor transcripcional como en el caso de ADR1 (Cherry *et al.*, 1990) e incluso controlando la cantidad de la proteína como con GCN4 (Thireos *et al.*, 1984; Hinnebusch, 1984).

Todos los estudios realizados han permitido elaborar un modelo molecular del proceso de regulación transcripcional en genes de levadura en el que el DNA actuaría de andamiaje para la formación del complejo transcripcional activo mediante su interacción con diferentes factores proteicos y entre estos entre sí. Se cree que este proceso consistiría en la unión de proteínas específicas a la UAS originando la exclusión de nucleosomas y la aparición de un sitio hipersensible a la DNasaI en dicha región. El efecto posicionador de esta zona coloca nucleosomas a ambos lados impidiendo que la RNA polimerasa inicie la transcripción. Proteínas

activadoras podrían reconocer entonces las secuencias accesibles en el sitio hipersensible originando un cambio conformacional en el DNA que eliminaría los nucleosomas vecinos. Esta eliminación de nucleosomas sería la causa del ensanchamiento de la región sensible a la nucleasa. Al saltar los nucleosomas del promotor, la caja TATA quedaría expuesta y podría ser reconocida por otros factores específicos, como el TFIID (Buratowski *et al.*, 1988; Cavallini *et al.*, 1988). Finalmente, la interacción entre la(s) proteína(s) activadora(s) y la unida a la TATA estabilizaría el promotor como un dominio carente de nucleosomas. Este conjunto de factores junto con el DNA del promotor constituye el complejo de transcripción que podría interactuar con la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

#### **1.4. Estructura de la cromatina del gen *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae*.**

El gen *SUC2* pertenece a la familia de genes *SUC* que codifican la  $\beta$ -fructofuranosidasa o invertasa, enzima cuya actividad hidrolítica sobre la sacarosa permite a la levadura utilizar dicho disacárido como fuente de carbono. Existen en *S.cerevisiae* dos formas de invertasa, una mayoritaria y extracelular cuya producción esta reprimida por la presencia de glucosa y otra minoritaria de producción constitutiva en el interior de la célula (Gascón y Lampen, 1968).

El gen *SUC2* posee dos sitios alternativos de inicio de la transcripción que da lugar a dos mRNAs de 1.8 (invertasa intracelular) y 1.9 (invertasa de secreción) kb (Carlson y Botstein, 1982). Se han identificado los elementos constituyentes del promotor imprescindibles para la síntesis regulada de la invertasa de secreción, una caja TATA entre -124 y -133 y una región reguladora responsable de la desrepresión del gen en ausencia de glucosa entre las posiciones -418 y -500 (Sarokin y Carlson, 1984).

La estructura de la cromatina del gen *SUC2* y sus flancos se ha determinado mediante digestiones con DNasaI y MNasa (Pérez-Ortín

*et al.*, 1986, 1987; Matallana *et al.*, 1991). Se han encontrado varios sitios hipersensibles a la DNasaI localizados en la región reguladora y flanqueando la caja TATA. Además, en el flanco 3' se observan otros dos sitios, uno justo al final de la zona transcribible y otro aproximadamente 2.5 kb mas lejano. Respecto a la localización de los nucleosomas se ha encontrado un diferente grado de posicionamiento en las diferentes zonas del gen, muy estricto en 3' entre los dos sitios hipersensibles comentados y en el promotor y mas laxo en la región codificante.

La estructura descrita sufre cambios con la variación en la actividad del gen. Con la desrepresión la región codificante adopta una conformación más abierta que se traduce en una mayor sensibilidad a la DNasaI (Pérez-Ortín *et al.*, 1986) y en una deslocalización de nucleosomas (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). En el promotor se observa una redistribución de la hipersensibilidad a la DNasaI y una pérdida de nucleosomas adyacentes (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). Junto a estos cambios, también se observan variaciones importantes en la zona central del tramo largo de nucleosomas posicionados en el flanco 3'. La Figura 1 muestra un modelo de la organización cromatínica del gen *SUC2* y de los cambios dependientes del estado transcripcional.

Como en el caso del *SUC2*, en otro gen de levadura, el *HSP82*, también se observan cambios en la estructura de la cromatina en el flanco 3' del gen dependiendo de su estado de activación (Szent-Györgyi *et al.*, 1987). Una respuesta tan similar en dos elementos distintos a mecanismos independientes de activación como son la eliminación de la glucosa y un choque térmico puede hacer pensar que esas regiones pudieran desempeñar un papel general relacionado con la activación génica. Sin embargo, esta idea ha sido descartada por estudio con mutantes de deleciones de los flancos del gen *SUC2* (Matallana, 1989). Por un lado, la eliminación del flanco 3' no afectaba a la transcripción del gen *SUC2*, y por otro la inactivación del gen *SUC2* no tenía ningún efecto sobre los cambios observados en el flanco 3'.

## **2. EL PEROXISOMA**

### **2.1. Aspectos generales.**

Las células eucariotas tienen una compleja compartimentalización bioquímica en diferentes orgánulos subcelulares. Los peroxisomas son uno de ellos. Se trata de orgánulos de simple membrana, con un diámetro de aproximadamente 0.2-1.0  $\mu\text{m}$ , presentes en casi todas las células eucariotas e involucrados en el metabolismo del peróxido de hidrógeno, conteniendo en casi todos los casos flavin oxidasas que lo producen y catalasa que lo degrada. Una propiedad característica de este orgánulo es que es inducible, tanto en rata (Reddy *et al.*, 1982) como en levadura (Veenhuis y Harder, 1987).

En un principio, al contrario que lo sucedido con las mitocondrias, cloroplastos y el retículo endoplásmico, despertaron poco interés. Se creía que estaban implicados en papeles secundarios del metabolismo. Sin embargo, hoy se sabe que participan en diferentes rutas metabólicas esenciales, tanto anabólicas como catabólicas (Lazarow y Fujiki, 1985; Tolbert 1981), presentando una gran variabilidad de composición y función según el tipo y estado metabólico de la célula. Así, enzimas peroxisomales están involucrados en la síntesis de glicerolípidos como plasmalógenos, ácidos biliares y quizás colesterol, en el ciclo del glioxilato, fotorrespiración, transaminaciones y procesos catabólicos como la oxidación de aminas, alcoholes y ácidos grasos. Esta última actividad, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, parece una propiedad común de todos los peroxisomas pues se ha encontrado en todas las diferentes fuentes estudiadas, como células animales (Osumi y Hashimoto, 1984), semillas (Cooper y Beevers, 1969) y plantas superiores (Gerhardt 1986) y microorganismos eucarióticos (Kunau *et al.*, 1988).

Antiguamente se pensaba que los peroxisomas se formaban por gemación a partir del retículo endoplásmico, pero hoy en día

esa idea se ha descartado. El retículo endoplásmico interviene en la síntesis de los fosfolípidos de la membrana, pero no en la síntesis de las proteínas peroxisomales. Estas son codificadas por genes nucleares y se sintetizan en polisomas libres incorporándose al peroxisoma después de la traducción. El orgánulo aumentaría de tamaño y los nuevos peroxisomas se formarían por división de los ya existentes (para revisión Lazarow y Fujiki, 1985; Borst 1989). Al menos de forma transitoria las membranas de los peroxisomas pueden estar asociadas formando el denominado "retículo peroxisomal", del cual se podrían formar ocasionalmente nuevos peroxisomas por gemación.

La biogénesis del peroxisoma es por tanto muy similar a las de la mitocondria y cloroplasto. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las proteínas de estos orgánulos (y también con las del retículo endoplásmico), la mayoría de proteínas peroxisomales son sintetizadas con el mismo tamaño que tendrán en su forma madura. Hasta ahora, sólo en los casos de la malato deshidrogenasa de pepino, la catalasa de calabaza, la carnitina acetiltransferasa de *Cándida* y la 3-oxoacil-CoA tiolasa de rata (Lazarow y Fujiki, 1985) se ha demostrado la existencia de un precursor que es convertido en su forma madura por proteólisis de una presecuencia en el extremo amino. Por tanto se asume que las proteínas peroxisomales contienen en su secuencia la señal topológica responsable de su localización celular. De hecho, en las proteínas sintetizadas como precursores no está claro que el procesamiento vaya acoplado al transporte al peroxisoma (Miura *et al.*, 1984).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han permitido identificar una señal responsable de la localización peroxisomal de algunas proteínas. El tripéptido SKL (o análogos a él) en el extremo carboxilo es suficiente para dirigir proteínas al peroxisoma (Gould *et al.*, 1988a;1989), aunque se requiere que esté expuesto para poder interactuar con el receptor. La influencia de la estructura terciaria de la proteína explicaría porque la localización interna de dicha secuencia no es una señal topogénica en la mayoría de los casos y si parece serlo en la catalasa (Gould *et al.*, 1988b). Este mecanismo de transporte parece universal pues dirige proteínas a peroxisomas en

animales, plantas y levaduras (Gould *et al.*, 1990). Sin embargo, no todas las proteínas peroxisomales contienen esa señal topogénica. En la acil-CoA oxidasa de *C.tropicalis* se ha identificado dos regiones responsables de su localización y en ninguna de ellas existe un tripéptido análogo al SKL (Small *et al.*, 1988). Así, la secuencia SKL no parece ser la única señal funcional en el proceso de localización de proteínas en los peroxisomas (para revisión Osumi y Fujiki, 1990).

La translocación de proteínas al peroxisoma requiere, al igual que el transporte a otros orgánulos, de la hidrólisis de ATP. Sin embargo, a diferencia de mitocondrias y procariotas no parece que sea necesario la existencia de un potencial de membrana (Imanaka *et al.*, 1987), al menos *in vitro*. De hecho se sigue debatiendo si la membrana del orgánulo es o no estanca permitiendo que exista un potencial de membrana en el peroxisoma.

Aunque ahora se tiene una idea más acertada acerca de la biogénesis del peroxisoma, los componentes moleculares esenciales para la misma, especialmente para el transporte de proteínas a través de su membrana, continúan siendo desconocidos.

El papel esencial que juegan los peroxisomas en las células se ha puesto recientemente de manifiesto con el descubrimiento de toda una serie de enfermedades humanas hereditarias originadas por alteraciones en proteínas necesarias para la formación y mantenimiento de la estructura y función del peroxisoma (Schutgens *et al.*, 1986; Wanders *et al.*, 1987; Wanders *et al.*, 1990). Entre ellas cabe citar la primera enfermedad descrita, el síndrome de Zellweger (Goldfisher *et al.*, 1973), cuyas consecuencias clínicas son muy graves y cuyo causa es un defecto en la maquinaria de importación de los diferentes enzimas al peroxisoma (Santos *et al.*, 1988a,b).

## **2.2. El sistema de la $\beta$ -oxidación peroxisomal.**

La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos es una de las rutas metabólicas que proporciona energía a la célula. Consiste en una serie de reacciones consecutivas de deshidrogenación, hidratación,

deshidrogenación nuevamente y ruptura tiolítica que degrada los ácidos grasos para obtener acetyl-CoA.

Los primeros datos que se obtuvieron acerca de la  $\beta$ -oxidación procedían de estudios en fracciones mitocondriales de animales superiores. Por extrapolación, se consideró que la  $\beta$ -oxidación era una ruta metabólica que tenía lugar en las mitocondrias. Sin embargo, el descubrimiento durante los años setenta de otros sistemas de  $\beta$ -oxidación no mitocondriales, como en glioxisomas de semillas de pepino (Cooper y Beevers, 1969), en peroxisomas de hígado de rata (Lazarow y deDuve 1976; Lazarow, 1978) y peroxisomas de levadura (Kawamoto *et al.* 1978), hizo cambiar las ideas. Así, hoy se piensa que la  $\beta$ -oxidación mitocondrial está reducida al reino animal, mientras que es un constituyente común de los peroxisomas de animales, plantas y microorganismos eucarióticos como se ha comentado anteriormente.

Aunque realizan la misma ruta metabólica, los sistemas de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal y mitocondrial son claramente distintos. Los enzimas involucrados así como su regulación y especificidad son diferentes (para una revisión Hashimoto, 1987). Solamente el paso previo, la activación del ácido graso a acil-CoA, es catalizado por una acil-CoA sintetasa en la membrana del peroxisoma que es idéntica a la presente en microsomas y mitocondrias (Tanaka *et al.*, 1979).

La primera reacción de la  $\beta$ -oxidación, la deshidrogenación de acil-CoA a enoil-CoA, es catalizada en peroxisomas por una acil-CoA oxidasa (Osumi *et al.*, 1980; Shimizu *et al.*, 1979; Gerhardt, 1983) mientras que en mitocondrias lo es por una acil-CoA deshidrogenasa. En los peroxisomas de hongos filamentosos esta reacción también es catalizada por una deshidrogenasa en lugar de una oxidasa (Kionka y Kunau, 1985). Esta primera reacción es el paso limitante de la  $\beta$ -oxidación y probablemente la que determina en función de la afinidad del enzima por los diferentes ácidos grasos la especificidad del sistema peroxisomal por ácidos grasos de cadena media y larga.

La segunda reacción (hidratación de enoil-CoA) y la tercera (deshidrogenación del 3-hidroxiacil-CoA) son catalizadas en mitocondrias por dos enzimas independientes mientras que en peroxisomas se ha encontrado un único polipéptido bifuncional en animales (Osumi y Hashimoto, 1979; Reddy *et al.*, 1987) y trifuncional (con actividad adicional epimerasa) en hongos y plantas (Kunau *et al.*, 1988; Berhends *et al.*, 1988).

Finalmente, la 3-oxoacil-CoA tiolasa que cataliza la cuarta reacción de la  $\beta$ -oxidación, la escisión del 3-oxoacil-CoA en acetil-CoA y un acil-CoA con dos átomos de carbono menos, también es molecular y catalíticamente diferente al enzima mitocondrial en todos los organismos estudiados (Miyazawa *et al.*, 1981; Frevert y Kindl, 1980; Kurihara *et al.*, 1989). Otra característica diferencial es que el sistema de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal es un sistema inducible a diferencia del mitocondrial que es constitutivo. La actividad del sistema peroxisomal en hígado de rata aumenta considerablemente con la administración de drogas hipolipídemicas (Lazarow, 1978;). Estas drogas inducen específicamente los enzimas involucrados en la  $\beta$ -oxidación, pues otros enzimas de la matriz peroxisomal solo aumentan ligeramente o no varían o incluso disminuyen (Osumi y Hashimoto, 1984). Además, estos compuestos originan también una proliferación de peroxisomas en la célula (Reddy *et al.*, 1982). Se ha demostrado que la activación de los enzimas de la  $\beta$ -oxidación por estas drogas ocurre a nivel de transcripción del gen (Reddy *et al.*, 1986). Este comportamiento no es exclusivo de los peroxisomas de hígado de rata. En plantas se produce una inducción en las células de la semilla con la puesta en marcha de la germinación y en el caso de los hongos también se puede conseguir un incremento brusco de las actividades de la  $\beta$ -oxidación y una proliferación del orgánulo.

El sistema de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal no se limita a la oxidación de ácidos grasos saturados sino que también es capaz de degradar ácidos grasos mono y poliinsaturados (de hecho tiene una muy alta afinidad por los sustratos poliinsaturados de cadena larga (Hovik y Osmundsen, 1987)). Los enzimas necesarios para ello (2,4-

dienoil-CoA reductasa y 3-cis-2-trans-enoil-CoA isomerasa) se han encontrado hasta el momento en todas las fuentes en que se han buscado (Schulz y Kunau 1987).

### 2.3. La levadura en el estudio de los peroxisomas.

La levadura es un sistema modelo ideal para el estudio del ensamblaje, estructura y función del peroxisoma, tanto por la accesibilidad a la tecnología del DNA recombinante como por el hecho de que el desarrollo y funciones metabólicas de los peroxisomas está fuertemente determinada por las condiciones de cultivo. Así, se sabe que varias especies de levadura son capaces de crecer en medios con fuentes de carbono y nitrógeno inusuales, como pueden ser alcanos y ácidos grasos de cadena larga, metanol, etanol, aminas alquiladas, ácido úrico, D-aminoácidos y aminas (para una revisión Veenhuis y Harder, 1987b). Estos compuestos inducen la proliferación de peroxisomas. Dichos peroxisomas comparten una característica común: contienen una o más actividades enzimáticas necesarias para el metabolismo de la sustancia empleada, por lo que juegan un papel indispensable durante el crecimiento.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que *S.cerevisiae* era una excepción a este comportamiento general. La presencia de peroxisomas en este organismo fue descrita por Avers y Federman (1968), pero a diferencia de otras especies no se han caracterizado con detalle, creyéndose que eran muy escasos, pequeños y muy frágiles (Parish, 1975). Sin embargo, recientemente se ha conseguido la inducción de peroxisomas con la adición de ácidos grasos al medio de cultivo (Veenhuis *et al.*, 1987a). Además, estos ácidos grasos inducen diversas actividades enzimáticas peroxisomales, entre ellas las de la  $\beta$ -oxidación (Veenhuis *et al.* 1987a; Skoneczny *et al.*, 1988), de la misma manera que lo hacían en otras levaduras como *Candida* (Tanaka *et al.*, 1982) y *Neurospora crassa* (Kionka y Kunau, 1985), y en procariotas (Nunn, 1986). Parece pues, como si la respuesta celular al ácido graso

(proliferación de peroxisomas e inducción de la  $\beta$ -oxidación) estuviera extendida entre todas las levaduras y no fuera una respuesta restringida a las especies *Candida* especializadas en degradar alcanos, como en un principio se creía.

La inducción de peroxisomas en *S.cerevisiae* abre las puertas al estudio de la biogénesis del peroxisoma, pues *S.cerevisiae* es el organismo eucariota mejor caracterizado tanto bioquímicamente como genéticamente y el sistema eucariota más desarrollado para la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Además, recientemente se han caracterizado mutantes deficientes en peroxisomas que contienen los enzimas de la matriz peroxisomal en el citoplasma (Erdman *et al.*, 1989, 1991), al igual que ocurre en el síndrome de Zellweger. Estas propiedades sugieren defectos en la biogénesis del peroxisoma, por lo que estos mutantes pueden ayudar a elucidar los elementos esenciales en la biogénesis del orgánulo y, por tanto ser útiles en el estudio de las enfermedades humanas asociadas con los peroxisomas. También recientemente se han puesto a punto sistemas *in vitro* que permitirán el estudio de los mecanismos del transporte al peroxisoma (Thieringer *et al.*, 1991).

### 3. LA FAMILIA DE LAS TIOLASAS.

Existen dos tipos diferentes de tiolasas según su actividad enzimática: 3-oxoacil-CoA tiolasas (EC 2.3.1.16.) que actúa sobre diferentes sustratos de diferentes longitudes de cadena, y las acetoacetyl-CoA tiolasas (EC 2.3.1.9.) que son específicas solamente para acetoacetyl-CoA. Se han caracterizado diversos isoenzimas de ambos tipos que intervienen en diferentes funciones metabólicas y difieren unos de otros no solo en su localización intracelular sino también en sus propiedades moleculares y catalíticas.

Las células procarióticas poseen un enzima de cada clase. La 3-oxoacil-CoA tiolasa es un componente del complejo multienzimático de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Este complejo está compuesto en *E.coli* y otros procariotas por un tetrámero de

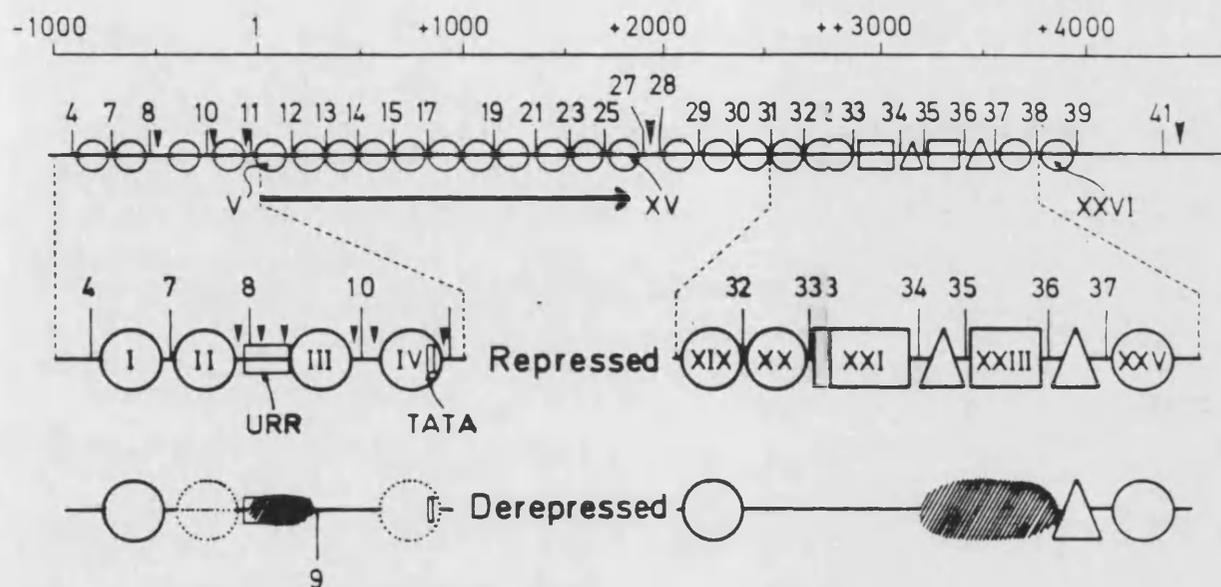
dos subunidades iguales, una  $\alpha$  constituida por una cadena polipeptídica multifuncional y una  $\beta$  que corresponde a la tiolasa (Pramanik *et al.*, 1979; Pawar y Schulz, 1981; Yang *et al.*, 1988; Imamura *et al.*, 1990). Por otro lado, los organismos procariotas también poseen una acetoacetyl-CoA tiolasa que en forma de tetrámero interviene en el metabolismo del acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato (Dumcombe y Frerman, 1976; Tomita *et al.*, 1983)

Las células eucarióticas poseen, como cabe esperar de su complejidad, un mayor número de isoenzimas de ambos tipos de tiolasa. Por lo que respecta a las oxoacetyl-CoA tiolasa se han descrito dos enzimas diferentes, uno peroxisomal (Frervert y Kindl, 1980; Miyazawa *et al.*, 1981; Kurihara *et al.*, 1989) y otro mitocondrial (Middleton, 1973) que intervienen en los respectivos sistemas de  $\beta$ -oxidación. Como ya se ha comentado anteriormente, ambos enzimas tienen diferentes características, no solo estructurales (la tiolasa peroxisomal es un dímero mientras que el mitocondrial es un tetrámero) sino que también presentan especificidades diferentes hacia los diversos sustratos (Miyazawa *et al.*, 1981). Así, el isoenzima peroxisomal es mucho menos reactivo frente a acetoacetyl-CoA que el correspondiente isoenzima mitocondrial. Como se ha dicho anteriormente, a diferencia de la mayoría de proteínas peroxisomales la tiolasa se traduce en forma de precursor con una extensión amino-terminal que es luego procesada para originar el péptido maduro (Fujiki *et al.*, 1985; Miura *et al.*, 1984). Todo lo contrario ocurre con el enzima mitocondrial, que a diferencia de la mayoría de proteínas mitocondriales no posee presecuencia y la señal de su localización se encuentra en los primeros dieciseis aminoácidos de la proteína madura (Arakawa *et al.*, 1990).

Por lo que se refiere a las acetoacetyl-CoA tiolasa, las células eucarióticas también contienen una variedad de isoenzimas. Una acetoacetyl-CoA tiolasa citosólica juega un papel esencial en la biosíntesis de esteroides mientras que un isoenzima mitocondrial está involucrado en el metabolismo de los cuerpos cetónicos (Kornblatt y Rudney, 1971; Clinkerbear *et al.*, 1973; Middleton, 1973). Ambos son tetrámeros y en el caso de enzima mitocondrial

se sintetiza en forma de precursor con un péptido señal de treinta aminoácidos. En el caso concreto de *Candida tropicalis* también se han encontrado dos acetoacetyl-CoA tiolasas, la citosólica y otra en el peroxisoma en lugar de en la mitocondria (Kurihara *et al.*, 1988 y 1989). Recientemente se ha sugerido que podría haber una tercera acetoacetyl-CoA tiolasa en el peroxisoma que intervendría en la síntesis de colesterol (Thompson y Krisans, 1990).

Todas las tiolasas eucarióticas están codificadas por el genoma nuclear. Varios de los genes que codifican tiolasas se han secuenciado. En concreto se conoce la secuencia de la 3-oxoacetyl-CoA tiolasa peroxisomal de rata (Hijikata *et al.*, 1987 y 1990) y humana (Bout *et al.*, 1988; Fairbairn y Tanner, 1989), la 3-oxoacetyl-CoA tiolasa mitocondrial de rata (Arakawa *et al.*, 1987), la 3-oxoacetyl-CoA tiolasa de *E.coli* (Yang *et al.*, 1990), la acetoacetyl-CoA mitocondrial de rata (Fukao *et al.*, 1989) y humana (Fukao *et al.*, 1990), la acetoacetyl-CoA tiolasa citosólica de *S.cerevisiae* (Dequin *et al.*, 1989) y las acetoacetyl-CoA tiolasas de *Zoogloea ramigera* (Peoples *et al.*, 1987) y *Alcaligenes eutrophus* (Peoples y Sinskey, 1989). El conocimiento de todas estas secuencias ha permitido establecer algunas relaciones evolutivas entre ellas, como la existencia de un ancestro común a todas ellas. Yang *et al.* (1990) ha propuesto un árbol filogenético en el que una duplicación génica inicial daría lugar a partir de dicho ancestro a las dos familias de enzimas, las oxoacetyl y las acetoacetyl.



**Figura 1.** Modelo de la organización cromatinica del gen *SUC2* y sus flancos.

Debajo de la escala (+1 indica el inicio de transcripción) se muestra el modelo propuesto para la organización del gen reprimido. Los números arábigos indican puntos de corte de la MNasa en DNAs espaciadores, las puntas de flecha representan sitios hipersensibles a la DNasaI y la línea gruesa horizontal indica el mRNA. La estructura del promotor y del flanco 3' en estado reprimido y desreprimido se muestran con más detalle. Los números romanos designan nucleosomas posicionados. Los círculos representan nucleosomas, estando a trazos cuando no se ha podido asegurar la presencia de los mismos. Los triángulos y los rectángulos representan nucleosomas alterados o factores no nucleosomales que conducen a la protección del ADN. Las áreas sombreadas indican regiones especialmente protegidas en el estado activo. (Tomado de Pérez-Ortín *et al.*, 1987).

#### 4. OBJETIVOS

En la primera fase del trabajo se pretende el esclarecimiento de las causas que originan los cambios en la estructura de la cromatina observados en el flanco 3' del gen *SUC2* de *S.cerevisiae* (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). Puesto que dicha región no parece estar relacionada con el gen *SUC2* (Matallana, 1989), la explicación más plausible es la existencia de un gen no identificado en dicha zona. Para comprobar esta hipótesis se llevará a cabo la secuenciación de una región de aproximadamente 3000 pb en el flanco 3' del gen *SUC2*.

En la segunda fase del trabajo se analizará el posible gen encontrado. Se identificará por comparación de secuencias y por las consecuencias fenotípicas de su interrupción. Se llevará a cabo, si es de interés, un estudio filogenético de la familia de proteínas a la que pertenezca. En segundo lugar se estudiarán los mecanismos de regulación del gen identificado. Finalmente, se realizará una aproximación a la estructura de cromatina en los diferentes estados de actividad caracterizados, con la ampliación de los resultados obtenidos en los estudios del gen *SUC2* y que son el origen de este trabajo.

## **Materiales y Métodos**

## 1. MATERIALES.

### 1.1. Productos de especial interés.

Acetoacetil-CoA	Sigma
Acido oleico	Sigma
Agarosa (Tipo I)	Sigma
Ampicilina	Boehringer
BSA Tipo V	Sigma
BSA (libre de nucleasas)	Boehringer
Cebador reverso 17-mer	Boehringer
Cloramfenicol	Boehringer
Coenzima A	Sigma
dATP ( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) (3000Ci/mmol)	Amersham
dATP ( $\alpha$ - <sup>35</sup> S) (1000Ci/mmol)	Amersham
DNA Ligasa del Fago T4 (1 u/ $\mu$ l)	Boehringer
DNA polimerasa I (5u/ $\mu$ l)	Amersham
DNasa I (DPFF 2300 u/mg)	Worthington
"double-stranded Nested Deletion Kit"	Pharmacia
Endonucleasas de restricción	Boehringer
Filtros de nylon (Hybond-N)	Amersham
IPTG	Boehringer
Klenow	Pharmacia
Lisozima	Boehringer
MNasa (15000 u/mg)	Boehringer
Proteinasa K	Boehringer
RNasa A	Boehringer
"T7Sequencing Kit"	Pharmacia
Trifosfatos de deoxiribonucleósidos	Boehringer
Tween 20	Merck
X-Gal	Boehringer
Zimoliasa 100T	Miles

## 11.2. Medios de cultivo.

### -- Medios de cultivo para *E.coli*.

LB: Medio de Luria-Bertani (Maniatis *et al.*, 1982)

Triptona 1% (p/v)

NaCl 1% (p/v)

Extracto de levadura 0.5% (p/v)

pH 7.5

Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar hasta el 1% (p/v).

Los antibióticos se añadieron a las siguientes concentraciones: ampicilina 50 µg/ml y cloramfenicol 170 µg/ml.

La temperatura de cultivo fue de 37 °C y se utilizó agitación orbital.

Las cepas se guardaron en cultivos en medio apropiado conteniendo glicerina al 15% (v/v) a -80 °C.

### -- Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

YP: Medio completo sin fuente de carbono adicional

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

YPG: Medio completo con glucosa (Sherman *et al.*, 1979)

Extracto de levadura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glucosa 2% (p/v)

**YPG-LGM: Medio completo con baja concentración de glucosa (a)**

(Carlson *et al.*, 1981)

**Extracto de levadura 1% (p/v)**

**Peptona 2% (p/v)**

**Glucosa 0.05% (p/v)**

**YPg: Medio completo con baja concentración de glucosa (b)**

**Extracto de levadura 1%**

**Peptona 2%**

**Glucosa 0.1%**

**YPGal: Medio completo con galactosa**

**Extracto de levadura 1%**

**Peptona 2%**

**Galactosa 2%**

**SD: Medio mínimo (Sherman *et al.*, 1979)**

**Yeast Nitrogen Base w/o aa 0.67% (p/v)**

**Glucosa 2% (p/v)**

A los medios anteriores se les adicionó en algunos casos ácido oleico 0.1% (v/v), Tween 20 0.5% (v/v) representándose como YP+O, YPG+O,...

Los medios sólidos se prepararon adicionando agar hasta el 1% (p/v) excepto en el caso de SD donde la concentración fue del 2% (p/v).

Los requerimientos para el cultivo de levaduras en medio mínimo se añadieron a una concentración de 80 µg/ml.

La temperatura de cultivo fue de 28°C y se utilizó agitación orbital.

Las cepas se guardaron en cultivos en el medio apropiado conteniendo glicerina al 50% (v/v) a -80 °C.

### 1.3. Cepas y plásmidos.

<u>Cepa</u>	<u>Características genotípicas</u>	<u>Procedencia</u>
<i>E.coli.</i>		
DH1	<i>recA<sup>-</sup> hsdR<sup>-</sup> F<sup>-</sup></i>	D. Ramón
DH5 $\alpha$	<i>recA<sup>-</sup> hsdR<sup>-</sup> <math>\Delta</math>lacU169</i>	D. Ramón
HB101	<i>recA<sup>-</sup> hsdS<sup>-</sup> lacY<sup>-</sup></i>	D. Ramón
XL1-Blue	<i>recA<sup>-</sup> hsdR<sup>-</sup> F' (<i>lacI<sup>-</sup> lacZ<sup>-</sup> Tn10(Tet<sup>r</sup>)</i>)</i>	Stratagene
<i>S.cerevisiae:</i>		
X2180-1A	<i>a SUC2 mal0</i>	R. Sentandreu
SEY2101	<i>a ura3-52 leu2-3,112 ade2-101 suc2-<math>\Delta</math>9 pot1-<math>\Delta</math>1</i>	S. Emr
MCY1389	<i>a ura3-52 leu2::HIS3 SUC2 POT1</i>	M. Carlson
MCY1484	<i><math>\alpha</math> lys2-801 ade2-101oc snf1-13 SUC2 POT1</i>	M. Carlson
MCY1371	<i>a his4-539am ade2-101oc ssn6-1 SUC2 POT1</i>	M. Carlson
H222	<i><math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math> leu2::HIS3 lys2-801 ura3-52 mig1-<math>\Delta</math>2::LEU2 SUC2 POT1</i>	H. Ronne
BQS2	SEY2101 transformada con pRB58 ( <i>URA3 SUC2 POT1</i> )	F. Estruch
BQS20	<i>a ura3-52 leu2::HIS3 SUC2 pot1::URA3</i>	Este trabajo

Plásmidos

pBR322	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	ColE1	D. Ramón
pUC18	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Pharmacia
pUC19	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Boehringer
YIp5	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> <i>URA3</i>	ColE1	S. Ferrer
pRB58	Ap <sup>r</sup> <i>URA3 SUC2</i> <i>POT1</i>	ColE1 2 $\mu$ m	R.Sentandreu
pSUC KE	Ap <sup>r</sup>	ColE1	E. Matallana
pUC URA3	Ap <sup>r</sup> <i>URA3</i>	ColE1	E. Matallana
pYA301	Ap <sup>r</sup> <i>ACT1</i>	ColE1	D. Gozalbo
p1300a	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Este trabajo
p1300b	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Este trabajo
p1600a	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Este trabajo
p1600b	Ap <sup>r</sup>	ColE1	Este trabajo
p1300URA	Ap <sup>r</sup> <i>URA3</i>	ColE1	Este trabajo
pSUC309b	Ap <sup>r</sup> <i>URA3</i>	ColE1	Este trabajo
pYIBE	Ap <sup>r</sup> <i>URA3</i>	ColE1	Este trabajo

## **2. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.**

### **2.1. Construcción de plásmidos.**

#### **2.1.1. Rellenado de extremos por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.**

La transformación de extremos cohesivos generados por corte con enzimas de restricción en extremos romos se llevó a cabo por relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I según se describe en Maniatis *et al.* (1982).

La reacción se realizó en un volumen total de 2,5  $\mu$ l en tampón NTB (Tris-HCl 50 mM pH 7.2,  $MgSO_4$  10 mM, DTT 0.1 mM, BSA (libre de nucleasas) 50  $\mu$ g/ml) utilizando como precursores trifosfatos de desoxirribonucleósidos a una concentración 80  $\mu$ M para cada uno de ellos y 1 unidad del enzima por  $\mu$ g de DNA.

Se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se inactivó el enzima calentando 10 min a 70 °C. Se añadió NaOAc hasta una concentración final 0.3 M y se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol a -20°C durante, al menos, 2 horas. El precipitado se recogió por centrifugación a 12000 x g (durante 15 minutos, se lavó con etanol 70% (v/v) y se secó a vacío.

#### **2.1.2. Reacción de ligamiento.**

Las mezclas de ligamiento se prepararon con cantidades de los DNAs a ligar dependientes de las características concretas de los mismos y en presencia de  $MgCl_2$  10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5. El volumen total de reacción fue, como máximo, de 20  $\mu$ l y se usó 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 para ligamiento de extremos cohesivos y 3 unidades para ligamiento de extremos romos. La reacción se llevó a cabo durante 2-4 horas a temperatura ambiente y se guardó a 4°C hasta el momento de su utilización.

## 2.2. Transformación de *E. coli*.

Se utilizó el método descrito por Hanahan (1983). Se inocularon 5 ml de un precultivo de la cepa seleccionada en medio LB realizado durante la noche anterior en 100 ml de LB fresco. Se cultivaron las células a 37°C hasta que la D.O. a 550 nm del medio de cultivo fue de aproximadamente 0.5. Se enfrió el matraz sobre hielo, se pasó el medio a tubos estériles y se centrifugó en frío a 2500 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron en 30 ml de tampón TfBI (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 15% (v/v) pH 5.8 ajustado con ácido acético 0.2 M). Se mantuvieron las células en dicho tampón a 4°C durante 30 minutos y se volvieron a recoger en las condiciones antes indicadas. Las células se resuspendieron en 4 ml de tampón TfBII (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15% (v/v) pH 7.0 ajustado con NaOH) y se separaron 20 alícuotas de 200 µl. Las células se congelaron a -80°C (en ese estado pueden conservarse durante meses sin que pierdan su estado de competencia).

En el momento de realizar una transformación, se descongeló una de esas alícuotas a 4°C y se mantuvo sobre hielo durante 10 min. Se añadió el DNA plasmídico (normalmente una mezcla de ligamiento) y se volvió a incubarlo en hielo durante 20 min. Se provocó entonces un choque térmico incubando a 42°C durante 90 s y pasando nuevamente a hielo durante 2 min. Se añadieron 0.8 ml de medio LB y se incubó 1 h a 37°C sin agitación.

A continuación se sembraron placas de LB sólido, suplementado con los antibióticos adecuados para la selección, con 200 µl del medio líquido mediante un asa de Digralsky. Las placas se incubaron a 37°C durante una noche y se analizaron algunas colonias transformantes para la verificación de la transformación. Paralelamente se llevaron a cabo controles de viabilidad y de reversión. Para conocer el número de viables se sembraron placas de LB sólido sin antibióticos y para conocer el número de revertientes se sembraron placas de LB sólido más antibióticos con células no transformadas. Ambos controles fueron habitualmente satisfactorios obteniéndose una viabilidad del orden de 10<sup>9</sup> células/ml y ausencia de revertientes.

### 2.3. Aislamiento de plásmidos.

Se utilizaron dos procedimientos alternativos, el primero para el aislamiento en pequeña escala con fines analíticos, y el segundo para el aislamiento de plásmidos en gran escala con fines preparativos.

Para el aislamiento rápido de plásmidos pequeños en pequeña escala se siguió el procedimiento descrito por Serghini *et al.* (1989). Se recogieron las células de 1.5 ml de cultivo por centrifugación 3 min a 12000g y se resuspendieron en 50 µl de tampón TNE: Tris-HCl 10mM pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 1mM. Se añadió 50 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. Se separaron las fases centrifugando 5 min a 12000g. A los 50 µl de fase acuosa se les añadió NH<sub>4</sub>OAc hasta una concentración final 2M y se precipitó con dos volúmenes de etanol 15 min en hielo. Se recogió el precipitado, se lavó y se secó como se ha indicado anteriormente. El sedimento seco se resuspendió en 25 µl de tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

Para el aislamiento preparativo de plásmidos se utilizó un procedimiento basado en el método descrito por Birnboim y Doly (1979). Se realizó un precultivo de la cepa de *E. coli* apropiada en medio LB (suplementado con los antibióticos oportunos) durante la noche. Al día siguiente se inocularon 2.5 ml de este precultivo en 500 ml del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación hasta que la D.O. a 600 nm fue de 0.4. En este momento se adicionó cloramfenicol (2.5 ml de una disolución 34 mg/ml en etanol) y se incubó con agitación a 37°C durante 12-16 h. Rutinariamente se comprobó que durante este periodo no se producía un crecimiento del cultivo. Al cabo de este tiempo se recogieron las células por centrifugación a 1500 x g 10 min en botes estériles de 250 ml y se resuspendieron en 10 ml de disolución de lisozima (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, lisozima 5 mg/ml). Se incubaron en esta disolución 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de la disolución de NaOH-SDS NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v)). Después de mezclar bien las disoluciones se incubaron 10 min a 0°C. A continuación se añadieron 15 ml de acetato potásico 5 M pH 4.8 y se incubó 10 min a 0°C. El precipitado se eliminó por centrifugación a 30000 x g 30 min. El sobrenadante se distribuyó en cuatro tubos de vidrio Corex de 30 ml sili-conizados y se extrajo 2-3 veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico

(25:24:1). La fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1-2 horas. El precipitado se recogió y lavó como se ha descrito anteriormente. El sedimento seco se disolvió en 5 ml de tampón TE y se digirió con RNasa A (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se añadió SDS hasta el 1% (p/v) y proteinasa K hasta 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó otros 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se extrajo una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con alcohol. El precipitado se recogió, lavó y secó en las condiciones descritas anteriormente y se disolvió en la cantidad apropiada de tampón TE. La cantidad de plásmido obtenido se calculó a partir de su  $A_{260}$  ( $\epsilon=20$  ml/mg.cm).

Los plásmidos obtenidos por ambos métodos se analizaron rutinariamente en electroforesis en agarosa (apartado 3.3) y/o por restricción (apartado 4.1).

#### 2.4. Transformación de levaduras.

Para la transformación de *S. cerevisiae* se siguió el método descrito por Ito *et al.* (1983).

Se inoculó 200 ml de YPG con 1 ml de un precultivo de la cepa a transformar y se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$ , con agitación hasta una D.O. a 600 nm de aproximadamente 1 ( $1-2 \times 10^7$  células/ml). Se recogieron las células de 10 ml del cultivo centrifugando a 2500 rpm 5 min en un tubo estéril y se lavaron una vez con 20 ml de agua destilada estéril y una vez con 20 ml de tampón TE-LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, acetato de litio 0.1 M). Tras los lavados las células se resuspendieron en 0.1 ml del mismo tampón y se mantuvieron durante 1 h a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación. A continuación se añadieron 50  $\mu\text{g}$  de DNA de esperma de salmón y el DNA plasmídico disuelto en 10  $\mu\text{l}$  de tampón TE y se dejó en reposo a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 0.7 ml de tampón TE-LiOAc+PEG 4000 40% (p/v) y se incubó 1 h más a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se provocó entonces un choque térmico, pasando las células a un baño a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, tras el cual se recogieron a 2500 rpm 5 min. Finalmente se resuspendieron en 0.8 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril y se sembraron alícuotas de 0.2 ml mediante un

asa Digralsky sobre placas de YMM sólido con los requerimientos adecuados según la cepa y el plásmido utilizados en cada caso.

Las placas se incubaron a 28°C durante 3 a 5 días hasta la aparición de transformantes. Se hicieron controles de viabilidad y de reversión ambos fueron, habitualmente, satisfactorios.

## **2.5. Obtención de protoplastos de levadura.**

La obtención de protoplastos a partir de células de levaduras se realizó mediante el empleo del preparado enzimático Zimoliasa 100T. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O destilada fría y una vez con medio de incubación: sorbitol 1.1 M, fosfato sódico 24 mM pH 6.5, β-mercaptoetanol 75 mM. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en este mismo medio a una concentración de 0.2 g de células/ml y se adicionaron 0.5 mg de Zimoliasa 100T por gramo de células, incubándose a 37°C durante 30-60 min con agitación suave. La formación de protoplastos se siguió mediante observación microscópica y por el descenso de A<sub>600</sub> en SDS 1% (p/v).

## **2.6. Extracción de DNA genómico.**

Los protoplastos obtenidos según se ha detallado en el apartado anterior se resuspendieron en tampón RSB: CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. A continuación las muestras se llevaron a 1% (p/v) en SDS, se adicionó proteinasa K hasta 100 μg/ml y se digirieron a temperatura ambiente durante la noche o alternativamente 1 h a 37 °C. Una vez digeridas se extrajeron dos o tres veces con 1 volumen de fenol , una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Se les añadió a las muestras NaOAc hasta 0.3 M y se precipitaron. El sedimento seco se resuspendió en tampón TE y se digirió con RNasa 20 μg/ml durante 1 h A 37 °C. Finalmente, el DNA se reprecipitó con alcohol.

## **2.7. Digestiones con nucleasas y extracción del DNA de las muestras.**

Las digestiones con MNasa y con DNasa I se realizaron sobre protoplastos obtenidos como se indica en el apartado 2.5. La muestra se resuspendió en medio de digestión RSB a una concentración de 0.1-0.25 mg/ml (en DNA). Las muestras se atemperaron a 37°C y se añadió la nucleasa en cantidades variables (de 0.2 a 100 u/mg de DNA para la DNasa I y de 20 a 2500 u/mg de DNA para la MNasa) y se incubaron durante los tiempos indicados a 37°C. La reacción se paró añadiendo EDTA hasta 10 mM y sumergiendo las muestras en baño de hielo. Posteriormente se aisló el DNA de las muestras como se describió en el apartado anterior.

La MNasa se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada a 15 u/ $\mu$ l, se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C. La DNasa I se guardó en glicerol 50% (a 0.2 u/ $\mu$ l) también a -20°C.

Las digestiones de DNA desnudo se realizaron en las mismas condiciones pero con concentraciones menores de nucleasas: de 0.5 a 20 u/mg de DNA para la MNasa y de 0.001 a 2 u/mg de DNA para la DNasa I.

Tras la digestión, las muestras de cromatina se digirieron con proteínasa K y RNasa como se ha explicado para la extracción de DNA.

## **2.8. Extracción de RNA total de levadura.**

Para la extracción de RNA total de levadura se siguió el procedimiento descrito por Sherman *et al.* (1986). Todo el material de vidrio y plástico utilizado para la extracción y almacenamiento del RNA se esterilizó en autoclave a 130°C durante 1 h.

Se inocularon 200 ml del medio de cultivo adecuado con 1 ml de un precultivo de la cepa escogida y se incubó a 28°C con agitación. El cultivo se pasó a botes de centrifuga previamente enfriados sobre hielo y se centrifugó a 5000 rpm 5 min para recoger las células. Se resuspendieron en 2.5 ml de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0.2% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 7.4) frío y se pasaron a un tubo Corex de 30 ml que

contenia 11 g de perlas de vidrio de 0.4 mm de diámetro y 3 ml de fenol saturado en tampón LETS. Para romper las células, se agitó durante 6 periodos de 30 s alternados con periodos de 30 s en hielo y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm 5 min para separar las fases. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo Corex de 30 ml y se extrajo dos veces con 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con 5 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Finalmente, la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de LiCl 5 M durante, al menos, 3 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El RNA se recogió centrifugando a 12000 rpm 15 min, se lavó con etanol 70% (v/v) y se secó a vacío. Se resuspendió en un volumen adecuado de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y se valoró espectrofotométricamente ( $\epsilon_{260} = 25$  ml/mg.cm). El RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se guardó precipitado.

Para extracciones de RNA de menos volumen de cultivo se adaptaron proporcionalmente las cantidades anteriores.

## **2.9. Extracción de proteínas.**

Se resuspendieron los protolastos obtenidos según se ha explicado en el apartado 2.5. en tampón Tris-HCl 75 mM pH 7.9,  $\text{MgCl}_2$ , EDTA 0.25 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, y se agitó vigorosamente. Se centrifugó 5 min a 10000 x g y se añadió al sobrenadante glicerina hasta el 15%. A continuación se valoró el contenido en proteínas de los extractos según se explica mas adelante y se ensayó la actividad tiolasa. Los extractos se guardaron durante siete días a  $-80^{\circ}\text{C}$  sin pérdida aparente de actividad.

## **3. TECNICAS ANALITICAS.**

### **3.1. Valoración de proteínas.**

Las proteínas se valoraron con el método de Bradford (1976). Los ensayos se realizaron mezclando 3 ml de reactivo (azul Coomassie G 0.8%

(p/v), etanol 4% (v/v), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6.8% (v/v)) y hasta 0.1 ml de muestra. El color azul desarrollado por las muestras se leyó a 595 nm, y los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva patrón obtenida con BSA (entre 10 y 60 µg/ml valorados espectrofotométricamente con un coeficiente de extinción de 0.660 ml/mg.cm). Los valores de cantidad de proteínas se refieren pues a cantidad equivalente de BSA.

### 3.2. Ensayos de actividad tiolasa.

La actividad tiolasa se ensayó en extractos celulares crudos según el método de Middleton (1973) con algunas modificaciones.

Se siguió el descenso en la A<sub>303</sub> que acompaña a la ruptura del acetoacetil-CoA originada por la adición de CoA (concentración final 50 µM) a una cubeta de 1 cm de paso de luz conteniendo 1 ml Tris-HCl 100 mM pH 8.1, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, NaCl 50 mM, acetoacetil-CoA 10 µM y extracto 50-200 µg. Para restar la actividad tiol esterasa presente en los extractos, la cubeta de referencia contenía la mezcla anterior pero no se añadió CoA. La reacción se siguió durante 5 min desde la adición de CoA a la cubeta de muestra y se determinó la actividad en el tramo lineal de la representación. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que degrada 1 nmol de acetoacetil-CoA por min. La actividad específica se expresó en unidades por mg de proteína. Para determinar la concentración de acetoacetil-CoA se consideró su coeficiente de extinción aparente como  $16.9 \times 10^3$  l/mol (Middleton, 1973).

### 3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa sumergido descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron geles de diferentes concentraciones de agarosa (entre el 0.8 y el 2% (p/v)) en tampón TBE: Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 2 mM, pH 8.3. Las electroforesis se realizaron en el mismo tampón a 4°C y 5 V/cm. Como disolvente de las muestras se utilizó el mismo tampón suplementado con 5% (v/v) de glicerol, 0.05% (p/v) de azul de bromofenol y 0.05% (p/v) de xilén cianol.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en TBE) durante 30 min y se destiñeron en TBE durante otros 30 min. Una vez desteñidos se fotografiaron utilizando un transiluminador ultravioleta a 360 nm y una cámara Polaroid MP4, cargada con negativos Agfapan 200 profesional de 9x12 cm, a través de un filtro ultravioleta convencional y un filtro Kodak Wratten n° 22.

### **3.4. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes.**

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles de agarosa con formaldehído según se describe en Maniatis *et al.* (1982). La agarosa se fundió en  $\text{H}_2\text{O}$  y se esterilizó en autoclave. Una vez fundida y esterilizada se añadieron los volúmenes adecuados de tampón de electroforesis 5x (MOPS 0.2 M pH 7.0, acetato sódico 50 mM, EDTA 5 mM pH 8.0) y de formaldehído para lograr concentraciones 1x y 2.2 M, respectivamente.

Las muestras se prepararon mezclando el RNA disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (hasta 60  $\mu\text{g}$  de RNA en un volumen de 4.5  $\mu\text{l}$ ) con 2  $\mu\text{l}$  del tampón de electroforesis 5x, 3.5  $\mu\text{l}$  de formaldehído y 10  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada. Se incubaron a 55°C durante 15 min y se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de disolventes de muestras estéril (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4% (p/v), xilen cianol 0.4% (p/v)). La preparación de las muestras se realizó siempre inmediatamente antes de la electroforesis, que se desarrolló en tampón de electroforesis 1x, a 4°C y 5 V/cm durante 6-8h.

Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con BrEt 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y se destiñeron con  $\text{H}_2\text{O}$ , con agitación y durante, al menos, 1 h.

### **3.5. Electroforesis en poliacrilamida.**

Se siguió el método de electroforesis vertical descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron geles de 12x12x0.1 cm de concentraciones variables entre el 5 y 12% (p/v) de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) en tampón TBE. El tampón de la cubeta, condiciones de electroforesis, disolvente de muestras, teñido y fotografía de los geles fueron idénticas a

las descritas en el apartado anterior salvo que el voltaje aplicado fue de 10 V/cm.

### **3.6. Geles de secuenciación.**

Para la secuenciación del DNA se utilizaron geles de poliacrilamida al 8%, urea 7M en tampón TBE de 40 cm de largo. Los geles se precorrieron al menos 30 min a 1500 voltios, mientras que las electroforesis se desarrollaron a 2500 voltios durante 6-8 h. Se hicieron dos cargas de 2  $\mu$ l espaciadas 3 h en cada electroforesis. La obtención de las muestras se explica en el apartado 4.7. Terminada la electroforesis se lavó el gel durante 20 min con ácido acético 10% (v/v), etanol 10% (v/v), se secó y se autorradiografió.

Con el objeto de manejar el gel con comodidad se recubrió la placa refrigerante con "solución repelente" (diclorodimetilsilano 2% (v/v) en cloroformo) y la placa de vidrio con "solución adherente" (etanol 80% (v/v), HOAc 2% (v/v), Bind-Silane (LKB) 0.3% (v/v)), permaneciendo el gel pegado a ésta última. Para soltar el gel se lavó la placa con NaOH 1M.

### **3.7. Densitometrado y cálculo de tamaño de los fragmentos.**

Los negativos o las placas de autorradiografía se densitometraron en un densitómetro Laser Ultrosan 2202 (LKB) provisto de un integrador Hewlett-Packard 3390A acoplado para el registro e integración de los picos.

Se utilizaron condiciones de densitometrado e integración apropiadas para maximizar la relación señal/ruido de fondo en cada caso.

En los casos en que se calculó el tamaño de los fragmentos se utilizó el procedimiento descrito en Plikaytis *et al.* (1986), que se basa en la interpolación de los valores de migración de los fragmentos problema en una hipérbola robusta construida mediante un ajuste realizado con un ordenador IBM PC a los datos de tamaño y migración de fragmentos patrón.

## **4. TECNICAS DE MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS.**

### **4.1. Digestión con endonucleasas de restricción.**

Para la digestión de muestras de DNA con endonucleasas de restricción se siguieron las condiciones recomendadas por el suministrador (Boehringer-Mannheim). Se utilizaron 3 tampones diferentes de alta, media y baja concentración salina: NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (alta concentración); NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (media); y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (baja), y otros dos tampones con composición intermedia que permiten la restricción simultanea con enzimas menos estrictos en sus requerimientos: Tris-acetato 33 mM pH 7.9, acetato magnésico 10 mM, acetato potásico 66 mM, DTT 0.5 mM (tampón A) y Tris-HCl 10 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM (tampón B). Para cada endonucleasa de restricción se utilizó el tampón indicado por el suministrador.

Las digestiones se realizaron en tubos eppendorf a 37°C durante dos horas. Se tuvo la precaución de que en la mezcla final la muestra de DNA quedara al menos diluida cinco veces y los enzimas de restricción diez veces con el objeto de eliminar posibles efectos de inhibición por el EDTA del tampón TE de las disoluciones de DNA o por el glicerol de las disoluciones de los enzimas de restricción (Maniatis *et al.*,1982). Las unidades de enzima utilizadas estuvieron en función del tamaño y número de cortes de la molécula a digerir. En las digestiones con DNA genómico, que tiene un tamaño variable y desconocido y un número de cortes con el enzima de restricción también desconocido, se utilizaron entre 3 y 4 unidades de actividad enzimática por µg de DNA

Cuando la restricción se llevó a cabo para el análisis rápido de plásmidos en gel de agarosa, la reacción se paró añadiendo la cantidad apropiada de disolvente de muestras concentrado seis veces. En los demás casos la reacción se paró mediante precipitación con alcohol y posteriormente las muestras se disolvieron en la cantidad apropiada de disolvente de muestras de electroforesis.

#### 4.2. Obtención de series de deleciones solapadas.

Con el objeto de secuenciar toda la región de interés con el mismo cebador se obtuvieron series de deleciones solapadas de los plásmidos conteniendo el DNA a secuenciar mediante la digestión con Exonucleasa III (Henikoff, 1984). Para ello se utilizó el "double-stranded Nested Deletion Kit" de la casa Pharmacia LKB (nº de catálogo 27-1691-01), siguiendo el protocolo indicado en las instrucciones. Para los plásmidos p1300a, p1300b, p1600a y p1600b se utilizó una restricción *Kpn* I para generar el extremo resistente a la *Exo*III y *Xba* I para originar el extremo susceptible de degradación. En el caso del plásmido pSUC KE las restricciones utilizadas fueron *Pst* I y *Xba* I respectivamente. De la librería de deleciones obtenida en los cuatro primeros casos se seleccionaron los clones que permitían cubrir toda la región de DNA de forma solapada, mientras que de las deleciones de pSUC KE se seleccionaron los clones que permitían pasar por los puntos de restricción *Hind* III (ver Figura 5).

#### 4.3. Aislamiento de DNA a partir de geles.

Los fragmentos de DNA de tamaños entre 100 y 600 pb se aislaron a partir de geles de poliacrilamida de concentración entre el 6% y el 12% según el tamaño, siguiendo el método descrito por Maxam y Gilbert (1977). La electroforesis se realizó en las condiciones descritas en el apartado 3.5 salvo que se utilizaron pocillos de 2 cm de ancho. Las bandas se localizaron por tinción con bromuro de etidio, se recortaron y el gel se dividió en pequeños fragmentos. Los fragmentos se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se les añadió un volumen de acetato amónico 0.5 M, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, SDS 0.1% (v/v) pH 8.0. Los tubos se mantuvieron en agitación a 37°C durante la noche. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 10000 x g 10 min y se precipitó el DNA con alcohol. Los rendimientos oscilaron alrededor del 70-80%.

Para fragmentos de DNA mayores y de forma alternativa también para los anteriores, se utilizó el método de electroelución para el aislamiento de cualquier fragmento de DNA a partir de geles tanto de agarosa como de poliacrilamida. Se utilizó una cubeta de electroelución

basada en el modelo diseñado por Bio Rad y un tampón de alta fuerza iónica (Acetato amónico 3 M, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.05%, TBE1x) para la retención del DNA. La electroelución se llevó a cabo a 100 V durante tiempos comprendidos entre 15 y 30 min dependiendo del tamaño del fragmento a electroeluir. Una vez finalizada, se recogió el tampón de retención con una microjeringa y se precipitó el DNA de la forma habitual.

#### **4.4. Marcaje radiactivo de DNA.**

El DNA se marcó radiactivamente mediante el método de "random primer" desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983, 1984) basado en la hibridación de una mezcla de todos los posibles hexanucleótidos al DNA a marcar. A partir de estos "cebadores aleatorios" se sintetiza la cadena complementaria mediante el fragmento Kleenow de la DNAPol I de *E. coli*. Para el marcaje se utilizó el "Random Primed DNA Labelling Kit" de la casa Pharmacia LKB (nº de catálogo 1004760) siguiendo el protocolo descrito en las instrucciones. Los marcajes se realizaron con dATP( $\alpha$ - $^{32}$ P).

Para eliminar los nucleótidos no incorporados se siguió un procedimiento descrito en Maniatis *et al.* (1982). Las muestras de 100  $\mu$ l se pasaron a través de columnas de Sephadex G-50 mediante centrifugación a 1600 x g durante 4 min. Las columnas se construyeron en jeringuillas hipodérmicas de 1 ml con Sephadex G-50 previamente autoclavado y equilibrado en tampón STE (tampón TE suplementado con NaCl 0.1 M), que se centrifugaron a 1600 x g 4 min y se lavaron 5-6 veces con 100  $\mu$ l de tampón STE y una vez con 100  $\mu$ l de DNA de salmón 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l en STE. Las muestras recuperadas de las columnas contenían entre el 80 y el 100% de radiactividad precipitable con TCA 10%.

#### **4.5. Transferencia de DNA y de RNA a filtros.**

Se utilizó el método descrito por Southern (1975) para la transferencia de DNA a partir de geles de agarosa. Se utilizaron filtros de nylon para la transferencia. Se siguió el procedimiento recomendado por la casa comercial que suministró el papel de nylon (Amersham, 1985). Una vez

teñido y fotografiado el gel de agarosa se incubó 15 min con HCl 0.25 M para fragmentar el DNA de alto peso molecular. Posteriormente se incubó 30 min con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M para desnaturalizar el DNA, y 2x15 min con Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM, pH 7.2 para neutralizar. Para la transferencia se depositó el gel sobre una hoja de papel Whatman n° 3 de su misma anchura aunque más larga, formando así dos mechas laterales de papel para absorber tampón desde dos cubetas situadas a los lados. Sobre la superficie del gel se depositó una hoja de papel para transferencia de su mismo tamaño, haciendo coincidir el borde superior del papel con los pocillos del gel. Sobre el papel de transferencia se colocó una hoja de papel Whatman n° 3 del mismo tamaño que el gel humedecida en tampón y 10 cm de toallas secas que se comprimieron sobre el gel mediante un peso de 1-1.5 kg. La transferencia se realizó durante 12-16 h a temperatura ambiente. El tampón utilizado fue 6xSSC (1xSSC - NaCl 0.15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7). Una vez realizada la transferencia se comprobó la desaparición del DNA del gel mediante tinción con bromuro de etidio. Los filtros de nylon se lavaron con 2xSSC y se secaron entre papeles de filtro. Posteriormente se irradiaron con un transiluminador de luz ultravioleta durante 5 min y se guardaron en bolsas de plástico selladas y a 4°C hasta el momento de su uso.

La transferencia de RNA se realizó del mismo modo pero sin necesidad de tratamientos previos de los geles que fueron directamente transferidos a nylon tras finalizar la electroforesis debido a las condiciones desnaturalizantes de las mismas (ver apartado 3.4). La fijación y conservación de los filtros se realizó de la misma forma que para filtros de DNA.

#### **4.6. Hibridación de DNA y de RNA sobre filtros con sondas radiactivas.**

Para la hibridación de los filtros se siguió el protocolo recomendado por el suministrador (Amersham). Los filtros de DNA se incubaron con una disolución de prehibridación consistente en 5xSSPE (1xSSPE - NaCl 0.18 M, EDTA 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.7), 5x disolución Denhardt (1x disolución Denhardt = BSA 0.02% (p/v), PVP 0.02% (p/v), Ficoll 400 0.02% (p/v)), SDS 0.5% y DNA de salmón sonicado y desnaturalizado 200 µg/ml durante 30-

60 min a 42 °C. Posteriormente se incubaron con la disolución de hibridación consistente en 5xSSPE, 5x disolución Denhardt, SDS 0.5% (p/v), formamida 50% (p/v), sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA de salmón sonificado y desnaturalizado 200 µg/ml durante 16-20 h a 42 °C. Una vez hibridados los filtros se lavaron dos veces durante 10 min a temperatura ambiente con 2xSSPE, SDS 0.1% (p/v), una vez durante 15 min a 65 °C con 1xSSPE, SDS 0.1% (p/v) y una vez durante 10 min a 65 °C con 0.1xSSPE, SDS 0.1% (p/v).

Para eliminar la sonda, con el propósito de reutilizar el filtro, se utilizaron lavados con NaOH 0.4M (2x30 min) a 45°C. Los filtros se lavaron posteriormente con 0.1xSSC, SDS 0.1% (p/v), Tris-HCl 0.2M, pH 7.5 para neutralizar. La eliminación de la sonda se comprobó con un contador Geiger. Los filtros lavados se rehibridaron en varias ocasiones sin pérdida aparente de capacidad de hibridación. Así mismo las sondas se reutilizaron hasta cinco veces con diferentes filtros. En este caso se guardaron a -20°C entre una hibridación y la siguiente. Se observó una reducción progresiva de la capacidad de hibridación de las sondas por lo que las reutilizaciones se limitaron de 3-5 generalmente.

Las condiciones de hibridación para filtros de RNA fueron las mismas pero se hicieron prehibridaciones más largas (un mínimo de 3h). La eliminación de sondas para posterior rehibridación de los filtros, debido a la inestabilidad del RNA en disoluciones básicas, se realizó sumergiendo los filtros en SDS al 0.1% (p/v) y llevando a ebullición durante 30-60 min. A continuación se dejaron secar y se comprobó la eliminación de la radiactividad.

#### **4.7. Reacciones de secuenciación.**

La secuenciación del DNA se realizó mediante el método de terminación de cadena con dideoxinucleótido (Sanger *et al.*, 1977) utilizando DNAPol del fago T7. Se utilizó el "T7Sequencing Kit" de la casa Pharmacia LKB (nº de catálogo 27-1682-01), siguiendo el protocolo descrito en las instrucciones. Para el marcaje radiactivo se utilizó dATP( $\alpha$ -<sup>35</sup>S). Las muestras se guardaron a -20 °C y se reusaron sin degradación

aparente. Con los plásmidos obtenidos por deleciones de p1300a, p1300b, p1600a y p1600b se utilizó cebador reverso 17-mer, mientras que las deleciones del plásmido pSUC KE se secuenciaron con cebador universal 17-mer. La utilización de las cuatro series de deleciones primeras permitió la secuenciación completa de las dos cadenas del DNA, mientras que las deleciones de pSUC KE permitieron pasar por los puntos de restricción utilizados (ver Figura 5).

#### **4.8. Autorradiografía de los filtros hibridados.**

Se utilizó película Kodak X-Omat S y cassettes Kodak X-Omatic, provistos de dos pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic regular. Las autorradiografías se desarrollaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad durante tiempos variables (entre 2 y 100 h), dependiendo de la radiactividad de los filtros.

Las placas fotográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante 5 min a  $20^{\circ}\text{C}$  o en una máquina de revelado automático Agfa modelo CURIX 60.

### **5. METODOS INFORMATICOS.**

#### **5.1. Análisis de secuencias.**

Las secuencias de DNA y de proteínas se analizaron mediante los diversos programas de los paquetes informáticos DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI 53705), PC GENE v. 5.10 (Amos BAIROCH/BIOMED, Universidad de Ginebra, Suiza) y GCG v.6.2 (Genetics Computer Group.).

La identificación de pautas abiertas de lectura en la secuencia de DNA obtenida se realizó mediante los programas COD FICK v.1.21 (método de Ficket, 1982) y COD RNY v.2.30 (método de Shepherd, 1984) del PC GENE. Para la traducción de estas regiones a secuencia de proteínas y el análisis del uso de codones se utilizaron los programas TRANSL v2.03 (PC GENE), CDUSAGE v.2.31 (PC GENE) y TRANS v1.10 (DNASTAR). La búsqueda

de subsecuencias, secuencias repetidas y de estructuras en horquilla se realizó con los programas QGSEARCH v.2.33, REPEATS v.2.10 y HAIRPIN v.2.31 respectivamente, todos del PC GENE.

Los perfiles de hidropatía de las secuencias de proteína se determinaron mediante el método de Kyte y Doolittle (1982) con el programa SOAP v.3.00 (PC GENE). En la búsqueda de hélices transmembrana se aplicaron los métodos de Rao y Argos (1986), Eisenberg *et al.* (1984) y Klein *et al.* (1985) mediante los programas del PC GENE ROARGOS v.1.00, HELIXMEN v.1.22 y SOAP v.3.00 respectivamente.

## **5.2. Comparación y alineamientos de secuencias.**

La comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos se realizó en un principio con los programas PROSCAN v.5.51 (secuencias de proteínas) y NUCSCAN v.5.51 (secuencias de DNA) ambos del DNASTAR. Se utilizaron los bancos de datos GenBank v.63 y NFBPR v.23. En la búsqueda de secuencias en estas bases de datos se utilizó también el programa del DNASTAR GENEMAN v.5.62. Posteriormente se realizaron comparaciones de secuencias con las bases de datos GenBank v.67 y NFBPR v.27 mediante los programas WORDSEARCH Y TFASTA del GCG.

Las comparaciones y alineamientos de secuencias de proteínas entre sí se realizaron con los programas AACOMP v.4.80, DOTPLOT v.2.18 y AALIGN v.1.65 y los de secuencias de DNA con el programa ALIGN v.5.86, todos ellos del DNASTAR.

El alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas se realizó aplicando el algoritmo de Higgins y Sharp (1989) mediante su programa CLUSTAL. Para el análisis de los árboles filogenéticos no se consideró la secuencia amino terminal hasta el aminoácido 34 de *POT1*. El alineamiento múltiple de las secuencias de DNA se realizó de acuerdo al resultado obtenido para las correspondientes proteínas.

### **5.3. Construcción de árboles filogenéticos.**

El número de sustituciones entre las secuencias, tanto de aminoácidos como de nucleótidos, se determinó corrigiendo las posibles sustituciones múltiples con  $d = -\ln(1-k)L$  (Kimura, 1983), siendo K la proporción de aminoácidos (o nucleótidos) diferentes y L la longitud homóloga de cada par de secuencias comparadas (el número de residuos que no son una delección simultáneamente en ambas secuencias). Los huecos se consideraron como sustituciones. También se calcularon los valores de d excluyendo los huecos en los cálculos y usando otras fórmulas, como la corrección empírica de K para las secuencias de aminoácidos (Kimura, 1983) o el estimador de Jukes y Cantor (1969) pero los valores obtenidos fueron muy similares y no cambiaron los resultados significativamente.

Los árboles filogenéticos se dedujeron de la matriz de las distancias mediante el método de mínimos cuadrados (Fitch y Margoliash, 1967) usando el programa FITCH del paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1990).

### **5.4. Fiabilidad de los árboles construidos.**

Para determinar la fiabilidad de los árboles construidos se utilizó un método de remuestreo tipo "bootstrap" (Efron, 1982; Felsenstein, 1985)

Los árboles filogenéticos se obtuvieron en un proceso en dos etapas. Primero se obtuvieron 500 remuestreos y para cada uno de ellos se infirió un árbol como se ha descrito en el apartado 5.3.. Con el programa CONSENSE, también del paquete PHYLIP, se obtuvo un árbol consenso de todas las réplicas.

En un segundo paso se determinó la longitud de las ramas. Se obtuvieron nuevamente otras 500 réplicas y se utilizó el programa FITCH con la opción "user tree" para calcular las 500 estimaciones de las longitudes de las ramas para el árbol consenso previamente obtenido. De este remuestreo se determinó las medias y varianzas, así como intervalos de confianza usando el método de los percentiles (Efron, 1982)

### **5.5. Contraste de la F de las desigualdades en las tasas evolutivas.**

Se aplicó el contraste de las desigualdades en las tasas evolutivas propuesto por Felsenstein (1984). El método usa la suma residual de los cuadrados de los árboles obtenidos usando los programas FITCH y KITCH. El programa KIITCH, también del paquete PHYLIP, utiliza el mismo algoritmo que el FITCH pero asumiendo un comportamiento de reloj molecular.

## **Resultados y Discusión**

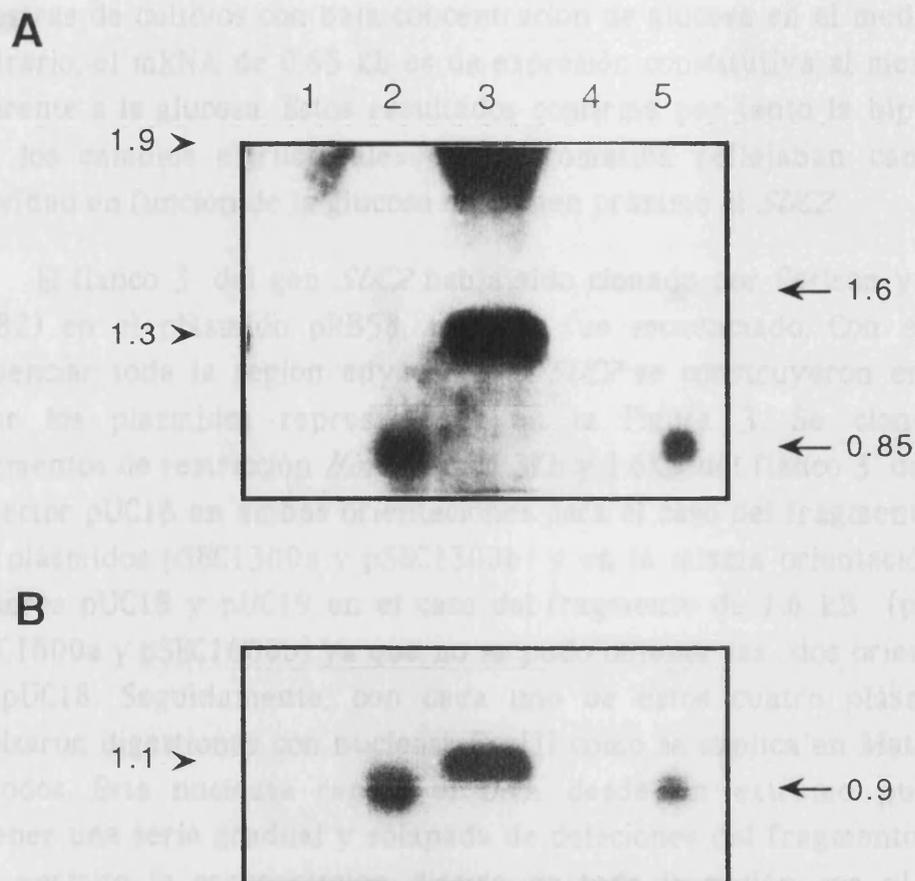
## 1. IDENTIFICACION DEL GEN DE LA 3-OXOACIL-CoA TIOLASA PEROXISOMAL DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

### 1.1. ¿Hay un gen regulado por glucosa en el flanco 3' próximo al gen *SUC2*?

El primer objetivo planteado en la realización de este trabajo era encontrar la causa de los cambios observados en la estructura de la cromatina del flanco 3' del gen *SUC2* de *S.cerevisiae* con la desrepresión del gen. Elementos en la región 3' de los genes pueden intervenir en el control de su expresión en eucariotas superiores (Kaufman y Sharp, 1983; Choi y Engel, 1986; Owen y Kühn, 1987). Aunque en levadura no se han encontrado elementos reguladores en los flancos 3' de los genes, las secuencias en estas regiones son necesarias para la correcta terminación y subsiguiente procesado de los mRNA poliadenilados (Oliver y Warmington, 1989). La proximidad y el comportamiento paralelo entre los cambios observados y la actividad del gen *SUC2* hicieron pensar en un principio que esta región podría estar relacionada de alguna manera con la regulación del gen *SUC2* (Pérez-Ortín *et al.*, 1987,1989). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante el estudio de mutantes con deleciones en los flancos del gen descartaban una posible relación funcional de esos cambios con la actividad del gen *SUC2* (Matallana, 1989; Igual *et al.*, 1991).

Es muy improbable que un elemento no génico sufriera en función de la presencia de glucosa en el medio de cultivo cambios como los observados. Considerando además que los genes de levadura están muy próximos, la hipótesis más factible era la existencia de un gen que por los cambios en su estructura cromatínica tendría un mecanismo de regulación similar al del *SUC2*.

Con el objeto de confirmar esta hipótesis se obtuvo RNA de células crecidas en medios con alta y baja concentración de glucosa. El RNA extraído se analizó por electroforesis en agarosa, transferencia a filtro de nylon e hibridación con el fragmento de restricción *Hind*III de 1.3 Kb del flanco 3' del gen *SUC2* marcado radiactivamente. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos. Este estudio confirmó la presencia no de uno sino



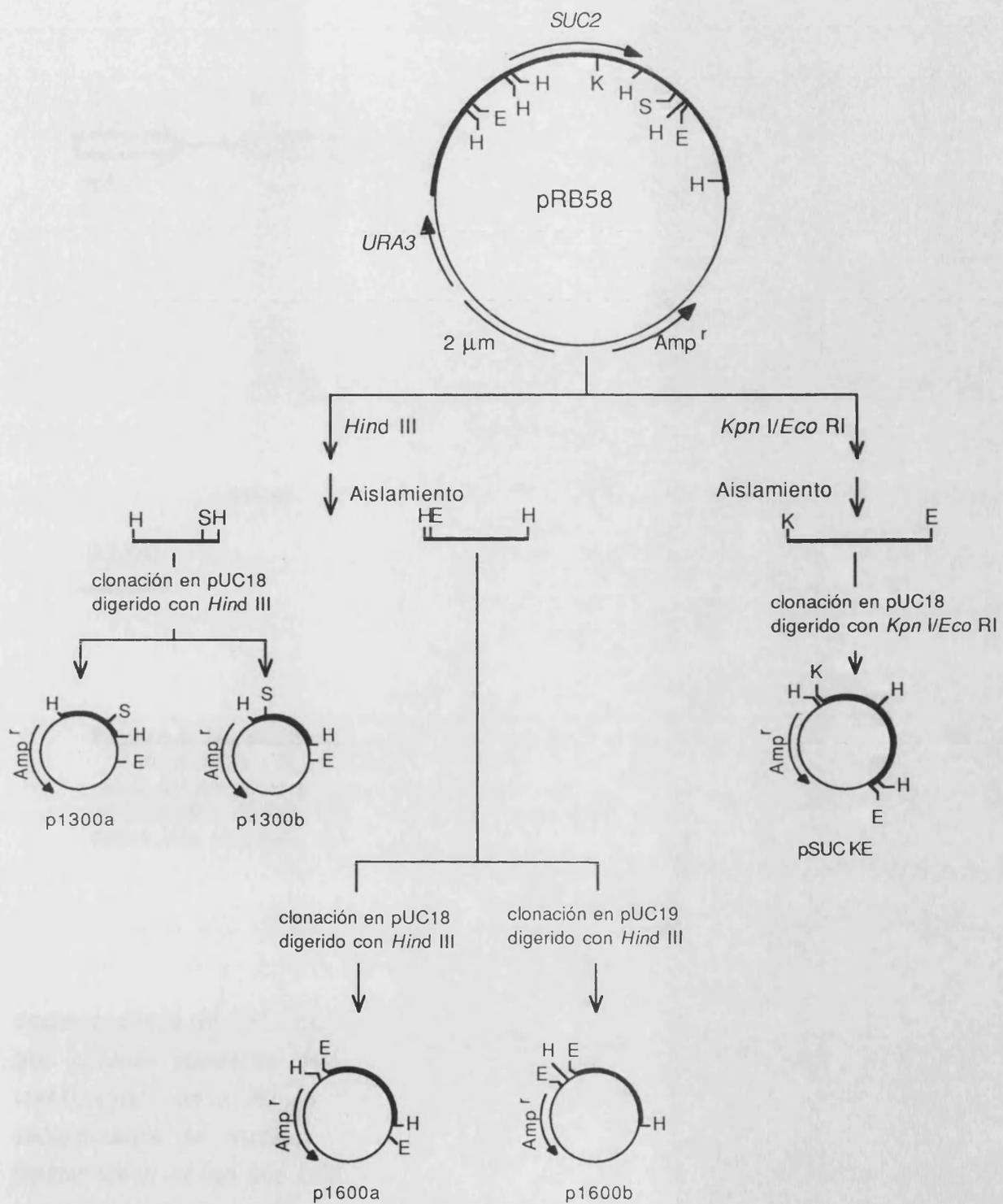
**Figura 2.** Análisis de mRNAs transcritos a partir del flanco 3' del gen *SUC2*.

Se extrajo RNA total de cultivos de la cepa salvaje X2180-1A en medio YPG (carreras 1 y 2) y en medio YPG-LGM (carreras 4 y 5) y se analizaron por electroforesis en agarosa al 1%, transferencia a filtro e hibridación con el fragmento de restricción *Hind*III de 1,3 kb del flanco 3' del gen *SUC2* (panel A). Se realizaron dos cargas con diferentes cantidades de cada muestra: 5  $\mu$ g en las carreras 1 y 4 y 10  $\mu$ g en las carreras 2 y 5. En la carrera 3 se inyectó una restricción *Hind*III del plásmido pRB58, que contiene el gen *SUC2* y sus flancos. Como control interno se lavó el filtro y se rehibridó con una sonda del fragmento *Hind*III de 1.1 kb conteniendo el gen *URA3* (panel B). Los tamaños y posiciones de los mRNA detectados se muestran en la izquierda y los de los DNA marcadores a la derecha.

de dos genes en el flanco 3' del *SUC2*, pues se detectaron dos mRNA diferentes, uno de aproximadamente 1.6 kb y otro mas pequeño de 0.85 kb. El primero de ellos esta reprimido por glucosa ya que solo se observa en las muestras de cultivos con baja concentración de glucosa en el medio. Por el contrario, el mRNA de 0.85 kb es de expresión constitutiva al menos en lo referente a la glucosa. Estos resultados confirma por tanto la hipótesis de que los cambios estructurales de la cromatina reflejaban cambios de actividad en función de la glucosa en un gen próximo al *SUC2*.

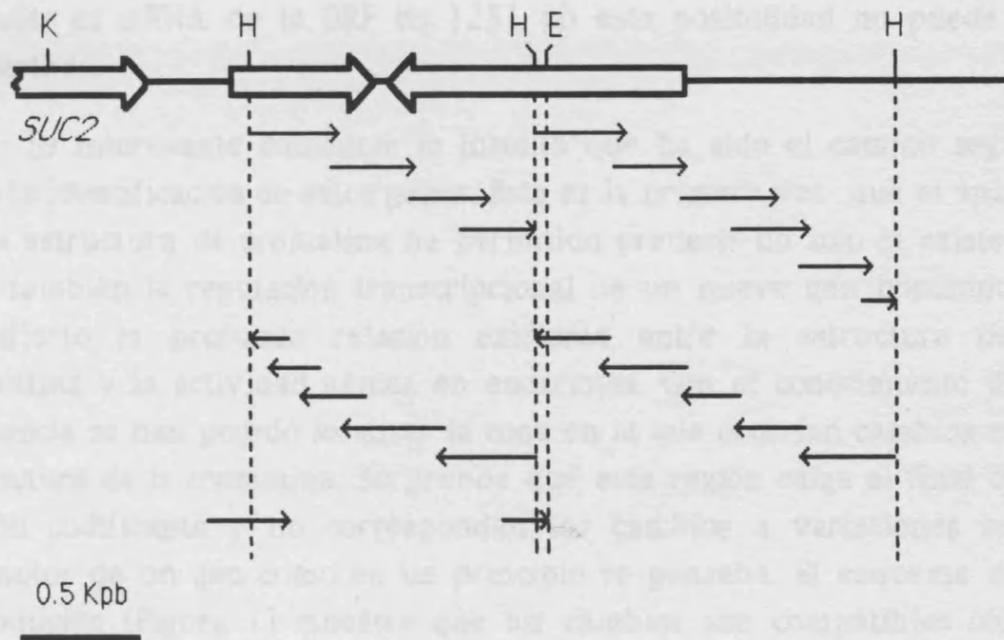
El flanco 3' del gen *SUC2* había sido clonado por Carlson y Botstein (1982) en el plásmido pRB58, pero no fue secuenciado. Con el fin de secuenciar toda la región adyacente al *SUC2* se construyeron en primer lugar los plásmidos representados en la Figura 3. Se clonaron los fragmentos de restricción *Hind*III de 1.3Kb y 1.6Kb del flanco 3' del gen en el vector pUC18 en ambas orientaciones para el caso del fragmento de 1.3 kb (plásmidos pSEC1300a y pSEC1300b) y en la misma orientación en los vectores pUC18 y pUC19 en el caso del fragmento de 1.6 kb (plásmidos pSEC1600a y pSEC1600b) ya que no se pudo obtener las dos orientaciones en pUC18. Seguidamente, con cada uno de estos cuatro plásmidos se realizaron digestiones con nucleasa *Exo*III como se explica en Materiales y Métodos. Esta nucleasa repela el DNA desde un extremo pudiendose obtener una serie gradual y solapada de deleciones del fragmento clonado que permite la secuenciación directa de toda la región con el cebador universal. Tambien se obtuvieron deleciones del plásmido pSUC KE que contiene el fragmento de restricción *Kpn*I-*Eco*RI (Figura 3) con el objeto pasar por los puntos de corte *Hind*III de los fragmentos de restricción clonados.

Con todos estos clones se realizó la secuenciación de ambas cadenas del DNA de la región de interés como se representa en el esquema de la Figura 4. El análisis de la secuencia por el método de Shepherd (1984) identificó dos pautas abiertas de lectura, una en cada cadena, que además tenían según el método de Fickett (1982) una probabilidad muy alta (92% para la grande y 77% para la pequeña) de ser regiones codificantes de proteínas. La mas cercana al gen *SUC2* tenía 705 pb y codifica en la misma dirección que el *SUC2*. La otra, de 1251 pb, se encuentra más alejada y en dirección contraria al *SUC2* (ver Figura 4). Por el tamaño de las dos ORF



**Figura 3.** Esquema de la construcción de los plásmidos p1300a, p1300b, p1600a, p1600b y pSUCKE.

Los enzimas de restricción relevantes son: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; K, *KpnI*; S, *StuI*.



**Figura 4.** Estrategia de secuenciación del flanco 3' del gen *SUC2*.

Las flechas en la parte inferior indican los fragmentos secuenciados obtenidos mediante delecciones con ExoIII. El gen *SUC2* y las nuevas ORFs encontradas se han representado por flechas vacías. Los sitios de restricción indicados son: K, *KpnI*; H, *HindIII*; E, *EcoRI*.

encontradas la de 1251 pb correspondería al mensajero de 1.6 kb regulable por glucosa mientras que el mensajero de 0.85 kb provendría de la transcripción de la ORF de 705 pb. Como se observa en la Figura 4 los genes secuenciados se encuentran bastante próximos. Entre los codones de terminación de las dos ORF sólo hay 57 pb. Atendiendo al tamaño de los mensajeros es bastante probable que los transcritos de ambos genes se solapen. La ORF de 1251 corresponde al gene más cercano al telómero del cromosoma IX conocido hasta ahora.

Junto a estos dos genes identificados es posible la existencia de un tercero que se extendiera mas allá del fragmento secuenciado pues los últimos 603 pb están en pauta abierta de lectura. Aunque como se verá más tarde la hibridación con el fragmento *HindIII* de 1.6 kb solo permite

detectar el mRNA de la ORF de 1251 pb esta posibilidad no puede ser descartada.

Es interesante comentar lo insólito que ha sido el camino seguido para la identificación de estos genes. Esta es la primera vez que el análisis de la estructura de cromatina ha permitido predecir no solo la existencia sino también la regulación transcripcional de un nuevo gen poniendo de manifiesto la profunda relación existente entre la estructura de la cromatina y la actividad génica en eucariotas. Con el conocimiento de la secuencia se han podido localizar la zona en la que ocurrían cambios en la estructura de la cromatina. Sorprende que esta región caiga al final de la región codificante y no correspondan los cambios a variaciones en el promotor de un gen como en un principio se pensaba. El esquema de la introducción (Figura 1) muestra que los cambios son compatibles con la desaparición de nucleosomas posicionados. No es muy común que ocurran grandes cambios en el posicionamiento de nucleosomas dentro de la región codificante, especialmente si la actividad no es muy pronunciada. Todo ello dió pie a un estudio detallado de la estructura de la cromatina del promotor y región codificante del gen en diferentes condiciones de regulación (capítulo 4).

## **1.2. Estructura primaria e interrupción del gen *POT1* de *Saccharomyces cerevisiae*.**

La secuencia de nucleótidos de la ORF de 1251 pb y sus flancos así como la secuencia de aminoácidos deducida de ella se muestra en la Figura 5. Se consideró el primer ATG como el inicio de la traducción porque es similar a la secuencia consenso de iniciación descrita para genes eucariotas (en el algoritmo propuesto para esta secuencia la región alrededor de dicho ATG se haya por encima del valor discriminatorio entre sitios de iniciación funcionales y no funcionales (Stormo, 1987) y por homología con otras proteínas análogas de otros organismos (ver mas adelante). Esta suposición fue confirmada por el grupo de H.Tabak que localizó el inicio de la transcripción alrededor de la posición -19 del primer ATG (comunicación personal). En la región del promotor, una posible caja TATA se encuentra en la posición -99. Entre 242 y 253 pb anteriores al codón de iniciación hay

CTAGTTTATATAGAGCCTTCGATAA CTT CATGCCACCTGTTGAAAGGTTTCTAACTAGGC  
 -900 CATCCAAAAAGTGTGCGTTTTTCAGCTAGTT CATTAGTGGCCAAATGTGTAGAGTATGTCG  
 TGCTCGAAGTCACTTTCTTTTTCCCCCAATGATTGGAAC TACGGATTTTACATATCAATA  
 ACCATTTCTTTCGTAGAGAGATGTTTTGTA AATTCTTATAAGCAGCCCCCAAAAAAAG  
 -720 TTCCATCTTTTTAAAAGCTCATCAAACATTCTTTTCGACGAGTGATGCGTCCTGAGGCATGC  
 ACTTCGGATTA AAAATCCATTCCGATCCGTTCACTTCTTCGGAAACCATTGGTGACGAAG  
 AAACGTCATTAGCTGAGAAAATTCTTCTGTTTTCATGTATATATGTGATCCTGTACCTTGTT  
 -540 TCTCTAACGCTACACCGACCAACTGCAAGCCAGCGGCAACCAGCCCATCGTTCAAATTC A  
 ATTCTTCCAATTTACGGGCTTCGCTGACCCTATCACGCGCGTGAAGTGACAGCGATCTGC  
 GAGGGTAGCGGTACGTCTTCTGTTCGGGGAAGAGTCCATCGCTGATGATTGTGCTATTT  
 -360 TTTTATCTGCTTTTGTGT CACGATCATCATCACTATGTAATCTTCAAAGATCAAGAATT  
 TGCTAGTTTTGAACCTATGCCACA AATAGCGAAAAAAGAAAAAAAACCTTGACGCGTCAAC  
 ATGAGGAGGGTAATGATGTGGTAGCGCCGTGTAAGGCGCTATCAAAGGGAAACGGGGATA  
 -180 ATAGTATTAACACCGCAGCTTTTTTTTTCTTTCTCCCTCTATTGGTTTTCAAATTTATTGG  
 AGTTTTACTAGAAAGAAGAGATATAAATAGGGTATACTTTTGCATCTCAGTTCTATTGAA  
 ATCGAATGGTTATTTCTTGTGGCTCTGAGTACAGAGTGAATATAACACTACATAAAAAGCA  
  
 1 ATGTCTCAAAGACTACAAAGTATCAAGGATCATT TGGTGGAGAGCGCCATGGGTAAGGGT  
 M S Q R L Q S I K D H L V E S A M G K G  
  
 GAATCGAAGAGGAAGAACTCGTTGCTGGAGAAAAGACCCGAAGATGTAGTTATTGTGGCT  
 E S K R K N S L L E K R P E D V V I V A  
  
 120 GCTAACAGGTCTGCCATCGGTA AAGGTTTTAAAGGTGCCTTCAAAGATGTAAACACAGAC  
 A N R S A I G K G F K G A F K D V N T D  
  
 TACTTATTATACA AACTTTCTCAATGAGTTCATCGGGAGGTTTTCCGGAACCTTTGAGGGCT  
 Y L L Y N F L N E F I G R F P E P L R A  
  
 240 GATTTGAACTTAATCGAAGAAGTTGCCTGTGGAAATGTTCTCAATGTTGGAGCCGGTGCT  
 D L N L I E E V A C G N V L N V G A G A  
  
 ACAGAACACAGGGCTGCATGCTTGGCAAGTGGGATTCCCTACTCGACTCCATTGTGCGCT  
 T E H R A A C L A S G I P Y S T P F V A  
  
 360 TTAAACAGACAATGTTCTTCAGGTTTAAACGGCGGTGAACGATATTGCCAACAAAGATTAAG  
 L N R Q C S S G L T A V N D I A N K I K  
  
 GTTGGGCAAATTGATATTGGTTTTGGCGCTGGGAGTGG AATCAATGACCAATAACTACAAA  
 V G Q I D I G L A L G V E S M T N N Y K  
  
 480 AACGTCAATCCCTTGGGCATGATCTCCTCTGAAGAGCTGCAAAAAAACCAGAGAAGCGAAG  
 N V N P L G M I S S E E L O K N R E A K  
  
 AAATGTCTAATACCAATGGGCATTACTAATGAGAATGTTGCCGCTAATTTCAAGATCAGT  
 K C L I P M G I T N E N V A A N F K I S  
  
 600 AGAAAGGATCAAGACGAGTTCGCTGCGAATTCATATCAAAAAGCTTACAAGGCGAAAAAT  
 R K D Q D E F A A N S Y Q K A Y K A K N  
  
 GAGGGGCTTTTTCGAAGATGAAATTTTACCTATAAAAATTACCAGATGGCTCAATTTGCCAG  
 E G L F E D E I L P I K L P D G S I C O

720 TCGGACGAAGGGCCACGCCCTAACGTCACTGCGGAGTCGCTTTC AAGCATCAGGCCTGCC  
 S D E G P R P N V T A E S L S S I R P A  
  
 TTTATCAAAGACAGAGGAACCACA AACTGCGGGCAATGCATCCCAGGTCTCCGATGGTGTG  
 F I K D R G T T T A G N A S Q V S D G V  
  
 840 GCAGGTGTCTTGTTAGCCCGCAGGTCCGTAGCCAACCAGTTAAATCTGCCTGTGCTAGGT  
 A G V L L A R R S V A N Q L N L P V L G  
  
 CGCTACATCGATTTTCAAACAGTGGGGGTCCCCCTGAAATCATGGGTGTGGGCCCTGCA  
 R Y I D F Q T V G V P P E I M G V G P A  
  
 960 TACGCCATACCAAAAAGTCTGGAAGCTACTGGCTTGCAAGTCCAAGATATCGATATTTTT  
 Y A I P K V L E A T G L Q V Q D I D I F  
  
 GAAATAAATGAAGCATTGCGGCCCAAGCATTATACTGCATCCATAAACTGGGCATCGAT  
 E I N E A F A A Q A L Y C I H K L G I D  
  
 1080 TTGAATAAAGTAAATCCAAGAGGTGGTGAATCGCGTTAGGCCATCCCTTGGGTTGTACT  
 L N K V N P R G G A I A L G H P L G C T  
  
 GCGCAAGGCAAGTAGCTACCATACTAAGAGA AACTGAAAAAGGATCAAATCGGGGTTGTT  
 G A R O V A T I L R E L K K D Q I G V V  
  
 1200 AGTATGTGTATCGGTACTGGTATGGGTGCCGCCCATCTTTATTAAGAATAGTTTTTAA  
 S M C I G T G M G A A A I F I K E \* \*  
 TACTTGATAATAGTTAATATTCTCCCTTTTTATTATGCTCATATTTATATGGTTTTGTAA  
 1320 AAGCTATTACGTAGTTTATCAATTTGTTTATAATTTTCCATTTTCAATATTTCTAACTCA  
 CTAACCAATAGTTTATTTGAGATAATATCCTCCAGTCCTCCTTAACCAATT

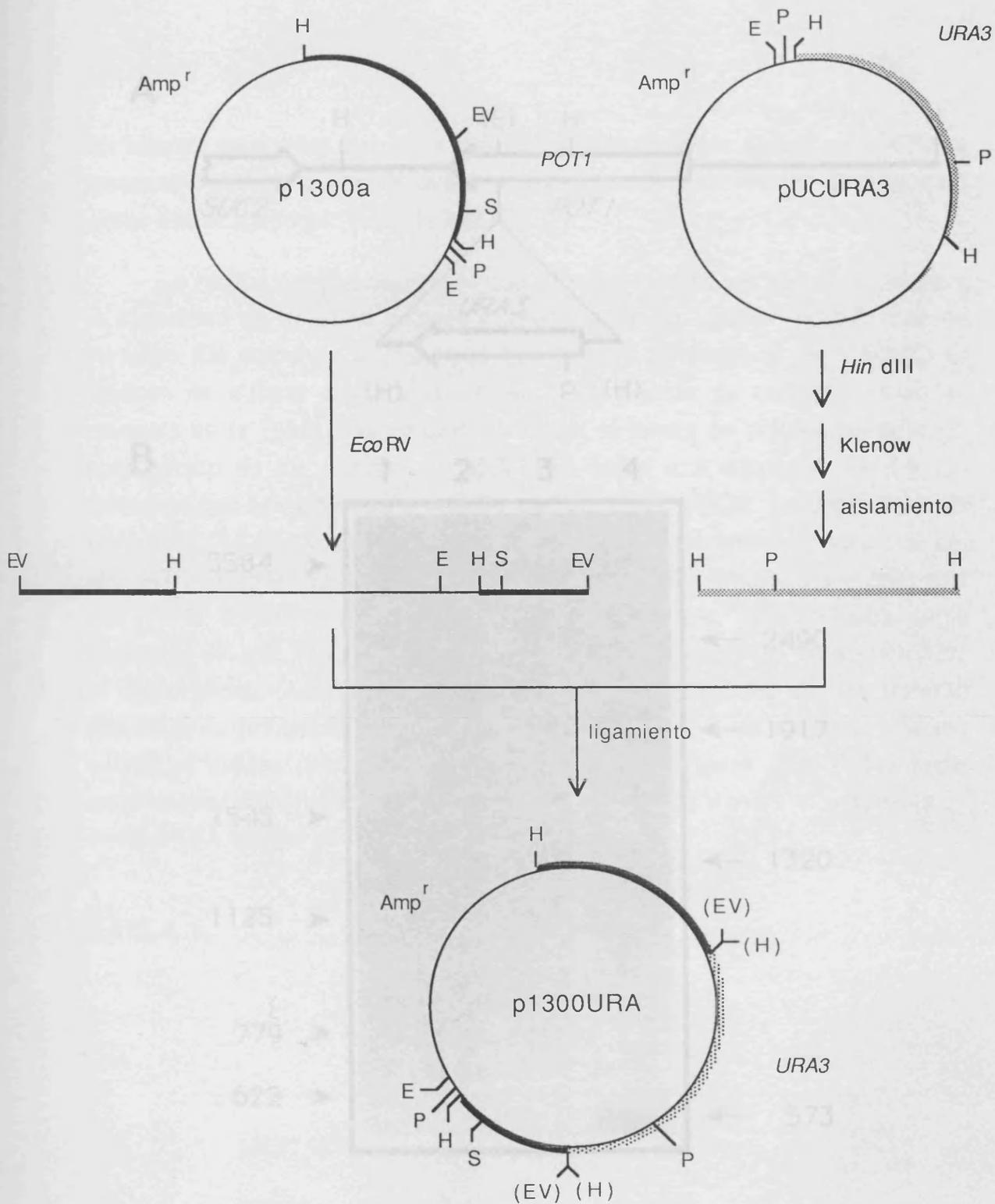
**Figura 5.** Secuencia del DNA de una región que incluye la ORF de 1251 y sus flancos y la secuencia de aminoácidos derivada de ella.

En el flanco 5' se han subrayado la hipotética caja TATA, dos secuencias repetidas invertidas de siete pb y una secuencia palindrómica de 12 pb. Con asteriscos se han señalado los dos codones de terminación diferentes en fase con la ORF. El triplete enmarcado corresponde al triplete de terminación de la ORF de 705 pb, invertido con respecto al *POT1*.

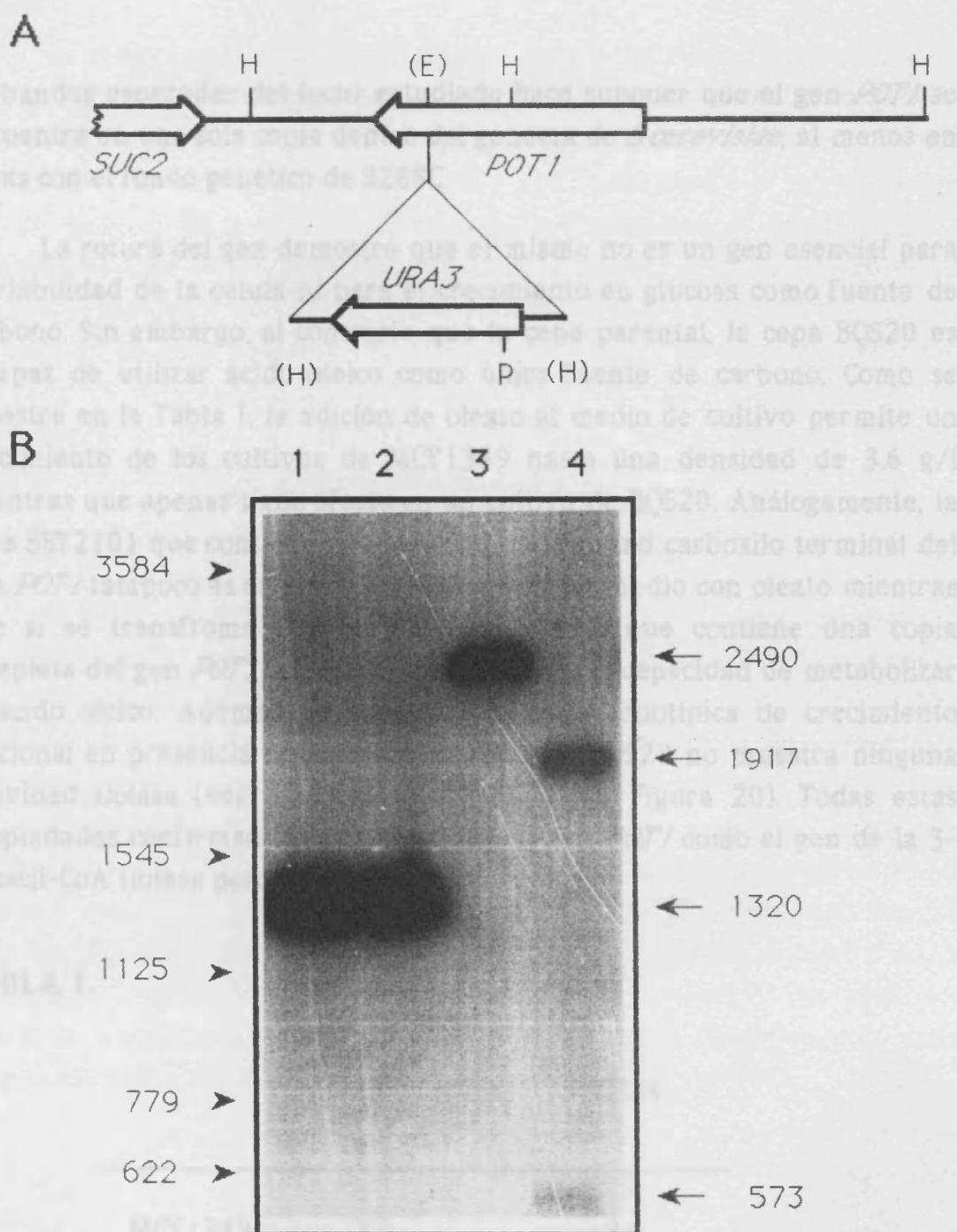
una secuencia palindrómica de 12 pb. Además, hay una secuencia de siete pb invertida en las posiciones -199 y -213 que podría formar una estructura en horquilla con un tronco de siete pb (de ellos cinco apareamientos serían GC) y seis pb desapareadas. No se detectaron secuencias consenso TACTAAC requeridas para el procesamiento de intrones en *S.cerevisiae* (Langford *et al.*, 1984). La región codificante termina con dos codones de parada adyacentes (posiciones 1251 y 1257), propiedad característica de muchos genes de levadura. No se han encontrado secuencias señales de terminación de transcripción ni de poliadenilación (Wehals, 1987; Russo *et al.*, 1991).

La proteína codificada por este gen está compuesta por 417 aminoácidos y tiene un peso molecular de 44730 daltons. La comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con los bancos de datos GenBank y NBRF-PIR mostró más del 50% de homología con la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal humana (Bout *et al.*, 1988) y de rata (Hijikata *et al.*, 1990). Con toda probabilidad el gen secuenciado, al que se denominó *POT1* (del inglés peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase) codifica para el correspondiente enzima de levadura cuya actividad había sido ya estudiada (Veenhuis *et al.*, 1987; Kunau *et al.*, 1988) aunque su regulación por glucosa no se había descrito. Un análisis extensivo de las secuencias de éste y otros genes que codifican tiolasas se realiza en el siguiente capítulo.

Se obtuvo una confirmación adicional de la naturaleza del gen mediante la rotura del mismo según el procedimiento de Rothstein (1983). Para ello se construyó un plásmido a partir de pSEC1300a en el que se había insertado el gen marcador *URA3* en la zona codificante del gen *POT1* (Figura 6). Se digirió el plásmido con *HindIII* que suelta el fragmento clonado del gen *POT1* interrumpido y se transformó la cepa MCY1389 seleccionándose transformantes capaces de crecer en medios sin uracilo. Para comprobar que las colonias tenían realmente el gen *POT1* roto se extrajo DNA genómico de la cepa transformada, se cortó con enzimas de restricción *HindIII* y *PstI* y se analizó por electroforesis en agarosa, transferencia a filtro e hibridación con una sonda radiactiva del fragmento de restricción *HindIII* de 1.3 kb. Como se observa en la Figura 7, la cepa seleccionada había intercambiado su copia salvaje del gen *POT1* por la copia rota. El hecho de que en estas muestras de DNA genómico sólo se observen



**Figura 6.** Esquema de la construcción del plásmido p1300URA. Los enzimas de restricción relevantes son: E, *EcoRI*; EV *EcoRV*; H, *HindIII*; P, *PstI*; S, *StuI*. Los puntos de corte entre paréntesis se destruyen en el procedimiento de clonación utilizado.



**Figura 7.** Interrupción del gen *POT1*.

(A) Mapa del locus *POT1* en la cepa BQS20. Se indican los sitios de restricción relevantes: H, *Hind*III; E, *Eco*RV; P, *Pst*I. Los sitios entre paréntesis se destruyen en el procedimiento de clonación utilizado. (B) Confirmación de la ruptura del gen *POT1* en la cepa BQS20. Se analizó DNA genómico de la cepa parental MCY1389 (carreras 1 y 2) y de la cepa BQS20 (carreras 3 y 4). Las muestras se digirieron con *Hind*III (carreras 1 y 3) o con *Hind*III y *Pst*I (carreras 2 y 4), se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1%, transferencia a filtro e hibridación con la sonda *Hind*III de 1.3 kb que cubre la parte 3' del gen *POT1* y gran parte de la región intergénica entre el mismo y el *SUC2*. A la izquierda se indica la migración de los patrones de tamaño utilizados y a la derecha las bandas experimentales con los tamaños esperados.

las bandas esperadas del locus estudiado hace suponer que el gen *POT1* se encuentra en una sola copia dentro del genoma de *S.cerevisiae*, al menos en cepas con el fondo genético de S288C.

La rotura del gen demostró que el mismo no es un gen esencial para la viabilidad de la célula ni para el crecimiento en glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, al contrario que la cepa parental, la cepa BQS20 es incapaz de utilizar ácido oleico como única fuente de carbono. Como se muestra en la Tabla I, la adición de oleato al medio de cultivo permite un crecimiento de los cultivos de MCY1389 hasta una densidad de 3.6 g/l mientras que apenas tiene efecto en un cultivo de BQS20. Análogamente, la cepa SEY2101 que contiene una delección de la mitad carboxilo terminal del gen *POT1* tampoco es capaz de crecer más en un medio con oleato mientras que si se transforma con el plásmido pRB58 que contiene una copia completa del gen *POT1* (cepa BQS2) se recupera la capacidad de metabolizar el ácido oleico. Además de esta característica fenotípica de crecimiento adicional en presencia de ácido oleico, la cepa BQS20 no muestra ninguna actividad tiolasa (ver mas adelante Tabla IV y Figura 20). Todas estas propiedades confirman la identificación del gen *POT1* como el gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *S.cerevisiae*.

**TABLA I.**

	gramos/litro	
	YP	YPOA
MCY1389	2.2	3.6
BQS20	2.2	2.5
SEY2101	2.2	2.4
BQS2	2.2	4.8

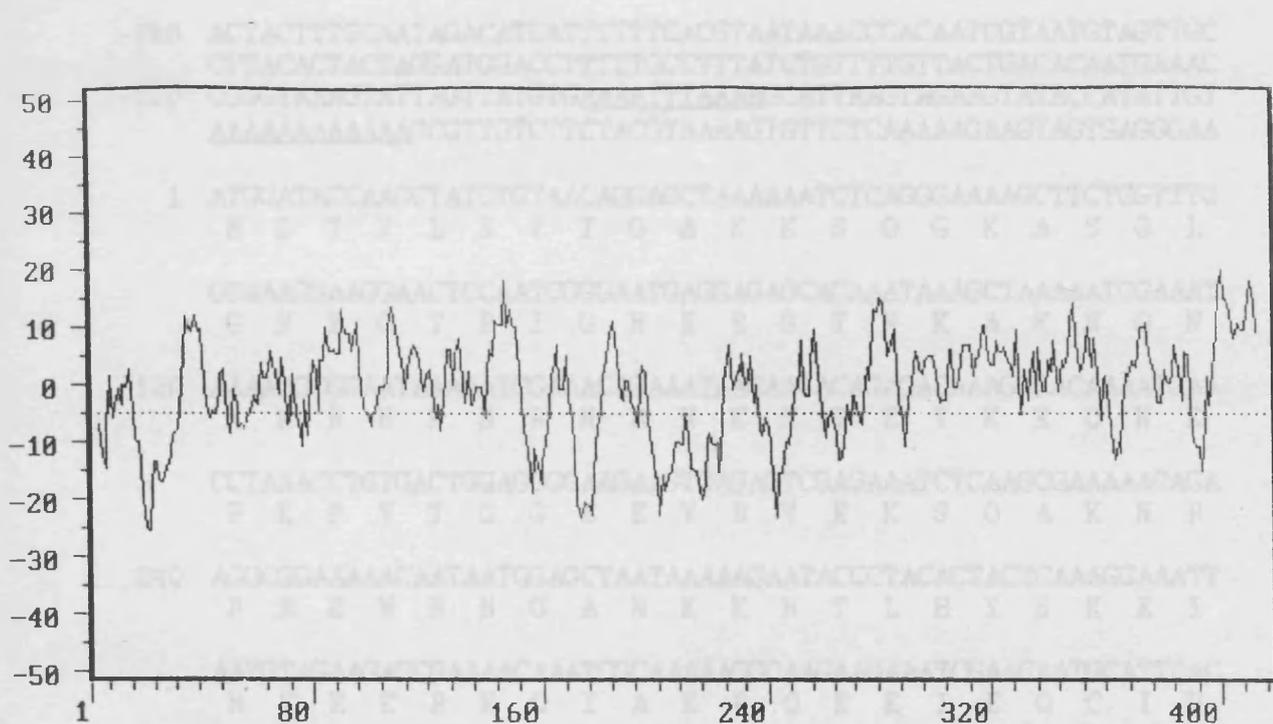
La composición de aminoácidos y el uso de codones se representan en la Tabla II. En cuanto a su composición no presenta ninguna propiedad llamativa, siendo la proporción de cada aminoácido muy similar al valor medio descrito para eucariotas (Doolittle, 1987). No ocurre lo mismo con el uso de codones. En levadura, como en otros organismos, se ha sugerido el uso preferencial de ciertos codones y su relación con el nivel de expresión del gen (Benetzen y Hall, 1982; Andersson y Kurland, 1990). En *POT1* el uso de codones se aleja bastante del descrito para genes de levadura teniendo un valor de sesgo en el uso de codones bastante bajo (concretamente de 0.19) para el nivel de expresión observado, sobre todo en algunas condiciones fisiológicas como se verá en este trabajo.

El perfil de hidropatía de la secuencia de la proteína determinado mediante el algoritmo de Kyte and Doolittle (1982) muestra dos regiones muy hidrofóbicas en los extremos (sobre todo entre los aminoácidos 40-152 y 372-412) y una región central más hidrofílica (Figura 8). Dos programas del paquete informático PCGene (ROARGOS y SOAP) predicen la existencia de un segmento transmembrana al final de la proteína, entre los aminoácidos 397-415 (VVSMCIGTTGMGAAAIFI). Como se observa en la Figura 8 esta región corresponde al máximo valor de hidrofobicidad aunque éste no sea excesivamente alto. Sin embargo, ensayos bioquímicos y citológicos localizan la tiolasa peroxisomal en la matriz del orgánulo (Lazarow y Fijiki, 1985) por lo que en principio habría que poner en duda esta predicción.

TABLA II.

USO DE CODONES POR AMINOACIDOS DE *POT1*

Ala	GCT	11	Lys	AAA	16	
	GCC	15		AAG	11 = 27	
	GCA	9		Met	ATG	8 = 8
	GCG	9 = 44			Phe	TTT
Arg	CGT	0	TTC			6 = 14
	CGC	3	Pro			CCT
	CGA	1		CCC		5
	CGG	0		CCA	6	
AGA	7	CCG		1 = 19		
AGG	8 = 19	Ser	TCT	4		
Asn	AAT		15	TCC	4	
	AAC		13 = 28	TCA	5	
Asp	GAT		15	TCG	5	
	GAC	4 = 19	AGT	4		
Cys	TGT	5	AGC	2 = 24		
	TGC	3 = 8	Thr	ACT	7	
Gln	CAA	13		ACC	3	
	CAG	3 = 16		ACA	4	
Glu	GAA	18		ACG	1 = 15	
	GAG	8 = 26	Trp	TGG	0 = 0	
Gly	GGT	18		Tyr	TAT	1
	GGC	9	TAC		8 = 9	
	GGA	4	Val	GTT	9	
	GGG	7 = 38		GTC	7	
His	CAT	3	GTA	5		
	CAC	1 = 4	GTG	8 = 29		
Ile	ATT	11	---	TAA	0	
	ATC	17		TGA	0	
	ATA	5 = 33		TAG	0	
Leu	TTA	11				
	TTG	11				
	CTT	2				
	CTC	2				
	CTA	4				
	CTG	7 = 37				



**Figura 8.** Perfil de hidropatía de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *S.cerevisiae*.

Se representan los valores de los índices de hidropatía determinados en intervalos de nueve aminoácidos frente a la posición de los residuos.

### 1.3. Estructura primaria de la ORF de 705 pb.

En la Figura 9 se representa la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la ORF de 705 pb. En la región del promotor no existe una caja TATA aparente. Por el contrario, en la posición -59 hay un tramo de 12 pb poli(dA)-poli(dT). Este tipo de secuencias se ha encontrado en varios genes de levadura de expresión constitutiva como es, por lo menos respecto a la glucosa, el caso de esta ORF. Se ha sugerido que esta estructura impediría la formación de nucleosomas y permitiría la unión de la polimerasa (Struhl, 1987). No se encontraron tampoco en este gen secuencias consenso de intrones de levadura. Al igual que en el caso anterior la ORF termina con dos codones de terminación en fase. Trece pb

-240 ACTACTTTGCAATAGACATCATTTTTTTCACGTAATAAACCCACAATCGTAATGTAGTTGC  
 CTTACACTACTAGGATGGACCTTTTTGCCTTTATCTGTTTTGTTACTGACACAATGAAAC  
 -120 CGGGTAAAGTATTAGTTATGTGAAAAATTTAAAAGCATTAAGTAGAAGTATAACCATATTGT  
AAAAAAAAAAAAAGCGTTGTCTTCTACGTAAAAGTGTCTCAAAAAGAAGTAGTGAGGGAA

1 ATGGATACCAAGCTATCTGTAACAGGAGCTAAAAAATCTCAGGGAAAAGCTTCTGGTTTG  
 M D T K L S V T G A K K S Q G K A S G L

GGAAACGAAGGAACTCCAATCGGGAATGAGGAGAGCACAAATAAAGCTAAAAATGGAAAT  
 G N E G T P I G N E E S T N K A K N G N

120 AAAAAGCGGAATAAAAAATCGAAACAGAAATAAGAAGACAGAGACAAAGGAACAAAATGAA  
 K K R N K N R N R N K K T E T K E Q N E

CCTAAACCTGTGACTGGAGGGGAAGAAGTGAGAGTCGAGAAATCTCAAGCGAAAAACAGA  
 P K P V T G G E E V R V E K S Q A K N R

240 AGGCGGAAAAACAATAATGGAGCTAATAAAAAAGAATACCCTACACTACTCAAAGGAAATT  
 R R K N N N G A N K K N T L H Y S K E I

AATGTAGAAGAGCGAAAAACAATCGCAAAAAGGCAAGAAGAAATCGAACAATGCATTAC  
 N V E E R K Q I A K R Q E E I E Q C I H

360 ACCTTATCCGATTTTAAACTGTTTTAAAAAGGGTAAGCACGTTACCTCATATGGCTATCGA  
 T L S D F K L F K K G K H V T S Y G Y R

ATCTCCCCCATGACAGACTCCGGTAAGATTTCTTTGAAAATTTTATTCAACATACCTTTG  
 I S P M T D S G K I S L K I L F N I P L

480 GATTATCCAAAGGCCCAATAAAACTAACGATGAAAAGTAATGAAGAAGTTTCTCTTAC  
 D Y P K A P I K L T M K S N E E V S S Y

ATGGACACCGTGATAGCGAATTTCAACTGGAAAGCCCGTCAATTGGTTAAGGAGGACTGG  
 M D T V I A N F N W K A R Q L V K E D W

600 AGGATATTATCTCAAATAAACTATTTGGTTAGTGAGTTAGAAATATTGAAAATGGAAAAT  
 R I L S Q I N Y L V S E L E I L K M E N

TATAAACAAATTGATAAACTACGTAATAGCTTTTACAAAACCATATAAATATGAGCATAA  
 Y K Q I D K L R N S F Y K T I \* \*

720 TAAAAAGGGAGAATATTAACTATTATCAAGTATTAAAACTATTCTTTAATAAAGATGGCG  
 GCGGCACCCATACCAGTACCGATACACATACTAACAACCCCGATTTGATCCTTTTTTCAGT  
 840 TCTCTTAGTATGGTAGCTACTTGCCTTGCGCCAGTACAACCCAAGGGATGGCCTAACGCG

**Figura 9.** Secuencia de DNA de la ORF de 705 pb y sus flancos y secuencia de aminoácidos deducida de ella.

La secuencia comienza en el nucleótido 1810 desde el inicio de la transcripción del gen *SUC2*. En la región del promotor se ha subrayado el tramo de doce residuos de adenina y la secuencia consenso ARS entre -88 y -98. En el flanco 3', con asteriscos se indican los dos codones de terminación diferentes en fase con la ORF, y se ha subrayado la secuencia consenso de poliadenilación. El triplete enmarcado corresponde al triplete de terminación de *POT1*.

mas allá del triplete de terminación hay una secuencia señal de poliadenilación AATAAA descrita para muchos genes eucariotas, aunque no posee secuencias de terminación de las descritas para otros genes de levadura (Wehals, 1987; Russo *et al.*, 1991).

La secuencia en dirección opuesta a la ORF entre las posición -138 y -148 coincide en 10 de sus 11 nucleótidos con la secuencia consenso del núcleo del ARS (Williamson, 1985; van Houten y Newton, 1990). Además posee otra secuencia (la caja ARS) entre -109 y -114 que es necesaria para la función ARS (Marunouchi *et al.*, 1987). Esta región coincide con un sitio hipersensible a la digestión con DNaseI (Pérez-Ortín *et al.*, 1986) y se ha demostrado que actúa como posicionador de nucleosomas (Matallana, 1989). El hecho de que se encuentre tan próximo a la ORF de 705 pb hace interesante su estudio. De hecho, secuencias consenso ARS se han descrito en los promotores de otros genes interviniendo en su regulación, como es el caso de los "silenciadores" de los genes *HML* y *HMR* (Brand *et al.*, 1988). Además, proteínas que se unen a secuencias asociadas a funciones ARS también lo hacen a promotores de diversos genes (Buchman y Kornberg, 1990) controlando su regulación.

Con el objeto de caracterizar dicha secuencia, se intentó en primer lugar determinar si esta secuencia ARS era funcional o no como origen de replicación. Para ello se construyó primeramente el plásmido pSUC309a (Figura 10). Este plásmido contiene un fragmento *KpnI*-*HindIII* que cubre el final del gen *SUC2* incluyendo la secuencia consenso ARS (ver Figura 3) clonado en vector pUC18. Como gen marcador, se clonó en una segunda etapa el fragmento *HindIII* de 1.1 kb que contiene el gen *URA3* en dicho plásmido obteniéndose el pSUC309b. Con éste plásmido, que no contiene origen de replicación autónomo de levadura salvo el posible ARS clonado, se transformó la cepa SEY2101 y se seleccionaron transformantes capaces de crecer en medio sin uracilo. A diferencia de la transformación control con plásmido YRp10, que contiene el ARS1, sólo se observó la aparición de colonias abortivas, por lo que el plásmido pSUC309b no era estable en la levadura. Debido a que se han descrito otros dos elementos además de la secuencia consenso central para el funcionamiento de los ARS y que dichos elementos pueden encontrarse a una distancia variable a ambos lados de la misma (Williamson, 1985), se decidió realizar otra estrategia de clonación

que abarcará una región... anteriormente analizada. Así, se clonó el fragmento... psUC EE (ver Figura 3), que se extiende hasta el sitio *Bam* HI utilizado en la construcción en vector YIp5, obteniéndose el plásmido pYI BE (Figura 10). Con dicho plásmido se volvió a transformar SEY2101 y nuevamente en las direcciones opuestas, al igual que en el control con YIp5 y a diferencia de la transformación con YRp10. Todos estos resultados permiten por tanto concluir que la secuencia consenso ARS existente en el flanco 5' de la ORF de 705 pb no funciona como origen de replicación, al menos en plásmido.

También se estudió en esta región una secuencia asociada al andamiaje nuclear como se ha descrito para algunas secuencias ARS (Amati y Gasser, 1988; Amati, 1990). Los resultados obtenidos fueron negativos, no observándose ninguna actividad de esta región por el andamiaje nuclear (Amati, comunicación personal).

La ORF codifica un polipéptido de 235 residuos y 27112 daltons de masa molecular relativa. La comparación de la secuencia de esta ORF con las bases de datos no dio homología significativa con ninguna proteína. Por otro lado, la cepa SEY2101 que presenta una delección completa de la ORF tampoco presenta actividad por el andamiaje nuclear, lo que no se ha podido sacar una conclusión acerca de la identidad de la proteína.

El análisis de la secuencia de la ORF muestra un número de aminoácidos cargados, en concreto un 34% de aminoácidos básicos (Tabla III). Hay un 12% de residuos ácidos y un 22% de aminoácidos neutros, destacando que un 15% de los aminoácidos totales de la proteína son lisinas. Además, presenta también una gran proporción de aminoácidos hidroxilados (17%) y de asparagina, el segundo aminoácido más abundante (10%). Como consecuencia de ello, el conjunto de aminoácidos polares supone el 71% de la proteína, un valor bastante alto comparado con el promedio de 59% calculado para las proteínas eucariotas (Doolittle, 1987). Esta composición tan rica en aminoácidos polares puede estar relacionada con la localización nuclear de esta proteína, una secuencia similar a las descritas como responsables de la localización nuclear de diversas proteínas (Silver y Hall, 1988) se encuentra entre los residuos 39-45 (GNKRRNK).

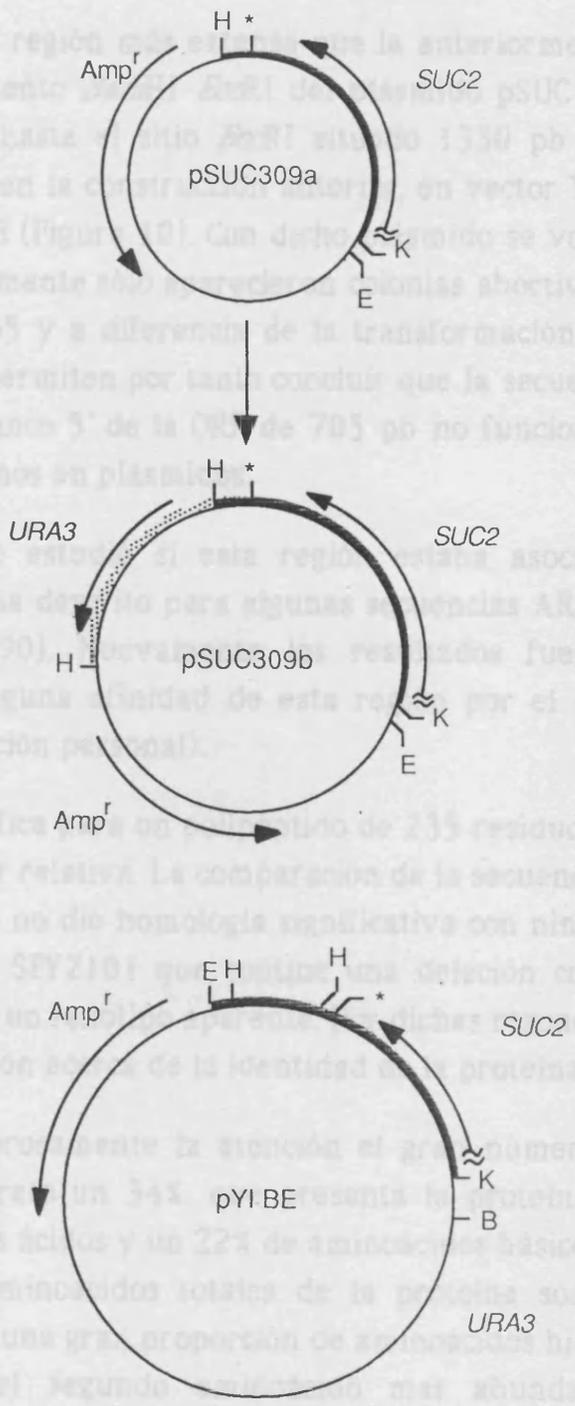


Figura 10. Esquema de los plásmidos construídos para el estudio de la secuencia consenso ARS. Los enzimas de restricción relevantes son: B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I. El asterisco indica la posición de la secuencia consenso ARS.

que abarcara una región más extensa que la anteriormente analizada. Así, se clonó el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI del plásmido pSUC KE (ver Figura 3), que se extiende hasta el sitio *Eco*RI situado 1330 pb más allá del sitio *Hind*III utilizado en la construcción anterior, en vector YIp5, obteniéndose el plásmido pYIBE (Figura 10). Con dicho plásmido se volvió a transformar SEY2101 y nuevamente sólo aparecieron colonias abortivas, al igual que en el control con YIp5 y a diferencia de la transformación con YRp10. Todos estos resultados permiten por tanto concluir que la secuencia consenso ARS existente en el flanco 5' de la ORF de 705 pb no funciona como origen de replicación, al menos en plásmidos.

También se estudió si esta región estaba asociada al andamiaje nuclear como se ha descrito para algunas secuencias ARS (Amati y Gasser, 1988; Amati, 1990). Nuevamente los resultados fueron negativos, no observándose ninguna afinidad de esta región por el andamiaje nuclear (Amati, comunicación personal).

La ORF codifica para un polipéptido de 235 residuos y 27112 daltons de masa molecular relativa. La comparación de la secuencia de esta ORF con las bases de datos no dió homología significativa con ninguna proteína. Por otro lado, la cepa SEY2101 que contiene una delección completa de la ORF tampoco presenta un fenotipo aparente. Por dichas razones no se ha podido sacar una conclusión acerca de la identidad de la proteína.

Llama poderosamente la atención el gran número de aminoácidos cargados, en concreto un 34%, que presenta la proteína (Tabla III). Hay un 12% de residuos ácidos y un 22% de aminoácidos básicos, destacando que un 15% de los aminoácidos totales de la proteína son lisinas. Además, presenta también una gran proporción de aminoácidos hidroxilados (17%) y de asparragina, el segundo aminoácido más abundante (10%). Como consecuencia de ello, el conjunto de aminoácidos polares supone el 71% de la proteína, un valor bastante alto comparado con el promedio de 59% calculado para las secuencias eucariotas (Doolittle, 1987). Esta composición tan rica en aminoácidos cargados y sobre todo básicos hace pensar en una posible función estructural de la proteína, probablemente relacionada con ácidos nucleicos. En relación con esta idea, una secuencia similar a las descritas como responsables de la localización nuclear de diversas proteínas (Silver y Hall, 1988) se encuentra entre los residuos 39-45 (GNKCRNK).

TABLA III.

## USO DE CODONES POR AMINOACIDOS DE ORF

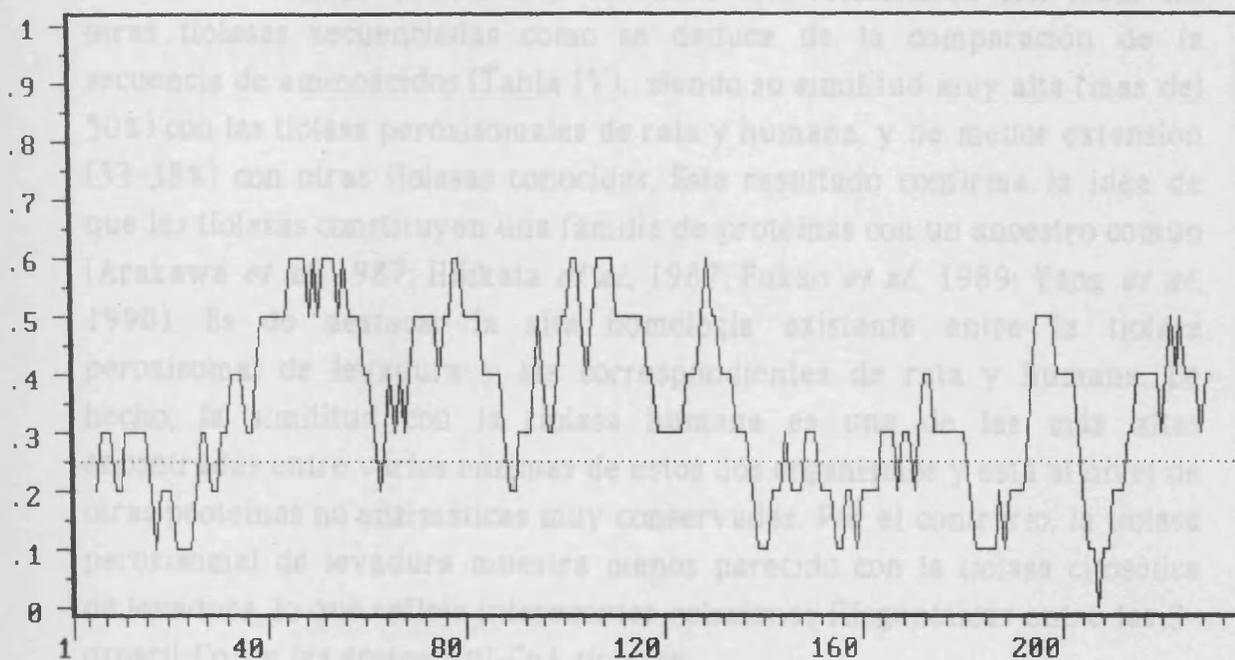
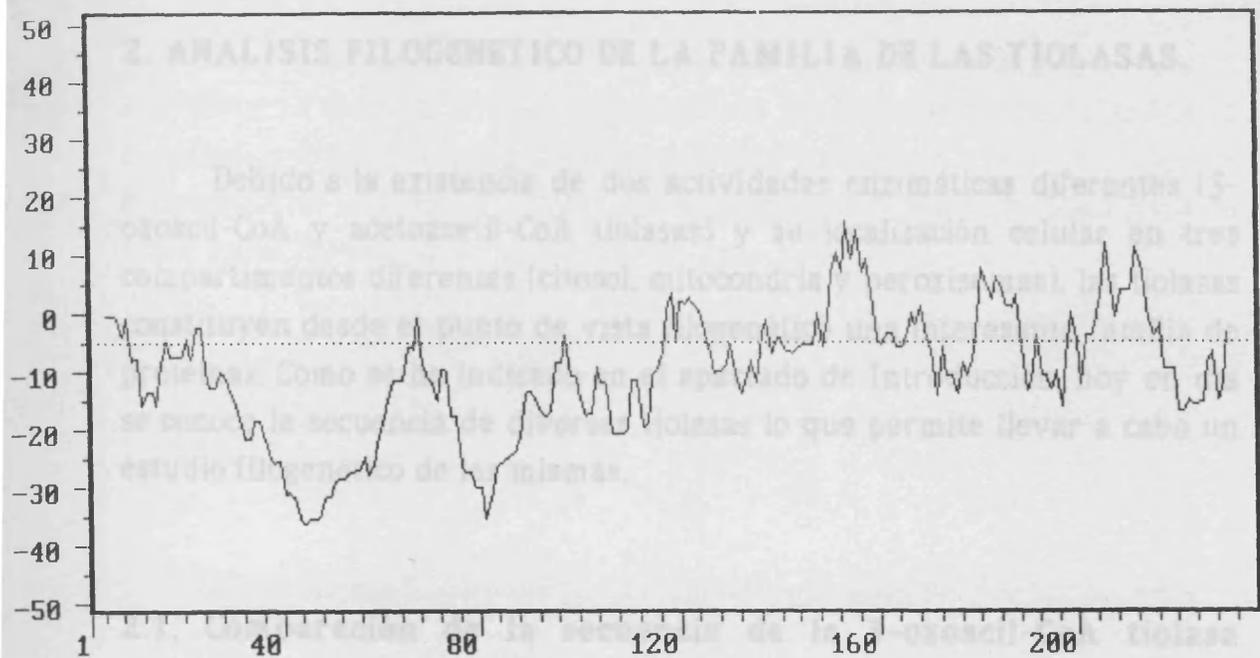
Ala	GCT	4	Lys	AAA	14	
	GCC	2		AAG	12 = 26	
	GCA	1	Met	ATG	5 = 5	
	GCG	2 = 9		Phe	TTT	3
Arg	CGT	2	TTC		2 = 5	
	CGC	0	Pro		CCT	3
	CGA	3			CCC	1
	CGG	2			CCA	3
	AGA	3			CCG	0 = 7
	AGG	3 = 13		Ser	TCT	7
Asn	AAT	17	TCC		4	
	AAC	7 = 24	TCA		2	
Asp	GAT	4	TCG		0	
	GAC	3 = 7	AGT		2	
Cys	TGT	0	AGC	2 = 17		
	TGC	1 = 1	Thr	ACT	2	
Gln	CAA	8		ACC	6	
	CAG	1 = 9		ACA	5	
Glu	GAA	14		ACG	1 = 14	
	GAG	7 = 24	Trp	TGG	2 = 2	
Gly	GGT	3		Tyr	TAT	5
	GGC	1	TAC		3 = 8	
	GGA	7	Val	GTT	4	
	GGG	2 = 13		GTC	1	
His	CAT	0		GTA	2	
	CAC	3	GTG	3 = 10		
Ile	ATT	5	---	TAA	0	
	ATC	4		TGA	0	
	ATA	7 = 16		TAG	0	
Leu	TTA	4	---	TAA	0	
	TTG	6		TGA	0	
	CTT	0		TAG	0	
	CTC	0				
	CTA	4				
	CTG	1 = 15				

Si la composición de la proteína es llamativa, no lo es menos la distribución que tienen los aminoácidos a lo largo de la secuencia. Como se observa en la Figura 11, el perfil de hidropatía muestra una primera mitad de la secuencia totalmente hidrofílica (solo hay un 20% de aminoácidos hidrofóbicos) mientras que la segunda mitad tiene unas características anfipáticas. Los aminoácidos cargados se distribuyen en la primera mitad de la secuencia, sobre todo en lo que respecta a los básicos (Figura 11). La región comprendida entre las posiciones 34 y 132 está especialmente enriquecida en aminoácidos cargados con un 34% de básicos y un 13% de ácidos.



Figura 11. Perfil de hidropatía y distribución de los aminoácidos cargados a lo largo de la secuencia de la proteína de 265 aa.

Se representaron los valores de los índices de hidropatía así como el porcentaje de aminoácidos cargados (+), básicos (+) y ácidos (-) en intervalos de veinte aminoácidos, según a la posición de los residuos.



**Figura 11.** Perfil de hidropatía y distribución de los aminoácidos cargados a lo largo de la secuencia de la ORF de 705 pb.

Se representan los valores de los índices de hidropatía (A) y el porcentaje de aminoácidos cargados (B), determinados ambos parámetros en intervalos de nueve aminoácidos, frente a la posición de los residuos.

## 2. ANALISIS FILOGENETICO DE LA FAMILIA DE LAS TIOLASAS.

Debido a la existencia de dos actividades enzimáticas diferentes (3-oxoacil-CoA y acetoacetyl-CoA tiolasas) y su localización celular en tres compartimentos diferentes (citosol, mitocondria y peroxisomas), las tiolasas constituyen desde el punto de vista filogenético una interesante familia de proteínas. Como se ha indicado en el apartado de Introducción, hoy en día se conoce la secuencia de diversas tiolasas lo que permite llevar a cabo un estudio filogenético de las mismas.

### 2.1. Comparación de la secuencia de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *S.cerevisiae* con otras tiolasas.

La tiolasa peroxisomal de levadura esta relacionada con todas las otras tiolasas secuenciadas como se deduce de la comparación de la secuencia de aminoácidos (Tabla IV), siendo su similitud muy alta (mas del 50%) con las tiolasa peroxisomales de rata y humana, y de menor extensión (33-38%) con otras tiolasas conocidas. Este resultado confirma la idea de que las tiolasas constituyen una familia de proteínas con un ancestro común (Arakawa *et al.*, 1987; Hijikata *et al.*, 1987; Fukao *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1990). Es de destacar la alta homología existente entre la tiolasa peroxisomal de levadura y las correspondientes de rata y humana. De hecho, la similitud con la tiolasa humana es una de las más altas encontradas entre varios enzimas de estos dos organismos y está al nivel de otras proteínas no enzimáticas muy conservadas. Por el contrario, la tiolasa peroxisomal de levadura muestra menos parecido con la tiolasa citosólica de levadura, lo que refleja interesantes relaciones filogenéticas entre las 3-oxoacil-CoA y las acetoacetyl-CoA tiolasas.

La comparación de la secuencia de *POT1* con cada una de las secuencias de las demás tiolasas se muestra en la Figura 12. Esta figura revela que la homología entre la tiolasa peroxisomal de levadura y las otras tiolasas es mucho mayor en la parte carboxilo terminal de las proteínas. Así, mientras la similitud global de las tiolasas peroxisomales de levadura y humana es del 52%, en la región entre los aminoácidos 180 a 417 (las

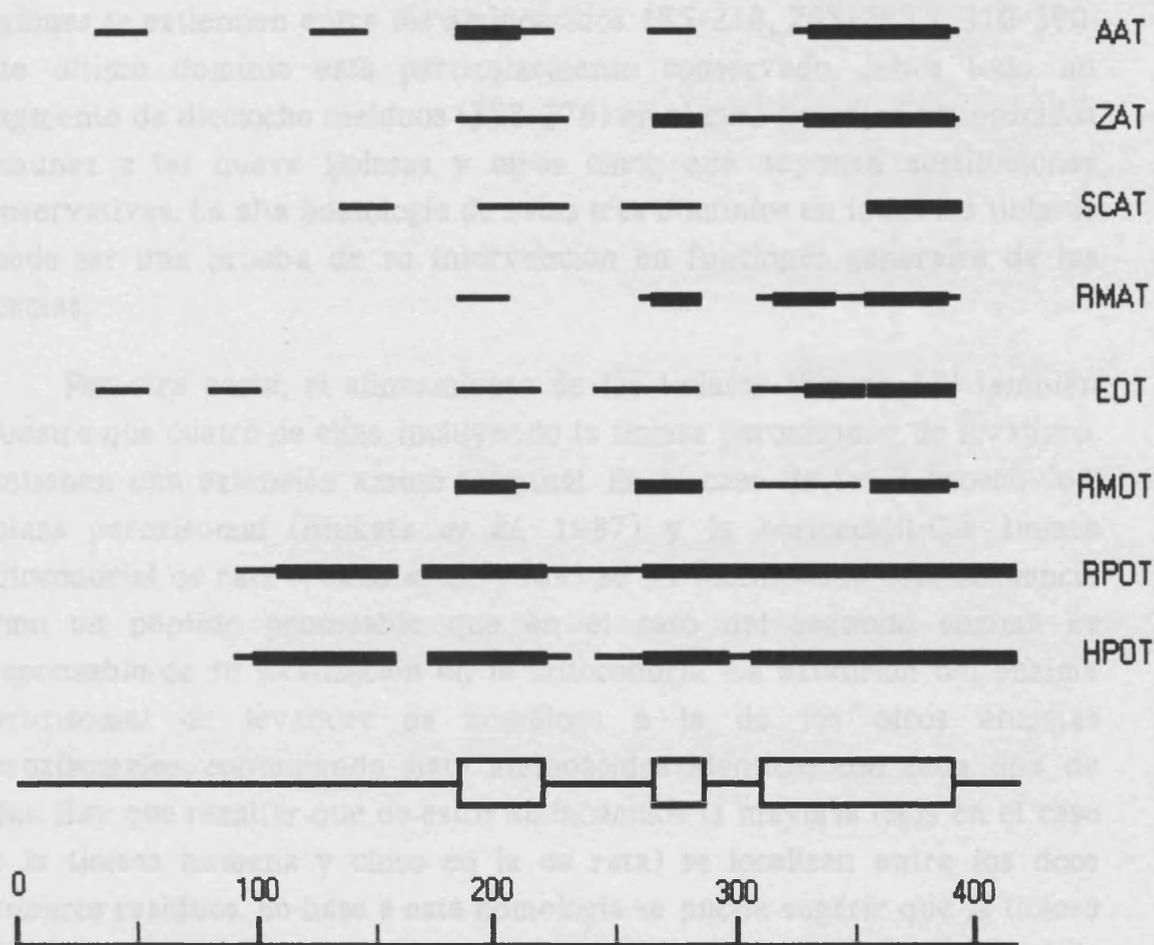
posiciones de los aminoácidos se refieren siempre a la secuencia de *POT1* este valor se eleva al 63%. Sin embargo, en la parte amino terminal (hasta el aminoácido 181) la similitud es sólo del 38%. El alineamiento múltiple de las secuencias (Figura 13) indica que este hecho es una propiedad general entre todas las tiolasas.

**TABLA IV.**

Similaridad (%) entre las secuencias de las tiolasas.

	SPOT	HPOT	RPOT	RMOT	EOT	RMAT	SCAT	ZAT
HPOT.....	51							
RPOT.....	52	86						
RMOT.....	35	38	37					
EOT.....	38	42	42	39				
RMAT.....	35	34	34	39	33			
SCAT.....	33	34	34	38	34	51		
ZAT.....	38	41	40	41	40	42	40	
AAT.....	37	42	42	42	42	47	42	63

Las abreviaturas utilizadas son: SPOT, 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de levadura; HPOT, 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal humana; RPOT, 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de rata; RMOT, 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial de rata; RMAT, acetoacetyl-CoA tiolasa mitocondrial de rata; SCAT, acetoacetyl-CoA tiolasa citosólica de *S. uvarum*; ZAT, acetoacetyl-CoA tiolasa de *Z. ramigera*; AAT, acetoacetyl-CoA tiolasa de *A. eutrophus*.



**Figura 12.** Comparación de la secuencia de *POT1* con las de las otras tiolosas.

Se han representado con líneas los tramos que daban una línea recta en las matrices de puntos obtenidos al comparar la secuencia de *POT1* con cada una de las otras tiolosas. Todas las determinaciones de regiones homólogas se realizaron con un tamaño de ventana de 20 aminoácidos y con una similitud mínima del 50% (líneas delgadas) o del 60% (líneas gruesas). La línea recta con tres rectángulos y la escala de debajo indican la longitud de la secuencia de *POT1*. Los rectángulos representan las regiones muy similares entre todas las tiolosas. Las abreviaturas son las mismas que en la Tabla IV.

Se han identificado en la segunda mitad de la proteína tres dominios que han sido especialmente conservados durante la evolución. Estas regiones se extienden entre los aminoácidos 185-218, 265-285 y 310-390. Este último dominio está particularmente conservado, sobre todo un fragmento de dieciocho residuos (358-376) en el cual hay diez aminoácidos comunes a las nueve tiolasa y otros cinco que suponen sustituciones conservativas. La alta homología de estos tres dominios en todas las tiolasa puede ser una prueba de su intervención en funciones generales de las mismas.

Por otra parte, el alineamiento de las tiolasa (Figura 13) también muestra que cuatro de ellas, incluyendo la tiolasa peroxisomal de levadura, contienen una extensión amino terminal. En el caso de las 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal (Hijikata *et al.*, 1987) y la acetoacetyl-Coa tiolasa mitocondrial de rata (Fukao *et al.*, 1989) se ha identificado esta secuencia como un péptido procesable que en el caso del segundo enzima es responsable de su localización en la mitocondria. La extensión del enzima peroxisomal de levadura es homóloga a la de los otros enzimas peroxisomales, conteniendo siete aminoácidos idénticos con cada una de ellas. Hay que resaltar que de estos aminoácidos la mayoría (seis en el caso de la tiolasa humana y cinco en la de rata) se localizan entre los doce primeros residuos. En base a esta homología se puede sugerir que la tiolasa peroxisomal de levadura, al igual que la de rata, se sintetice en forma de precursor aunque no es posible concluir la longitud de la presecuencia.

Se han sugerido dos mecanismos alternativos para la aparición de presecuencias, uno a través de acumulación de mutaciones y otro mediante procesos de reordenamiento (Baker y Schatz, 1987). El hecho de que sólo algunas de las tiolasa contengan extensiones amino terminal sugiere que en este caso concreto las presecuencias aparecerían por el segundo mecanismo, adquiriendo las tiolasa peroxisomales y la acetoacetyl-CoA tiolasa mitocondrial de rata sus presecuencias en algún momento durante la evolución. Por otra parte, la presencia de una región conservada en los doce primeros aminoácidos de la misma en el caso de los enzimas peroxisomales indica probablemente que esta presecuencia tuvo un origen común para los tres enzimas y reafirma la suposición de que la extensión

1

	* ** *					
SPOT	MSQRLQSIKD	HL---VESAM	OKGESKRKMS	LLEKRPE--D	VVIVAAARSA	IGKGFKAQFK
HPOT	M-QRLQVVLG	HLRGPADSGW	MPQAAPCLSG	APQASAA--D	VVVVHGRTA	ICRAGRGQFK
RPOT	M-HRLQVVLG	HLAQRSESS	ALQAAPCSAG	FPQASAS--D	VVVVHGRTP	WRRAGRGQFK
RHOT				MALLRG	VFIVAAKRTP	FG-AYGGLLK
EOT				MEQ	VVIVDAIRTP	MGRSKGGAFR
RHAT	M-AALAVLKG	VVRRPLLRG-	LLQEVRCLGR	SYASKPTLND	VVIVSATRTP	IG-SFLGSLA
SCAT				MSQN	VVIVSTARTP	IG-SFGSLS
ZAT				MSTP	V-IAS-ARTA	VG-SFNGAFA
AAAT				MTD	V-IVSAARTA	VG-KFGGSLA

\* . . . \* . . \*

56

SPOT	DVNTDYLLYN	FLNEFIGRFP	EPLRADLMLI	EEV---ACGN	VLNVGAGAT-	EHRAACLASG
HPOT	DTTPDELLSA	VMTAVLKDV-	-MLRPEQ--L	GDI---CVGN	VLQPGAGAI-	MARIAQFLSD
RPOT	DTTPDELLSA	VLTAVLQDV-	-KLKPEC--L	GDI---SVGN	VLQPGAGAA-	MARIAQFLSG
RHOT	DFTATDLTEF	AARAALSA--	OKV--PPETI	DSVI---VGN	VMSSSDAAY	LARHVGLRVG
EOT	NVRAEDLSAH	LMSRLLARNP	A---LEAAAL	DDIYWGCVCQ	TLEQGFN---	IARNAALLAE
RHAT	SQPATKLOTI	AIQGAIEK--	ASI--PKEEV	KEYY---MGN	VIQGGEGQA-	PTRQATLGAG
SCAT	SKTAVELGAA	ALNGALAK--	VPELDASKDF	DEII---FGN	VL SANLQQA-	PARQVYALTAG
ZAT	WPAHELQAT	VISAVLER--	AGV--AAGEV	NEVI---LQ	VLPAGEQQN-	PARQAAMKAG
AAAT	KIPAPELQAV	VIKAALER--	AGV--KPEQV	SEVI---MQ	VLTAGSQQN-	PARQAAMKAG

112

SPOT	IPYSTPFVAL	NRQCSSOLTA	VNDIANKIKV	GQIDIGLALG	VESMTNWKYK	VNPLGMSSE
HPOT	IPETVPLSTV	NRQCSSOLQA	VASIAGGIRN	OSYDIGMACG	VESMSLADRG	-NF-ONITSR
RPOT	IPETVPLSAV	NRQCSSOLQA	VANIAGGIRN	OSYDIGMACG	VESMTL SERG	-NF-ONISSR
RHOT	VPTETGALT	NRLCQSQFQS	IYQCCQICIS	KDAEYVLCQG	TESMSQSPYS	VRWVRFQTKF
EOT	VPHSYPAVTV	NRLCQSSMJA	LHDAARMIHT	QDAQACLVOG	VERHGHV---	--PMSHGVDF
RHAT	LPIATPCTTV	NKYCASOMKA	IMIASQSLMC	GHQDVMVAGG	MESMSNVPYF	MS--RGATPY
SCAT	LGNHIVATTV	NKYCASAMKA	IILQASIKC	GNADVVVYAGG	CE SMTNAPYY	MPAARGGAKF
ZAT	VPQEATAWGM	NQLCQSQSRA	VALQMQIAT	QDASIIYVAGG	MESMSMAPHC	--AKLAGVYM
AAAT	LPAMVPAMTI	NKYCQSQSLLA	VMLAANAIMA	QDAEIVVYAGG	QEMISAAPHV	LPQSRDGFRI

\* . . . \* . . \*

172

SPOT	ELQKNREAKK	CL-----	-IPMGITWEN	VAANFKISRK	DQDEFAANSY	QKAYKAKNEG
HPOT	LMEKEK-ARD	CL-----	-IPMGITSEN	VAERFGISRE	KQDTFALASQ	QKAARAQSKG
RPOT	LLENEK-ARD	CL-----	-IPMGITSEN	VAERFGISRQ	KQDAFALASQ	QKAASAQSKG
RHOT	GLDLKLEDTL	-WAGLTDQHV	KLPMGITAEN	LAAKYMSRE	DCDRYALQSQ	QRWKAANEAG
EOT	HPGLSRNVAK	AA-----	-GUTGLTAEM	LARMHGISRE	MQDAFAARSH	ARAWAATQSA
RHAT	G-GVKLEDLI	VKDGLTDVYN	KIHGHCNAEN	TAKKLSISRE	EQDKYAIGSY	TRSKEAWDAG
SCAT	G-QTVLIDGV	ERDGLNDAYD	GLAMGVHAEK	CARDWDITRD	QQDSFAIESY	QKSQQSQKEG
ZAT	G-DFKIMIDM	IKDGLTDAFY	GVRHBTTAEN	VAKQWQLSRD	EQDAFAYASQ	NKAEAAQKDG
AAAT	G-DAKLVDTM	IVDGLWDVYN	QYRHGITAEN	VAKYEGITRE	AQDEFAYQSQ	NKAEAAQKAG

\*\* \* \* \* . . . \* . . \*

223

SPOT	LFEDAILPIK	LP-----	DQSIQSDQEG	PRPNVTAESL	SSIRPAFIKD	RGTTTAGNAS
HPOT	CFQAEIVPYT	TTVHDDKQTK	RSITVTQDEG	IRPSTTMEGL	AKLKPAF-KK	DGSTTAGNSS
RPOT	CFRAEIVPYT	TTVLDDKQDR	KTITVSDQEG	VRFSTTMEGL	AKLKPAF-KD	GGSTTAGNSS
RHOT	YFNEEMAPIE	VKTIKKQK---	QTMQV--DEH	ARPQTLEQL	QNLPPVFKKE	-GTVTAGNAS
EOT	AFKNEIIP--	TGGHDADGVY	KQFNY--DEV	IRPETTVEAL	ATLRPAFDPV	NGMVTAGTSS
RHAT	KFANEIMPIT	I-SYKQK---	PDVVYKEDDEE	YKR-VDFSKV	PKLKTVFQKE	NGVYTAANAS
SCAT	KFDNEIVPYT	IKGFRQK---	PDTQVWDEE	PAR-LHVEKL	KSARTVFPQRE	NGVYTAANAS
ZAT	RFKDEIVPFI	VKGRKQD---	--ITVDADEY	IRHGATLDSM	AKLRPAFQKE	-GTVTAGNAS
AAAT	KFDEEIVPVL	IPQRKQD---	-PVAFKTDEF	VROGATLDSM	SGLKPAFDKA	-GTVYTAANAS

\* . . \*

\*\*

\* . . \*

\* . . . . \*

275

SPOT	QVSDG7AGYL	LARRSVANQL	NLPVLRGYID	FQTVGVPPEI	MGVGPAYAIP	KVLEATGLQ-
HPOT	QVSDGAAASP	AARRSKAEEL	GLPILGVLRS	YAVVGVPPDI	MGIGPAYAIP	VALQKAGLT-
RPOT	QVSDGAAAVL	LARRSKAEEL	GLPILGVLRS	YAVVGVPPDI	MGIGPAYAIP	AALQKAGLT-
RHDT	GMSDGAGVVI	IASEDAVKKH	NFTPLARVVG	YFVSGCDPAI	MGIGPVPAIT	GALKKAGLS-
EOT	ALSDGAAAML	VMSESAHEL	GLKPRARVRS	MAVVGCDPSI	MGVGPVPASK	LALKKAGLS-
RHAT	TLNDGAAAVV	LMTAEAAQRL	KYKPLARIAA	FADAAVDPID	FPLAPAYAVP	KYLKYAGLKK
SCAT	PINDGAAATI	LYSERVLKEK	NLKPLAIVKG	WGEAAHLPAD	FTWAPSLAVP	KALKHAGIED
ZAT	GLNDGAAAAL	LMSEAEASRR	GIQPLGRIYS	WATVGVDPKV	MGTGPIPASR	KALERAGWK-
AAT	GLNDGAAAVV	VMSAAKAKEL	GLTPLATIKS	YANAGVDPKV	MGVGPVPASK	RALSRAEWT-

..\*\*.. \* \* \* \*

334

SPOT	VQDIDIFEIN	EAFAAQALYC	IHKLGIDL--	-NKVMPRGGG	IALGHPLGCT	GARQVATILR
HPOT	VSDVDIFEIN	EAFASQAAYC	VEKLRLPF--	-EKVNLPGA	VALGHPLGCT	GARQVITLLN
RPOT	VNDIDIFEIN	EAFASQALYC	VEKLGIPA--	-EKVNLPGA	IALGHPLGCT	GARQVVTLLN
RHDT	LKMDLIDVH	EAFAPQFLAV	QKSLDLDP--	-SKTVSOGG	IALGHPLGGS	GRITAKLVH
EOT	ASDVGTFEMN	EAFAAQILPC	IKDLGLIEQI	DEKINLNGG	IALGHPLGCS	GARISTLLN
RHAT	-EDIAMFEVN	EAFSVVLAN	IKMLEIDP--	-QKYNVHGG	VSLGHPIGMS	GARIVVHLAH
SCAT	INSVDYFEFN	EAFSVVGLVN	TKILKLDP--	-SKVNVYGG	VALGHPLGCS	GARVVVTLIS
ZAT	IGDLDLVEAN	EAFAAQACAV	NKDLGWDP--	-SIVNVNGG	IAIGHPIGAS	GARILNTLLF
AAT	PQDLDLMEIN	EAFAAQALAV	HQQMWDT--	-SKVNVNGG	IAIGHPIGAS	GRILVTLH

... \* \*\*\* \* \*\*\* \* \*\*\* \* \* \*

391

SPOT	ELK---KDQI	GVSCKIGTG	MGAAAFI--	KE
HPOT	ELKRRGKRAY	GVSCKIGTG	MGAAAVFEYP	GN
RPOT	ELKRRGRRAY	GVSCKIGTG	MGAAAVFEYP	GN
RHDT	ELRRRGK-Y	AVGSACIGGG	QGILIIQ-N	TA
EOT	LMERKDVQ-F	GLADGCVS-G	LQGIATVFE	RV
RHAT	ALKQ--GE-F	GLASICNGGG	GASAV----	L-
SCAT	ILQEGGK-I	GVAICNGGG	GASSVIE-K	L-
ZAT	EMKRRGAR-K	GLATLCIGGG	MGVAKIE-S	L-
AAT	EMKRRDAK-K	GLASLCIGGG	MGVALAVE-R	K-

... \* \* \*

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de las tiolasas.

Las abreviaturas son las mismas que en la Tabla V y se ha utilizado el código de una letra para los aminoácidos. Se han insertado huecos (-) para permitir una máxima homología. La numeración se refiere a la secuencia de *PVT1*. Los asteriscos reflejan los aminoácidos idénticos en todas las tiolasas y los puntos representan sustituciones conservativas. Los asteriscos y puntos encima de la primera línea indican las homologías en la extensión amino terminal entre las tiolasas peroxisomales.

amino terminal es un dominio característico peroxisomal añadido durante la evolución a un ancestro común con el objeto de realizar funciones relacionadas con su localización peroxisomal.

En un principio la extensión amino terminal parecía un candidato interesante para dirigir las proteínas a los peroxisomas. Sin embargo, no está clara su intervención en el proceso (Miura *et al.*, 1984). Las tiolasa peroxisomales deben por tanto, como el resto de enzimas peroxisomales, contener la información necesaria para ir al peroxisoma en la secuencia de la proteína madura (Lazarow y Fujiki., 1985). La tiolasa de levadura como las de rata y humana no contienen el tripéptido terminal SKL o análogo que se ha visto que funciona como señal de localización peroxisomal (Gould *et al.*, 1989). Tampoco muestra homología con las regiones identificadas en la acil-CoA oxidasa de *C.tropicalis* con la misma función. La comparación con otras proteínas peroxisomales de *S.cerevisiae* también ha dado un resultado negativo en la búsqueda de un elemento común que pudiera relacionarse con la localización del enzima.

Otro aspecto de interés es el referente a las dos cisteínas involucradas en el mecanismo de la reacción de la tiolasa. Las tiolasa se unen covalentemente al grupo acilo durante la primera etapa de la reacción para formar intermediarios acil-enzima (Gehring y Harris, 1970). Con el conocimiento de las secuencias se ha podido determinar que el residuo Cys-89 de la tiolasa de *Z.ramigera* es el tiol nucleófilo en el sitio activo (Thompson *et al.*, 1989). Por otro lado, en el paso de desprotonación durante la reacción de condensación interviene la Cys-387 del mismo enzima (Masamune *et al.*, 1989). Como se observa en la Figura 13 ambas cisteínas se han conservado en todas las tiolasa, correspondiendo a las Cys-125 y Cys-403 respectivamente de la secuencia de *POT1*.

Las secuencias alrededor de estos residuos activos tienen una significativa homología. Así, la secuencia que rodea a la Cys-125 esta muy conservada entre las acetoaceti-CoA tiolasa eucarióticas por un lado (la tiolasa citosólica de levadura y la mitocondrial de rata tienen 12 de los 13 aminoácidos iguales) y entre los enzimas peroxisomales por otro (10 de los 13 aminoácidos son comunes a las tres proteínas). Además, ambos grupos de secuencias mantienen una homología global importante, con siete

residuos comunes (Figura 14). Las divergencias en esta región pueden relacionarse con las diferentes especificidades de sustrato de los enzimas. Reafirmando esta idea, se observa que las secuencias en esta región de las 3-oxoacil-CoA tiolosas de *E.coli* y mitocondrial de rata se parecen más a la secuencia de las tiolosas peroxisomales, mientras que la secuencia de la tiolosa de *A.eutrophus* es muy parecida a la secuencia de las acetoacetyl-CoA tiolosas eucarióticas. Se puede proponer por tanto, en base a las homologías observadas, secuencias consenso para los centros activos de las 3-oxoacil-CoA tiolosas (similares a las descrita previamente por Yang *et al.*, 1990) y de las acetoacetyl-CoA tiolosas, como se indican en la Figura 14.

PT	A <sub>T</sub>	V <sub>L</sub>	N	R	Q	C	S	S	G	L	Q <sub>T</sub>	A	V
RHOT	T	L	N	R	L	C	G	S	G	F	Q	S	I
EOT	T	V	N	R	L	C	G	S	S	M	Q	A	L
EAT	T	V	N	K	V	C	A	S	G <sub>A</sub>	M	K	A	I
ZAT	G	M	N	Q	L	C	G	S	G	L	R	A	V
ΔAT	T	I	N	K	V	C	G	S	G	L	A	A	V
OT	T <sub>A</sub>	V <sub>L</sub>	N	R	Q <sub>L</sub>	C	S <sub>G</sub>	S	G	-	Q	A	-
AT	T	-	N	K	V	C	A <sub>G</sub>	S	G	M <sub>L</sub>	-	A	I <sub>V</sub>

**Figura 14.** Comparación de las secuencias alrededor del sitio de unión del sustrato.

Se han alineado las secuencias de todas las tiolosa alrededor del residuo de Cys involucrado en la unión del sustrato. PT es la secuencia consenso de las tiolosas peroxisomales y EAT la secuencia consenso de las acetoacetyl-CoA tiolosas citosólica de levadura, mitocondrial de rata y de corazón de cerdo (Gehring y Harris, 1970). El resto de abreviaturas son las mismas que en la Tabla V. Las secuencias consenso propuestas para las acetoacetyl-CoA tiolosas y 3-oxoacil-Coa tiolosas se han representado por AT y OT respectivamente.

Respecto a la Cys-403, cabe resaltar que las tiolasas peroxisomales contienen un fragmento de 15 aminoácidos iguales en esta región (del aminoácido 398 al 412). Sin embargo, *POT1* no muestra una alta homología en esta secuencia con el resto de las tiolasas, como se ve en la Figura 12. Una posibilidad atractiva es que esta secuencia pueda estar relacionada con la naturaleza peroxisomal del enzima, aunque no se han encontrado secuencias similares en otras proteínas peroxisomales.

## 2.2. Árboles filogenéticos de las secuencias de DNA y proteínas.

Se han construido árboles filogenéticos para las secuencias de proteínas (Figura 15) y de DNA (Figura 16). Ambos muestran en principio la misma topología. Los intervalos de confianza para las ramificaciones son iguales y altamente significativos (99.9%) para todos los puntos excepto uno, como se comenta más adelante. Además, permanecen invariables después de 200-250 remuestreos ("bootstrap replicates"). Por ello, el proceso evolutivo propuesto para las secuencias es muy consistente.

Se pueden definir dos grupos monofiléticos claramente diferenciados que aparecen en todas las réplicas: uno consiste en la 3-oxoacil-CoA mitocondrial de rata y las cuatro acetoacetyl-CoA tiolasas y otro compuesto por las tiolasas peroxisomales y de *E.coli*. Basándose en esta agrupación se eligió la raíz del árbol de forma arbitraria entre los dos clusters correspondientes a los dos grupos de proteínas.

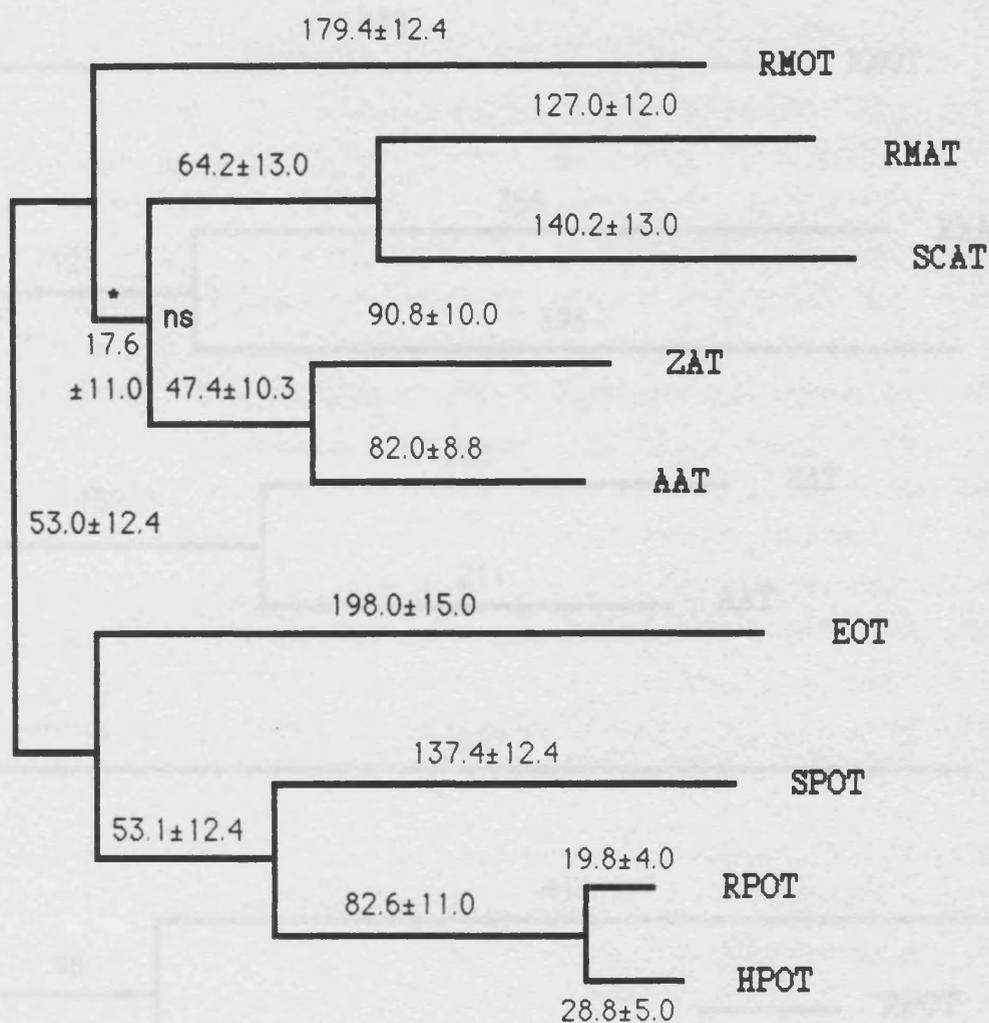
El orden de ramificación dentro del primer grupo no está completamente definido. De hecho, a partir del análisis de las secuencias de DNA se puede proponer una tricotomía con los dos pares de acetoacetyl-CoA tiolasas y la 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial de rata, ya que esta última aparece en el 26% de los casos agrupada con el par de acetoacetyl-CoA tiolasas eucarióticas. Además, la distancia internodal que separa las acetoacetyl-CoA procarióticas y eucarióticas no es diferente de cero al aplicar el método de los percentiles (Efron, 1982) a las diferentes réplicas. Sin embargo, en el caso de las secuencias de proteínas, aunque la ramificación tampoco es significativa, la rama internodal comentada es diferente de cero con una probabilidad del 95%. Por esta razón el proceso

evolutivo propuesto implica una separación previa de la 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial de las acetoacetyl-CoA tiolasas, tal como se muestra en el árbol de la Figura 15.

La inspección del árbol sugiere que durante la evolución ocurrieron varios acontecimientos de duplicación génica. El primero de ellos pudo originar, a partir del ancestro común, los genes que darían lugar al grupo de 3-oxoacil-CoA tiolasas del tipo peroxisomal y a otro grupo misceláneo que incluiría las acetoacetyl-CoA tiolasas y la 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial. La presencia de ambos tipos de tiolasas en todos los organismos parece indicar que esta primera duplicación ocurrió antes de la divergencia entre eucariotas y procariotas. Otros fenómenos de duplicación pueden haber ocurrido durante la evolución de las tiolasas, como en la divergencia entre la 3-oxoacil-CoA mitocondrial y el grupo de acetoacetyl-CoA tiolasas o entre los enzimas citosólico y mitocondrial de estas últimas. Además de los referidos, recientemente se ha comprobado que la tiolasa peroxisomal de rata está codificada por dos genes con una similitud del 95% (Bodnar y Rachubinski, 1990; Hijikata *et al.*, 1990) lo que refleja una duplicación génica reciente.

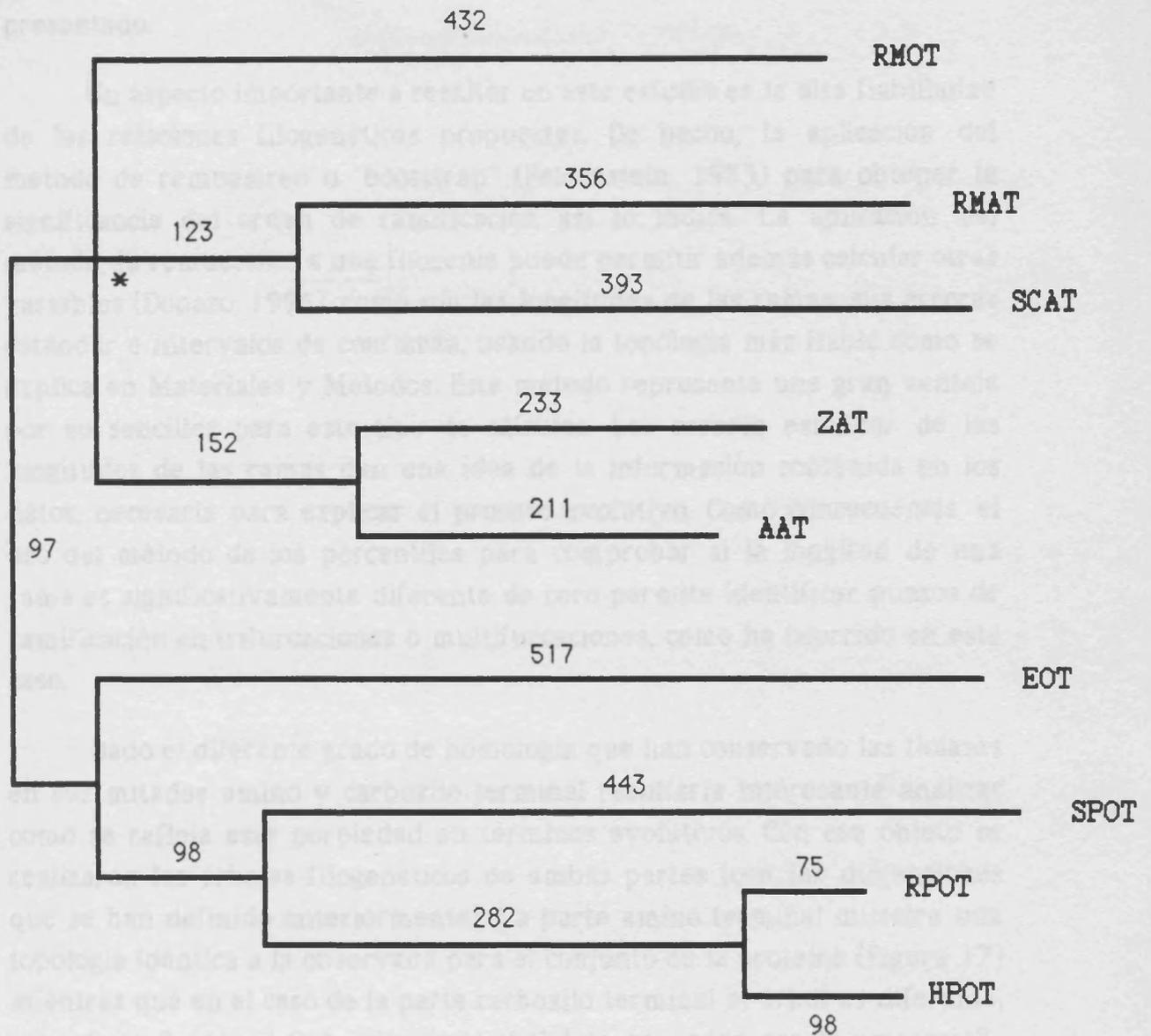
En vista de lo comentado, el ancestro común de la familia de las tiolasas debió tener una amplia especificidad de sustrato. El hecho de que la 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial sea más activa frente a acetoacetyl-CoA que los correspondientes enzimas peroxisomales y de *E. coli*, sugiere que el ancestro común originó dos genes con una especificidad de sustrato ligeramente diferente y que después uno de ellos daría lugar al gen de las acetoacetyl-CoA tiolasas. Según este punto de vista la clasificación de las tiolasas en 3-oxoacil-CoA y acetoacetyl-CoA enzimas puede ser cuestionada en términos evolutivos.

El proceso evolutivo obtenido está más de acuerdo con el propuesto por Fukao *et al.* (1989) que con los resultados de Yang *et al.* (1990). Este último obtuvo un árbol diferente, con todas las 3-oxoacil-CoA tiolasas formando un grupo. Se ha intentado reproducir sus resultados utilizando las mismas secuencias y diversas aproximaciones para construir el árbol filogenético (ver Materiales y Métodos) pero no fue posible. Además, no realizan ninguna estimación del árbol. Por el contrario, la alta fiabilidad



**Figura 15.** Arbol filogenético de las tiolamas deducido a partir de las secuencias de aminoácidos.

Las secuencias se alinearon como se muestra en la Figura 14. La raíz del árbol filogenético deducido de dicho alineamiento se colocó de manera arbitraria en un punto entre los dos grupos monofiléticos encontrados. Todos los puntos de ramificación son altamente significativos excepto el marcado como ns. Todas las distancia internodales son significativamente diferentes de cero al 99% salvo la marcada con asterisco que es significativa sólo al 95%. Los números indican las longitudes y errores estándar de las ramas. Las abreviatura son las mismas que en la Tabla V.



**Figura 16.** Arbol filogenético de las tiolosas deducido a partir de las secuencias de DNA.

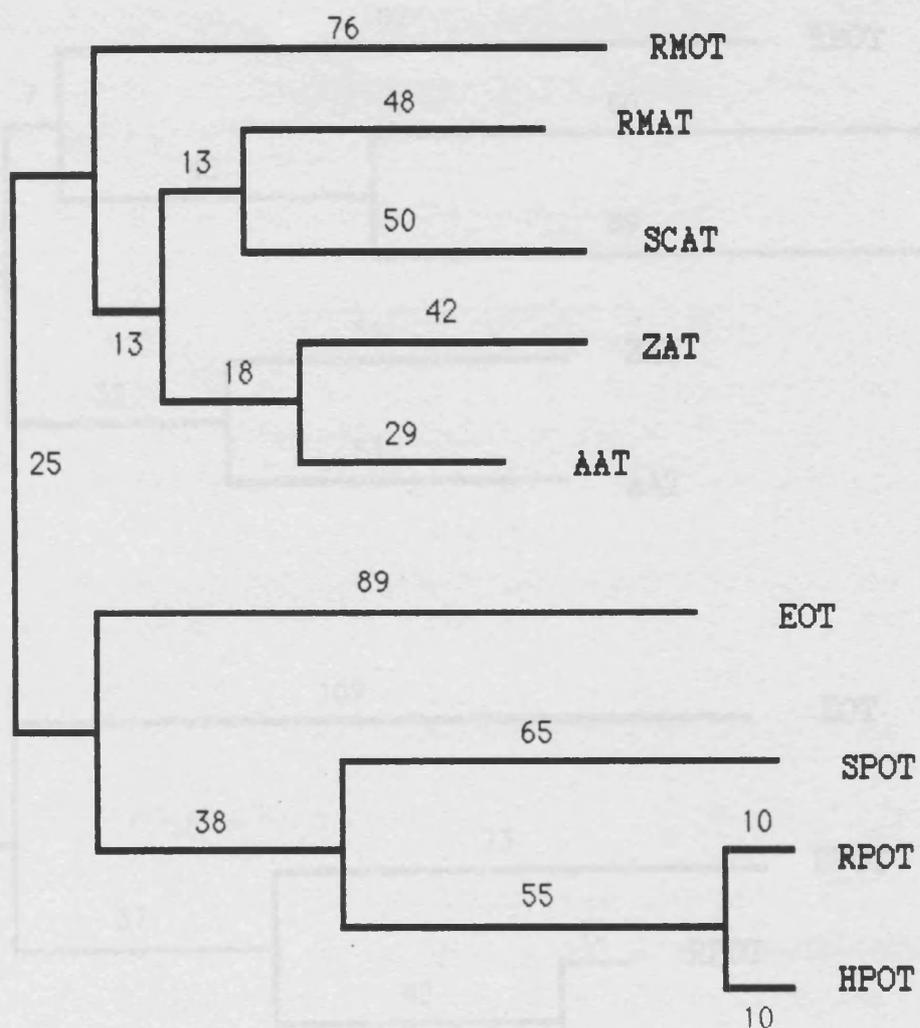
Las secuencias de DNA se alinearon de acuerdo a la Figura 14. La raíz del árbol obtenido a partir de dicho alineamiento se colocó de manera arbitraria en un punto entre los dos grupos monofiléticos encontrados. Todos los puntos de ramificación son altamente significativos, salvo el marcado con asterisco que obliga a plantear una tricotomía. Los números indican las longitudes de las ramas. Las abreviaturas son las mismas que en la Tabla V.

obtenida para el proceso evolutivo aquí descrito apoya el resultado presentado.

Un aspecto importante a resaltar en este estudio es la alta fiabilidad de las relaciones filogenéticas propuestas. De hecho, la aplicación del método de remuestreo o "bootstrap" (Felsenstein, 1985) para obtener la significancia del orden de ramificación así lo indica. La aplicación del método de remuestreo a una filogenia puede permitir además calcular otras variables (Dopazo, 1991), como son las longitudes de las ramas, sus errores estándar e intervalos de confianza, usando la topología más fiable como se explica en Materiales y Métodos. Este método representa una gran ventaja por su sencillez para este tipo de cálculos. Los errores estándar de las longitudes de las ramas dan una idea de la información contenida en los datos, necesaria para explicar el proceso evolutivo. Como consecuencia, el uso del método de los percentiles para comprobar si la longitud de una rama es significativamente diferente de cero permite identificar puntos de ramificación en trifurcaciones o multifurcaciones, como ha ocurrido en este caso.

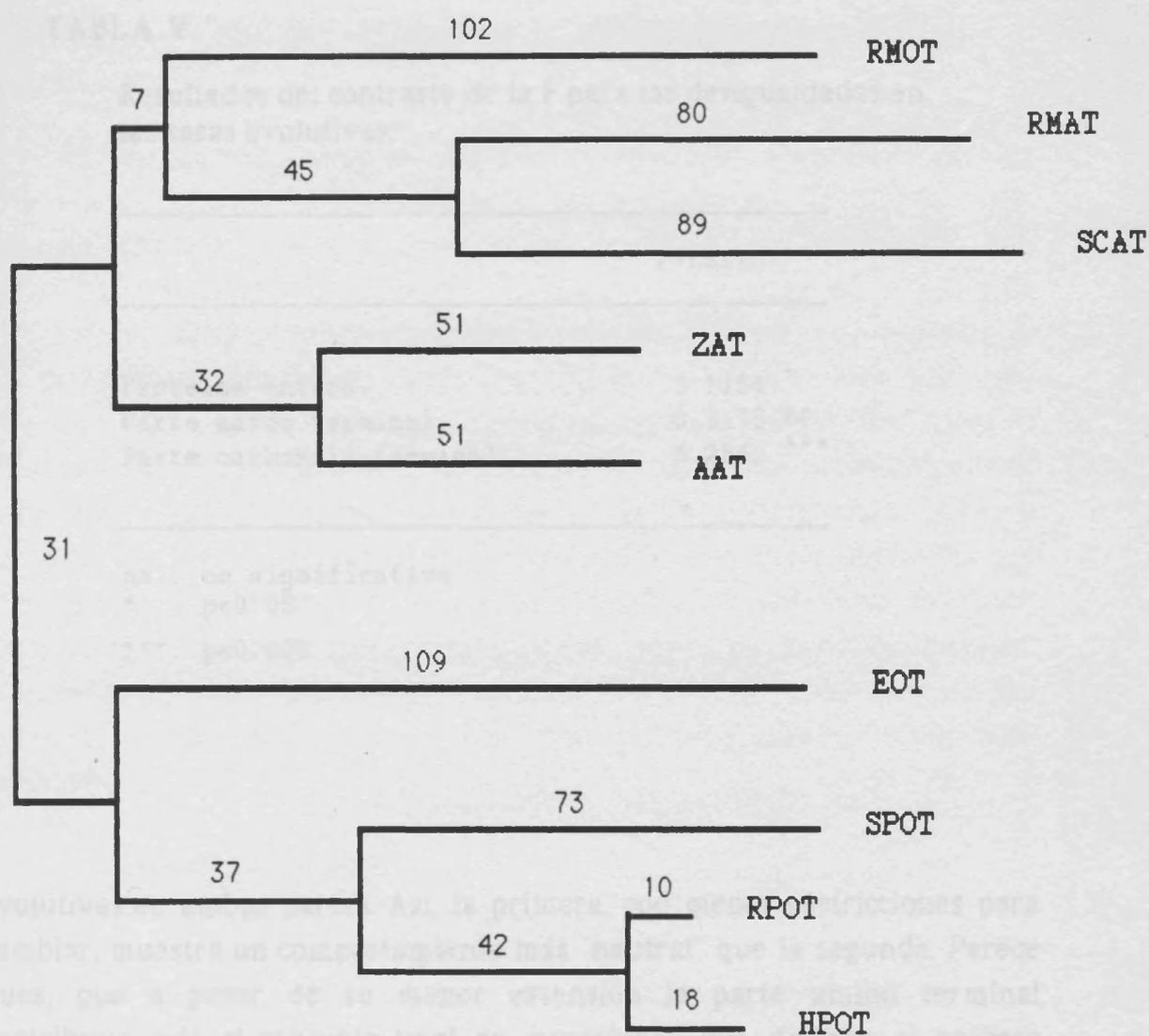
Dado el diferente grado de homología que han conservado las tiolosas en sus mitades amino y carboxilo terminal resultaría interesante analizar como se refleja esta propiedad en términos evolutivos. Con ese objeto se realizaron los árboles filogenéticos de ambas partes (con las dimensiones que se han definido anteriormente). La parte amino terminal muestra una topología idéntica a la observada para el conjunto de la proteína (Figura 17) mientras que en el caso de la parte carboxilo terminal el árbol es diferente, estando la 3-oxoacil-CoA mitocondrial tiolasa agrupada con la acetoacetyl-CoA mitocondrial y citosólica (Figura 18).

El comportamiento diferente de las dos partes de la proteína no se refleja sólo en la diferente topología sino también al aplicar el contraste de la F a las desigualdades de las tasas evolutivas (Felsenstein, 1984). La Tabla V indica que ni la proteína completa ni la parte carboxilo terminal siguen un comportamiento de reloj molecular pero este comportamiento si que se puede asumir para la parte amino terminal. Puesto que la parte amino terminal es más variable que la carboxilo terminal, el diferente comportamiento evolutivo se puede explicar a la luz de las restricciones



**Figura 17.** Arbol filogenético de las tiolosas deducido de las secuencias de aminoácidos de la parte amino terminal.

Se consideraron sólo las secuencias de la Figura 14 comprendidas entre los residuos 34 y 180 de *POT1*. Los números indican las longitudes de las ramas. Las abreviaturas son las mismas que en la Tabla V.



**Figura 18.** Arbol filogenético de las tiolosas deducido de las secuencias de aminoácidos de la parte carboxilo terminal.

Se consideraron sólo las secuencias de la Figura 14 a partir del residuo 181 de *POT1*. Los números indican las longitudes de las ramas. Las abreviaturas son las mismas que en la Tabla V.

TABLA V.

Resultados del contraste de la F para las desigualdades en las tasas evolutivas.

	F-ratio
Proteína entera.....	3.1154 *
Parte amino terminal.....	0.8175 ns
Parte carboxilo terminal.....	6.2562 ***

ns : no significativo

\* :  $p < 0.05$

\*\*\*:  $p < 0.001$

evolutivas en ambas partes. Así, la primera, con menos restricciones para cambiar, muestra un comportamiento más "neutral" que la segunda. Parece pues, que a pesar de su menor extensión la parte amino terminal contribuye más al conjunto total de mutaciones que definen el proceso evolutivo de la proteína entera.

Una consecuencia importante de este estudio, también apoyado por las especificidades de sustrato de las diferentes proteínas, es que las 3-oxoacil-CoA tiolasas peroxisomales y de *E. coli* forman un grupo monofilético. Este resultado plantea la cuestión del posible origen endosimbiónico del peroxisoma, como ha sido sugerido recientemente por Yang *et al.* (1990). Con el árbol filogenético mejorado que se ha obtenido su razonamiento puede ser cuestionado. Sin embargo, la hipótesis del origen endosimbiónico del peroxisoma (deDuve, 1983; Cavalier-Smith, 1987; Borst, 1989) permanece como una posibilidad atractiva para explicar los resultados comentados anteriormente. Esta claro que las tiolasas peroxisomales provienen de un ancestro común y divergieron

"recientemente", bastante después de la divergencia entre procariotas y eucariotas.

Es interesante comentar algunas propiedades sugerentes de las proteínas peroxisomales. Curiosamente, como ocurre con la tiolasa, otros enzimas altamente conservados entre levadura y mamíferos son peroxisomales, como es el caso de la catalasa A (Cohen *et al.*, 1988) o la citrato sintasa (Rosenkrantz *et al.*, 1986). Además, los índices de sesgo en el uso de codones para las proteínas peroxisomales de levadura son muy similares: 0.19 para la tiolasa, 0.10 para la acil-CoA oxidasa, 0.11 para la catalasa A, 0.16 para la citrato sintasa y para la malato deshidrogenasa. Estos índices son sorprendentemente bajos (ver Bennetzen y Hall, 1982) y corresponden a los observados para proteínas de muy baja expresión. Sin embargo, ni la catalasa A (Cohen *et al.*, 1988) ni la tiolasa se expresan mucho menos que otros genes con mayores índices de sesgo de codones. Considerando todas estas propiedades en su conjunto parece como si las proteínas peroxisomales constituyeran un grupo homogéneo en términos de evolución.

### 3. REGULACION DEL GEN *POT1* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

#### 3.1. Represión por glucosa e inducción por ácido oleico del gen *POT1*.

La regulación de algunos genes peroxisomales de *S.cerevisiae* ha comenzado a ser objeto de estudio en los últimos años. La presencia de ácido oleico en el medio de cultivo origina la proliferación de peroxisomas (Veenhuis *et al.*, 1987) y simultáneamente la inducción de las actividades enzimáticas de la  $\beta$ -oxidación, del ciclo del glioxilato y de la catalasa (Veenhuis *et al.*, 1987; Skoneczny *et al.*, 1988; McCamon *et al.*, 1991). Sin embargo, la proliferación del orgánulo no se produce en medios de cultivo ricos en glucosa (Veenhuis *et al.*, 1987), y las actividades de la acil-CoA oxidasa y de la catalasa están reprimidas en presencia de glucosa (Skoneczny *et al.*, 1988). Esta regulación ocurre a nivel de la transcripción del gen, como se ha observado en los casos de la acil-CoA oxidasa (Dmochowska *et al.*, 1990) y el gen *PAS1* (Erdmann *et al.*, 1991). Además, este mismo comportamiento también se ha descrito en genes de proteínas peroxisomales de otras levaduras (Roggenkamp *et al.*, 1984). Por todo ello, se acepta que dichos genes están sujetos a un doble mecanismo de regulación, represión por glucosa (represión catabólica) e inducción por ácidos grasos de cadena larga, dominando el primer mecanismo sobre el segundo.

Con el objeto de estudiar si la regulación del gen *POT1* de *S.cerevisiae* respondía a dicho modelo de regulación se realizaron, en primer lugar, ensayos enzimáticos de extractos de células crecidas con diferentes fuentes de carbono. Se sembraron con la cepa salvaje MCY1389 y con la cepa BQS20 (obtenida de la anterior por una disrupción del gen *POT1*) medios de cultivo que contenían extracto de levadura 1% y peptona 2% suplementado con glucosa 0.1% (YPg), con glucosa 2% (YPG) o con galactosa 2% (YPGal) y los mismos medios conteniendo además ácido oleico 0.1% (+ O). Por otra parte, en los estudios preliminares se observó que el nivel de actividad tiolasa estaba relacionado con el estado de crecimiento del organismo, de forma similar a como se ha descrito para las dos acetoacetyl-CoA tiolasas de

levadura (Kornblatt y Rudney, 1971). Por ello se realizaron extractos de células en mitad de la fase exponencial de crecimiento y tras diez horas en fase estacionaria.

En los ensayos enzimáticos se usó acetoacetil-CoA como sustrato debido a que, a diferencia de otros posibles sustratos, se trata de un producto comercial. Esto planteaba dos dificultades. En primer lugar, la sensibilidad del ensayo disminuía, pues la actividad de la tiolasa peroxisomal es mayor frente a ácidos grasos de cadena más larga. En segundo lugar y mucho más importante, en *S.cerevisiae* se han descrito además de la peroxisomal otras dos tiolosas, una citosólica y otra mitocondrial, ambas específicas de acetoacetil-CoA. Para eliminar el fondo de actividad tiolasa no debido al producto del gen *POT1* fue necesario realizar controles de actividad en la cepa BQS20 que contiene ambas acetoacetil-CoA tiolosas intactas mientras que carece de actividad tiolasa peroxisomal.

Los resultados de los ensayos enzimáticos se muestran en la Tabla IW. En primer lugar hay que resaltar que en las condiciones utilizadas, el ensayo es específico para la tiolasa peroxisomal, pues en la cepa BQS20 no se detecta actividad en ninguno de los casos. La utilización en el tampón de ensayo de catión  $\text{Na}^+$  en lugar de  $\text{K}^+$  (que es un activador de la acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial (Middleton, 1973)) es una de las causas, ya que si se usaba este último catión la cepa BQS20 presentaba una apreciable actividad tiolasa. Además, en los ensayos se utilizó una concentración de sustrato ( $10 \mu\text{M}$ ) muy inferior a la utilizada por Rudney y Kornblatt (1975) para el estudio de las acetoacetil-CoA tiolosas ( $160 \mu\text{M}$ ) lo que también pudo contribuir a que no se detectaran estas tiolosas.

Por lo que se refiere a la actividad de la tiolasa peroxisomal, en las muestras extraídas de cultivos en fase exponencial solo se detectó actividad en cultivos crecidos en ausencia de glucosa. Además, la presencia de oleico en el medio originaba un aumento considerable en la actividad detectada. Los resultados confirman por tanto que la actividad tiolasa está sujeta a represión por glucosa y a inducción por ácido oleico. El hecho de que en las muestras de cultivos que contenían tanto glucosa como oleico no se detectara actividad muestra que el primer mecanismo, la represión catabólica, predomina sobre el segundo, la inducción por oleico.

TABLA VI.

Actividad tiolasa específica (u/mg) en diferentes medios de cultivo.

	<u>fase exponencial</u>		<u>fase estacionaria</u>	
	MCY 1389	BQS 20	MCY 1389	BQS 20
YPg	<0.1	0	4.2	0
YPg+O	1.6	0	10.0	0
YPG	0	0	<0.1	0
YPG+O	0	0	<0.1	0
YPGal	<0.1	0	1.2	0
YPGal+O	0.8	0	4.3	0

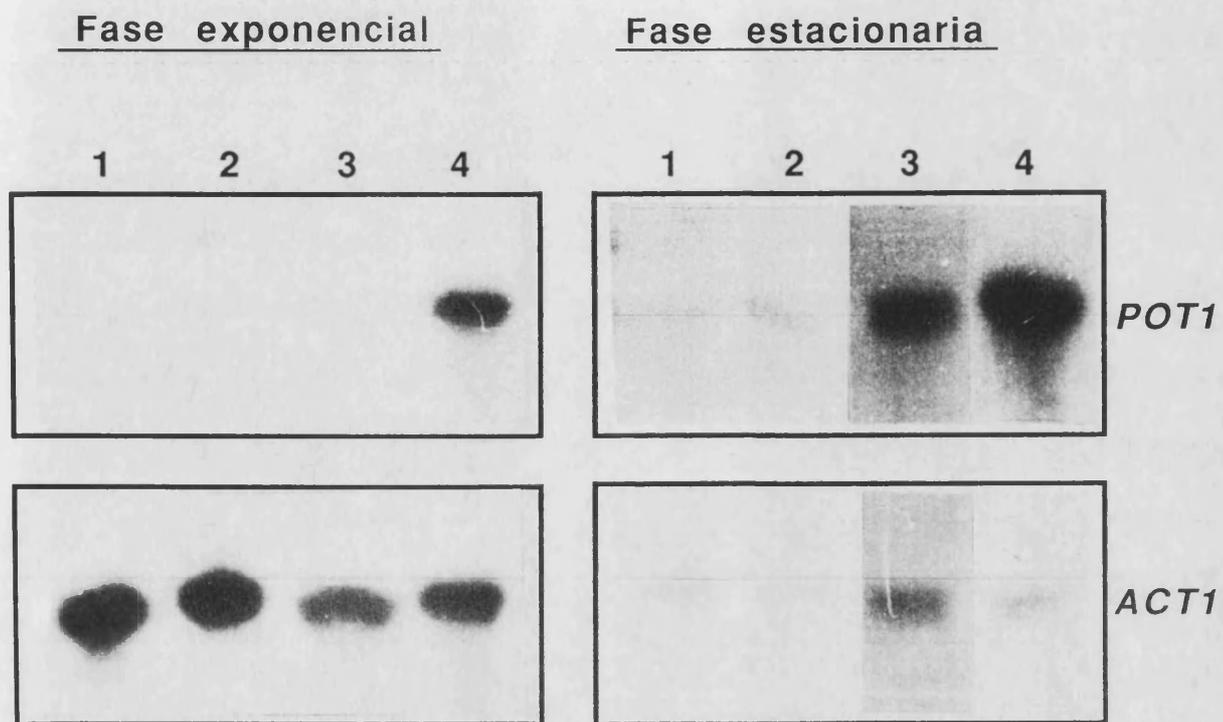
Respecto a las muestras extraídas en fase estacionaria se observa una mayor actividad que en las extraídas en fase exponencial para todas las fuentes de carbono utilizadas. En concreto, en los cultivos en YPg+O y YIPGal+O este incremento es de seis y cinco veces respectivamente. Esto sugiere un tercer mecanismo de control de la actividad de la tiolasa en función de la fase de crecimiento.

También en las muestras obtenidas en fase estacionaria se observa un efecto activador debido a la presencia de oleico en el medio de crecimiento. Sin embargo, este efecto no parece ser tan drástico como en la fase exponencial, pues aquí el incremento es de dos o tres veces. Una posible causa podría ser una saturación en la transcripción del gen.

Con el objetivo de estudiar si estos mecanismos de regulación actuaban a nivel de la transcripción del gen se extrajo RNA de cultivos en YPg y YPG con y sin oleico, tanto en fase exponencial de crecimiento como en fase estacionaria. Las muestras se analizaron por electroforesis en agarosa, transferencia a nylon e hibridación con una sonda radiactiva del gen *POT1*.

El nivel del transcrito del gen en las diferentes muestras (Figura 19) está de acuerdo con un mecanismo de represión por glucosa y otro de inducción por oleico, con un predominio del primero sobre el segundo. Así, en las muestras extraídas en fase exponencial el mRNA del *POT1* no se detecta en cultivos crecidos en medios ricos en glucosa, lleven o no oleico, el nivel del transcrito es muy bajo en los cultivos crecidos en medios pobres en glucosa y aumenta drásticamente, del orden de diez veces, con la presencia de oleico en el medio de cultivo. Todo ello indica que la doble regulación por glucosa y por oleico del gen *POT1* ocurre a nivel de transcripción. Este resultado coincide con el observado para otros dos genes de proteínas peroxisomales o relacionados con el peroxisoma, el de la acil-CoA oxidasa (Dmochowska *et al.*, 1990) y el *PAS1* (Erdmann *et al.*, 1991), y debe reflejar una propiedad común que se probablemente se irá poniendo de manifiesto con el estudio de la regulación de otros genes de proteínas peroxisomales.

También se observa en los análisis de RNA un posible tercer mecanismo de regulación en el gen *POT1*, pues la cantidad de transcrito en fase estacionaria es mayor que en fase exponencial. En concreto, la cantidad relativa de mRNA de *POT1* respecto a la del gen de la actina en las muestras obtenidas en fase estacionaria es comparada con las obtenidas en fase exponencial del orden de seis veces mayor en cultivos con oleico, siendo todavía más acusado el incremento en ausencia de oleico (del orden de treinta veces). Al igual que se observó en los ensayos enzimáticos, el efecto de la presencia de oleico en el medio de cultivo no es en la fase estacionaria tan llamativo como en la fase exponencial, siendo el nivel de mRNA en los cultivos con oleico sólo dos veces mayor que en los cultivos sin oleico.



**Figura 19.** Regulación del gen *POT1*.

Se analizaron muestras de RNA de la cepa MCY1389 extraídas de cultivos en medios YPg (1), YPg+O (2), YPG (3) y YPG+O (4) tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento. El filtro se rehibridó con una sonda del gen de la actina (*ACT1*) como control de carga.

Los resultados confirman por tanto que el gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal de *S.cerevisiae* sigue el modelo de otros genes de proteínas peroxisomales en su regulación, estando sometido a un mecanismo de represión por glucosa y otro de inducción por ácido oleico. Muy recientemente, resultados obtenidos por el grupo de H. Tabak confirman este mecanismo de regulación del gen *POT1* (comunicación personal). Estos autores han caracterizado además una secuencia en el promotor del gen, entre los nucleótidos -151 y -203, responsable de ambos fenómenos, la represión por glucosa y la inducción por oleico. La comparación de las secuencias de los promotores de los genes de las proteínas que intervienen en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos les ha permitido identificar dentro de esta región una zona conservada que han denominado " $\beta$ -oxidation box" que se extiende en *POT1* entre -180 y -199.

Un tercer posible mecanismo de regulación del gen que sugieren los resultados obtenidos, se estudia con más profundidad en el siguiente apartado.

### **3.2. El gen *POT1* se activa específicamente en la fase estacionaria de crecimiento.**

Las células de *S.cerevisiae* proliferan en un medio de cultivo hasta que éste queda exahusto de algún nutriente esencial. Entonces las células detienen de forma regulada su crecimiento y adquieren propiedades características que reflejan un estado fisiológico alterado: la fase estacionaria (Wheals, 1987). En esta fase las células no replican el DNA, presentan una estructura cromosómica característica, aumento de la termotolerancia y altos niveles de reservas de carbohidratos entre otras características. Todas estas propiedades que definen el estado de la célula en fase estacionaria se pierden cuando se restaura un nivel de nutrientes satisfactorio y se reinicia la proliferación celular.

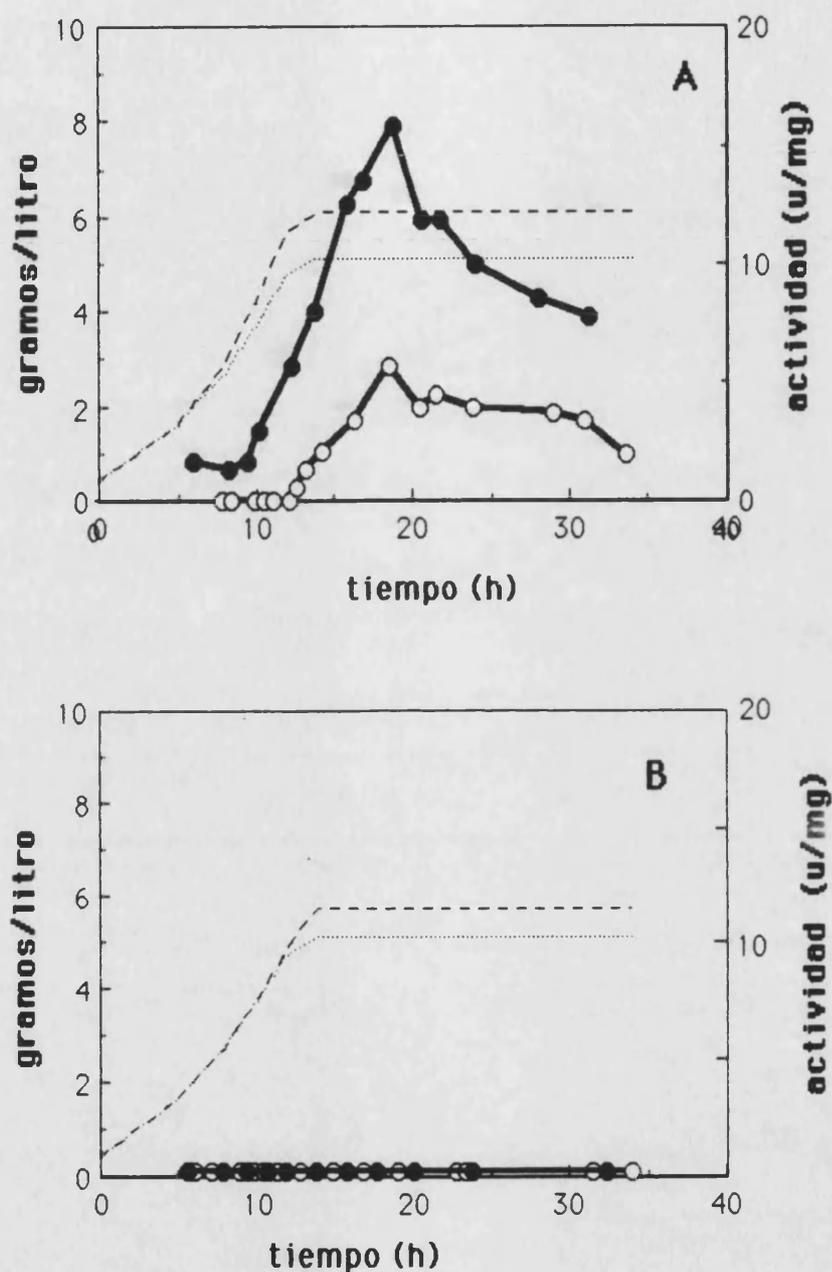
Con el fin de confirmar y caracterizar más a fondo una tercera posible vía de regulación del gen *POT1* en función del estado de la fase de crecimiento del cultivo, se estudiaron los niveles tanto de actividad

enzimática como de mRNA del gen a lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados podrían además ayudar a entender los papeles fisiológicos del enzima.

La actividad tiolasa de un cultivo a lo largo de la curva de crecimiento se muestra en la Figura 20. Como control de las otras actividades tiolasa diferentes de *POT1* presentes en la célula se realizó también un estudio a lo largo de la curva de crecimiento con la cepa BQS20. Nuevamente se observó que el ensayo era específico para la tiolasa peroxisomal a pesar de usar acetoacetil-CoA como sustrato, pues ninguna muestra presentó actividad. En lo referente a la cepa salvaje, los resultados obtenidos ponen claramente de manifiesto que la actividad tiolasa se activa al alcanzar las células el estado estacionario. Para este ensayo las levaduras se crecieron en medio YPg, condición en la que se evita la represión catabólica a la que, como se vió en el apartado anterior, está sujeto el gen. Debido a esto, la aparición de la actividad en la fase estacionaria no se puede relacionar con una liberación de la represión catabólica que pudiera ocurrir en las últimas etapas del crecimiento (ver más adelante Figura 21).

Esta respuesta es independiente de la presencia de oleico en el medio de cultivo, pues también se observa, y del mismo orden, en los cultivos realizados sin ácido graso. Los perfiles de actividad en ambos cultivos, con y sin oleico, siguen una trayectoria paralela. La actividad es muy baja en la fase exponencial de crecimiento (casi indetectable en los cultivos sin oleico); aumenta bruscamente al alcanzar la fase estacionaria, con un máximo a las 6 horas después; a continuación disminuye de forma muy gradual, pero manteniendo un nivel bastante considerable. La máxima actividad detectada en muestras extraídas en fase estacionaria es del orden de 15 veces la actividad observada en las muestras extraídas en fase exponencial.

¿Tiene alguna explicación lógica que una actividad enzimática como la tiolasa se active al detener las células su crecimiento en la fase estacionaria? Se podría aventurar una explicación metabólica a esta propiedad. La tiolasa interviene en la asimilación de los ácidos grasos vía  $\beta$ -oxidación. Durante la fase exponencial el medio de cultivo y las mismas células tendrían suficientes nutrientes como para mantener esta vía, aparentemente secundaria en el metabolismo de la levadura, a niveles basales. Sin embargo, ante la escasez de metabolitos al alcanzar la fase



**Figura 20.** Actividad específica tiolasa a lo largo de la curva de crecimiento.

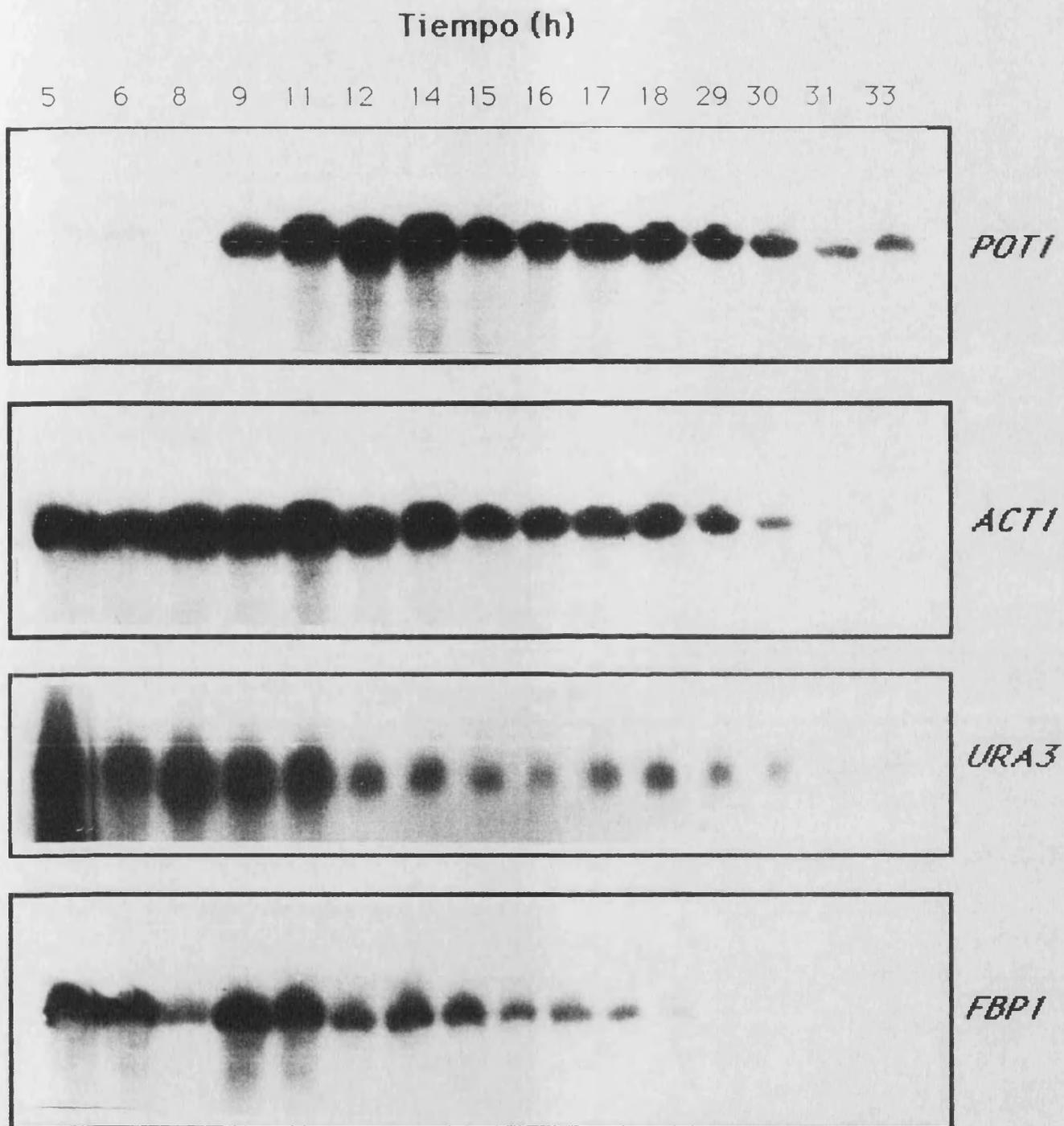
Se extrajeron proteínas de cultivos de las cepas MCY1389 (A) o BQS20 (B) en medios YPg con y sin oleico a diferentes tiempos y se ensayó la actividad tiolasa. (—) curva de crecimiento en medio YPg, (----) curva de crecimiento en medio YPg+0. (○) actividad específica tiolasa en medio YPg. (●) actividad específica tiolasa en medio YPg+0.

estacionaria la célula podría responder activando rutas para la obtención de energía de fuentes alternativas como podrían ser los lípidos mediante su oxidación.

La actividad tiolasa es pues claramente activada al alcanzarse la fase estacionaria. Ahora bien, este proceso podría deberse a una regulación del propio enzima y no tratarse de un proceso de regulación génica. La levadura contiene varias proteasas y las actividades proteolíticas presentes están determinadas entre otras cosas por la fase de crecimiento. Esto puede ocasionar, como en el caso de la triptófano sintetasa, que la sensibilidad del enzima a la degradación sea función del crecimiento (Manney *et al.*, 1968). Para aclarar si como parece observarse en la Figura 20 la regulación, total o parcialmente, se produce a nivel de RNA se sembró nuevamente medio de cultivo YPg+oleico con la cepa MCY1389 y se analizó, al igual que se había hecho con la actividad enzimática, los niveles de mRNA de *POT1* en extractos realizados a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 22).

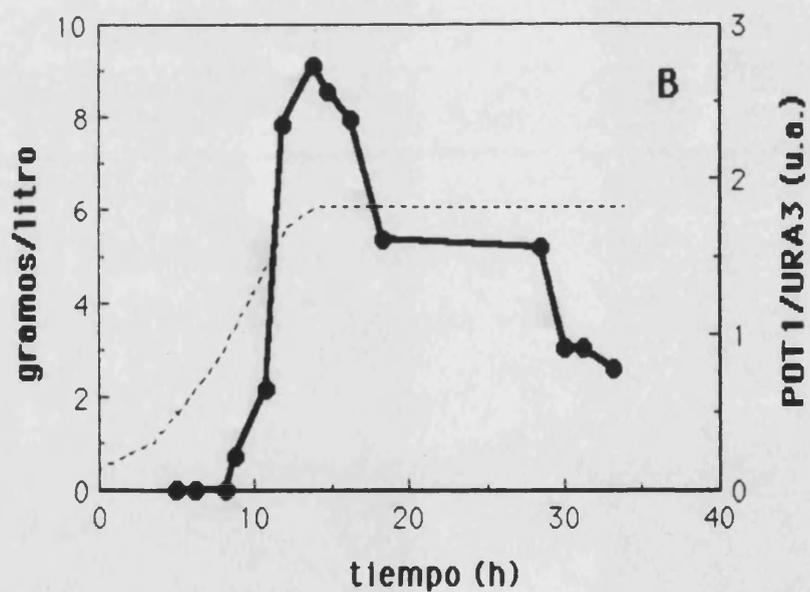
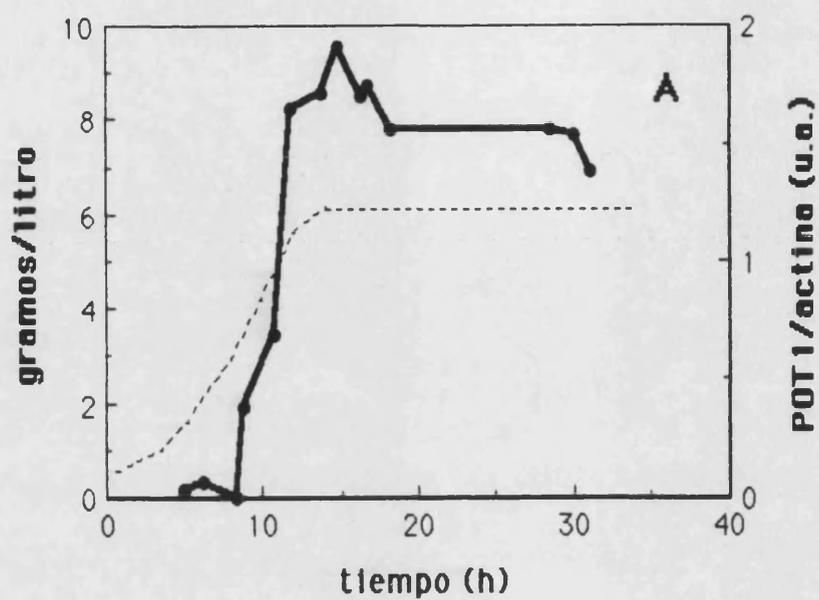
Como se observa, la cantidad de transcrito detectada no es apreciable hasta alcanzar el cultivo el último tercio de la fase exponencial, con un máximo entre el cambio de estado de crecimiento y cayendo posteriormente su nivel de forma muy gradual. Se midieron así mismo los niveles de mRNA del gen de la actina, del *URA3* y de un gen también reprimido por glucosa, en concreto el gen de la FBPasa (*FBP1*). En todos los casos, sobre todo en el *URA3*, hay una diferencia apreciable entre las muestras de una y otra fase. En fase exponencial los mRNA son muy abundantes ya en cultivos muy poco crecidos y su nivel cae bruscamente a medida que los cultivos se encuentran en fase estacionaria. Por tanto el comportamiento del gen *POT1* es diferente al de los genes control *URA3* y el de la actina, así como al del *FBP1*. La comparación con este último, al tratarse de un gen también reprimido por glucosa, permite concluir que el comportamiento observado no está originado por una liberación de la represión catabólica y parece específico de algunos genes como el *POT1*.

La acumulación específica del mRNA del *POT1* en la fase estacionaria se ve más claramente en la Figura 22, donde se ha representado las cantidades relativas del transcrito del *POT1* frente a las del *URA3* y actina para las distintas muestras. Observando las curvas de la Figura 22 llama la



**Figura 21.** Análisis de RNA a lo largo de la curva de crecimiento.

Se extrajeron muestras de RNA total en diferentes puntos a lo largo de la curva de crecimiento en un cultivo de MCY1389 en medio YPg+0. Las muestras se analizaron por electroforesis, transferencia a filtro e hibridación con una sonda radiactiva de *POT1*. Como controles se hibridó el mismo filtro también con sondas de los genes *ACT1*, *URA3* y *FBP1*.



**Figura 22.** Cantidad relativa de mRNA de *POT1* respecto al del gen de la actina y del *URA3* en diferentes estados de crecimiento.

Se densitometraron las muestras de la Figura 22 y se representó el cociente entre las cantidades detectadas de mRNA de *POT1* y del gen *ACT1* (A) o del *URA3* (B) en unidades arbitrarias. La línea a trazos representa la curva de crecimiento en gramos por litro.

atención su similitud con las curvas de la actividad enzimática (Figura 20). El perfil es casi idéntico, salvo que la curva del RNA parece desplazada hacia fases más tempranas del cultivo precediendo a la aparición de la actividad enzimática. Todo parece indicar por tanto que este nuevo mecanismo de regulación no ocurre a nivel de proteína o de la traducción, sino que se produce principalmente mediante el control de la cantidad de mRNA existente.

En lo referente a posibles mecanismos de la regulación en función de la fase de crecimiento es interesante comentar la relación del estado de fase estacionaria con el ciclo celular de la levadura. El control del ciclo celular se realiza en un proceso que se denomina "arranque", al final de la fase G1. En este momento la célula decide el camino a seguir en función de los nutrientes presentes en el medio, la ausencia de feromonas y del tamaño celular, eligiendo entre cuatro caminos diferentes: iniciar un nuevo ciclo celular, conjugarse con otra célula, esporular o entrar en fase de no proliferación o G0. Como fase G0 se entiende un estado de quiescencia diferenciado de la fase G1, caracterizado por propiedades fisiológicas diferentes y por la existencia de mutantes en la entrada y salida de ese estado. En levadura se alcanza la fase G0 cultivando en condiciones de hambre o al alcanzarse la fase estacionaria (Wheals, 1987)

Se han caracterizado mutantes del ciclo celular (*cdc*) que detienen el ciclo de la célula en el "arranque". Algunos de ellos, en concreto los mutantes *cdc start* de la clase II, hacen que estas adquieran unas propiedades iguales a las que poseen células en fase estacionaria (Wheals, 1987; Drebot *et al.*, 1990). Uno de estos mutantes es el *cdc25*. El producto del gen *CDC25* es un componente esencial en el sistema de transmisión de señal del cAMP y su mutación origina niveles más bajos de cAMP en la célula (Broek *et al.*, 1987). Los mismos efectos, niveles más bajos de cAMP y adquisición de propiedades de células en fase estacionaria, se obtienen con mutaciones en el gen de la adenilato ciclasa (mutantes *cyr1*) (Drebot *et al.*, 1990). Se sabe que el sistema de transmisión de señal del cAMP es en parte responsable de la respuesta de la célula a las diferentes condiciones nutricionales. Por tanto, los cambios fisiológicos característicos de la fase estacionaria parecen el resultado de los cambios moleculares originados por

la respuesta a las condiciones nutricionales vía cAMP (Broach, 1991). En las condiciones de hambre, como las que representa el agotamiento de un medio de cultivo durante la fase exponencial de crecimiento, la célula responde disminuyendo los niveles de cAMP y consecuentemente la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Esto origina la entrada de la célula en G0 y la adquisición del resto de propiedades propias de la fase estacionaria. Entre estas propiedades hemos visto en este capítulo que está la activación del gen *POT1*, proceso que podría por tanto depender en último término de la respuesta del sistema del cAMP a la ausencia de nutrientes. Reforzando esta idea, se ha descrito que bajos niveles de actividad proteína quinasa dependiente de cAMP inducen de una manera directa la acumulación de hidratos de carbono (trehalosa concretamente), así como la actividad de proteínas relacionadas con estrés, propiedades ambas características de células en fase estacionaria (Broach, 1991). Sin embargo no se puede descartar la intervención de otros mecanismos ya que se ha propuesto que la respuesta de la célula depende del conjunto de señales recibidas por diferentes rutas (Broach, 1991).

Es interesante resaltar en este punto una propiedad de la secuencia del 5' del gen *POT1*. Recientemente se ha identificado una secuencia (motivo *Miv*: ACGCGTNA) en los promotores de diversos genes responsable de la regulación por el ciclo celular de dichos genes (McIntosh *et al.*, 1991). La secuencia origina una activación del gen al final de la fase G1, en la transición hacia la fase S del ciclo. Curiosamente, en 5' del inicio del gen, concretamente entre los nucleótidos -250 y -242, se encuentra dicha secuencia. La probabilidad de encontrar por azar dicha secuencia es de una vez cada 10000 nucleótidos, por lo que podría tratarse de un hecho significativo. No parece haber una razón para que la tiolasa estuviera regulada por el ciclo celular, pero pudiera ser que la célula utilizara un mismo mecanismo molecular de regulación para controlar dos procesos fisiológicos diferentes pero relacionados como la regulación por el ciclo celular y la activación en la fase estacionaria.

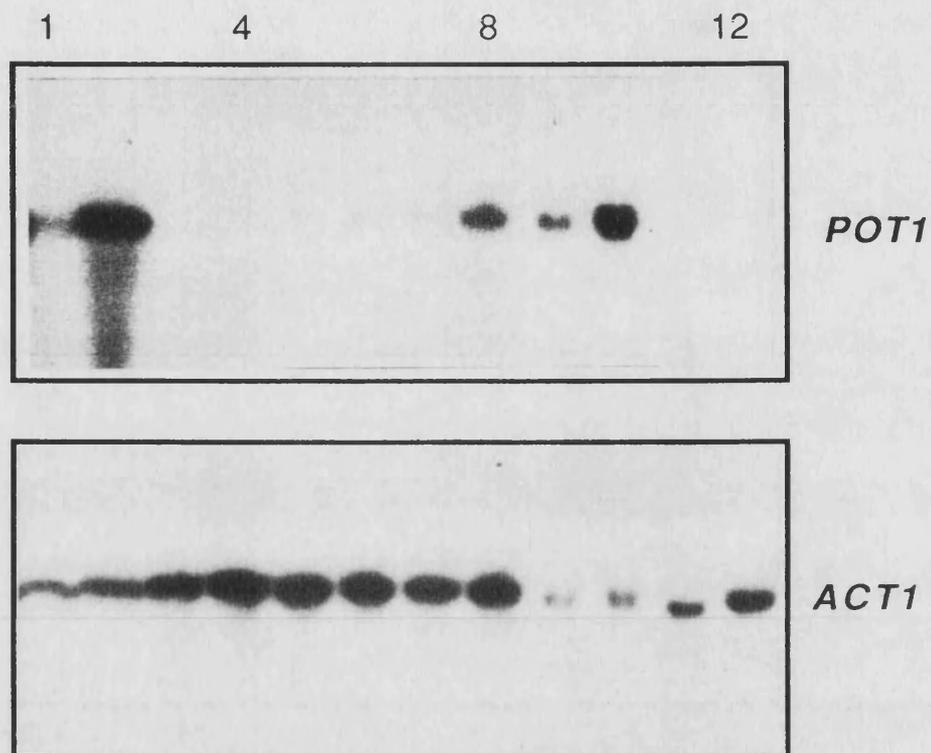
El estudio futuro de la actividad del gen *POT1* durante el ciclo celular y el estudio del papel de la secuencia *Miv* presente en el promotor del gen permitirán descartar o confirmar las diferentes posibilidades para explicar la activación del gen al alcanzarse la fase estacionaria.

### 3.3. En la represión por glucosa del gen *POT1* intervienen los productos de los genes *SNF1* y *SSN6*.

La levadura responde a la presencia de glucosa activando el metabolismo fermentativo y reprimiendo enzimas de muchas rutas metabólicas como los implicados en gluconeogénesis, ciclo del ácido cítrico, fosforilación oxidativa, transporte electrónico,...(Entian, 1986). El proceso de represión por glucosa es complejo. En la mayoría de genes ocurre la regulación a nivel de transcripción, como se ha demostrado aquí para el *POT1*, y está mediado por secuencias cis en los promotores de los genes (Struhl, 1985; Guarente, 1987).

Mediante técnicas de análisis de mutantes y supresores de éstos se han identificado diversos genes que intervienen en este proceso, pero sin tener aún clara su función. *SNF1* (o *CAT1* o *CCR1*) y *SSN6* (o *CYC8*) son unos de estos genes mejor estudiados. *SNF1* es una protein quinasa necesaria para la desrepresión del gen *SUC2* en ausencia de glucosa (Neigeborn y Carlson, 1984; Celenza y Carlson, 1986). Por su parte mutaciones en *SSN6* suprimen la mutación *snf1*, expresándose el gen *SUC2* incluso en presencia de glucosa (Carlson *et al.*, 1984; Schultz y Carlson, 1987). Estos genes afectan a la represión por glucosa de otros genes de enzimas del metabolismo secundario (Entian, 1986; Gancedo y Gancedo, 1986). Por otro lado, el producto del gen *MIG1* también está involucrado en la regulación negativa de la transcripción por la glucosa (Nehlin y Ronne 1990). En este caso parece que interviene de forma directa sobre los genes regulados, pues se ha descrito su unión al promotor del gen *SUC2*. Sin embargo no está claro si el gen *MIG1* es un represor general de los diversos genes reprimidos por glucosa o por el contrario es específico del *SUC2*.

¿Están los genes *SNF1*, *SSN6* y *MIG1* involucrados en la regulación transcripcional de los genes peroxisomales en lo que se refiere a su represión por glucosa?. Para comprobar este aspecto se estudió la expresión del gen *POT1* en las cepas mutantes en diferentes condiciones de cultivo. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 23. En las muestras de la cepa salvaje solo se detecta transcrito en las obtenidas de cultivos crecidos en medio YPg, con una clara inducción en los medios que contenían oleico. La transcripción del gen *POT1* no es sin embargo detectada en



**Figura 23.** Análisis de RNA en cepas mutantes.

Se analizó la cantidad de mRNA del *POT1* en muestras extraídas de diferentes cepas crecidas en diversos medios: (1) cepa MCY1389 en medio YPg, (2) cepa MCY1389 en YPg+O, (3) cepa MCY1389 en YPG, (4) cepa MCY1389 en YPG+O, (5) mutante *snf1* en YPg, (6) mutante *snf1* en YPg+O, (7) mutante *ssn6* en YPG, (8) mutante *ssn6* en YPG+O, (9) mutante *mig1* en YPg, (10) mutante *mig1* en YPg+O, (11) mutante *mig1* en YPG, (12) mutante *mig1* en YPG+O. Como control se rehibridó el filtro con una sonda del gen *ACT1*.

cultivos en YPG aunque contengan oleico, como ya se había observado anteriormente. En lo que respecta a la cepa MCY1484, que presenta la mutación *snf1*, se detecta muy poca cantidad de mRNA en comparación con los niveles de las muestras equivalentes de la cepa salvaje (carreras 5-6 y 1-2 respectivamente). Está claro que el gen *POT1* está reprimido en el mutante *snf1* en condiciones de cultivo en las que está desreprimido en una cepa salvaje. El producto del gen *SNF1* interviene por tanto en la regulación del gen *POT1* de una manera análoga a como lo hace en otros genes.

Respecto al gen *SSN6*, las muestras de la cepa MCY1371 que es mutante en dicho gen, presentan en cultivos crecidos en YEPG un nivel de transcrito considerable, mientras que en la cepa salvaje el gen está reprimido y no se detecta mRNA (carreras 7-8 y 3-4 respectivamente). Las cantidades de mRNA detectadas son del mismo orden que las observadas en la cepa salvaje en condiciones de desrepresión. El producto del gen *SSN6* interviene por tanto en la regulación del gen *POT1* de la misma forma que lo hace en el gen *SUC2*.

Tanto en las muestras de la cepa MCY1484 como en las de la cepa MCY1371 la presencia del ácido graso en el medio de cultivo origina un aumento en la cantidad de mRNA detectado, lo que pone de manifiesto que el proceso de inducción por oleico es independiente de las mutaciones *snf1* y *ssn6*. Además, el hecho de que la muestra del mutante *snf1*, aunque mayor que en ausencia de oleico, siga siendo muy inferior a la correspondiente muestra de la cepa salvaje y que en el mutante *ssn6* la inducción por oleico ocurra aún con la presencia de glucosa en el medio, es un reflejo de que el mecanismo de represión por glucosa domina sobre la inducción por oleico. La presencia de oleico en el medio induce la transcripción del gen en ambos mutantes, pero siempre dentro del nivel de actividad permitido por el mecanismo de represión por glucosa.

En cuanto a las muestras de la cepa H222 (mutante *mig1*), los resultados son similares a los de la cepa salvaje. Se observa transcripción del gen en los cultivos en YPg, con una inducción de la misma causada por el ácido oleico presente en el medio, pero no se detecta transcrito en los cultivos en medios ricos en glucosa. A diferencia de lo observado en el gen *SUC2*, donde en el mutante se detectaba una desrepresión, aunque parcial, del gen en presencia de glucosa (Nehlin y Ronne, 1990), no parece que el

producto del gen *MIG1* esté involucrado en la represión por glucosa del gen *POT1*.

Los resultados presentados aquí ponen por tanto de manifiesto que los genes *SNF1* y *SSN6* intervienen en la regulación del gen *POT1*. Así pues, parece que la represión por glucosa en los genes peroxisomales sigue los mismos mecanismos moleculares que la represión por glucosa descrita para otros genes. Muy recientemente resultados obtenidos por Simon *et al.* 1991, profundizan en esta idea. Estos autores han identificado al producto del gen *ADR1* como un regulador transcripcional positivo en el proceso de regulación por glucosa de los genes peroxisomales. Este mismo papel del gen *ADR1* había sido descrito anteriormente en la regulación de otro gen reprimido por glucosa, el gen de la alcohol deshidrogenasa II (*ADH2*), (Denis y Young, 1983; Denis, 1987). Además, en la regulación de *ADH2* también actúa el gen *CCR1* (o *SNF1*) (Denis, 1987). Parecen pues muy similares los procesos que controlan la expresión de *ADH2* y de los genes de proteínas peroxisomales.

Por último es interesante resaltar al hilo de lo comentado anteriormente sobre la fase estacionaria y el mutante *cdc25* algunos aspectos de *ADR1*. Esta proteína está regulada por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Denis y Gallo, 1986; Cherry *et al.* 1990). La fosforilación de un residuo de Ser da lugar a una forma inactiva incapaz de activar la transcripción de *ADH2*. Como se ha comentado anteriormente, la activación de los genes de proteínas peroxisomales podría estar regulada también en último término vía proteína quinasa dependiente de cAMP. Una posibilidad atractiva es que el efecto de *ADR1* sobre la transcripción de los genes de proteínas peroxisomales no se limite al descrito sino que tenga un papel más general: una disminución de la actividad proteína quinasa en la fase estacionaria provocaría una defosforilación de *ADR1* con lo que aumentaría su poder activador de la transcripción de los genes sobre los que actúa. La activación descrita en medios de cultivo sin glucosa podría ser al fin y al cabo un caso particular de una activación general en ausencia total de nutrientes como es la fase estacionaria. Sin embargo, aunque esta hipótesis parece bastante razonable no se puede descartar que la activación observada en la fase estacionaria aunque dependiente de cAMP, estuviera mediada por factores diferentes a *ADR1*.

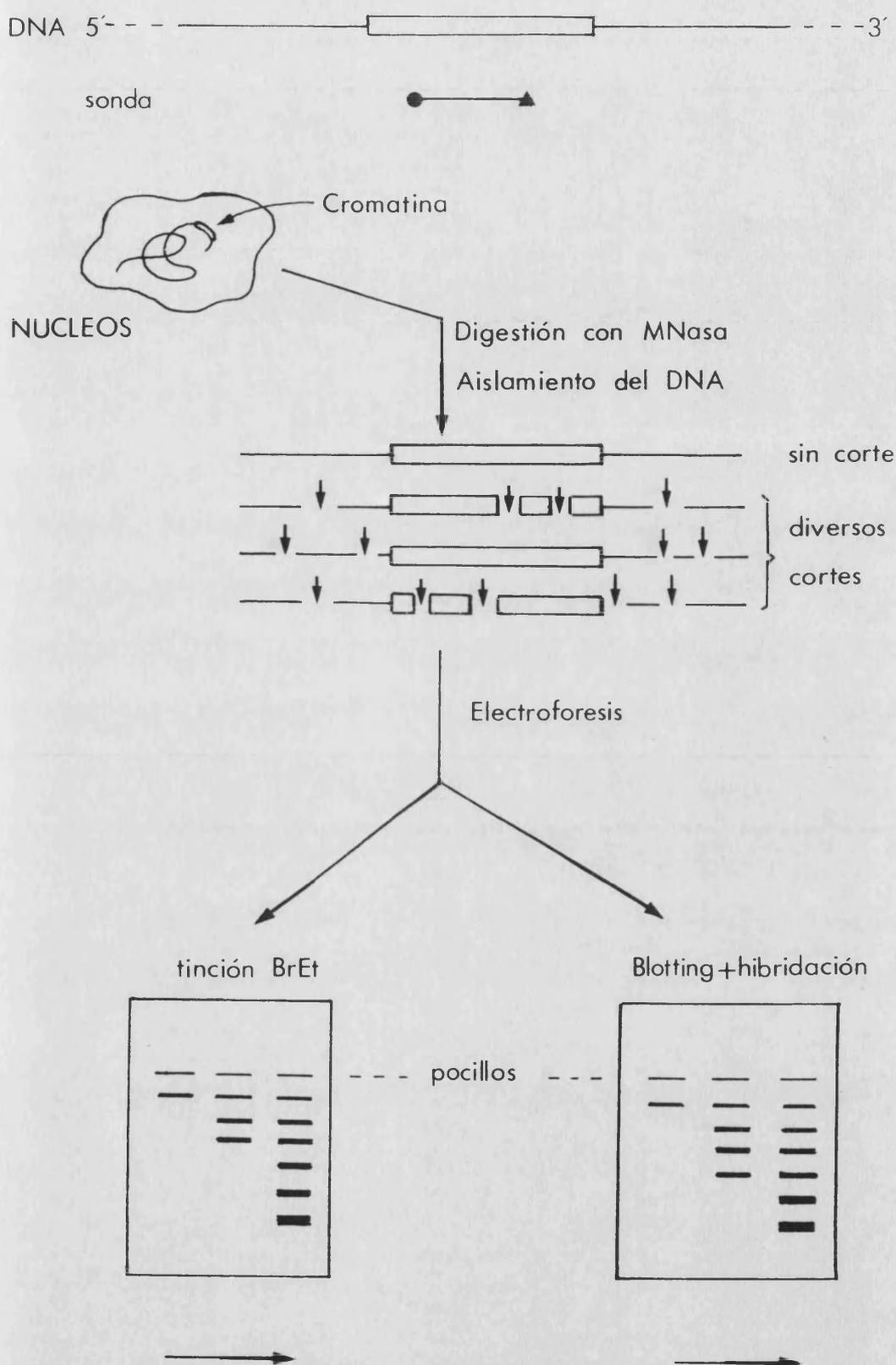
## **4. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DEL GEN *POT1* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.**

### **4.1. Consideraciones generales sobre la metodología.**

En el presente trabajo se ha abordado un estudio de la estructura de la cromatina del gen *POT1* basado en el empleo de digestiones con nucleasa DNasaI para la localización de sitios hipersensibles y con MNasa para la determinación de las posiciones de los nucleosomas. Para ello se aplicó la técnica de marcaje terminal indirecto desarrollada por Wu(1980) para digestiones con DNasaI y adaptada para la MNasa por Nedospasov y Georgiev (1980). Un esquema general de dicha técnica, para el caso concreto de la determinación de cortes con MNasa, se muestra en la Figura 24.

Para la aplicación de dicha técnica es necesario disponer del mapa de restricción de la zona a analizar para poder así seleccionar la sonda y el punto de referencia que permiten determinar las posiciones de los puntos de corte de la nucleasa. La técnica consiste en digerir la cromatina, a varias tasas, con la nucleasa elegida. El DNA se purifica y se digiere con el enzima de restricción adecuado, que debe cortar en un extremo de la zona a analizar y coincidir con un extremo de la sonda. Las muestras se someten a electroforesis, se transfieren a un filtro y este se hibrida con la sonda marcada radiactivamente. Las bandas que se ven en la autoradiografía corresponden a fragmentos con un extremo común, el generado por el corte del enzima de restricción, y otro extremo generado por el corte de la nucleasa sobre la cromatina. La inclusión en la electroforesis de un patrón adecuado permite calcular el tamaño de los diferentes fragmentos, y con él conocerse la posición del punto de corte de la nucleasa.

Un primer requerimiento de esta técnica es usar sondas pequeñas para minimizar la probabilidad de corte de la nucleasa en la zona de apareamiento con la misma, ya que esto ocasionaría la aparición de fragmentos que no tendrían el extremo coincidente con el punto de restricción. Para obviar este problema, se utilizan además tasas de digestión bajas de forma que sólo haya en promedio, un punto de corte de



**Figura 24.** Método para la determinación de las posiciones de puntos de corte de la MNasa mediante marcaje terminal indirecto.

la nucleasa por molécula, o bien se utilizan varias sondas con puntos de restricción diferentes que permitan corroborar los resultados entre sí.

Otra precaución que debe tomarse en este tipo de estudios es la inclusión de testigos de DNA desnudo digerido con la nucleasa con el fin de detectar puntos de corte debido a la especificidad de secuencia que pueden presentar estas enzimas y no originados por la estructura de la cromatina. Este problema debe tenerse especialmente en cuenta cuando se digiere la cromatina con MNasa (Hörz y Altenburger, 1981; Dingwall *et al.*, 1981).

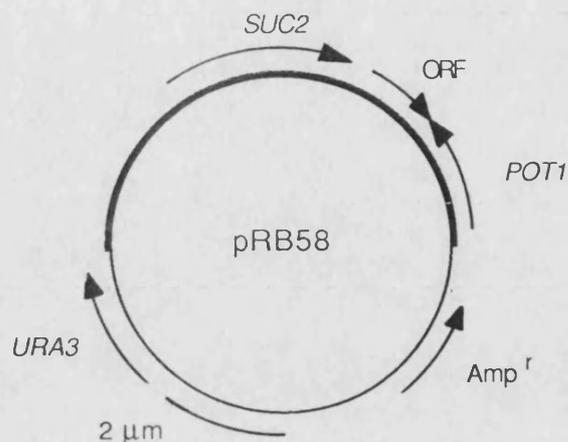
Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ha establecido una serie de criterios para la interpretación de los resultados de un experimento de marcaje terminal indirecto:

- las bandas presentes en las muestras de cromatina pero no en las de DNA desnudo son consecuencia de la estructura de la cromatina. En el caso de la MNasa, dada su preferencia por el DNA espaciador, estas bandas deben corresponder a cortes en dicha zona del DNA o en regiones desprovistas de nucleosomas.

- bandas que están presentes en las muestras de DNA desnudo pero no en las de cromatina corresponden a corte en secuencias reconocidas específicamente por la nucleasa y que quedan protegidas por la estructura de la cromatina, generalmente por "cores" nucleosomales o por factores proteicos.

- las bandas más difíciles de interpretar son las que aparecen tanto en muestras de cromatina como en muestras de DNA desnudo, ya que la especificidad por la secuencia puede enmascarar el hecho de que se deban a la estructura de la cromatina. En estos casos se atiende a la intensidad relativa de las bandas y a que su disposición sea compatible con el tamaño nucleosomal.

Puesto que los estudios de la estructura de la cromatina del gen *SUC2* muestran una completa equivalencia entre la estructura de la copia cromosómica del gen y las copias presentes en plásmidos de replicación autónoma (Pérez-Ortín *et al.*, 1987), se ha utilizado en este trabajo la cepa BQS2 que contiene el plásmido pRB58. Este es un plásmido multicopia que incluye (además del origen de replicación del plásmido 2  $\mu$ m y del gen



**Figura 25.** Esquema del plásmido pRB58. En trazo grueso se ha representado el fragmento de DNA de levadura. Los arcos con flechas indican los genes existentes y la dirección de los mismos.

(*URA3* como marcador) un fragmento del genoma de levadura que incluye el gen *SUC2*, la ORF de 705 pb y el gen *POT1* (Figura 25). La presencia de unas veinte copias por célula de estos genes supone un importante aumento de sensibilidad en la detección de los mismos mediante sondas radiactivas.

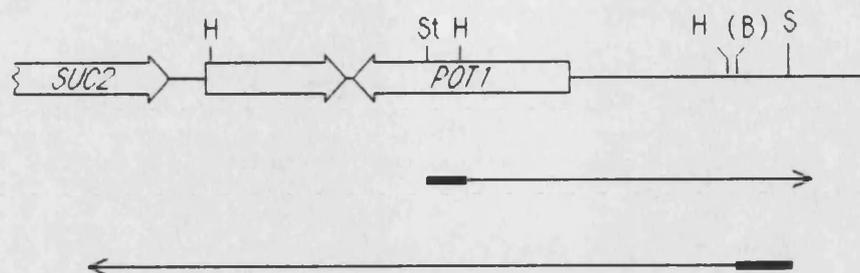
#### 4.2. Localización de zonas hipersensibles a la DNasaI en el gen *POT1*.

Como se ha comentado en la Introducción, los estudios con el gen *SUC2* permitieron obtener un modelo de la estructura de la cromatina de su flanco 3', tanto con digestiones con DNasaI (Pérez-Ortín *et al.*, 1986) como con MNasa (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). Esta zona, de aproximadamente 2.3 kb, presenta una organización cromatínica muy particular. Se han localizado en los extremos dos sitios hipersensibles a nucleasas localizados a +1950 y

+4350 desde el comienzo de la transcripción del gen *SUC2*. Entre ellos aparece una sucesión de 13 nucleosomas perfectamente posicionados y con unos espaciados, en general, más grandes de los 165 pb típicos del genoma de levadura. Dentro de la regularidad de ésta región de la cromatina existe un tramo central donde se alternan espaciados de cortes de la MNasa grandes con otros pequeños, por lo que podría no estar ocupada por nucleosomas o estarlo por nucleosomas alterados. La función posicionadora de los sitios hipersensibles ha sido demostrada para el de +1950 (Matallana, 1989). Una característica importante descrita son los cambios que se observan en dicha región central, probablemente debidos a la desaparición de los nucleosomas, y que fueron el motivo, como se explica en el apartado 1.1. de Resultados y Discusión, de la realización de este trabajo. Con la identificación de dos genes en esta región es interesante reinterpretar los datos, así como obtener nuevos resultados en los diferentes estados de regulación del gen *POT1* ahora conocidos.

Por lo que respecta a los sitios hipersensibles a la DNasaI, las dos regiones identificadas en los trabajos con el gen *SUC2* se localizan en las posiciones 2110 y -290 desde el comienzo del gen *POT1*. Este último podría estar originado por algún elemento regulador en la región del promotor del gen *POT1*, como se ha descrito en otros muchos genes (Elgin, 1988). Con el objeto de estudiar con mayor detalle la estructura de la cromatina del gen *POT1*, se siguió la estrategia de la Figura 26, tanto para la detección de sitios hipersensibles mediante digestiones con DNasaI como en el estudio del posicionamiento de nucleosomas con MNasa. Se realizaron digestiones de la cromatina en los diferentes estados de actividad del gen. En concreto, las células se cultivaron en medio YPG con y sin oleico y se digirieron en fase exponencial de crecimiento o se cultivaron en medio YPg con y sin oleico realizandose en este caso las digestiones tanto en fase exponencial como en fase estacionaria.

Las muestras obtenidas mediante digestión con DNasaI se analizaron en gel de agarosa 1% con restricción *SaI* y sonda SB (Figura 27). Una característica común a todas las muestras es la existencia de un sitio hipersensible bastante lejano (banda 1) que estaría situado a +2204 pb desde el inicio del gen *POT1*. Este sitio coincide con la región hipersensible de aproximadamente 100 pb descrita en los estudios del gen *SUC2* (Pérez-



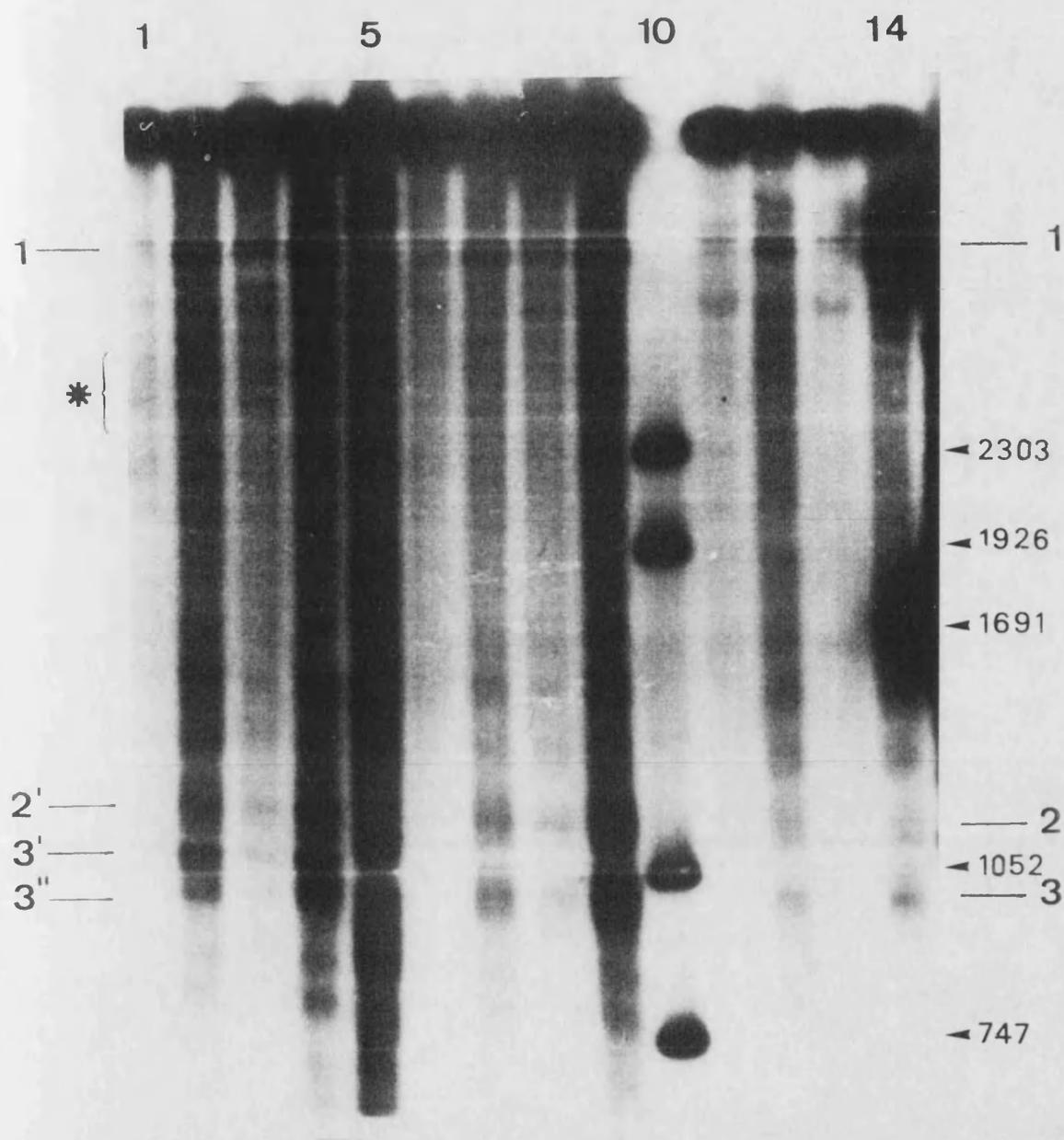
**Figura 26.** Sondas y estrategias utilizadas para la localización de puntos de corte de la DNasa I y MNasa. Los trazos grueso indican las sondas radiactivas utilizadas y los finos las regiones analizadas con ellas. Los enzimas de restricción relevantes son: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sa*I; St, *Stu*I. El punto de restricción BamHI, entre paréntesis, es el punto de clonación del fragmento de levadura en el vector bacteriano en pRB58, desapareciendo en dicha clonación. La sonda SB corresponde por tanto a DNA bacteriano.

Ortín *et al.*, 1986). En dicho trabajo se puso de manifiesto que la zona correspondía exactamente a dos sitios hipersensibles con una región central protegida a digestiones con Mnasa (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). Puesto que su determinación se realizó desde una distancia más próxima, su valor (centrado en +2110) es más fiable que el obtenido en este experimento, aunque la discrepancia observada (84 pb) es menor del 4%. Es interesante resaltar que este sitio hipersensible coincide con la región en la que se encuentra la secuencia consenso ARS discutida en el apartado 1.3 (centrada alrededor de la posición 2103), y que probablemente refleje algún elemento del promotor del gen de la ORF de 705 pb, ya que su relación con el gen *SUC2* ha sido descartada (Matallana, 1989).

Respecto al segundo sitio hipersensible, se ha podido comprobar en este ensayo que realmente corresponde a una estructura central protegida (marcada con un círculo negro en la Figura 27) flanqueada por dos regiones muy sensibles a la digestión (bandas 2 y 3). En esta región se observan cambios entre los diferentes estados de activación del gen *POT1*. En las muestras de cultivos crecidos en presencia de glucosa (carreras 10-13), tanto con oleico como sin oleico en el medio, en las que el gen *POT1* está reprimido (ver Tabla VI y Figura 19), las bandas 2 y 3 se localizan en las posiciones -165 y -294 respectivamente. La zona central protegida, de aproximadamente 35 pb, está centrada en la posición -220 del inicio del gen *POT1*. Con la activación del gen en cultivos crecidos en YPg±0 (carreras 6-9), la banda 3 y la posición protegida no varían, pero la banda 2 se desplaza a la posición -133 (banda 2'). En las muestras extraídas en fase estacionaria, (carreras 1-4), en las que la activación del gen es todavía mayor, además de este cambio se observa una variación en relación a muestras del mismo cultivo pero extraídas en fase exponencial de crecimiento en la región alrededor de la banda 3 (entre -248 y -338): la zona central más sensible presente en las muestras en fase exponencial tanto en medios con como sin glucosa, parece como parcialmente protegida, adquiriendo mayor sensibilidad la región alrededor de la posición -248 (banda 3'), y en menor medida una banda más alejada, en la posición -338 (banda 3'').

En las tres condiciones de cultivo utilizadas no se observan modificaciones en la estructura de la cromatina relacionadas con la presencia de oleico en el medio de cultivo, a pesar de la activación del gen que ello representa en las muestras crecidas en ausencia de glucosa. Como ya se ha comentado, la región responsable de la activación por oleico y represión por glucosa se extiende en un pequeño tramo de 50 pb. La sensibilidad de la técnica de marcaje terminal indirecto utilizado en este trabajo no permite apreciar cambios de estructura en regiones tan pequeñas, por lo que habrá que recurrir a técnicas de mayor resolución para poder determinar si la activación por oleico está como cabe esperar mediada por factores proteicos que interaccionan con el DNA.

Además de las comentadas, se observan en todas las muestras muchas otras bandas de menor intensidad. Dichas bandas coinciden



**Figura 27.** Localización de sitios hipersensibles a la DNasa I mediante restricción *SaI* y sonda SB.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa del 1% de 25 cm de largo. Las muestras corresponden a cultivos en YPg y YPg+0 en fase estacionaria (carreras 1-2 y carreras 3-4 respectivamente) o en fase exponencial (carreras 6-7 y carreras 8-9) y a cultivos en YPG (carreras 11-12) y YPG+0 (carreras 13-14) ambos en fase exponencial. Como testigo de DNA desnudo se digirió plásmido pRB58 (carrera 5). En la carrera 10 se inyectó una digestión de pRB58 con diferentes enzimas de restricción como patrones de tamaño. Las migraciones y los tamaños de las bandas de éstos y otros patrones obtenidos por restricciones de pBR322 se indican a la derecha con puntas de flecha. El resto de los símbolos se explican en el texto.

aproximadamente con las obtenidas mediante digestiones con MNasa, por lo que deben tratarse de ataques preferentes de la DNasaI a DNAs espaciadores. Una cierta preferencia de la DNasaI por dichas regiones de DNA ya había sido descrita previamente (Lohr *et al.*, 1977; Worcel *et al.*, 1983; Pérez-Ortín *et al.*, 1986; Lee y Garrard, 1991). Es interesante resaltar el aumento de la sensibilidad que se observa con la activación del gen en ausencia de glucosa (carreras 1-4 y 6-9 frente a carreras 11-14) en la región intergénica entre el gen *POT1* y la ORF y que están marcados con un asterisco en la Figura 27. La región limitada por dos bandas (+1433 y +1234) en condiciones de represión, presenta, en las muestras en las que no hay represión por glucosa, una gran sensibilidad entre +1433 y +1340, mientras que la zona desde +1340 hasta +1268 parece menos accesible a la DNasaI. Puesto que los resultados con MNasa son mucho más claros, estos cambios así como el posicionamiento de nucleosomas que parece deducirse de la Figura 27 se comentarán más adelante.

Los cambios observados en la sensibilidad a la DNasaI en la región del promotor con los cambios de actividad concuerdan con los obtenidos por otros autores en diversos genes de levadura y otros eucariotas. El sitio hipersensible descrito coincide con la secuencia responsable de la represión por glucosa e inducción por ácido oleico del gen *POT1*, que se extiende entre -153 y -203 (H. Tabak, comunicación personal), lo cual hace suponer que existe una relación entre ambos hechos. La interacción de proteínas con esta zona podría ser la causa de la estructura alterada de la cromatina responsable de su sensibilidad, como sucede en muchos otros genes (Elgin, 1988). De hecho, el modelo sobre la estructura de sitios hipersensibles, con una zona protegida por la unión de proteínas que impide la asociación de nucleosomas dejando accesibles a las nucleasas las regiones colindantes con un efecto global de hipersensibilidad, encaja perfectamente con el tipo de estructura detectada.

El desplazamiento de la banda 2 con la activación del gen podría estar originado por la entrada de nuevos factores proteicos que interaccionarían con la región reguladora. La proteína ADR1, un factor que como se ha indicado media en la activación de los genes peroxisomales por la ausencia de glucosa, podría ser la responsable de dichos cambios. En las muestras en fase estacionaria, el cambio observado afecta a la región que

se extiende entre -248 y -338, con una disminución muy marcada de la sensibilidad de la banda 3 (a -294). Este cambio parece indicar claramente que el promotor del gen *POT1* presenta una estructura característica en células en fase estacionaria, debido probablemente a la interacción con algún, o algunos, factores, que estaría relacionada con la mayor actividad del gen descrita en este trabajo para dicho estado. Como se ha indicado en el apartado 3.2., el motivo *Miv1*, que se encuentra en -250 englobado en una secuencia palindrómica de 12 pb y es responsable de la regulación en función del ciclo celular de algunos genes, podría ser el blanco de proteínas reguladoras que al interaccionar con el DNA protegieran parcialmente la región alrededor de la banda 3 y originaran la aparición de la banda 3'.

Un esquema de los resultados obtenidos se representa en la Figura 28.

#### **4.3. Posicionamiento de nucleosomas en el gen *POT1* y sus flancos.**

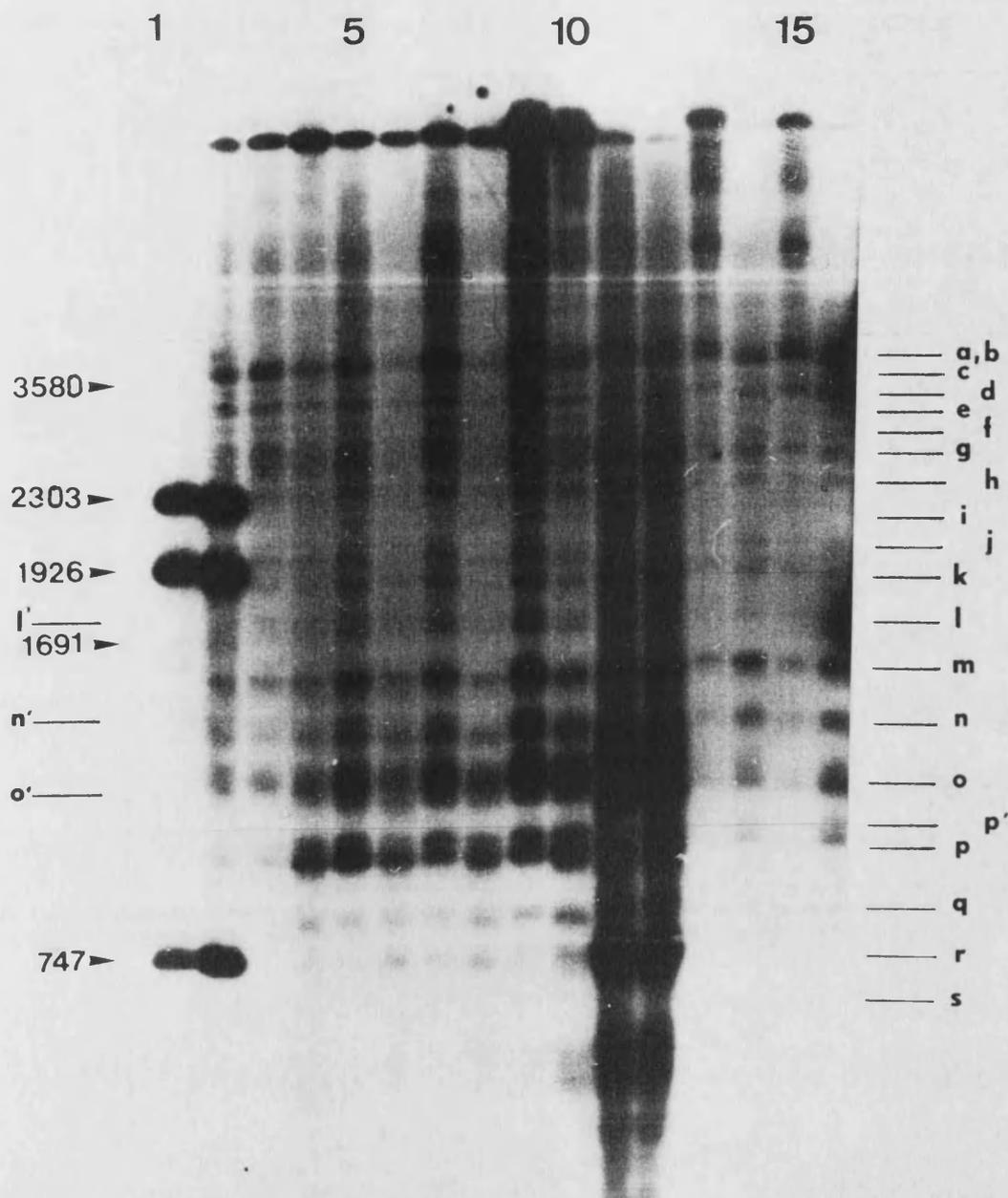
Para la determinación de las posiciones de los nucleosomas en el gen *POT1* y sus flancos se realizaron digestiones con MNasa en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente para la DNasaI. Las muestras se analizaron en primer lugar en agarosa al 1% con una restricción *SmaI* e hibridación con la sonda SB. La Figuras 29 y 30 muestra los resultados obtenidos.

En condiciones de represión (cultivos en YPG±0) se observa un posicionamiento estricto de nucleosomas a lo largo de toda la región. En el promotor del gen *POT1*, a la altura del sitio hipersensible descrito anteriormente, se detecta una estructura similar a la observada en las muestras digeridas con DNasaI. En las posiciones -309 y -270 se observan dos bandas (**p** y **p'** respectivamente) que también están presentes en muestras de DNA desnudo, mientras que en la posición -165 existe una banda (**o**) que parece típica de cromatina (ver Figura 30). En las muestras de DNA se observa una banda intensa de migración muy parecida a **o**, aunque ligeramente por debajo, que estaría protegida en la cromatina. Puesto que la separación entre **p'** y **o** es bastante pequeña (105 pb) para la existencia de un nucleosoma en dicha zona, la protección de la zona

alrededor de -150 (posición de la banda de DNA comentada) debe originarse por la interacción con factores proteicos reguladores, como se discute más adelante. A partir de la banda **o** se colocarían trece nucleosomas hasta el sitio hipersensible a la DNasaI detectado en +2204 y que corresponde, según se ha visto en estudios anteriores con el *SUC2*, a un doblete (**a/b**) (Pérez-Ortín *et al.*, 1987). En algunos casos este posicionamiento no admite dudas al tratarse de bandas que no aparecen en las muestras de DNA y por tanto son debidas a la estructura de la cromatina, siendo los espaciados entre ellas compatibles con la existencia de partículas nucleosomales. Tal es el caso de las bandas **c, d, e, f, i, j** y **l**, que deben reflejar el corte preferencial de la MNasa en el DNA espaciador entre los nucleosomas **b-c, c-d, d-e, e-f, f-g, h-i, i-j, j-k, k-l**.

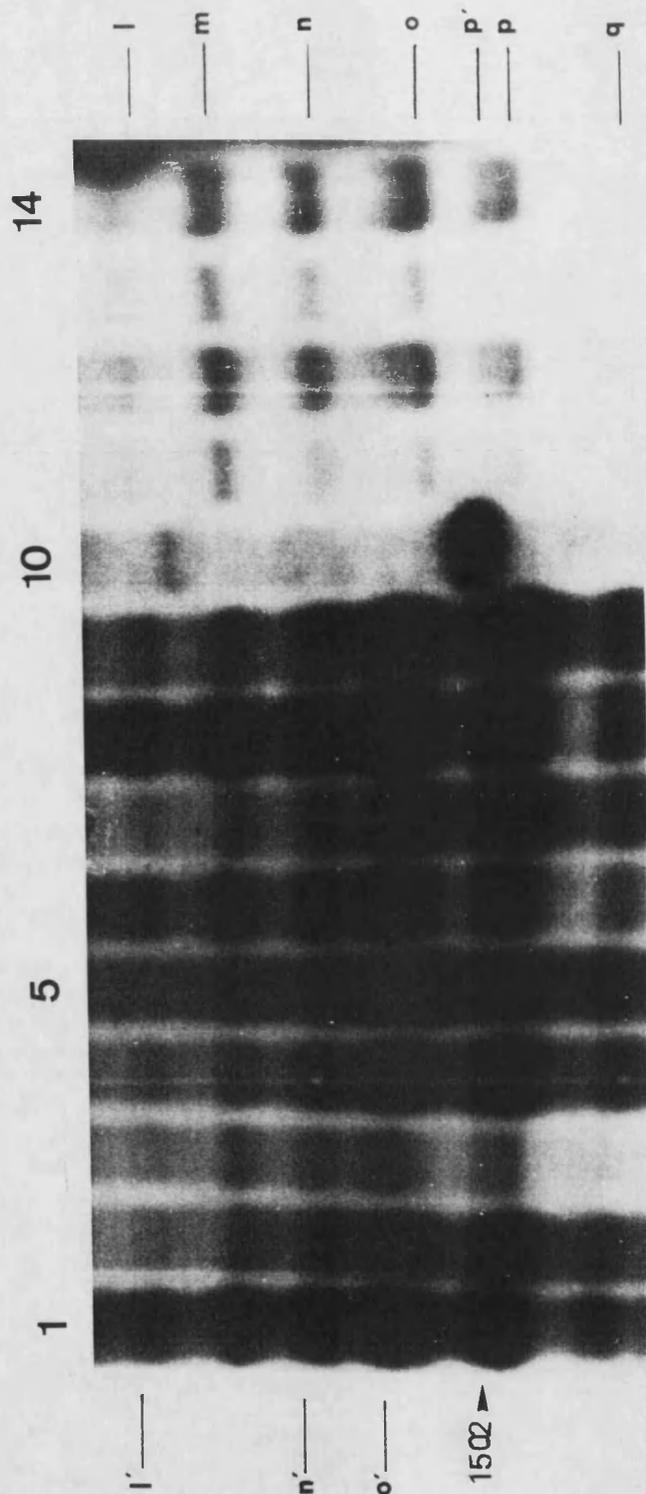
En otros casos, la coincidencia de las bandas tanto en DNA como en cromatina pueden plantear la duda sobre la existencia de nucleosomas posicionados. Así ocurre con las bandas **g, h, k, m** y **n** (aunque esta última parece tener un tamaño ligeramente más grande que la presente en muestras de DNA), que podría hacer dudar de los posibles nucleosomas entre **o-n, n-m** y **g-h**. En el caso de la zona entre **o** y **n**, que como se ha comentado corresponden a bandas de tamaño parecido a bandas existentes en muestras de DNA desnudo aunque parecen diferentes (ver Figura 30), la existencia de un nucleosoma se confirma por la protección de la banda muy intensa que presenta en esa zona la muestra de DNA desnudo. El hecho de que en los otros dos casos la distancia entre las bandas (172 y 224 pb respectivamente) sea compatible con la existencia de nucleosomas posicionados y la estructura tan definida de toda la región parece indicar que en efecto sí que existen dichos nucleosomas y que se trata de una coincidencia de las secuencias reconocidas por la MNasa con los DNA espaciadores. El nucleosoma entre **n-m** se confirma más adelante en la Figura 31.

Adicionalmente a los trece nucleosomas presentes entre los dos sitios hipersensibles a la DNasaI, en el lado 5' del sitio localizado en el promotor del *POT1* también se observa el posicionamiento, en este caso, de dos nucleosomas entre las bandas **p-q** y **q-s**. Tanto la banda **q** como la **s** son bandas que sólo se observan en las muestras de cromatina, por lo que la existencia de estos nucleosomas no ofrece duda. Además, la banda **r** situada



**Figura 29.** Localización de puntos de corte de la MNasa mediante restricción *SaI* y sonda SB.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa del 1% de 25 cm de largo. Las muestras corresponden a cultivos en YPg y YPg+0 en fase estacionaria (carreras 3-4 y carreras 5-6 respectivamente) o en fase exponencial (carreras 7-8 y carreras 9-10) y a cultivos en YPG (carreras 13-14) y YPG+0 (carreras 15-16) ambos en fase exponencial. Como testigo de DNA desnudo se digirió plásmido pRB58 (carreras 11-12). En la carrera 1 se inyectó una restricción de pRB58 con diferentes enzimas de restricción como patrones de tamaño. En la carrera 2 se inyectó alícuotas de las muestras de las carreras 1 y 3 para comprobar si se producía alguna distorsión en la migración por efecto de la cantidad de DNA inyectada. Los símbolos como en la Figura 27.



**Figura 30.** Detalle de la localización de puntos de corte de la MNasa mediante restricción *SaI* y sonda SB.

Se analizaron nuevamente las muestras por electroforesis en gel de agarosa del 1% de 25 cm de largo. Las muestras corresponden a cultivos en YPg y YPg+0 en fase estacionaria (carreras 1-2 y carreras 3-4 respectivamente) o en fase exponencial (carreras 6-7 y carreras 8-9) y a cultivos en YPG (carreras 11-12) y YPG+0 (carreras 13-14) ambos en fase exponencial. Como testigo de DNA desnudo se digirió plásmido pRB58 (carrera 5). En la carrera 10 se inyectó una restricción de pRB58 con diferentes enzimas de restricción como patrones de tamaño. Se muestra sólo un detalle de la región del promotor de *POT1*. Símbolos como en Figura 29.

entre ambas y que es característica de DNA desnudo, aunque llega a detectarse en las muestras de cromatina, está claramente protegida en comparación con las muestras de DNA desnudo.

Las posiciones de las diferentes bandas así como el espaciado entre ellas se recoge en la Tabla VII.

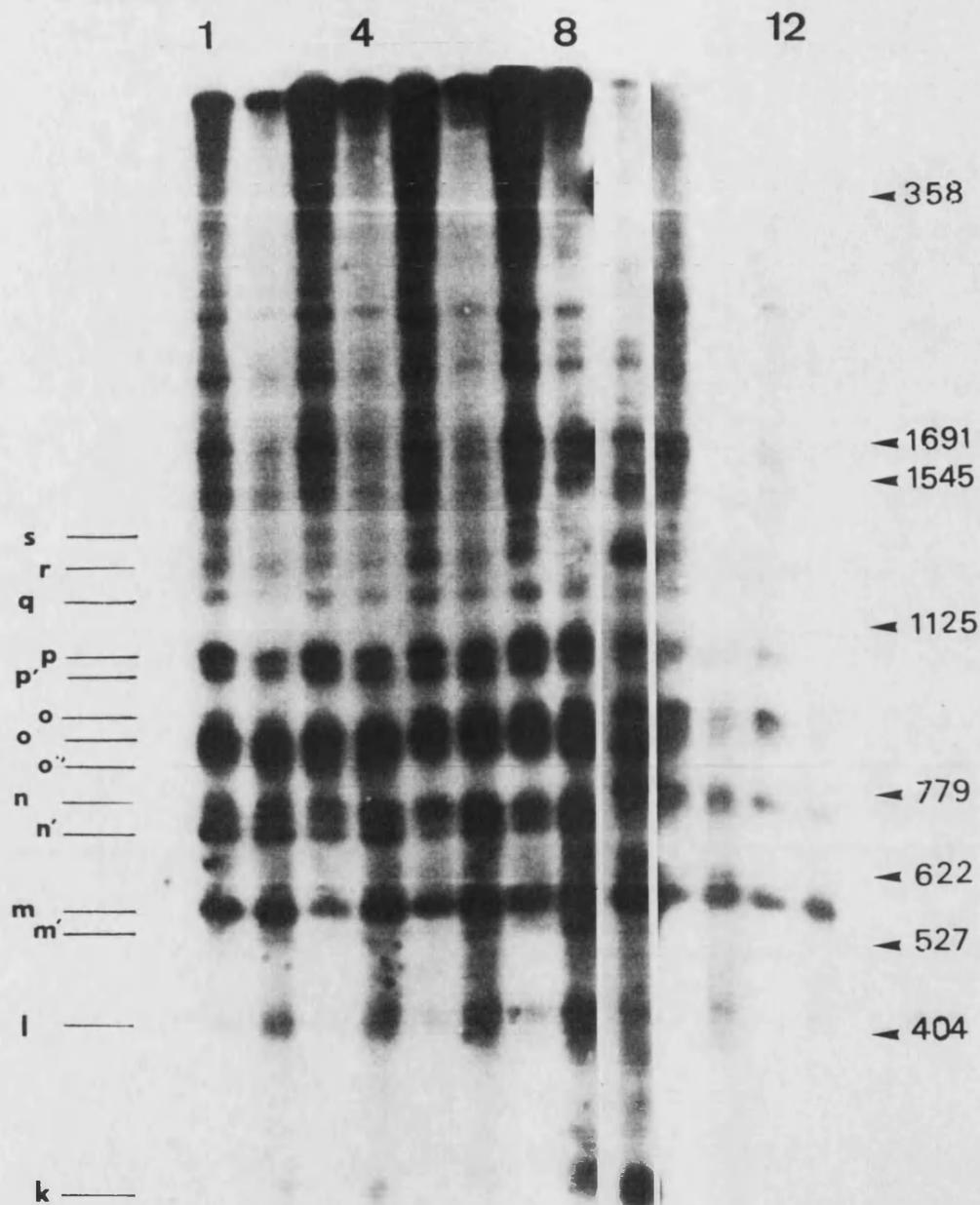
Con la activación del gen en cultivos en YPg±0 se observan cambios en el posicionamiento en dos regiones que coinciden con las comentadas anteriormente para la DNasaI. En la región del promotor, la banda **o** situada a -165, (equivalente a la banda 2 de las muestras con DNasaI) desaparece casi totalmente mientras que se observa una banda un poco desplazada, la **o'**, en la posición -109. Cambios más discretos se observan en las bandas **n** (+22) y **l** (+194), que parecen desdoblarse en dos bandas. Un cambio importante ocurre en la región entre las bandas **f** (+1436) y **h** (+1040). En condiciones de represión existen dos nucleosomas posicionados entre dichas bandas que desaparecen, al menos el **f-g**, con la activación del gen. En las muestras activas, entre ambas bandas se diferencian dos regiones, una muy sensible que se extiende desde +1436 hasta +1200, con una zona central menos sensible (esta región corresponde a la zona que sufría modificaciones en las muestras de DNasaI como se observa en la Figura 27), y otra protegida desde +1200 a +1040. En esta última zona sería posible la existencia de un nucleosoma.

En las digestiones con Mnsa analizadas mediante esta estrategia no se observa ningún cambio en la estructura de la cromatina en las células en fase estacionaria, al contrario de lo que ocurría en las digestiones con DNasaI. Al igual que entonces, la presencia de oleico en el medio y la consiguiente activación del gen siempre que no haya glucosa, no origina tampoco ningún cambio en la estructura que pueda ser detectable mediante la técnica utilizada.

A continuación se realizó un análisis mediante restricción *Sma*I e hibridación con la sonda SH, con el objeto de poder confirmar los cambios observados en la región del promotor. En primer lugar, con los resultados de la Figura 31 se confirma la existencia de un nucleosoma posicionado entre las bandas **n-m**, ya que en dicha región se observa la protección de una banda existente en el DNA desnudo. Como en la estrategia anterior, al

TABLA VII.

<u>banda</u>	<u>posición</u>	<u>espaciado</u>
a/b	2204	238
c	1966	178
d	1788	216
e	1572	136
f	1436	172
g	1264	224
h	1040	160
i	880	187
j	693	140
k	553	192
l	237	167
m	194	172
n	22	187
o	-165	105
p'	-270	39
p	-309	
l'	424	187
m'	237	172
n'	65	174
o'	-109	



**Figura 31.** Localización de puntos de corte a la MNasa mediante restricción *StuI* y sonda SH.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa del 1.4% de 25 cm de largo. Las muestras corresponden a cultivos en YPg y YPg+0 en fase estacionaria (carreras 1-2 y carreras 3-4 respectivamente) o en fase exponencial (carreras 5-6 y carreras 7-8) y a cultivos en YPG (carreras 10-11) y YPG+0 (carreras 12-13) ambos en fase exponencial. Como testigo de DNA desnudo se digirió plásmido pRB58 (carrera 9). Símbolos como en Figura 29.

crecer las células en YPg±O la banda **o** desaparece originándose la banda **o'** (analogamente a los cambios de las bandas **2** y **2'** de digestiones con DNasaI). También se ve claramente el desdoblamiento de la banda **n** para originar la banda **n'** y también se observa la aparición de una banda, aunque débilmente, por debajo de la **m** (banda **m'**). La aportación principal de esta estrategia se refiere a las muestras en fase estacionaria, puesto que permite observar diferencias con las muestras de fase exponencial. En concreto, por debajo de la banda **o'** aparece una nueva banda, la **o''**. Además, la banda **n** se difumina, convirtiéndose en una zona sensible que se extiende hasta **n'**. Estos cambios en las bandas, unidos a los observados en las digestiones con DNasaI, deben reflejar cambios en la estructura del promotor que acompañan la activación del gen que se produce al alcanzarse la fase estacionaria. Como en los casos anteriores tampoco se pudo observar cambios específicos con la adición de oleico a los medios de cultivo.

Cambios en el posicionamiento de nucleosomas asociados a la activación de los genes se han descrito en diversos casos (Almer *et al.*, 1986; Lohr, 1984; Pérez-Ortín *et al.*, 1987; Szent-Györgyi *et al.*, 1987). Generalmente el proceso implica la eliminación de uno o varios nucleosomas presentes en estado reprimido, dejando accesibles secuencias esenciales para la transcripción del gen. El papel "represor" que pueden desempeñar los nucleosomas en la transcripción génica también ha quedado demostrado por el grupo de M. Grunstein en los que demuestran la activación de genes causada por la ausencia de histona H4 y la consiguiente ausencia de nucleosomas (Han *et al.*, 1988).

En el caso concreto del *POT1*, los datos obtenidos no permiten una interpretación sencilla de este tipo. Un resumen de la estructura de la cromatina del gen *POT1* y sus flancos así como de los cambios en el posicionamiento que se observan con la activación del gen se representan en la Figura 32. En estado reprimido, hay una zona hipersensible a la DNasaI y también marcadamente más sensible a la MNasa entre las bandas **p-p'-o**. Esta región se extiende entre -165 y -309, abarcando la casi totalidad de la región reguladora responsable de la represión por glucosa e inducción por oleico. La ausencia de nucleosomas podría estar originada por la interacción específica de factores reguladores con dicha región que como

ya se ha comentado pudiera dar lugar a la mayor sensibilidad de la región. Estos factores podrían actuar como posicionadores de nucleosomas bloqueando la transcripción del gen.

El cambio más llamativo que se observa con la liberación de la represión por glucosa es el desplazamiento de la sensibilidad de la banda **o** a la **o'**, un cambio que también se reflejaba en las digestiones con DNase I. La banda **o'**, como se observa al comparar con las muestras de DNA desnudo tanto en las Figuras 29 y 30 como en la Figura 31 es una banda característica de cromatina. Además, entre **p'** y **o'** debe existir alguna estructura cromatínica que proteja la zona, pues hay una banda intensa en muestras de DNA que no se observa en las muestras activas. Una posibilidad es el ensamblaje de un nucleosoma en esta zona, pues la distancia entre **p'** y **o'** es de 161 pb, aunque es más factible que exista una protección directa de la zona de la banda **o**, a -165, por factores proteicos. De hecho, esa posición está dentro de la secuencia reguladora de 50 pb descrita. Como se ha comentado anteriormente, la proteína ADR1 podría ser la responsable directa de dicha interacción. Una consecuencia de dicha interacción sería la aparición de la banda **o'**, que se podría interpretar como un desplazamiento lateral del nucleosoma entre **o-n**. La distancia entre la banda **o'** y **n**, de 132, es demasiado corta para la existencia de un nucleosoma, aunque no se puede descartar totalmente. De hecho, algún tipo de estructura que protege al DNA debe existir, pues hay una clara protección de una banda existente en DNA desnudo. Más probable es que ocurriera un desplazamiento lateral de varios nucleosomas, lo que justificaría el dedoblamiento que se observa, aunque menos pronunciado, en las bandas **n**, **m** y **l** (apareciendo las bandas **n'**, **m'** y **l'**) al activarse el gen. Ninguna de estas bandas, como tampoco sucedía con la **o'**, aparecen en DNA desnudo, por lo que parecen cortes en DNA espaciadores, y las distancias entre estas bandas son compatibles con la existencia de nucleosomas **o'-n'**, **n'-m'** y **m'-l'** (Tabla VII). Puesto que las bandas **n**, **m** y **l** no desaparecen, se puede plantear la hipótesis de la existencia de dos fases en el posicionamiento de nucleosomas ligeramente desplazadas una de otra. El hecho de que el dedoblamiento de las bandas se atenue a medida que nos alejamos de la región reguladora parece apoyar esta idea del deslizamiento de nucleosomas por la entrada de factores reguladores.

se ha demostrado *in vitro* (Dong *et al.*, 1990) e *in vivo* (Ponder y Crawford, 1977), aunque hasta ahora no se había descrito en relación con un proceso de activación génica.

Dentro de esta hipótesis se podrían explicar los cambios observados mediante digestiones con MNasa en las muestras en fase estacionaria. En estas muestras aparece una banda **o''**, ligeramente desplazada de la **o'**, a la vez que la zona de la banda **n** se difumina. Todo ello podría representar un desplazamiento nuevamente del nucleosoma, aunque menos marcado que el sugerido anteriormente, que afectaría a los nucleosomas **o-n o'-n'**. El que la banda **o''** parezca coincidir con una banda existente en digestiones de DNA desnudo, así como la alteración de la zona de la banda **n**, permite también una explicación que implique la distorsión o eliminación parcial de los nucleosomas citados.

En ninguna de las muestras se observan cambios específicos relacionados con la presencia de oleico en el medio de cultivo. Como ya se ha comentado, la causa podría ser que las regiones reguladoras de la represión por glucosa e inducción por oleico se extienden tan sólo a lo largo 50 pb, no permitiendo la sensibilidad del método detectar cambios dentro de dicha región. El dominio del mecanismo de represión por glucosa sobre el de inducción por oleico se podría explicar en función de los datos de la estructura de la cromatina del promotor obtenidos. En presencia de glucosa, el posicionamiento de nucleosomas escondería las secuencias diana de los probables factores responsables de la regulación por oleico. El desplazamiento de los nucleosomas mediado por la eliminación de la glucosa, dejaría accesibles dichas secuencias, permitiendo entonces la activación de la transcripción como respuesta a la presencia de ácido oleico.

Además de los cambios observados en la región del promotor, se detectan variaciones en el posicionamiento de nucleosomas en las zonas 3' del gen *POT1* y de la ORF, al igual que se detectaban mediante digestiones con DNasaI. En estado reprimido del gen *POT1*, existen dos nucleosomas posicionados entre las bandas **f-g** y **g-h**. Al activarse *POT1* en medios YP±O desaparece la banda **g** observándose una zona extensa sensible a la nucleasa desde la banda **f** hasta la posición +1183 (entre las bandas **g** y **h** del estado reprimido). Este cambio es parecido al observado en digestiones con DNasaI, aunque en este último caso la zona sensible se extendía sólo

hasta +1340 permaneciendo la banda análoga a la **g** inalterada. La accesibilidad de esta región se explicaría por la desaparición del nucleosoma entre **f-g**. El nucleosoma entre **g-h** también podría desaparecer o, al menos alterarse, colocándose entre la región protegida que se observa entre +1183 y la banda **h** en 1040, con una extensión de 143 pb que, dentro del error experimental podría ser suficiente para albergar un nucleosoma. La causa de estos cambios podría ser el superenrollamiento positivo inducido por el avance de la RNA pol II durante la transcripción (Pederson y Morse, 1990; Lee y Garrard, 1991). En nuestro caso concreto la existencia de dos genes transcribiéndose simultáneamente en direcciones opuestas originaría una acumulación de supervueltas positivas en la zona intergénica que desestabilizaría los nucleosomas de esa zona.

## **Conclusiones**

La secuenciación de una región de aproximadamente 3000 pb en el flanco 3' del gen *SUC2* ha permitido la localización de dos nuevos genes hasta ahora desconocidos en dicha zona. Próximo al gen *SUC2*, y en la misma orientación existe una pauta abierta de lectura de 705 pb que codifica un mRNA de 0.85 kb de transcripción constitutiva. Este gen no muestra homología al comparar su secuencia con las bases de datos ni su mutación lleva asociado un fenotipo aparente, por lo que no se ha podido identificar su naturaleza. El otro gen, más alejado del *SUC2* y en orientación contraria, tiene una región codificante de 1251 pb dando lugar a un mRNA de 1.6 kb. La comparación de la secuencia de la proteína con las bases de datos y el efecto fenotípico de su ruptura ha permitido su identificación como el gen de la 3-oxoacil-CoA tiolasa peroxisomal, al que se ha denominado *POT1*. Este gen es el gen más al extremo del telómero del cromosoma IX conocido hasta ahora.

La comparación de las secuencias de *POT1* y de otras tiolasas ha reflejado la alta conservación de la parte carboxilo terminal de dichas proteínas a lo largo de la evolución. En concreto, se han identificado tres regiones entre los aminoácidos 185-218, 265-285 y 310-390 de la secuencia de *POT1* especialmente conservados que deben estar involucradas en funciones esenciales y comunes a todas las tiolasas.

Los árboles filogenéticos deducidos de las secuencias mediante una variante del método de remuestreo diferencian dos grupos monofiléticos constituidos por la 3-oxoacil-CoA tiolasa de *E. coli* y los enzimas peroxisomales por un lado, y por la 3-oxoacil-CoA tiolasa mitocondrial y todas las acetoacetyl-CoA tiolasas por el otro lado. El proceso evolutivo seguido por las tiolasas parece implicar una primera duplicación génica a partir de un ancestro común con una afinidad amplia por sustratos de diferente longitud de cadena para originar dos proteínas con especificidades ligeramente diferentes a partir de una de las cuales surgirían las tiolasas específicas de acetoacetyl-CoA.

El gen *POT1* está sujeto a tres mecanismos de regulación diferentes que actúan a nivel de la transcripción del gen: represión por glucosa,

inducción por ácido oleico y activación en la fase estacionaria de crecimiento. El mecanismo de represión por glucosa domina sobre el efecto inductor del oleico, y en él intervienen los productos de los genes *SNF1* y *SSN6*, pero no el del gen *MIG1*.

En el promotor del gen *POT1* existe un sitio hipersensible a la DNasaI y a la MNasa constituido por una región central protegida flanqueada por dos zonas muy sensibles en las posiciones -165 y -270. Esta región coincide con el elemento regulador responsable de la represión por glucosa y de la inducción por oleico descrito para el gen *POT1* (H.Tabak, comunicación personal). A partir de este sitio hipersensible se localizan en estado reprimido 13 nucleosomas posicionados ( hasta el sitio hipersensible situado en el flanco 5' de la ORF de 705 pb) en la dirección 3' del gen *POT1* y al menos dos nucleosomas posicionados en la dirección 5'. Con la activación del gen por la ausencia de glucosa se producen cambios de la estructura de la cromatina en dos regiones diferentes. En la zona del promotor, la zona protegida del sitio hipersensible se extiende hacia la región codificante, apareciendo nuevas bandas. Los datos sugieren un desplazamiento lateral con la consiguiente existencia de dos fases de posicionamiento de los tres primeros nucleosomas. Por otro lado, se observan cambios en la región intergénica entre el gen *POT1* y la ORF de 705 pb, con la pérdida de al menos un nucleosoma de dicha región y el aumento de sensibilidad de la misma. Las células en fase estacionaria parecen tener una estructura cromatínica característica en la región del promotor del gen *POT1*. Mediante digestiones con DNasaI se han podido observar diferencias en la zona entre -248 y -238, con una aparente protección de la región central de dicha zona en comparación con células en fase exponencial de crecimiento. La digestión con MNasa de la cromatina de células en fase estacionaria también permite observar diferencias con células en fase exponencial, en concreto una alteración en la región del primer nucleosoma posicionado. En ningún caso se han podido detectar cambios en la estructura de la cromatina específicos de la activación por oleico.

## **Bibliografía**

- ALMER, A., H. RUDOLPH, A. HINNEN y W. HÖRZ, 1986. *EMBO J.* 5: 2689-2696.
- AMATI, B. y S.M. GASSER, 1988. *Cell* 54.
- AMATI, B. y S.M. GASSER, 1990. *Mol. Cell Biol.* 10: 5442-5454.
- AMERSHAM INTERNATIONAL plc, 1985. *Membrane and detection protocols.*
- ANDERSON, S.G.E y C.G. KURLAND, 1990. *Microbiol. Rev.* 54: 198-210.
- ARAKAWA, H., M. TAKIGUCHI, Y. AMAYA, S. NAGATA, H. HAYASHI y M. MORI, 1987. *EMBO J.* 6: 1361-1366.
- ARAKAWA, H., Y. AMAYA y M. MORI, 1990. *J. Biochem.* 107: 160-164.
- AVERS, C.J. y H. FEEDERMAN, 1968. *J. Cell Biol.* 37: 555-562.
- BENNETZEN, J.L. y B.D. HALL, 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 3026-3031.
- BAKER, A. y G. SCHATZ, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3117-3121.
- BEHRENDT, W., K. ENGELAND y H. KINDL, 1988. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 161-169.
- BIRNBOIM, H.H. y J. DOLY, 1979. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- BLOOD, K.S. y J. CARBON, 1982. *Cell* 29: 305-317.
- BODNAR, A.G. y R.A. RACHUBINSKI, 1990. *Gene* 91: 193-199.
- BRADFORD, M., 1976. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRAND, H.A., G. MICKLEM y K. NASMYTH, 1987. *Cell* 51: 709-719.
- BROACH, J.R., 1991. *TIG* 7: 28-33.
- BORST, P., 1989. *Biochim. Biophys. Acta* 1008:1-13.
- BOUT, A., Y. TEUNISSEN, T. HASHIMOTO, R. BENNE y J.M. TAGER, 1988. *Nucl. Acids Res.* 16: 10369.

- BROEK, D., T. TODA, T. MICHAELI, L. LEVIN, C. BIRCHMEIER, M. ZOLLER, S. POWERS y M. WIGLER, 1987. *Cell* 48: 789-800.
- BUCHMAN, A.R. y R.D. KORNBERG, 1990. *Mol. Cell Biol.* 10: 887-897.
- CARLSON, M. y D. BOTSTEIN, 1982. *Cell* 28: 145-154.
- CARLSON, M., B.C. OSMOND y D. BOTSTEIN, 1981. *Genetics* 98: 25-40.
- BURATOWSKI, S., S. HAHN, P.A. SHARP y L. GUARENTE, 1988. *Nature* 334: 37-42.
- CARLSON, M., B.C. OSMOND, L. NEIGEBORN y D. BOTSTEIN, 1984. *Genetics* 107: 19-32.
- CAVALIER-SMITH, T., 1987. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 503: 55-71.
- CAVALLINI, B., J.HUET, J.L. PLASSAT, A. SENTENAC, J.M. EGLY y P. CHAMBON, 1988. *Nature* 334:77-80.
- CELENZA, J.L. y M. CARLSON, 1986. *Science* 233: 1175-1180.
- CHASMAN, D.I. y R.D. KORNBERG, 1990. *Mol. Cel. Biol.* 10:2916-2923.
- CHERRY, J.R., JOHNSON, T.R., DOLLARD, C., SHUSTER, J.R. y C.L. DENIS, 1989. *Cell* 56: 409-419.
- CHOI, O. R. y J.D. ENGEL, 1986. *Nature* 323: 731-734.
- CLINKENBEAR, K.A., T. SUGIYAMA, J. MOSS, W.A. REED y M.D. LAVE, 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 2275-2284.
- COHEN, G., W. RAPATZ, y H. RUIS, 1988. *Eur. J. Biochem.* 176: 159-163.
- COOPER, T.G. y H. BEEVERS, 1969. *J. Biol. Chem.* 244: 3514-3520.
- DENIS, C.L., 1987. *Mol. Gen. Genet.* 208: 101-106.
- DENIS, C.L. y C. GALLO, 1986. *Mol. Cell Biol.* 6: 4026-4030.
- DENIS, C.L. y E.T. YOUNG, 1983. *Mol. Cell Biol.* 3: 360-370.
- DINGWALL, C., LOMONOSSOFF, P. y LASKEY, R.A., 1981. *Nucleic Acid Res.* 9: 2659-2673.

- DONG, F., J.C. HANSEN y K.E. VAN HOLDE, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5724-5728.
- DOOLITTLE, R.F., 1987. "Of urfs and orfs: a primer on how to analyze derived amino acid sequences". University Science Books.
- DOPAZO, J., 1991. comunicación personal.
- DREBOT, M.A., C.A. BARNES, R.A. SINGER y G.C. JOHNSTON, 1990. *J. Bacteriol.* 172: 3584-3589.
- DREW, H.R. y C.R. CALLADINE, 1987. *J. Mol. Biol.* 195: 143-173.
- DUNCOMBE, G.R. y F.E. FRERMAN, 1976. *Arch. Biochem. Biophys.* 176: 159-170.
- De DUVE, C., 1983. *Sci. Am.* 248: 74-84.
- EFRON, B., 1982. The Jackknife, the Bootstrap and other resampling plans. Society for industrial and applied mathematics.
- EISENBERG, D., E. SCHWARTZ, M. KOMARONY y R. WALL, 1984. *J. Mol. Biol.* 179: 125-142.
- EISSENBERG, J.D., I.L. CARTWRIGHT, G.H. THOMAS y S.C.R. ELGIN, 1985. *Ann. Rev. Genet.* 19: 485-536.
- ELGIN, S.C.R., 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 19259-19262.
- EMERSON, B.M. y G. FELSENFELD, 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 95-99.
- ENTIAN, K.D., 1986. *Microbiol. Sci.* 3: 366-371.
- ERDMANN, R., M. VEENHUIS, D. MERTENS y W.H. KUNAU, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5419-5423.
- ERDMANN, R., F.F. WIEBEL, A. FLESSAU, J. RYTKA, A. BEYER, K.U. FROHLICH y W.H. KUNAU, 1991. *Cell* 64: 499-510.
- FAIRBAIRN, L.J. y M.J.A. TANNER, 1989. *Nucl. Acids Res.* 17: 3588.
- FEINBERG, A.P. y B. VOGELSTEIN, 1983. *Anal. Biochem.* 132: 6-10.

- FEINBERG, A.P. Y B. VOGELSTEIN, 1984. *Anal. Biochem.* 137: 266-271.
- FELSENSTEIN, J., 1984. *Evolution* 39: 16-24.
- FELSENSTEIN, J., 1985. *Evolution* 39: 783-791.
- FELSENSTEIN, J., 1990. PHILIP manual version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkeley, California.
- FICKETT, J.W., 1982. *Nucleic Acids Res.*10: 5303-5318.
- FINCH, J.T. y A. KLUG, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1897-1901.
- FITCH, M.W. y E. MARGOLIASH, 1967. *Science* 155: 279-284.
- FRAGELIUS, T.J. y D.M. LIVINGSTON, 1984. *J. Mol. Biol.* 173: 1-13.
- FRAGELIUS, T.J., A.D. STRAND y D.M. LIVINGSTON, 1987. *J. Mol. Biol.* 197: 415-423.
- FREVERT, J. y H. KINDL, 1980. *Physiol. Chem.* 361: 537-542.
- FUJIKI, Y., R.A. RACHUBINSKI, R.M. MORTENSEN y P.B. LAZAROW, 1985. *Biochem. J.* 226: 697-704.
- FUKAO, T., K. KAMIJO, T. OSUMI, Y. FUJIKI, S. YAMAGUCHI, T. ORII y T. HASHIMOTO, 1989. *J. Biochem.* 106: 197-204.
- FUKAO, T., S. YAMAGUCHI, M. KANO, T. ORII, Y. FUJIKI, T. OSUMI y T. HASHIMOTO, 1990. *J. Clin. Invest.* 86: 2086-2092.
- GANCEDO, J.M. y C. GANCEDO, 1986. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 179-187.
- GASCON, S. y J.O. LAMPEN, 1986. *J. Biol. Chem.* 243: 1567-1572.
- GEHRING, U. y J.I. HARRIS, 1970. *Eur. J. Biochem.* 16:492-498.
- GERHARDT, B., 1983. *Planta* 159: 238-246.
- GERHARDT, B., 1987. En "Peroxisomes in Biology and Medicine" H.D. Fahimi y H. Sies eds., pg. 141-151.

- GOLDFISHER, S., C.L. MOORE, A.B. JOHNSON, A.J. SPIRO, M.P. VALSAMIS, H.K. WISNIEWSKI, R.H. RITCH, W.T. NORTON, I. RAPIN y L.M. GARNTER, 1973. *Science* 182: 62-64.
- GOULD, S.J., G.A. KELLER, N. HOSKEN, J. WILKINSON y S. SUBRAMANI, 1989. *J. Cell Biol.* 108: 1657-1664.
- GOULD, S.J., G.A. KELLER, M. SCHNEIDER, S.H. JOUEL, L.J. GARRARD, J.M. GOODMAN, B. DISTEL, H. TABAC y S. SUBRAMANI, 1990. *EMBO J.* 9: 85-90.
- GOULD, S.J., G.A. KELLER y S. SUBRAMANI, 1988. *J. Cell Biol.* 108: 1657-1664.
- GROSS, D.S., C. SZENT-GYORGYI y W.T. GARRAD, 1985. *Yeast Cell Biology. UCLA Symp. Mol. Cell Biol. New Series*, vol.33, pp. 345-366.
- GUARENTE, L., 1987. *Ann. Rev. Genet.* 21: 425-452.
- GUARENTE, L., 1988. *Cell* 52: 303-305.
- HAN, M. y M. GRUNSTEIN, 1988. *Cell* 55:1137-1145.
- HANAHAN, D., 1983. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- HASHIMOTO, T., 1987. En "Peroxisomes in Biology and Medicin" H.D. Fahimi y H. Sies eds., pg. 97-104.
- HENIKOFF, S., 1984. *Gene* 28: 35-40.
- HEREFORD, L.M. y M. ROSBACH, 1977. *Cell* 10: 453-462.
- HIGGINS, D.G. y P.M. SHARP, 1989. *Comput. Appl. Biosci.* 5: 151-153.
- HIJIKATA, M., N. ISHII, H. KAGAMIYAMA, OSUMI, T. y T. HASHIMOTO, 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 8151-8158.
- HIJIKATA, M., J.K. WEN, T. OSUMI y T. HASHIMOTO, 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 4600-4606.
- HINNEBUSCH, A.G., 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6442-6446.
- HOPE, I.A. y K. STRUHL, 1986. *Cell* 43: 177-188.
- HORZ, W. y W. ALTENBURGER, 1981. *Nucleic Acids Res.* 9: 2645-2658.

- HOVIK, R. y H. OSMUNDSEN, 1987. *Biochem. J.* 247:531-535.
- IGO-KEMENES, T., HÖRZ, W. y ZACHAU, H.G., 1982. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 89-121.
- IGUAL, J.C., E. MATALLANA, C. GONZALEZ-BOSCH, L. FRANCO y J.E. PEREZ-ORTIN, 1991. *Yeast* en prensa.
- IMAMURA, S., S. UEDA, M. MIZUGAKI y A. KAWAGUCHI, 1990. *J. Biochem.* 107: 184-189.
- IMANAKA, T., G.M. SMALL y P.B. LAZAROW, 1987. *J. Cell Biol.* 105: 2915-2922.
- ITO, H., Y. FUKUDA, K. MURATA y A. KIMURA, 1983. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- JOHNSTON, M., 1987. *Microbiol. Rev.* 51:458-476.
- JUKES, T.H. y C. R. CANTOR, 1969. *Evolution of protein molecules*. Pp 21-132 en H.N. MUNRO, eds. *Mammalian protein metabolism III*. New York, Academic Press.
- KAWAMOTO, S., C. NOZAKI, A. TANAKA y S. FUKUI, 1978. *Eur. J. Biochem.* 83: 609-613.
- KAUFMAN, R.J. y P.A. SHARP, 1983. *J. Mol. Biol.* 159: 601-621.
- KEEGAN, L., G. GILL, y M. PTASHNE, 1986. *Science* 231: 699-704.
- KIMURA, M., 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press. Cambridge.
- KIONKA, C. y W.H. KUNAU, 1985. *J. Bacteriol.* 161: 153-157.
- KLEIN, P., M. KANEHISA y C. DeLISI, 1985. *Biochim. Biophys. Acta* 815: 468-476.
- KORNBERG, R.D., 1974. *Science* 184, 868-871.
- KORNBERG, R.D., 1977. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 931-954.
- KORNBERG, R.D. y L. STRYER, 1988. *Nucleic Acids Res.* 16: 6677-6690.

- KORNBLATT, J.A., y H. RUDNEY, 1971. *J. Biol. Chem.* 246: 4424-4430.
- KYTE, J.K. y R.F.D. DOOLITTLE, 1982. *J. Mol. Biol.* 157:105-132.
- KUNAU, W.H., S. BÜHNE, M. MORENO DE LA GARZA C. KIONKA, M. MATEBLOWSKI, U. SCHULTZ-BORCHARD y R. THIERINGER, 1988. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 418-420.
- KURIHARA, T., M. UEDA y A. TANAKA, 1989. *J. Biochem.* 106: 474-478.
- LANGFORD, C.J., F.J. KLINZ, C. DONATH y D. GALLWITCH, 1984. *Cell* 36: 645-653.
- LAZAROW, P.B., 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 1522-1528.
- LAZAROW, P.B. y C. de DUVE, 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2043-2046.
- LAZAROW, P.B. y Y. FUJIKI, 1985. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1: 489-530.
- LEE, M.S. y W.T. GARRARD, 1991. *EMBO J.* 10: 607-615.
- LOHR, D., 1984. *Nucleic Acids Res.* 12: 8457-8474.
- LOHR, D., J. CORDEN, K. TATCHELL, R.T. KOVACIC y V.E. VAN HOLDE, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 79-83.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH y J. SAMBROOCK, 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Lab. New York.
- MANNEY, T.R., 1968. *J. Bacteriol.* 96: 403-407.
- MARUNOUCHI, T., Y. MATSUMOTO, H. HOSOYA y K. OKABAYASHI, 1987. *Mol. Gen. Genet.* 206: 60-65.
- MASAMUNE, S., M.A.J. PALMER, R. GAMBANI, S. THOMPSON, J.T. DAVIS, S.F. WILLIAMS, O.P. PEOPLES, A.J. SINSKEY y C.T. WALSH, 1989. *J. Amer. Chem. Soc.* 111: 1879-1881.
- MATALLANA, E., L. FRANCO y J.E. PEREZ-ORTIN, 1991. enviado para su publicación.
- MATALLANA, E., 1989. Tesis Doctoral.

- MAXAM, A.M. y W. GOLBERT, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 560-564.
- McCAMMON, M.T., M. VEENHUIS, S.B. TRAPP y J.M. GOODMAN, 1990. *J. Bacteriol.* 172: 5816-5827.
- McGEE, J.D., J.M. NICKOL, G. FELSENFELD, y D.C. RAU, 1983. *Cell* 33, 831-841.
- McINTOSH, E.M., T. ATKINSON, R.K. STORMS y M. SMITH, 1991. *Mol. Cell Biol.* 11: 329-337.
- MENGERITSKY, G. y E.N. TRIFONOV, 1983. *Nucleic Acids Res.* 11: 3833-3851.
- MIDDLETON, B., 1973. *Biochem. J.* 132: 717-730.
- MIURA, S., M. MORI, M. TAKIGUCHI, M. TATIBANA, S. FURUTA, S. MIYAZAWA y T. HASHIMOTO, 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 6397-6402.
- MIYAZAWA, S., S. FURUTA, T. OSUMI, T. HASHIMOTO y N. UI, 1981. *J. Biochem.* 90: 511-519.
- NEDOSPASOV S. y G. GEORGIEV, 1980. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 532-539.
- NEHLIN, J.O. y H. RONNE, 1990. *EMBO J.* 9: 2891-2898.
- NEIGEBORN, L. y M. CARLSON, 1984. *Genetics* 108: 845-858.
- NELSON, D.A., W.R. BELTZ y R.L. RILL, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 11343-1347.
- NUNN, W.D., 1986. *Microbiol. Rev.* 50: 179-192.
- OLIVER, S.G. y J.R. WARMINGTON, 1989. Transcription in Rous, A.H. and Harrison, J.S. (Eds.) *The Yeasts*, vol.3, 2nd edn. Academic Press Inc., (London), pp. 117-160.
- OSUMI, T. y Y. FUJIKI, 1990. *BioEssays* 12: 217-222.
- OSUMI, T. y T. HASHIMOTO, 1979. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89: 580-584.

- OSUMI, T. y T. HASHIMOTO, 1984. *TIBS* 317-319.
- OSUMI, T., T. HASHIMOTO y N. UI, 1980. *J. Biochem.* 87: 1739-1750.
- OWEN, D. y L.C. KUHN, 1987. *EMBO J.* 6: 1287-1293.
- PARISH, R.W., 1975. *Arch. Microbiol.* 105: 187-192.
- PAULSON, J.R. y U.K. LAEMMLI, 1977. *Cell* 12: 817-828.
- PAWAR, S. y H. SCHULZ, 1981. *J. Biol. Chem.* 256: 3894-3899.
- PENDERSON, D.S. y R.H. MORSE, 1990. *EMBO J.* 9: 1873-1881.
- PEOPLES, O.P., S. MASAMUNE, C.T. WALSH y A.J. SINSKEY, 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 97-102.
- PEOPLES, O.P. y A.J. SINSKEY, 1989. *J. Biol. Chem.* 264: 15293-15297.
- PEREZ-ORTIN, J.E., F. ESTRUCH, E. MATALLANA y L. FRANCO, 1986. *Mol. Gen. Genet.* 205: 422-427.
- PEREZ-ORTIN, J.E., F. ESTRUCH, E. MATALLANA y L. FRANCO, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15: 6937-6954.
- PEREZ-ORTIN, J.E., E. MATALLANA y L. FRANCO, 1989. *Yeast* 5: 219-238.
- PFEIFER, K., B. ARCANGIOLI y L. GUARANTE, 1987. *Cell* 49: 9-18.
- PLIKAYTIS, B.D., G.M. CARBONE, P. EDMONDS y L.W. MAYER, 1986. *Anal. Biochem.* 152: 346-364.
- PRAMANIK, A., S. PAWAR, E. ANTONIAN y H. SCHULZ, 1979. *J. Bacteriol.* 137: 469-473.
- PONDER, B.A.J. y L.V. CRAWFORD, 1977. *Cell* 11: 35-49.
- RAO, M.J.K. y P. ARGOS, 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 869: 197-214.
- REDDY, J.K., S.K. GOEL, M.R. NEURALI, J.J. CANINOS, T.G. LOFFLER, M.K. REEDY, S.J. SPERBECK, T. OSUMI, T. HASHIMOTO, N.D. LALWANI y M.S. RAO, 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1747-1751.

- REDDY, J.K., J.R. WARREN, M.K. REDDY y N.D. LALWANI, 1982. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 386: 81-110.
- REEDY, M.K., N. USUDA, M.N. REEDY, E.R. KUCZMARSKI, M.S. RAO y J.K. REEDY, 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3214-3218.
- REEVES, R., 1984. *Biochim. Biophys. Acta* 782: 343-393.
- ROGGENKAMP, R., Z. JANOWICZ, B. STANIKOWSKI y C.P. HOLLENBERG, 1984. *Mol. Gen. Genet.* 194: 489-493.
- ROSENKRANTZ, M., T. ALAM, K.S. KIM, B.J. CLARK, P.A. SRERE y L.P. GUARENTE, 1986. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4509-4515.
- ROTHSTEIN, R.J., 1983. *Meth. Enzimol.* 101: 202-211.
- RUSSO, P., W. LI, D.M. HAMPSEY, K.S. ZARET y F. SHERMAN, 1991. *Embo J.* 10: 563-571.
- SANTOS, M.J., T. IMANAKA, H. SHIO, G.M. SMALL y P.B. LAZAROW, 1988a. *Science* 239: 1536-1538.
- SANTOS, M.J., T. IMANAKA, H. SHIO y P.B. LAZAROW, 1988. *J. Biol. Chem.* 263: 10502-10509.
- SANGER, F., S. NICKLEN y A.R. COULSON, 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SAROKIN, L. y M. CARLSON, 1984. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2750-2757.
- SCHUTGENS, R.B.H., H.S.A. HEYMANS, R.J.A. WANDERS, H. v.d. BOSCH y J.M. TAGER, 1986. *Eur. J. Pediatr.* 144: 430-440.
- SCHULTZ, J. y M. CARLSON, 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3637-3645.
- SCHULZ, H. y W.H. KUNAU, 1987. *TIBS* 12: 403-406.
- SEGHINI, M.A., C. RITZENTHALER y L. PINCK, 1989. *Nucleic Acids Res.* 17:
- SHEPHERD, J.C.W., 1984. *TIBS* 9: 8-10.
- SHERMAN, F., G.R. FINK y J.B. HICKS, 1979. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. New York.

- SHERMAN, F., G.R. FINK y J.B. HICKS, 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- SHIMIZU, S., K. YASUR, Y. TAUI y H. YAMADE, 1979. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 91: 108-117.
- SILVER, P.A. y M.N. HALL, 1988. En "Protein transfer and organelle biogenesis". R.C.Das y P.W. Robbins eds. Academic Press. Pp 749-769.
- SIMON, M., G. ADAM, W. RAPATZ, W. SPEVAK y H. RUIS, 1991. *Mol. Cell Biol.* 11: 699-704.
- SIMPSON, R.T., 1986. *BioEssays* 4: 172-176.
- SKONECZNY, M., A. CHELSTOWSKA y J. RYTKA, 1988. *Eur. J. Biochem.* 174: 297-302.
- SMALL, G.M., L.J. SZABO y P.B. LAZAROW, 1988. *EMBO J.* 7: 1167-1173.
- SOUTHERN, E.M., 1975. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- STORMO, G.D., 1987. En "Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis: a Practical Approach". M. J. Bishop y C. J. Rawlings eds. IRL Press. Pp 231-258.
- STRUHL, K., 1985. *Nature* 317: 822-824.
- STRUHL, K., 1987. *Cell* 49: 295-297.
- STRUHL, K., 1989. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 1051-1077.
- SZENT-GYORGYI, C. y I. ISENBERG, 1983. *Nucleic Acids Res.* 11: 3717-3736.
- SZENT-GYORGYI, C., D.B. FINKELSTEIN y W.T. GARRAD, 1987. *J. Mol. Biol.* 193: 71-80.
- TANAKA, T., K. HOSAKA, M. HOSHIMARU y S. NUMA, 1979. *Eur. J. Biochem.* 98: 165-172.
- TANAKA, A., M. OSUMI y S. FUKUI, 1982. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 183-199.
- THIERINGER, R., H. SHIO, Y. HAN, G. COHEN y P.B. LAZAROW, 1991. *Mol. Cell Biol.* 11: 510-522.

- THIREOS, G., M.D. PENN, H. GREER, 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5096-5100.
- THOMA, F. y M. ZATCHEJ, 1988. *Cell* 55: 945-953.
- THOMPSON, S., F. MAYER, O.P. PEOPLES, S. MASAMUNE, A.J. SINSKEY y C.T. WALSH, 1989. *Biochemistry* 28: 5735-5742.
- THOMPSON, S.L. y S.K. KRISANS, 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 5731-5735.
- TOLBERT, N.E., 1981. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157.
- TOMITA, K., T. SAITO y T. FUKUI, 1983. En "Biochemistry of metabolic processes". D.L.F. Lennon, F.W. Stratman y R.N. Zalten eds. Pp.353-366 Elsevier Scientific Publishing Co., New York.
- VAN HOUTEN, J.V. y C.S. NEWLON, 1990. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3917-3925.
- VEENHUIS, M., M. MATEBLOWSKI, W.H. KUNAU y W. HARDER, 1987. *Yeast* 3: 77-84.
- VEENHUIS, M. y W. HARDER, 1987. En "Peroxisomes in Biology and Medicine", H.D. Fajimi y H. Sies eds., pg. 436-458.
- VERDIER, J.M., 1990. *Yeast* 6:271-297.
- WANDERS, R.J., R.B.H. SCHUTGENS, H.S.A. HEYMANS, J. COLLINS, S. GOLDFISHER, T.HASHIMOTO, G. SCHRAKAMP, H. VAN DEN BOSCH, J.M. TAGER y A.W. SCHRAM, 1987. En "Peroxisomes in Biology and Medicine", H.D. Fajimi y H. Sies eds., pg. 341-352.
- WHEALS, A.E., 1987. En "The Yeasts" Vol.1 A.H. Rose y J.S Harrison eds. Academic Press. Pp 283-390.
- WILLIAMSON, D., 1985. *Yeast* 1: 1-14.
- WORCEL, A., G. GARGIULO, B. JESSEE, A. UDVARDY, C. LOUIS y P. SCHEDL, 1983. *Nucleic Acid Res.* 11: 421-439.
- WU, C., 1980. *Nature* 286: 854-860.
- WU, C., 1984. *Nature* 311: 81-84.

- YANG, S.Y., J. LI, G. HEALY-LOUIE, S.D. COSLOY y H. SCHULZ, 1988. *J. Bacteriol.* 170: 2543-2548.
- YANG, S.Y., X.Y.H. YANG, G. HEALY-LOUIE, H. SCHULZ y M. ELZINGA, 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 10424-10429.

YANG S.Y. J. LI G. HEALY-LOUIE S.D. COSLOY & H. SCHULZ 1988  
YANG S.Y. X.Y. H. YANG G. HEALY-LOUIE H. SCHULZ & M. ELZINGA 1990

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de  
D. Juan Carlos Igual Garcia  
la calificación de Apto CUM LAUDE

Valencia, a 9 de Julio de 1991

El Secretario,

El Presidente



*[Handwritten signature in blue ink]*

*[Handwritten signature in black ink]*