



Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado:

Estructura y Función de Proteínas

**Mig2, una proteína bifuncional de levadura implicada
en la regulación de la represión por glucosa
y en la fusión mitocondrial**

TESIS DOCTORAL

Alejandra Fernández-Cid Fernández-Canteli

OVIEDO, 2011

“The fool doth think he is wise, but the wise man knows himself to be a fool.”

William Shakespeare.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos.

Quisiera expresar mis agradecimientos a las siguientes personas:

En primer lugar a la Dra. Pilar Herrero Espílez y al Dr. Fernando Moreno Sanz, codirectores de este trabajo, por ofrecerme la oportunidad de seguir aprendiendo, por su dedicación y apoyo diarios y, sobre todo, por su paciencia ante mi ausencia continuada de optimismo.

A la Dra. Rosaura Rodicio Rodicio por estar siempre disponible a resolver cualquier duda, por su paciencia y su apoyo.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, por la concesión de la beca FPU que permitió el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Alberto, por su sabiduría, su paciencia y por enseñarme que ser meticuloso y, a veces, paranoico puede llegar a ser una virtud en esta profesión; Rafa, por su paciencia a lo largo de tantos años; Poly, por estar ahí cuando la necesitaba; Lucía, por todas las risas, meriendas y ciencia que compartimos, David, por esos chistes (horribles), por tener siempre una sonrisa y por ser feliz y compartirlo con nosotros; Montse, por ser un desastre y hacernos reír siempre.

A los compañeros del departamento, por estar siempre dispuestos a ayudar y a resolver dudas, por los cumplidos, las espichas y los buenos momentos. Mención especial merecen Ana, Isabel y Sonsoles, gracias por vuestra paciencia.

A mis padres, hermanos y familia, por estar ahí a lo largo de los años y saber que siempre hay alguien dispuesto a escuchar. Por su paciencia, su apoyo y por aguantar mis quebraderos de cabeza con los “cucus”.

A Lela, por ser la mejor abuela del mundo.

A Alberto, por ser mi mitad.

A Pepe e Isabel, por tener siempre una (o muchas) palabra(s) de ánimo y saber que siempre se puede contar con ellos.

A mis amigos: los que llevan ahí años y años, los de la facultad y los que conocí durante la realización de la tesis. Gracias por estar siempre ahí, por su apoyo incondicional, ayudarme siempre que lo necesité y por la paciencia infinita. Especialmente, David, Mar, Mos, Dani, Paula, Dabo (y demás Caborians), Lucía, Manu, Iky, Alvar, Nadaya, Silvia, Brezo, Raquel, Sara, Gloria y Cova, fueron los que me aguantaron durante estos últimos años.

ÍNDICE

ÍNDICE.

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	8
1.- Señalización por glucosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.1.- Detección de glucosa por <i>S. cerevisiae</i>	9
1.2.- Transducción de la señal glucosa a través de la vía Gpr1/AMPC.....	10
1.3.- Represión por glucosa mediada por Hxk2/Snf1/Mig1.....	11
1.4.- La represión por glucosa del gen <i>SUC2</i>	14
1.5.- Papel del complejo Hxk2/Snf1/Mig1 en la represión por glucosa del gen <i>SUC2</i>	15
2.- Transporte núcleo-citoplasmático.....	19
2.1.- Estructura y función del poro nuclear.....	19
2.2.- Superfamilia de las Carioferinas.....	21
2.3.- Regulación del transporte núcleo-citoplasmático por RanGTP.....	22
2.4.- Ruta de importación nuclear.....	24
2.5.- Exportación nuclear mediada por NES.....	26
2.6.- Regulación del transporte núcleo-citoplasmático.....	28
3.- Morfología y función mitocondrial.....	30
3.1.- Bases genéticas de la morfología y función mitocondrial.....	30
3.1.1.- Genes necesarios para la respiración.....	31
3.1.2.- Genes implicados en la distribución y morfología mitocondrial.....	31
3.2.- Fusión mitocondrial.....	33
3.2.1.- Componentes de la ruta de fusión mitocondrial.....	33
3.2.2.- Formación del complejo de fusión en levaduras.....	36
3.2.3.- Modelo del mecanismo de fusión mitocondrial.....	37
3.2.4.- Regulación de los procesos de fusión.....	39
3.3.- Fisión mitocondrial.....	40
3.3.1.- Componentes de la ruta de fisión mitocondrial.....	40
3.3.2.- Modelos para el mecanismo de fisión mitocondrial.....	42
3.4.- Tubulación mitocondrial en levaduras.....	44
3.4.1.- El complejo MMM.....	44
3.4.2.- Modelos para la función del complejo MMM (<u>Mmm1</u> , <u>Mdm10</u> , <u>Mdm12</u>).....	45
3.5.- Enfermedades, apoptosis y mitocondrias.....	46
3.5.1.- Desórdenes neurológicos: Neuropatía de tipo 2A (Charcot-Marie-Tooth, CMT2A).....	46
3.5.2.- Disfunción mitocondrial y enfermedades neurodegenerativas: Atrofia óptica (ADOA, <i>Autosomal Dominant Optic Atrophy</i>).....	46

3.5.3.- Dinámica mitocondrial y muerte celular programada.....	47
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	50
1.- Microorganismos utilizados.....	50
1.1.- Bacterias.....	50
1.2.- Levaduras.....	50
2.- Medios y condiciones de cultivo.....	53
2.1.- Bacterias.....	53
2.2.- Levaduras.....	53
3.- Vectores de clonación, construcciones de DNA y oligodesoxinucleótidos.....	54
3.2.- Vectores de clonación.....	54
3.3.- Construcciones de DNA.....	56
3.4.- Oligodesoxinucleótidos.....	61
4.- Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.....	65
4.1.- Manipulación de DNA plasmídico de bacterias.....	65
4.2.- Aislamiento de DNA genómico de levaduras.....	65
4.3.- Análisis de restricción del DNA.....	65
4.4.- Electroforesis en geles de agarosa.....	65
4.5.- Construcción de plásmidos.....	65
4.6.- Transformación de bacterias.....	66
4.7.- Transformación de levaduras.....	66
4.8.- Preparación de sondas radioactivas.....	66
4.9.- Análisis <i>Southern Blot</i> : hibridación DNA-DNA.....	66
4.10.- Fosforilación e hibridación de oligodesoxinucleótidos.....	67
4.11.- Amplificación de fragmentos de DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	67
4.12.- Mutagénesis dirigida por PCR.....	67
4.13.- Deleción de secuencias mediante PCR reversa.....	67
4.14.- PCR en tiempo real (RT-PCR).....	68
4.15.- Secuenciación.....	68
5.- Técnicas de Manipulación de proteínas.....	69
5.1.- Obtención de extractos proteicos libres de células.....	69
5.2.- Aislamiento de mitocondrias.....	69
5.3.- Cuantificación de proteínas.....	69
5.4.- Determinación de la actividad invertasa.....	69
5.5.- Determinación de la actividad β -galactosidasa.....	69
5.6.- Sistema del doble híbrido.....	70
5.7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (<i>SDS-PAGE</i>)	70
5.8.- Transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (<i>Polyvinylidene Fluoride</i>).....	70

5.9.- Ensayos de retardo en gel (EMSA)	71
5.10.- Expresión y purificación de proteínas unidas a GST en columnas de glutatión <i>sepharosa</i>	71
5.11.- Coprecipitación o <i>pull-down</i> como fusiones con GST.....	72
6.- Técnicas inmunológicas.....	72
6.1.- Inmunodetección de antígenos: <i>Western Blot</i>	72
6.2.- Co-Inmunoprecipitación.....	73
6.3.- Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	73
6.4.- Inmunopurificación.....	74
7.- Microscopía de fluorescencia.....	75
7.1.- Preparación de muestras.....	75
7.2.- Observación de las muestras y grabación de imágenes.....	75
RESULTADOS	76
1.- Caracterización de la proteína Mig2 de <i>S. cerevisiae</i>	76
1.1.- Análisis comparativo entre las proteínas Mig1 y Mig2 de <i>S. cerevisiae</i> ...	76
1.2.- Estudio de la estructura tridimensional de los motivos de dedos de zinc de la proteína Mig2 de <i>S. cerevisiae</i>	78
1.3.- Los niveles de expresión del gen <i>MIG2</i> no muestran diferencias significativas cuando la levadura crece en glucosa o en glicerol.....	81
1.4.- Los componentes del complejo represor del gen <i>SUC2</i> : Mig1, Hxk2 y Snf1 están implicadas en la regulación de la expresión del gen <i>MIG2</i> en presencia de glucosa.....	82
1.5.- Estudio del promotor del gen <i>MIG2</i> mediante su fusión a la secuencia codificante del gen <i>LacZ</i>	83
1.6.- Mig1 reprime la expresión del gen <i>MIG2</i> , tanto en alta como en baja glucosa, a través de su unión a dos sitios de la ORF de Mig2.....	88
1.7.- Las proteínas del heterotrímero Snf1 y Hxk2 forman parte del complejo represor del gen <i>MIG2</i>	90
1.8.- La localización subcelular de Mig2 está regulada por estrés nutricional.....	91
1.9.- Mig2 se encuentra asociada a la red mitocondrial en condiciones de baja glucosa.....	94
1.10.- La ausencia de las proteínas Mig1 y Hxk2 dificulta la acumulación de Mig2 en el núcleo en alta glucosa, por el contrario, la ausencia de Snf1 parece no tener efecto sobre la localización de Mig2.....	96
1.11.- La localización subcelular de Mig2 está regulada por estrés oxidativo pero no por estrés osmótico.....	99
2.- Papel de Mig2 como represor transcripcional.....	101
2.1.- Análisis global de la expresión de un mutante $\Delta mig2$ en su adaptación a condiciones de estrés nutricional y oxidativo.....	101
2.2.- Papel de Mig2 en la represión por glucosa del gen <i>SUC2</i>	103

2.2.1.- La expresión del gen <i>SUC2</i> está regulada por Mig2 tanto en alta como en baja glucosa.....	104
2.2.2.- La proteína Mig2 es capaz de unirse <i>in vitro</i> al promotor del gen <i>SUC2</i> a través de los sitios SUC2A y SUC2B de Mig1.....	106
2.2.3.- Mig2 se une al promotor del gen <i>SUC2</i> <i>in vivo</i> independientemente de la fuente de carbono presente en el medio.....	107
2.2.4.- La ausencia de Mig1, Hxk2 o Snf1 no condiciona la capacidad de unión por parte de la proteína Mig2 al promotor del gen <i>SUC2</i>	108
2.2.5.- El represor transcripcional Mig1 interacciona con Mig2 en alta y baja glucosa.....	110
2.2.6.- Mig2 interacciona con las proteínas Hxk2 y Snf1, tanto en alta como en baja glucosa.....	113
3.- Estudio de los mecanismos de importación y exportación nuclear de la proteína Mig2.....	116
3.1.- Estudio de los mecanismos de importación nuclear de la proteína Mig2.....	116
3.1.1.- La Carioferina Msn5 no está implicada en el transporte núcleo-citoplasmático de Mig2.....	116
3.1.2.- La importación nuclear de Mig2 en <i>S. cerevisiae</i> está mediada por Kap95.....	118
3.1.3.- Las proteínas Kap60 y Kap95 interaccionan con Mig2 tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>	122
3.1.4.- Caracterización de las secuencias de localización nuclear (NLSs) de Mig2.....	125
3.1.5.- La NLS1 de Mig2 es importante para la interacción <i>in vitro</i> con Kap95, pero no con Kap60.....	130
3.1.6.- La interacción de Mig2 con Kap95 está regulada por la proteína Mig1.....	132
3.1.7.- El represor transcripcional Mig1 interacciona <i>in vitro</i> con las importinas Kap60 y Kap95 de <i>S. cerevisiae</i>	133
3.2.- Estudio de los mecanismos de exportación nuclear de la proteína Mig2.....	134
3.2.1.- El represor transcripcional Mig2 interacciona con la exportina Xpo1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	134
3.2.2.- Caracterización de las secuencias NES de Mig2.....	136
3.2.3.- Xpo1 no parece ser la vía principal de exportación de Mig.....	139
4.- Estudio del papel de Mig2 en las mitocondrias.....	141
4.1.- Estudio del crecimiento de un mutante $\Delta mig2$ en diferentes condiciones metabólicas.....	141
4.2.- Mig2 interacciona con Ups1 de manera dependiente de glucosa.....	142
4.3.- La asociación de Mig2 a la red mitocondrial, en condiciones de estrés nutricional, depende de Ups1.....	144
4.4.- El represor Mig2 no está implicado en la regulación de los niveles intracelulares de Ups1.....	146

4.5.- Mig2 está implicado en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, posiblemente mediante su participación en la ruta de fusión.....	147
4.6.- La ausencia de la proteína Mig2 no conlleva problemas de segregación del mtDNA.....	152
4.7.- La ausencia de Mig2 es capaz de revertir parcialmente los problemas de crecimiento de un mutante $\Delta ups1$	154
DISCUSIÓN	156
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXOS	183
PUBLICACIONES	197

RESUMEN

RESUMEN.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la represión por glucosa afecta a genes que codifican enzimas relacionados con la respiración o con el uso de fuentes de carbono alternativas, mientras que la inducción por glucosa estimula la transcripción de enzimas glicolíticas y genes que codifican para sus transportadores, posibilitando su utilización.

La proteína Mig1 es un factor transcripcional fundamental en la represión de aquellos genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas, que codifican para enzimas gluconeogénicos e implicados en la respiración. El gen *SUC2* se ha utilizado de forma tradicional como modelo en la represión por glucosa, ya que se regula de forma exclusiva a través de esta vía. Mig1 reprime la expresión de *SUC2* en alta glucosa, condición en la que el microorganismo no precisa el enzima invertasa. Cuando la concentración del monosacárido disminuye, *SUC2* se desreprime y los niveles de invertasa se elevan.

Aunque Mig1 es un represor crucial para la regulación de *SUC2*, no realiza su papel en solitario, sino formando parte de un complejo represor integrado por varias proteínas. En concreto, se ha demostrado la participación del enzima Hxk2, el complejo Snf1 y el represor Mig2, entre otros factores.

La proteína Mig2 en *S. cerevisiae* ha sido descrita como un factor transcripcional implicado en la regulación por glucosa de genes relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas. Entre los promotores a los cuales se une esta proteína se encuentran los de *GALI* y *SUC2*. En el caso de *SUC2*, se ha descrito que tanto Mig1 como Mig2 son necesarios para llevar a cabo la represión de su expresión en condiciones de alta glucosa. El papel de la proteína Mig2 en el complejo represor del gen *SUC2*, por el momento, es poco conocido, barajándose la posibilidad de que actúe como un elemento redundante de Mig1 o complementando su función.

En la presente tesis hemos analizado el papel de Mig2 en la represión por glucosa del gen *SUC2*, demostrando su participación tanto en alta como en baja glucosa, así como los factores que regulan la misma. Así mismo, hemos observado que la expresión de *MIG2* se encuentra regulada, en presencia de glucosa, por un complejo represor formado por Mig1, el complejo Snf1 y el enzima Hxk2.

Además, en este trabajo demostramos que Mig2 presenta una doble localización núcleo-citosólica dependiente de glucosa de tal manera que, en presencia de dicho monosacárido, Mig2 se acumula de forma mayoritaria en el núcleo, donde lleva a cabo su función como represor. En ausencia de glucosa, esta localización cambia de forma muy rápida, pasando a asociarse a la red mitocondrial.

Así mismo, hemos analizado los mecanismos de importación y exportación de la proteína Mig2, demostrando que la ruta principal de importación está mediada por el dímero Kap60/Kap95. Además, hemos identificado dos secuencias NLSs implicadas en dicho transporte, siendo la NLS1 de Mig2 indispensable para su interacción con la importina Kap95. En cuanto al sistema de exportación, se han identificado tres posibles NESs pero la mutación individual de estas secuencias no impide la salida de Mig2 del núcleo. Aunque se ha demostrado la interacción de esta proteína con Xpo1, ésta no parece ser la ruta principal de exportación de Mig2 al citoplasma.

La asociación de Mig2 a la red mitocondrial es dependiente de Ups1, proteína mitocondrial con la que interacciona de manera preferente en ausencia de glucosa. En cuanto a su papel mitocondrial, Mig2 parece estar implicado en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, posiblemente, a través de la ruta de fusión. La ausencia de esta proteína no conlleva problemas en la segregación del mtDNA.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

α : Aminoácidos.

A: Adenina.

Á: Armstrong.

ADOA: (*Autosomal Dominant Optic Atrophy*) Atrofia óptica autosómica dominante.

ADP: Adenosina difosfato.

AIF: (*Apoptosis-inducing factor*) Factor inductor de la apoptosis.

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico.

Amp^r: Resistencia a ampicilina.

Arm: Repeticiones Armadillo.

ATP: Adenosina trifosfato.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

C: Citosina.

°C: Grado centígrado.

ChIP: Inmunoprecipitación de Cromatina.

CMT2A: Charcot-Marie-Tooth Neuropatía de Tipo 2A.

cNLS: (*classical Nuclear Localization Sequence*) Secuencia de localización nuclear clásica.

C-terminal: Carboxilo terminal.

C_T: Ciclo umbral.

d: Directo.

Da: Dalton.

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

dCTP: Desoxicitidina trifosfato.

dHSP: (*Drosophila heat-shock factor*) Elemento de respuesta a estrés térmico de *Drosophila*.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato.

D.O.: Densidad óptica.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EIM: Espacio intermembrana.

EMSA: (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*) Ensayo de retardo de la movilidad electroforética.

GFP: (*Green Fluorescent Protein*) Proteína verde fluorescente.

GST: Glutathion S-Transferasa.

G: Guanina.

Glucosa-6P: Glucosa 6 fosfato.

GDP: Guanosín difosfato.

GTP: Guanosín trifosfato.

HA: Hemaglutinina.

HEAT: (*Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), and the yeast PI3-kinase TOR1*) Huntingtina, factor de Elongación 3, subunidad PR65/A de la proteína fosfatasa 2A y PI3-quinasa TOR.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina etanesulfónico.

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosido.

Kap: Carioferinas.

LB: Medio de cultivo *Lysogeny broth*.

M: Molar.

ME: Membrana externa.

MI: Membrana interna.

MOPS: Ácido 3-(N-Formilo)-propanosulfónico.

mRNA: RNA mensajero.

mtDNA: DNA mitocondrial.

N: Normal.

NADP⁺: Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina.

NADPH: Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido.

NBD: (*Nucleotide-Binding Domain*) Dominio de unión a nucleótidos.

MDM: Mantenimiento de la distribución y morfología mitocondrial.

MCP: (*Mitochondrial Carrier Protein*) Proteína transportadora mitocondrial.

MPP: (*Mitochondrial Processing Peptidase*) Peptidasa procesadora mitocondrial.

NES: (*Nuclear Export Signal*) Señal de exportación nuclear.

NLS: (*Nuclear Localization Sequence*) Secuencia de localización nuclear.

NPC: (*Nuclear Pore Complex*) Complejo del poro nuclear.

N-terminal: Amino terminal.

NTE: Extensión N-Terminal.

Nups: Nucleoporinas.

OL: Oligodesoxinucleótido.

ONPG: Orto-nitrofenilgalactopiranosido.

ORF: (*Open Reading Frame*) Pauta abierta de lectura.

Ori: Origen.

P: Fosfato.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCD: (*Putative Carrier Domain*) Dominio transportador putativo.

PCR: (*Polymerase chain reaction*) Reacción en cadena de la polimerasa.

PKA: Proteín-quinasa A.

PKI: (*Protein kinase inhibitor peptide*) Péptido inhibidor de la proteín-quinasa.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Poli dI-dC: *Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt*.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

r: Reverso.

Ran: (*RAs-related Nuclear protein*) Proteína nuclear relacionada con Ras.

RanGEF: (*Ran Guanine-nucleotide-Exchange Factor*) Elemento intercambiador del nucleótido guanina de la proteína Ran.

RanGAP: (*Ran GTPase Activating Protein*) Proteína GTPasa activadora de Ran.

RFP: (*Red Fluorescent Protein*) Proteína roja fluorescente.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAi: RNA de interferencia.

RT-PCR: (*Real-time PCR*) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

rpm: Revoluciones por minuto.

S: Serina.

SC: (*Sintetic Culture*) Medio sintético.

SCD: (*Sintetic Culture Dextrose*) Medio sintético con glucosa.

SCE: (*Sintetic Culture Ethanol*) Medio sintético con etanol.

SCF: *Skp1-Cdc53-F-box*.

SCY: (*Sintetic Culture Glycerol*) Medio sintético con glicerol.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*) Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

siRNA: (*small interfering RNA*) RNA pequeño de interferencia.

snRNP: (*small nuclear RiboNucleoProteins*) Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas.

STRE: (*Stress Response Elements*) Elementos de respuesta a estrés.

T: Timina.

TBE: Tampón Tris Borato EDTA.

t-BOOH: (*Tertiary-butyl hydroperoxide*) Tert-butilo.

TBS : Tampón Tris salino.

TE: Tampón Tris EDTA.

TPR: *TetratricoPeptide Repeat*.

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

tRNA: RNA de transferencia.

TW: Tumor de Wilms.

U: Unidades enzimáticas.

UAS: (*Upstream Activating Sequences*) Secuencias activadoras aguas arriba.

YEP: (*Yeast Extract Peptone*) Medio complejo con extracto de levadura y peptona.

YEPD: (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) Extracto de levadura, peptona y glucosa.

YEPE: (*Yeast Extract Peptone Ethanol*) Extracto de levadura, peptona y etanol.

YEPY: (*Yeast Extract Peptone Glycerol*) Extracto de levadura, peptona y glicerol.

YNB: (*Yeast Nitrogen Base*) Medio mínimo para levaduras.

X-gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosido.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.

En la levadura *S. cerevisiae* la proteína Mig2 ha sido descrita como un represor transcripcional implicado, junto con Mig1, en la regulación por glucosa de ciertos genes como *GAL1*, *HXK1* o *SUC2*. Si bien Mig2 está relacionado con la represión por glucosa, sólo se le ha asignado un papel redundante al ejercido por Mig1. Por el momento, no se han identificado genes regulados exclusivamente por Mig2 ni se han llevado a cabo estudios detallados acerca de su participación en la represión por glucosa. Dada la importancia de estos mecanismos en la adaptación al entorno y supervivencia del microorganismo, decidimos profundizar en el estudio de la función de esta proteína.

El papel de Mig2, al igual que el de muchos otros factores transcripcionales, se encuentra regulado a través de la doble localización núcleo-citosólica de la proteína. La entrada y salida al núcleo tiene lugar a través de unas estructuras denominadas complejos del poro nuclear y se lleva a cabo mediante un complicado sistema de importación y exportación mediado por Carioferinas. Puesto que la función de Mig2 depende de su localización, también nos propusimos abordar el estudio de los mecanismos de entrada y salida al núcleo de la misma.

Finalmente, estudios de localización realizados en nuestro laboratorio plantearon la posibilidad de que, en determinadas condiciones, Mig2 se encontrara asociada a la red mitocondrial. Esta inesperada localización nos llevó a plantear la realización de una serie de experimentos encaminados a intentar conocer su papel en estos orgánulos así como el mecanismo de asociación a los mismos.

1. Señalización por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación génica es una adaptación crítica de los seres vivos que permite su supervivencia en ambientes fluctuantes. Este proceso adaptativo es común a todas las especies, desde las bacterias hasta los vertebrados más complejos. Con respecto a la intermitencia en la presencia de alimento, la mayoría de los organismos han desarrollado un sistema jerárquico en el uso de diferentes fuentes de carbono. Esta jerarquía parece estar relacionada con el coste energético que supone la síntesis de la maquinaria metabólica implicada en el uso de cada fuente de carbono.

La efectividad de la levadura para crecer en diferentes medios se debe a su capacidad para percibir y responder a los cambios en la disponibilidad de nutrientes en el entorno. Muchas de estas respuestas implican una modificación en el patrón de expresión génica. El monosacárido más abundante en la naturaleza, la glucosa, resulta ser un nutriente de uso preferente para la mayoría de los organismos, entre ellos

S. cerevisiae, y, por ello, existen complejos mecanismos de regulación génica para adaptarse a las fluctuaciones en la presencia de esta hexosa.

En los primeros veinte minutos tras la adición de glucosa, un 20% de los 6200 genes de *Saccharomyces* muestran una variación en su expresión aumentando o disminuyendo la misma unas tres veces. Otro 40% de los genes la modifica alrededor de dos veces (¹). Esta modificación en la expresión se realiza a dos niveles, bien a nivel enzimático, aumentando la degradación proteica o disminuyendo la tasa de transcripción, bien a nivel del mRNA, modificando la tasa de transcripción o la estabilidad del mismo (²⁻⁴).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la represión por glucosa afecta a genes que codifican enzimas relacionados con la respiración o con el uso de fuentes de carbono alternativas, mientras que la inducción por glucosa estimula la transcripción de enzimas glicolíticos y genes que codifican para transportadores, posibilitando de este modo, su propia utilización.

1.1. Detección de glucosa por *S. cerevisiae*.

Para que esta respuesta inductora o represora tenga lugar la levadura debe detectar la presencia o ausencia de glucosa en el medio externo. Para ello, cuenta con proteínas de membrana que actúan como receptores de glucosa. La glucosa se une a estos receptores generando una cascada de señalización intracelular.

En *S. cerevisiae*, la señal glucosa se genera gracias a las proteínas Snf3 y Rgt2. Ambas pertenecen a la familia de transportadores de hexosas Hxt, aunque ellas mismas son incapaces de llevar a cabo la función de transporte. Esta familia está formada por más de 20 miembros que difieren en su afinidad por las hexosas a transportar, por ejemplo, Hxt1 es un transportador de baja afinidad, mientras que Hxt2 y Hxt4 son de alta afinidad. La mayor parte de las proteínas Hxt son muy similares entre sí y presentan una identidad de secuencia aminoacídica comprendida entre el 50% y prácticamente el 100%. Snf3 y Rgt2 son los miembros de la familia más divergentes, mostrando sólo un 25% de identidad con los 18 miembros restantes (⁵).

Ambas proteínas presentan largas colas citoplasmáticas requeridas para la transducción de señales. La región común del extremo C-terminal de estos sensores está formada por un motivo de 26 aminoácidos que parece ser realmente importante para desempeñar esta función. En el caso de Snf3 este motivo está presente dos veces, mientras que en Rgt2 sólo una (⁶). El sensor de glucosa Snf3 es de alta afinidad y se expresa cuando la glucosa presente en el medio es escasa, siendo necesario para la inducción de la expresión del gen *HXT2* en estas condiciones. Por el contrario, Rgt2 es un sensor de baja afinidad necesario para la completa inducción por glucosa de la expresión de *HXT1* (⁵). La unión de la glucosa a estas proteínas transmembrana inicia una señal que activa la vía y permite la expresión de los genes *HXT* por represión de la función de la proteína reguladora Rgt1. De este modo la glucosa actúa como una

hormona de crecimiento (^{7,8}). Rgt1 tiene un peso molecular de 128 kDa y pertenece al grupo de proteínas con dedos de zinc Cys₆His₂.

En ausencia de glucosa, Rgt1 se une a los promotores de los genes *HXT* y reprime su expresión; la glucosa, sin embargo, inactiva la función de Rgt1, permitiendo la desrepresión de los genes *HXT*. La inhibición de Rgt1 por glucosa requiere de la proteína Grr1, que a su vez forma parte de un complejo mayor (^{6,9}).

Además de la señal procedente de la cascada de señalización, la actividad represora de Rgt1 se encuentra también modulada por fosforilación. Se ha observado que la expresión del gen *HXT1* está modulada a través de los niveles de fosforilación de la proteína Rgt1. Cuando Rgt1 se encuentra hiperfosforilado pasa a actuar como activador (⁸).

Rgt1 está implicado en la regulación de otros genes, además de aquellos que codifican para transportadores de hexosas. Por ejemplo, se ha demostrado que el promotor del gen *HXX2* presenta un dominio de unión para Rgt1 (¹⁰). Así mismo, se ha visto que la actividad represora de Rgt1 sobre *HXX2* se encuentra modulada por fosforilación mediante las quinasas Tpk3 y Snf1. Snf1 actuaría, directa o indirectamente, sobre Rgt1, activando su función como represor en niveles bajos de glucosa. Tpk3, por su parte, en condiciones de alta glucosa, hiperfosforila a Rgt1 de tal manera que provoca su liberación del DNA y, por tanto, permite la expresión de *HXX2* (¹¹).

1.2. Transducción de la señal glucosa a través de la vía Gpr1/AMPC.

En *S. cerevisiae*, la señalización por cAMP tiene un papel clave en el control del metabolismo, de los mecanismos de resistencia a estrés y en el control de la proliferación celular. Se trata de una vía que permite una respuesta rápida, aunque transitoria, en la que los niveles de cAMP se ven incrementados entre 5 y 50 veces al minuto tras la adición de glucosa al medio, volviendo a sus niveles basales 20 minutos después (¹²).

En respuesta a la presencia de glucosa, se produce una activación de la adenilato ciclasa provocando un aumento en la cantidad de cAMP intracelular. En este caso, el receptor de glucosa es la proteína Gpr1 que se encuentra acoplada a proteínas G. La interacción entre Grr1 y Gpa2 (la subunidad α de una proteína G) es necesaria para el aumento de cAMP dependiente de glucosa (¹³). El cAMP produce la activación de la proteína-quinasa dependiente de cAMP (PKA) al bloquear el efecto inhibitorio de Bcy1. Con la activación de la PKA aumenta la actividad del factor transcripcional Rap1, induciendo la expresión de genes que codifican para proteínas ribosomales y para proteínas necesarias para la glicolisis, como Msn2 y Msn4, que regulan a la baja la expresión de genes controlados por STRE (¹⁴).

1.3. Represión por glucosa mediada por Hxk2/Snf1/Mig1.

Una vez en el interior celular, la glucosa activa la vía implicada en la represión por glucosa que tiene como efector al complejo represor Hxk2/Snf1/Mig1.

El primer componente de esta vía es la proteína Hxk2. En *S. cerevisiae* existen tres enzimas capaces de fosforilar la glucosa en el C₆: Hxk1, Hxk2 y Glk1, si bien tan sólo el gen *HXK2* está altamente expresado cuando la glucosa es la fuente predominante en el medio, mientras que la expresión de *HXK1* y *GLK1* es importante cuando el medio de cultivo contiene fuentes de carbono no fermentables o galactosa (¹⁵).

La particularidad de la proteína Hxk2 reside en que su función va más allá del mero papel catalítico. Diferentes mutaciones nulas en el gen *HXK2* muestran defectos en la represión por glucosa de ciertos genes como *HXT1*, cuya inducción se encuentra afectada en mutantes $\Delta h x k 2$ (¹⁶). Mientras, genes normalmente reprimidos en presencia del monosacárido, como *SUC2*, se expresan de forma prácticamente constitutiva en dicho mutante (²).

Son varias las características de Hxk2 que pueden estar implicadas en la represión por glucosa. En primer lugar, se sugirió su actividad fosforiladora como cualidad indispensable (¹⁷) pero, posteriormente, se propuso que su doble localización núcleo-citosólica (¹⁸), así como la diferente afinidad que sus dos isoformas (monomérica y dimérica) presentan por la glucosa (¹⁹), también eran fundamentales para el proceso.

Existe una gran controversia en cuanto a la independencia entre la función catalítica y reguladora de Hxk2. Mientras unos autores creen que ambas funciones son dependientes (²⁰), estudios recientes sugieren que las funciones reguladora y enzimática de esta proteína podrían ser independientes (²¹).

Como ya se mencionó, la proteína Hxk2 presenta dos isoformas, monomérica y dimérica (²²). El residuo Ser₁₄ parece ser clave en el papel regulador de Hxk2. En ausencia de glucosa, Hxk2 es fosforilada en este residuo desplazando el equilibrio entre sus dos isoformas hacia la monomérica (²³) mientras que en presencia del monosacárido, Reg1 dirige a la proteína-fosfatasa Glc7 para desfosforilar la Ser₁₄ de la Hxk2 (²⁴), lo que desplaza el equilibrio hacia la forma homo-dimérica (^{22,18,25}).

Trabajos recientes muestran que la fosforilación de este residuo por Snf1 o una quinasa dependiente de la misma, es indispensable para la interacción de Hxk2 con Xpo1. Por tanto, el estado de fosforilación de la Ser₁₄ sería responsable de controlar el transporte de Hxk2 y, por consiguiente, su función reguladora (²⁶). Así mismo, dado que la Ser₁₄ se encuentra localizada dentro de una posible secuencia NLS, se planteó la posibilidad de que este residuo fuera indispensable para su reconocimiento por parte del sistema de importación. Sin embargo, la expresión de una versión mutante del enzima

con la mutación S14A no impide su localización nuclear ni altera la represión por glucosa del gen *SUC2* (^{27,28}).

En cuanto a la función llevada a cabo por otros dominios de la proteína, se ha demostrado que la secuencia localizada entre los residuos Lys₆-Met₁₅ está directamente implicada en la interacción de Hxk2 con la proteína Mig1 (²⁹) y que su eliminación suprime tanto la localización nuclear de Hxk2 como la represión por glucosa del gen *SUC2* (²⁷). Además, se ha visto que la localización de Mig1 es dependiente de Hxk2, ya que la ausencia de represión por glucosa en mutantes $\Delta h x k 2$ se debe a la localización citoplasmática de Mig1 (^{29,30,31}).

El segundo componente del complejo represor es la proteína Snf1. Snf1 es una serín-treonín-quinasa que permite la activación de la transcripción mediante la inhibición de represores transcripcionales como Mig1 o por estimulación de activadores como Cat8 y Sip4.

Se ha observado que existe una interacción directa entre Snf1 y Hxk2, tanto en alta como en baja glucosa (²⁹), posiblemente a través de su subunidad catalítica α , ya que la interacción de Hxk2 con ella es mucho más intensa que con las subunidades β y γ (Tesis doctoral de A. Riera. Oviedo, 2007).

El complejo Snf1 está compuesto por tres subunidades una subunidad α catalítica (Snf1); una subunidad γ reguladora (Snf4) y una subunidad β localizadora dependiente del compartimento celular (Gal83, Sip1 o Sip2). Este complejo presenta diferentes papeles dentro de la célula, como son la regulación de la transcripción de un gran número de genes actuando sobre sus activadores o represores (²) o el control de la actividad de ciertos enzimas implicados en el metabolismo del glucógeno y de los ácidos grasos (^{32,33}).

La subunidad reguladora Snf4, en condiciones de baja glucosa, se une a la zona reguladora de la subunidad catalítica del complejo, estabilizándola en una conformación abierta y activa, de forma que pueda llevar a cabo sus funciones fisiológicas (³⁴). La activación de Snf1 depende también de otras proteínas como Sak1, Tos3 y Elm1, capaces de asociarse al complejo Snf1 y fosforilar la subunidad α (³⁵). Todos estos mecanismos actúan de forma simultánea en baja glucosa.

Las subunidades β pueden ser de tres tipos: Sip1, Sip2 y Gal83. Las tres son capaces de interaccionar tanto con Snf1 como con Snf4 para constituir el complejo funcional (³⁶) siendo las encargadas de conducir al heterotrímero a un compartimento celular determinado donde, posteriormente, realizará una serie de funciones fisiológicas concretas. Por tanto, son las encargadas de conferir especificidad de sustrato al complejo. En presencia de glucosa, las 3 subunidades se localizan en el citoplasma, sin embargo, en presencia de fuentes de carbono no fermentables, Sip1 se localiza preferentemente en la vacuola, Sip2 en el citoplasma y Gal83 en el núcleo (³⁷).

El dímero Reg1/Glc7, mediante su actividad fosfatasa, es capaz de regular negativamente la actividad de Snf1 en presencia de glucosa. Reg1 es el elemento regulador que conduce a la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa (Glc7) hasta sus sustratos específicos que, en muchos casos, son parte de la vía de represión por glucosa (³⁸).

Finalmente, el último elemento del complejo represor es la proteína Mig1, factor fundamental en la represión por glucosa de numerosos genes. Mig1 fue identificada en la búsqueda de genes capaces de reprimir al promotor del gen *GAL1*, de ahí su nombre, *Multicopy Inhibitor of GAL gene expression*.

Mig1 es un factor transcripcional con dedos de zinc del tipo Cys₂-His₂. Es capaz de unirse a secuencias consenso ricas en CG del tipo 5'(G/C)(C/T)GGGG^{3'}, flanqueadas en el extremo 5' por una región rica en AT (³⁹), que se localizan en muchos promotores de genes reprimibles por glucosa (^{40,41}). Se ha demostrado el papel fisiológico de Mig1 para los genes *GAL1* y *GAL4*, del metabolismo de la galactosa (⁴²); *SUC2*, que codifica para la proteína invertasa (⁴³); *MAL*, para la utilización de maltosa (⁴⁴); genes respiratorios (³⁹) y genes que codifican para otros enzimas gluconeogénicos (⁴⁵).

La represión llevada a cabo por Mig1 se encuentra regulada a través de la fosforilación de la proteína, siendo Snf1 la quinasa responsable de la misma (residuos Ser₂₂₂, Ser₂₇₈, Ser₃₁₀ y Ser₃₁₁) (⁴⁶). En presencia de glucosa Mig1 está desfosforilada, localizándose mayoritariamente en el núcleo celular, donde lleva a cabo su función como represor transcripcional (^{31,47}). Sin embargo, en baja glucosa, la activación del complejo Snf1 provoca la fosforilación de Mig1, lo que a su vez conlleva su salida del núcleo (³¹) y permite la expresión de aquellos genes que se encontraban reprimidos en presencia de glucosa. Es posible que Snf1 fosforile a Mig1 en algún residuo clave localizado en su NES, lo que provocaría su reconocimiento por parte de la exportina Msn5 y su salida al citosol (⁴⁸).

De todos los residuos de Mig1 fosforilados por Snf1, la Ser₃₁₁ parece ser clave, ya que su fosforilación provoca la liberación del complejo represor y la salida de Mig1 al citoplasma. La mutación de dicho residuo a Ala hace que la localización de Mig1 sea nuclear, con la consiguiente represión de los genes que regula, independientemente de la fuente de carbono presente en el medio (³⁰).

Como se ha señalado anteriormente, el estado de fosforilación de Mig1 es clave en la regulación génica por glucosa. Mientras que la fosforilación es llevada a cabo por la proteína-quinasa Snf1, la desfosforilación del represor está regulada por la proteína-fosfatasa Reg1/Glc7, bien directamente (²⁴), bien de manera indirecta. En esta segunda vía, la presencia de glucosa activa al complejo Reg1/Glc7 provocando la desfosforilación de Snf1 y, como consecuencia de la misma, su inactivación; en estas condiciones, Snf1 no es capaz de fosforilar a Mig1 (²⁴).

Mig1 requiere al complejo correpresor Cyc8/Tup1 para poder llevar a cabo su función como represor transcripcional. Cyc8/Tup1 presenta una gran versatilidad respecto a la naturaleza y número de sus activadores, además de una elevada eficiencia represora, controlando la expresión de aproximadamente un 3% de los genes de *S. cerevisiae*. Tanto Cyc8 como Tup1 pertenecen a una familia de proteínas muy conservadas evolutivamente, no solo en secuencia sino también en función⁽⁴⁹⁾. Si bien la delección de uno o ambos genes no es letal, ésta implica un enlentecimiento del crecimiento además de otros fenotipos como floculación, pobre esporulación, capacidad de asimilar timidina del medio y pérdida parcial de la represión por glucosa. Todos estos efectos están provocados por la expresión inapropiada de los genes regulados por el complejo Cyc8-Tup1⁽⁵⁰⁾.

1.4. La represión por glucosa del gen *SUC2*.

Como hemos visto, un gran número de genes de diferentes vías son reprimidos por glucosa a nivel transcripcional. En concreto, el gen *SUC2* se regula, casi exclusivamente, por un proceso de represión en presencia de glucosa y ha servido, de forma tradicional, como modelo de estudio de los mecanismos de represión por esta hexosa.

SUC2 codifica, a través de dos mRNAs, para las dos formas del enzima invertasa, la exocelular y la intracelular. El enzima exocelular es la forma fisiológicamente importante, tiene una localización periplásmica e hidroliza la sacarosa presente en el medio para generar fructosa y glucosa.

Se han descrito varias secuencias reguladoras (UASs) necesarias para la correcta expresión de *SUC2* en la región comprendida entre -418 y -650 pb de su promotor. En ellas se localiza un elemento repetido cinco veces que responde a la secuencia (AAGAAAT). Un fragmento de 32 pb conteniendo múltiples copias en tándem de este motivo es suficiente para conferir a un promotor heterólogo la capacidad de ser regulado por glucosa. Posteriormente, se identificó esta secuencia como un sitio de unión para Mig1⁽⁵¹⁾. Dentro de esta región se hallaron dos cajas GC necesarias para la represión de *SUC2*, denominadas SUC2A de -500 a -485 y SUC2B de -448 a -443⁽³⁹⁾. Ambos sitios contienen motivos ricos en GC similares que están invertidos uno con respecto al otro, además de presentar una base hipersensible individual en la hebra rica en G y varias regiones hipersensibles flanqueando los motivos. Esto sugiere que el DNA cambia de conformación cuando se une a Mig1, posiblemente por formación de un lazo debido a la unión cooperativa DNA-proteína en los dos sitios⁽³⁹⁾. Estudios realizados sobre los sitios SUC2A y SUC2B mediante mutagénesis indican que ambos elementos son parcialmente redundantes respecto a la represión de *SUC2*⁽⁵²⁾.

La realización de varios análisis genéticos ha permitido identificar numerosas mutaciones reguladoras en esta vía de represión. Por ejemplo, ciertas alteraciones en los genes *CYC8* (*SSN6*) y *TUPI1*, al igual que ocurre en el caso de la delección de *MIG1*, eliminan parcialmente la represión por glucosa (⁵³). Además, existen mecanismos independientes de Mig1 para la represión de *SUC2* (^{47,53,54}). En ellos está directamente implicada la proteína Mig2 (^{55,56}) y se observa que, aunque su delección no afecta de forma significativa a la represión de *SUC2*, la expresión del gen en el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$ está mucho más desreprimida que el mutante simple $\Delta mig1$. La supresión de los dos sitios de unión para Mig1 en el promotor del gen *SUC2* también reduce su transcripción, lo que sugiere que los elementos necesarios para la represión se encuentran localizados muy cerca de aquellos requeridos para unos niveles de expresión normales, posiblemente superpuestos (⁵²).

1.5. Papel del complejo Hxk2/Snf1/Mig1 en la represión por glucosa del gen *SUC2*.

Como se indicó anteriormente, cuando la glucosa está presente en el medio es detectada a través de las proteínas de membrana Snf3 y Rgt2, cuya función es generar una señal intracelular que se transmite a través de Grr1^{SCF} al factor transcripcional Rgt1. En estas condiciones Rgt1 se hiperfosforila a causa de Tpk3 (¹¹) disociándose del complejo represor de ciertos genes, como el que codifica para el transportador de glucosa Hxt1, permitiendo su expresión.

En alta glucosa la mayor parte del complejo Snf1 permanece desensamblado y se localiza en el citoplasma, aunque todavía existe una pequeña fracción activa en el núcleo. En el compartimento nuclear también se puede encontrar una reducida cantidad de Hxk2 capaz de interactuar tanto con Mig1 como con Snf1, formando parte del complejo represor y, por tanto, manteniendo la represión sobre el gen *SUC2*. La interacción de Hxk2 con Mig1 es a través de la región Lys₆-Met₁₅ de Hxk2 y para que pueda llevarse a cabo resulta imprescindible el residuo Ser₃₁₁ de Mig1. Si dicho residuo se muta a alanina, Mig1 es incapaz de interactuar con Hxk2 (²⁹) además de no ser posible su fosforilación por Snf1. En el mutante S311A, Mig1 presenta una localización permanentemente nuclear y la regulación de *SUC2* se ve alterada, ya que el gen pierde la capacidad de desreprimirse aún en ausencia de glucosa.

Cuando las condiciones del medio cambian y disminuye la cantidad de glucosa, prácticamente todo el heterotrímero Snf1 del citosol es activado por Sak1 y una fracción muy importante del mismo pasa a localizarse en el núcleo gracias a Gal83. Una vez en el núcleo, debido a que Hxk2 deja de interactuar con Mig1, Snf1 fosforila a Mig1 y provoca su salida mayoritaria hacia el citosol, permitiendo que Hxk2 también abandone el núcleo a través de la exportina Xpo1 (²⁶). En estas condiciones el gen *SUC2* se desreprime, aunque la pequeña fracción de Mig1 desfosforilada presente en la célula puede mantener cierto grado de represión (⁵²).

Aunque Mig1 es el principal represor implicado en la regulación del gen *SUC2*, la ausencia de la proteína Mig1 no produce una desrepresión total, sino que ésta sólo se alcanza en el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$. Dado que Mig2 presenta dos motivos de dedos de zinc similares a Mig1 se ha planteado la posibilidad de que esta proteína tenga un papel secundario en la regulación del gen *SUC2* (⁵⁵) aunque su delección no afecte de forma significativa a la represión del mismo.

Si bien se demostró que Mig2 es capaz de unirse a promotores con motivos similares a los sitios de unión de Mig1 (⁵⁵) y parece un elemento clave en la regulación de la utilización de glucosa por *S. cerevisiae*, no se tienen muchos datos acerca de su participación en el complejo represor del gen *SUC2*, ni de otras posibles funciones que pueda llevar a cabo en la célula.

Agrupando lo expuesto hasta el momento, el comportamiento general simplificado de una célula de *S. cerevisiae* en cuanto a la detección y utilización de glucosa podría ser tal y como se representa en las figuras I-1.5A (página 16) e I-1.5B (página 17).

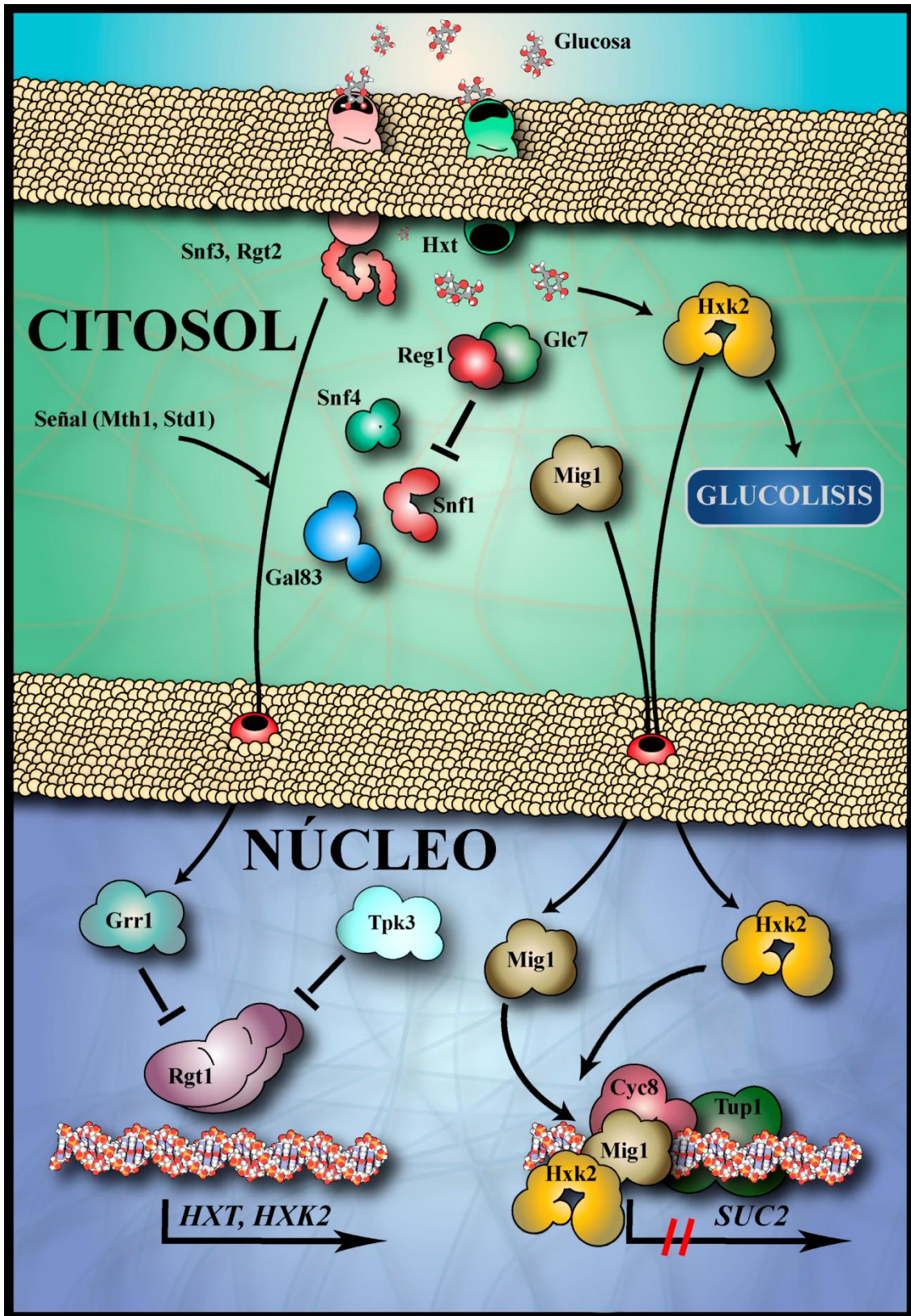


Figura I-1.5A: Represión por glucosa. En presencia de glucosa, Mig1 en su estado desfosforilado forma parte del complejo represor del gen *SUC2* impidiendo su transcripción. La señal glucosa es transmitida a través de la vía Mth1, Std1 y Grr1 provocando la disociación del DNA de Rgt1, posibilitando la transcripción de genes como *HXT* y *HXK2*. El complejo quinasa Snf1 se encuentra en el citosol en forma inactiva. Hxk2 se localiza parcialmente en el núcleo, participando en la represión.

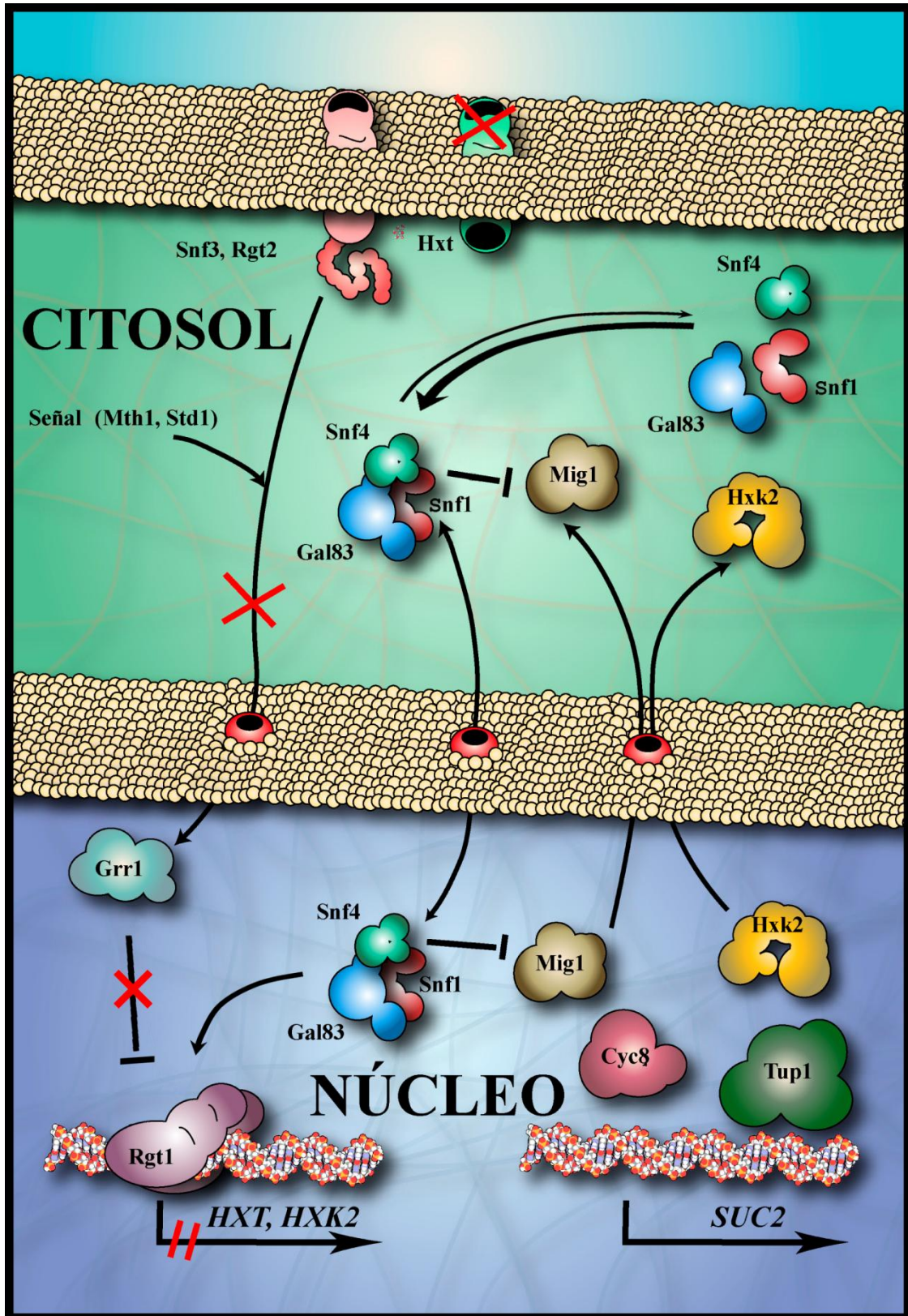


Figura I-1.5B: Desrepresión en ausencia de glucosa. El complejo Snf1 en su conformación activa puede translocarse al núcleo gracias a Gal83. En este compartimento fosforila (entre otras proteínas) a Mig1, provocando la disociación del complejo represor del gen *SUC2* y el comienzo de la transcripción. Rgt1 se hiperfosforila y asocia al DNA, determinando el fin de la transcripción de los transportadores de glucosa y del gen *HXK2*. El complejo Reg1/Glc7 inactivará de nuevo a Snf1 cuando la hexosa vuelva a estar presente en el medio.

2. Transporte núcleo-citoplasmático:

El núcleo es una de las estructuras celulares más características de los organismos eucariotas. Es un orgánulo delimitado por una doble membrana y en su interior se halla la mayor parte del material genético celular. Esta doble membrana es conocida como envoltura nuclear. Cada una de las membranas que componen la envoltura nuclear tiene una composición típica de bicapa lipídica, dejando entre sí un espacio aproximado de 20-40 nm llamado espacio perinuclear. La membrana externa mantiene una continuidad con el retículo endoplásmico rugoso, mientras que la membrana interna está interconectada con la lámina nuclear. La lámina nuclear es una red de filamentos proteicos compuestos por varias proteínas conocidas como laminas (A, B1, B2 y C) que actúa como punto de anclaje para los cromosomas y proporciona estabilidad mecánica al núcleo.

La función del núcleo es permitir la separación del material genético y la maquinaria transcripcional de los componentes propios del citoplasma, como los implicados en el metabolismo y en la traducción de proteínas. Esta segregación facilita la organización de diversos procesos celulares como la expresión génica, la transducción de señales y la progresión del ciclo celular. Uno de los puntos clave para poder llevar a cabo esta regulación es la existencia de un transporte selectivo y bidireccional, tanto de RNA como de proteínas, entre el citoplasma y el núcleo. Este transporte ocurre a través de grandes estructuras localizadas en la membrana nuclear conocidas como poros nucleares (NPC, *Nuclear Pore Complex*).

2.1. Estructura y función del poro nuclear.

El poro nuclear es una gran estructura macromolecular con un tamaño aproximado de 125 MDa (⁵⁷) que se encuentra anclada en la doble membrana de la envoltura nuclear, permitiendo la conexión entre el citoplasma y el interior del núcleo. Estudios recientes han mostrado que la estructura del NPC se encuentra muy conservada evolutivamente, comprendiendo un número relativamente pequeño de proteínas (~ 30) conocidas como nucleoporinas o Nups (^{58,59}).

Cada poro contiene de 8 a 48 copias de cada Nup, presentando, por tanto, una simetría octogonal. En el centro del NPC, perpendicular a la membrana, se encuentra el canal central, con un diámetro de 30nm, a través del cual tienen lugar la entrada. La mayor parte de las nucleoporinas se disponen de forma simétrica, estando presentes a ambos lados del NPC, cerca del canal central (Nups simétricas). También se ha observado que, tanto en levadura como en metazoos, algunas Nups tienden a asociarse de manera preferente con el lado nuclear o con el lado citoplásmico del NPC (Nups asimétricas) (⁵⁸).

Aunque la mayoría de las Nups presentan una baja similitud en cuanto a su secuencia, muchas mantienen algún grado de conservación en cuanto a su estructura y/o función, permitiendo que la composición del NPC se conserve en varios aspectos (⁶⁰).

Las nucleoporinas se pueden dividir en tres grupos teniendo en cuenta su papel. En primer lugar se encuentran aquellas con un dominio transmembrana cuya función es el anclaje del NPC a la membrana; en segundo lugar están las Nups estructurales, que se encargan de mantener la estructura del canal central que hace posible el transporte; finalmente, se encuentran aquellas que contienen repeticiones de los aminoácidos fenilalanina y glicina (FG-Nups). En mamíferos podemos encontrar un cuarto grupo compuesto por Nups ricas en motivos triptófano-arginina (WD) (⁵⁹).

Las FG-Nups comprenden, aproximadamente, la mitad de la masa total del NPC y, como se comentó anteriormente, en su mayoría están distribuidas de manera simétrica aunque algunas se localicen exclusivamente sólo en la cara nuclear o en la citosólica. Son muy importantes puesto que las repeticiones FG resultan las encargadas de interaccionar con las proteínas implicadas en el transporte núcleo-citoplasmático. Se estipula que existen unas 200 repeticiones de FG-Nups por cada NPC, lo que representa un gran número de sitios de unión para estos transportadores (⁶¹). Esta característica, hace de las FG-Nups un elemento esencial para el transporte específico a través del poro nuclear.

El mecanismo de transporte a través del poro se encuentra mediado por un conjunto de proteínas denominadas Carioferinas (Kaps). Muchos de estos factores son miembros de una superfamilia de proteínas que contienen repeticiones HEAT y a las que se conoce colectivamente como β -Carioferinas. El número de las mismas, así como su función y el mecanismo de reconocimiento de las proteínas a transportar, varía según las especies. Hay unas 20 β -Kaps en células humanas, mientras que el número se reduce a 14 en *S. cerevisiae* (^{62,63}).

Mientras que los iones, moléculas pequeñas y macromoléculas con un tamaño inferior a 40 kDa pueden difundir de forma pasiva a través del poro nuclear, aquellas moléculas con un tamaño superior, así como la mayoría de proteínas nucleares, usan un mecanismo de transporte activo, pudiendo alcanzarse del orden de 1.000 transportes por complejo en un segundo (^{62,64}).

Se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo de entrada y translocación del conjunto Kap-cargo a través del poro (⁶⁵). En el primer modelo se propone que las repeticiones FG de las Nups son capaces de interaccionar entre sí de manera débil para formar una especie de “entramado selectivo”. Este tamiz imposibilitaría el paso a aquellas proteínas incapaces de “disolverse” en el mismo. Las Kaps, gracias a su naturaleza hidrofóbica, son capaces de integrarse en el tamiz y atravesar el poro (⁶⁶).

Una segunda teoría sugiere que, aunque la estructura interna del NPC está formada por un canal acuoso, el pequeño tamaño de este canal (30 nm) junto con los filamentos de las FG-Nups funcionaría como una barrera entrópica a la difusión. La unión de las Kaps a las repeticiones FG permitiría superar esta barrera y acceder al interior del canal para, finalmente, atravesar el poro en un proceso denominado “entrada virtual” (^{58,61}).

El último modelo plantea la formación de un gradiente de afinidad por parte de las FG-Nups. Las Kaps serían capaces de viajar a través del mismo gracias al establecimiento de interacciones con sitios específicos de las FG-Nups, aumentando la afinidad por las mismas a medida que avanza la translocación. En apoyo a esta teoría, se ha demostrado que una Kap implicada en la importación presenta una afinidad significativamente mayor por una Nup presente en el lado nuclear del NPC, mientras que una Kap relacionada con la exportación tiene una afinidad superior por aquellos sitios de unión localizados en el lado citoplasmático (⁶⁷⁻⁶⁹). La presencia de nucleoporinas con sitios de unión de alta afinidad en los compartimentos de destino permite mantener una direccionalidad en el transporte (⁶¹).

2.2. Superfamilia de las Carioferinas.

Aquellas moléculas incapaces de atravesar la envoltura nuclear por difusión pasiva requieren de un mecanismo de transporte activo mediado por proteínas. Estos transportadores son conocidos por el nombre de carioferinas (Kaps) y juegan un papel muy importante en diversos procesos celulares como son la expresión génica, la transducción de señales, la respuesta inmune y la propagación viral (⁷⁰).

En *S. cerevisiae* esta superfamilia está compuesta por 17 proteínas que podemos dividir en cuatro grupos: un primer grupo al que pertenece la importina α (α -Kap), una segunda familia a la que pertenecen las β -Kaps, en tercer lugar estaría el heterodímero Mex6-Mtr2 y, por último, la carioferina Ntf2.

Se conocen 14 β -Kaps en *S. cerevisiae*, cada una de ellas operando en distintas vías del transporte nuclear: importación, exportación o transporte bidireccional (⁷¹). Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia presentan unos pesos moleculares comprendidos entre 90 y 150 kDa, un punto isoeléctrico de 4-5, una baja homología de secuencia (entre un 10 y un 20%) y todas contienen repeticiones helicoidales HEAT (⁶³). Análisis evolutivos dividen la superfamilia de las Kaps en 12 subfamilias (⁷²). De las 14 β -Kaps presentes en *S. cerevisiae*, 10 median la importación de proteínas al interior del núcleo, tres la exportación y una de ellas participa en ambos procesos, siendo la única capaz de realizar ambas actividades (⁷³).

En cuanto a la estructura de los diferentes miembros de esta familia, se ha podido determinar que todas ellas contienen dominios HEAT. Este dominio proteico está presente en varias proteínas entre las que se encuentran aquellas que le dan nombre: Huntingtina, factor de Elongación 3, subunidad PR65/A de la proteína fosfatasa 2A y PI3-quinasa TOR. El dominio HEAT consiste en la repetición de aproximadamente 40 residuos, dispuestos en dos α -hélices (A y B) antiparalelas unidas por un giro. Una característica propia de estos dominios es la presencia de dos residuos muy conservados, el Asp₁₉ y la Arg₂₅ (⁷⁴⁻⁷⁶).

En el caso de la familia de las β -carioferinas, el número de repeticiones HEAT presentes varía entre 18 y 20 (⁷⁷). Estas repeticiones se unen entre sí de tal manera que

forman dos arcos, los cuales se fusionan para dar lugar a una molécula helicoidal. La orientación relativa de los arcos varía entre los miembros de esta familia y se ve influida por la unión de las mismas a diferentes proteínas (⁷⁸). De esta manera, pese a presentar una arquitectura similar, las α -hélices de las β -Kaps muestran una considerable variabilidad en aquellas zonas implicadas en la unión. Esta flexibilidad estructural confiere a las β -carioferinas la capacidad de unir diferentes sustratos, así como que varias Kaps puedan mediar el transporte de una misma proteína. Por ejemplo, las histonas son capaces de usar al menos cuatro vías de importación (⁷⁹).

Cada β -Kap reconoce un grupo específico de proteínas o RNA, creando múltiples vías de transporte a través del poro nuclear. El reconocimiento de las proteínas a transportar tiene lugar a través del extremo C-terminal de la Kap, mientras que en el extremo N-terminal se encuentra localizado el dominio de unión para la proteína Ran. Además de interactuar con las proteínas/RNA a transportar y con RanGTP, las carioferinas establecen interacciones débiles con las repeticiones FG presentes en las nucleoporinas del NPC a través de un dominio localizado en el centro de la proteína, permitiendo la translocación del complejo Kap-*cargo* (^{80,81}).

El factor determinante en la localización nuclear es la presencia de señales diana para las Carioferinas. Estas secuencias se conocen con el nombre de NLS (*Nuclear Localization Sequence*) en el caso de señales que median la importación y NES (*Nuclear Export Signal*) en aquellas implicadas en la exportación. La mayoría de las β -Kap se unen directamente a la NLS de su *cargo*. La importina β es la única que puede reconocer la secuencia de localización nuclear directamente o a través de un adaptador, la importina α (⁷⁶). La importina β puede usar también como adaptador a la proteína Esnrportinal para mediar la importación de las snRNPs (⁸²).

Mientras que la localización de una proteína nuclear viene marcada por la presencia de una secuencia NLS o NES, la direccionalidad del transporte a través del NPC está determinada por un gradiente de RanGTP, esencial en la regulación de la interacción de la β -Kap con su *cargo* (^{62,83}). La concentración de RanGTP en el interior del núcleo es unas 100 veces superior al presente en el citoplasma celular, estando regulada esta distribución por varias proteínas, siendo las más importantes RanGEF y RanGAP (⁸⁴).

2.3. Regulación del transporte núcleo-citoplasmático por RanGTP.

Como se ha indicado previamente, la direccionalidad del transporte a través del poro nuclear viene determinada por un gradiente en la concentración de RanGTP. Ran (*RAS-related Nuclear protein*) (Gsp1 en levadura) es una pequeña proteína de 25 kDa perteneciente a la familia de las proteínas G, que se caracterizan por ser capaces de unir e hidrolizar GTP. Esta unión e hidrólisis tiene lugar a través de un dominio G altamente conservado. El dominio G en los miembros de la superfamilia RasGTPasa está formado por 6 láminas β rodeadas por 5 α -hélices, siendo indispensable para la unión de la proteína a GTP (⁸⁵).

En el apartado anterior se hacía mención a la existencia de un gradiente de RanGTP entre el núcleo y el citoplasma regulado principalmente por dos proteínas: RanGEF (Prp20) y RanGAP (Rna1). La distribución de ambos moduladores es diferente. RanGEF (*Ran Guanine-nucleotide-Exchange Factor*) se encuentra en el núcleo y asociado con las histonas H2A y H2B, mientras que RanGAP (*Ran GTPase Activating Protein*) presenta una localización citoplasmática. Este fenómeno crea y estabiliza el gradiente de tal manera que RanGTP está presente de forma mayoritaria en el núcleo, mientras que RanGDP es esencialmente citoplasmática (⁸⁶).

La capacidad de la proteína Ran para regular la direccionalidad del transporte a través del poro se debe a la diferente afinidad que presentan las carioferinas por la misma. Las proteínas β -Kaps se unen preferentemente a RanGTP a través de su extremo N-terminal, con una afinidad en el rango nM mientras que la afinidad por RanGDP es $\sim 10 \mu\text{M}$ (⁷⁶).

La diferente afinidad que muestran las carioferinas por Ran, unida a la distribución diferencial de la misma en el interior celular, dan lugar al ciclo representado en la Fig. I-2.3. En la parte izquierda de la figura podemos observar cómo tiene lugar la importación. En ella, las proteínas a transportar se unen a las importinas en el citoplasma, donde RanGTP está casi ausente, produciéndose su translocación al interior del núcleo. Una vez en el núcleo se produce la unión entre la importina y RanGTP provocando la liberación del *cargo*.

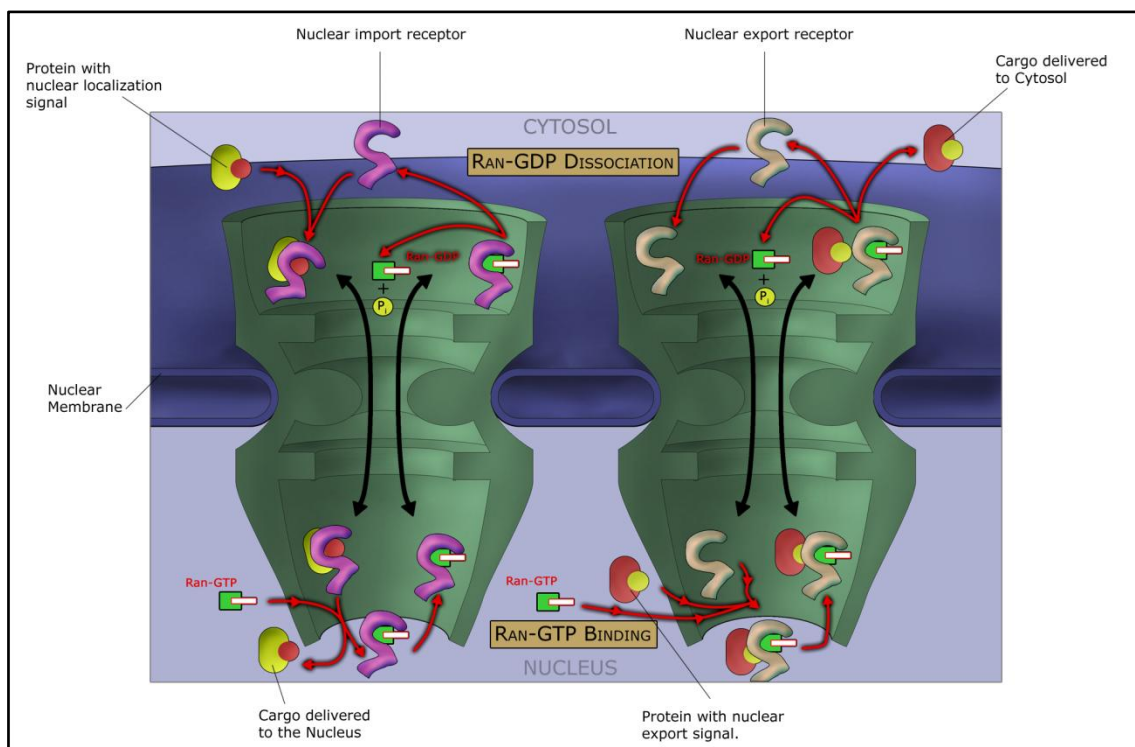


Figura I-2.3: Regulación del transporte núcleo-citoplasmático por RanGTP (Shao; Creative Commons). Durante la importación, las Kaps se unen a sus *cargos* pasando al interior del núcleo donde la unión de la importina con RanGTP y su hidrólisis a RanGDP produce la liberación del *cargo*. El complejo Kap-RanGTP se recicla al citoplasma. En el caso de la exportación, la exportina se une a su *cargo* y a RanGTP en el núcleo, tras atravesar el mismo, la hidrólisis de RanGTP provoca la separación del complejo.

En el caso de la exportación (parte derecha de la figura), se forma un complejo ternario entre la exportina, el *cargo* y RanGTP en el interior del núcleo. Una vez producida la translocación al citoplasma, la hidrólisis de RanGTP provoca un cambio conformacional con la consiguiente disociación del complejo y la liberación del *cargo* (⁸⁷). RanGDP es entonces importada al núcleo a través de la importina Ntf2 (*Nuclear Transport Factor 2*) y posteriormente convertida a RanGTP por RanGEF (⁸⁸). RanGTP no es totalmente accesible a RanGAP mientras está formando parte del complejo, por ello, debe constituirse una estructura intermediaria RanBP1·RanGTP·Kap donde RanGAP sí puede acceder a RanGTP, llevándose a cabo la hidrólisis a RanGDP (⁶²).

2.4. Ruta de importación nuclear.

La ruta de importación mediada por carioferinas más caracterizada tiene como efector a la importina β (Kap95). La mayoría de las Kaps interaccionan de manera directa con sus *cargos* pero Kap95 es capaz de llevar a cabo su función tanto de forma directa, como a través de una proteína adaptadora, la importina α (Kap60). Como se comentó anteriormente, el reconocimiento de los *cargos* por parte de las Kaps tiene lugar a través de secuencias específicas conocidas como NLSs, en el caso de la importación.

La primera NLS caracterizada recibe el nombre de NLS-clásica (cNLS). Fue descubierta a principios de los 80 (⁸⁹) y se caracteriza por ser una secuencia corta, rica en lisinas, reconocida por el heterodímero importina $\alpha\beta$. Posteriormente, se identificó un grupo significativamente amplio y diverso de secuencias que recibe el nombre de PY-NLS, reconocidas por Kap β 2 (⁹⁰).

Otro tipo de NLS son las presentadas por algunas proteínas con dedos de Zn del tipo C₂H₂. Estas proteínas se caracterizan por tener unas secuencias entre los dominios C₂H₂ 2 y 3, cuya mutación causa la pérdida de localización nuclear. Este tipo de NLS se conoce como NLS de tipo intercalado (⁹¹). Recientemente, se ha descubierto que otras β -Kaps implicadas en la importación reconocen segmentos con secuencias muy diversas, haciendo extremadamente difícil la identificación de características comunes que definan las NLSs.

Aunque la cNLS es la más frecuente, el uso de una proteína adaptadora como señal indirecta de reconocimiento por parte de la importina β es poco común. Estudios recientes indican que, pese a lo esperado, el transporte del dímero importina β -*cargo* es más rápido que el transporte mediado por la importina α . Modificaciones en la concentración de la importina α mediante siRNA o microinyección han provocado cambios equivalentes en la concentración de *cargo* dentro del núcleo. Por el contrario, aumentos en la cantidad de importina β pueden llegar a inhibir el transporte al interior nuclear. Por tanto, aunque el uso de una proteína adaptadora conlleve un gasto de energía superior (la célula necesita exportar la importina α , con el consiguiente gasto de GTP), parece que esta vía presenta una ventaja evolutiva y mejora la respuesta a cambios ambientales (⁹²).

Dentro de la cNLS podemos encontrar dos tipos de secuencias: monopartitas y bipartitas. La NLS-clásica monopartita se caracteriza por ser corta, presentando de 5 a 7 residuos, y tener carácter básico. En la mayoría de los casos, se corresponde con la secuencia consenso $K(K/R)_x(K/R)$. Su pequeño tamaño y su naturaleza polar podrían favorecer su localización en la superficie de giros donde sería accesible a la importina α . La cNLS bipartita presenta dos zonas ricas en aminoácidos básicos separadas por una secuencia de 10-12 aminoácidos y responde, en general, a la siguiente secuencia consenso: $(K/R)(K/R)_{x_{10-12}}(K/R)_{3/5}$ (⁹³). Los residuos críticos se han denominado P1'-P2' (región amino de la secuencia) y P2-P5 (región carboxilo). El más importante parece ser el residuo P2, predominantemente definido por los aminoácidos Thr₁₆₆ y Asp₂₀₃ en las repeticiones Arm 2 y 3 de la importina α . Las dimensiones del bolsillo parecen ser óptimas para albergar un residuo de Lys (⁹⁴).

La importina α está compuesta por dos dominios diferentes tanto desde el punto de vista estructural como desde el funcional. En el extremo N-terminal se encuentra localizado el dominio de unión a la importina β (α IBB) mientras que el extremo C-terminal está implicado en el reconocimiento del *cargo*. El extremo C-terminal está formado por una repetición en tándem de 10 dominios armadillo (Arm) (^{95,96}). El dominio Arm consiste en 3 α -hélices (H1, H2 y H3) codificadas por un motivo de ~40 aminoácidos que se disponen de forma antiparalela generando una superestructura helicoidal con forma fusiforme, ligeramente curvada y con carácter hidrofóbico. La hélice H3 define la superficie interna de la región cóncava de la proteína.

Estudios estructurales revelan que el sitio de unión para la cNLS está localizado a lo largo de un surco, muy conservado evolutivamente, sobre la superficie de la importina α . La zona cóncava del surco contiene una secuencia muy conservada de residuos triptófano y asparragina, localizados en los giros 3 y 4 de la hélice H3. Esta secuencia se encuentra interrumpida entre las repeticiones Arm 5 y 6, dividiendo el surco de unión en dos partes: el surco mayor que comprende los dominios Arm 2-4 y el surco menor formado por los dominios Arm 6-8. La interrupción de la secuencia triptófano-asparragina se encuentra conservada desde las levaduras hasta los humanos (⁹⁵).

En resumen, la ruta de importación mediada por el dímero importina α - β comienza en el citoplasma con la interacción entre la importina α y la NLS de la proteína a transportar. A continuación, la importina β se une al dominio α IBB de la importina α a través de la región comprendida entre los dominios HEAT 7-19 (⁹⁷). Mediante la interacción de la importina β con las FG-Nups, el trímero importina α - β -*cargo* se transloca al interior del núcleo. Una vez en el núcleo, debido a la alta concentración de RanGTP, se produce la interacción entre la importina β y RanGTP lo que provoca un cambio conformacional con la consiguiente liberación del dímero importina α -*cargo* (⁹⁸). Posteriormente, se produce la unión de la importina α -*cargo* a Nup50 (Nup2) y al dímero formado por la exportina Cse1-RanGTP, provocando la liberación del *cargo* en el núcleo. En último lugar, la importina α se recicla al citoplasma mediante el complejo

Cse1·RanGTP, quedando lista para un nuevo ciclo (⁹⁹). El reciclaje de la importina β parece que ocurre unida a RanGTP, mediante su interacción con las FG-Nups (¹⁰⁰).

2.5. Exportación nuclear mediada por NES.

Las β -Kaps tienen la capacidad de reconocer señales tanto de localización nuclear como de exportación. Aún cuando están descritas varias clases de NLSs, hasta el momento sólo se conoce un tipo de NES, la LR-NES. La LR-NES es una secuencia compuesta por unos 10-15 residuos, identificada por primera vez en la proteína VIH-1 Rev y en el inhibidor de la proteína-quinasa dependiente de cAMP. Es reconocida por la exportina Crm1 (Xpo1) (¹⁰¹).

A través de varios experimentos de mutagénesis y diversos estudios de simulación por ordenador, se ha establecido que la secuencia NES, en muchos casos, se corresponde con la secuencia consenso Φ -x_{2,3}- Φ -x_{2,3}- Φ -x- Φ , donde Φ representa a los aminoácidos Lys, Val, Ile, Phe o Met. Estos aminoácidos son clave para el reconocimiento y unión por parte de la exportina Crm1 aunque se ha visto que las secuencias anexas, muchas de carácter ácido, son también importantes en esta unión (¹⁰²). Muchas de las LR-NES se corresponden con esta secuencia, pero esta secuencia también se localiza en muchas proteínas que contienen en su estructura secundaria α -hélices (^{102,103}). Al igual que ocurre con las NLSs, la LR-NES podría ser tan compleja y diversa que sería necesario describirla no como una secuencia lineal, sino dentro de un contexto físico y estructural que permitiera su interacción con la Crm1.

Algunos estudios han demostrado la existencia de NESs reconocidas también por otras proteínas, tal es el caso de la calreticulina, una proteína capaz de unirse a calcio e implicada en el plegamiento de proteínas en el lumen del retículo endoplásmico. *S. cerevisiae* no presenta esta proteína aunque Cne1 tiene cierta homología con ella. La calreticulina es capaz de unirse a la NES presente en la proteína PKI (¹⁰⁴). Se ha comprobado la existencia de otras secuencias de exportación independientes de Crm1, ya que el transporte de las proteínas que llevan esta secuencia es independiente de leptomicina B. Tal es el caso del ejemplo antes mencionado de la secuencia reconocida por calreticulina, así como de las secuencias M9 y KNS localizadas en hnRNPA1 y hnRNP K (¹⁰²). El transporte de estas dos últimas proteínas sí es sensible a actinomicina D.

Se han identificado cuatro exportinas en *S. cerevisiae*: Los1, Msn5, Crm1/Xpo1 y Cse1. Los1 está implicada en el transporte de tRNA (¹⁰⁵). Msn5 es la única proteína conocida en levadura capaz de llevar a cabo procesos de importación y de exportación, siendo la encargada del transporte de varios factores de transcripción como Pho4 y Mig1 (¹⁰⁶). Cse1 es la exportina encargada del reciclaje de la importina α , mediante su interacción con Nup153 (¹⁰⁷). Crm1 es la encargada del transporte de aquellas proteínas que presentan LR-NES cualidad que, en estos momentos, hace que sea la exportina más estudiada. Dada la importancia de Cse1 en el reciclaje de la importina α y que la ruta de exportación por Crm1 es la mejor caracterizada, nos centraremos en estas dos proteínas.

Crm1 contiene 20 repeticiones HEAT (H1-H20). La estructura de muchas de las repeticiones H1 junto con varios de los giros dentro de H1-H3, H8-H9 y los últimos 10 residuos de Crm1 no ha sido modelada debido a la débil densidad electrónica y movilidad de estas zonas. Las repeticiones H1-H20 se disponen en forma de anillo con H2-H5 a sólo 10Å de H20. Los diámetros externo e interno de la circunferencia que forman son 90 y 45Å, respectivamente. Las repeticiones H1-H19 presentan la estructura típica con dos hélices antiparalelas, mientras que la H20 tiene 3 hélices: H20', H20A y H20B. La hélice H20B está seguida por una hélice compuesta por 27 residuos denominada hélice C implicada en el contacto con las hélices H8-H12. Al igual que en el caso de Kap-β2, Crm1 contiene un giro flexible en el centro de su estructura y, por tanto, se propone un modelo en el cual el giro enmascararía el sitio de unión del *cargo*, dificultando la asociación estable entre Ran y Crm1. Cuando se produce la unión con Ran o con el *cargo*, el giro sufriría un cambio conformacional y se produciría la formación de un complejo ternario estable (¹⁰⁸). Este mecanismo podría no ser universal dado que la exportina Cse1 carece de un giro en esta posición aunque sí contiene una extensión dentro de la hélice H19 que interacciona con RanGTP y con la proteína a transportar (⁷⁷).

El antifúngico leptomicina B es capaz de inhibir la exportación nuclear mediante transferencia de un grupo alquil a la Cys₅₂₈ de las Crm1, aunque no está claro si esta inhibición se debe a un bloqueo del sitio de unión al sustrato o a un cambio conformacional. Aún así, en ambos casos se impediría la unión del *cargo* a Crm1 (¹⁰⁹).

Por su parte, Cse1 forma una super hélice con sus extremos amino y carboxilo terminales próximos, generando una proteína con forma arqueada que se dispone abrazando a la proteína RanGTP. Simultáneamente, Cse1 puede establecer contacto con la importina α, disponiéndose ésta en una conformación donde no sería posible su unión con el *cargo*, en esta conformación, la importina α también se encuentra en contacto con RanGTP.

La interacción entre Cse1 y RanGTP es diferente de la presentada por las importinas β1 y β2, y podría explicar por qué las exportinas presentan una alta afinidad por RanGTP sólo en presencia de sus *cargos*. Cse1 tiene dos sitios de unión para RanGTP, la unión débil entre ambas proteínas tiene lugar a través del sitio localizado en el extremo N-terminal. Por el contrario, en presencia de su *cargo*, Cse1 se dispone alrededor de RanGTP de manera que ésta ocupa ambos sitios (⁷⁷).

Recientemente, se ha conseguido cristalizar la proteína Crm1 humana (residuos 1-1071) unida a uno de sus sustratos: la Exportina 1 (Spn1) (residuos 1-342). En esta estructura se puede observar que los últimos 30 residuos de Spn1 son prescindibles para su unión con Crm1. En la región que comprende los residuos 1-66 podemos encontrar el dominio sIBB mientras que en la región 94-293 se localiza el dominio NBD (*Nucleotide-Binding Domain*). La unión de Crm1 a la región NBD es idéntica a la unión al dominio m₃G-cap. Por el contrario, la unión a la región sIBB difiere bastante de la unión Kap-β1·sIBB (¹¹⁰). Los residuos 1-10 de la sIBB forman una hélice que conecta a

través de un gran bucle con las hélices $\alpha 2^{\text{IBB}}$ y $\alpha 3^{\text{IBB}}$. Los residuos 1-17 sobresalen de la proteína para unirse a Crm1, mientras que el resto de la región sIBB cubre una cara del NBD.

Spn1 se une de manera bipartita sobre la superficie de Crm1, abarcando las hélices H11-H14. Los residuos 1-16, que forman la LR-NES, interaccionan con un surco hidrofóbico formado por las hélices H11-H12 de Crm1 mientras que el segundo elemento de unión o epítipo II de la NES, interacciona con la región comprendida entre las hélices H12 y 14. No hay contacto entre ambas regiones NES (¹¹¹).

El mecanismo básico de exportación mediado por Crm1 podría resumirse de la siguiente manera: en el núcleo se produce el reconocimiento por parte de Crm1 de la NES presente en la proteína a transportar. Una vez llevado a cabo el reconocimiento, se forma un complejo ternario entre Crm1, RanGTP y el *cargo*. Posteriormente, el complejo es reconocido por los residuos FG de las nucleoporinas del NPC, quienes permiten su translocación al citoplasma. Una vez en el citoplasma tiene lugar la hidrólisis de RanGTP a RanGDP por parte de la proteína citoplasmática RanGAP, provocando la liberación del *cargo* fuera del núcleo. En último lugar Crm1 es reciclada al núcleo a través de su interacción con la Nup214 (¹⁰⁷).

2.6. Regulación del transporte núcleo-citoplasmático.

En respuesta a una gran variedad de señales como hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, señales del ciclo celular, señales del desarrollo y señales de estrés, se pueden modificar las tasas de transporte de una gran cantidad de proteínas. Recientemente, se ha observado que muchas proteínas contienen ambas señales NLS y NES, de tal manera que su concentración en el interior del núcleo puede ser regulada de manera muy precisa en respuesta a diferentes tipos de señales a través de la modulación de sus tasas de importación y exportación.

Uno de los mecanismos para modular la tasa de transporte es a través del enmascaramiento de su NLS o NES, de manera intra o intermolecular. Un ejemplo del primer caso lo tenemos en el factor de transcripción NF-AT4, donde una alta concentración de calcio provoca la unión de la calcineurina impidiendo el reconocimiento de su NES por parte de Crm1 (¹¹²). El enmascaramiento intramolecular es uno de los mecanismos de regulación más comunes, ocurre cuando la accesibilidad a las NLS/NES se impide a través de un cambio conformacional, tal es el caso del factor transcripcional nuclear kappa (NF- κ B) (¹¹³).

Además del enmascaramiento de las NLS/NES que previenen la importación/exportación, la afinidad de las importinas/exportinas por sus *cargos* puede ser regulada a través de diferentes modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones, ubiquitinaciones y metilaciones. El caso más frecuente es la regulación por fosforilación de un sitio cercano a la secuencia NLS/NES. Tal es el caso del morfogen Dorsal de *Drosophila*. La fosforilación de la Ser₃₁₂ por la PKA, aminoácido

localizado 22 residuos hacia el extremo N-terminal de su NLS, incrementa su afinidad y reconocimiento por parte del dímero importina $\alpha\beta$ ⁽¹¹⁴⁾. Otro ejemplo de regulación por fosforilación lo encontramos en el enzima Hxk2, en este caso, la fosforilación de la Ser₁₄ provoca la dimerización de la proteína e impide su reconocimiento por parte de Xpo1 ⁽²⁶⁾.

Otro mecanismo de regulación es a través de la modulación de la unión del *cargo* a factores específicos del citoplasma o del núcleo. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides (GR) se retiene en el citoplasma a través de la formación de un complejo con la proteína Hsp90 en ausencia de ligando ⁽¹¹⁵⁾.

En último lugar, se encuentra la regulación por modulación de la expresión de los componentes de la maquinaria de transporte. La presencia o ausencia de una determinada importina o Nup podría determinar si un *cargo* específico puede entrar o salir del núcleo de manera eficiente, haciendo de la expresión dependiente de tejido o tipo celular de los diferentes componentes del transporte, un factor crítico ⁽¹¹⁶⁾. Como ejemplo tenemos a dHSF (*Drosophila Heat-Shock Factor*), que es transportado al núcleo por IMP α 3. IMP α 3 está ausente durante el desarrollo embrionario evitando la entrada al núcleo de dHSF hasta que comienza su expresión en el estadio 13 ⁽¹¹⁷⁾.

Como se ha señalado, el transporte núcleo-citoplasmático puede estar regulado a través de una gran variedad de mecanismos. De esta manera, a través de diferentes efectores capaces de modular la localización subcelular, tenemos una relación directa entre las señales intra/extracelulares y la respuesta en términos de importación y exportación de moléculas clave en la señalización, como son reguladores del ciclo celular, quinasas y factores transcripcionales.

3. Morfología y función mitocondrial.

Las mitocondrias son orgánulos esenciales presentes en las células eucariotas. Su diámetro varía entre 0,5-10 nm y su número depende del organismo y tejido en el cual estén presentes. Muchas células poseen una única mitocondria, mientras otras pueden contener varios miles. Este orgánulo contiene, a su vez, material genético propio así como sistemas particulares de transcripción y traducción, siendo capaz de llevar a cabo una gran variedad de procesos metabólicos. Entre ellos se incluyen las reacciones del ciclo de Krebs, el ensamblaje de los complejos hierro/azufre, la β -oxidación de los ácidos grasos, procesos de degradación y biosíntesis de muchos metabolitos (¹¹⁸), así como la producción de energía esencial para diversos procesos celulares (¹¹⁹).

El papel de la mitocondria en la célula se ve reflejado en su estructura. Es un orgánulo delimitado por una doble membrana con unas características morfológicas y una distribución intracelular muy especiales. Un corte transversal de un túbulo mitocondrial revela 4 partes diferentes: una membrana externa (ME) y una membrana interna (MI) separadas por un espacio intermembrana (EIM) y un compartimento delimitado por la membrana interna llamado matriz. Dentro de la matriz mitocondrial de encuentra el DNA mitocondrial (mtDNA) anclado a la membrana interna.

La herencia y morfogénesis mitocondrial dependen de un transporte activo a lo largo del citoesqueleto y de sofisticados mecanismos que regulan la diferente morfología y distribución, ayudando a optimizar la función mitocondrial en respuesta a constantes cambios tanto en el interior como en el exterior celular (¹²⁰).

3.1. Bases genéticas de la morfología y función mitocondrial.

El hecho de que *S.cerevisiae* sea una levadura anaerobia facultativa, capaz de satisfacer sus requerimientos energéticos gracias a la energía producida a través de la fermentación, implica que sólo un pequeño número de proteínas mitocondriales son esenciales para la viabilidad celular. Este pequeño grupo se encuentra restringido a un conjunto de factores esenciales para la importación, procesamiento y plegamiento de proteínas precursoras; ensamblaje de los complejos hierro/azufre y la síntesis del nucleótido flavina.

El genoma de *S.cerevisiae* codifica ocho proteínas esenciales para la fosforilación oxidativa. A pesar de la capacidad de la mitocondria para codificar y sintetizar sus propias proteínas, hay un amplio número de genes localizados en el genoma nuclear necesarios para la respiración. Mutantes en estos genes son comúnmente conocidos como mutantes *petite* o *pet* (¹²¹).

Las mitocondrias son orgánulos increíblemente dinámicos. Su morfología y distribución reflejan los requerimientos energéticos propios de la célula. En *S.cerevisiae*, las mitocondrias forman un entramado tubular bajo el córtex celular. La

continuidad del mismo se mantiene por un transporte activo dependiente de actina y un equilibrio dinámico entre procesos de fusión y fisión (^{120,122}).

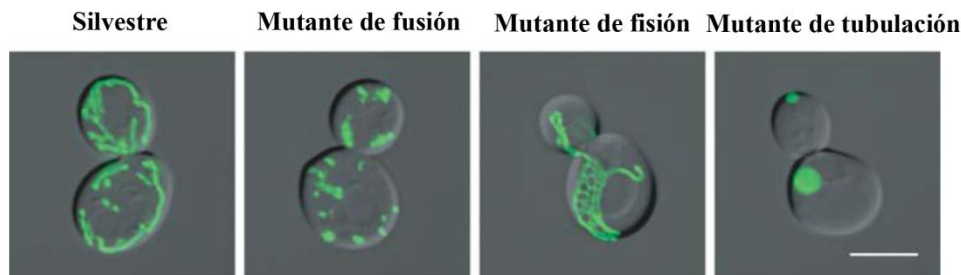


Figura I-3.1: Morfología mitocondrial en *S.cerevisiae* (Okamoto, K. *et al.*, 2005). Células mostrando un fenotipo silvestre, mutante para la fusión (*Afzo1*), mutante de fisión (*Adnm1*) y mutante en la ruta de la tubulación (*Ammml1*). Bar, 5µm.

3.1.1. Genes necesarios para la respiración.

Se han identificado un total de 341 ORFs necesarias para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Más de la mitad de los genes identificados como *pet* codifican para proteínas mitocondriales, la mayoría implicadas en replicación, transcripción y traducción del genoma mitocondrial o en el ensamblaje de la cadena respiratoria.

Una gran parte de los genes *pet* codifica para proteínas no mitocondriales asociadas con funciones vacuolares o para factores transcripcionales nucleares. Los restantes están asociados con diferentes funciones celulares y los defectos que muestran en el crecimiento en medios con glicerol, podrían deberse a una acumulación de efectos que comprometieran la fisiología general de la célula.

38 ORFs codifican para proteínas desconocidas que, presumiblemente, juegan un importante papel en el mantenimiento de la capacidad respiratoria de la célula (¹²³).

3.1.2. Genes implicados en la distribución y morfología mitocondrial.

Aquellos genes implicados en el mantenimiento de la distribución y morfología mitocondrial reciben el nombre de genes MDM (¹²⁴). Los mutantes Δmdm se han clasificado en tres clases teniendo en cuenta la morfología mitocondrial que presentan. Mientras que los mutantes de la clase I se consideran esenciales en el establecimiento de una morfología mitocondrial tipo silvestre, los componentes de las clases II y III presentan una pequeña proporción de células con morfología normal y, por tanto, no son esenciales para el establecimiento de una estructura mitocondrial normal.

Los mutantes de la clase II son capaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables. Este grupo incluye cepas que exhiben defectos en la morfología mitocondrial sólo bajo determinadas condiciones. Las mitocondrias que presentan los componentes de esta clase están, normalmente, fragmentadas o agregadas (¹²³). En este grupo podemos encontrar a los mutantes $\Delta pct1$, $\Delta mdm20$ o para tres genes implicados en la biosíntesis del ergosterol: *ERG6*, *ERG24* y *ERG28*. El hecho de que estos mutantes Δerg estén dentro de este grupo es consistente con el papel que el ergosterol juega en la fusión de membranas (¹²⁵).

En la clase III encontramos el mismo tipo de morfología aberrante que en la clase II, es decir, mitocondrias agregadas y fragmentadas pero que, además, presentan un fenotipo *pet*. Dado que la pérdida de función respiratoria está asociada a una pérdida en la estructura de las crestas mitocondriales y que los procesos de morfogénesis mitocondrial están íntimamente ligados con las conexiones entre la membrana externa e interna (¹²⁶), es concebible que estos mutantes presenten defectos en la estructura de su membrana interna.

Entre los mutantes de la clase I hay, por el momento, 18 genes identificados que codifican para componentes esenciales de la maquinaria implicada en la morfología mitocondrial. En este grupo podemos encontrar a los mutantes $\Delta tom7$, $\Delta mdm30$, $\Delta mdm33$ y $\Delta mdm36$ entre otros. Todos muestran una morfología mitocondrial aberrante aunque difieren en la misma. Mientras que unos presentan agregados y/o fragmentos cortos, otros se caracterizan por presentar mitocondrias alargadas con muchas ramas o anillos gigantes (¹²³). Muchos de los componentes de este grupo carecen de una presecuencia que determine su localización mitocondrial. Tal es el caso de *Mdm33*, *Mdm39*, *Mdm30*, *Mdm34*, *Mdm35* y *Mdm36*. Incluso algunos carecen de un dominio transmembrana que facilite su importación a dicho orgánulo.

Además de los genes *mdm* nombrados, existe una serie de levaduras mutantes para ciertos genes nucleares que muestran fenotipos aberrantes en sus mitocondrias. Se han definido, al menos, tres rutas implicadas en la morfología que se basan en los defectos mostrados en la forma de las mitocondrias. La primera de las rutas es la que media la fusión mitocondrial. Cuando la fusión se encuentra bloqueada, las mitocondrias se fragmentan debido a que los procesos de fisión no están contrarrestados por los de fusión. La segunda vía implica a la fisión mitocondrial: en el caso de que ésta esté bloqueada, las mitocondrias siempre se encuentran interconectadas y agregadas. Las levaduras aún utilizan una tercera vía necesaria para la formación de mitocondrias tubulares, la disrupción de esta ruta provoca la aparición de grandes esferas.

3.2. Fusión mitocondrial.

3.2.1. Componentes de la ruta de fusión mitocondrial.

En levaduras, el núcleo de la maquinaria implicada en fusión mitocondrial está compuesto por tres proteínas: Fzo1 y Ugo 1 en la membrana externa y Mgm1, una proteína del espacio intermembrana anclada a las membranas interna y externa. Mutantes que carezcan de cualquiera de estos tres componentes presentan mitocondrias fragmentadas y defectos en la herencia del mtDNA.

Aunque la proteína Fzo1 (*fuzzy onions*) se localiza mayoritariamente en la membrana externa, también se ha visto asociada a la membrana interna (¹²⁶). Fzo1 es una GTPasa muy conservada evolutivamente, presente en *Drosophila* y en mamíferos (Mfn, mitofusina) (^{127,128}). Contiene 4 repeticiones de siete aminoácidos que responden a la secuencia aminoacídica HPPHCPC, donde la H representa residuos hidrofóbicos; la C residuos con carga; y la P residuos polares y, por tanto, hidrofílicos. Este tipo de repeticiones son la base para muchos motivos estructurales de hélice superenrollada (*coiled coils*), normalmente implicados en la interacción entre proteínas. Un ejemplo de hélice superenrollada es el motivo de cremallera de leucina, el cual suele presentar una leucina en la cuarta posición del motivo.

Además de las repeticiones de siete aminoácidos, Fzo1 presenta un dominio GTPasa y dos segmentos transmembrana. Aunque estudios genéticos indican que el dominio GTPasa de Fzo1 es esencial para su función *in vivo* (¹²⁷), la actividad bioquímica de esta región aún no ha sido determinada *in vitro*. Fzo1 se encuentra integrada en la membrana mitocondrial externa con su dominio GTPasa y su dominio de hélice superenrollada expuestos hacia el citoplasma. Además presenta una pequeña zona de unión entre sus dos regiones transmembrana expuesta hacia el espacio intermembrana (¹²⁶).

En segundo lugar se encuentra la proteína Ugo1, por el momento identificada sólo en levaduras (¹²⁹). Ugo1 es una proteína de 58 kDa que contiene, al menos, cinco dominios transmembrana (¹³⁰). En su estructura presenta dos posibles dominios transportadores (PCD, *Putative Carrier Domain*) con la secuencia consenso Px(D,E)xx(K,R), siendo x cualquier residuo (¹³¹). La presencia de estos dominios la convierte en miembro de la familia de proteínas transportadoras mitocondriales (MCP, *Mitochondrial Carrier Protein*). Todos los miembros de esta familia contienen múltiples dominios transportadores, participando en el transporte de metabolitos y otras biomoléculas a través de la MI mitocondrial (¹³²).

Ugo1 es el miembro menos conservado de esta familia difiriendo en varios aspectos: por ejemplo, su peso molecular es aproximadamente el doble que el del resto del grupo. En segundo lugar, aunque otros componentes de esta familia se localizan en la impermeable MI, Ugo1 lo hace en la semipermeable ME, donde el transporte de pequeñas moléculas (hasta 5 kDa) a través de la bicapa lipídica no requiere,

necesariamente, un transporte activo. Estudios bioquímicos sugieren que Ugo1 presenta una topología con el extremo N-terminal hacia el citoplasma y el C-terminal en el EIM (¹²⁹), mientras que los componentes de la familia MCP caracterizados muestran-ambos extremos orientados hacia el EIM. Finalmente, mientras que el resto de miembros tiene tres dominios transportadores, Ugo1 tiene dos posibles dominios transportadores, de los cuales, sólo uno (PCD2) provoca alteraciones en el fenotipo cuando se mutan los residuos con carga conservados.

Estudios recientes han planteado que, si bien no se excluye la posibilidad de que Ugo1 sea una proteína con actividad transportadora, sí se favorece la idea de que Ugo1 haya evolucionado desde un transportador ancestral adquiriendo una nueva función en la fusión mitocondrial (¹³⁰)

Finalmente, como último componente imprescindible en la maquinaria de fusión, tenemos a la proteína Mgm1 (*Mitochondrial genome maintenance*) (¹³³), una segunda GTPasa relacionada con las dinaminas, las cuales median la escisión de la membrana durante la endocitosis (¹³⁴). Mgm1 es necesaria en los procesos de fusión, morfología, mantenimiento del genoma y mantenimiento de la estructura de las crestas mitocondriales (¹³⁵⁻¹³⁷).

La proteína Mgm1 contiene una presecuencia en su extremo N-terminal, adyacente a la misma, una secuencia de corte, dos segmentos hidrofóbicos (transmembrana), un dominio GTPasa, un dominio intermedio y un dominio efector de la GTPasa (¹³⁸). El dominio GTPasa, al igual que sucede con Fzo1, es esencial para poder llevar a cabo su función *in vivo*, pero no se ha demostrado su actividad bioquímica *in vitro* (¹³⁹). Su ortólogo en mamíferos es la proteína Opa1 (*optic atrophy*) (¹⁴⁰) que, al igual que Mgm1, se encuentra localizada en el espacio intermembrana (¹⁴¹).

Mgm1, tal como se puede observar en la figura I-3.2.1A, presenta dos formas moleculares generadas mediante un proceso de topogénesis (¹⁴²), una isoforma de 97 kDa (l-Mgm1) y una segunda (s-Mgm1) carente de la región de anclaje a membrana, de 84 kDa. Mgm1 se sintetiza en el citosol y posteriormente se dirige hacia la mitocondria gracias a la presecuencia que presenta en su extremo N-terminal. Una vez dirigida a la mitocondria, es importada a través de la translocasa de la membrana externa, donde su primer dominio transmembrana se inserta en la proteína de membrana interna Tim23. Tras el corte de la presecuencia por la peptidasa de la matriz MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) se pueden seguir dos vías: por un lado, Mgm1 difundiría fuera del canal Tim23 y se insertaría en la membrana interna, dando lugar a la forma l-Mgm1. Otra posible vía sería la translocación de Mgm1 fuera de Tim23 por parte del motor mtHsp70 y el complejo PAM de la matriz mitocondrial, quedando el segundo segmento transmembrana inmerso en la MI (¹⁴²). Mgm1 sería entonces cortada por la proteasa de membrana Pcp1, dando lugar a la forma s-Mgm1 (^{139,141}). Opa1 presenta una variabilidad mayor con 8 isoformas fruto del procesamiento alternativo dependiente de tejido.

Si bien el modelo de topogénesis presentado por Herlan *et al.* (2004) afirma que la forma I-Mgm1 se encuentra en la membrana interna, hay ciertas discrepancias respecto a esta localización. Mientras que Fekkes *et al.* (1999) localizan Mgm1 en la membrana externa, expuesta al citosol, Sesaki *et al.* (2003) aseguran que la proteína Mgm1 se localiza en el espacio intermembrana, siendo capaz de asociarse tanto a la membrana externa como a la membrana interna (^{135,139,142}).

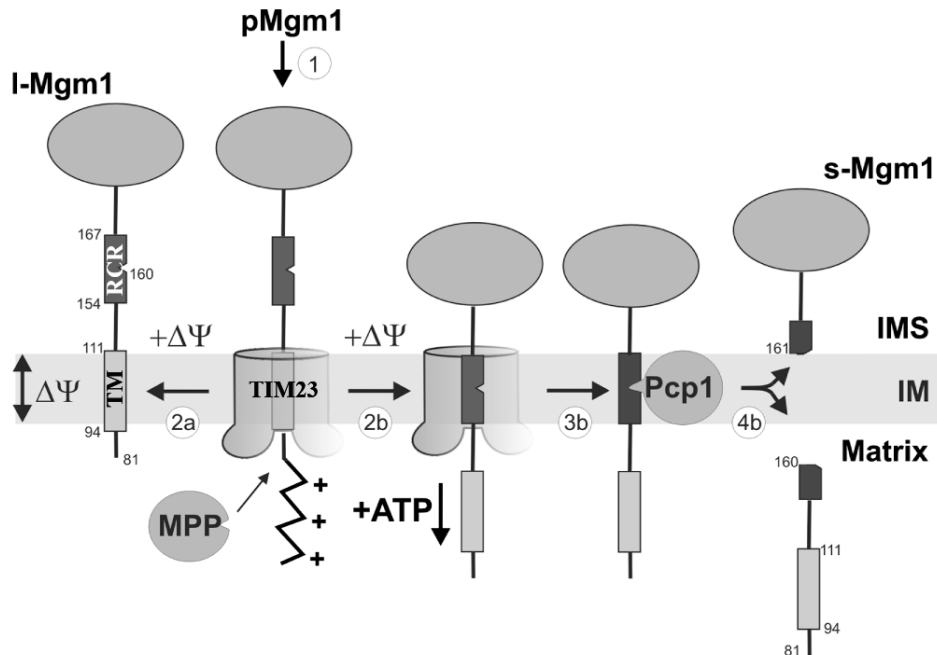


Figura I-3.2.1A: Representación esquemática del procesamiento alternativo de Mgm1 (Herlan *et al.*, 2004). Mgm1 es importada a la matriz mitocondrial a través de TIM23 (1). A continuación, la proteasa MPP elimina la presecuencia del extremo N-terminal, dando lugar a la forma I-Mgm1 (2a). Una vía alternativa es la translocación del dominio RCR (*Rhomboid Cleavage Region*) a la membrana interna (2b). Este proceso depende de la hidrofobicidad del segmento TM (transmembrana), de los niveles de ATP de la matriz y de la presencia de un motor de importación funcional. El procesamiento a través de Pcp1 lleva a la formación de s-Mgm1 (4b). IMS, espacio intermembrana; p-Mgm1, proteína precursora de Mgm1.

El hecho de que Fzo1 y Mgm1 puedan estar localizadas tanto en la membrana externa como en la membrana interna, hace pensar que ambas proteínas podrían estar asociadas a sitios de contacto, donde las membranas externa e interna se encontrarían muy próximas.

A continuación, se muestra un esquema con los componentes más relevantes, hasta el momento, de la ruta de fusión de *S. cerevisiae*.

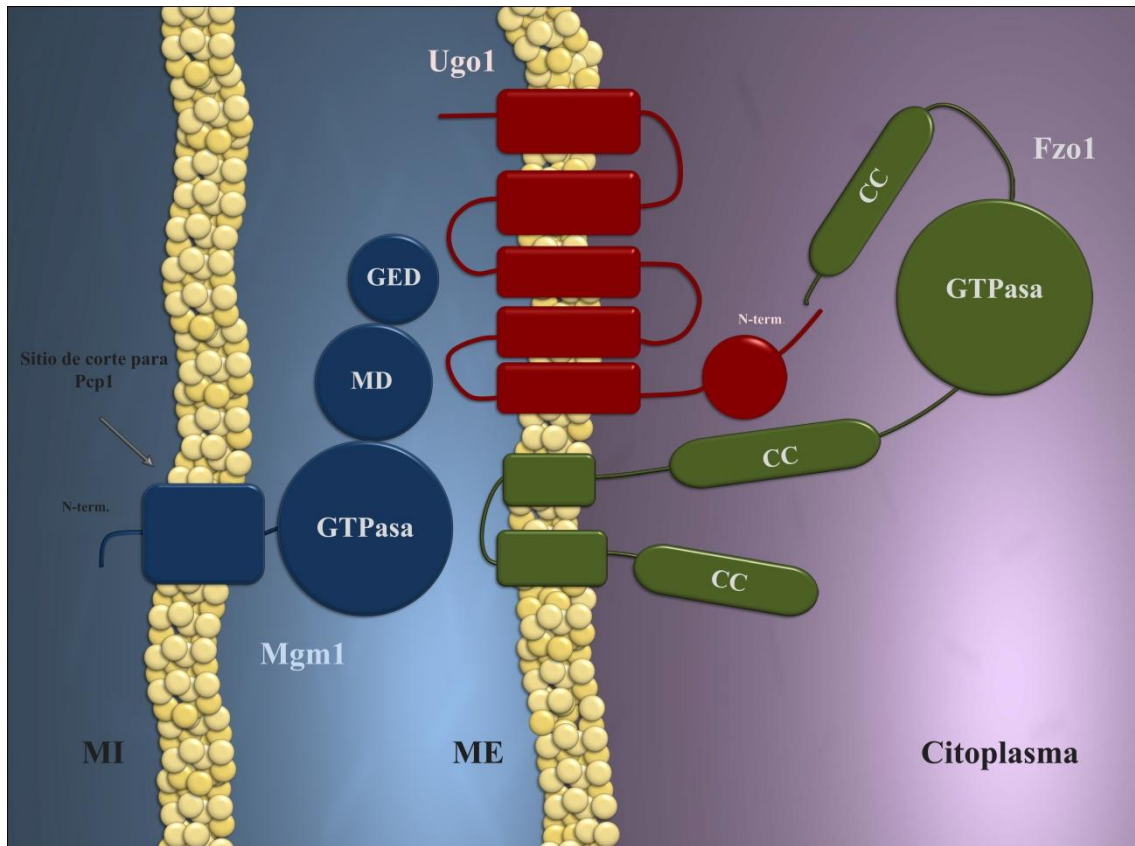


Figura I-3.2.1B: Componentes esenciales de la maquinaria molecular implicada en fusión mitocondrial en levaduras. La proteína Ugo1 se encuentra localizada en la membrana externa mitocondrial interactuando con Fzo1 a través de su dominio N-terminal y con Mgm1 a través de sus dominios expuestos hacia el espacio intermembrana. CC, *coiled coil*; GED, dominio efector GTPasa; MD, dominio intermedio, ME, membrana externa; MI, membrana interna.

3.2.2. Formación del complejo de fusión en levaduras.

Fzo1, Mgm1 y Ugo1 forman un complejo implicado en la fusión mitocondrial que conecta las membranas externa e interna. El hecho de que Ugo1 presente un dominio citoplasmático y un dominio expuesto al EIM, hace plantear la posibilidad de que Ugo1 actúe como puente entre las proteínas Mgm1 y Fzo1 (¹⁴³). Otros estudios sugieren que la interacción entre Fzo1 y Ugo1 es esencial para que la fusión pueda llevarse a cabo y que la interacción entre Mgm1 y Ugo1 no es dependiente de Fzo1 (^{136,143}).

Según diversas observaciones, la actividad GTPasa de las proteínas Fzo1 y Mgm1 no es necesaria para la formación del complejo de fusión ya que la proteína Fzo1, carente de su dominio GTPasa, es capaz de interactuar con el dominio citoplasmático de Ugo1 *in vitro*. Del mismo modo, un mutante Mgm1_{S224N} (sin actividad GTPasa), defectuoso en la ruta de fusión mitocondrial, continúa siendo capaz de interactuar con Ugo1. Fzo1 y Ugo1 son capaces de interactuar en presencia del mutante Mgm1_{S224N}, por tanto, esta interacción es independiente de la actividad GTPasa de Mgm1 (¹⁴³).

3.2.3. Modelo del mecanismo de fusión mitocondrial.

Como orgánulo delimitado por una doble membrana, la mitocondria debe enfrentarse al problema de fusionar cuatro membranas de manera coordinada. Este proceso puede dividirse en tres fases: acoplamiento, fusión de las membranas externas y fusión de las membranas internas.

El acoplamiento ocurre mediante la formación de complejos *trans* que implica a proteínas de la superficie de ambas membranas. Este paso asegura la especificidad de la fusión y media la oposición de membranas adyacentes. La proteína Fzo1, así como las mitofusinas de mamífero, juegan un papel principal en la formación de estos complejos. La ausencia de cualquiera de ellas imposibilita los procesos de fusión (¹⁴⁴). Además, el extremo C-terminal de la Mfn1 (contiene las repeticiones héptada) forma un dímero antiparalelo mediante homodimerización en *trans* (¹⁴⁵).

El segundo paso es la fusión de las membranas externas. La capacidad de homodimerización mediante apareamiento de los extremos C-terminales de Fzo1/Mfn1 es un sello indiscutible de la fusión de membranas, presente también en otras proteínas de fusión como la familia de proteínas SNARE o las proteínas virales de fusión. La formación de estos homodímeros aproxima las membranas de tal manera que puede producirse la fusión entre ambas (¹⁴⁶). Fzo1/Mfn1 poseen todos los dominios necesarios para poder llevar a cabo esta fusión: varias regiones con dominios de hélice superenrollada, dos dominios transmembrana y un dominio GTPasa capaz de proporcionar la energía necesaria para superar la barrera energética que implica la fusión de las bicapas lipídicas. Aunque no se ha demostrado si la actividad de estas proteínas es suficiente para actuar como fusógenos, sí está claro que Fzo1 y las mitofusinas juegan un papel muy importante en este proceso (^{138,147}).

Tras finalizar la fusión de las MEs, debe llevarse a cabo el mismo proceso con las MIs. La fusión de las membranas internas es un proceso muy sensible a la disipación del potencial de membrana y, desde el punto de vista funcional, independiente de la fusión de las membranas externas. Estas diferencias indican la existencia de una maquinaria de fusión para la membrana interna diferente a la existente en el caso de la ME (¹⁴⁸). Un análisis mecánico de este proceso, mediante el uso de mutantes condicionales, asigna a Mgm1 un papel principal en la fusión de la MI similar al mostrado por Fzo1 en el caso de la ME. Mgm1 tiene la capacidad de formar complejos en *trans* anclando MIs adyacentes (¹⁴⁷).

La actividad coordinada de las maquinarias de fusión de las membranas externa e interna debería asegurar la fidelidad durante los procesos de fusión de la doble membrana. El contacto físico de la maquinaria implicada en la fusión de la ME con la MI es necesaria para coordinar la fusión de la doble membrana. Dado que Ugo1 es capaz de interactuar con Mgm1 y con Fzo1, se cree que es uno de los factores indispensables en la coordinación de los procesos de fusión de ambas membranas.

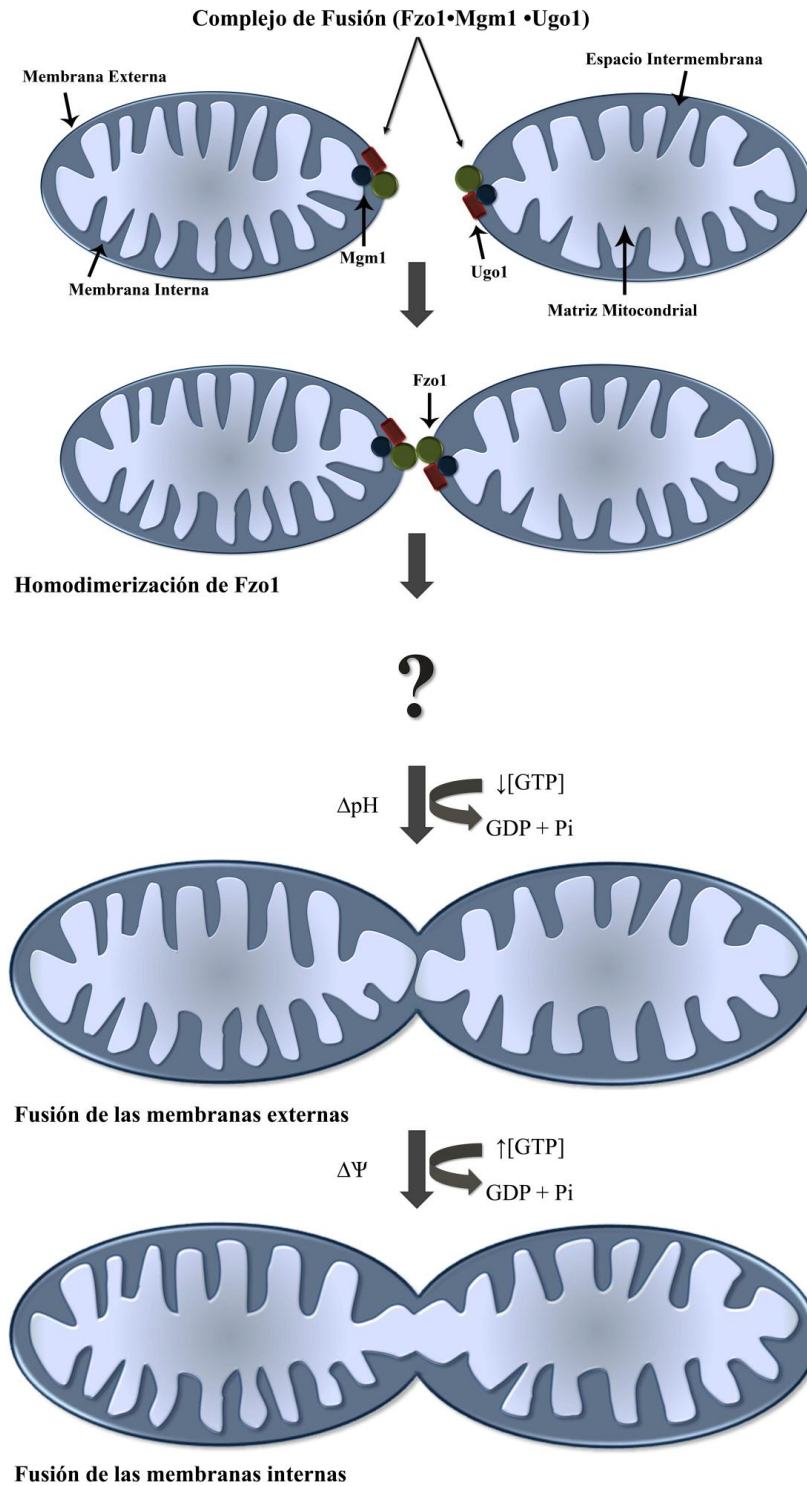


Figura I-3.2.3: Modelo de fusión mitocondrial en levaduras. El primer paso en el proceso de fusión es la formación, entre mitocondrias adyacentes, de homodímeros de Fzo1 en *trans*. A continuación tiene lugar el acoplamiento de ambos orgánulos a través del complejo Fzo1•Mgm1•Ugo1, aunque el mecanismo molecular del mismo no está claro. Posteriormente, las membranas externas se fusionan en presencia de un gradiente de protones (ΔpH) y GTP para, finalmente, producirse la fusión de las membranas internas. Para poder llevar a cabo este último paso, es necesaria la existencia de un potencial eléctrico ($\Delta \Psi$) y altos niveles de GTP.

3.2.4. Regulación de los procesos de fusión.

Mdm30 es una proteína con un peso molecular de 70 kDa que contiene un motivo *F-box* en su extremo N-terminal. Muchas proteínas que presentan este motivo son componentes del complejo SCF (*Skp1-Cdc53-F-box*), el cual media el marcaje de proteínas para su degradación por el proteasoma. Este motivo también ha sido asociado con funciones celulares como la transducción de señales y la regulación del ciclo celular (¹⁴⁹).

El mutante Δmdm30 muestra un fenotipo mitocondrial fragmentado, similar al presentado por mutantes de fusión, aunque este fenotipo se revierte cuando se bloquea la fisión mitocondrial. Estos resultados sugieren que, si bien Mdm30 es una proteína importante en el mantenimiento de la capacidad de fusión mitocondrial, su función no es esencial.

Mdm30 es capaz de regular los niveles de Fzo1, aumentando estos en mutantes Δmdm30 y disminuyendo en el caso de sobreexpresión de este gen (¹⁵⁰). Se cree, por tanto, que el papel de Mdm30 en la fusión mitocondrial se ejerce a través de la regulación de los niveles de Fzo1, mediante su marcaje para degradación por el proteasoma 26S.

En cuanto a Mgm1, se ha observado que su ruta de topogénesis se encuentra alterada en los mutantes Δpcp1 y Δups1 , presentando ambos niveles casi nulos de la forma s-Mgm1. Pcp1 es una serín-proteasa, integrada en la membrana interna y necesaria en levadura para el procesamiento de la Citocromo c peroxidasa. La pérdida de la misma causa fragmentación mitocondrial y agregación, que se revierte cuando se bloquea la fisión (¹²⁹). Las mitocondrias de cigotos carentes de Pcp1 son capaces de fusionarse, indicando que sólo l-Mgm1 es indispensable para la fusión (¹³⁷). Es posible que la forma s-Mgm1 aumente la eficiencia de la fusión o bien esté implicada en otros procesos no relacionados con la fusión, como el mantenimiento de los túbulos mitocondriales.

El mutante Δups1 presenta una disminución en los niveles de cardiolipina, un fenotipo mitocondrial aberrante caracterizado por fragmentos mitocondriales y una alteración en el procesado de la proteína Mgm1. Se ha observado que Ups1 es indispensable para el mantenimiento de la composición lipídica de la membrana interna y, por tanto, para la biogénesis de algunas proteínas mitocondriales localizadas en la misma, así como para la morfogénesis mitocondrial. Aunque por el momento no se conoce su papel concreto, entre las funciones postuladas para Ups1 se encuentran las siguientes: Ups1 podría estar implicada en la síntesis y/o degradación lipídica, en el transporte de lípidos a la membrana interna o bien en el transporte mitocondrial (¹⁵¹).

En cuanto a su papel en la morfología mitocondrial, se cree que podría actuar a través de la regulación en la topogénesis de la proteína Mgm1. En ausencia de Ups1 y

presencia de glucosa Mgm1 no es capaz de procesarse, encontrándose sólo en forma de l-Mgm1. Por el momento, no está claro el papel que juega Ups1 en el procesamiento de Mgm1, se plantea la posibilidad de que actúe como chaperona de Mgm1 permitiendo su procesamiento, aunque también podría actuar controlando los niveles de cardiolipina, influir sobre el sistema de importación Tim o sobre el balance energético de la mitocondria (¹⁵¹).

Ups1 es una proteína del espacio intermembrana asociada en un 50% al lado externo de la membrana mitocondrial interna. Poco se sabe de la estructura de Ups1, salvo que los primeros 80 residuos de esta proteína son imprescindibles para su localización mitocondrial. Debido a su ubicación en el espacio intermembrana, sería de esperar que contuviera una secuencia bipartita (presencia + *sorting signal*) o motivos de cisteína que posibilitaran dicha localización (^{151,152}) pero, por el momento, no se ha identificado ninguna secuencia responsable de la misma.

Recientemente, se ha publicado que Ups1 es importada a la mitocondria a través de un novedoso mecanismo que implica a la proteína Mdm35 (^{152,153}). En primer lugar, Ups1 se sintetiza en el citoplasma donde puede interactuar con los receptores del complejo Tom, Tom20 y Tom22; una vez producida esta interacción, Ups1 sería translocada al espacio intermembrana formando, durante o tras este proceso, un complejo con Mdm35. Aunque Mdm35 podría participar mejorando esta translocación, no es un factor limitante ni esencial para la misma. La importancia del papel de Mdm35 no está clara, mientras Potting *et al.* (2010) mantienen que en ausencia de Mdm35, Ups1 sería rápidamente degradada por las proteasa Yme1 y Atp23, Tamura *et al* (2010) no observan esta degradación y afirman que Ups1 se acumularía en el espacio intermembrana de forma estable, si bien es cierto que en niveles reducidos (^{152,153}).

3.3. Fisión mitocondrial.

3.3.1. Componentes de la ruta de fisión mitocondrial.

En levaduras, el núcleo de la maquinaria implicada en fisión mitocondrial está formado por cuatro proteínas: Fis1 en la membrana externa y tres proteínas citosólicas: Dnm1, Mdv1 y Caf4 que se acumulan en aquellos puntos de la superficie mitocondrial donde tiene lugar la fisión. Las células con defectos en componentes de esta ruta son incapaces de llevar a cabo la fisión de la membrana externa y, por tanto, presentan una red mitocondrial interconectada y compleja, debido a que los procesos de fusión no se encuentran contrarrestados por los de fisión (^{154,155}).

Dnm1 es una proteína relacionada con las dinaminas que contiene un dominio GTPasa en su extremo N-terminal, un dominio intermedio, una región hidrofílica llamada inserto B, de función desconocida, y un dominio efector de la GTPasa (GED) en su extremo C-terminal. Aunque Dnm1 se comporta como una proteína soluble en

estudios bioquímicos de fraccionamiento, puede acumularse en estructuras puntuales en la superficie de las mitocondrias (¹⁵⁶), indicando que la asociación de Dnm1 con las mitocondrias es lábil y/o dinámica.

Experimentos *in vitro* han demostrado que Dnm1 es capaz de hidrolizar GTP y ensayos con mutantes indican que su actividad GTPasa es esencial para la fisión de mitocondrias *in vivo* (^{157,158}). Dnm1 es capaz de interactuar consigo misma, mediante homo-oligomerización, gracias, en parte, a su dominio GED (¹⁵⁹).

La proteína integral de membrana Fis1 (muy conservada evolutivamente) juega un papel muy importante en la fisión mitocondrial. Fis1 es una proteína anclada a la membrana externa a través de su extremo C-terminal y con su extremo N-terminal expuesto hacia el citoplasma (¹⁶⁰). Su dominio citosólico N-terminal está formado por un brazo N-terminal y un *array* de 6 α -hélices antiparalelas. Las 6 α -hélices forman un motivo estructural TPR (*tetratricopeptide repeat*), el cual contiene una superficie cóncava con carácter hidrofóbico que podría actuar como bolsillo de unión (¹⁶¹).

Al contrario que Dnm1, Fis se encuentra distribuido de manera uniforme sobre la superficie mitocondrial. Un mutante $\Delta fis1$ carente de su segmento transmembrana se encuentra localizado en el citoplasma y es incapaz de mediar en la fisión (¹⁶⁰).

El tercer componente de la maquinaria de fisión es Mdv1. Mdv1 contiene una extensión N-terminal (NTE), uno o dos dominios de hélice superenrollada en la mitad N-terminal y siete repeticiones WD40, con una posible estructura de hélice β en su extremo C-terminal. Tanto los dominios de hélice superenrollada como las repeticiones WD40 podrían estar implicados en la interacción proteína-proteína. Diversos experimentos han demostrado que Mdv1 es capaz de oligomerizar interactuando consigo misma a través de los dominios de hélice superenrollada. El dominio NTE contiene dos α -hélices y está implicado en la interacción con Fis1, mientras que el dominio WD40 sería el responsable de la interacción con Dnm1 (¹⁶²).

La mayor parte de la proteína Mdv1 presente en la célula se encuentra estrechamente asociada con la cara citoplasmática de la membrana externa y, al igual que hace Dnm1, se localiza en estructuras puntuales uniformemente distribuidas por la célula (¹⁶³).

El último componente de esta ruta es la proteína Caf4. Al igual que hace Mdv1, Caf4 es capaz de interactuar con Fis1 y presenta una estructura muy similar con un dominio NTE, un dominio de hélice superenrollada y siete repeticiones WD en el extremo C-terminal. Pese a que un mutante $\Delta caf4$ no tiene un fenotipo obvio en cuanto a la morfología mitocondrial, un doble mutante $\Delta mdv1/\Delta caf4$ presenta un fenotipo aberrante indistinguible del fenotipo propio de un mutante $\Delta dnm1/\Delta fis1$. Esto sugiere que en el mutante $\Delta mdv1$ aún queda cierta capacidad residual de fusión, llevada a cabo por Caf4.

Al igual que Mdv1, Caf4 se localiza en la membrana externa de forma dependiente de Fis1. La formación de las estructuras puntuales por parte de la proteína Dnm1 se pierde completamente en los mutantes $\Delta caf4/\Delta mdv1$, por tanto, estas proteínas podrían colaborar en el reclutamiento de Dnm1 en estructuras puntuales sobre la mitocondria (¹⁶⁴).

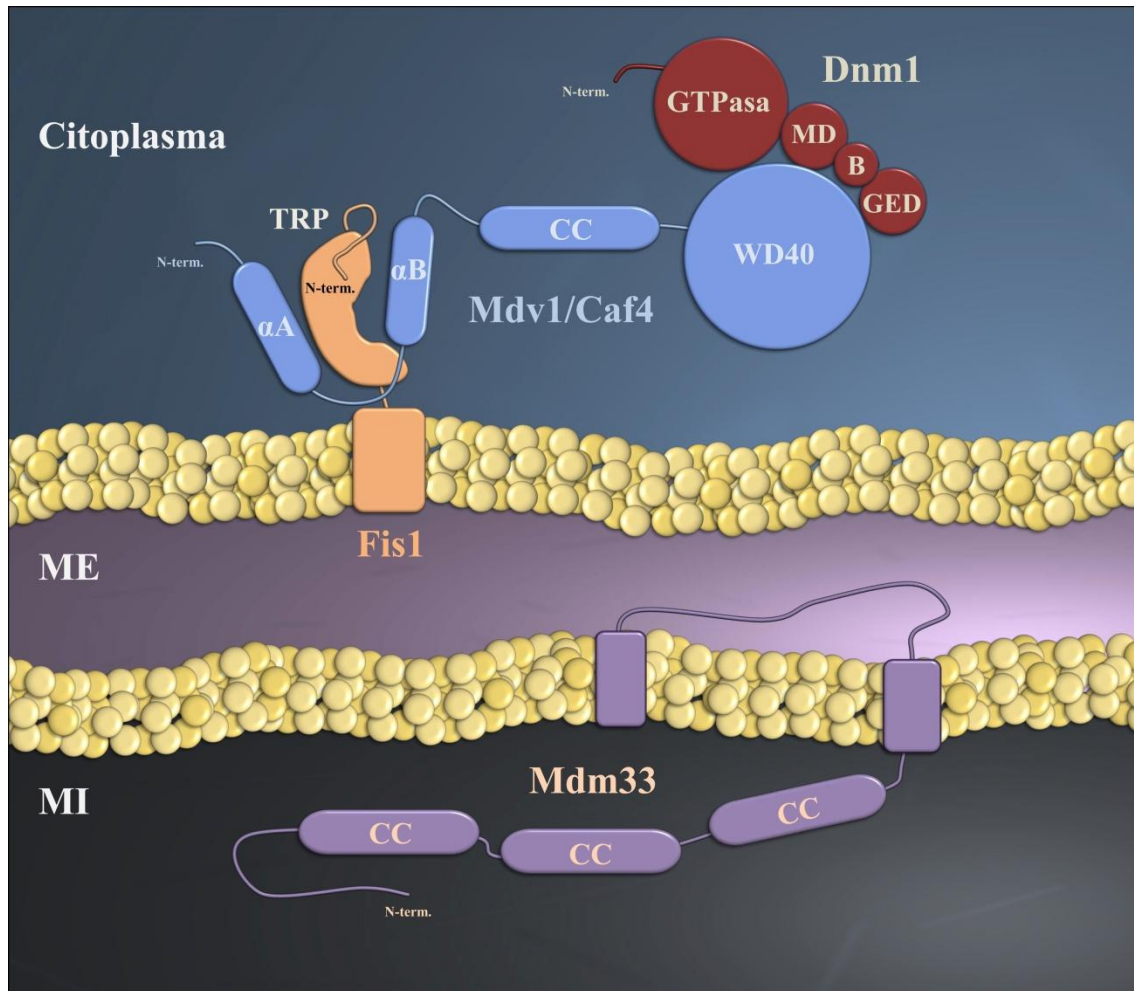


Figura I-3.3.1: Representación de los componentes de la maquinaria molecular implicada en fisión mitocondrial en *S.cerevisiae*. Mdv1 y Caf4 presentan la misma organización estructural y ejercen funciones redundantes como adaptadores de las proteínas Dnm1 y Fis1. Sus dominios CC son los encargados de su homo-oligomerización. Dnm1 forma oligómeros que se ensamblan en forma de espiral alrededor de la mitocondria, permitiendo la fisión de las membranas mitocondriales. αA y αB , α -hélices del extremo N-terminal de Mdv1/Caf4; B, inserto B; CC, *coiled coil*; GED, Dominio efector GTPasa; MD, dominio intermedio; ME, membrana externa; MI, membrana interna; TPR, *tetratricopeptide tandem repeats*.

3.3.2. Modelos para el mecanismo de fisión mitocondrial.

Se han propuesto dos modelos para el mecanismo de fisión mitocondrial en levaduras. En el primer modelo, Dnm1 se une y separa en puntos concretos sobre la

superficie mitocondrial gracias a su capacidad de homo-oligomerización, formando anillos alrededor del túbulo mitocondrial de manera dependiente de Mdv/Caf41 (^{165,166}). En este modelo, la localización mitocondrial de Dnm1 sería dependiente de su interacción directa con Fis1. Del mismo modo, Mdv1/Caf4 estarían asociadas a las mitocondrias gracias a su interacción con Fis1 a través de su dominio NTE. Tras la homo-oligomerización de Dnm1 en la proximidad de la mitocondria, el dominio WD40 de Mdv1/Caf4 mediaría la incorporación del complejo multimérico Dnm1 al complejo Fis1-Mdv1/Caf4 ya anclado a la membrana. Tras su incorporación, Mdv1/Caf4 activaría de alguna manera al complejo, provocando la constricción de la membrana o procesos de remodelación de los lípidos, mediante algún mecanismo aún desconocido.

El segundo modelo es muy similar al primero, salvo que propone que la unión de Dnm1 en puntos concretos sobre la superficie de la mitocondria no dependería de Fis1 y Mdv1/Caf4, sino que el complejo multimérico Dnm1 sería el que reclutaría a Mdv1 y a Fis1 en una estructura anular que, posteriormente, catalizaría la reacción (¹⁵⁸).

En ambos modelos Dnm1 sería el elemento clave en la escisión de la membrana. La homo-oligomerización de Dnm1 tendría lugar formando filamentos o espirales extendidas, rodeando completamente los túbulos mitocondriales. Dado que la curvatura de los filamentos dependería de la unión de los mismos a GTP, la hidrólisis de éste podría, en último lugar, provocar la constricción y escisión de las membranas mitocondriales (^{147,167}).

Se sabe mucho menos sobre la fisión de la membrana interna. Es concebible que la actividad de Dnm1 sea suficiente para provocar la escisión de ambas membranas simultáneamente, aunque hay determinadas evidencias que sugieren mecanismos diferentes para ambas membranas. En primer lugar el diámetro de un túbulo mitocondrial es de 300-400 nm, mientras que los diámetros de las espirales de Dnm1 son sólo de unos 100 nm (¹⁶⁷), aunque el diámetro del túbulo en los puntos de fisión podría estar significativamente disminuido para permitir la formación de las espirales de Dnm1. Además, se ha observado que el ensamblaje de Dnm1 sobre la superficie mitocondrial conlleva una división exitosa solo cuando coincide con un lugar donde ya ha tenido lugar una constricción. Es posible que estas constricciones sean el resultado de una división previa de la membrana interna en ese punto (¹⁶⁸).

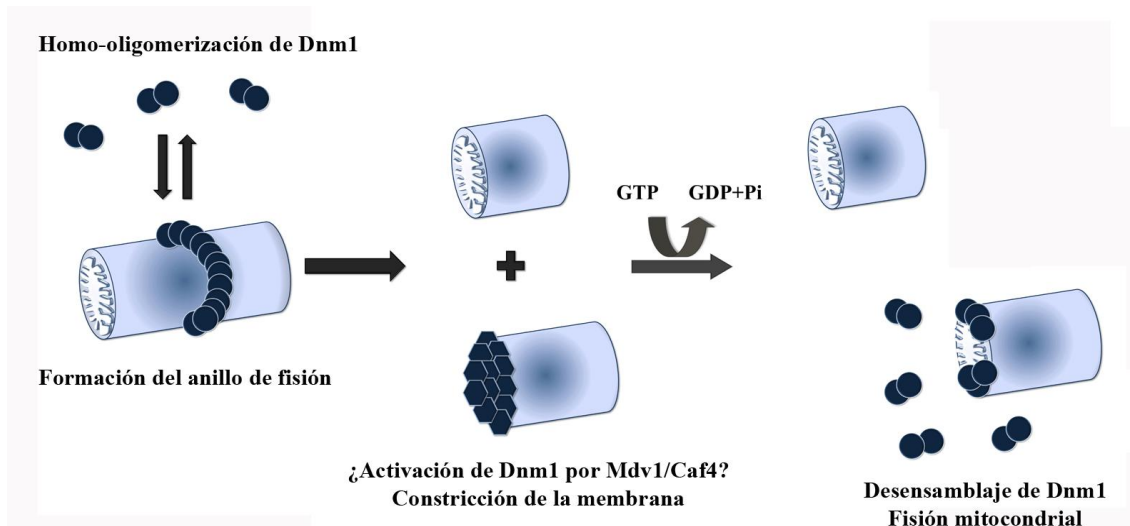


Figura I-3.3.2: Modelo de fisión mitocondrial mediada por Dnm1 en *S. cerevisiae*. La homo-oligomerización y ensamblaje de Dnm1 permiten la formación de un anillo de fisión alrededor del túbulo mitocondrial. A continuación, Dnm1 posiblemente sufre un cambio conformacional que lleva a la constricción de la membrana. Finalmente, tiene lugar el desensamblaje de Dnm1.

3.4. Tubulación mitocondrial en levaduras.

3.4.1. El complejo MMM.

Las proteínas que componen esta ruta han sido identificadas en hongos pero no en eucariotas superiores. En *S. cerevisiae*, la formación de los túbulos mitocondriales requiere de la presencia de las proteínas Mmm1, Mdm10 y Mdm12 (complejo MMM).

Mmm1 (*Maintenance of Mitochondrial Morphology*) es una proteína integral de membrana con un tamaño de 49 kDa con un único dominio transmembrana. Mmm1 abarca ambas membranas, con su extremo N-terminal expuesto al citoplasma y el extremo C-terminal hacia la matriz mitocondrial (¹⁶⁹).

Mutaciones en el gen *MMM1* alteran la morfología mitocondrial y la estructura de las crestas mitocondriales de tal manera que, en lugar de redes, las mitocondrias se organizan en grandes esferas. Concomitante con este cambio, los nucleoides de mtDNA se desorganizan, provocando una inestabilidad en el mtDNA severa (¹⁷⁰). Estudios adicionales sugieren que la proteína Mmm1 media la herencia del mtDNA a través de una interacción directa o indirecta con el citoesqueleto de actina (¹⁷¹).

Un segundo componente de esta ruta es Mdm10, una proteína de 56 kDa conservada en hongos pero que no está presente en eucariotas superiores. Mdm10 se encuentra insertada en la membrana externa y presenta una estructura de barril- β . Al igual que sucede con los mutantes $\Delta mmm1$, la pérdida de la función llevada a cabo por Mdm10

causa defectos en la forma, herencia, movilidad, interacciones con el citoesqueleto de actina, estabilidad del mtDNA y un incremento en la pérdida de mtDNA hacia el núcleo (¹⁷²).

El último componente de esta ruta es Mdm12, proteína integrada en la membrana externa con un tamaño de 31 kDa. La pérdida del gen *MDM12* provoca un fenotipo muy similar a aquel visto en los mutantes $\Delta mmm1$ y $\Delta mdm10$. Mdm12 presenta en su extremo N-terminal un segmento transmembrana y una región C-terminal similar a la de Mmm1. Mdm12, al igual que Mdm10 y Mmm1, se localiza en zonas de la mitocondria adyacentes a los nucleoides de mtDNA (¹⁷³).

La localización de Mmm1 en las mitocondrias depende de la presencia de Mdm12 y Mdm10, así mismo, Mdm12 no puede asociarse a la mitocondria en ausencia de Mmm1 y Mdm10. Por el contrario, Mdm10 no necesita la presencia del resto de componentes de la ruta de tubulación para poder localizarse en la mitocondria.

3.4.2. Modelos para la función del complejo MMM (Mmm1, Mdm10, Mdm12).

Existe una gran controversia respecto al modo por el cual el complejo MMM es capaz de llevar a cabo la tubulación de las mitocondrias. Se ha planteado la posibilidad de que el complejo MMM medie la interacción de las mitocondrias con el citoesqueleto en *S. cerevisiae* o con los microtúbulos en *N. crassa*. En respuesta a esta hipótesis, estudios en *N. crassa* han demostrado que las mitocondrias son capaces de seguir interaccionando con los microtúbulos en ausencia del complejo MMM. Por tanto, si la interacción de las mitocondrias con los microtúbulos/citoesqueleto fuera a través del complejo MMM, ésta no sería esencial para el transporte de las mitocondrias (¹⁷⁴).

¿Es la unión de la actina a las mitocondrias indispensable para que el complejo MMM pueda mediar la tubulación? La disrupción de los filamentos de actina no provoca el mismo fenotipo mitocondrial que un mutante Δmmm , es decir, la formación de mitocondrias esféricas (¹⁷¹). Por tanto, parece poco probable que la formación de túbulos se deba solo a la interacción con la actina. No se excluye la posibilidad de que el complejo MMM pueda interaccionar con otras estructuras celulares para generar los túbulos mitocondriales. También es posible que el complejo MMM organice una especie de andamio sobre la superficie de las mitocondrias capaz de estabilizar y/o mantener la morfología mitocondrial.

Estudios recientes sugieren que Mmm1 es capaz de abarcar ambas membranas, con su extremo N-terminal expuesto hacia la matriz. Esta capacidad sería imprescindible para que Mmm1 pudiera acumularse en zonas concretas (¹⁷⁵). Curiosamente, estas zonas son adyacentes a estructuras puntuales que contienen Mgm10, una proteína soluble que se une a DNA e indispensable en el mantenimiento del mtDNA (¹⁷⁶). Tras estas

observaciones, se plantea la posibilidad de que el complejo MMM abarque la membrana externa e interna en los sitios de contacto entre ambas membranas y ancle a estos sitios el mtDNA que se está replicando activamente.

3.5. Enfermedades, apoptosis y mitocondrias.

La mayor parte de los estudios llevados a cabo sobre la dinámica mitocondrial y las proteínas implicadas en la misma han tenido lugar en *S. cerevisiae*, aunque el número de publicaciones sobre estudios realizados en mamíferos se está incrementando notablemente. Estos trabajos han permitido poner de manifiesto la relación entre los defectos en la dinámica mitocondrial, los desórdenes neurológicos y los procesos de apoptosis.

3.5.1. Desórdenes neurológicos: Neuropatía de tipo 2A (Charcot-Marie-Tooth, CMT2A).

En humanos existen dos homólogos de la proteína Fzo1 de levaduras, Mfn1 y Mfn2. Varias mutaciones en el gen *MFN2* han sido identificadas en pacientes afectados por la CMT2A (¹⁷⁷). La neuropatía de tipo 2A es la más común de las neuropatías periféricas heredadas, con una prevalencia 1:2500. Clínicamente se caracteriza por debilidad y atrofia de la musculatura distal, ausencia o reducción de los reflejos, pérdida de sensibilidad y deformación de los pies.

La mayor parte de las mutaciones encontradas en estos pacientes se encuentra en los dominios GTPasa y de hélice superenrollada (¹⁷⁸). Ya que la mutación en estos residuos impide que Mfn2 pueda llevar a cabo su función, se ha establecido una relación entre la ausencia de función de la proteína Mfn2 (defectos en la fusión mitocondrial) y la CMT2A. Aunque no está clara la patofisiología de la CMT2A ligada al mutante $\Delta mfn2$, se ha planteado la posibilidad de que defectos en la función de Mfn2 pudieran estar relacionados con una menor producción de ATP mitocondrial, lo que produciría un impacto en procesos con altos requerimientos energéticos como es el caso del transporte de vesículas. Un dato curioso es la reducción de movilidad mitocondrial en fibroblastos de ratón mutantes para esta proteína, planteando la posibilidad de que cambios en la morfología mitocondrial provocados por mutaciones en el gen *MFN2* afecten al transporte de dichos orgánulos.

3.5.2. Disfunción mitocondrial y enfermedades neurodegenerativas: Atrofia óptica (ADOA, Autosomal Dominant Optic Atrophy).

La ADOA es la más común de las neuropatías ópticas hereditarias, con una frecuencia comprendida entre 1:12.000 y 1:50.000. Esta enfermedad afecta a las células ganglionales de la retina provocando, en última instancia, la atrofia del nervio óptico.

Los pacientes, niños o adolescentes, se caracterizan por presentar una reducción en la agudeza visual, palidez en el disco óptico temporal y una visión en color alterada (^{140,179,180}).

Se han descrito cuatro loci asociados a esta enfermedad: OPA1, OPA2, OPA3 y OPA4, siendo el más común OPA1. El gen *OPA1* está formado por 28 exones que codifican para 8 mRNAs diferentes mediante procesamiento alternativo. Hasta el momento se han identificado 96 mutaciones diferentes en el gen *OPA1*, correspondiendo el 66%, 29% y 5% a sustituciones, deleciones e inserciones, respectivamente. La mayoría de estas mutaciones se encuentran en el dominio GTPasa y en la región 3', describiéndose muy pocas en la región 5' de la proteína (¹⁸¹), y se caracterizan por una reducción o desaparición de los procesos de fusión mitocondrial. La pérdida de funcionalidad de Opa1 se muestra a nivel fenotípico por un incremento en la fragmentación mitocondrial así como por un aumento de los episodios espontáneos de apoptosis.

No existe una correlación obvia entre el genotipo y el fenotipo de esta enfermedad, lo que sugiere que otros factores ambientales y genéticos sean también importantes en el desarrollo de la misma. Así mismo, el análisis del rango de mutaciones parece indicar la existencia de más de un mecanismo patogénico en la ADOA (^{182,183}).

Tanto el mRNA como la proteína Opa1 se encuentran distribuidos de forma ubícua, por lo que, por el momento, se desconoce la razón por la cual estas mutaciones afectan específicamente a las células ganglionales de la retina. Si bien recientemente se ha descrito que éstas no son las únicas células afectadas, ya que la mutación R445H en Opa1 (dominio GTPasa) está también relacionada con la pérdida de audición debido a la degradación del nervio auditivo, presentando las mitocondrias de estas células un fenotipo anómalo caracterizado por una alta fragmentación (¹⁸⁴).

3.5.3. Dinámica mitocondrial y muerte celular programada.

Durante los estadios tempranos de la vía intrínseca de apoptosis, la activación de proteínas proapoptóticas produce poros en la membrana externa de las mitocondrias, permitiendo la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana. Entre estas proteínas se encuentran el citocromo c, Smac/DIABLO y el factor inductor de la apoptosis AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*). Una vez liberadas al citoplasma, activan el apoptosoma, desencadenando las últimas fases de la apoptosis (¹⁸⁵).

Además de los cambios en la permeabilidad de la membrana externa, se han descrito modificaciones en la morfología mitocondrial durante la apoptosis. Por ejemplo, se ha observado una fragmentación mitocondrial en células HeLa y COS-7 al sobreexpresar el factor pro-apoptótico Bax o al tratar las células con estaurosporina (¹⁸⁶).

Estos cambios en la morfología ocurren antes de la liberación del citocromo c, son caspasa independientes y no pueden ser bloqueados mediante la sobreexpresión del factor antiapoptótico Bcl-2. Por tanto, las mitocondrias se fragmentarían durante los estadios tempranos de la apoptosis (¹⁸⁶).

Drp1 (Dnm1 en levaduras) puede actuar como factor tanto proapoptótico como antiapoptótico, dependiendo de la naturaleza de la vía de muerte celular (^{187,188}). La sobreexpresión de la proteína hFis1 induce fragmentación mitocondrial, liberación del citocromo c y activación de muerte celular en ausencia de estímulos apoptóticos (¹⁸⁹), aunque no está claro el mecanismo por el que hFis1 ejerce este efecto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

La señalización por glucosa en la levadura *S. cerevisiae* es un mecanismo muy complejo estudiado a lo largo de muchos años con gran profundidad, pero en el que aún existen ciertas lagunas. Si bien el papel de proteínas indispensables en la regulación por glucosa, como Mig1, Hxk2 y Snf1, ha sido ampliamente estudiado, la función de otros componentes como el represor transcripcional Mig2 continúa siendo poco conocida.

Por ello, a lo largo de este trabajo nos propusimos ahondar en el papel que Mig2 juega en los mecanismos de represión por glucosa de *S. cerevisiae*. Para conseguir dicho objetivo, utilizaremos como modelo el sistema de represión del gen *SUC2*.

La función de multitud de represores transcripcionales se encuentra regulada a través de una doble localización núcleo-citosólica. Dicha distribución está controlada y modulada mediante un complejo sistema de transporte a través de estructuras conocidas como complejos del poro nuclear, y es llevada a cabo por la familia de las Carioferinas. Dada la importancia de una correcta distribución de Mig2 para poder realizar su función de forma óptima, nos planteamos el estudio de los mecanismos que regulan dicha distribución.

Finalmente, intentaremos determinar si la proteína Mig2 realiza otras funciones en la célula, a parte de su papel como modulador de Mig1 en la represión por glucosa.

Para llevar a cabo este trabajo, nos proponemos los objetivos enumerados a continuación:

1. Caracterizar tanto la expresión y distribución de la proteína Mig2 como los factores implicados en la regulación de la misma.
2. Analizar el papel concreto de la fracción nuclear de Mig2 en la represión por glucosa del gen *SUC2*, así como los elementos necesarios para que ésta pueda llevarse a cabo.
3. Identificar las vías de importación y exportación de Mig2 implicadas en la correcta distribución de la proteína y determinar, si es posible, los dominios de la proteína implicados en el transporte.
4. Analizar si Mig2 lleva a cabo otras funciones en la célula, ajenas a su papel como modulador de la función del represor Mig1.
5. Si se confirmara el punto 4, identificar y estudiar los mecanismos reguladores de dicha función.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Microorganismos utilizados.

1.1. Bacterias.

Nombre	Genotipo
BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsS_B</i> (<i>r_B</i> , <i>m_B</i>), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3), pLysS, Cm ^r .
DH5α	F ⁻ ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hdsR17</i> (<i>r_k</i> - <i>r_k</i>) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>deoR</i> Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>)U169.
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hdsR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , F', <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> Δ M15, Tn10 tet ^R .

1.2. Levaduras.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas durante el desarrollo de esta investigación fueron:

Nombre	Genotipo	Origen
W303.1A	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> .	[¹⁹⁰]
BY4742	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0.	[¹⁹¹]
DBY2052	<i>MATa</i> ; <i>hxx1::LEU2</i> ; <i>hxx2-202</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3,2-112</i> ; <i>lys2-801</i> ; <i>gal2</i> .	[¹⁶]
FMY303	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>SNF1::6HA</i> .	[³⁰]
FMY303R-01	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>XPO1::3HA</i> .	[²⁶]
FMY403	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>SNF4::6HA</i> .	Tesis Doctoral A. Riera
FMY501	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>MIG2::GFP</i> .	Este trabajo
FMY502	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>UPS1::GFP</i> .	Este trabajo
FMY503	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> ; <i>leu2</i> ; <i>lys2</i> ; <i>trp1</i> ; <i>ura3</i> ; <i>UPS1-myc-TRP</i> ; <i>MIG2::GFP</i> .	Este trabajo
FMY504	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> ; <i>leu2</i> ; <i>lys2</i> ; <i>trp1</i> ; <i>ura3</i> ; <i>UPS1-myc-TRP</i> ; <i>mig2::kanMX4</i> .	Este trabajo

FMY505	<i>MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0 dnm1::kanMX4; mig2::HIS3.</i>	Este trabajo
FMY506	<i>MATa; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0 fzo1::kanMX4; mig2::HIS3.</i>	Este trabajo
FMY507	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY508	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; snf1::kanMX4 MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY509	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; hvk2::kanMX4; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY510	<i>MATa; his3; leu2; lys2; trp1; ura3; ups1::kanMX4; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY511	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; mig2::kanMX4.</i>	Este trabajo
FMY512	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; mig2::kanMX4; ups1::HIS3.</i>	Este trabajo
FMY513	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; mig2::kanMX4; promMIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY514	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom1MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY515	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom2MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY516	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom3MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY517	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; prom1MIG2:: URA3.</i>	Este trabajo
FMY518	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; prom2MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY519	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; prom3MIG2:: URA3.</i>	Este trabajo
FMY520	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; mig2::kanMX4; prom1MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY521.A	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; mig2::kanMX4; prom2MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY522.A	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trpl-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; mig2::kanMX4; prom3MIG2::URA3.</i>	Este trabajo
FMY523.A	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; MIG2_{NLS1}::GFP.</i>	Este trabajo
FMY524	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; MIG2_{NLS2}::GFP.</i>	Este trabajo

FMY525	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; MIG2_{NLS1}::GFP.</i>	Este trabajo
FMY526	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-J; ura3-1; migl-6J::LEU2; MIG2_{NLS2}::GFP.</i>	Este trabajo
FMY527	<i>MATa; ade2-1; ura3-1; his3-11,15; trp1-1; leu2-3,112; can1-100; kap95::HIS3; pSW509/pkap95-L63A; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY528	<i>MATa; ade2-1; ura3-1; his3-11,15; trp⁶³; leu2-3,112; can1-100; srp1-31; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY529	<i>MATa; trp1-1; his3-1; ura3-1; ade2-1; leu2-3; cans1-100; xpo1Δ::LEU2; MIG2::GFP [pKW457-HIS3,xpo1-1].</i>	Este trabajo
FMY530	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; XPO1::3HA; MIG2::GFP.</i>	Este trabajo
FMY534	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; tetOx200::URA3; tetR-GFP::LEU2; UPS1-myc-TRP.</i>	Este trabajo
FMY535	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; msn5::kanMX4; MIG2::GFP</i>	Este trabajo
FMY536	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; MIG2_{NES1}::GFP.</i>	Este trabajo
FMY537	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; MIG2_{NES2}::GFP.</i>	Este trabajo
FMY833	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; GAL83::6HA.</i>	Tesis Doctoral A. Riera
H174	<i>MATa; ade2-1; canJ-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-J; ura3-1; migl-6J::LEU2.</i>	[⁴¹]
JCY1407	<i>MATa; ade2-1; ura3-1; his3-11,15; trp1-1; leu2-3,112; can1-100; kap95::HIS3; pSW509/pkap95-L63A.</i>	[¹⁹²]
JCY1410	<i>MATa; ade2-1; ura3-1; his3-11,15; trp⁶³; leu2-3,112; can1-100; srp1-31.</i>	[¹⁹³]
KW121	<i>MATa; trp1-1; his3-1; ura3-1; ade2-1; leu2-3; cans1-100 xpo1Δ::LEU2 [pKW457-HIS3,xpo1-1].</i>	[¹⁹⁴]
MAP24	<i>MATa; mig1::loxp mig2::loxp-KAN-lox; can1-100; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura 3-1.</i>	[¹⁹⁵]
TetR-GFP	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; tetOx200::URA3; tetR-GFP::LEU2.</i>	[¹⁹⁶]
YRJ2012	<i>MATa; his3; leu2; lys2; trp1; ura3; UPS1-myc-TRP.</i>	[¹⁵¹]
YRJ2011	<i>MATa; his3; leu2; lys2; trp1; ura3; ups1::kanMX4.</i>	[¹⁵¹]
Y01489	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; dnm1::kanMX4.</i>	Euroscarf
Y03319	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; fzo1::kanMX4.</i>	Euroscarf
Y03694	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; msn5::kanMX4.</i>	Euroscarf

Y04620	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; hxx2::kanMX4.</i>	Euroscarf
Y14311	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; snf1::kanMX4.</i>	Euroscarf
Y14575	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; mig2::kanMX4.</i>	Euroscarf
Y187	<i>MATa; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3,112; gal4Δ; gal80Δ; URA3::GALIUAS-GALITATA-lacZ.</i>	Clontech

2. Medios y condiciones de cultivo.

2.1. Bacterias.

Para el crecimiento de las bacterias se empleó medio LB, que consta de triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 0,5%. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar al 2%. En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, se adicionó el correspondiente antibiótico, ampicilina (100 mg/l) o kanamicina (50 mg/l). La esterilización se realizó en autoclave durante 20 minutos.

El crecimiento de las células en medio sólido se llevó a cabo en placas *Petri* en una estufa de incubación a 37°C. Las incubaciones en medio líquido se realizaron en un agitador circular a 200 rpm y 37°C en matraces *Erlenmeyer* de tal manera que el volumen no fuera superior al 20% del recipiente, con el fin de permitir una buena aireación. El crecimiento celular se determinó midiendo la turbidez del cultivo a una D.O. de 600 nm.

2.2. Levaduras.

Los medios utilizados para su cultivo fueron los siguientes:

- **YEP:** medio complejo cuya composición incluye extracto de levadura al 1% y peptona al 2%, suplementado con glucosa al 4% (YEPD), etanol al 3% y glucosa 0,05% (YEPE) o glicerol al 3% (YEPG) como fuentes de carbono. A lo largo de todo este trabajo nos referiremos a la glucosa 4% como alta glucosa y al YEPE o YEPG como baja glucosa.

- **SC:** medio sintético mineral con base de nitrógeno con sulfato amónico sin aminoácidos (YNB w/o aminoacids) al 0,69% y glucosa al 4% (SCD), etanol al 3% y glucosa 0,05% (SCE) o glicerol al 3% (SCG). Durante el trabajo, también mantendremos la nomenclatura de alta y baja glucosa para los medios SC. Estos medios se suplementaron con los aminoácidos necesarios para el crecimiento de las levaduras, excepto aquellos utilizados como marcadores.

En todos los casos, se prepararon los medios sólidos adicionando agar al 2% y se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos. El crecimiento de las células en medio sólido se llevó a cabo en placas *Petri* incubadas en una estufa a 28°C o 22°C en el caso de mutantes termosensibles. En medio líquido, las células se crecieron en matraces *Erlenmeyer* conteniendo el medio correspondiente en un volumen no superior al 20% del recipiente, con el fin de conseguir una buena aireación. Las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador circular a 22°C, 28°C o 37°C y 200 rpm. El crecimiento celular se determinó midiendo la turbidez del cultivo a una D.O. de 600 nm.

En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, diferente a las auxotrofías clásicas, se utilizó el antibiótico geneticina en una concentración 200 mg/l.

3. Vectores de clonación, construcciones de DNA y oligodesoxinucleótidos.

3.1. Vectores de clonación.

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

- **PA179-6HA-TRP1**. Plásmido empleado para generar mediante PCR un casete para etiquetar el extremo C-terminal de un gen con seis epítomos HA. Lleva el gen *TRP1* como marcador de selección. Cedido por Paula Alepuz.

- **pFa6a-GFP(S65T)-KanMX6**. Plásmido empleado para generar por PCR un casete para etiquetar el extremo C-terminal de un gen con GFP. Este vector porta un origen de replicación para *E.coli* junto con el marcador de resistencia a ampicilina. Presenta un sitio de clonación múltiple en el que se introdujo el gen de resistencia a geneticina bajo el control de un promotor fúngico (¹⁹⁷).

- **pFa6a-GFP(S65T)-HIS3MX6**. Plásmido empleado para generar por PCR un casete para etiquetar el extremo C-terminal de un gen con GFP. Este vector porta la maquinaria de replicación en bacterias junto con el marcador de resistencia a ampicilina. Presenta un sitio de clonación múltiple y el gen *HIS5*⁺ como marcador de selección (¹⁹⁷).

- **pFa6a-HIS3Mx6**. Plásmido empleado para generar por PCR un casete para sustituir un gen por el gen *HIS5*⁺ de *S. pombe* (¹⁹⁷).

- **pGADT7**. Vector para el ensayo de doble híbrido que lleva incorporado un fragmento de DNA que codifica el dominio de activación del gen *GAL4*. *LEU2*, *GAL 4 DNA-AD*, *P ADH1*, *T ADH1*, *HA*, *NLS SV40* T-antigen, Col E1 ori y 2 μ ori. (Clontech).

- **pGBKT7**. Vector para el ensayo de doble híbrido que lleva incorporado un fragmento de DNA que codifica los aminoácidos 1-147 del dominio de unión al DNA del gen *GAL4*. *Kanr*, *TRP1*, *GAL4 DNA-BD*, *P ADHI*, *T T7 & ADHI*, *P T7*, c-Myc pUC ori y 2 μ ori. (Clontech).

- **pGEM[®]-T**. Vector diseñado para la subclonación de fragmentos de PCR o cualquier fragmento de DNA. Contiene los promotores SP6/T7 flanqueando la región codificante del péptido α de la β -Galactosidasa. Contiene un gen marcador de resistencia a ampicilina y el origen de replicación del fago T1 (Promega).

- **pGEX-4T-1**. Vector de expresión en *E. coli* que contiene el promotor tac químicamente por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactopiranosido), el gen represor *lacI^q*, un gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*), un origen de replicación pBR322 ori y, finalmente, el gen codificante de la proteína GST. También posee un sitio de reconocimiento digerible con trombina (Amersham BiosciencesTM), permitiendo así obtener la proteína de interés sin fusión.

- **pSP73**. Vector que contiene los promotores Sp6 y T7 de la RNA polimerasa flanqueando un sitio de clonación múltiple. Presenta un gen marcador de resistencia a ampicilina (¹⁹⁸).

- **pWS93**. Vector episomal que contiene el gen *URA3* como marcador para levaduras y porta la maquinaria necesaria para su replicación en bacterias, así como el marcador de resistencia a ampicilina. Permite la producción de proteínas de fusión con tres epítosos HA con una masa molecular de 3,74 kDa, bajo el control del promotor *ADHI* (¹⁹⁹).

- **YEp351**. Vector episomal que puede replicarse autónomamente en *S. cerevisiae*, pues contiene un fragmento del círculo de 2 μ , lo que permite su aparición en un alto número de copias por célula. Contiene el gen *LEU2* como marcador (²⁰⁰).

- **YEp351-GFP**. Se trata de un vector YEp351 que lleva subclonado un fragmento *BamHI-BglII* de 969 pares de bases conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) en la diana *BamHI* de su sitio múltiple de clonación. Generada en este trabajo.

- **YEp352**. Vector episomal que puede replicarse autónomamente en *S. cerevisiae*. Contiene el gen *URA3* como marcador (²⁰⁰).

- **YEp352-GFP6**. Se trata de un vector YEp352 que lleva subclonado un fragmento *BamHI-BglII* de 969 pares de bases conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente en la diana *BamHI* de su sitio múltiple de clonación.

- **YIp356 e YIP358R**. Pertenecen a la serie de vectores integrativos Yip356-7-8, contienen un origen de replicación para bacterias y el gen de resistencia a ampicilina. Carecen de origen de replicación en levaduras y como marcador cuentan con el gen *URA3*. Cuentan con un derivado del gen *lacZ* de *E. coli* que carece de promotor y presenta una región con múltiples sitios de clonación únicos introducida a nivel del octavo codón de dicho gen. Para que tenga lugar la expresión del gen *lacZ* es necesario fusionar una región de DNA con las características de un promotor que debe aportar además un ATG iniciador y los nucleótidos necesarios para que quede en pauta de lectura con el gen *lacZ* (²⁰¹).

3.2. Construcciones de DNA.

Las construcciones usadas durante este trabajo fueron las siguientes:

Nombre	Descripción	Origen
pGBKT7/MIG1	Expresa la proteína Mig1 fusionada al dominio de unión al DNA del gen <i>GAL4</i> .	[²⁹]
pGADT7/MIG2	Expresa la secuencia codificante del gen <i>MIG2</i> fusionada al dominio de activación del gen <i>GAL4</i> . Integrada en el sitio <i>Sall</i> .	Este trabajo
pGADT7/MIG2_{B/S}	Expresa la secuencia codificante del gen <i>MIG2</i> , excepto los 203αα C-terminales, fusionada al dominio de activación del gen <i>GAL4</i> . Integrada en el sitio <i>Sall</i> .	Este trabajo
pGADT7/MIG2₍₋₄₁₎	Expresa la secuencia codificante del gen <i>MIG2</i> , excepto los 41αα C-terminales, fusionada al dominio de activación del gen <i>GAL4</i> . Integrada en el sitio <i>Sall</i> .	Este trabajo
pGADT7/MIG2₍₋₁₈₃₎	Expresa la secuencia codificante del gen <i>MIG2</i> , excepto los 183αα C-terminales, fusionada al dominio de activación del gen <i>GAL4</i> . Integrada en el sitio <i>Sall</i> .	Este trabajo
pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3	Expresa el gen <i>MIG2</i> , bajo su propio promotor, fusionado a GFP. Contiene HIS3 como marcador.	Este trabajo
pGEMT/pMIG2_{NLS1}-GFP-HIS3	Expresa el gen <i>MIG2</i> , con la secuencia NLS1 mutada, bajo su propio promotor, fusionada a GFP. Contiene <i>HIS3</i> como marcador.	Este trabajo
pGEMT/pMIG2_{NLS2}-GFP-HIS3	Expresa el gen <i>MIG2</i> , con la secuencia NLS2 mutada, bajo su propio promotor, fusionada a GFP. Contiene <i>HIS3</i> como marcador.	Este trabajo
pGEMT/pMIG2_{NES1}-GFP-HIS3	Expresa el gen <i>MIG2</i> , con la secuencia NES1 mutada, bajo su propio promotor, fusionada a	Este trabajo

	GFP. Contiene <i>HIS3</i> como marcador.	
pGEMT/pMIG2_{NES2}-GFP-HIS3	Expresa el gen <i>MIG2</i> , con la secuencia NES2 mutada, bajo su propio promotor, fusionada a GFP. Contiene <i>HIS3</i> como marcador.	Este trabajo
pGEX-4T-1/HXK2	Expresa la secuencia codificante de <i>HXK2</i> fusionada a GST.	[²⁰²]
pGEX/KAP60	Expresa la secuencia codificante de <i>KAP60</i> fusionada a GST.	Dr. M.P. Rout
pGEX/KAP95	Expresa la secuencia codificante de <i>KAP95</i> fusionada a GST.	Dr. M.P. Rout
pGEX-4T-1/MIG1	Expresa la secuencia codificante de <i>MIG1</i> fusionada a GST.	[²⁰²]
pGEX-4T-1/MIG2	Expresa la secuencia codificante de <i>MIG2</i> fusionada a GST.	Este trabajo
pGEX-4T-1/MIG2_{NLS1}	Expresa la secuencia codificante de <i>MIG2</i> , con la secuencia NLS1 mutada, fusionada a GST.	Este trabajo
pGEX-3X/XPO1	Expresa la secuencia codificante de <i>XPO1</i> fusionada a GST.	[²⁰³]
pWS93/MIG1	Expresa la secuencia codificante de <i>MIG1</i> fusionada a 3 epítomos HA en el extremo N-term.	[³⁰]
pWS93/SNF1	Expresa la secuencia codificante de <i>SNF1</i> fusionada a 3 epítomos HA en el extremo N-term.	Nuestro laboratorio
pMM186/GRX5-GFP	Expresa el gen <i>GRX5</i> fusionado a la proteína verde fluorescente GFP en <i>S. cerevisiae</i> .	Dr. Enrique Herrero
pRS315/Su9::RFP	Expresa la proteína roja fluorescente (RFP) fusionada a la presecuencia de la subunidad 9 de la F ₀ -F ₁ ATP Sintasa de <i>Neurospora crassa</i> bajo el control del promotor de la <i>ADH1</i> . Contiene el gen <i>LEU2</i> como marcador.	Nuestro laboratorio
pRS316/Su9::RFP	Expresa la proteína roja fluorescente (RFP) fusionada a la presecuencia de la subunidad 9 de la F ₀ -F ₁ ATP Sintasa de <i>Neurospora crassa</i> bajo el control del promotor de la <i>ADH1</i> . Contiene el gen <i>URA3</i> como marcador.	Dr. Pascual Sanz
pSP73/MIG2(XhoI/EcoRI)	Expresa un fragmento de <i>MIG2</i> comprendido entre las dianas <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i> .	Este trabajo
pSP73/MIG2(XhoI/EcoRI) (-42)	Expresa un fragmento deleciónado de <i>MIG2</i> comprendido entre las dianas <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i> .	Este trabajo
pSP73/MIG2(XhoI/EcoRI) (-83)	Expresa un fragmento deleciónado de <i>MIG2</i> comprendido entre las dianas <i>XhoI</i> y <i>EcoRI</i> .	Este trabajo

YEp352/pMIG1	Expresa el gen <i>MIG1</i> bajo su propio promotor.	[³⁰]
YEp352/pMIG2	Expresa el gen <i>MIG2</i> bajo su propio promotor, subclonado en el sitio <i>BamHI</i> .	Nuestro laboratorio
YEp352/pMIG2-GFP	Expresa el gen <i>MIG2</i> bajo su propio promotor, fusionado a GFP y subclonado en el sitio <i>BamHI</i> .	Este trabajo
YEp352/pMIG2_{NES3}-GFP	Expresa el gen <i>MIG2</i> sin los 41α C-terminales fusionado a GFP y subclonado en el sitio <i>BamHI</i> del vector YEp352.	Este trabajo
YEp351/pMIG2	Expresa el gen <i>MIG2</i> , subclonado en el sitio <i>BamHI</i> del vector YEp351.	Nuestro laboratorio
YEp351/pMIG2-GFP	Expresa el gen <i>MIG2</i> , fusionado a GFP y subclonado en el sitio <i>BamHI</i> del vector YEP351.	Este trabajo
Yip356/prom-MIG2-lacZ	Expresa un fragmento de la ORF de <i>MIG2</i> fusionado al gen <i>LACZ</i> .	Este trabajo
Yip358R/prom1-MIG2-lacZ	Expresa un fragmento de la ORF de <i>MIG2</i> incluyendo parte de su gen estructural, fusionado al gen <i>LACZ</i> .	Este trabajo
Yip358R/prom2-MIG2-lacZ	Expresa un fragmento de la ORF de <i>MIG2</i> incluyendo parte de su gen estructural con una deleción de 42α de su extremo N-terminal fusionado al gen <i>LACZ</i> .	Este trabajo
Yip358R/prom3-MIG2-lacZ	Expresa un fragmento de la ORF de <i>MIG2</i> incluyendo parte de su gen estructural con una deleción de 83α de su extremo N-terminal fusionado al gen <i>LACZ</i> .	Este trabajo

A continuación se describe cómo se generaron las construcciones propias de esta tesis:

- **pGADT7/MIG2**: Permite expresar Mig2 fusionada al dominio de activación del gen *GAL4*. Se obtuvo cortando la construcción **pGEX-4T-1/MIG2** con *SacI/XhoI* y subclonando la secuencia completa de *MIG2* en el vector **pGADT7** digerido con *SacI/XhoI*.

- **pGADT7/MIG2_{B/S}**: Permite expresar Mig2 fusionada al dominio de activación del gen *GAL4*. Se obtuvo cortando la construcción **pGBKT7/MIG2** con *BamHI/SacI* y subclonando la secuencia de *MIG2* comprendida entre las bases 1 y 539 en el vector **pGADT7** digerido con *BamHI/SacI*.

- **pGADT7/MIG2₍₋₄₁₎**: Permite expresar Mig2 sin los últimos 41αα del extremo C-terminal fusionada al dominio de activación del gen *GAL4*. Se obtuvo amplificando por PCR parte de la secuencia codificante de *MIG2* con los oligos **MIG2-AD-d** y **MIG2(-41)-AD-r**. El DNA amplificado se cortó con *BamHI* y se subclonó en el vector **pGADT7** cortado de igual modo.

- **pGADT7/MIG2₍₋₁₈₃₎**: Permite expresar Mig2 sin los últimos 183 αα del extremo C-terminal fusionada al dominio de activación del gen *GAL4*. Se obtuvo amplificando por PCR parte de la secuencia codificante de *MIG2* con los oligos **MIG2-AD-d** y **MIG2(-183)-AD-r**. El DNA amplificado se cortó con *BamHI* y se subclonó en el vector **pGADT7** cortado de igual modo.

- **pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* bajo su propio promotor fusionada a GFP. Se obtuvo amplificando un genómico de la cepa **FMY501** con los oligos **MIG2-d** y **MIG2-r** y subclonándolo en el vector **pGEMT**.

- **pGEMT/pMIG2_{NLS1}**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* bajo su propio promotor con su secuencia NLS1 mutada obtenida mediante mutagénesis dirigida según se indica en el punto 4.12.

- **pGEMT/MIG2_{NLS1}-GFP-HIS3**: Permite expresar Mig2 con su secuencia NLS1 mutada fusionada a la proteína GFP. Se obtuvo subclonando el fragmento *XhoI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/MIG2_{NLS1}** en el vector **pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3**.

- **pGEMT/pMIG2_{NLS2}**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* bajo su propio promotor con su secuencia NLS2 mutada obtenida mediante mutagénesis dirigida según se indica en el punto 4.12.

- **pGEMT/MIG2_{NLS2}-GFP-HIS3**: Permite expresar Mig2 con su secuencia NLS2 mutada fusionada a la proteína GFP. Se obtuvo subclonando el fragmento *XhoI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/MIG2_{NLS2}** en el vector **pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3**.

- **pGEMT/pMIG2_{NES1}**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* bajo su propio promotor con su secuencia NES1 mutada obtenida mediante mutagénesis dirigida según se indica en el punto 4.12.

- **pGEMT/MIG2_{NES1}-GFP-HIS3**: Permite expresar Mig2 con su secuencia NES1 mutada fusionada a la proteína GFP. Se obtuvo subclonando el fragmento *XhoI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/MIG2_{NES1}** en el vector **pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3**.

- **pGEMT/pMIG2_{NES2}**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* bajo su propio promotor con su secuencia NES2 mutada obtenida mediante mutagénesis dirigida según se indica en el punto 4.12.

- **pGEMT/MIG2_{NES2}-GFP-HIS3**: Permite expresar Mig2 con su secuencia NES2 mutada fusionada a la proteína GFP. Se obtuvo subclonando el fragmento *XhoI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/MIG2_{NES2}** en el vector **pGEMT/pMIG2-GFP-HIS3**.

- **pGEX-4T-1/MIG2**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2* fusionada a GST. Se obtuvo subclonando en el sitio *Sall* del **pGEX-4T-1** el producto obtenido con los oligos **MIG2-BD/AD-d** y **MIG2-BD/AD-r** previamente cortado con *Sall*.

- **pGEX-4T-1/MIG2_{NLS1}**: Contiene la secuencia codificante de *MIG2*, con la NLS1 mutada, fusionada a GST. Se obtuvo subclonando en el sitio *Sall* del **pGEX-4T-1** el producto obtenido con los oligos **MIG2-BD/AD-d** y **MIG2-BD/AD-r** previamente cortado con *Sall*.

- **YEp352/pMIG2-GFP**: Expresa la proteína Mig2, bajo su propio promotor, fusionada a GFP. Se obtuvo subclonando en el sitio *BamHI* del vector **YEp352/GFP6** el producto de PCR obtenido con los oligos **MIG2GFP-d** y **MIG2GFP-r** previamente cortado con *BamHI*.

- **YEp352/pMIG2_{NES3}-GFP**: Expresa el gen *MIG2* carente de los 41 aa C-terminales, fusionado a GFP. Se obtuvo subclonando en el sitio *BamHI* del vector **YEp352/GFP6** el producto de PCR obtenido con los oligos **MIG2GFP-d** y **MIG2-GFP(-41)-r** previamente cortado con *BamHI*.

- **YEp351/GFP**: Se obtuvo subclonando un fragmento *BamHI/BglIII* de 969pb conteniendo el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) en la diana *BamHI* del sitio múltiple de clonación del vector **YEp351**.

- **YEp351/pMIG2-GFP**: Vector episomal que expresa la proteína Mig2 fusionada a GFP. Se obtuvo extrayendo el fragmento de 1450 pb del **YEp352pMIG2** cortando con *BamHI* y subclonándolo en el **YEp351/GFP** digerido previamente con el mismo enzima.

- **YIp356/prom-MIG2-lacZ**: Se obtuvo amplificando por PCR un fragmento del promotor de *MIG2* comprendido entre las bases -950 y 50, usando como molde un genómico de una cepa **W303.1A** de *S. cerevisiae* con los oligos **MIG2pro-d** y **MIG2-pro-r** y subclonando en el sitio *BamHI* del vector integrativo YIp356.

- **YIp358R/prom1-MIG2-lacZ**: Contiene un fragmento de la ORF de *MIG2* comprendido entre las bases -550 y 267. Se obtuvo subclonando el fragmento *BamHI/EcoRI* extraído de la construcción **YEp352/pMIG2** en el vector **YIP358R** digerido previamente con *BamHI/EcoRI*.

- **pSP73/MIG2(*XhoI/EcoRI*)**: Se obtuvo subclonando el fragmento de 310 pb *XhoI/EcoRI* de *MIG2* en el vector pSP73 cortado con los mismos enzimas.

- **pSP73/MIG2(*XhoI/EcoRI*) (-42)**: Se obtuvo por PCR reversa con los oligos **MIG2-SLM-42-d** y **MIG-2SLM-r** y posterior religación, según se indica en el punto 4.13.

- **pGEMT/pMIG2(-42)**: Se obtuvo subclonando el fragmento de 180 pb comprendido entre las dianas *XhoI* y *EcoRI* en el vector **pGEMT/pMIG2**.

- **YIp358R/prom2-MIG2-lacZ**: Contiene un fragmento de la ORF de *MIG2* comprendido entre las bases -550 y 267 y carente del fragmento comprendido entre las bases 16 y 131. Se obtuvo subclonando el fragmento *BamHI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/pMIG2(-42)** en el vector **YIP358R** digerido previamente con *BamHI/EcoRI*.

- **pSP73/MIG2(*XhoI/EcoRI*) (-83)**: se obtuvo por PCR reversa con los oligos **MIG2-SLM-83-d** y **MIG-2SLM-r** y posterior religación, según se indica en el punto 4.13.

- **pGEMT/pMIG2(-83)**: Se obtuvo subclonando el fragmento de 80 pb comprendido entre las dianas *XhoI* y *EcoRI* en el vector **pGEMT/pMIG2**.

- **YIp358R/prom3-MIG2-lacZ**: Contiene un fragmento de la ORF de *MIG2* comprendido entre las bases -550 y 267 y carente del fragmento comprendido entre las bases 16 y 253. Se obtuvo subclonando el fragmento *BamHI/EcoRI* extraído de la construcción **pGEMT/pMIG2(-42)** en el vector **YIP358R** digerido previamente con *BamHI/EcoRI*.

3.3. Oligodesoxinucleótidos.

Los oligodesoxinucleótidos empleados durante la realización de esta tesis fueron los siguientes:

Nombre	Secuencia	Descripción
Mig2-d	5' TAAGCTGTGGCGATGTGCTG ^{3'}	Sustitución del gen <i>MIG2</i> por el gen <i>KANMX4</i> .
Mig2-r	5' CCACCTTATCTCCACGGGAA ^{3'}	Sustitución del gen

		<i>MIG2</i> por el gen <i>KANMX4</i> .
MIG2-BD/AD-d	5' ATTCCCGGGTCGACTCATGCCTA AAAAGCAAACGAATTTCCAGTA ^{3'}	Subclonación de la secuencia codificante de <i>MIG2</i> en <i>Sall</i> .
MIG2-BD/AD-r	5' TTCCCGGGTCGACTCAACTCTTT TGGGACCGTTCAAACAT ^{3'}	Subclonación de la secuencia codificante de <i>MIG2</i> en <i>Sall</i> .
OLAMIG2	5' CGCCTGTACGTAACCTACTGAA ACAAATTGATGTTTTCAACGGTCC CAAAGAGTTTCCGGTTCTGCTGC TAGT ^{3'}	Casete de etiquetado en el genoma usando como molde el vector PA179-6HA-TRP1.
OLBMIG2	5' GACCATGCCGGCCGCAATTCGT ATAGGTAAACGTGCTATTCATGA CGACGATGCCTCGAGGCCAGAAG AC ^{3'}	Casete de etiquetado en el genoma usando como molde el vector PA179-6HA-TRP1.
Test-Mig2	5' CTTGAGTCCGTCTATTTAGA ^{3'}	Cheques y secuenciación.
MIG2GFP-d	5' GTTGGAAACCGGATCCTAAGCTG TGGCGATGTGCTG ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> con 550pb de su promotor en <i>BamHI</i> .
MIG2GFP-r	5' GTTGGAAACCGGATCCAACCTCTTT TGGGACCGTTGAAAACAT ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> con 550pb de su promotor en <i>BamHI</i> .
Test-TRP1	5' ACCAAATGCGATCGGTGTCG ^{3'}	Cheques.
MIG2-SLM-42-d	5' ACTGATCTAGACCTCATCATTGC GCATTCCTG ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> sin 42aa del extremo N-term. En <i>XbaI</i> .
MIG2-SLM-83-d	5' ACTAGATCTAGACAGGAGTTTT TGACAGTAAG ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> sin 83aa del extremo N-term. En <i>XbaI</i> .
MIG2-SLM-r	5' ACTGATCTAGACATTCTCTTTTT TTATTTTTATTTGTTTGTTCGAG G ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> sin 42/83aa del extremo N-term. En <i>XbaI</i> .
MIG2-pro-201-d	5' CTCGCTCGATACAGTAATT ^{3'}	Cheques.
SUC2(Mig1A-n)-d	5' TCGACATTATCCCCGATTTTT ATTACTCTGAACAGGAA ^{3'}	EMSA del sitio Mig1 en el promotor <i>SUC2</i> .
SUC2(Mig1A-n)-r	5' TCGATTCCTGTTTCAGAGTAATAA	EMSA del sitio Mig1

	AAATGCGGGGAATAATG ^{3'}	en el promotor <i>SUC2</i> .
SUC2(Mig1B-n)-d	5' TCGAAGTTTAGGAAATTATCCG GGGGCGAAGAAATACG ^{3'}	EMSA del sitio Mig1 en el promotor <i>SUC2</i> .
SUC2(Mig1B-n)-r	5' TCGACGTATTTCTTCGCCCCCGG ATAATTCCTAAACT ^{3'}	EMSA del sitio Mig1 en el promotor <i>SUC2</i> .
MIG2-AD-d	5' TTCCCGGGGATCCTCATGCCTAA AAAGCAAACGAATTC ^{3'}	Subclonación de la región codificante de <i>MIG2</i> en <i>BamHI</i> .
SUC2-d-FMH	5' AGCTCGAGTTATTACTCTGAAC AGGA ^{3'}	Experimentos de ChIP.
SUC2-r-FMH	5' TAGTCGACAAGTCGTCAAATCT TTCT ^{3'}	Experimentos de ChIP.
HXK2-RGT1-d	5' ACTACGAGTTTTCTGAACCTCC ^{3'}	Experimentos de ChIP.
HXK2-RGT1-d	5' TAATTCGTGGATCTCGAATC ^{3'}	Experimentos de ChIP.
MIG2-GFP(-41)-r	5' GTTGAACCGGATCCGCTGCTG TTATTGGTATCTTCTTCTTG ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> sin los 41α C-terminales.
MIG2(-183)-AD-r	5' GTTGAACCGGATCCGCGAACA TTCATGTTCGA ^{3'}	Subclonación de <i>MIG2</i> sin los 183α C-terminales.
OL-Kan-MX5'-out	5' GGAATTTAATCGCGGCCTCG ^{3'}	Chequeos.
OL-MIG2-p-d	5' TAAATTATATGCCGCTGAGAAA AATCTCGT ^{3'}	Secuenciación.
MIG2-pFA6a-d	5' AACCTACTGAAACAAATTGATG TTTTCAACGGTCCCAAAGAGTTC GGATCCCCGGGTTAATTAA ^{3'}	Casete de etiquetado en el genoma usando como molde los vectores pFA6a.
MIG2-pFA6a-r	5' GACCATGCCGGCCGCAATTCGT ATAGGTAAACGTGCTATTCATGA CGATGAATTCGAGCTCGTTAAAC ^{3'}	Casete de etiquetado en el genoma usando como molde los vectores pFA6a.
MIG2-1-d	5' CTGTGGTAGTTTGTGTTGAATATG TAATAT ^{3'}	Experimentos de ChIP.
MIG2-1-r	5' ATTTTCGGATGAGCCAAAAA ^{3'}	Experimentos de ChIP.
MIG2-3-d	5' AGCAAACGAATTC ^{3'}	Experimentos de ChIP.
MIG2-3-r	5' CGGTATTGGTTGGTGTATCAT ^{3'}	Experimentos de ChIP.

UPS1-del(HIS)-d	5' ATGGTCCTTTTACACAAAAGCA CACATATATTTCTACCGA3'	Sustitución del gen <i>UPS1</i> por <i>HIS3</i> .
UPS1-del(HIS)-d	5' AAAGTGGAGGATTTCTCGCCTCTT CGAGTTTTTGGATAACAAATGCC ATCGGAATTCGAGCTCGTTTAAA C3'	Sustitución del gen <i>UPS1</i> por <i>HIS3</i> .
MIG2-NES-L₂₄₄- L₂₅₁-d	5' GCAGAAAACCTTTTGCACATTCT GCTGCATCTGCAGCATCTACCGC ACAAAAAAGAACGCCTGTAAGTG 3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NES-L₂₄₄- L₂₅₁-r	5' CACTTACAGGCGTTCTTTTTTGT GCGGTAGATGCTGCAGATGCAGC AGAATGTGCAAAAGTTTTCTGC3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NES-V₂₆₉- L₃₀₅-d	5' TGCTCCTTCTCAGCTCGCCGCGG CCAAAGAAGCTGAGTCCGTCTAT GCAGATTCCAATAGATACACCA3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NES V₂₆₉- L₃₀₅-r	5' TGGTGTATCTATTGGAATCTGC ATAGACGGACTCAGCTTCTTTGGC CGCGGCGAGCTGAGAAGGAGCA3	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NLS-K₃₁- R₃₆-d	5' GTGGTTTCCATCGGTTAGAACAT GCAGCGAGAACACTTGGCAAGAC ACACTGGGGAAAAACCTC3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NLS-K₃₁- R₃₆-r	5' GAGGTTTTTCCCCAGTGTGTTGC CAAGTGTCTCGCTGCATGTTCTAA CCGATGGAAACCAC3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NLS-R₇₄- K₇₈-d	5' AACGCATACAGGGCAATCTCAA GCGGCATTGAAGGCAGCTAGCGT ACAGAAACAGGAGTT3'	Mutagénesis dirigida.
MIG2-NLS-R₇₄- K₇₈-r	5' AACTCCTGTTTCTGTACGCTAGC TGCTTCAATGCCGCTTGAGATTG CCCTGTATGCGTT3'	Mutagénesis dirigida.
OL57-GFP-r	5' ATTGGGACAACCTCGAGTG3'	Chequeos.
HIS-S1-d	5' CGTACGCTGCAGGTCGAC3'	Chequeos.
HIS-S1-r	5' ATCGATGAATTCGAGCTCG3'	Chequeos.
MIG2-pFA6a- del(HIS)-d	5' CGCTAAGACTATTGACCTCGAG AACAAACAAAATAAAAATAAAA AAAGAGACGGATCCCCGGGTAA TTAA3'	Sustitución del gen <i>MIG2</i> por <i>HIS3</i> .
MIG2pro-d	5' TCGAACGGATCCGAAGGAAGGC TGTTTACGTACGCAAG3'	Subclonación del promotor de <i>MIG2</i> .
MIG2pro-r	5' TCGAGAGGATCCCAGGTCTGTT TTCGTTATCTACTGGG3'	Subclonación del promotor de <i>MIG2</i> .

RTPCR-RGT1-d	5' ATCATCTTTTGGCCAGTTCG ^{3'}	PCR cuantitativa de <i>RGT1</i>
RTPCR-RGT1-r	5' GTTACTGATACGGGGGCTGA ^{3'}	PCR cuantitativa de <i>RGT1</i>
RTPCR-MIG2-2R	5' AGGACTTGCGGTATTGGTTG ^{3'}	PCR cuantitativa de <i>MIG2</i>
RTPCR-MIG2-2F	5' TTCCTGGTTGTGGGAAAAG ^{3'}	PCR cuantitativa de <i>MIG2</i>

4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

4.1. Manipulación de DNA plasmídico de bacterias.

Se empleó el método de *Miniprep*. En este método, las células se tratan con tampón STET (Sacarosa 8%, Tritón X-100 al 5%, EDTA 50mM y Tris-HCl 50 mM a pH 8,0) y lisozima, para posteriormente purificar el DNA plasmídico.

4.2. Aislamiento de DNA genómico de levaduras.

Para la obtención del DNA genómico de *S. cerevisiae* se empleó el método descrito por Ciriacy and Williamson (1981) ⁽²⁰⁴⁾, que se basa en la producción de protoplastos utilizando zimoliasa y su posterior lisis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). El DNA cromosómico se obtuvo mediante precipitaciones con etanol en presencia de acetato amónico 5M.

4.3. Análisis de restricción del DNA.

Se utilizaron endonucleasas de restricción suministradas por Roche Diagnostics, por General Electric Healthcare o por Fermentas, siguiendo las condiciones indicadas por la casa comercial.

4.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles horizontales de agarosa al 1% o 2% fundida en tampón TBE (Tris base 89 mM; EDTA 2 mM; ácido bórico 89 mM a pH 8,3). Las bandas se visualizaron por tinción de los geles con bromuro de etidio.

4.5. Construcciones de plásmidos.

La construcción de los distintos plásmidos recombinantes se realizó mediante la subclonación de fragmentos de DNA en los vectores descritos anteriormente. En los casos en que el vector se digirió con un solo enzima o con dos que generaran sitios de

corte compatibles, se trató a continuación con fosfatasa alcalina para evitar así su religación. Las ligaciones con el fragmento deseado se realizaron utilizando ligasa del fago T4.

La purificación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando los kits comerciales *Matrix Gel Extraction System* de Marling Biosciencie Inc. y *ATP™ Gel/PCR Fragment DNA Extraction Kit* de ATP Biotech Inc.

4.6. Transformación de bacterias.

Se prepararon células competentes de la cepa de *E. coli* pertinente siguiendo el método descrito en ⁽²⁰⁵⁾. Las células se trataron con dos soluciones: RF1 (RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 nM; KAc 30 nM; glicerol 10 mM a pH 5,8) y RF2 (MOPS 10 nM; RbCl 10 nM; CaCl₂ 75 mM; glicerol 15% a pH 6,8), manteniéndose luego congeladas hasta su uso a -70°C. Se añadió DNA plasmídico en una proporción de 50 ng de DNA por cada 2x10⁸ células, sembrándose a continuación en medio de cultivo selectivo.

4.7. Transformación de levaduras.

Se utilizó el método descrito en ⁽²⁰⁶⁾. Las células se hicieron competentes a partir de un cultivo en fase exponencial tratándolas con una disolución de sorbitol 1M, bicina 10 mM y etilenglicol 3% a pH 8,35. A continuación se almacenaron rápidamente a -70°C. La cantidad de DNA plasmídico a la hora de transformar fue de 5-10 µg DNA/10⁸ células. La selección de levaduras transformadas se llevó a cabo mediante crecimiento en medio selectivo.

4.8. Preparación de sondas radioactivas.

Las sondas se marcaron con (α^{32} -P) dCTP utilizando el kit comercial *Ready to go* de la casa General Electric Healthcare, basado en el método indicado en ⁽²⁰⁷⁾.

4.9. Análisis *Southern Blot*: hibridación DNA-DNA.

Esta técnica se empleó para detectar secuencias de DNA en el genoma de la levadura. El DNA genómico se obtuvo según el método descrito en el apartado 4.2. A continuación, se digirió con la endonucleasa *BglIII*, separándose luego los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Seguidamente, el DNA de doble hebra se desnaturalizó sometiéndolo a una hidrólisis ácida (HCl 0,25 N) en condiciones suaves, seguida de un tratamiento con una base (NaOH 0,5 N), según el protocolo contemplado en ⁽²⁰⁸⁾. Posteriormente, se transfirió a un filtro *Immobilon-P* (Millipore).

La hibridación del filtro con la sonda se realizó a 42°C en presencia de 3xSSC (NaCl 150mM; citrato sódico 15 mM a pH 7,0) y 4x Denhart's (suministrado por Sigma

Aldrich Co.). El lavado de la membrana se realizó según (²⁰⁹). Finalmente el filtro de expuso a autorradiografía.

4.10. Fosforilación e hibridación de oligodesoxinucleótidos.

Se realizó empleando T4 polinucleótido quinasa y después un tampón de hibridación (Tris-HCl 200 mM pH 7,5; MgCl₂ 100 mM; NaCl 250 mM) incubándose a 70°C y dejando enfriar lentamente hasta 30°C.

4.11. Amplificación de fragmentos de DNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El protocolo a seguir fue diseñado tal y como se describe en (²¹⁰) y modificado como se indica en (²¹¹). Se empleó 1 µg de DNA molde, 0,2 µg de los oligonucleótidos necesarios, 2,5 UI de *High Fidelity Taq DNA polimerasa* (5 Prime) y 0,2 mM de dNTPs (General Electric Healthcare) en un volumen de 50 µl sometidos a un proceso de 35 ciclos (1' a 94°C, 1' a 55°C y 2' a 72°C). El termociclador fue un Perkin Elmer GeneAmpPCR System 2.400.

4.12. Mutagénesis dirigida por PCR.

Para la obtención de mutaciones puntuales se siguió la siguiente metodología de mutagénesis: utilizando como molde un plásmido que contenía el gen completo, se prepararon dos mezclas de reacción; la primera incluía un oligo mutante *antisense* (M2) y un oligo externo 5' *sense*, la segunda contenía un oligo mutante *sense* (M1) y un oligo externo 3' *antisense*. Seguidamente se realizó la primera PCR con el programa 95°C (5') - [94°C (1'), 58°C (1'), 72°C (1,5')] - 72°C (5') y 35 ciclos.

Posteriormente, se purificaron los fragmentos 5' y 3' obtenidos mediante electroforesis y se extrajeron mediante el kit comercial *Matrix Gel Extraction System* de Marling Biosciencie Inc.

A continuación se realizó una segunda PCR usando 5 µl de la primera PCR como molde y los oligos externo 5' *sense* y 3' *antisense*, usando el programa: 98°C (5') - [98°C (1'), 58°C (1,5'), 72°C (1')] - 72°C (5') y 35 ciclos.

El producto obtenido se purificó, se digirió con los enzimas correspondientes a los sitios de restricción S1 y S2 y se subclonó en el plásmido adecuado.

4.13. Delección de secuencias mediante PCR reversa.

Para la obtención de las diferentes deleciones del gen *MIG2*, se utilizó como molde el plásmido **pSP73/MIG2(XhoI/EcoRI)** con los oligonucleótidos específicos para cada

delección, así como una Taq polimerasa de alta procesividad y fidelidad, la *TripleMaster[®] PCR System*.

Los productos de PCR se observaron en una agarosa al 2% y se purificaron con el Kit *High pure PCR Product Purification Kit* suministrado por la casa *Roche Diagnostics*. Una vez purificado el producto de PCR, se digirió con los enzimas pertinentes y se purificó de nuevo mediante el mismo kit siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se religaron los productos cortados con T4 DNA ligasa de la casa comercial *Roche Diagnostics*.

4.14. PCR en tiempo real (RT-PCR).

La PCR en Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporado un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de una serie de fluoróforos específicos. Ambos factores permiten monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación, lo que sustituye a los tradicionales pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR convencional. El parámetro fundamental en una PCR en Tiempo Real, en función del cual se van a realizar todos los cálculos analíticos, es el denominado Ciclo Umbral (o Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa respecto al ruido de fondo.

Una de la principales ventajas de la PCR en Tiempo Real frente a la PCR convencional radica en que la cuantificación del DNA amplificado no se realiza en función del producto final de la reacción, sino en función del valor de Ct, lo que permite, entre otras cosas, valorar de forma muy precisa la concentración inicial de DNA molde utilizado en la reacción.

En nuestros ensayos, el RNA celular que se utilizó como base para la RT-PCR se extrajo con el kit comercial *FastRNA[®] Pro Red Kit*, de *Bio 101[®] Systems*, siguiendo las indicaciones de uso del propio producto. A partir de ese RNA, la reacción de amplificación se llevó a cabo utilizando el kit *SuperScript[™] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step qRT-PCR Kit with ROX*, de *Invitrogen*, ateniéndonos estrictamente al protocolo del fabricante. El termociclador utilizado fue un *Abi Prism 7300* de *Applied Biosystems* y los resultados se analizaron según el método ΔCt ($2^{-\Delta\Delta t}$) de *Livak y Schmitteng* (²¹²).

4.15. Secuenciación.

Se utilizó el método de secuenciación automática capilar en un equipo *Abi Prism 3100* de *Applied Biosystems* (Unidad de Secuenciación de los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo).

5. Técnicas de Manipulación de proteínas.

5.1. Obtención de extractos proteicos libres de células.

Se inocularon células de levadura en los medios requeridos y se crecieron a una temperatura de 28°C con una agitación de 200 rpm hasta una DO_{600} de 1,0. Las células se recolectaron y se lavaron con tampón PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM a pH 7,5). Posteriormente, se rompieron dos veces en 200 μ l de tampón de lisis (PBS con inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Tablets, Roche), 0,1% TritonX-100 y 1mM DTT) y 400 μ l de bolas de vidrio *ballotini* (0,50 mm de diámetro) durante 30 segundos en un agitador FastPrep™ a velocidad 6,5 utilizando tubos apropiados de 1,5 ml, tras lo cual se resuspendieron en 200 μ l más de tampón de lisis y se pasaron a hielo. La suspensión obtenida se recogió y centrifugó a cuatro grados durante 20 minutos a 13.000 rpm o bien se empleó de forma directa, según el tipo de ensayo que se fuera a abordar con ella.

En el caso de extractos celulares que posteriormente se utilizarían para valorar la actividad β -Galactosidasa o experimentos de doble híbrido, tanto el lavado como la ruptura de células se realizó en Tampón Z (0,06 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 0,04 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,01 M KCl; 0,001 M $MgSO_4$; 0,05 M β -ME; pH 7.0).

5.2. Aislamiento de mitocondrias.

Se inocularon células de levadura en 200 ml de YEPD y se crecieron a una temperatura de 28°C con una agitación de 200 rpm hasta una DO_{600} de 0,8. Las células se recolectaron y se lavaron con YEP para, a continuación, dar un pase de 1h a un medio YEPG a la mitad del cultivo. Las mitocondrias se recolectaron siguiendo el protocolo descrito en ⁽²¹³⁾.

5.3. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó empleando el Método de Lowry, utilizando sero-albúmina bovina para confeccionar la recta patrón y el kit *Quant-it™ Protein Assay* de Invitrogen.

5.4. Determinación de la actividad invertasa.

Se estimó siguiendo el método descrito en ⁽²¹⁴⁾.

5.5. Determinación de la actividad β -galactosidasa.

Se valoró siguiendo el método descrito por Miller en ⁽²¹⁵⁾. La reacción se realizó en tampón Z (al que se adicionaron cantidades variables de la preparación enzimática,

dependiendo del extracto) y se inició añadiendo el sustrato ONPG (ortonifrofenilgalactopiranosido) a una concentración final de 0,8 mg/ml siendo el volumen final 1 ml. Las muestras se incubaron a 30°C hasta la aparición de color, deteniéndose la reacción con 500 μ l de Na₂CO₃ 1M. A continuación, se centrifugó 10 minutos a 14.000 rpm con el objeto de eliminar los restos celulares. Posteriormente, se midió la absorbancia a 420 nm. La unidad de actividad específica se define como aquella cantidad de enzima capaz de hidrolizar un mol de ONPG por minuto y por mg de proteína en las condiciones de ensayo (λ_{420} para el ONPG = $4,5 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.6. Sistema del doble híbrido.

Para la detección de interacciones proteína-proteína se utilizó el sistema *Matchmaker Gal4 Two-Hybrid System 3*, de la casa comercial Clontech, basado en el sistema de doble-híbrido. La interacción se valora determinando la actividad β -galactosidasa de los extractos proteicos de las células cotransformadas y crecidas en las condiciones de interés.

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

Las proteínas presentes en extractos libres de células se separaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y β -mercaptoetanol siguiendo, fundamentalmente, el método descrito en ⁽²¹⁶⁾. El gel de empaquetamiento se preparó a partir de una disolución de acrilamida y N-N'-metilen-bisacrilamida al 3,5% y el gel de separación a partir de la misma disolución al 12%.

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

5.8. Transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (Polyvinylidene Fluoride).

La transferencia de proteínas separadas en geles de poliacrilamida a filtros de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride*) se llevó a cabo según el método descrito en ⁽²¹⁷⁾, utilizando el equipo comercializado por BIO-RAD. La transferencia se efectuó en un tampón que contiene Tris-HCl 25 mM a pH 8,8; glicina 192 mM y metanol al 20% v/v, aplicándose una diferencia de potencial constante de 100 V durante una hora.

5.9. Ensayos de retardo en gel.

El ensayo de retardo en gel se basa en el hecho de que la movilidad electroforética de un ácido nucleico a través de un gel de poliacrilamida puede ser alterada cuando una proteína se une a él.

Para llevarlo a cabo, se mezclaron 4 µg de proteína total (usualmente, 10 µl de extracto celular) con 1 µl de DNA marcado radioactivamente, 1 µl de poli dI-dC (4 mg/ml), 5 µl de un tampón con HEPES 50 mM pH 7,0 y DTT 5 mM en un volumen final de 25 µl. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras los que se adicionaron 2,5 µl de tampón de electroforesis (glicerol 50%; EDTA 1 mM; azul de bromofenol 0,4%; xileno cianol 0,4%). Los complejos de DNA-proteína se separaron del DNA libre por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida del 4%. El gel se recorrió durante 45 minutos en TBE x0,5 (TBE x10: Tris Base 108 g/l; ácido bórico 55 g/l; EDTA 9,3 g/l) y se corrió en el mismo tampón a 110 V. Posteriormente, se secó (con una máquina de vacío) y se expuso a autorradiografía a -70 °C.

5.10. Expresión y purificación de proteínas unidas a GST en columnas de glutación *sepharosa*.

La secuencia codificante de la proteína de interés se subclonó en el vector de expresión **pGEX-4T-1/3X** en pauta de lectura con la proteína GST. Con la construcción obtenida, se transformaron células de la cepa de *E. coli* BL21 y se indujo la expresión de la proteína de fusión con GST adicionando al medio de cultivo IPTG (isopropil-β-D-tio-galactopiranosido) a una concentración final de 0,5 mM. Cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,45. La inducción se realizó durante 3 horas a 37 °C.

Posteriormente, las bacterias se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS a pH 7,5. Luego se les adicionó lisozima a una concentración de 1 mg/ml y se mantuvieron en hielo durante media hora para, posteriormente, llevar a cabo su rotura por sonicación mediante 5 pulsos de 10 segundos de duración a 200-300 W. El extracto resultante se centrifugó dos veces a 14.000 rpm durante 20 min. Una vez obtenido el extracto libre de células, se puso en contacto con 100 ml de *glutination sepharosa 4B* (equilibrada con 5 ml de PBS frío a pH 7,5), durante un mínimo de una hora a 4°C en una noria.

Tras este tiempo, se retiró el extracto y se lavó la columna con 5 ml de PBS frío a pH 7,5, antes de eluir la proteína fusionada a GST con 2 U de trombina, a fin de escindir la proteína de interés de la GST.

5.11. Coprecipitación o *pull-down* como fusiones con GST.

Es una técnica apropiada para comprobar interacciones físicas entre proteínas de interés, sirviendo como apoyo a otro tipo de ensayos. Se basa en la precipitación de una proteína, previamente purificada o proveniente de un extracto proteico, mediante su unión a otra proteína fusionada a GST adherida a una matriz de *glutathion sepharosa*.

Para su realización, una de las proteínas debe expresarse como se indica en 5.10 y no ser eluida de la matriz de *sepharosa 4B*. Posteriormente, en el mismo tubo *Eppendorf* se adiciona el extracto proteico celular conteniendo la otra proteína etiquetada con el antígeno que deseemos (o bien directamente la proteína purificada) y se deja incubar la mezcla toda la noche a 4°C en la noria.

Al día siguiente, se lava la matriz 5 veces con 1 ml de PBS a pH 7,5 y posteriormente, se le adicionan 20 µl de *Laemmli buffer 4X* (12,5 ml Tris-HCl 1M pH 6,8; 4 g SDS; 17,5 ml glicerol; 1,25 ml β-mercaptoetanol; 1,6 ml EDTA 250 mM; azul de bromofenol; H₂O hasta 50 ml). Luego se añaden otros 60 µl de PBS frío (NaCl 0,14 M; KCl₂ 7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM a pH 7,5) al tubo, se resuspende la resina y se hierve 20 minutos. Finalmente, se centrifuga a 14.000 rpm diez minutos y se realiza un *Western Blot* con la muestra, tal y como se indica en el siguiente apartado.

6. Técnicas inmunológicas.

6.1. Inmunodetección de antígenos: *Western Blot*.

Las células con la proteína etiquetada con el antígeno de interés se centrifugaron en un tubo *Falcon*, en un volumen de 15 ml. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 100 µl de *Laemmli buffer 4X* a las células. A continuación, el contenido se transfirió a un tubo de ruptura y se hirvió durante 5 minutos. Posteriormente, se enfrió y se le dio un pulso, tras el que se adicionaron 400 µl de *ballotini* y se rompió en un *FastPrep™* a máxima velocidad durante 30 segundos, dos veces. Finalmente, las muestras se hirvieron otros 5 minutos.

Para la recogida de las mismas, se realizó una pequeña perforación en la base del tubo de ruptura y se colocó encajado en la tapa cortada de otro tubo mayor, de 10 ml. Luego se centrifugan ambos de forma simultánea durante 5 minutos a 4.500 rpm. Después se agregaron 200 µl de tampón a pH 7,5 en el tubo de ruptura y se lavó el *ballotini*. El sobrenadante se recogió (unos 500 µl) y se transfirió a un tubo *Eppendorf*, que se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm. De nuevo se recogió el sobrenadante y se transfirió a otro tubo *Eppendorf* totalmente limpio. Las muestras así obtenidas se cargaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de PVDF. Una vez transferidas las proteínas al filtro, éste se incubó durante una hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo TBS-Tween (HCl 20 mM a pH 7,5; NaCl 150mM; Tween 20 al 0,1%) más un 5% de leche desnatada en polvo. A continuación se añadió el anticuerpo primario (en la dilución correspondiente) a una

nueva solución de bloqueo con leche recién preparada, se desechó la que bañaba la membrana de PVDF y se adicionó la nueva con el anticuerpo sobre la misma, con la que permaneció en incubación durante toda una noche a 4°C.

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

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

6.2. Co-Immunoprecipitación.

En este ensayo, un antígeno se aísla por unión a un anticuerpo específico adherido a una matriz con capacidad para sedimentar. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando extractos proteicos que contenían las proteínas que interactuaban según el método descrito en ⁽²¹⁸⁾ con algunas modificaciones menores. Los extractos permanecieron con 1,5 µl de anticuerpo durante dos horas a 4°C. Posteriormente, se añadieron 200 µl de proteína *A-sepharosa* (General Electric Healthcare) y se incubó la mezcla otras dos horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo se lavó la resina cinco veces con 1 ml de tampón *Stapha-A* (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ mM; NaH₂PO₄ 18 mM a pH 7,3; Tritón X-100 al 20%; SDS 1% y deoxicolato 5%) y el inmunoprecipitado se hirvió en 20 µl de *Laemmli buffer* 4X y 60 µl de PBS. Las muestras se analizaron, una vez centrifugadas, realizando un *Western Blot* (apartado 6.1).

6.3. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Se siguió la metodología descrita en ⁽²¹⁹⁾ con las siguientes modificaciones: las células se crecieron en 25 ml de medio YEP o SC con los requerimientos nutricionales adecuados en cada caso. Cuando el cultivo llegó a una DO de 1,0 a 600 nm se adicionaron 200 µl de formaldehído y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción agregando glicina a una concentración final de 125 mM y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos más.

Las células se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 5 veces con 25 ml de TBS frío (Tris HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µl de tampón de lisis (Hepes KOH 50 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato sódico 0,1%; PMSF 1 mM) y se rompió en un FastPrep™ tras adicionarle 400 µl de *ballotini*. El lisado celular se transfirió a tubos *Eppendorf* limpios y se sonicó en un *Bioruptor* siguiendo las recomendaciones del

fabricante. Después, el contenido del tubo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante (DNA-proteína solubilizado).

En este punto, se tomó una alícuota de 15 µl de cada muestra para utilizarla como control. A 200 µl del sobrenadante se adicionaron 2 µl del anticuerpo específico y se dejó en la noria toda la noche a 4°C. Posteriormente se agregaron 200 µl de la resina proteína *A-sepharosa* y se dejó la muestra en una noria durante 4 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó 4 veces con 1ml de PBS (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM a pH7,5), se resuspendió la resina en 100 µl de tampón de elución (SDS 1%; NaH₂CO₃ 100 mM) y se mantuvo en un bloque a 65°C durante 10 minutos. Después, se centrifugó 3 minutos a 1.500 rpm, se recogió el eluido y se incubó toda la noche a 65°C para revertir la unión de las proteínas al DNA (el control también se resuspendió en 100 µl de tampón de elución y siguió el mismo tratamiento. A partir de este punto, se manejó al igual que la muestra). Se centrifugó de nuevo un minuto a 1.500 rpm y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se adicionaron 100 µl de tampón TE (TrisHCl 10 mM a pH 8,0; EDTA 1 mM), 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 6 µl de glicógeno (10 mg/ml), incubándose una hora a 37 °C.

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

6.4. Inmunopurificación.

Las células con la proteína etiquetada con el antígeno de interés se crecieron en 2l de SCD en un matraz *Erlenmeyer*, hasta una DO₆₀₀ de 0,7. A continuación, a la mitad del cultivo se le dio un pase de 1 h a SCY. Posteriormente, se recolectaron las células por centrifugación a 4°C y 4.500 rpm durante 10 min., se lavaron dos veces con 50 ml de PBS frío a pH 7,5, se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (PBS, inhibidor de proteasas (Complete, Roche), 0,1% TritonX-100 y 1,0 M DTT) y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta su uso.

Las células se rompieron con *ballotini* en un *Pulverisette 6* (potencia 500, dos repeticiones de 4 min.). Los extractos obtenidos se centrifugaron a 4.500 rpm durante 10 min. a 4°C para eliminar los restos celulares. A continuación se realizó otra centrifugación de 1 h. a 14.000 rpm. Una vez obtenidos los extractos libres de células se dejaron en contacto toda la noche a 4°C con 200 µl de proteína *A-sepharosa* a la que previamente se le había pegado el anticuerpo correspondiente.

Posteriormente, la resina se lavó de forma exhaustiva con 5ml de tampón de lisis. Luego se resuspendió en 60 µl de PBS y 30 µl de *Laemmli buffer* 4X. Finalmente, el

contenido se hirvió durante 20 minutos. Las muestras se analizaron, una vez centrifugadas, mediante *Western Blot* (apartado 6.1).

7. Microscopía de fluorescencia.

7.1. Preparación de muestras.

Las cepas de levadura expresando las proteínas fusionadas a GFP se crecieron en un medio sintético conteniendo la fuente de carbono apropiada y sin el/los aminoácido/s requerido/s para mantener la selección del plásmido. Cuando las células alcanzaron una DO_{600} de 0,8 se realizaron las preparaciones en un portaobjetos tipo *Afora K14*. Primeramente se adicionaron, sobre las áreas del portaobjetos a utilizar, 7 μ l de una solución de *Poly-L-Lisina* (Sigma Aldrich Co.) diluida 1:5 en agua. Tras retirar la *Poly-L-Lisina* por aspiración, se adicionaron 25 μ l del cultivo que contenía las células a visualizar en las áreas previamente tratadas, retirándose el remanente por aspiración. Posteriormente, se adicionó 1 μ l de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 2,5 μ g/ml disuelto en glicerol al 80% y se colocó un cubre objetos de 22 x 22 mm sobre la superficie con las células.

7.2. Observación de las muestras y grabación de imágenes.

Las imágenes se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM5000B, que contiene un bloque de filtros de fluorescencia con intercambio motorizado. En concreto se utilizaron los siguientes filtros:

- DAPI BP 360/640 (filtro de excitación), 400 (espejo dicrómico) y 470/440 (filtro de restricción), con el que se visualizaron los núcleos celulares teñidos con DAPI.

- GFP BP 470/440 (FE), 500 (ED) y 525/550 (FR), con el que se visualizaron las proteínas fusionadas a GFP.

- TX2 BP 560/540 (FE), 595(ED) y 645/675 (FR), con el que se visualizaron proteínas fusionadas a RFP.

Las cámaras utilizadas fueron una Leica DFC300 FX (gestionándose la máquina con el software proporcionado por la casa comercial (LAS Software; Version 2.8.1)) y una ORCA-R² de la casa comercial Hamamatsu (con HC Image 2.0.1 como software de gestión). Las imágenes se procesaron usando Adobe Photoshop CS4.

RESULTADOS

RESULTADOS.

Mig2 ha sido descrito como un factor transcripcional que colabora con la proteína Mig1 en la represión por glucosa de varios genes, entre los que se encuentran *HXK1*, *HXT1*, *HXT13* y *SUC2* (⁵⁶). El estudio de la expresión de aquellos genes que presentan motivos de unión para Mig1, ha demostrado que esta proteína, por sí misma, no es capaz de llevar a cabo la represión total de los genes que regula sino que, en la mayoría de los casos, actúa en colaboración con Mig2. Mig1 parece ser el represor principal, ya que es responsable de llevar a cabo la mayor parte de la represión de estos genes, mientras que la delección de *MIG2* o bien no tiene efecto, o sólo provoca una ligera modificación de la expresión.

Análisis de las regiones del DNA a las cuales se asocian Mig1 y Mig2 han demostrado que ambos represores se unen a motivos de DNA idénticos, siendo imprescindible la presencia de una región rica en GC en el extremo 5' (⁵⁶). Se han barajado varias hipótesis con el fin de explicar el papel redundante de Mig2 en la represión por glucosa: una primera teoría es que ambas proteínas muestren diferente afinidad por los motivos de unión al DNA, siendo Mig2 responsable de la represión en aquellas condiciones en que Mig1 no está presente, no es totalmente funcional, o bien, se encuentra en poca cantidad. En el caso del gen *SUC2* se confirmó que Mig1 presenta mayor afinidad por el promotor de este gen (⁵⁶); la segunda hipótesis implicaría una regulación post-transcripcional de Mig2, de tal manera que en presencia de bajos niveles de Mig1, sufriría algún tipo de modificación que permitiría o propiciaría su unión al DNA.

Debido a la importancia de los mecanismos de regulación por glucosa para la supervivencia celular y a la escasa información existente sobre el papel de Mig2 en los mismos, en este trabajo nos hemos propuesto ampliar los conocimientos acerca de esta proteína, centrándonos en su papel represor y en la búsqueda de otras posibles funciones que pueda llevar a cabo.

1. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Mig2 EN *S. cerevisiae*.

1.1. Análisis comparativo entre las proteínas Mig1 y Mig2 de *S. cerevisiae*.

MIG2 codifica para una proteína de 382 aminoácidos con un peso molecular de 42 kDa, conteniendo en su secuencia dos motivos de dedos de zinc del tipo C₂H₂, el primer motivo se encuentra localizado entre los aminoácidos 17 y 39 y el segundo entre los residuos 45 y 69.

Como se comentó con anterioridad, Mig1 y Mig2 son dos proteínas homólogas que presentan ciertas similitudes en cuanto a su estructura, esta semejanza es la responsable de que ambas proteína puedan unirse a motivos similares y, por tanto, regular conjuntamente ciertos genes.

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo entre las secuencias primarias de Mig1 y Mig2 para comprobar la existencia de semejanzas entre ambas proteínas a nivel de la estructura primaria. Para ello, se llevó a cabo un alineamiento de sus secuencias con la aplicación **ClustalW2**. Como se puede observar en la figura R-1.1A, Mig1 y Mig2 presentan un 20% de identidad en su secuencia primaria, siendo el único dominio que comparten ambas proteínas el correspondiente a los motivos de dedos de zinc, donde la identidad es del 71% (Fig. R-1.1B).

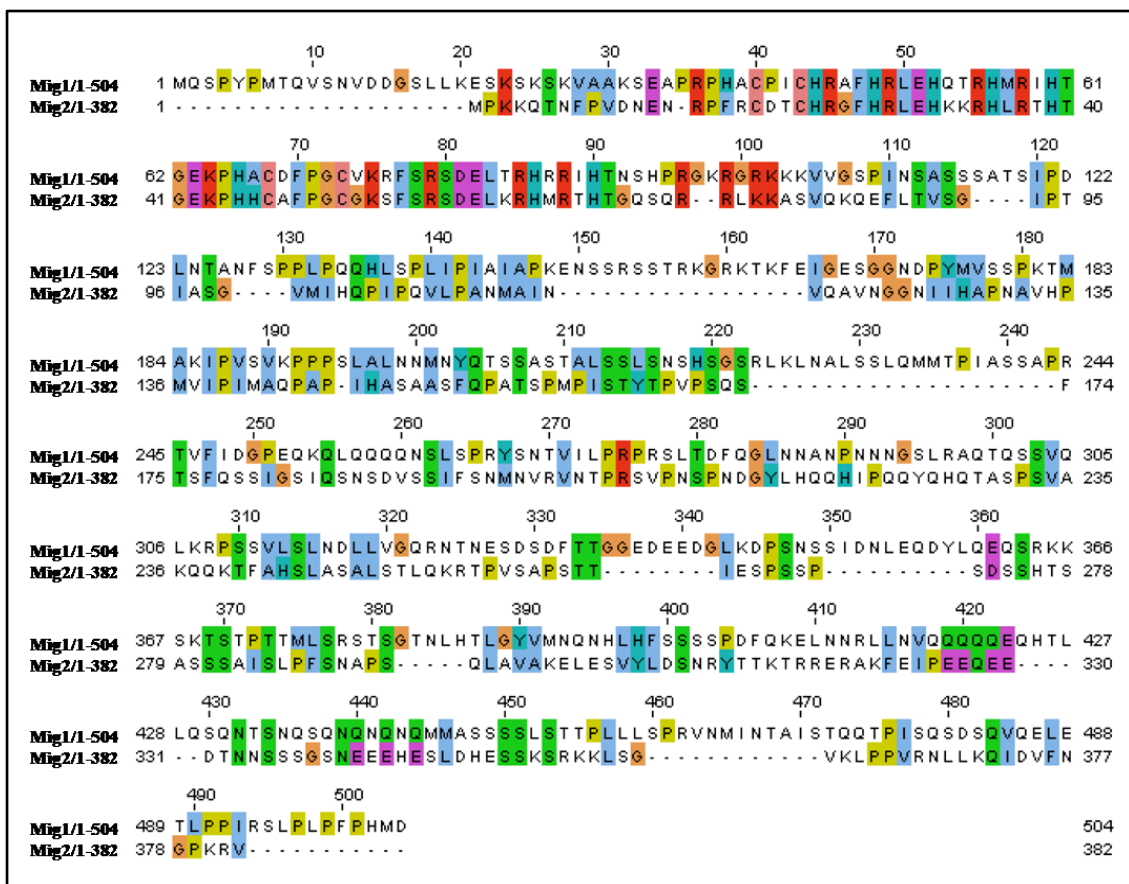


Figura R-1.1A: Alineamiento de secuencias entre Mig1 (YGL035C) y Mig2 (YGL209W). Las secuencias primarias de las proteínas Mig1 y Mig2 presentan un 20% de identidad concentrándose ésta en el extremo N-terminal.

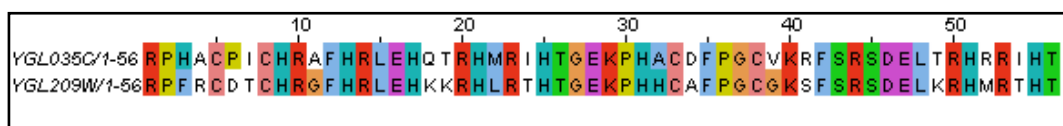


Figura R-1.2B: Alineamiento entre las secuencias correspondientes a los dedos de zinc de Mig1 y Mig2. Mig1 y Mig2 presentan un 71% de identidad a nivel de su estructura primaria en la zona correspondiente a los motivos de dedos de zinc.

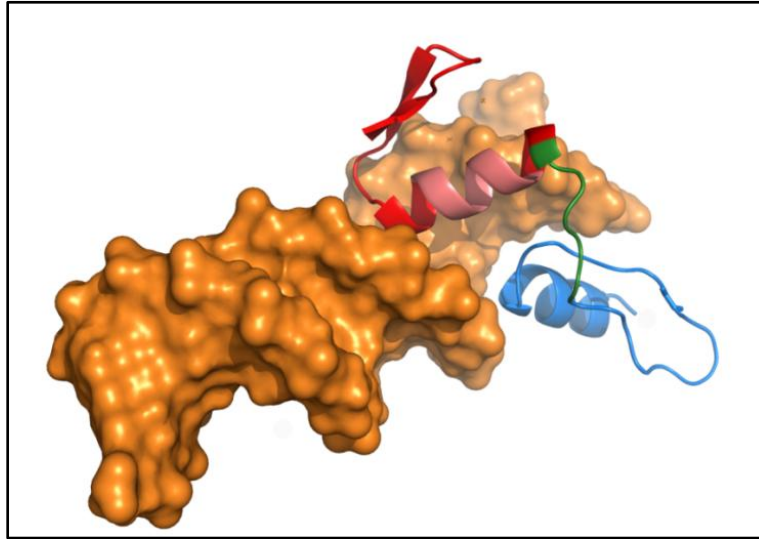


Figura R-1.2B: Modelo teórico de la estructura tridimensional de Mig2 correspondiente a los motivos de dedos de zinc unidos al DNA. En rojo se representa el primer motivo de dedos de zinc de Mig2, siendo la zona implicada en la interacción con el DNA rosa, mientras que al segundo motivo se le asignó el color azul. El DNA se encuentra representado en naranja.

En la figura R-1.3C podemos observar una representación más detallada del primer motivo de dedos de zinc de Mig2. En este modelo se especifican los aminoácidos de la región implicada en la interacción con el DNA (representado en rosa en la figura R-1.2C), siendo los residuos indispensables para la misma la Arg y la His señalados con una estrella.

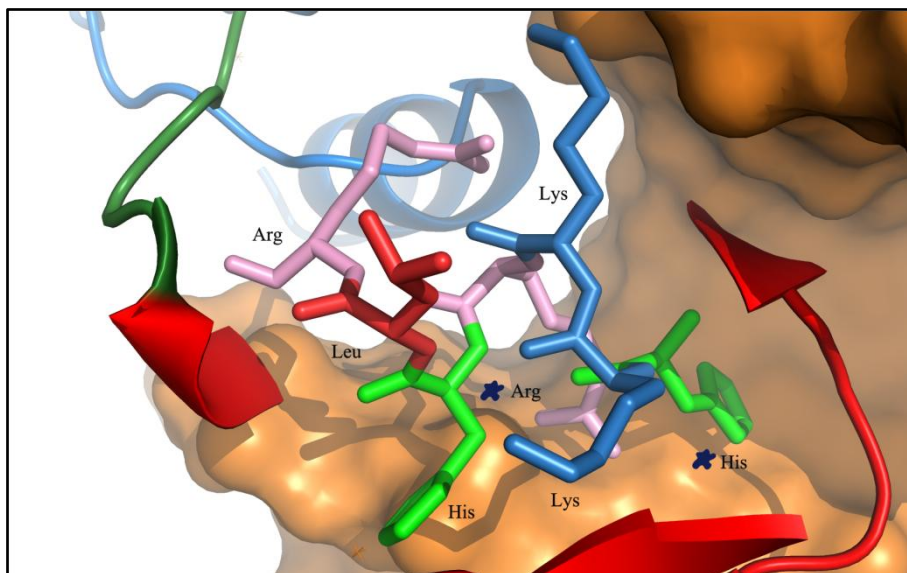


Figura R-1.2C: Modelo teórico detallado de los aminoácidos implicados en la interacción con el DNA del primer motivo de dedos de zinc de Mig2. Los aminoácidos His y Arg señalados con una estrella son los residuos directamente implicados en la interacción.

1.3. Los niveles de expresión del gen *MIG2* no muestran diferencias significativas cuando la levadura crece en glucosa o en glicerol.

Dado que el papel represor de Mig2 está regulado por la presencia de glucosa en el medio (⁵⁶), se quiso comprobar si esta regulación estaba causada por una expresión diferencial del gen *MIG2*. Para llevar a cabo este estudio se decidió realizar un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *MIG2* (RT-PCR/Mig2-2R y 2F) y como control un par de oligonucleótidos específicos para el gen *RGT1* (RT-PCR/RGT1d y r). La elección de *RGT1* como referencia no fue casual, por un lado es un gen totalmente específico de *S. cerevisiae* y por otro, su regulación y producto fueron objeto de intensos análisis en nuestro laboratorio (^{10,11}). Se ha observado que la expresión de *RGT1* es constitutiva y no demasiado elevada, lo que posibilita su empleo como control preciso en el análisis de la expresión de proteínas no estructurales, mucho más cercanas a él en cuanto a concentraciones intracelulares.

Como molde en los experimentos de RT-PCR se utilizó el RNA total de muestras de células crecidas hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0 en medios de cultivo YEP con alta y baja glucosa. La extracción del mismo se realizó empleando el kit comercial FastRNA[®] Pro Red Kit (Bio 101[®] Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante para, a continuación, realizar un tratamiento con DNAsa y así eliminar cualquier posible contaminación de DNA. Posteriormente, la transcripción reversa y amplificación del cDNA generado se llevó a cabo en un solo paso empleando el kit SuperScript[™] III Platinum[®] SYBR[®] Green One-Step pRT-PCR con ROX (Invitrogen), ateniéndonos igualmente al protocolo del fabricante. Como control negativo de la RT-PCR se utilizó la mezcla de reacción sin molde, comprobándose que no había amplificación inespecífica de ningún tipo. Los datos de la tabla R-1.3 muestran el análisis de los resultados siguiendo el método $\Delta C_T(2^{-\Delta\Delta t})$ de Livak y Schmitteng (²¹²).

Cepa Wt: BY4741					
Condiciones nutricionales	<i>MIG2</i> C _T	<i>RGT1</i> C _T	ΔC_T (<i>MIG2-RGT1</i>)	$\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_T \text{ Glc}$)	<i>MIG2</i> relat. a glucosa
Alta glucosa	16,51±0,05	16,44±0,05	0,07	0	1
Baja glucosa	18,25±0,02	17,99±0,07	0,26	0,19	0,88

Tabla R-1.3: RT-PCR de la expresión del gen *MIG2* en condiciones de alta y baja glucosa. El ciclo umbral (C_T) del gen *MIG2* se normalizó frente al C_T del gen *RGT1* y se relacionó con el C_T del control interno. La comparación de los ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$ se definió como la diferencia entre los valores ΔC_T , $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ MIG2} - C_T \text{ normalizador}) - (C_T \text{ RGT1} - C_T \text{ normalizador})$. El valor de la expresión comparativo se transformó en un valor absoluto usando la siguiente fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Como podemos observar en la tabla, la expresión de *MIG2* es constitutiva y no depende de la fuente de carbono presente en el medio, ya que las diferencias observadas entre ambas condiciones nutricionales no son significativas. Estos valores informan de que las diferencias descritas en la capacidad represora de Mig2 en función de la presencia o ausencia de glucosa no se deben a diferencias a nivel de la expresión génica

sino a procesos posteriores como pueden ser modificaciones post-traduccionales o diferencias en la tasa de degradación, dependientes de glucosa.

1.4. Los componentes del complejo represor del gen *SUC2*: Mig1, Hxk2 y Snf1 están implicados en la regulación de la expresión del gen *MIG2* en presencia de glucosa.

Estudios previos llevados a cabo en el laboratorio de Mark Johnston (⁵⁶) muestran claras diferencias en la regulación a la que están sometidos los genes *MIG1* y *MIG2*. Mediante fusiones del promotor del gen *MIG1* a la secuencia codificante del gen *LacZ* observaron que la expresión del mismo se encuentra reprimida en presencia de glucosa a través de la proteína Mig2 y del propio represor Mig1. En cuanto a la expresión del gen *MIG2*, por el momento, sólo se sabe que aumenta en presencia de glucosa, respecto a los valores mostrados en galactosa, mediante la vía Mth1/Std1/Rgt1.

En vista de la falta de datos acerca de la regulación del gen *MIG2*, decidimos abordar el estudio de la expresión del mismo en diferentes cepas mutantes para proteínas implicadas en la represión por glucosa. De este modo, comprobaríamos si alguna de estas proteínas ejerce un papel regulador sobre la expresión de dicho gen. La realización de este estudio se llevó a cabo mediante un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real, empleando los mismos oligos que en el apartado anterior.

Para llevar a cabo este experimento se utilizó como molde RNA total, extraído como se indica en el apartado 1.3 de Resultados, de cepas mutantes para las proteínas Mig1, Hxk2 y Snf1. La elección de estas proteínas no fue al azar, sino que se debe al importante papel que Mig1, Hxk2 y Snf1 desempeñan en la regulación de la represión por glucosa (apartado 1.3 de la Introducción).

En la tabla R-1.4 podemos observar el análisis de los resultados obtenidos. Estos valores muestran que la expresión del gen *MIG2* se ve incrementada en presencia de glucosa y en ausencia de cualquiera de los tres componentes del complejo represor del gen *SUC2*, siendo este aumento mayor en el caso del mutante $\Delta mig1$, donde la expresión de *MIG2* se incrementa en un 103%. En el caso de células crecidas en condiciones de baja glucosa, la expresión de *MIG2* no se ve modificada de manera significativa en ninguno de los mutantes sometidos a estudio.

Cepa $\Delta mig1$					
Condiciones nutricionales	<i>MIG2</i> C _T	<i>RGT1</i> C _T	ΔC_T (<i>MIG2-RGT1</i>)	$\frac{\Delta \Delta C_T}{(\Delta C_T - \Delta C_T \text{ Wt Glc})}$	<i>MIG2</i> relat. a Wt glucosa
Alta glucosa	14,99±0,10	15,95±0,06	-0,96	-1,02	2,03
Baja glucosa	16,23±0,08	16,02±0,02	0,21	0,14	0,91

Cepa $\Delta h x k 2$					
Condiciones nutricionales	$MIG2 C_T$	$RGT1 C_T$	ΔC_T ($MIG2-RGT1$)	$\Delta \Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_T Wt$ Glc)	$MIG2$ relat. a Wt glucosa
Alta glucosa	18,14±0,07	18,74±0,06	-0,6	-0,67	1,59
Baja glucosa	16,62±0,09	16,34±0,04	0,28	0,21	0,86

Cepa $\Delta s n f 1$					
Condiciones nutricionales	$MIG2 C_T$	$RGT1 C_T$	ΔC_T ($MIG2-RGT1$)	$\Delta \Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_T Wt$ Glc)	$MIG2$ relat. a Wt glucosa
Alta glucosa	14,93±0,02	15,50±0,04	-0,57	-0,64	1,56
Baja glucosa	15,69±0,01	15,56±0,08	0,13	0,06	0,96

Tabla R-1.4: RT-PCR de la expresión del gen *MIG2* en condiciones de alta y baja glucosa en los mutantes $\Delta mig1$, $\Delta h x k 2$ y $\Delta s n f 1$. El ciclo umbral (C_T) del gen *MIG2* se normalizó frente al C_T del gen *RGT1* y se relacionó con el C_T del control interno. La comparación de los ΔC_T , $\Delta \Delta C_T$ se definió como la diferencia entre los valores ΔC_T , $\Delta \Delta C_T = (C_T_{MIG2} - C_T_{normalizador}) - (C_T_{RGT1} - C_T_{normalizador})$. El valor de la expresión comparativo se transformó en un valor absoluto usando la siguiente fórmula $2^{-\Delta \Delta C_T}$.

1.5. Estudio del promotor del gen *MIG2* mediante su fusión a la secuencia codificante del gen *LacZ*.

Para ahondar más en los resultados obtenidos en el apartado anterior e intentar determinar las diferentes regiones del promotor del gen *MIG2* implicadas en la regulación de la expresión del mismo, se procedió a la fusión de diferentes fragmentos del promotor de dicho gen a la secuencia codificante del gen *LacZ*.

En primer lugar, se amplificaron por PCR los distintos fragmentos sometidos a estudio y se subclonaron en el vector integrativo correspondiente (YIp356 o YIp358R). Las construcciones generadas se denominaron: **prom.**, contiene el promotor completo de *MIG2*; **prom1.**, lleva un fragmento del promotor comprendido entre las bases -550 y 267; **prom2.**, lleva el mismo fragmento que la construcción anterior pero se eliminó la región comprendida entre las bases 16 y 131 y **prom3.**, idéntica a la construcción prom1. pero sin la región que va desde la base 16 a la 253 (Fig. R-1.5B). La eliminación de las regiones correspondientes en las construcciones prom2 y prom3 se llevó a cabo mediante PCR reversa según se indica en el apartado 4.13 de Materiales y Métodos. Estas áreas se corresponden con posibles sitios de unión para la proteína Mig1. Recordemos que la secuencia consenso de unión para Mig1 es $5'(G/C)(C/T)GGGG3'$ con una región rica en ATs en 5'.


```

451 GATTTACGAG CGACCATCAT CTCCACGGTG CGAATTAATA AGCTGTGGCG
501 ATGTGCTGTA GTTGCCCTAT CGCCCCTGCG GAGCTTGCGT CAACTAGCTC
551 TCCCCTTTCC CCATTGAAGT TAGCGTATTA CCATCAGTTA ATGATTGATA
601 GGCTCATACG AAGAAGAAAA AAAGCCGGGA TAAGAAAACC CGCCTCCACT
651 TTTTGGGCTC ATCCGAAAAT TTATCCGCGG AGACATCCAC GGAGCACCCG
701 CAAAAC TGAAATAAT TAAATTATAT GCCGCTGAGA AAAATCTCGT
751 ACGAGGATAC GGTAATAAAT CCGTGCGAGA AAGTTTTTCC GAAAATCATT
801 CCCGGTCAAA AGCGTTTCTG GTATATAAGC GATTGGGAAA CCCGTCTATA
851 ATACGTAGTA ACTTACGATC TGCCTGTCAA ATTGTGTGCT TGTCTTGTGTA
901 CTATTACCAT TGTGTAGCTT ATCTTAACTC TCAATTAAGT TTTAACTCAC
951 GCTAAGACTA TTGACCTCGA GAACAAACAA AATAAAAAATA AAAAAAGAGA
1001 ATGCCTAAAA AGCAAACGAA TTTCCCAGTA GATAACGAAA ACAGACCTTT
1051 TAGATGTGAT ACCTGTCACC GTGGTTTCCA TCGGTTAGAA CATAAAAAGA
1101 GACACTTGAG AACACACACT GGGGAAAAAC CTCATCATTG CGCATTTTCT
1151 GGTTGTGGGA AAAGTTTCAG TAGAAGCGAT GAACTGAAAA GGCACATGAG
1201 AACGCATACA GGGCAATCTC AAAGGAGATT GAAGAAAGCT AGCGTACAGA
    
```

Figura R-1.5A: Fragmento de la secuencia de la ORF de Mig2. Los posibles sitios de unión para la proteína Mig1 se encuentran indicados en rojo y subrayados. El ATG de inicio de la proteína Mig2 se señala en verde.

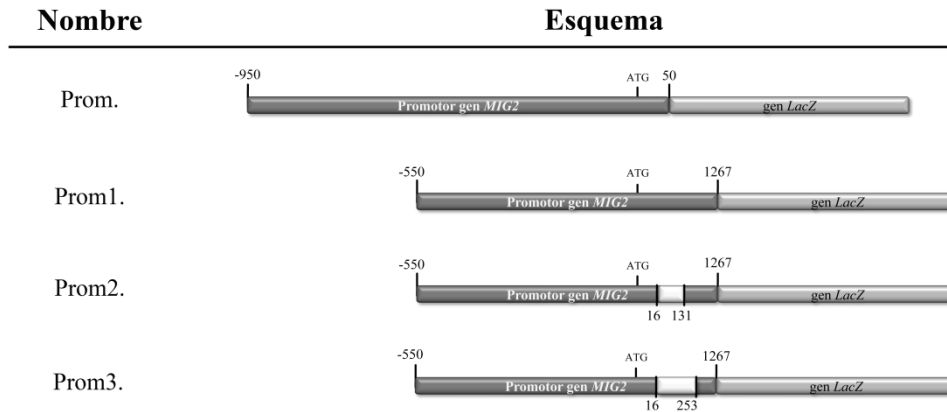


Figura R-1.5B: Representación esquemática de las construcciones *prom.*, *prom1.*, *prom2.* y *prom3.* Estas construcciones se integraron mediante recombinación homóloga en el sitio *URA3* de la cepa W303.1A.

A continuación, los DNAs se cortaron con *StuI* y se integraron en el sitio *URA3* de la cepa W303.1A. Las colonias positivas se seleccionaron en medio sólido SC sin uracilo y se sometieron a análisis *Southern Blot* para confirmar que las células sólo hubieran incorporado una copia del vector. Las cepas obtenidas fueron:

Nombre	Genotipo
FMY513	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; mig2::kanMX4; promMIG2::URA3.</i>
FMY514	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom1MIG2::URA3.</i>
FMY515	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom2MIG2::URA3.</i>
FMY516	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; prom3MIG2::URA3.</i>

Tabla R-1.5A: Cepas obtenidas mediante la integración de las construcciones *prom.*, *prom1.*, *prom2.* y *prom3.* en el sitio *URA3* de la cepa **W303.1A. Estas cepas contienen diferentes fragmentos del promotor del gen *MIG2* fusionado en pauta a la secuencia codificante del gen *LacZ*.**

La actividad β -galactosidasa de cada cepa se analizó creciendo las células hasta una DO 1,0 a 600 nm en medio rico YEP con alta y baja glucosa. Los resultados del análisis se recogen en la Tabla R-1.5B. Se aprecia que el promotor completo no es capaz de inducir la expresión de la secuencia codificante del gen *LacZ* en ninguno de los medios utilizados. Por el contrario, el fragmento formado por 450 pares de bases del promotor y 267 pares de bases de la secuencia codificante de *Mig2* sí induce la expresión de la proteína β -galactosidasa, indicando que la región localizada entre el ATG y las primeras 267 pares de bases de *MIG2* es esencial para la expresión del gen. Así mismo, podemos observar que, al igual que indicaban los ensayos de RT-PCR, la expresión de *MIG2* es independiente de la fuente de carbono.

Además, se puede observar que la región comprendida entre las bases 16 y 131 posee uno o varios motivos de unión para elementos represores sensibles a la presencia de glucosa. Si se elimina, la tasa de expresión en presencia del monosacárido se incrementa 2,4 veces.

Finalmente, se aprecia que la región localizada entre las bases 16 y 253, también está implicada en la regulación de la expresión aunque, en este caso, es independiente de la fuente de carbono. Si se suprime, la tasa de expresión se incrementa unas 3 veces tanto en alta como en baja glucosa con respecto a los valores mostrados por la cepa FMY513.

Actividad β -galactosidasa (mU/mg proteína) en una cepa silvestre W303.1A		
Cepa	\uparrow Glc	\downarrow Glc
FMY513	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
FMY514	29,75 \pm 2,14	34,44 \pm 1,46
FMY515	70,53 \pm 0,89	44,65 \pm 3,27
FMY516	95,52 \pm 1,49	91,15 \pm 3,64

Tabla R-1.5B: Actividad β -galactosidasa de las cepas FMY513, FMY514, FMY515 y FMY516. El promotor completo es incapaz de inducir la expresión de la proteína β -galactosidasa. Por el contrario, al incluir 267 pb tras el ATG, la secuencia codificante del gen *LacZ* es capaz de transcribirse. Las regiones comprendidas entre las bases 16 y 131 y 16 y 253 poseen uno o varios elementos reguladores.

Dado que las regiones eliminadas de la ORF de Mig2 en las cepas FMY515 y FMY516 contienen posibles zonas de unión para Mig1/Mig2, decidimos integrar las diferentes construcciones utilizadas en el punto anterior en una cepa mutante $\Delta mig1$ y en una cepa doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$. Para ello, se transformaron las cepas indicadas con las construcciones que contienen cada una de los fragmentos del promotor del gen *MIG2* que presentaban actividad reguladora. Las colonias positivas se seleccionaron en medio sólido sin uracilo y se realizó un *Southern Blot* para confirmar que sólo hubieran incorporado una copia del plásmido. Las cepas obtenidas fueron:

Nombre	Genotipo
FMY517	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>prom1MIG2::URA3</i> .
FMY518	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>prom2MIG2::URA3</i> .
FMY519	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>prom3MIG2::URA3</i> .
FMY520	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>mig2::kanMX4</i> ; <i>prom1MIG2::URA3</i> .
FMY521.A	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>mig2::kanMX4</i> ; <i>prom2MIG2::URA3</i> .
FMY522.A	<i>MATα</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>canJ-100</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trpl-J</i> ; <i>ura3-1</i> ; <i>mig1-6J::LEU2</i> ; <i>mig2::kanMX4</i> ; <i>prom3MIG2::URA3</i> .

Tabla R-1.5C: Cepas obtenidas mediante la integración de las construcciones *prom*, *prom1*, *prom2* y *prom3* en el sitio *URA3* de las cepas $\Delta mig1$ y $\Delta mig1/\Delta mig2$. Estas cepas expresan diferentes fragmentos del promotor del gen *MIG2* fusionado en pauta a la secuencia codificante del gen *LacZ*.

Los resultados obtenidos para el mutante $\Delta mig1$ se muestran en la tabla R-1.5D. De nuevo, estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante RT-PCR. Los datos indican que el promotor del gen *MIG2* se encuentra regulado por la proteína Mig1,

aumentando su tasa de expresión en ausencia de la misma 2,6 veces en alta glucosa. Sin embargo, su expresión no se ve modificada cuando la fuente de carbono presente en el medio es glicerol. En ausencia de Mig1, la regulación ejercida por las regiones situadas entre las bases 16 y 131 y 16 y 253 es independiente de la fuente de carbono. Dado que existen variaciones en los niveles de β -galactosidasa dentro de las cepas $\Delta mig1$, la regulación que esta proteína ejerce sobre la expresión de *MIG2* no parece implicar directamente a estas regiones.

Actividad β-galactosidasa (mU/mg proteína) en un mutante $\Delta mig1$		
Cepa	\uparrow Glc	\downarrow Glc
FMY 517	76,80 \pm 3,21	20,64 \pm 1,38
FMY 518	105,08 \pm 5,95	103 \pm 3,24
FMY 519	183,7 \pm 3,16	200,74 \pm 4,76

Tabla R-1.5D: Actividad β -galactosidasa de las cepas FMY517, FMY518 y FMY519. La expresión del gen *MIG2* se encuentra regulada por la proteína Mig1 pero esta regulación no tiene lugar a través de las regiones comprendidas entre las bases 16 y 131 o 16 y 253.

No existen diferencias significativas en la expresión de β -galactosidasa entre el mutante $\Delta mig1$ (Tabla R-1.5D) y el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$ (Tabla R-1.5E), por tanto, Mig1 parece ser el principal regulador de la expresión del gen.

Actividad β-galactosidasa (mU/mg proteína) en un mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$		
	\uparrow Glc	\downarrow Glc
FMY 520	71,03 \pm 0,41	20,71 \pm 2,48
FMY 521.A	91,44 \pm 2,74	140,16 \pm 5,37
FMY 522.A	174,9 \pm 5,24	133,5 \pm 4,53

Tabla R-1.5E: Actividad β -galactosidasa de las cepas FMY520, FMY521.A y FMY522.A. La expresión de la secuencia codificante del gen *LacZ* muestra el mismo patrón en un doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$ y en un mutante simple $\Delta mig1$. El regulador principal de la transcripción del gen *MIG2* parece ser la proteína Mig1.

1.6. Mig1 reprime la expresión del gen *MIG2* a través de su unión a dos sitios de la ORF de Mig2.

Con el fin de determinar aquellas regiones del gen *MIG2* implicadas directamente en la regulación por parte de Mig1, se realizó un experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para su realización se utilizó la cepa W303.1A transformada con el vector episomal pWS93/Mig1 que permite la expresión de dicha proteína fusionada a 3 epítomos HA en el extremo N-terminal bajo el promotor del gen *ADHI* (Alcohol DesHidrogenasa 1). Las colonias positivas se seleccionaron en medio sólido SC sin uracilo y con glucosa al 4%. Posteriormente, las células crecieron en 50 ml de medio de

cultivo YEP con alta glucosa hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0, momento en el cual se dio un pase de una hora a YEP con baja glucosa a la mitad del cultivo.

Las levaduras se procesaron según se indica en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos, obteniéndose al final del ensayo la cromatina inmunoprecipitada con los anticuerpos anti HA en ambas condiciones de crecimiento, esta cromatina se utilizó como DNA molde del experimento. Para realizar el análisis de PCR se utilizaron dos parejas de oligos flanqueantes de dos posibles sitios de unión a Mig1 en la ORF de Mig2 (el sitio 1 comprende las bases desde -387 a -671 y el sitio 2 desde las bases 11 a 380) así como dos oligos flanqueantes del elemento RGT1 del gen *HXX2* a modo de control negativo. También se empleó, como control del procedimiento, la cromatina purificada sin inmunoprecipitar (Input). En la figura R-1.6 se observa cómo se produce amplificación utilizando los oligos de los sitios 1 y 2 del gen *MIG2* en ambas condiciones metabólicas. Al utilizar los oligos del sitio RGT1 en el promotor de *HXX2*, tan sólo hay amplificación en el Input del ensayo.

Este experimento demuestra que la proteína Mig1 se une al promotor del gen *MIG2*, lo cual sugiere que Mig1 ejerce su papel regulador a través de su unión directa a los sitios comprendidos entre las bases -387 y -671 y las bases 11 y 380.

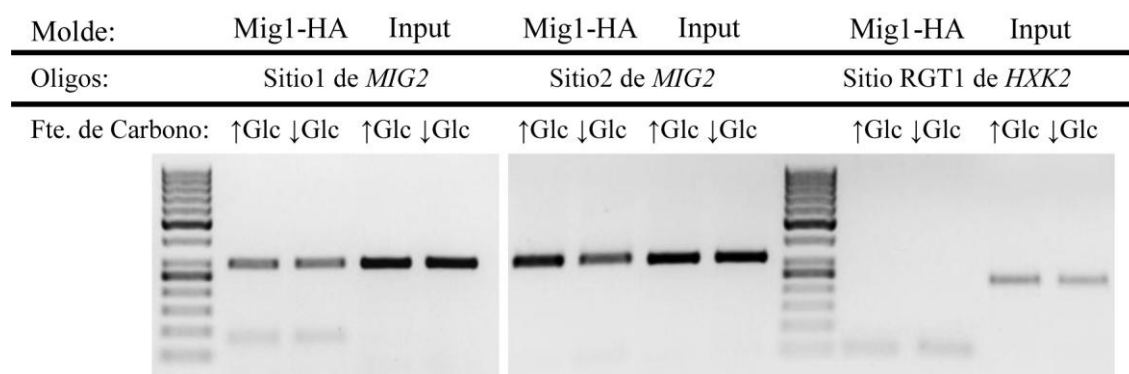


Figura R-1.6: Ensayo de ChIP entre la proteína Mig1 y dos motivos de unión a Mig1 del gen *MIG2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean dos sitios de unión para Mig1 en *MIG2* y RGT1 de *HXX2* (control negativo). El experimento indica que Mig1 se une a la ORF de Mig2 a través de estos dos sitios de manera independiente a la fuente de carbono.

1.7. Las proteínas del heterotrímero Snf1 y Hxk2 forman parte del complejo represor de *MIG2*.

Una vez confirmado el papel que la proteína Mig1 ejerce sobre el gen *MIG2*, quisimos comprobar si esta regulación tenía lugar a través del mismo complejo represor descrito para el gen *SUC2* o si, por el contrario, Mig1 llevaba a cabo su papel a través de una vía diferente. Para ello, realizamos una serie de experimentos de ChIP entre las

proteínas Hxk2, los componentes del complejo Snf1 y los motivos de unión a Mig1 del gen *MIG2* descritos en el apartado anterior utilizando las cepas W303.1A, FMY303 (Snf1-HA), FMY403 (Snf4-HA) y FMY803 (Gal83-HA). Las células crecieron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.6 de Resultados y se procesaron del mismo modo.

Estos experimentos, realizados tanto con Hxk2 como con cada uno de los componentes del complejo Snf1, muestran que las cuatro proteínas forman parte del complejo represor del gen *MIG2* en las condiciones metabólicas estudiadas.

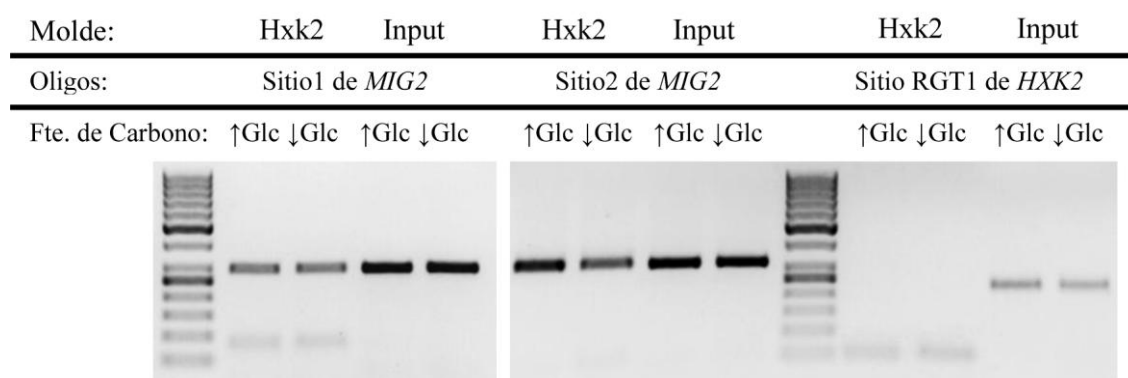


Figura R-1.7A: Ensayo de ChIP entre la proteína Hxk2 y dos motivos de unión para Mig1 del gen *MIG2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean dos sitios de unión para Mig1 en *MIG2* y RGT1 de *HXX2* (control negativo). El experimento indica que Hxk2 forma parte del complejo represor del gen *MIG2* tanto en alta como en baja glucosa.

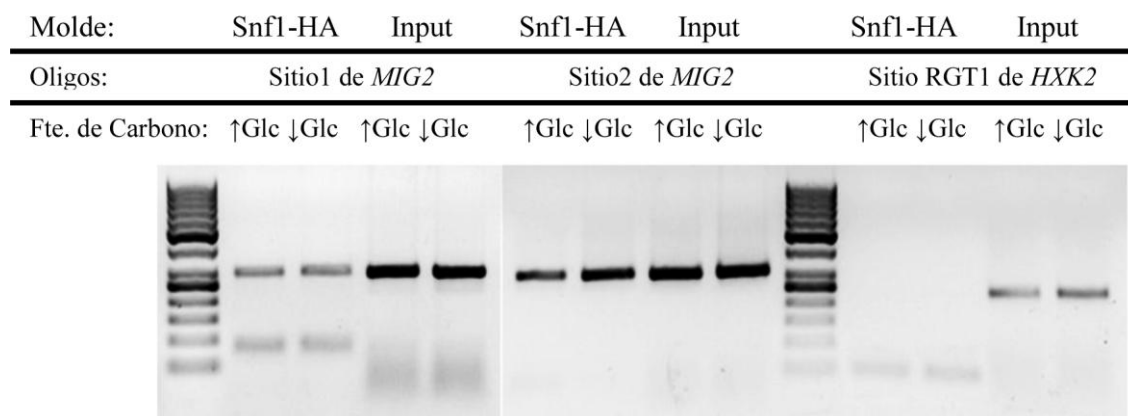


Figura R-1.7B: Ensayo de ChIP entre la proteína Snf1 y dos motivos de unión para Mig1 del gen *MIG2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean dos sitios de unión para Mig1 en *MIG2* y RGT1 de *HXX2* (control negativo). El experimento indica que Snf1 forma parte del complejo represor del gen *MIG2* tanto en alta como en baja glucosa.

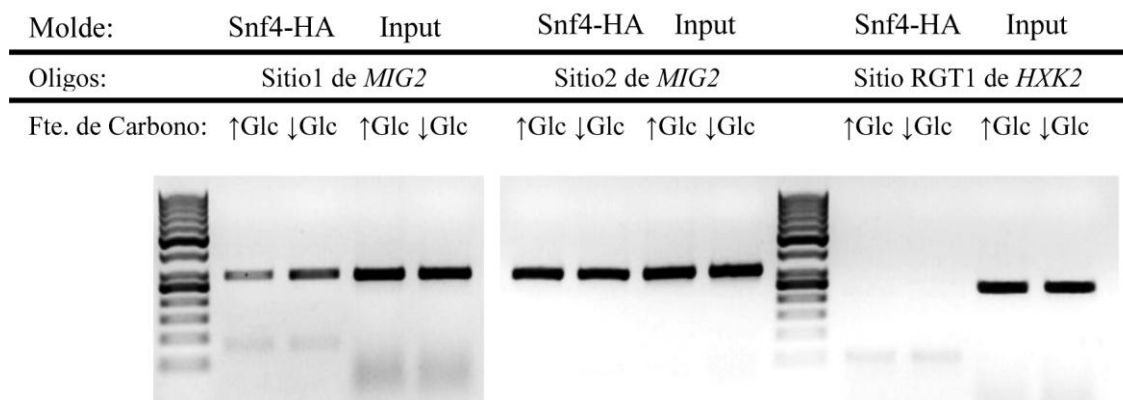


Figura R-1.7C: Ensayo de ChIP entre la proteína Snf4 y dos motivos de unión para Mig1 del gen *MIG2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean dos sitios de unión para Mig1 en *MIG2* y RGT1 de *HXX2* (control negativo). El experimento indica que Snf4 forma parte del complejo represor del gen *MIG2* tanto en alta como en baja glucosa.

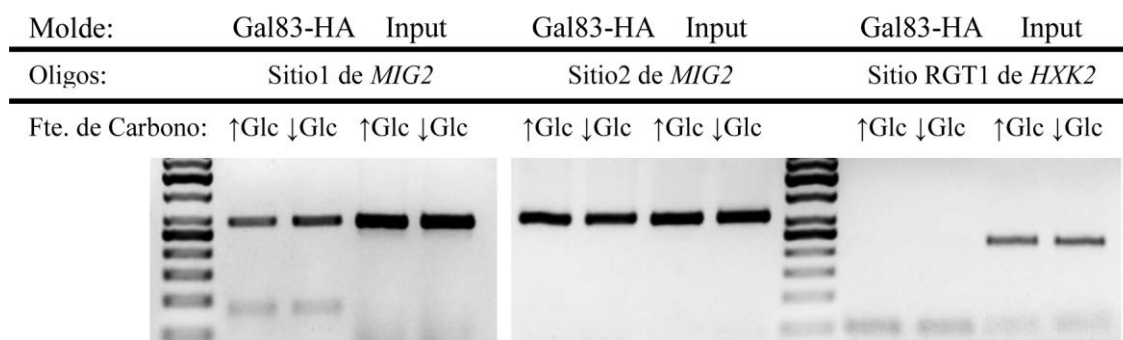


Figura R-1.7D: Ensayo de ChIP entre la proteína Gal83 y dos motivos de unión para Mig1 del gen *MIG2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean dos sitios de unión para Mig1 en *MIG2* y RGT1 de *HXX2* (control negativo). El experimento indica que Gal83 forma parte del complejo represor del gen *MIG2* tanto en alta como en baja glucosa.

1.8. La localización subcelular de Mig2 está regulada por estrés nutricional.

Estudios previos llevados a cabo por Lutfiyya y colaboradores muestran una localización constante e independiente de la fuente de carbono presente en el medio para Mig2 (⁵⁶). Estos estudios fueron llevados a cabo mediante la expresión de una proteína quimérica que contenía la región comprendida entre los aminoácidos 81 y 381 de Mig2, fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) y a la secuencia codificante del gen *LacZ*, dicha proteína se subclonó en un vector episomal.

La expresión mediante vectores episomales provoca una sobreexpresión desregulada del DNA que podría afectar a los resultados obtenidos. El etiquetado genómico, sin embargo, permite el estudio preciso de los niveles, así como de las modificaciones

sufridas por la proteína de interés, algo fundamental cuando se analiza la función de un elemento regulador como es Mig2.

Con el fin de confirmar los resultados mostrados en la bibliografía y comprobar la existencia de factores reguladores de la localización de Mig2, se decidió etiquetar en el genoma con GFP la proteína Mig2 en una cepa silvestre W303-1A y en una cepa mutante $\Delta mig1$. El proceso de etiquetado se llevó a cabo según el método descrito por Mark S. Longtine y colaboradores en 1998 (¹⁹⁷). La técnica consiste en amplificar por PCR un casete que contiene los 45 pares de bases finales de la secuencia codificante del gen *MIG2* en pauta con la proteína GFP (que se incorporará en el extremo carboxilo terminal), un terminador T_{ADH1} , el marcador de selección que precisemos (en nuestro caso el gen *His5⁺* de *S. pombe*) y 45 pares de bases del genoma de la levadura distantes 240 pares de bases del fin de la secuencia codificante de Mig2.

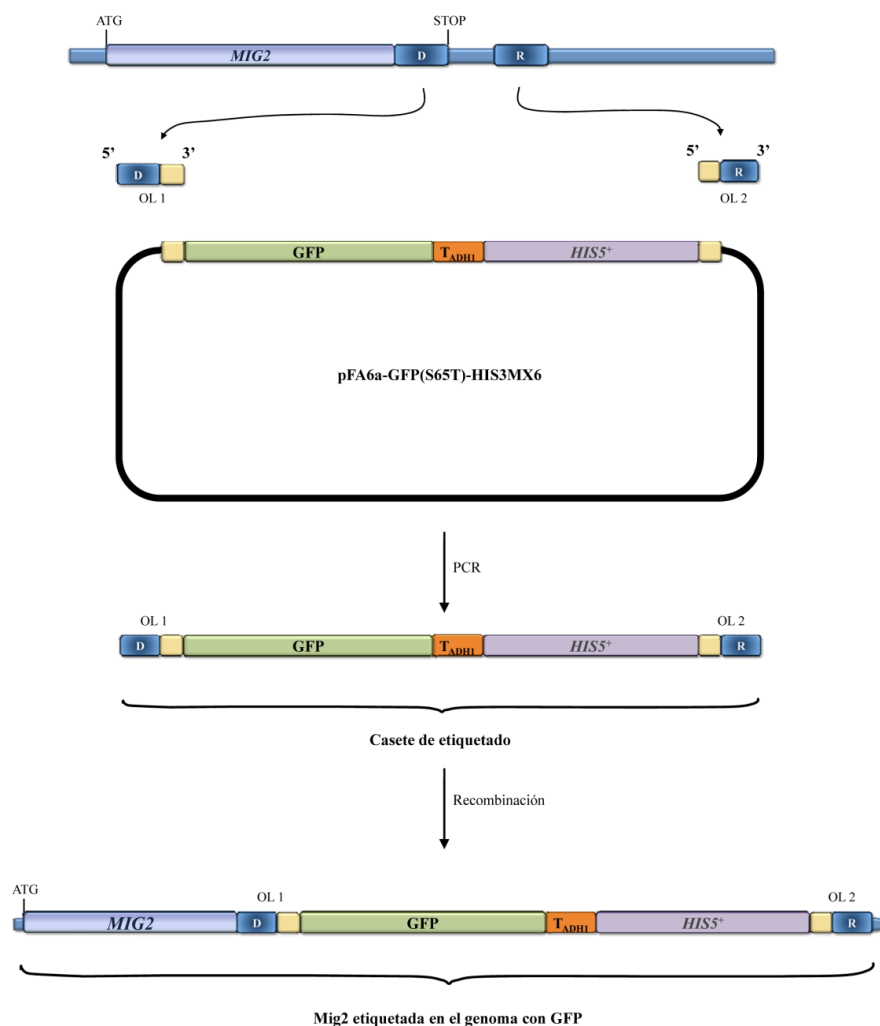


Figura R-1.8A: Esquema del proceso de etiquetado en el genoma de la proteína Mig2 con GFP. Con los oligos OL1 y OL2 se amplifica el casete de etiquetado a partir del vector pFA6a-GFP(S65T)-HIS3MX6. Con el DNA obtenido se transforma la cepa a etiquetar y, tras un proceso de recombinación, algunos de los transformantes presentarán la inserción del casete en el lugar correcto y, por tanto, la proteína de interés etiquetada.

El casete de etiquetado de *MIG2* se obtuvo amplificando el vector pFa6a-GFP(S65T)-HIS3MX6 (cedido amablemente por el Dr. Jürgen Heinisch) con los oligos MIG2-pFA6a-d y MIG2-pFA6a-r, indicados como OL1 y OL2 en el esquema que se muestra a continuación.

Las levaduras transformadas se seleccionaron en placas con medio SC sólido sin histidina y con glucosa al 4%. Posteriormente, la presencia de la inserción en el lugar adecuado se comprobó por PCR utilizando como molde DNA genómico de las células transformadas y oligonucleótidos homólogos al gen de interés (Test-MIG2) y a una región del gen *HIS5*⁺ incorporado en el genoma (His-S1-r) o a una región del gen que codifica para la GFP (OL57) (Fig. R-1.8B). Como se puede ver en la figura R-1.8C, sólo se produce amplificación si se ha etiquetado correctamente la proteína deseada, generándose un DNA de unas 2.100 pb en el caso de los oligos Test-Mig2/His-S1-r y 250 pb en el de Test-Mig2/OL57.

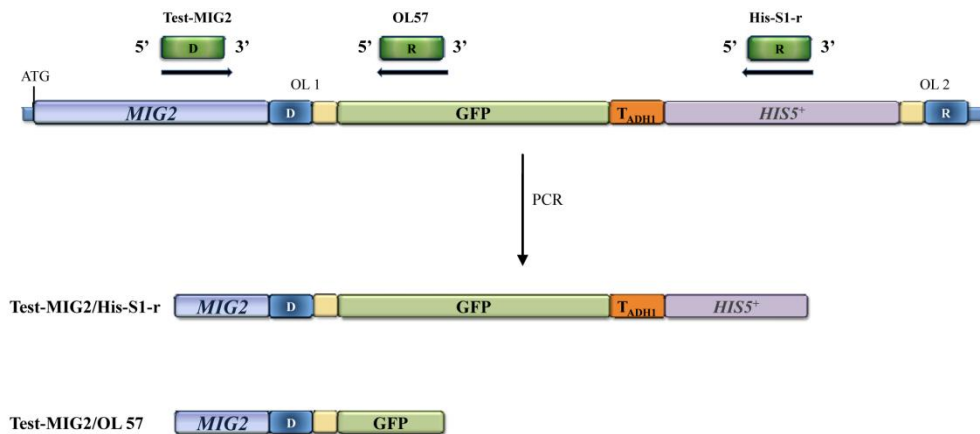


Figura R-1.8B: Esquema del sistema de control del proceso de etiquetado en el genoma de la proteína Mig2 con GFP. Para la comprobación se utiliza un oligo específico de la proteína a etiquetar (Test-MIG2) y otro oligonucleótido bien del gen *HIS5*⁺ (His-S1-r), bien del gen que codifica para la GFP (OL57). Sólo se produce amplificación si la inserción del casete se realiza en el lugar correcto.

Las amplificaciones se comprobaron analizando los productos de PCR de la cepa con el gen *MIG2* etiquetado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 y 2% teñido con bromuro de etidio. En aquellas cepas donde la recombinación se efectuó en un lugar inadecuado, así como en las cepas de origen sin transformar (W303.1A y $\Delta mig1$) no se produjo ningún tipo de amplificación (datos no mostrados). Las cepas generadas se denominaron FMY501 y FMY507.

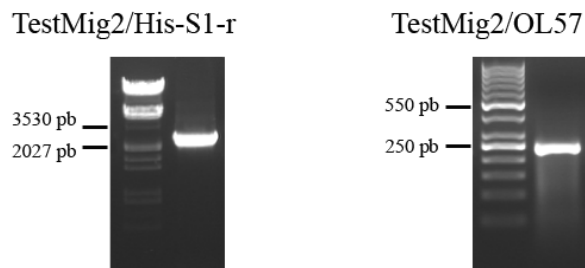


Figura R-1.8C: Comprobación del etiquetado del gen *MIG2* con GFP. La inserción de la etiqueta fue correcta amplificándose tan sólo una banda específica del tamaño predicho en cada ocasión.

Para comprobar que la etiqueta no interfiriera en la capacidad de Mig2 como represor transcripcional, realizamos una serie de ensayos de actividad invertasa tanto en la cepa silvestre W303.1A como en la cepa mutante $\Delta mig1$. En ambos casos, las células crecieron en medio YEP con glucosa hasta una DO a 600 nm de 1,0 y a continuación se realizó un pase a baja glucosa de 1 hora. Tras analizar la actividad invertasa de las dos cepas en ambas condiciones metabólicas, se comprobó que la proteína etiquetada era perfectamente funcional, no presentando las levaduras alteraciones en el patrón de expresión del gen *SUC2* respecto a las cepas origen (W303.1A y $\Delta mig1$).

Una vez obtenida la cepa con la proteína Mig2 etiquetada en el genoma, procedimos a realizar los ensayos de localización subcelular. Para ello, las células se crecieron a 28°C en 15 ml de YEPD durante 16 horas en agitación, hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se obtuvieron las muestras celulares de glucosa y se dio un pase a YEP con baja glucosa al resto del cultivo durante 5 minutos. Posteriormente, se prepararon las muestras y se observaron al microscopio junto con las de glucosa.

Se observó que la proteína Mig2, como estaba descrito, tiene una localización mayoritariamente nuclear cuando crece en presencia de glucosa, aunque también se detecta en el citoplasma celular (Fig. R-1.8D). Contrariamente a lo descrito, cuando el monosacárido no está presente en el medio, Mig2 se encuentra localizada en el citoplasma asociada a estructuras membranosas y, al menos, parcialmente excluida del núcleo.

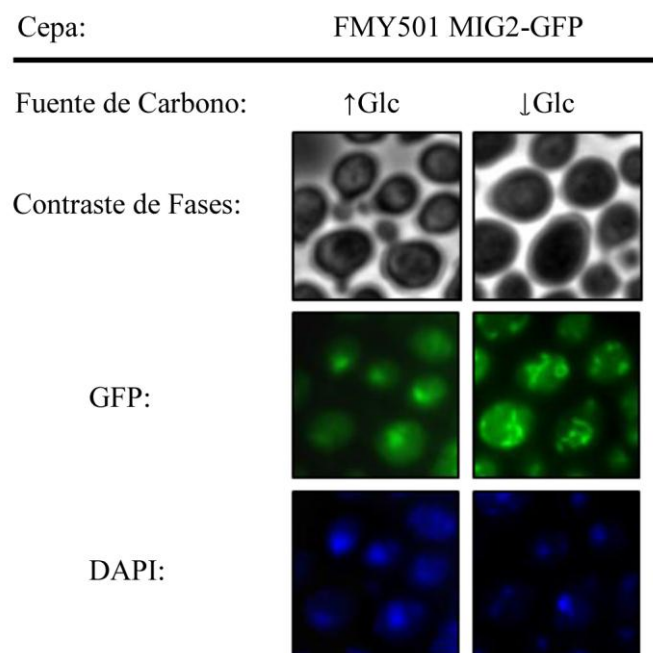


Figura R-1.8D: Localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en una cepa silvestre W303.1A. En alta glucosa la proteína Mig2 presenta localización nuclear, mientras que en baja glucosa se encuentra asociada a estructuras tubulares y, al menos, parcialmente excluida del núcleo.

1.9. Mig2 se encuentra asociada a la red mitocondrial en condiciones de baja glucosa.

A fin de identificar las estructuras a las cuales Mig2 se encuentra asociada, se procedió a transformar la cepa FMY501 con el plásmido pRS316/Su9-FRP. Dicho plásmido centromérico expresa la proteína roja fluorescente (RFP) fusionada a la presecuencia de la subunidad 9 de la F₀-F₁ ATP Sintasa de *Neurospora crassa* bajo el control del promotor de la *ADHI* sirviendo, por tanto, como marcador mitocondrial.

Las colonias positivas se seleccionaron en placa con medio SC sólido sin uracilo y con glucosa al 4%. Las células transformadas crecieron a 28°C en 15 ml de SC sin uracilo, siguiendo la misma metodología indicada con anterioridad. En el apartado anterior observamos que la localización de Mig2 está regulada por estrés nutricional, por tanto, para evitar que las características del medio mínimo pudieran alterar la localización de Mig2, tras alcanzar la densidad óptica deseada, se dio un pase al correspondiente medio complejo YEPD/Y durante 30 minutos. A continuación, se prepararon las muestras y se observaron al microscopio.

Gracias al plásmido pRS316/Su9-FRP, pudimos identificar las estructuras a las cuales se asocia Mig2 como pertenecientes a la red mitocondrial (R-1.9A).

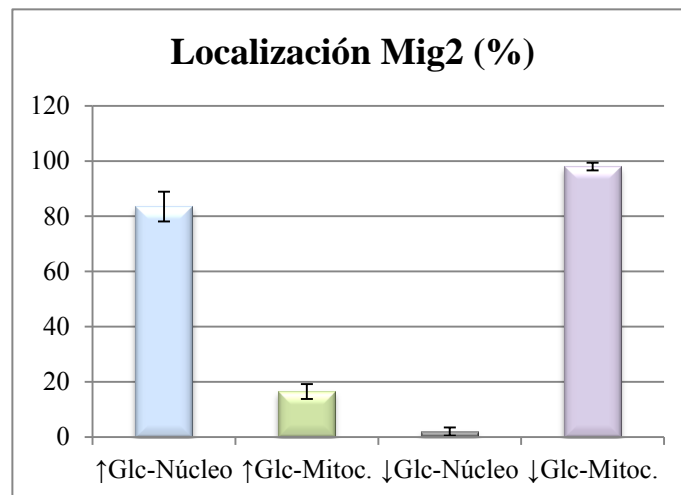
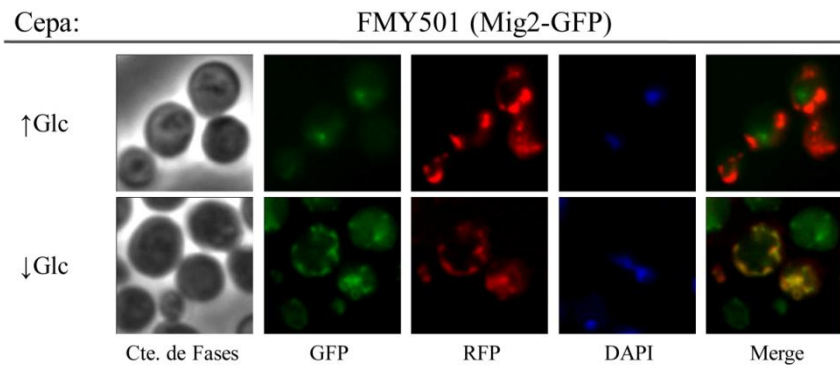


Figura R-1.9A: Localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en células que expresan el marcador mitocondrial pRS316/Su9-RFP. En alta glucosa la proteína Mig2 presenta localización nuclear, mientras que tras un pase de 5 minutos a baja glucosa se encuentra asociada a la red mitocondrial y, al menos, parcialmente excluida del núcleo.

Con el fin de confirmar la asociación de Mig2 a la red mitocondrial procedimos a realizar una purificación de diferentes compartimentos celulares y así determinar la presencia o ausencia de Mig2 en los mismos. Para llevar a cabo este experimento las levaduras crecieron en 400 ml de YEP con alta glucosa hasta alcanzar una DO_{600} de 1,0, momento en el que se dio un pase a YEP con baja glucosa a la mitad del cultivo. Una vez obtenidas ambas muestras, éstas se procesaron de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y Métodos, obteniéndose finalmente extractos enriquecidos en mitocondrias, núcleos o citoplasma celular.

Como se aprecia en la figura R-1.9B, en presencia de glucosa, la mayor parte de Mig2 se encuentra en el núcleo, donde lleva a cabo su papel represor de genes como *SUC2*, mientras que sólo una pequeña parte de la misma se encuentra asociada a las mitocondrias. Una vez que los niveles de glucosa disminuyen en el medio, la cantidad de Mig2 presente en el núcleo desciende drásticamente, resultado acorde con el hecho de que no seamos capaces de detectar su presencia en el núcleo mediante microscopía

de fluorescencia. La cantidad de Mig2 asociada a la red mitocondrial en ausencia de glucosa se incrementa de modo muy acusado.

Para comprobar que el enriquecimiento en las diferentes fracciones celulares es correcto y que no hay contaminación entre las mismas, se utilizaron marcadores específicos de cada compartimento celular. Como marcador mitocondrial se usó Ups1-myc y en el caso del núcleo se escogió la proteína nucleolar Nop1.

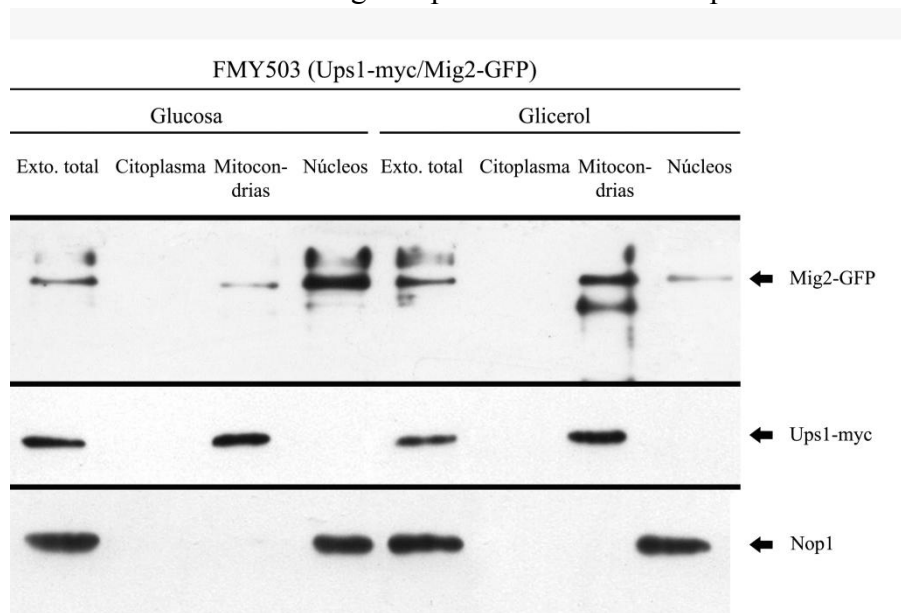


Figura R-1.9B: Localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en distintas fracciones subcelulares. En presencia de glucosa, Mig2 se encuentra en el núcleo mientras que, tras un pase de una hora a baja glucosa, pasa a asociarse a la red mitocondrial y queda parcialmente excluida del núcleo.

1.10. La ausencia de las proteínas Mig1 y Hxk2 dificulta la acumulación de Mig2 en el núcleo en alta glucosa. Por el contrario, la ausencia de Snf1 parece no tener efecto sobre la localización de Mig2.

Con el objeto de averiguar si proteínas indispensables en la señalización por glucosa como Mig1, Hxk2 y Snf1 están implicadas en la localización nuclear de la proteína Mig2, se procedió al etiquetado en el genoma con GFP de las cepas $\Delta h x k 2$ y $\Delta s n f 1$ siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado 1.6 de Resultados.

Las cepas $\Delta m i g 1$, $\Delta h x k 2$ y $\Delta s n f 1$ con la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP se transformaron con el plásmido pRS316/Su9-RFP a modo de marcador mitocondrial. Los transformantes positivos se seleccionaron en placas de medio SC selectivo con alta glucosa, posteriormente, las colonias elegidas se crecieron en 15 ml de medio SC sin uracilo y con alta glucosa. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 1,0, sufrieron un pase de 5 minutos a baja glucosa para, a continuación, ser transferidas al medio complejo correspondiente donde permanecieron

durante 30 minutos más. Posteriormente se prepararon las muestras provenientes de los diferentes medios y se observaron al microscopio.

Como podemos observar en la figura R-1.10A, la proteína Mig2 es incapaz de localizarse en el núcleo en una cantidad perceptible mediante microscopía de fluorescencia, incluso en alta glucosa, en las cepas mutantes $\Delta mig1$ o $\Delta hxx2$. Por el contrario, la ausencia de la subunidad catalítica del complejo Snf1, no parece afectar a la localización nuclear de Mig2.

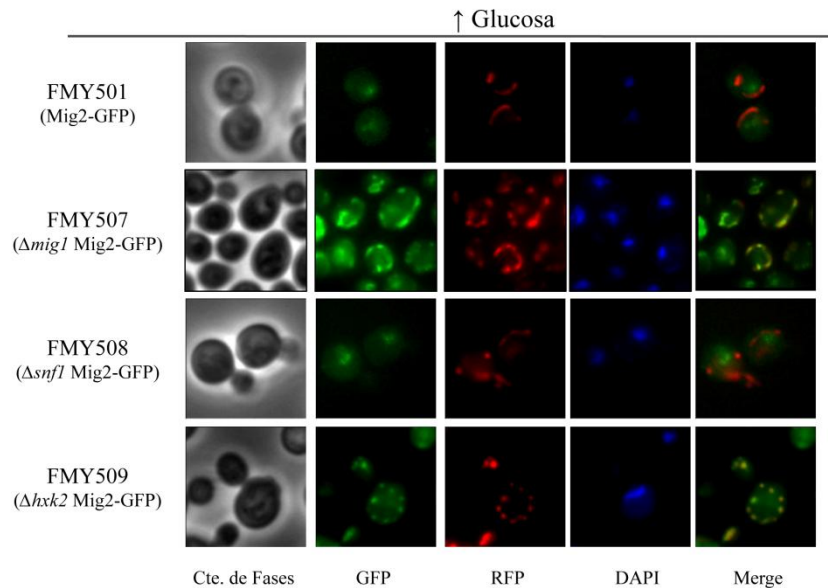


Figura R-1.10A: Localización de la proteína Mig2 etiquetada con GFP en alta glucosa en las cepas mutantes $\Delta mig1$, $\Delta hxx2$ y $\Delta snf1$. La ausencia de las proteínas Mig1 y Hxx2 dificulta la acumulación de Mig2 en el núcleo, de tal manera que no podemos detectarla mediante microscopía de fluorescencia. Por el contrario, la ausencia de Snf1 parece no tener efecto sobre la localización nuclear de Mig2.

Por el contrario, la asociación de Mig2 con la red mitocondrial no se ve comprometida en ausencia de las proteínas Hxx2, Mig1 o Snf1 (Fig. R-1.10B).

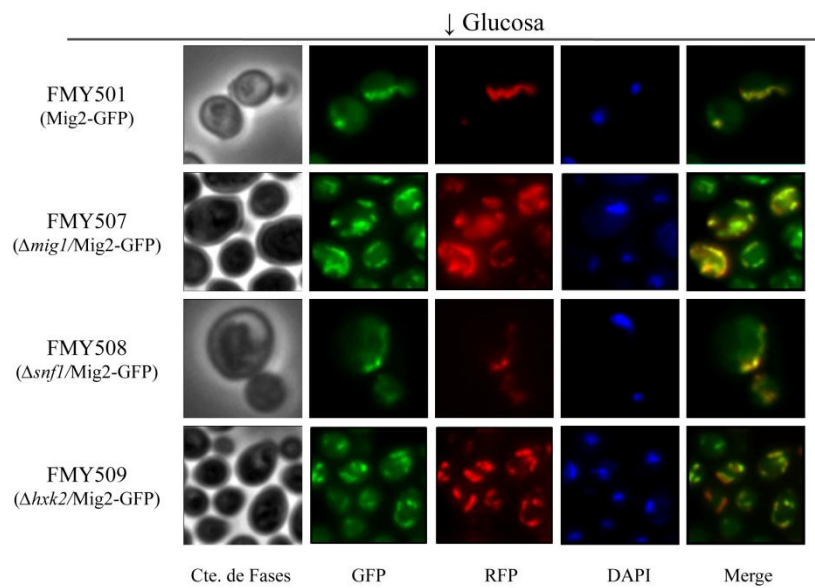


Figura R-1.10B: Localización de la proteína Mig2 etiquetada con GFP en baja glucosa en las cepas mutantes $\Delta mig1$, $\Delta hvk2$ y $\Delta snf1$. En ausencia de glucosa, Mig2 se encuentra asociada a las mitocondrias independientemente de la presencia o ausencia de las proteínas Hvk2, Mig1 y Snf1.

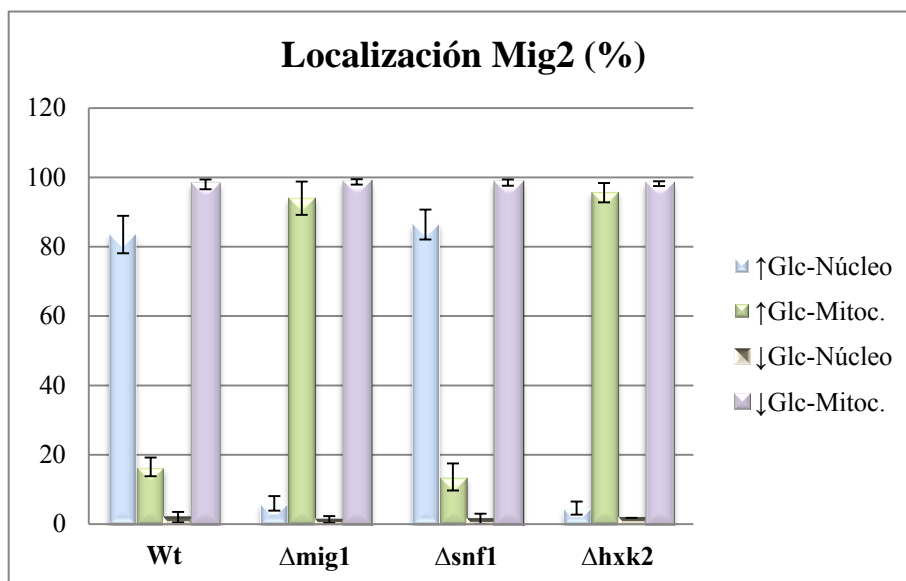


Figura R-1.10C: Estadística de la localización de la proteína Mig2 etiquetada con GFP en alta y baja glucosa en las cepas mutantes $\Delta mig1$, $\Delta hvk2$ y $\Delta snf1$. La ausencia de las proteínas Mig1 y Hvk2 provoca una disminución en la localización nuclear de la proteína de fusión Mig2-GFP, de tal manera que no es posible detectar la presencia de la misma en el núcleo mediante microscopía de fluorescencia.

1.11. La localización subcelular de Mig2 está regulada por estrés oxidativo pero no por estrés osmótico.

Con objeto de comprobar si la localización subcelular de Mig2 está regulada por otros tipos de estrés, además del nutricional, las células se crecieron en YEPD sufriendo un pase a YEPD 5mM H₂O₂ o a YEPD 0,4M NaCl durante 5 minutos. La observación de estas células al microscopio de fluorescencia (Fig. R-1.11A) reveló que, en alta glucosa, la proteína Mig2 modifica su localización en presencia de un inductor de estrés oxidativo como el peróxido de hidrógeno, pasando a asociarse a la red mitocondrial. Por el contrario, no se aprecian modificaciones en cuanto a la localización de esta proteína si el estrés inducido es osmótico.

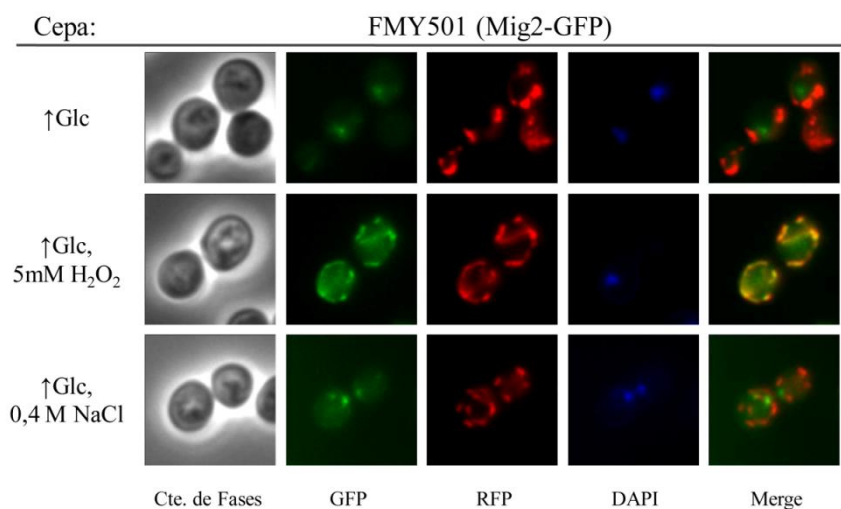


Figura R-1.11A: Localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en alta glucosa y presencia de estrés oxidativo y osmótico. En alta glucosa, Mig2 presenta localización nuclear, que no se ve modificada en condiciones de estrés osmótico. Por el contrario, concentraciones 5mM de H₂O₂ provocan su salida del núcleo y su asociación con la red mitocondrial.

En ausencia de glucosa (Fig. R-1.11B), Mig2 se encuentra siempre asociada a la red mitocondrial. La inducción de estrés osmótico u oxidativo no modifica la capacidad de esta proteína para asociarse a las mitocondrias.

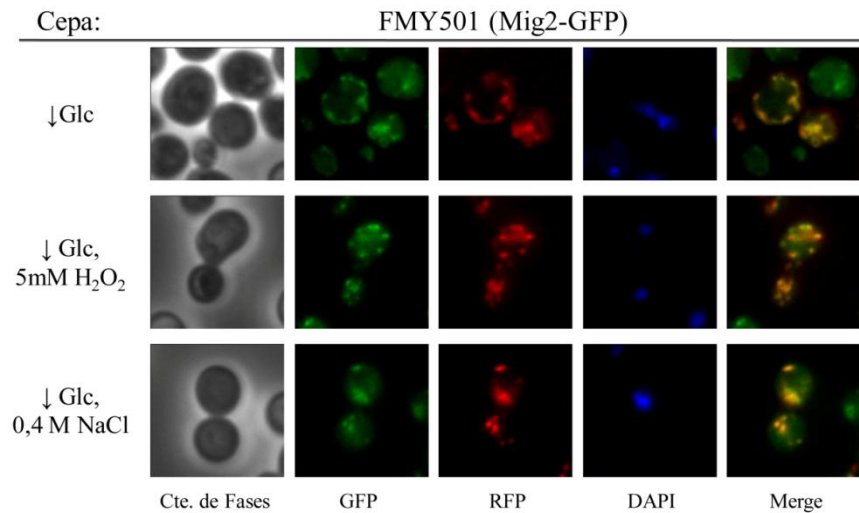


Figura R-1.11B: Localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en baja glucosa y presencia de estrés oxidativo y osmótico. En ausencia de glucosa, la proteína Mig2 se encuentra asociada a la red mitocondrial, no encontrándose esta asociación alterada por estrés oxidativo u osmótico.

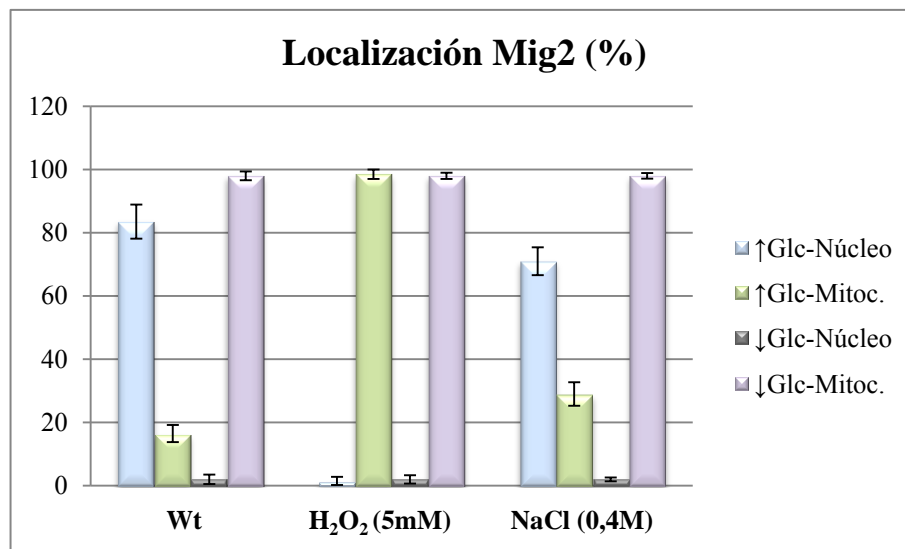


Figura R-1.11C: Estadística de la localización de la proteína Mig2 etiquetada en el genoma con GFP en alta y baja glucosa en presencia de estrés oxidativo y osmótico. En presencia de glucosa y estrés oxidativo Mig2-GFP modifica su patrón de localización pasando a estar asociada a la red mitocondrial, por el contrario, la inducción de estrés osmótico no parece tener efecto sobre la localización de esta proteína. En ausencia de glucosa, la localización mitocondrial de Mig2 no se ve alterada por estrés oxidativo u osmótico.

2. Papel de Mig2 como represor transcripcional.

2.1. Análisis global de la expresión de un mutante $\Delta mig2$ en su adaptación a condiciones de estrés nutricional y oxidativo.

Hasta el momento, el papel de Mig2 como represor transcripcional sólo se ha estudiado desde el punto de vista de su relación y colaboración con la proteína Mig1. Estos estudios, llevados a cabo sobre promotores que presentan posibles sitios de unión tanto para Mig1 como para Mig2, han mostrado que Mig2 actúa como modulador de la proteína Mig1 (⁵⁶), no encontrándose genes regulados exclusivamente por ella. Dado que los estudios previos utilizan una muestra muy sesgada de promotores, en nuestro laboratorio nos planteamos la realización de un análisis general del transcriptoma de *S. cerevisiae*. A través de este análisis intentamos identificar aquellos genes que muestran diferencias en su expresión debido a la delección del gen *MIG2* en diferentes condiciones. Las condiciones estudiadas fueron aquellas en las que observamos una modificación en la localización de la proteína Mig2, es decir, estrés nutricional y estrés oxidativo.

Para llevar a cabo estos estudios, se crecieron en 150 ml de YEP con alta glucosa las cepas BY4741 (Wt) e Y14575 ($\Delta mig2$) hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8, momento en el cual el cultivo inicial se dividió en tres cultivos de 50 ml. La primera muestra continuó creciendo en YEPD, a la segunda muestra se le dio un pase a YEP con glicerol y a la tercera se le adicionó tertbutilo (t-BOOH) hasta una concentración final 0,1 mM. Los tres cultivos permanecieron en las nuevas condiciones durante 30 minutos. Una vez pasado este tiempo, las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se congelaron en nitrógeno líquido.

Las diferentes muestras fueron enviadas al Laboratorio de Chips de DNA del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia, donde se extrajo el mRNA total de las células y se analizó el patrón de expresión de la levadura. Los datos obtenidos se clasificaron en tablas y muestran aquellos genes, agrupados según GOs (*Gene Ontology categories*), que aumentan o disminuyen su expresión respecto a la condición control (cepa silvestre en alta glucosa) (p-valor < 0,05 de acuerdo a un Test-Z). Una vez obtenidos estos datos, se compararon para cada condición la cepa silvestre y la cepa mutante $\Delta mig2$, generando una nueva tabla en la que sólo representamos aquellos genes que modifican su expresión significativamente de manera dependiente de Mig2. (Ver anexos).

Entre los genes que incrementan su expresión en ausencia de Mig2 y condiciones de estrés nutricional, se encuentran aquellos relacionados con el catabolismo de compuestos nitrogenados (p-valor = $3,63 \times 10^{-6}$). Genes implicados en el procesamiento de ncRNA (p-valor = $2,25 \times 10^{-28}$), en la regulación de la fidelidad durante la traducción (p-valor = $1,29 \times 10^{-5}$) y en la biosíntesis de macromoléculas (p-valor = $9,14 \times 10^{-11}$). Todos ellos presentan una menor expresión en un mutante $\Delta mig2$ en ausencia de glucosa.

En la figura R-2.1A podemos ver la representación gráfica que muestra la respuesta en cuanto a modificación en los niveles de expresión de las cepas Wt y $\Delta mig2$ en su adaptación al estrés originado por el cambio de la fuente de carbono presente en el medio.

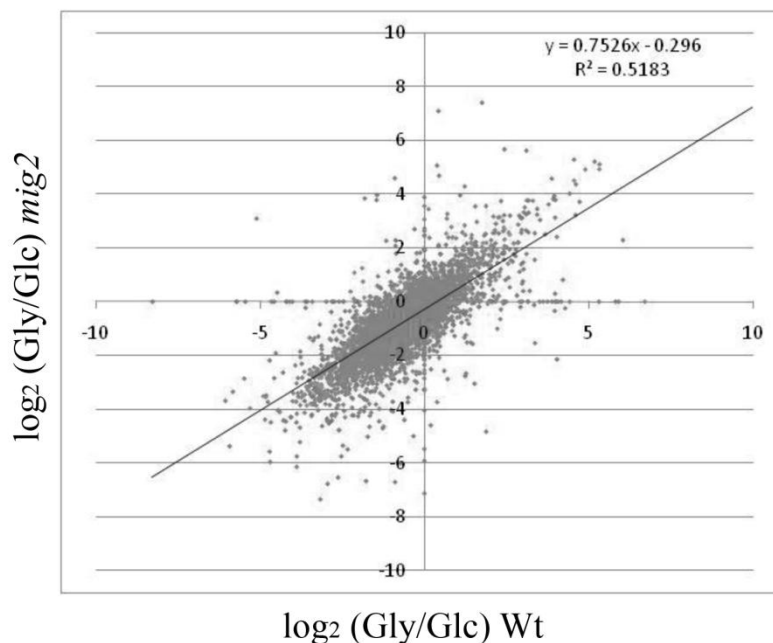


Figura R-2.1A: Comparación de los niveles de expresión entre una cepa silvestre y una cepa mutante $\Delta mig2$ en su adaptación a condiciones de estrés nutricional. En el eje de ordenadas se representan los valores de expresión génica (en forma de logaritmo en base 2) de la cepa mutante $\Delta mig2$, en su adaptación a condiciones de estrés nutricional, mientras que en el eje de abscisas se representan los valores de la cepa silvestre.

En condiciones de estrés oxidativo, encontramos una correlación bastante buena entre las tasas de expresión de la cepa silvestre y el mutante $\Delta mig2$, existiendo sólo algunos puntos dispersos. Estos puntos corresponden a genes que presentan un patrón de expresión alterado debido a la delección de *MIG2*. Entre los alelos que sufren un aumento de expresión encontramos aquellos relacionados con el transporte de hierro (p-valor = $6,63 \times 10^{-6}$) e implicados en la actividad oxidorreductasa a través del enzima peroxidasa (p-valor = $1,26 \times 10^{-5}$). Dentro del conjunto de alelos que disminuyen su expresión hallamos varios relacionados con el ensamblaje ribosómico (p-valor = $7,82 \times 10^{-15}$), el procesamiento y maduración del RNA (p-valor = 10^{-8}), el ensamblaje de orgánulos (p-valor = $1,59 \times 10^{-12}$), el transporte núcleo-citoplasmático (p-valor = $7,9 \times 10^{-8}$) y el metabolismo de los ácidos nucleicos (p-valor = $2,39 \times 10^{-6}$).

La figura R-2.1B muestra la variación de los niveles de RNA de las cepas silvestre y $\Delta mig2$ en su adaptación al estrés oxidativo inducido por tertbutilo.

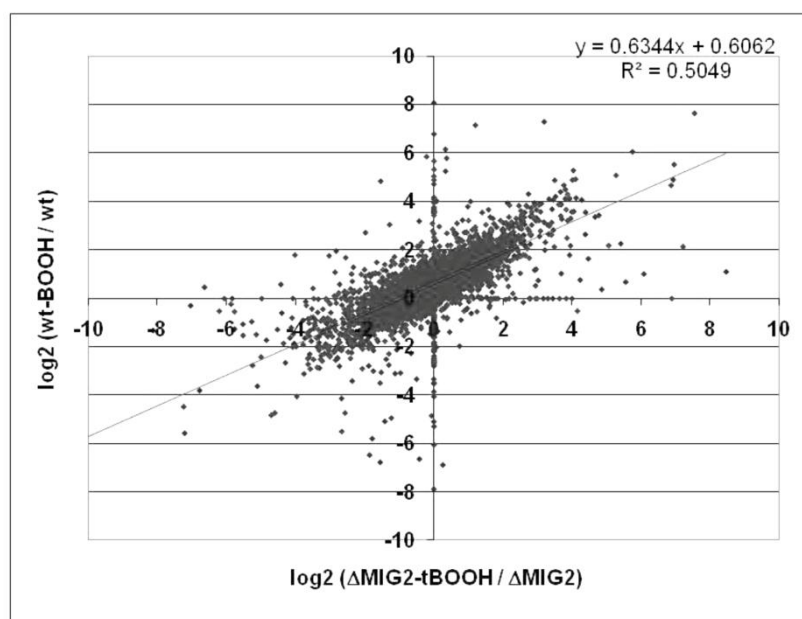


Figura R-2.1B: Comparación de los niveles de expresión entre una cepa silvestre y una cepa mutante *mig2* en su adaptación a condiciones de estrés oxidativo. En el eje de ordenadas se representan los valores de expresión génica (en forma de logaritmo en base 2) de la cepa mutante $\Delta mig2$, en su adaptación a condiciones de estrés oxidativo, mientras que en el eje de abscisas se representan los valores de la cepa silvestre.

2.2. Papel de Mig2 en la represión por glucosa del gen *SUC2*.

Una vez llevado a cabo el análisis global del efecto que sobre los niveles de RNA de la célula tiene la delección del gen *MIG2*, decidimos centrarnos en el estudio de la función que Mig2 tiene como efector de la regulación génica en respuesta a glucosa.

Como gen modelo de la vía represora en *S. cerevisiae* utilizamos *SUC2*, que codifica para la proteína invertasa en sus dos formas (la intracelular y la exocelular) y que fue descrito ampliamente con anterioridad. La elección se debe a que *SUC2* se regula, prácticamente de forma total, por el proceso de represión en presencia de glucosa y, por tanto, ha servido de forma tradicional como modelo para el estudio de dicho sistema.

Estudios previos indican que, si bien la regulación de este gen es llevada a cabo mayoritariamente por el represor transcripcional Mig1, es necesaria la delección simultánea de las proteínas Mig1 y Mig2 para alcanzar los niveles de desrepresión máxima del gen *SUC2*. Dada la escasa información existente sobre el papel de la proteína Mig2 en la represión del mismo, nos planteamos ampliar los conocimientos sobre esta proteína y su implicación en los procesos de represión por glucosa.

2.2.1. La expresión del gen *SUC2* está regulada por Mig2 tanto en alta como en baja glucosa.

Para analizar el papel que juega la proteína Mig2 en la represión por glucosa del gen *SUC2* cuantificamos los niveles de invertasa en alta y baja glucosa en los mutantes $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ y $\Delta mig1/\Delta mig2$, comparándolos con los presentados por una cepa silvestre.

Para ello, la cepa silvestre W303.1A y las levaduras mutantes $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ y $\Delta mig1/\Delta mig2$ se crecieron en 15 ml de YEP con alta glucosa hasta una DO de 1,0 a 600 nm. A continuación, se dio a la mitad del cultivo un pase a YEP con baja glucosa durante una hora y se tomaron las muestras para realizar el ensayo de invertasa tal y como se describe en el apartado 5.4 de Materiales y Métodos.

En la figura R-2.2.1A podemos apreciar que tanto en una cepa silvestre como en un mutante $\Delta mig2$ creciendo en condiciones de alta glucosa, el gen *SUC2* se encuentra reprimido casi en su totalidad (3 U / 100 mg de células). En el mutante $\Delta mig1$ los valores obtenidos se ven incrementados (20 U / 100 mg), mientras que en el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$ se alcanzan los valores máximos de expresión (72 U / 100 mg). Estos datos indican que, en condiciones de alta glucosa, la expresión del gen *SUC2* se encuentra regulada de manera conjunta por las proteínas Mig1 y Mig2, si bien Mig1 sería el represor principal y Mig2 actuaría como modulador.

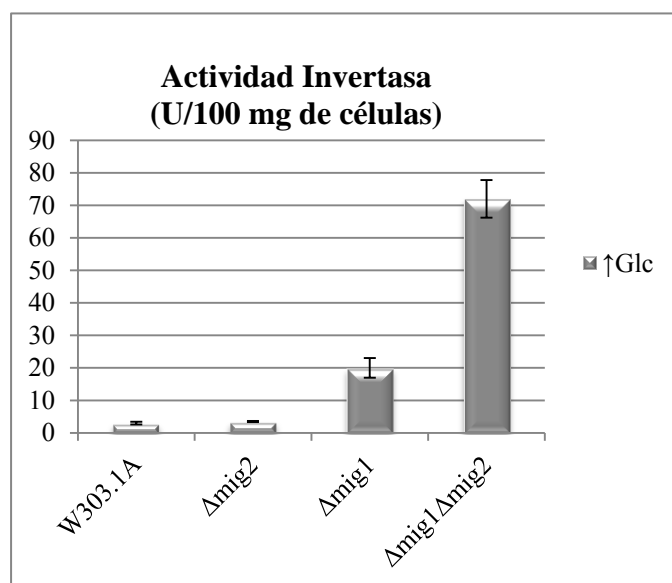


Figura R-2.2.1A: Actividad invertasa en alta glucosa de la cepa silvestre W303.1A y las cepas mutantes $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ y $\Delta mig1/\Delta mig2$. El gen *SUC2* se encuentra reprimido en alta glucosa tanto en una cepa silvestre como en un mutante $\Delta mig2$, esta represión se pierde parcialmente en un mutante $\Delta mig1$ y totalmente en un doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$.

En ausencia de glucosa, el gen *SUC2* se encuentra desreprimido pasando a mostrar unos niveles de expresión del orden de 32 U / 100 mg de células tanto en una cepa silvestre como en un mutante $\Delta mig2$. En el mutante $\Delta mig1$ estos valores alcanzan las 55 U. Finalmente, en el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$ la actividad invertasa de las células es

mucho mayor (del orden de 80 U). Estos datos indican que, en una cepa silvestre, la expresión del gen *SUC2* se encuentra siempre regulada y que Mig1 continúa ejerciendo un papel represor aún en ausencia de glucosa. Por su parte, Mig2 es capaz de complementar en cierta medida la delección de *MIG1* aunque actúa más bien como un modulador de Mig1 ya que el mutante simple $\Delta mig2$ presenta niveles de invertasa idénticos a los mostrados por la cepa silvestre (Fig. R-2.2.1B).

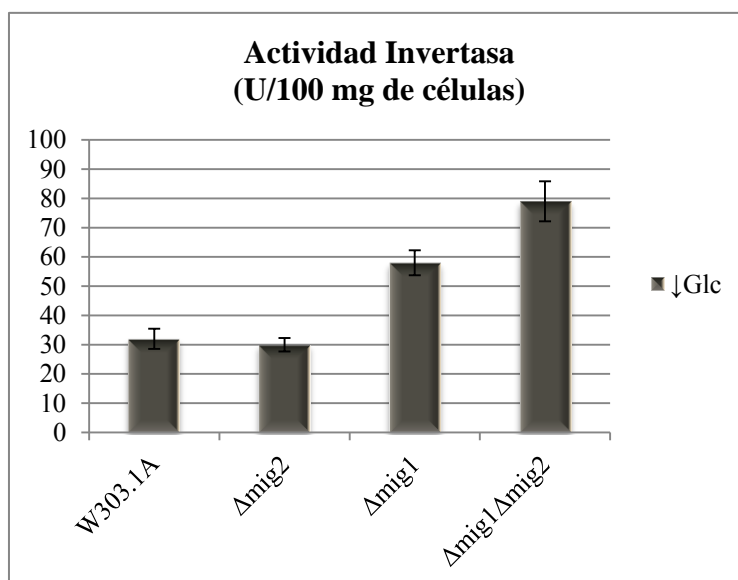


Figura R-2.2.1B: Actividad invertasa en baja glucosa de la cepa silvestre W303.1A y las cepas mutantes $\Delta mig1$, $\Delta mig2$ y $\Delta mig1/\Delta mig2$. El gen *SUC2* mantiene cierta represión en baja glucosa tanto en una cepa silvestre como en un mutante *mig2*, esta represión se pierde parcialmente en un mutante $\Delta mig1$ y totalmente en un doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$.

Una situación similar ocurre cuando se analiza la actividad invertasa de un mutante $\Delta hxx2$ y un doble mutante $\Delta hxx1/\Delta hxx2$. Si se mantienen las mismas condiciones que en el experimento anterior, cuando la glucosa no está presente en el medio, la cepa $\Delta hxx1/\Delta hxx2$ presenta una desrepresión notablemente mayor que una cepa silvestre, manifestando el mutante $\Delta hxx2$ niveles intermedios debido a un fenómeno de complementación provocado por la proteína Hxx1 (Fig. R-2.2.1C). Al igual que sucedía en el caso de la complementación debida a Mig2, un mutante $\Delta hxx1$ presenta actividad invertasa idéntica a la mostrada por una cepa silvestre.

Además de existir una equivalencia funcional Hxx2-Mig1 a nivel de complementación por otras proteínas e influencia sobre la expresión del gen *SUC2*, existe una equivalencia a nivel molecular ya que, al igual que Mig1 influye sobre la expresión de *MIG2*, se sabe que la expresión de *HXX1* está controlada por la proteína Hxx2⁽²²⁰⁾.

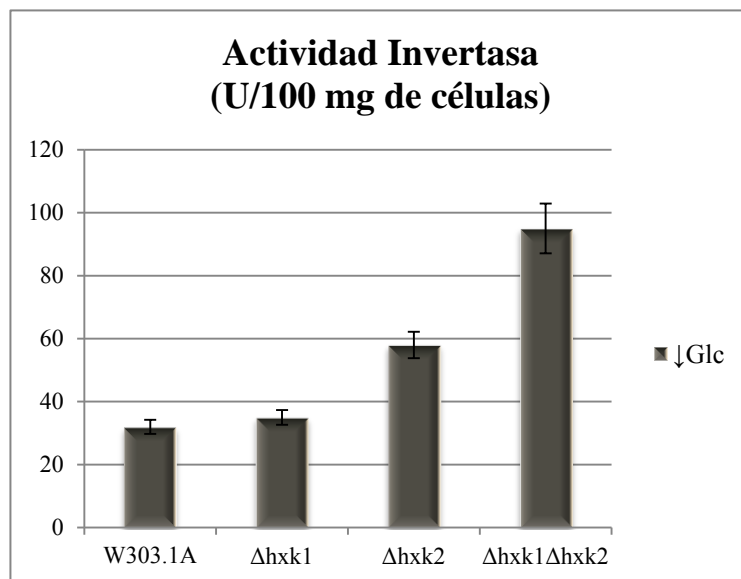


Figura R-2.2.1C: Actividad invertasa en baja glucosa de la cepa silvestre W303.1A y las cepas mutantes $\Delta hvk1$, $\Delta hvk2$ y $\Delta hvk1/\Delta hvk2$. El gen *SUC2*, en una cepa silvestre, mantiene cierto grado de represión aún en baja glucosa, represión que disminuye en un mutante $\Delta hvk2$ y, en mayor medida, en un doble mutante $\Delta hvk1/\Delta hvk2$.

Los resultados obtenidos indican que en una levadura silvestre, el gen *SUC2* se encuentra siempre reprimido, aunque esta represión se pierde parcialmente cuando la célula crece en un medio con muy baja concentración de glucosa. Estos datos indicarían que en aquellas condiciones en las que no somos capaces de apreciar una acumulación de Mig2 en el núcleo mediante microscopía de fluorescencia, como durante el crecimiento en ausencia de glucosa o en el mutante $\Delta mig1$, siempre habría una pequeña cantidad de Mig2 en el núcleo y, al menos una parte, estaría unida al DNA.

2.2.2. La proteína Mig2 es capaz de unirse *in vitro* al promotor del gen *SUC2* a través de los sitios SUC2A y SUC2B de Mig1.

Para confirmar que el efecto de Mig2 sobre la expresión del gen *SUC2* observado en el apartado anterior se debe a la unión directa de Mig2 al promotor del gen *SUC2*, se llevó a cabo un ensayo de retardo de la movilidad electroforética. Para realizar dicho experimento se utilizó Mig2 fusionada a GST producida en *E. coli* (tal y como se indica en el apartado 5.11 de Materiales y Métodos) y oligonucleótidos sintéticos de doble cadena, de 37 y 40 pares de bases, etiquetados con fósforo 32 y conteniendo los sitios SUC2A (-499, -484) y SUC2B (-449, -431). Ambos sitios corresponden a motivos de unión para Mig1. Como competidor frío se utilizaron ambos oligos sin marcar.

Como podemos observar en la figura R-2.2.2, Mig2 es capaz de unirse *in vitro* a ambos motivos de DNA formando complejos específicos como demuestran los ensayos de competencia con oligo frío.

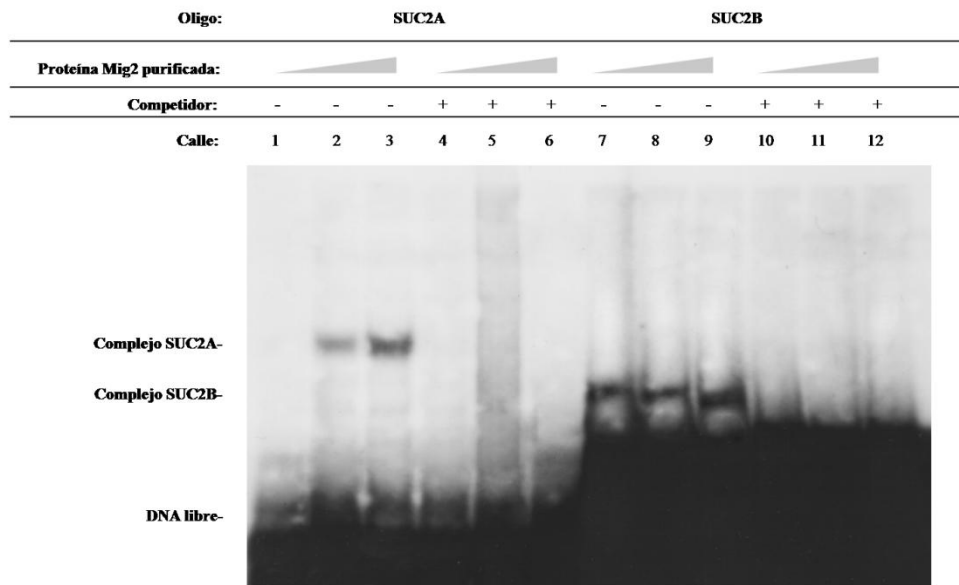


Figura R-2.2.2: Ensayo de retardo de la movilidad electroforética entre la proteína Mig2 y los sitios SUC2A y SUC2B. Mig2 es capaz de unirse *in vitro* de manera directa a los sitios SUC2A y SUC2B.

2.2.3. Mig2 se une al promotor del gen *SUC2* *in vivo* independientemente de la fuente de carbono presente en el medio.

Una vez observada la capacidad de unión por parte de la proteína Mig2 al promotor del gen *SUC2*, quisimos comprobar si esta unión tenía lugar *in vivo*. Para ello se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando la cepa FMY501 (MIG2-GFP).

Las células crecieron en 50 ml de medio de cultivo YEP con alta glucosa hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0, momento en el cual se dio un pase de una hora a YEP con baja glucosa a la mitad del cultivo. Las células se procesaron siguiendo el mismo procedimiento indicado en el apartado 6.3 de Materiales y Métodos, obteniéndose al final del ensayo la cromatina inmunoprecipitada con los anticuerpos anti GFP que sirvió como DNA molde del experimento.

Para realizar el análisis de PCR se utilizó una pareja de oligos que comprendía los sitios SUC2A y SUC2B, así como dos oligos flanqueantes del elemento RGT1 del gen *HXK2* a modo de control negativo. Como control del procedimiento, se empleó la cromatina purificada sin inmunoprecipitar (Input). En la figura R-2.2.3 se observa cómo se produce amplificación utilizando los oligos que incluyen los sitios SUC2A y SUC2B,

en ambas condiciones metabólicas. Si se utilizan los oligos del sitio RGT1 en el promotor del gen *HXX2*, tan sólo hay amplificación en el Input del ensayo.

Este experimento demuestra que la proteína Mig2 regula la expresión del gen *SUC2* tanto en alta como en baja glucosa, a través de su unión a los sitios comprendidos entre las bases -503 y -445. Estos resultados concuerdan con nuestras observaciones en los ensayos de actividad invertasa, donde se detecta siempre una represión del gen *SUC2* por parte de la proteína Mig2 con independencia de las condiciones de crecimiento.

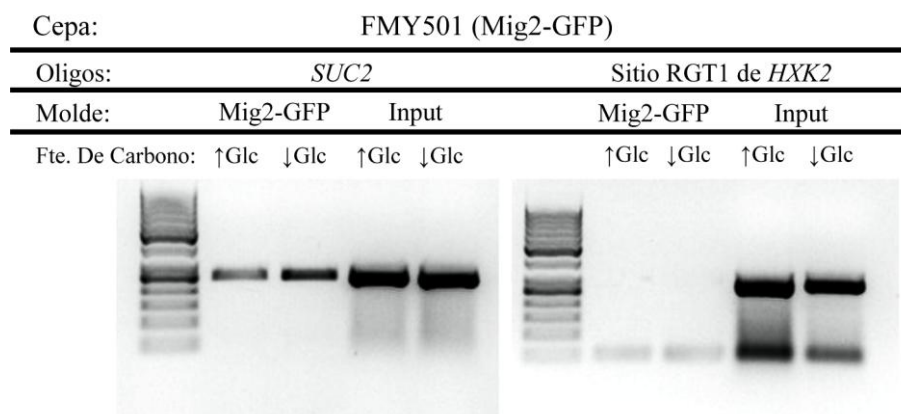


Figura R-2.2.3: Ensayo de ChIP entre la proteína Mig2 y el motivo de unión a Mig1 del promotor *SUC2*. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean el elemento Mig1 de *SUC2* (a la izquierda de la imagen) y RGT1 de *HXX2* (a la derecha).

2.2.4. La ausencia de Mig1, Hxk2 o Snf1 no condiciona la capacidad de unión por parte de la proteína Mig2 al promotor del gen *SUC2*.

Cepas mutantes para los componentes del complejo represor Mig1, Hxk2 y Snf1 muestran patrones de expresión del gen *SUC2* alterados. Con el fin de comprobar si la ausencia de alguna de estas proteínas modificaba la capacidad de unión al promotor del gen *SUC2* por parte de Mig2, realizamos ensayos de ChIP entre Mig2 y el motivo de unión a Mig1 del promotor del gen *SUC2* utilizando las cepas mutantes FMY507 ($\Delta mig1$ /Mig2-GFP), FMY508 ($\Delta snf1$ /Mig2-GFP) y FMY509 ($\Delta h x k 2$ /Mig2-GFP). El ensayo reveló que, en ausencia de Mig1, Snf1 o Hxk2, Mig2 continúa asociándose al promotor de *SUC2* siendo, por tanto, responsable de que la célula siempre mantenga cierto estado de represión sobre el gen.

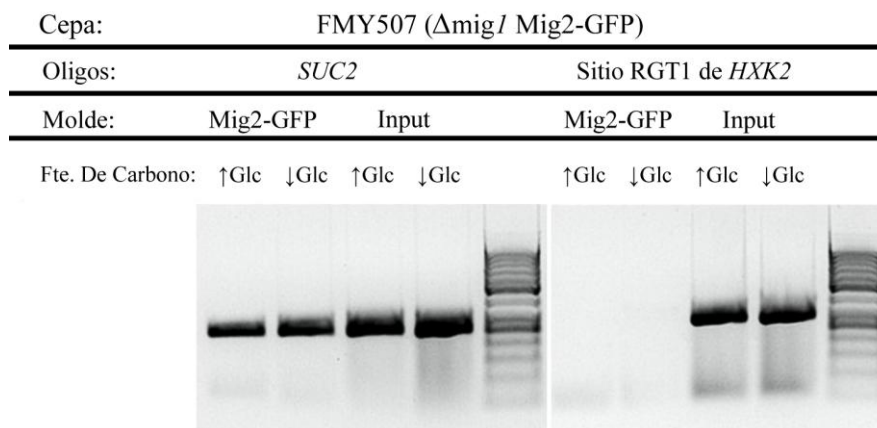


Figura R-2.2.4A: Ensayo de ChIP entre la proteína Mig2 y el motivo de unión a Mig1 del promotor *SUC2* en un mutante $\Delta mig1$. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean el elemento Mig1 de *SUC2* (a la izquierda de la imagen) y RGT1 de *HXX2* (a la derecha).

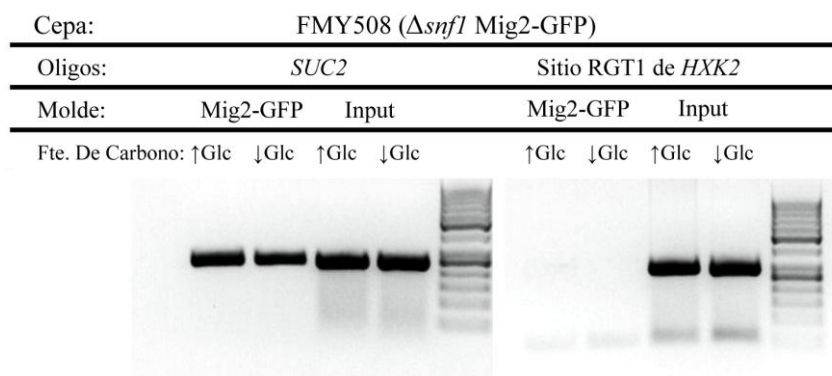


Figura R-2.2.4B: Ensayo de ChIP entre la proteína Mig2 y el motivo de unión a Mig1 del promotor *SUC2* en un mutante $\Delta snf1$. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean el elemento Mig1 de *SUC2* (a la izquierda de la imagen) y RGT1 de *HXX2* (a la derecha).

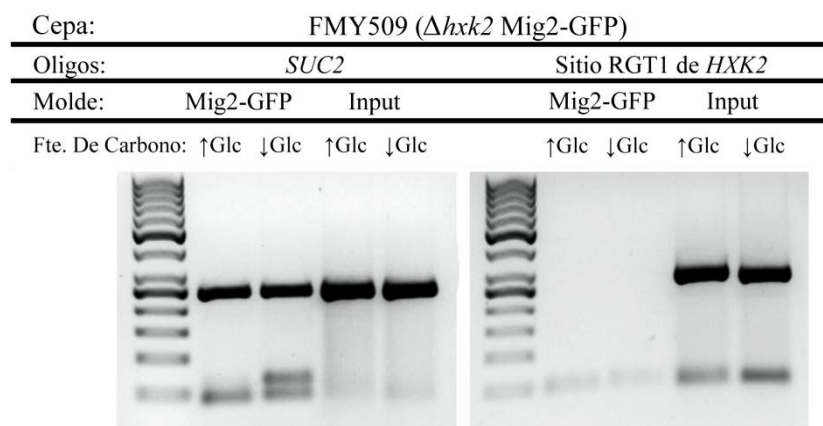


Figura R-2.2.4C: Ensayo de ChIP entre la proteína Mig2 y el motivo de unión a Mig1 del promotor *SUC2* en un mutante $\Delta hxx2$. La imagen muestra una electroforesis en gel de agarosa (2%) de las amplificaciones de una PCR utilizando los oligonucleótidos que flanquean el elemento Mig1 de *SUC2* (a la izquierda de la imagen) y RGT1 de *HXX2* (a la derecha).

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante ensayos EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*; apartado 2.2.2 de Resultados), en los cuales observábamos una unión directa a los sitios SUC2A y SUC2B del promotor del gen *SUC2* por parte de la proteína Mig2 producida en *E. coli*. Por tanto, parece que el complejo represor se une directamente al promotor de este gen a través de Mig1 y de Mig2, no siendo necesarios para esta unión el resto de componentes.

2.2.5. El represor transcripcional Mig1 interacciona con Mig2 en alta y baja glucosa.

Dado el papel cooperativo que Mig1 y Mig2 juegan en la represión del gen *SUC2*, quisimos ahondar más en la relación existente entre estas dos proteínas. Para ello, nos planteamos comprobar si existía una interacción física entre ellas, y de ser así, si el estado de fosforilación de Mig1 regulaba de algún modo esta interacción.

En primer lugar decidimos abordar el estudio de esta interacción mediante un ensayo de coimmunoprecipitación. Para la realización del mismo, se transformó la cepa FMY507 ($\Delta mig1$ /Mig2-GFP) con el plásmido pWS93/Mig1 (permite la expresión de dicha proteína fusionada a 3 epítopos HA en el extremo N-terminal). Las colonias positivas se seleccionaron en medio mínimo sin uracilo y con alta glucosa. A continuación, las levaduras crecieron en 40 ml de SC sin uracilo y con alta glucosa hasta una DO_{600} de 1,0, momento en el que se obtuvieron los extractos celulares de la mitad del cultivo. A los 20 ml restantes se les dio un pase a SC sin uracilo con baja glucosa durante una hora. Finalmente, se obtuvieron los extractos libres de células de la muestra crecida en baja glucosa.

Tras cuantificar la cantidad de proteína en cada extracto, se inmunoprecipitaron con un anticuerpo policlonal anti-Pho4, a modo de control negativo, y con un anticuerpo monoclonal anti-HA durante tres horas a 4°C. A continuación, los extractos se incubaron con la resina proteína *A-Sepharosa* durante la noche. Tras lavar exhaustivamente las muestras con tampón *Staph-A* más deoxicolato sódico, las muestras se prepararon para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFP.

Como se puede observar en la figura R-2.2.5A-B, Mig1 y Mig2 interaccionan tanto en alta como en baja glucosa (calles 1 y 2), no apareciendo banda alguna en las calles inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-Pho4 (calles 3 y 4).

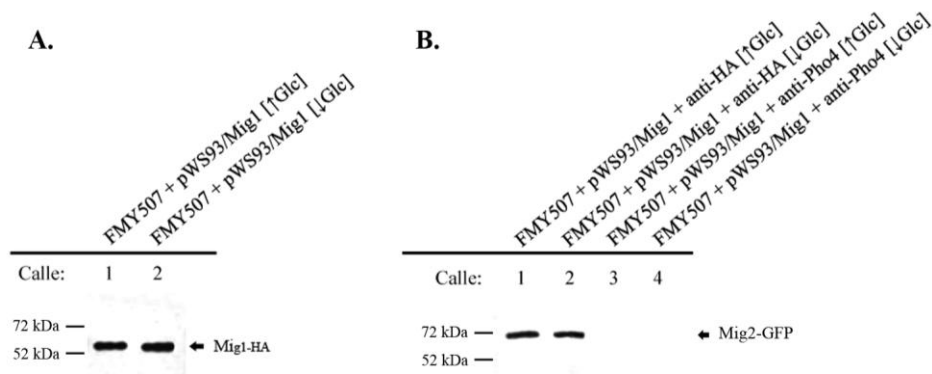


Figura R-2.2.5A: Inmunoprecipitación entre Mig1-HA y Mig2-GFP. La interacción entre ambas proteínas es constitutiva, no apreciándose diferencias en la misma al modificar la fuente de carbono presente en el medio.

Con el fin de confirmar si esta interacción tiene lugar de forma directa o a través de alguno de los factores del complejo represor del gen *SUC2*, se llevaron a cabo una serie de experimentos de doble híbrido. También quisimos averiguar si el estado de fosforilación de Mig1 era crítico para el establecimiento de la interacción entre ambos factores transcripcionales.

Para poder llevar a cabo estos experimentos, se subclonó la secuencia codificante de la proteína Mig2 en el sitio BamHI del vector pGADT7, de la casa comercial Clontech. Esta construcción se utilizó junto con una batería de plásmidos, construidos previamente en nuestro laboratorio, que contenían diferentes fragmentos de la secuencia codificante de la proteína Mig1 subclonados en el vector pGBKT7 (Clontech). Las construcciones mostradas en la figura R-2.2.5B se utilizaron junto con pGADT7/Mig2 para transformar la cepa Y187, efectuándose luego la selección de los transformantes positivos. También se realizaron los consiguientes controles cotransformando dicha cepa con el vector pGADT7 vacío y las cinco construcciones de Mig1 en el vector pGBKT7.

Finalmente, se analizó la posible interacción de las proteínas en un medio SC carente de leucina y triptófano en alta y baja glucosa.

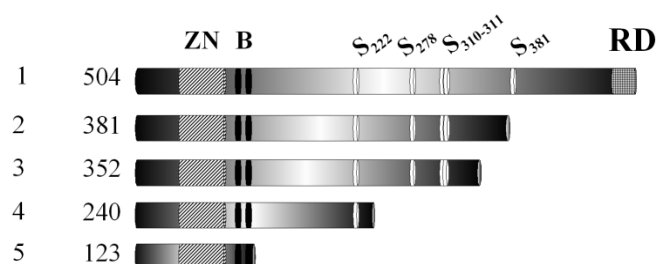


Figura R-2.2.5B: Representación esquemática de las construcciones de la proteína Mig1 utilizadas. En la imagen se muestran las diferentes construcciones de Mig1 indicando las serinas susceptibles de ser fosforiladas por Snf1, así como el dominio de dedos de zinc de Mig1 (ZN), el motivo de unión al DNA (B) y el dominio represor (RD).

Como podemos apreciar en la figura R-2.2.5C, Mig1 y Mig2 son capaces de interactuar *in vivo* tanto en alta como en baja glucosa, aunque esta interacción es ligeramente más intensa en presencia de glucosa. También podemos observar que la ausencia de la región de Mig1 comprendida entre los residuos 240 y 352, si bien no impide la interacción entre ambas proteínas, sí provoca un descenso significativo de la misma. Teniendo en cuenta que en esta región se encuentran localizadas las serinas 278, 310 y 311 de Mig1, es posible que el estado de fosforilación de esta proteína pudiera determinar la intensidad de la interacción entre ambas proteínas.

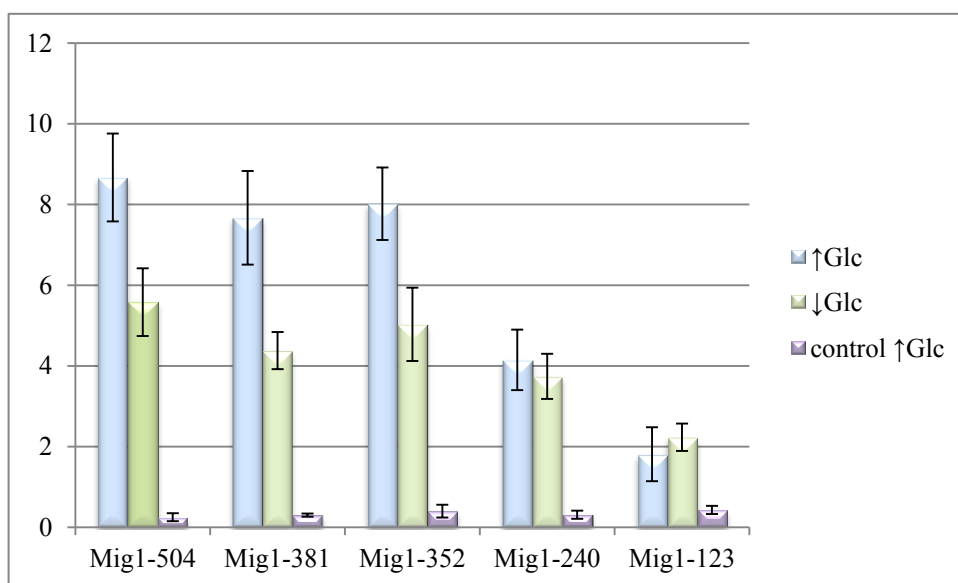


Figura R-2.2.5C: Doble híbrido entre Mig2 y las distintas construcciones de pGBKT7/Mig1. Las barras oscuras muestran los resultados en alta glucosa, las más claras en baja glucosa y las grises la actividad mostrada en el control obtenido al cotransformar las células con el vector pGADT7 vacío y las diferentes construcciones de Mig1.

Teniendo presentes estos resultados, decidimos confirmar si el estado de fosforilación del represor transcripcional Mig1 es determinante en la interacción del mismo con Mig2. Para ello, llevamos a cabo un ensayo de coimmunoprecipitación entre ambas proteínas en los mutantes $\Delta h x k 2$ y $\Delta s n f 1$. Recordemos que en ausencia de la proteína Hxk2, Mig1 se encuentra fosforilado de forma constitutiva, mientras que sufre una constante desfosforilación en ausencia de la quinasa Snf1 (Tesis doctoral de A. Riera. Oviedo, 2007).

Para la realización de este ensayo, se transformaron las cepas FMY508 ($\Delta s n f 1$ /Mig2-GFP) y FMY509 ($\Delta h x k 2$ /Mig2-GFP) con el plásmido pWS93/Mig1. A continuación se obtuvieron los extractos libres de células en alta y baja glucosa, procediendo del mismo modo que en la cepa silvestre. Cantidades equivalentes de estos extractos se inmunoprecipitaron con 1,5 μ l de un anticuerpo monoclonal anti-HA durante 3 horas. Tras este tiempo, se añadieron 100 μ l de la resina proteína A-Sepharosa y se dejaron en contacto con ella durante toda la noche.

Tras lavar exhaustivamente las muestras con tampón *Staph-A* más deoxicolato sódico, éstas se procesaron para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP.

Como podemos observar en la figura R-2.2.5D, el estado de fosforilación de la proteína Mig1 es importante, pero no determinante, para la interacción de la misma con Mig2. En un mutante $\Delta h x k 2$, donde Mig1 se encuentra fosforilada de forma constitutiva, se aprecia cierta interacción entre ambas proteínas (calles 1 y 2) aunque la intensidad de la misma disminuye de forma considerable respecto a la observada en el mutante $\Delta s n f 1$, donde Mig1 está siempre desfosforilada (calles 3 y 4). No se aprecia señal alguna en las calles correspondientes a los controles negativos (calles 5-8).

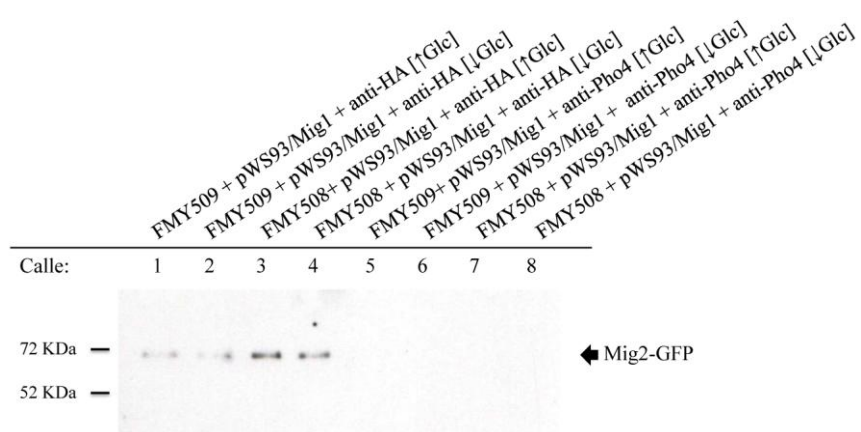


Figura R-2.2.5D: Inmunoprecipitación entre Mig1-HA y Mig2-GFP en las cepas FMY509 ($\Delta h x k 2$ /Mig2-GFP) y FMY508 ($\Delta s n f 1$ /Mig2-GFP). La proteína Mig2 es capaz de interaccionar con el represor Mig1 tanto en su estado fosforilado (calles 1 y 2) como desfosforilado (calles 3 y 4), aunque en este último caso, la intensidad de la interacción es mayor.

Por tanto, parece que ambos represores interaccionan de forma mayoritaria cuando Mig1 se encuentra desfosforilado, condición en la que el represor se localiza en el núcleo. Estos resultados parecen indicar que la interacción entre Mig1 y Mig2 tiene lugar, de forma mayoritaria, a nivel del complejo represor de aquellos genes regulados por ambas proteínas (como es el caso del gen *SUC2*).

2.2.6. Mig2 interacciona con las proteínas Hxk2 y Snf1, tanto en alta como en baja glucosa.

Una vez confirmada la interacción entre las proteínas Mig1 y Mig2, nos propusimos profundizar más en la relación de Mig2 con los componentes del complejo represor del gen *SUC2*. Para ello, nos planteamos estudiar las posibles interacciones entre Mig2 y las proteínas Hxk2 y Snf1 y, de existir éstas, determinar si se encuentran reguladas por glucosa.

En primer lugar, para determinar si existe interacción con la proteína Hxk2, realizamos un ensayo de coimmunoprecipitación. Para ello, se prepararon extractos de la

cepa W303.1A del mismo modo que en el apartado anterior, inmunoprecipitándose a continuación con un anticuerpo policlonal anti-Hxk2 por un lado y anti-Pho4 por otro durante tres horas. Pasado este tiempo, se añadió la resina con proteína *A-Sepharosa* permaneciendo en contacto con el extracto durante toda la noche. Al día siguiente, los extractos se lavaron de manera exhaustiva y se prepararon las muestras para su análisis *Western Blot*. Las películas se revelaron usando un anticuerpo policlonal anti-GFP.

Como podemos observar en la figura R-2.2.6A-B, Mig2-GFP y Hxk2 interaccionan, tanto en alta como en baja glucosa (calles 1 y 2), aunque parece que en ausencia de glucosa esta interacción es ligeramente menor. Mientras que en las calles correspondientes a los controles negativos no se aprecia banda alguna (calles 3 y 4).

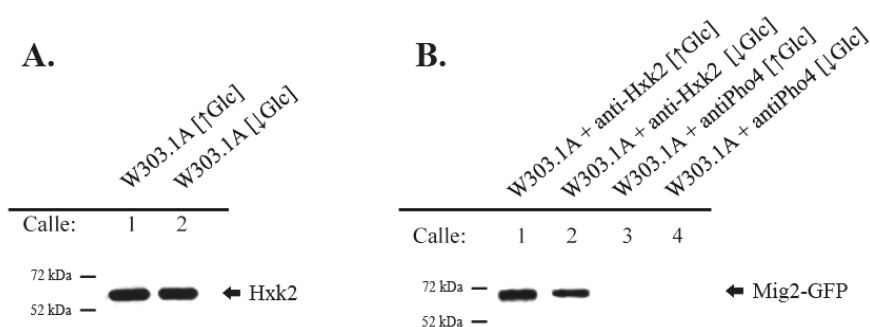


Figura R-2.2.6A: Inmunoprecipitación entre Mig2-GFP y Hxk2. Ambas proteínas interaccionan de manera constitutiva, aunque esta interacción parece algo menor en baja glucosa.

Además de con Mig1 y Hxk2, se estudió la posible interacción de Mig2 con la subunidad catalítica del complejo Snf1. Las condiciones experimentales fueron idénticas a los casos descritos, pero en este caso se utilizó la cepa FMY508 (*snf1*/Mig2-GFP) transformada con el plásmido episomal pWS93/Snf1. Una vez obtenidos los extractos proteicos, se inmunoprecipitaron con un anticuerpo monoclonal anti-HA y como control se utilizó el anticuerpo policlonal anti Pho4.

Como se aprecia en la figura R-2.2.6B-B, Mig2 interacciona con Snf1 de manera independiente a la fuente de carbono presente en el medio (calles 1 y 2). Igual que ocurre con Mig1 y Hxk2, esta interacción parece algo menor en ausencia de glucosa (calle 2). De nuevo, no se aprecia señal alguna en los controles negativos (calles 3 y 4).

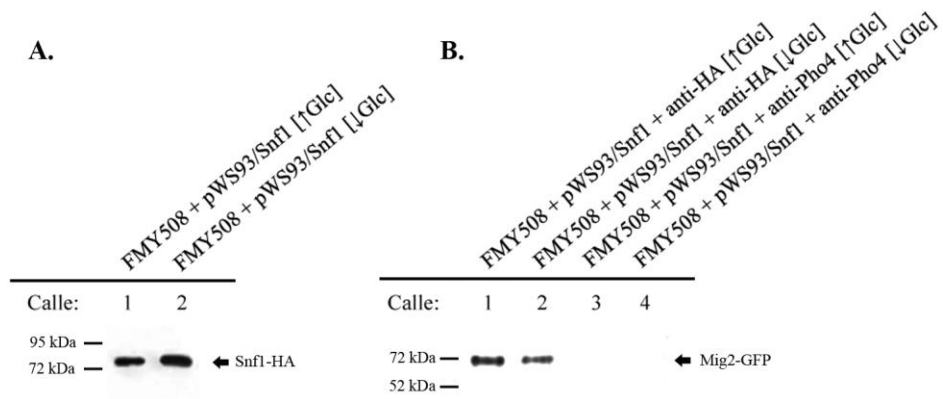


Figura R-2.2.6B: Inmunoprecipitación entre las proteínas Mig2-GFP y Snf1-HA. Se detecta interacción entre ambas proteínas de manera constitutiva.

3. Estudio de los mecanismos de importación y exportación nuclear de la proteína Mig2.

Como ya se comentó a lo largo de la introducción, determinadas moléculas como iones y macromoléculas con un tamaño inferior a los 40 kDa son capaces de difundir de forma pasiva a través del poro nuclear. Por el contrario, moléculas con un tamaño superior o, proteínas con función nuclear, precisan de un transporte activo para traspasar la envoltura nuclear. Este transporte activo es llevado a cabo por proteínas de la familia de las Carioferinas, recibiendo el nombre de importinas o exportinas dependiendo de la dirección del transporte. Mientras que la localización de una proteína nuclear viene determinada por la presencia de señales dianas para estas Carioferinas (NLSs o NESs), la direccionalidad de este transporte es dependiente de un gradiente de RanGTP.

La mayor parte de los factores transcripcionales presentan una regulación dependiente de su localización. Tal es el caso de la proteína Mig1, cuya función como regulador transcripcional está asociada a su localización nuclear o citoplasmática. Los primeros estudios que relacionan la señalización por glucosa con el tráfico nuclear datan del año 1997 (³¹). En este trabajo se muestra como Mig1 en su estado fosforilado y, por tanto, no unido al DNA, es capaz de unirse a la Carioferina Msn5 que permite su salida hacia el citoplasma. Por el momento, no se conoce la importina implicada en la localización nuclear de Mig1. Otros estudios llevados a cabo con Gal83 muestran que esta proteína presenta una NES en la región N-terminal, independiente de Snf1 y cuya mutación tiene por efecto su acumulación en el interior nuclear (²²¹). La salida de Gal83 del núcleo tiene lugar a través de la exportina Xpo1.

Teniendo en cuenta estos datos, así como las diferentes localizaciones presentadas por la proteína Mig2, nos pareció interesante abordar el estudio de los mecanismos de importación y exportación nuclear implicados en la localización de Mig2 y, por tanto, en la regulación de su función.

3.1. Estudio de los mecanismos de importación nuclear de la proteína Mig2.

3.1.1. La Carioferina Msn5 no está implicada en el transporte núcleo-citoplasmático de Mig2.

En apartados previos se mostró que Mig2 presenta dos nichos celulares. Por un lado tiene localización nuclear en presencia de alta glucosa, pasando a estar asociada a la red mitocondrial en ausencia de dicho monosacárido o en situaciones de estrés oxidativo. Debido a su función nuclear como represor transcripcional, y al hecho de tener un tamaño superior a 40 kDa, es probable que esta proteína no sea capaz de difundir de forma pasiva a través de la envoltura nuclear y precise de un transporte activo.

Dada la homología que Mig2 presenta con Mig1 y teniendo en cuenta que Msn5 es la única Carioferina capaz de actuar tanto de importina como de exportina, nos planteamos la posibilidad de que Msn5 pudiera estar implicada en la localización nuclear de Mig2, bien a través de su exportación, bien de su importación. Para comprobar esta hipótesis, etiquetamos en el genoma el locus de Mig2 con la secuencia codificante de la proteína GFP en una cepa mutante $\Delta msn5$ (siguiendo el mismo esquema mostrado en el apartado 1.8 de Resultados). Esta cepa recibió el nombre de FMY535.

A continuación, las levaduras se crecieron en 15 ml de medio YEP con alta glucosa a 28°C hasta una DO_{600} de 1,0, momento en que se obtuvieron las muestras de glucosa y se dio un pase a YEP con baja glucosa al resto del cultivo, permaneciendo las células en estas condiciones durante una hora. Finalmente, se prepararon las muestras de baja glucosa y se observaron al microscopio junto con las de alta glucosa.

Como se aprecia en la figura R-3.1.1, en una cepa mutante para la Carioferina Msn5 Mig2 mantiene el mismo patrón de localización que en una cepa silvestre. En alta glucosa Mig2 se localiza en el núcleo, por tanto, Msn5 no parece estar implicada en la importación nuclear de Mig2. Cuando la glucosa en el medio disminuye, Mig2 es capaz de salir del núcleo y asociarse a la red mitocondrial, indicando que Msn5 no participa en la exportación de la misma.

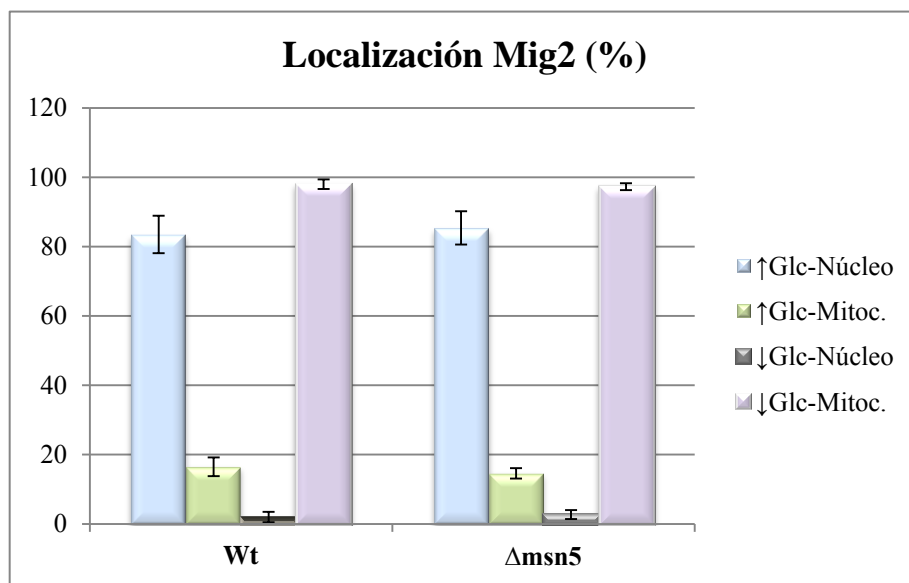
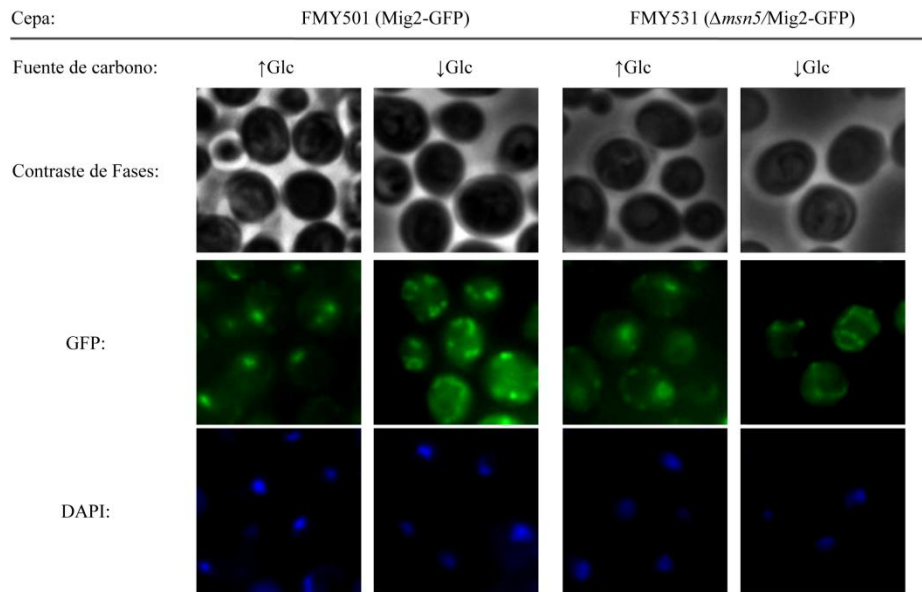


Figura R-3.1.1: Localización de la proteína Mig2-GFP en las cepas FMY501 (WT) y FMY535 ($\Delta msn5$). La proteína Mig2 mantiene su patrón de localización, tanto en alta como en baja glucosa, en ausencia de la Carioferina Msn5.

3.1.2. La importación nuclear de Mig2 en *S. cerevisiae* está mediada por Kap95.

Dado que la distribución subcelular de la proteína Mig2 no se encuentra alterada en un mutante $\Delta msn5$ y que, por tanto, ésta no es la Carioferina responsable de su localización nuclear, nos propusimos identificar la importina implicada en la entrada de Mig2 al interior del núcleo celular. En primer lugar, llevamos a cabo un análisis

bioinformático de la secuencia aminoacídica de Mig2 con el fin de encontrar posibles secuencias de localización nuclear (NLSs) que pudieran informarnos acerca del sistema de importación utilizado por esta proteína. Este análisis permitió la identificación de dos posibles motivos de localización nuclear que se ajustan a la secuencia consenso $K(K/R)_x(K/R)$ (NLS-clásica). Debido a que este tipo de secuencias son características del sistema de importación Kap60-Kap95 (apartado 2.4 de la Introducción), decidimos comprobar si Kap95 estaba, de alguna manera, implicada en la importación de Mig2.

Kap95 es una proteína indispensable para la supervivencia celular, por tanto, para abordar estos estudios nos servimos de una cepa mutante termosensible para Kap95. En primer lugar, etiquetamos en dicha cepa el gen *MIG2* con GFP (usando como marcador el gen *KANMx6*). La cepa obtenida recibió el nombre FMY527. A continuación, se transformó esta cepa con el vector pRS316/Su9-RFP a modo de marcador mitocondrial. Los transformantes positivos se seleccionaron en placas de medio SC selectivo con alta glucosa, posteriormente, las colonias seleccionadas se crecieron en 20 ml de medio SC sin uracilo ni histidina y con alta glucosa a temperatura permisiva (22°C). Cuando las células alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0,8, sufrieron un pase de 5 minutos a baja glucosa. Ambos cultivos se dividieron, obteniéndose 4 muestras de 5 ml y se les dio un pase al medio complejo correspondiente donde permanecieron 15 minutos, dos de las muestras a 22°C y las otras dos muestras, correspondientes a la temperatura restrictiva, a 37°C. Finalmente, se prepararon las muestras provenientes de las diferentes condiciones y se observaron al microscopio.

Los estudios de fluorescencia muestran que, como se esperaba, a temperatura permisiva Mig2 presenta localización nuclear en alta glucosa y mitocondrial en ausencia de la misma (figura R-3.1.2A). Por el contrario, Mig2 pierde la localización nuclear a temperatura restrictiva, lo que sugiere que Kap95 es la importina responsable de la entrada de Mig2 al interior del núcleo celular.

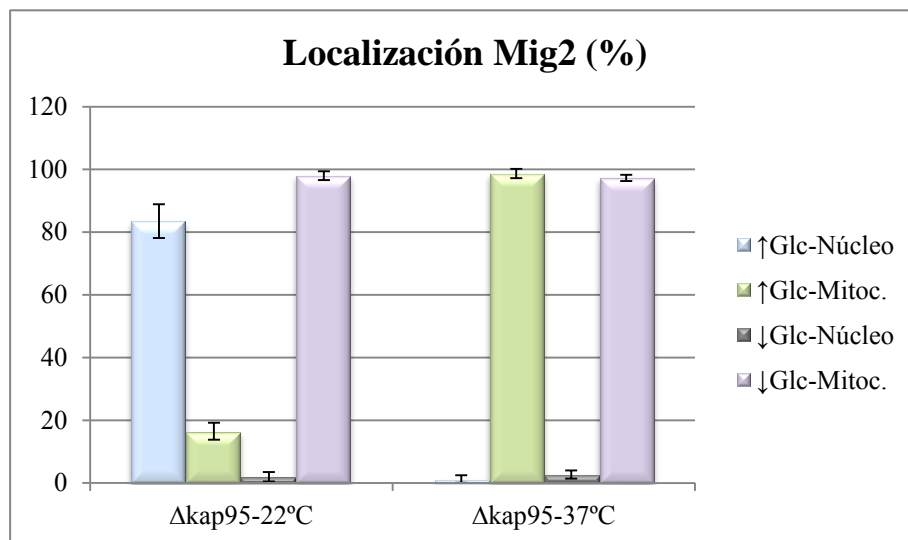
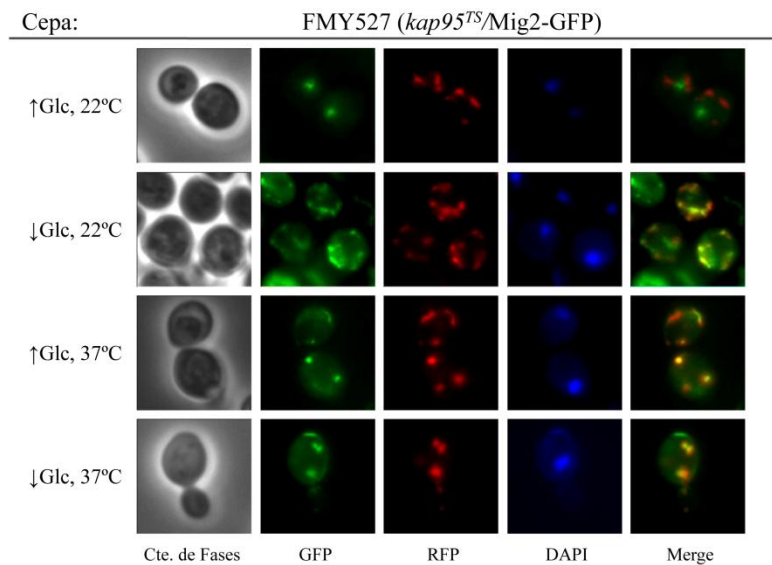


Figura R-3.1.2A: Localización de la proteína Mig2-GFP en la cepa FMY527 (*kap95^{TS} Mig2-GFP*): A temperatura restrictiva (37°C), Mig2 modifica su localización en presencia de glucosa, no siendo capaz de acumularse en el interior del núcleo.

Puesto que el papel de Kap95 como importina puede ser mediante reconocimiento directo de la proteína a transportar o bien indirecto, a través de la proteína adaptadora Kap60, nos propusimos determinar si la ausencia de esta última tenía el mismo efecto que Kap95 sobre la distribución subcelular de Mig2. Para ello, nos servimos de la cepa JCY1410, mutante para Kap60 (*SRP1*). En primer lugar, procedimos a etiquetar en el genoma el gen *MIG2* con GFP en dicha cepa, obteniéndose la cepa FMY528. A continuación, ésta se transformó con el plásmido pRS316/Su9-RFP a modo de marcador mitocondrial y los transformantes se seleccionaron en placas con medio SCD sin uracilo. Las células se procesaron del mismo modo que en la cepa silvestre FMY501.

Finalmente, las muestras correspondientes al crecimiento en alta y baja glucosa se observaron al microscopio de fluorescencia.

Como podemos apreciar en la figura R-3.1.2B, Mig2 presenta el mismo patrón de localización en una cepa silvestre y en una cepa mutante para Kap60, lo que indicaría que Kap95 sería la proteína clave implicada en la entrada de Mig2 al interior del núcleo celular. Si bien no podemos excluir que Kap60 participe en la misma, sí podemos afirmar que su ausencia no impide la translocación de Mig2 al núcleo.

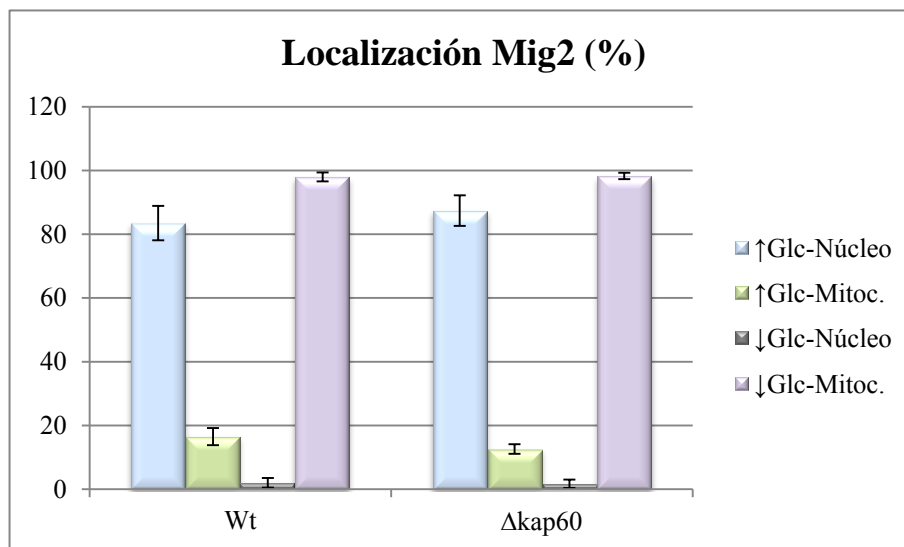
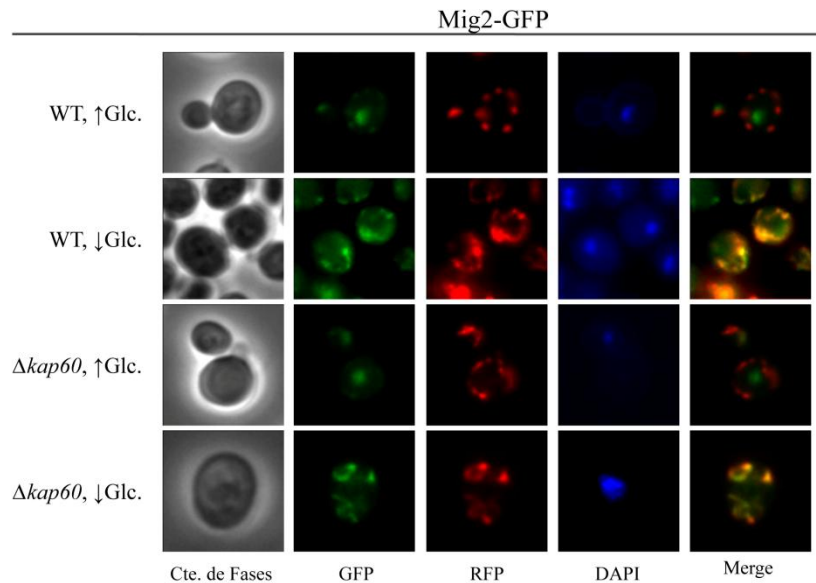


Figura R-3.1.2B: Localización de la proteína Mig2-GFP en la cepa FMY528 (*kap60*/Mig2-GFP): En ausencia de la importina Kap60, Mig2 no ve alterada su distribución intracelular siendo capaz de acumularse en el núcleo en presencia de glucosa.

3.1.3. Las proteínas Kap60 y Kap95 interaccionan con Mig2 tanto *in vivo* como *in vitro*.

Una vez confirmado el papel esencial que la Importina- α (Kap95) juega en la entrada al núcleo de Mig2 quisimos comprobar si Kap95 era capaz de llevar a cabo su función mediante unión directa a la proteína Mig2 o si, por el contrario, esta unión tenía lugar a través del adaptador Kap60. Para abordar este estudio decidimos realizar experimentos de coimmunoprecipitación y *GST pull-down*.

Para la realización del ensayo de coimmunoprecipitación se creció, en 40 ml de medio YEP con alta glucosa, la cepa FMY501 hasta una DO_{600} de 1,0. En este momento en el que se obtuvo el extracto celular de 20 ml del cultivo y se dio un pase de 1 hora a YEP con baja glucosa al resto. Finalmente, se obtuvo el extracto libre de células del cultivo en baja glucosa.

Tras cuantificar la concentración de proteína en cada extracto, se incubaron cantidades equivalentes de ambos con un anticuerpo policlonal anti-Kap95 por un lado, un anticuerpo policlonal anti-Kap60 por otro y un anticuerpo policlonal anti-Pho4 por otro. Las incubaciones duraron 3 horas y se realizaron a 4°C, permaneciendo luego los extractos en contacto con la resina proteína *A-Sepharosa* durante toda la noche. Tras lavar exhaustivamente las muestras con tampón *Staph-A* más deoxicolato sódico, se prepararon para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP.

Como podemos apreciar, existe interacción entre Mig2-GFP y Kap95 y entre Mig2-GFP y Kap60 tanto en alta como en baja glucosa, aunque en estas condiciones la intensidad de la interacción parece algo menor (Fig. R-3.1.3A).

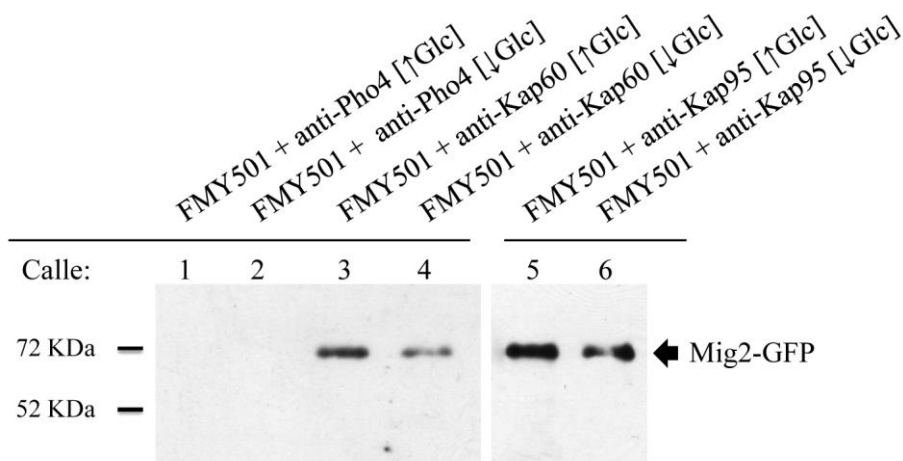


Figura R-3.1.3A: Inmunoprecipitación entre Kap60 y Mig2-GFP y Kap95 y Mig2-GFP. Mig2-GFP interacciona *in vivo* con Kap60 y con Kap95, tanto en alta como en baja glucosa.

Una vez halladas evidencias de la interacción entre Mig2 y el dímero Kap60/Kap95 nos propusimos confirmar dicha interacción mediante GST *pull-down*, así como comprobar si existe interacción directa entre ambas proteínas y Mig2. Para llevar a cabo este estudio, en primer lugar se expresaron las proteínas Mig2-GST, Kap60-GST y Kap95-GST en *E. coli* mediante el uso de vectores pGEX. A continuación, los extractos con las proteínas fusionadas a GST se pusieron en contacto con una resina *Glutathione Sepharose 4B* durante 2 horas. Tras este tiempo, las proteínas Kap60 y Kap95 se eluyeron de la resina mediante corte con trombina durante dos horas. Una vez liberadas las proteínas, la trombina se inhibió mediante la adición a los extractos de PMSF a una concentración final 2mM. La producción de ambas proteínas se confirmó mediante gel de poliacrilamida y su posterior tinción con azul Coomassie. Como se observa en la figura R-3.1.3B, ambas proteínas se producen perfectamente y muestran el tamaño esperado: 60 kDa en el caso de Kap60 y unos 95 kDa en el de Kap95.

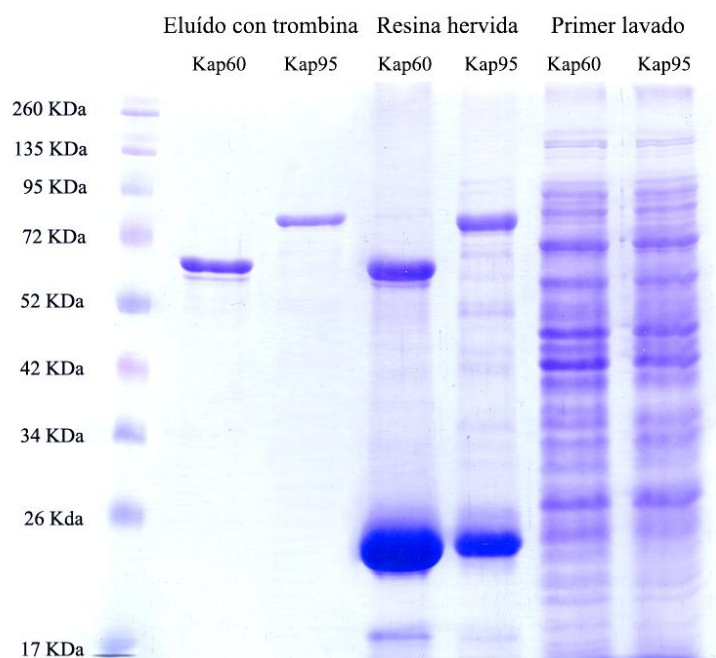


Figura R-3.1.3B: Producción y purificación de las proteínas Kap60 y Kap95 en *E. coli*. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul Coomassie. En las calles 1 y 2 se observan las proteínas purificadas tras su elución mediante corte con trombina. A continuación, se muestran las proteínas liberadas tras hervir la resina con *Laemmli Buffer*. En último lugar se encuentran las calles correspondientes al primer lavado de la resina tras estar en contacto con el extracto libre de células.

Para llevar a cabo la GST *pull-down* se prepararon cultivos idénticos a los usados en la inmunoprecipitación pero, en este caso, la cepa utilizada fue una cepa silvestre W303.1A. Tras cuantificar la concentración de proteína, se incubaron cantidades equivalentes de ambos extractos con una resina conteniendo GST-Mig2 (expresada en *E. coli* utilizando el vector pGEX/Mig2) por un lado, así como con una resina con sólo GST a modo de control, durante toda la noche. Para comprobar la interacción directa

entre Kap60 y Kap95 con Mig2 se puso en contacto la misma cantidad de ambas proteínas purificadas con una resina GST-Mig2 o GST durante la noche. A continuación, las muestras se lavaron de manera exhaustiva con PBS frío y se procesaron para su análisis mediante *Western Blot*. Las proteínas retenidas en la resina por su interacción con Mig2 se revelaron utilizando anticuerpos policlonales anti-Kap60 y anti-Kap95.

En la parte A de la figura R-3.1.3C podemos apreciar una clara interacción de la proteína Mig2 con Kap60, tanto en alta como en baja glucosa (calles 3 y 4), mientras que no observamos interacción inespecífica con la proteína GST (calles 1 y 2). También se aprecia que Mig2-GST y Kap60 son capaces de interactuar de manera directa *in vitro* (calle 6).

En el caso de Kap95 (Fig. R-3.1.3C, B) Mig2-GST interactúa con la Importina- α independientemente de la fuente de carbono presente en el medio (calles 1 y 2). Al contrario que en el caso de Kap60, no se aprecia interacción directa entre las proteínas Mig2-GST y Kap95 (calle 3). Por tanto, parece que Kap60 actuaría de adaptador en la interacción entre las proteínas Kap95 y Mig2.

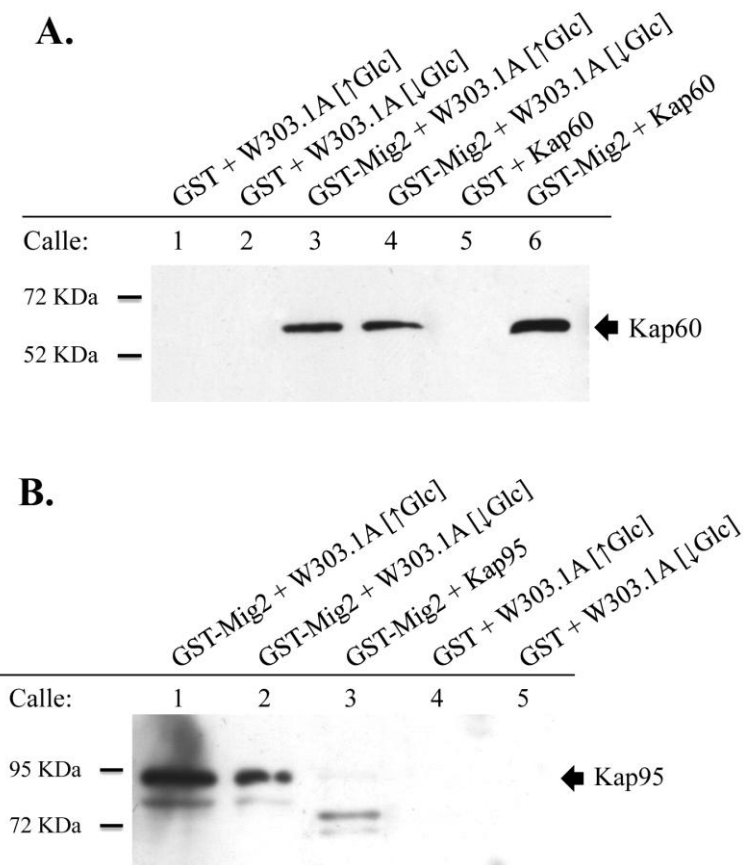


Figura R-3.1.3C: GST pull-down entre Mig2-GST y las importinas α y β de *S. cerevisiae*. Las proteínas Kap60 y Kap95 son capaces de interactuar *in vitro* con la proteína de fusión Mig2-GST de manera independiente de la fuente de carbono. Kap 60 es capaz de interactuar de manera directa *in vitro* con Mig2-GST, mientras que Kap95 no.

Gracias a los experimentos anteriores demostramos que la proteína Mig2-GST es capaz de interactuar directamente con la importina Kap60 y, de manera indirecta, seguramente a través de Kap60, con la Carioferina Kap95. Del mismo modo, comprobamos que en un mutante $\Delta kap60$ Mig2 es capaz de acumularse en el núcleo, lo que nos hizo pensar que, si bien Kap60 participaría en la interacción entre Mig2 y Kap95, podría no ser indispensable para la misma.

A fin de confirmar esta hipótesis, decidimos estudiar si en ausencia de Kap60 existe interacción entre Kap95 y Mig2. Para llevar a cabo dicho experimento, realizamos un ensayo de GST pull-down entre Mig2-GST y Kap95 en una cepa mutante para Kap60 (JCY1410).

Los resultados obtenidos muestran que Mig2-GST interactúa con Kap95 en ausencia de Kap60, aunque de forma muy débil (Fig. R-3.1.3D, calles 3 y 4). Por tanto, parece que si bien la interacción entre Mig2 y Kap95 tiene lugar mayoritariamente a través de Kap60, también existe una pequeña fracción de Mig2 capaz de interactuar con Kap95 en ausencia de la Importina- α independientemente de la fuente de carbono presente en el medio.

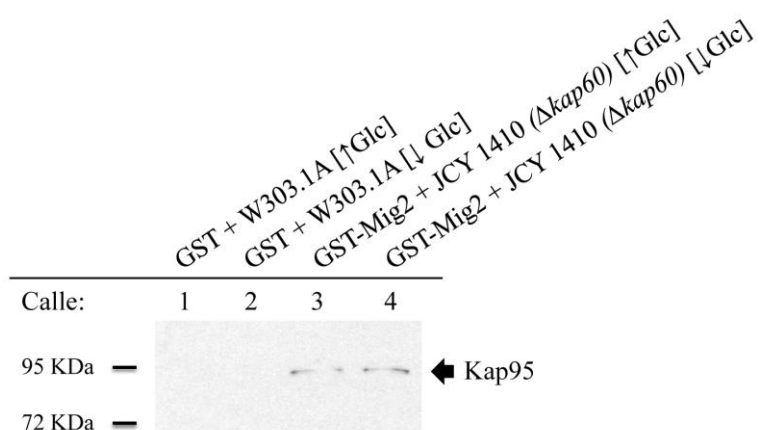


Figura R-3.1.3D: GST pull-down ente Mig2-GST y Kap95 en un mutante $\Delta kap60$. En ausencia de la importina Kap60, Mig2-GST interactúa *in vitro* con Kap95, siendo esta señal mucho más débil que en una cepa silvestre.

3.1.4. Caracterización de las secuencias de localización nuclear (NLSs) de Mig2.

En el apartado 2.4 de la Introducción hacíamos referencia al reconocimiento de las proteínas a transportar (*cargos*) por parte de las Carioferinas. Este reconocimiento se lleva a cabo a través de secuencias denominadas NLSs, NLSs clásicas en el caso del sistema de importación Importina- $\alpha\beta$. La NLS-clásica se caracteriza por ser una secuencia corta, muy rica en residuos básicos y que, frecuentemente, responde a la secuencia consenso K(K/R)x(K/R).

Como indicamos anteriormente (apartado 3.1.2 de Resultados), el análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de Mig2 permitió identificar dos posibles motivos implicados en la localización nuclear de esta proteína, ambas secuencias del tipo NLS clásica. La primera de ellas, a la que denominamos NLS1, se encuentra localizada entre los aminoácidos 32 y 37, siendo su secuencia KKRHLR. La segunda (NLS2) corresponde a la secuencia ⁷⁵RRLKK⁷⁹.

Para comprobar si estas secuencias son funcionales en el reconocimiento de Mig2 por parte de las Kaps, nos propusimos realizar mutagénesis dirigida de los residuos básicos clave en este tipo de señales de importación.

Tras identificar las posibles secuencias de reconocimiento implicadas en la importación, observamos que la NLS1 se encuentra localizada dentro de la región correspondiente al primer motivo dedos de zinc de Mig2. Para comprobar que, desde el punto de vista teórico, la mutación de los residuos seleccionados no afecta a los aminoácidos básicos indispensables en la interacción de los motivos de dedos de zinc con el DNA, utilizamos los modelos estructurales teóricos obtenidos en el apartado 1.2 de Resultados. En las representaciones generadas con el programa **PyMol** (figura R-3.1.4A, pág. 126) podemos observar la mutación de dos residuos lisina (azul) y un residuo arginina (rosa) de la NLS1 a alanina (gris) y como, en principio, ésta no afecta a la interacción de Mig2 con el DNA (residuos señalados con una estrella).

En vista de que la mutación de los residuos básicos presumiblemente indispensables en las NLSs no afecta a los aminoácidos claves en la interacción con el DNA, procedimos a realizar la mutación de los mismos por alaninas. Para llevar a cabo estas mutaciones seguimos el mecanismo descrito en el apartado 4.12 de Materiales y Métodos

Tras obtener los fragmentos con las mutaciones por PCR, estos se subclonaron en un vector pGEMT[®] y se comprobaron por secuenciación. Las secuencias resultantes fueron AARHLA para la NLS1 y AALKA en el caso de la NLS2. Una vez obtenidas y comprobadas las mutaciones se integraron en el genoma de una cepa W303.1A por recombinación homóloga, sustituyendo la secuencia nativa del gen *MIG2* por la mutación correspondiente seguida de la secuencia de la GFP en pauta y la ORF del gen *HIS5⁺* como marcador. A continuación, los productos de PCR obtenidos al amplificar el DNA genómico de dichas cepas con los oligos Mig2-d y Mig2-r se secuenciaron para confirmar que la secuencia mutada estaba integrada en el lugar correcto. Las cepas con las mutaciones en las NLSs 1 y 2 recibieron el nombre FMY523.A y FMY524, respectivamente.

Las cepas FMY523.A y FMY524 crecieron en medio YEPD durante 16 horas hasta una densidad óptica de 1,0 a 600 nm, momento en el que se dio un pase de 15 minutos a baja glucosa a la mitad del cultivo. Tras este tiempo, se prepararon las muestras y se observaron, junto a las de glucosa, al microscopio.

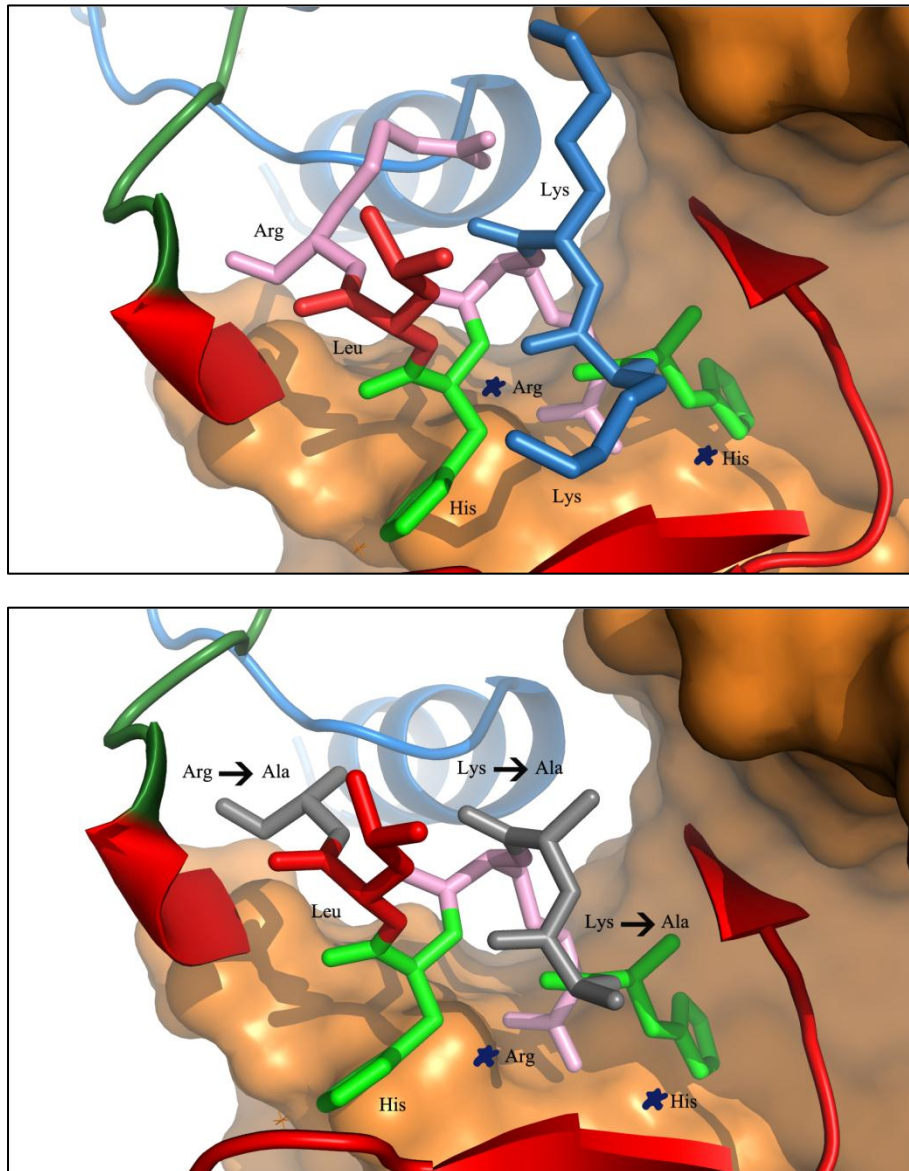


Figura R-3.1.4A: Representación teórica de los aminoácidos que componen la NLS1 de Mig2. En la parte superior de la imagen se representa la estructura tridimensional de la NLS1 de Mig2, señalándose los aminoácidos esenciales en la interacción con el DNA con una estrella. En la parte inferior, se representa la estructura tridimensional de la NLS1 tras la mutación de los residuos clave en la interacción con las Kaps, no alterándose los aminoácidos Lys e His implicados en la interacción con el DNA. El DNA se representa en naranja.

En la figura R-3.1.4B podemos observar que en el mutante NLS1 no se aprecia acumulación de Mig2 en el núcleo en presencia de glucosa. Por el contrario, el mutante NLS2 es capaz de localizarse en el núcleo, si bien esta localización no es total, encontrándose la proteína en parte asociada a la red mitocondrial. Por tanto, a la vista de esos resultados, parece que la secuencia NLS1 es funcional y determina la capacidad de entrada en el núcleo de la proteína Mig2 en alta glucosa, aunque su papel podría estar complementado por la secuencia NLS2.

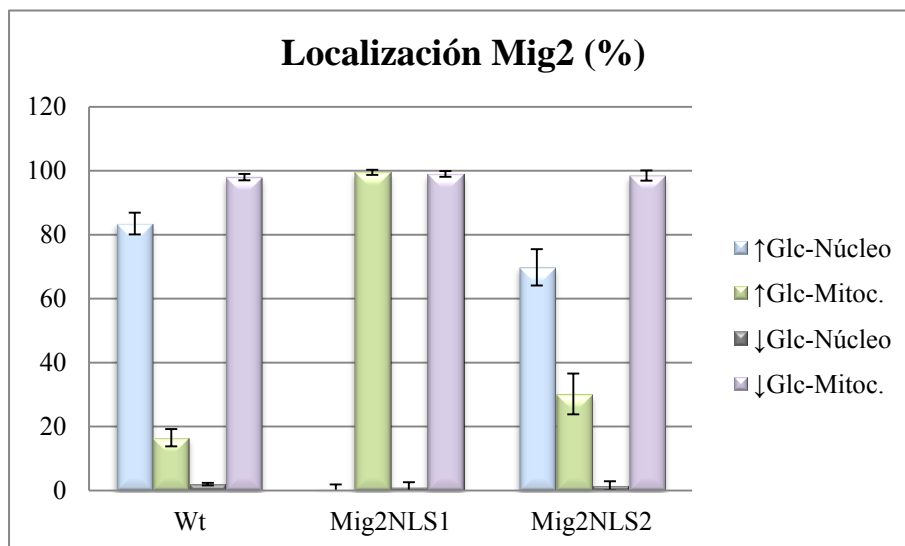
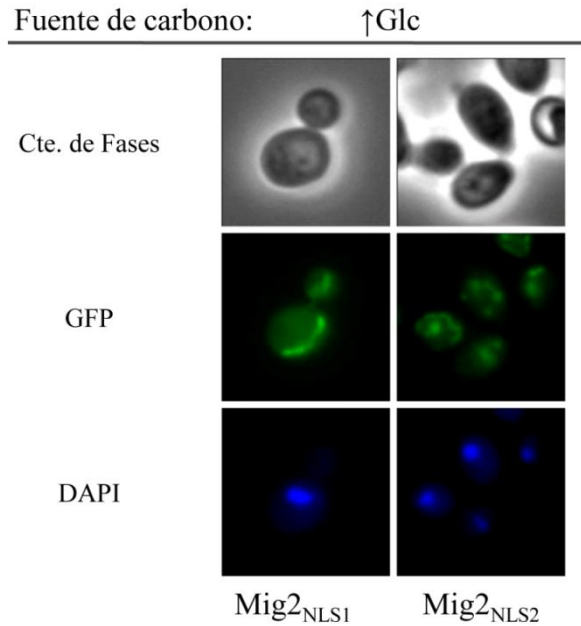


Figura R-3.1.4B: Localización de la proteína Mig2-GFP en las cepas FMY523.A (Mig2_{NLS1}-GFP) y FMY524 (Mig2_{NLS2}-GFP). La proteína de fusión Mig2_{NLS1}-GFP muestra un patrón de localización muy similar al presentado por el mutante $\Delta kap95^{TS}$ a temperatura restrictiva, no apreciándose localización de la misma en el núcleo en presencia de glucosa. Por el contrario, Mig2_{NLS2}-GFP es capaz de localizarse en el núcleo en presencia del monosacárido aunque en menor medida que la proteína silvestre.

A la vista de estos resultados se decidió estudiar el papel de Mig2 como represor del gen *SUC2* en los mutantes NLS1 y 2 para confirmar que Mig2 no puede llevar a cabo su función represora al no localizarse en el núcleo. Dado que la actividad invertasa en una cepa silvestre y en una cepa mutante $\Delta mig2$ es idéntica, procedimos a integrar en el genoma de una cepa $\Delta mig1$ las NLSs mutadas para comprobar si estas cepas, a nivel de actividad invertasa, se comportaban como una mutante simple $\Delta mig1$ o como un doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$.

Para llevar a cabo estos experimentos, las cepas FMY501 (Mig2-GFP), FMY523.A (Mig2_{NLS1}-GFP), FMY524 (Mig2_{NLS2}-GFP), FMY525 ($\Delta mig1$ /Mig2_{NLS1}-GFP) y FMY526 ($\Delta mig1$ /Mig2_{NLS2}-GFP) se crecieron en 15 ml de medio YEP con alta glucosa hasta una DO₆₀₀ de 1,0. A continuación, se dio a los cultivos un pase a YEP con baja glucosa durante una hora y se tomaron las muestras para realizar el ensayo de invertasa tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Como podemos apreciar en la figura R-3.1.4C, las cepas que sólo presentan la mutación Mig2_{NLS1} o Mig2_{NLS2} se comportan como una cepa silvestre, estando el gen *SUC2* casi totalmente reprimido. En el caso de la cepa $\Delta mig1$ /Mig2_{NLS2} (FMY526) observamos niveles de invertasa algo mayores a los presentes en una cepa $\Delta mig1$, pero sin llegar a los niveles de un doble mutante $\Delta mig1$ / $\Delta mig2$, indicando que Mig2 está actuando como represor y, por tanto, se encuentra, al menos parcialmente, en el interior del núcleo. Por el contrario, en la cepa $\Delta mig1$ /Mig2_{NLS1} (FMY525) los niveles de invertasa corresponden a los de una cepa doble mutante $\Delta mig1$ / $\Delta mig2$, resultado esperado si, como observamos por microscopía de fluorescencia, Mig2 no es capaz de acumularse en el núcleo.

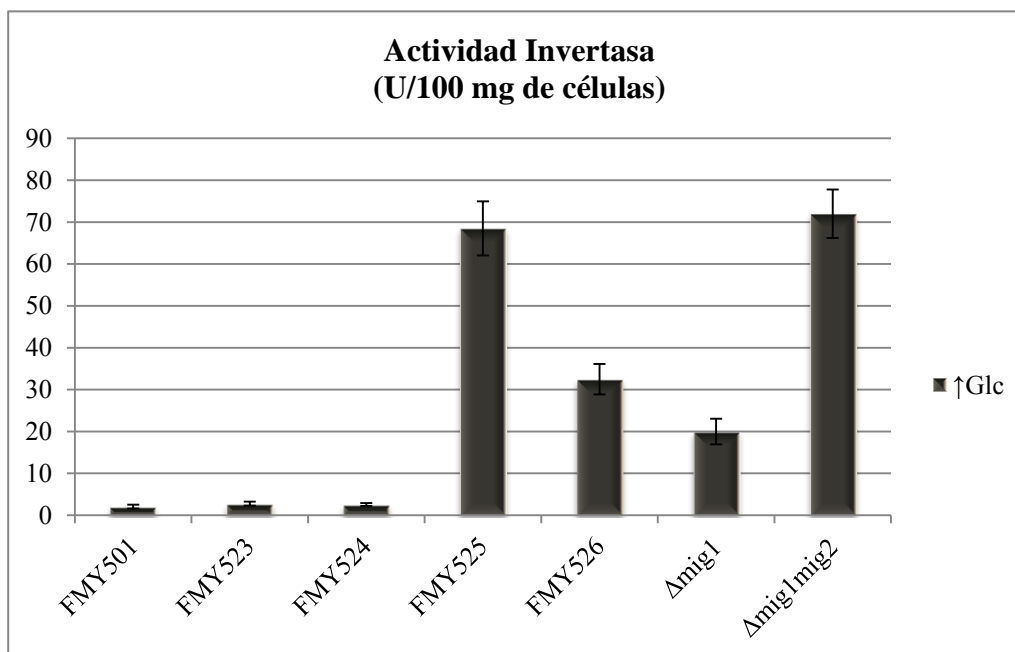


Figura R-3.1.4C: Actividad invertasa de las cepas FMY501 (Mig2-GFP), FMY523.A (Mig2_{NLS1}-GFP), FMY524 (Mig2_{NLS2}-GFP), FMY525 ($\Delta mig1$ /Mig2_{NLS1}-GFP) y FMY526 ($\Delta mig1$ /Mig2_{NLS2}-GFP) en alta glucosa. El gen *SUC2* permanece reprimido en alta glucosa en las cepas silvestre, Mig2_{NLS1} y Mig2_{NLS2}, mantiene cierto grado de represión en el mutante $\Delta mig1$ /Mig2_{NLS2} y pierde la represión en el mutante $\Delta mig1$ /Mig2_{NLS1}.

3.1.5. La NLS1 de Mig2 es importante para la interacción *in vitro* con Kap95, pero no con Kap60.

Una vez confirmada la interacción entre Mig2 y el dímero Importina- $\alpha\beta$, tanto *in vivo* como *in vitro*, y la importancia de la región NLS1 en el transporte de la proteína Mig2 al interior del núcleo, nos propusimos profundizar más en el estudio de esta región. Con este fin, nos planteamos una serie de experimentos encaminados a determinar si las mutaciones introducidas en la NLS1 impedían de alguna manera la interacción de Mig2 con las importinas Kap60 y Kap95, imposibilitando su translocación al interior del núcleo.

Para llevar a cabo este estudio decidimos realizar una serie de ensayos GST *pull-down* entre las proteínas Kap60 y Kap95 con Mig2_{NLS1}-GST, bien con extractos completos obtenidos a partir de una cepa silvestre, bien con proteínas purificadas para comprobar la existencia de interacciones directas.

En primer lugar, procedimos a subclonar la región codificante de la proteína Mig2_{NLS1} en un vector pGEX-3X. Mediante la utilización de este vector es posible la expresión y producción de Mig2_{NLS1}, permitiendo la realización de experimentos de GST *pull-down* idénticos a los llevados a cabo con la proteína nativa.

Una vez obtenida la construcción que nos permite expresar Mig2_{NLS1}-GST procedimos a la realización de los ensayos de GST *pull-down*. Para ello, la cepa W303.1A se creció en 40 ml de medio YEP con alta glucosa hasta una densidad óptica de 1,0 a 600 nm, momento en el cual se dio un pase de una hora a YEP con baja glucosa a la mitad del cultivo. Posteriormente, se obtuvieron extractos libres de células de cada una de las muestras y se pusieron en contacto con una resina conteniendo Mig2_{NLS1}-GST, así como con una resina con sólo GST a modo de control, durante toda la noche a 4°C. En el caso del estudio de interacciones directas, la resina con Mig2_{NLS1}-GST se dejó interaccionar con cantidades equivalentes de proteína purificada: Kap60, Kap95 o ambas al mismo tiempo. Tras la incubación, la resina se lavó de manera exhaustiva con PBS, las muestras se prepararon para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando anticuerpos anti-Kap60 y anti-Kap95.

En el caso de Kap60 (Fig. R-3.1.5A) la mutación de la NLS1 parece no modificar la capacidad de Mig2-GST de interaccionar con ella, aunque se aprecia un leve descenso en la intensidad de esta interacción en presencia de glucosa (calle 4). En cuanto a la interacción directa entre ambas proteínas, Mig2_{NLS1} es capaz de interaccionar con la proteína Kap60 purificada (calle 6), disminuyendo ésta en presencia de Kap95 (calle7).

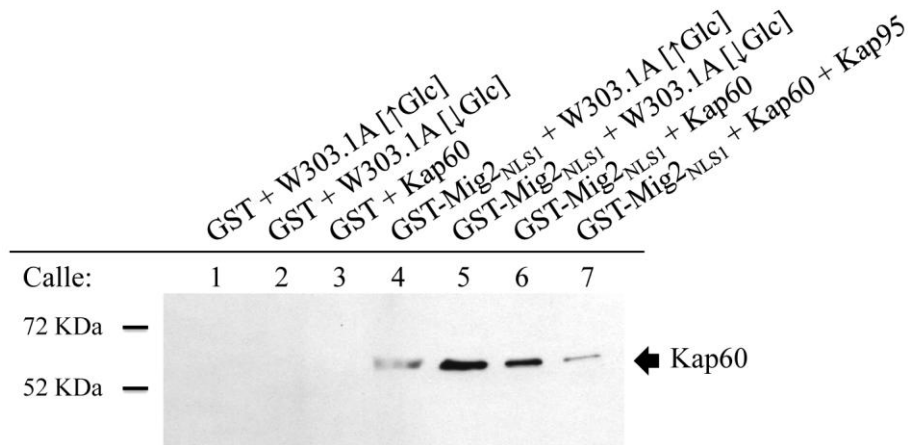


Figura R-3.1.5A: GST pull-down entre Kap60 y Mig2_{NLS1}-GST. La mutación de la secuencia correspondiente a la NLS1 de Mig2 no impide la interacción de esta proteína con Kap60.

En cuanto a la interacción de Mig2_{NLS1} con Kap95, en la figura R-3.1.5B podemos apreciar como ésta disminuye considerablemente, aunque no desaparece. En presencia de glucosa, Mig2_{NLS1} interacciona con Kap95 aunque de forma débil, mientras que, en ausencia de glucosa, esta interacción es casi indetectable (calles 4 y 5).

Como ocurría con la proteína Mig2 nativa, no se aprecia interacción directa entre Mig2-GST y Kap95 (calle 6). Para comprobar si la ausencia de interacción directa con Kap95 es debida a la necesidad de Kap60, se adicionaron ambas proteínas y se dejaron interaccionar con la resina conteniendo Mig2_{NLS1}-GST. Como se observa en la figura, Mig2_{NLS1} no es capaz de interaccionar de manera directa con Kap95, aún en presencia de Kap60 (calle 7).

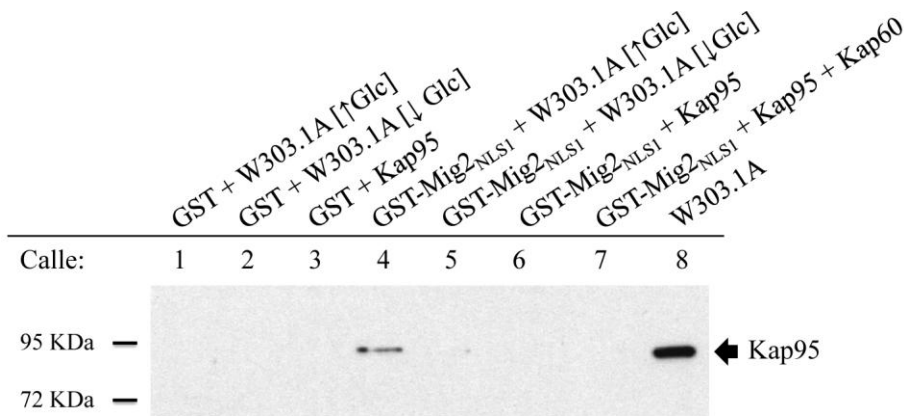


Figura R-3.1.5B: GST pull-down entre Kap95 y Mig2_{NLS1}-GST. En presencia de glucosa, la interacción *in vitro* entre Mig2 y Kap95 se debilita al mutar la secuencia correspondiente a la NLS1 de Mig2. En condiciones de baja glucosa, esta interacción desaparece. Mig2_{NLS1}, al igual que ocurría con la proteína nativa, no es capaz de interaccionar de forma directa con Kap95 aún en presencia de Kap60.

3.1.6. La interacción de Mig2 con Kap95 está regulada por la proteína Mig1.

El hecho de que Mig2 sea capaz de mantener una leve interacción con el dímero Importina- $\alpha\beta$ en el mutante NLS1, aún cuando no somos capaces de apreciar su acumulación nuclear, nos llevó a plantear la posibilidad de que la entrada de Mig2 al núcleo pudiera depender de otras proteínas.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en el apartado 1.10 de Resultados, en los cuales observábamos que en un mutante $\Delta mig1$, Mig2 no es capaz de acumularse en el núcleo en cantidad suficiente como para ser detectada mediante microscopía de fluorescencia, nos planteamos la posibilidad de que Mig1 regulara, de alguna manera, la entrada de Mig2 al núcleo.

Para comprobar esta hipótesis procedimos a la realización de un ensayo de coimmunoprecipitación de las proteínas Mig2_{NLS1} y las importinas Kap60 y Kap95 en una cepa $\Delta mig1$. En primer lugar se prepararon extractos libres de células de las cepas FMY507 ($\Delta mig1$ /Mig2-GFP) y FMY525 ($\Delta mig1$ /Mig2_{NLS1}-GFP) crecidas en glucosa y tras un pase de una hora a glicerol, siguiendo el mismo procedimiento descrito en apartados anteriores. Una vez cuantificada la cantidad de proteína presente en los extractos, se pusieron a inmunoprecipitar cantidades equivalentes de proteína con anticuerpos policlonales anti-Kap60 por un lado, anti-Kap95 por otro y anti-Pho4 a modo de control negativo. La incubación se realizó a 4°C durante 3 horas y, a continuación, se adicionó a los extractos la proteína A-Sepharosa, que permaneció con ellos durante toda la noche. Tras lavar exhaustivamente con tampón *Staph-A* más deoxicolato sódico, las muestras se prepararon para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP.

Nuevamente se aprecia interacción entre Mig2_{NLS1} y Kap60 (Fig. 3.1.6A), tanto en alta como en baja glucosa (calles 7 y 8), lo que indica que la ausencia de la proteína Mig1 no parece tener ningún efecto sobre la interacción entre ambas.

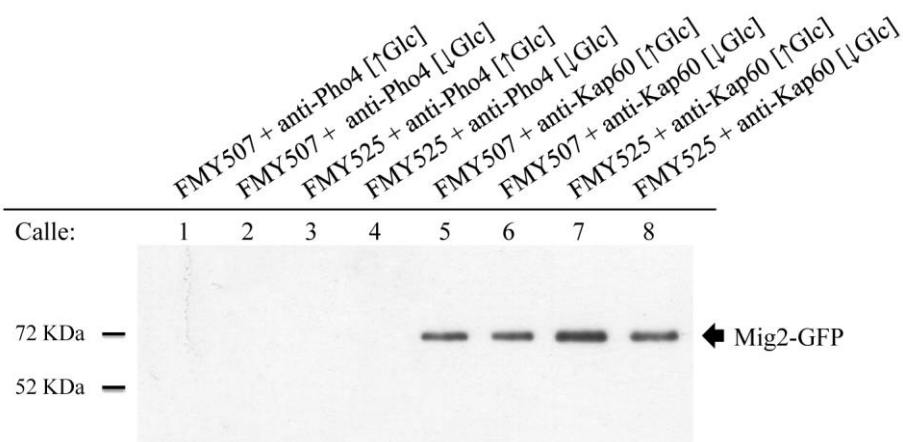


Figura R-3.1.6A: Inmunoprecipitación entre Kap60 y Mig2_{NLS1}-GFP en una cepa $\Delta mig1$. La mutación de las secuencia NLSs de Mig2 no impide la interacción de ésta con Kap60 en ausencia de Mig1.

En el caso de la interacción entre Kap95 y Mig2_{NLS1} (Fig. R-3.1.6B), en una cepa mutante para la proteína Mig1 la mutación de la secuencia NLS1 de Mig2 tiene como efecto una importante disminución de la interacción entre ambas en ausencia de glucosa y una desaparición de la misma en presencia del monosacárido (calles 7 y 8). A la vista de estos resultados, parece que Mig1, de algún modo, regula la interacción de Mig2 con la Importina- α y, por tanto, la entrada de la misma al núcleo celular.

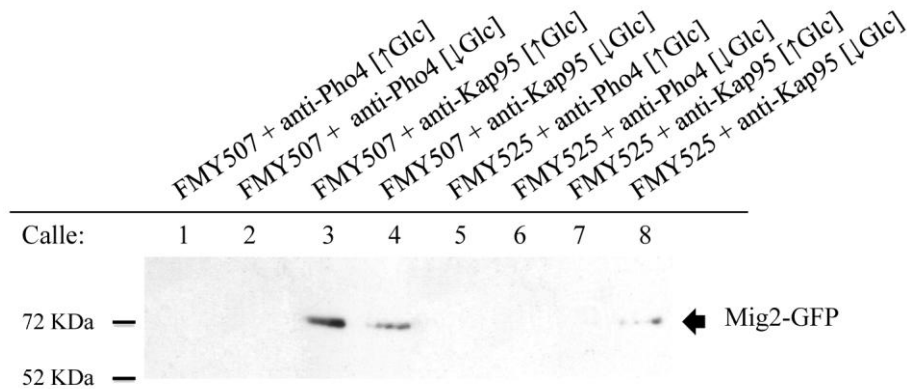


Figura R-3.1.6B: Inmunoprecipitación entre Kap95 y Mig2_{NLS1}-GFP en una cepa $\Delta mig1$. La mutación de la NLS1 de Mig2 provoca una importante disminución en la interacción de esta proteína con la importina Kap95 en ausencia de Mig1.

3.1.7. El represor transcripcional Mig1 interacciona *in vitro* con las importinas Kap60 y Kap95 de *S. cerevisiae*.

En el apartado anterior observábamos como el reconocimiento de Mig2 por parte de Kap95, así como su posterior transporte al interior del núcleo celular estaba regulado, de algún modo, por la proteína Mig1. Estos resultados nos llevaron a plantear la posibilidad de que ambos represores transcripcionales compartieran el mismo sistema de importación.

Para comprobar esta teoría, realizamos un ensayo de GST *pull-down* entre la proteína de fusión Mig1-GST y las importinas Kap60 y Kap95 de *S. cerevisiae*. El experimento se llevó a cabo siguiendo la misma metodología mostrada en el apartado 3.1.3 de Resultados.

Como podemos observar en la Fig. R-3.1.7-A, Mig1-GST interacciona con Kap60 *in vitro*, siendo esta interacción mucho más intensa en presencia de glucosa (calle 1). Además, al igual que ocurre en el caso de Mig2, la interacción entre ambas proteínas es directa (calle 3).

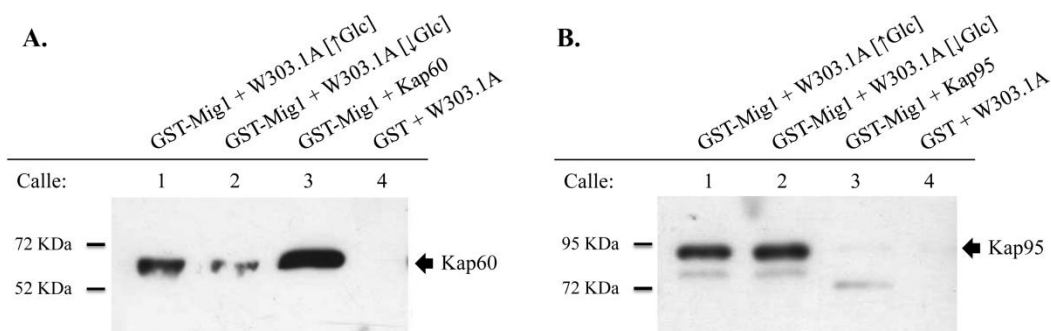


Figura R-3.1.7: GST pull-down ente Mig1-GST y el dímero importina- $\alpha\beta$ de *S. cerevisiae*. La proteína de fusión Mig1-GST interacciona *in vitro* de forma directa con Kap60 e indirecta con Kap95.

En el caso de Kap95 (Fig. R-3.1.7-B), Mig1-GST es capaz de interactuar con la misma no apreciándose diferencias significativas entre las diferentes condiciones metabólicas (calles 1 y 2). De nuevo, como sucede con Mig2, esta interacción tiene lugar de forma indirecta (calle 3). En ambos ensayos, no se observa interacción inespecífica alguna con la GST (calle 4).

3.2. Estudio de los mecanismos de exportación nuclear de la proteína Mig2.

3.2.1. El represor transcripcional Mig2 interactúa con la exportina Xpo1 *in vivo* e *in vitro*.

En la introducción hacíamos mención a la existencia de cuatro exportinas conocidas en *S. cerevisiae*. En primer lugar se encuentra Los1, implicada en el transporte de tRNAs. A continuación está la Carioferina Msn5 que es la única capaz de actuar como importina y exportina. Como pudimos apreciar en el apartado 3.1.1 de Resultados, en un mutante $\Delta msn5$, Mig2 se localiza en las mitocondrias en ausencia de glucosa. El hecho de que Mig2 pueda salir del núcleo y asociarse con la red mitocondrial indica que Msn5 no está actuando como exportina de Mig2. En tercer lugar está la exportina Crm1 (Xpo1), encargada de mediar el transporte de proteínas que presentan LR-NES. Finalmente, Cse1 es la encargada del reciclaje de la Importina- α .

Una vez descartada la proteína Msn5 como exportina de Mig2, nos planteamos la búsqueda de la Carioferina implicada en la salida de Mig2 del núcleo. En primer lugar, al igual que hicimos en el análisis del sistema de importación, realizamos un análisis bioinformático de la estructura primaria de Mig2 con el fin de encontrar posibles señales de exportación nuclear (NESs). La identificación de tres posibles secuencias de este tipo hizo que nos planteáramos la posibilidad de que Xpo1 actuara como exportina de Mig2. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se propuso la realización de una serie de experimentos de GST pull-down y coimmunoprecipitación para, de este modo, determinar si existe interacción entre las proteínas Xpo1 y Mig2. Para llevar a cabo el

ensayo de coimmunoprecipitación, partimos de una cepa que presenta Xpo1 etiquetada en el genoma con tres epítomos HA (FMY303R-01, Tesis doctoral de R. Peláez, 2009) y procedimos a etiquetar el gen *MIG2* con GFP en dicha cepa siguiendo el mismo esquema que en cepas anteriores.

Una vez obtenida la cepa FMY530 (Xpo1-HA, Mig2-GFP), ésta se creció en 40 ml de YEP con alta glucosa, sufriendo un pase de una hora a YEP con baja glucosa la mitad del cultivo una vez alcanzada la DO_{600} de 1,0. A continuación se obtuvieron extractos libres de células, se cuantificó la cantidad de proteína presente en los mismos y se procedió a inmunoprecipitar cantidades equivalentes de estos extractos con un anticuerpo monoclonal anti-HA por un lado y un anticuerpo policlonal anti-Pho4 por otro. La incubación duró 3 horas y se realizó a 4°C. A continuación, se añadió la resina proteína *A-Sepharosa* y se dejó en contacto con los extractos toda la noche a 4°C. Una vez lavada la resina, se procesaron las muestras para su análisis *Western Blot* y se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP.

En la figura R-3.2.1A-A se observa como la proteína Mig2 interacciona con la exportina Xpo1 tanto en alta como en baja glucosa, no apreciándose bandas en las calles correspondientes a los controles negativos. Como se puede ver en la Fig. R-3.2.1A-B, las cantidades de Xpo1 presentes en la célula son similares en ambas condiciones.

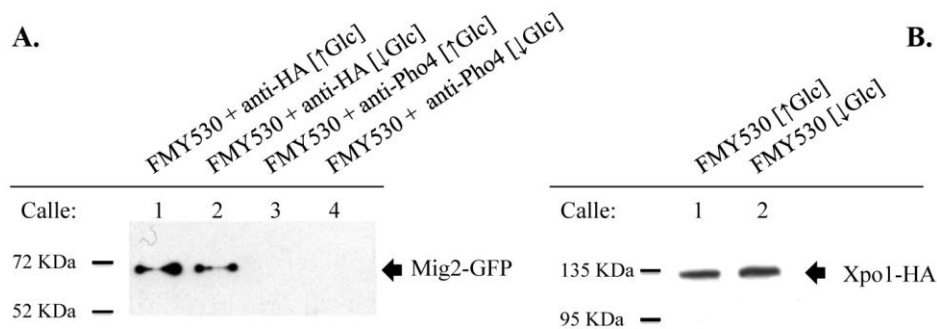


Figura R-3.2.1A: Inmunoprecipitación entre las proteínas Mig2-GFP y Xpo1-HA. En la parte izquierda de la figura podemos observar la interacción entre Mig2 y Xpo1 en alta y baja glucosa. En la figura de la derecha apreciamos que la cantidad de Xpo1 presente en la célula es constante y no depende de la fuente de carbono presente en el medio.

Con el fin de confirmar la interacción hallada, también realizamos un ensayo de *GST pull-down* entre ambas proteínas. Para su realización, se crecieron idénticos cultivos de una cepa FMY501 y se obtuvieron los correspondientes extractos en alta y baja glucosa. A continuación, se pusieron cantidades equivalentes de extracto en contacto con una resina Xpo1-GST durante toda la noche, así como con la resina con sólo GST a modo de control. Posteriormente se lavaron las muestras minuciosamente y se procesaron para la realización de un *Western Blot*. Las proteínas retenidas se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP.

De nuevo, podemos observar interacción entre Xpo1 y Mig2 (Fig. R-3.2.1B) no apreciándose banda alguna en los controles negativos (calles 3 y 4).

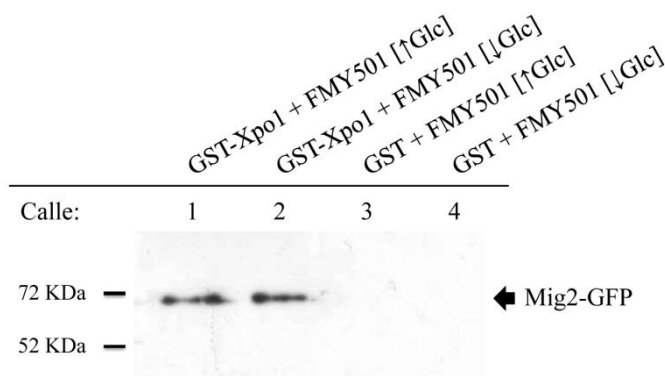


Figura R-3.2.1B: GST pull-down entre Mig2-GFP y Xpo1-GST. Ambas proteínas interaccionan de manera constitutiva.

3.2.2. Caracterización de las secuencias NES de Mig2.

En el apartado anterior hicimos referencia al análisis de la secuencia aminoacídica de Mig2 y como éste permitió identificar tres posibles señales de exportación nuclear (NESs). Estas señales se caracterizan por ser ricas en aminoácidos hidrofóbicos y, normalmente, se ajustan a la secuencia consenso Φ -x₂₋₃- Φ -x₂₋₃- Φ -x- Φ , donde Φ representa a los aminoácidos Leu, Val, Ile, Phe o Met. Las tres NESs se corresponden con las secuencias ²⁴⁵LASALSTL²⁵², ²⁹⁷VAKELESVYL³⁰⁶ y ³⁶⁶VRNLLKQIDV³⁷⁵, todas ellas localizadas en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

Con el fin de determinar si estas secuencias son funcionales y actúan como NESs procedimos a la mutación, en el caso de las NES1 y 2, de los aminoácidos hidrofóbicos, residuos clave en este tipo de secuencia, por alaninas. Una vez obtenidos los fragmentos con las mutaciones por PCR, se subclonaron en un vector pGEMT[®] y se comprobaron por secuenciación. A continuación, procedimos a la sustitución de la secuencia nativa de MIG2 por la secuencia mutada, mediante recombinación homóloga en una cepa silvestre W303.1A seguida, en pauta, por la secuencia de la GFP y el gen HIS5⁺ como marcador. Finalmente, los productos de PCR generados al amplificar el DNA genómico de las cepas obtenidas con los oligos Mig2-d y Mig2-r se secuenciaron para confirmar que portaban la secuencia mutada sin haber incorporado otras mutaciones. Las cepas obtenidas se denominaron FMY536 (Mig2_{NES1}-GFP) y FMY537 (Mig2_{NES2}-GFP), respectivamente.

En el caso de la NES3, dada su localización próxima al extremo carboxilo terminal de la proteína, en lugar de realizar mutagénesis dirigida, decidimos deletar desde el aminoácido 342 al 383. Finalmente, la secuencia deletada se subclonó en un vector YEp352/GFP para obtener el plásmido YEp352/pMig2_{NES3}-GFP.

Una vez generados los mutantes para las tres posibles NESs de Mig2 y con el fin de confirmar si alguna de estas secuencias está implicada en la interacción de Xpo1 con Mig2, decidimos llevar a cabo un ensayo de GST *pull-down* entre los mutantes Mig2_{NES}-GFP y Xpo1-GST. Para realizar dicho experimento, en primer lugar, se transformó una cepa mutante $\Delta mig2$ con la construcción YEp352/pMig2_{NES3}-GFP, realizándose la selección de las colonias positivas en placas con medio SC sólido sin uracilo y con glucosa al 4%. Posteriormente, las células transformadas se crecieron en 40 ml de medio SCD líquido sin uracilo durante 16 horas a 28°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0. Tras este tiempo, se dio un pase a SC ura⁻ con baja glucosa a la mitad del cultivo durante una hora. En el caso de las cepas Mig2_{NES1}-GFP y Mig2_{NES2}-GFP las células crecieron en medio complejo YEP y se procesaron de igual modo. Finalmente, se obtuvieron extractos libres de células de ambas condiciones para a continuación, poner en contacto cantidades equivalentes de extracto con una resina GST-Xpo1, así como con sólo GST a modo de control. Por último, se lavaron las muestras de manera exhaustiva y se procesaron para su visualización mediante *Western Blot*. Las proteínas retenidas se revelaron utilizando anticuerpos monoclonales anti-GFP.

Como podemos observar en la figura R-3.2.2A la mutación de las posibles secuencias NES no parece afectar a la capacidad de Mig2 para interaccionar con la exportina Xpo1. Estos resultados indican que, o bien estas secuencias no están actuando como NESs, o bien es necesaria la mutación de varias NESs simultáneamente para poder apreciar un efecto fisiológico.

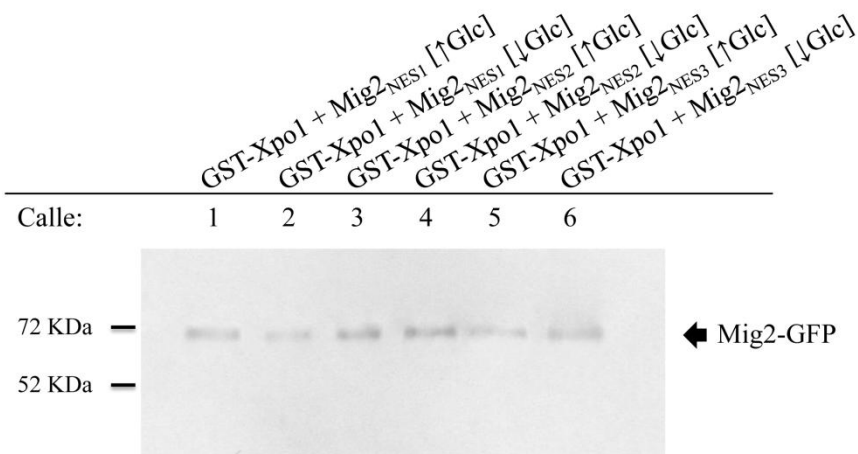


Figura R-3.2.2A: GST *pull-down* entre Xpo1-GST y las proteínas Mig2_{NES1}-GFP, Mig2_{NES2}-GFP y Mig2_{NES3}-GFP en *S. cerevisiae*. La mutación de las diferentes señales NES no impide la interacción de Mig2 con la exportina Xpo1.

Para confirmar estos resultados decidimos comprobar mediante microscopía de fluorescencia si la localización de Mig2 se veía alterada en alguno de los mutantes NES. Como podemos observar en la figura R-3.2.2B, ninguno de los mutantes presenta alteración alguna en el patrón de localización de esta proteína, siendo Mig2, en ausencia de glucosa, capaz de salir del núcleo y asociarse a la red mitocondrial.

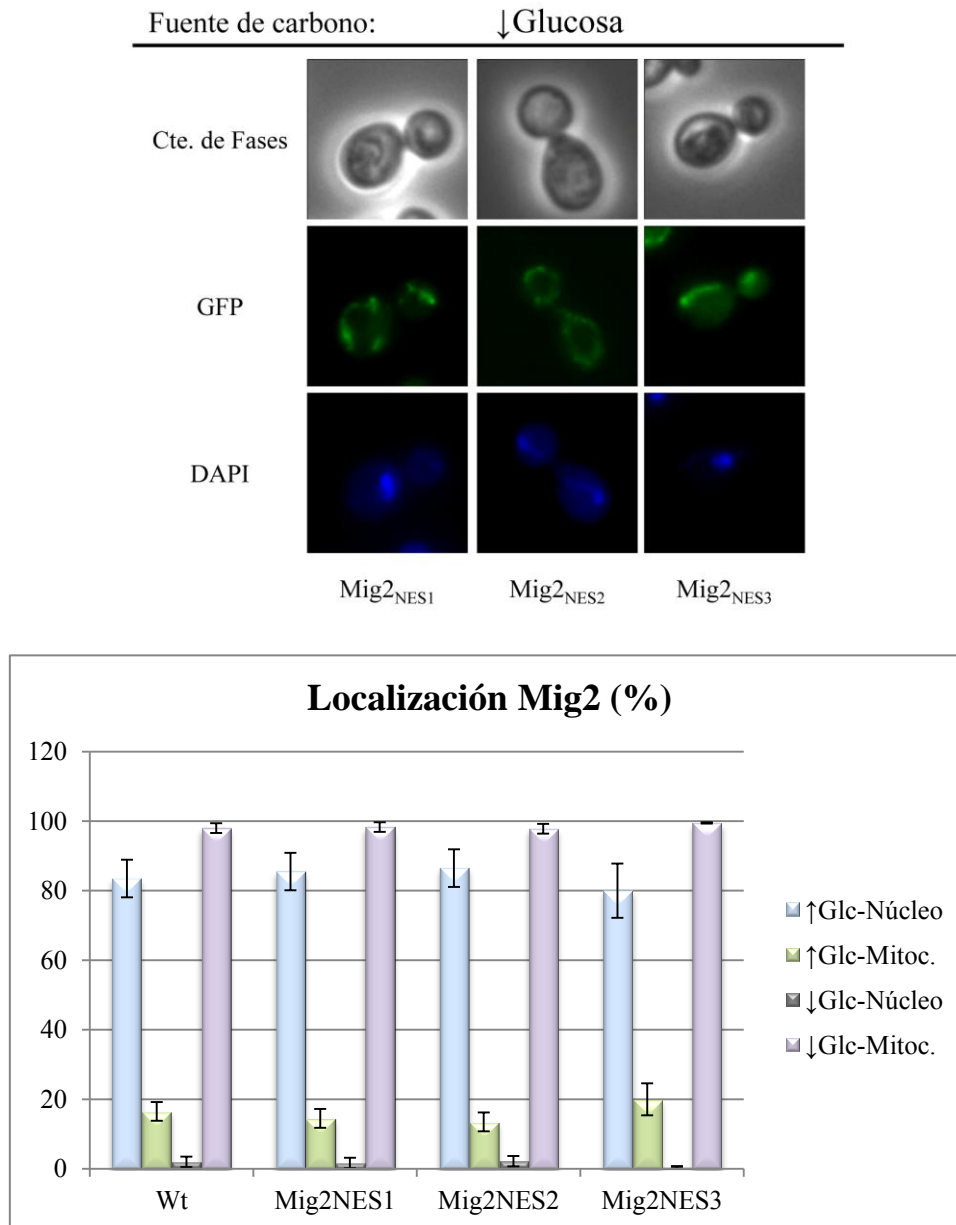


Figura R-3.2.2B: Localización de las proteínas Mig2-GFP, Mig2_{NES1}-GFP, Mig2_{NES2}-GFP y Mig2_{NES3}-GFP en *S. cerevisiae*. La mutación de las diferentes señales NESs no impide la salida del núcleo de la proteína de fusión Mig2-GFP en baja glucosa.

Los resultados obtenidos concuerdan con el hecho de que las diferentes proteínas mutantes en las NES de Mig2 continúen siendo capaces de interactuar con Xpo1 e indican que, por separado, la mutación de las posibles NESs encontradas en Mig2 no

afecta a su exportación nuclear o bien, que realmente estas secuencias no están implicadas en la salida de Mig2 del núcleo.

3.2.3. Xpo1 no parece ser la vía principal de exportación de Mig2.

A la vista de estos resultados nos planteamos dos posibles hipótesis para explicar la falta de efecto que tiene la mutación de las distintas NESs sobre la localización de Mig2 o su interacción con Xpo1. Por un lado, podría deberse a que dichas secuencias actúan de modo cooperativo y, por tanto, sería necesaria la mutación simultánea de varias para observar una retención de Mig2 en el núcleo. Otra posibilidad es que, si bien se ha demostrado que Mig2 y Xpo1 interaccionan tanto *in vivo* como *in vitro*, ésta no sea la vía de exportación principal implicada en la salida de Mig2 del núcleo.

Para comprobar si Xpo1 es la vía principal de exportación de Mig2 decidimos observar la localización de dicha proteína en un mutante Xpo1. El mutante *xpo1* es inviable y, como en el caso de *kap95*, es necesario el uso de una cepa termosensible. Dicha cepa es capaz de crecer correctamente a 22°C, comportándose como una cepa silvestre, pero a temperatura no permisiva (37°C) Xpo1 pierde su funcionalidad.

En primer lugar, procedimos a etiquetar en el genoma con GFP el gen *MIG2* de la cepa mutante termosensible para Xpo1 (KW121). Como marcador de selección se utilizó el gen de resistencia a la kanamicina. La cepa obtenida (FMY529) se creció en medio mínimo sin histidina y con alta glucosa recibiendo el mismo tratamiento que en el caso del mutante *kap95^{ts}*. Finalmente se obtuvieron cuatro muestras correspondientes a las temperaturas restrictiva y permisiva, así como a los medios con alta y baja glucosa. Estas muestras se procesaron para su estudio mediante microscopía de fluorescencia siguiendo el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.

Los estudios de fluorescencia que se muestran en la Fig. R-3.2.3 sugieren que, en alta glucosa, Mig2_{NES} se localiza en el núcleo celular, mientras que esta localización cambia al descender la glucosa del medio, saliendo Mig2 del núcleo y asociándose a la red mitocondrial. A la vista de los resultados obtenidos, Xpo1 parece no ser el sistema principal de exportación de Mig2, aunque no podemos descartar que colabore en la misma.

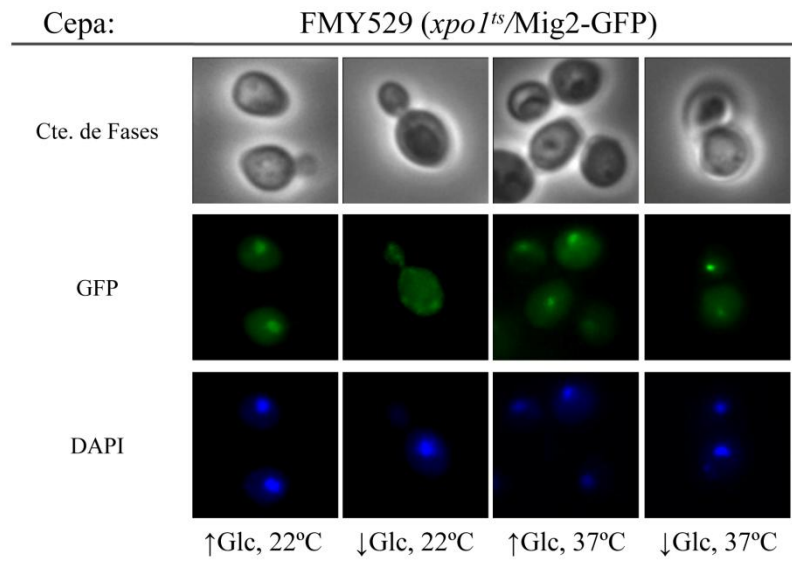


Figura R-3.2.3: Localización de la proteína de fusión Mig2-GFP en el mutante $\Delta xpo1$. La presencia de una proteína Xpo1 no funcional no conlleva la modificación del patrón de localización de la proteína de fusión Mig2-GFP.

El hecho de que la importación de Mig2 pueda estar regulada de algún modo por Mig1 (apartados 1.10 y 3.1.6 de Resultados), plantea la posibilidad de que esta proteína también juegue un papel en la exportación de Mig2. Si bien esta opción no parece muy probable, ya que en un mutante $\Delta mig1$ no se aprecia una disminución en la asociación de Mig2 a la red mitocondrial (apartado 1.10 de Resultados). Además, el principal sistema de exportación utilizado por Mig1 está mediado por Msn5 y como pudimos comprobar, no se aprecia acumulación alguna de Mig2 en el núcleo en condiciones de baja glucosa apartado 3.1.1 de Resultados).

4. Estudio del papel de Mig2 en las mitocondrias.

4.1. Estudio del crecimiento de un mutante $\Delta mig2$ en diferentes condiciones metabólicas.

En el primer apartado de resultados pudimos observar que determinadas condiciones metabólicas como estrés nutricional u oxidativo provocan la salida de Mig2 del núcleo y su asociación a la red mitocondrial. Esta asociación a las mitocondrias hizo que nos planteáramos la posibilidad de que Mig2 estuviera implicada en la regulación, por parte de la levadura, del uso de fuentes de carbono no fermentables.

Para comprobar esta hipótesis, era necesaria una cepa mutante incapaz de expresar la proteína Mig2. Para obtener dicha cepa se amplificó por PCR el casete de disrupción de *MIG2* a partir de una cepa Y14575 (Euroscarf) que posee el gen *MIG2* interrumpido con el gen *kanMX4* (confiere resistencia a geneticina). Una vez obtenido, ese casete se utilizó para transformar la cepa W303.1A y así obtener la cepa FMY511 (*MIG2::KanMX4*).

A continuación, se resembró una alícuota de la cepa control W303.1A y del mutante $\Delta mig2$ en agua estéril, ajustando la D.O. a 600 nm a 0,8. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} de ambas cepas, depositando una gota de 5 μ l de cada dilución en medio completo sólido YEP con glucosa al 4%, con etanol al 3% o con glicerol al 3% para así comprobar la capacidad de crecimiento que presenta dicha cepa en presencia de diferentes fuentes de carbono.

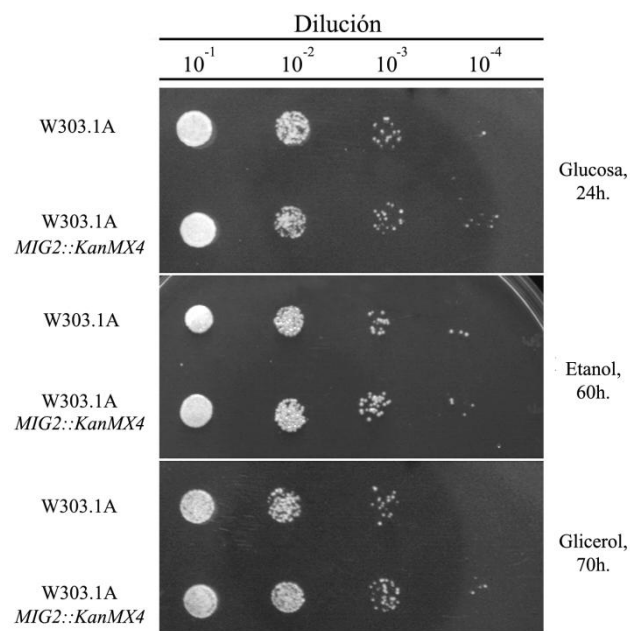


Figura R-4.1: Crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono de una cepa mutante $\Delta mig2$. La ausencia de la proteína Mig2 no parece implicar ninguna modificación en la capacidad de crecimiento de la levadura en presencia de glucosa, glicerol o etanol.

Como podemos apreciar en la figura R-4.1, la ausencia de Mig2 no parece tener efecto sobre la capacidad de crecimiento de la levadura, tanto en presencia de una fuente de carbono fermentable (glucosa), como de una fuente no fermentable (etanol o glicerol).

4.2. Mig2 interacciona con Ups1 de manera dependiente de glucosa.

Una vez observado que, aparentemente, la ausencia de la proteína Mig2 no supone una desventaja en la capacidad de la levadura para adaptarse a diferentes condiciones metabólicas, decidimos realizar una búsqueda, en las bases de datos existentes, de posibles proteínas que interaccionasen con Mig2, tanto física como genéticamente.

A través de las bases BIOGRID (<http://www.thebiogrid.org/>) y DRYGIN (<http://www.drygin.ccb.utoronto.ca/>) encontramos diez proteínas que presentan una interacción genética con Mig2 (Fig. R-4.2A). Siete de ellas están clasificadas dentro de la categoría “metabolismo/mitocondria”. Dentro de este grupo se encuentra Ups1, proteína mitocondrial localizada en el espacio intermembrana y a la que ya hicimos referencia en la introducción. Entre las funciones de Ups1 se encuentra la regulación de los niveles de cardiolipina, el mantenimiento de la morfología mitocondrial y el procesamiento de proteínas mitocondriales (^{151,152}).

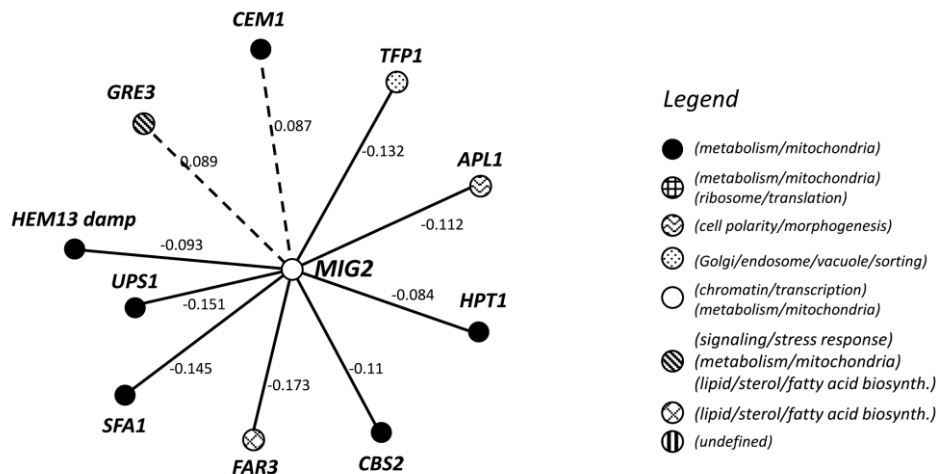


Figura R-4.2A: Mapa de interacciones genéticas del factor transcripcional Mig2. La proteína Mig2 presenta una interacción genética con diez proteínas, de las cuales, siete están incluidas dentro del grupo “metabolismo/mitocondrias”.

Una vez confirmada la existencia de una interacción genética entre Mig2 y Ups1, dada la localización mitocondrial de la misma, nos planteamos la posibilidad de que

existiera una interacción física entre ambas proteínas. De existir dicha interacción podría ser la responsable de la asociación de Mig2 a la red mitocondrial.

Para comprobar esta hipótesis partimos de una cepa que contiene el gen *UPS1* etiquetado en el genoma con el epítipo myc (cedida amablemente por el Dr. Sesaki) y procedimos a etiquetar Mig2 con GFP del mismo modo mostrado con anterioridad, generando la cepa FMY503.

A continuación, tanto la cepa sometida a estudio como el control que expresa tetR-GFP crecieron en 200 ml de YEP con alta glucosa hasta una DO_{600} de 0,8. Una vez alcanzada dicha densidad, se dio un pase de una hora a YEP glicerol a la mitad del cultivo y ambas muestras se procesaron según se indica en Materiales y Métodos. Cantidades idénticas de extracto se pusieron en contacto con una resina de proteína A-*Sepharosa* a la que previamente se había dejado interaccionando con un anticuerpo anti-GFP, y se mantuvieron a 4°C en una noria durante toda la noche. Tras lavar de manera exhaustiva las muestras, éstas se procesaron para su análisis mediante *Western Blot*, revelándose las proteínas retenidas con un anticuerpo monoclonal anti-myc.

Como podemos apreciar en la figura R-4.2B existe una mínima interacción entre Ups1 y Mig2 en presencia de glucosa, mientras que la intensidad de la misma se incrementa considerablemente en ausencia de la hexosa. No se observa interacción alguna con el control tetR-GFP, mostrando que la interacción entre Ups1 y Mig2 es específica.

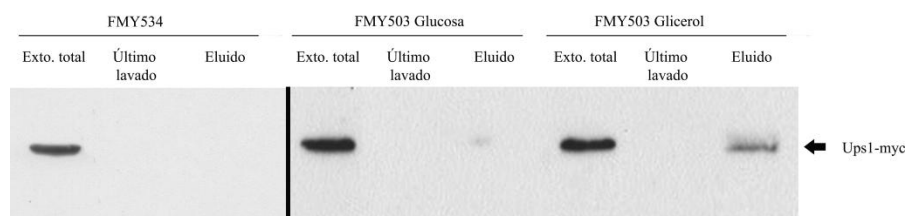


Figura R-4.2B: Inmunoprecipitación entre Mig2-GFP y Ups1-myc. En presencia de glucosa no se aprecia interacción entre ambas proteínas, mientras que es intensa en ausencia de la misma.

Para confirmar esta interacción, así como concretar las condiciones que regulan la misma, realizamos un ensayo de coimmunoprecipitación precipitando Ups1-myc y detectando Mig2-GFP. Las condiciones ensayadas fueron las mismas que se usaron en los estudios de localización de Mig2 mediante microscopía de fluorescencia: alta glucosa (Glc 4%); baja glucosa (Glc < 0,05%); glicerol (3%); alta glucosa más 5mM de H_2O_2 (estrés oxidativo); alta glucosa más 0,1 mM de t-BOOH (estrés oxidativo) y alta glucosa más 0,4 M de NaCl (estrés osmótico).

Se observa (Fig. R-4.2C) una leve interacción entre Ups1 y Mig2 en aquellas condiciones en las que el monosacárido glucosa está presente (calles 1, 4, 5 y 6), estimulándose esta interacción en presencia de agentes inductores tanto de estrés oxidativo como de estrés osmótico (calles 4, 5 y 6). Por el contrario, en condiciones de estrés nutricional la interacción entre ambas proteínas es fuerte. A la vista de estos resultados, podemos concluir que la presencia de glucosa en el medio es uno de los factores reguladores de la interacción entre Ups1-myc y Mig2-GFP.

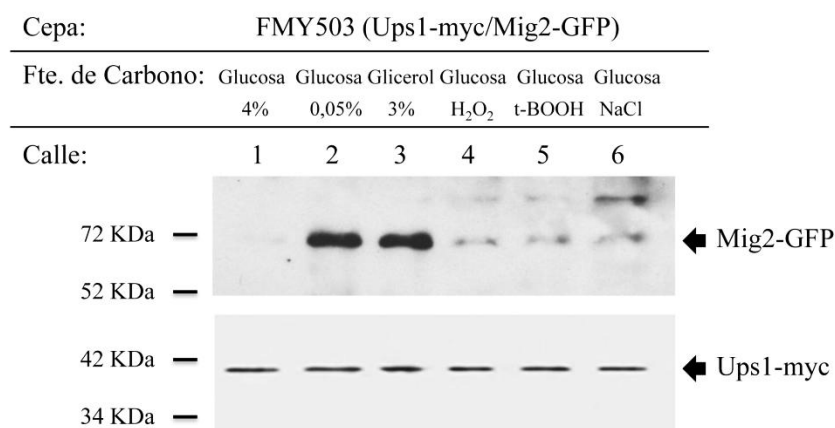


Figura R-4.2C: Inmunoprecipitación entre Ups1-myc y Mig2-GFP. En presencia de glucosa se observa una leve interacción entre ambas proteínas, mientras que esta interacción es fuerte en ausencia del monosacárido.

4.3. La asociación de Mig2 a la red mitocondrial, en condiciones de estrés nutricional, depende de Ups1.

Como hemos podido observar, en condiciones de estrés nutricional y estrés oxidativo Mig2 sufre un transporte muy rápido desde el interior del núcleo celular al citoplasma, donde pasa a asociarse a la red mitocondrial. En ausencia de glucosa, pero no en presencia de un agente oxidativo como peróxido de hidrógeno o tertbutilo, Mig2 interacciona de manera intensa con la proteína mitocondrial Ups1. Ambos resultados sugieren que la localización mitocondrial de Mig2 en ausencia de glucosa se debe a la interacción de la misma con Ups1.

Para confirmar esta teoría, realizamos una purificación de mitocondrias en presencia y ausencia de Ups1 según está descrito en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos. Las levaduras utilizadas fueron la cepa FMY501 (Mig2-GFP) y la cepa FMY510 ($\Delta ups1$ /Mig2-GFP).

En la figura R-4.3A podemos observar que, cuando la fuente de carbono presente en el medio es el glicerol, en ausencia de Ups1 la cantidad de Mig2 detectada en las

mitocondrias disminuye de manera muy acusada. Por tanto, parece que *Ups1* es responsable de la asociación de Mig2 a la red mitocondrial en ausencia de glucosa.

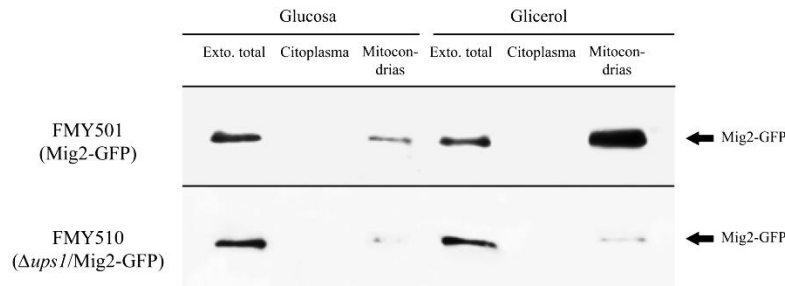
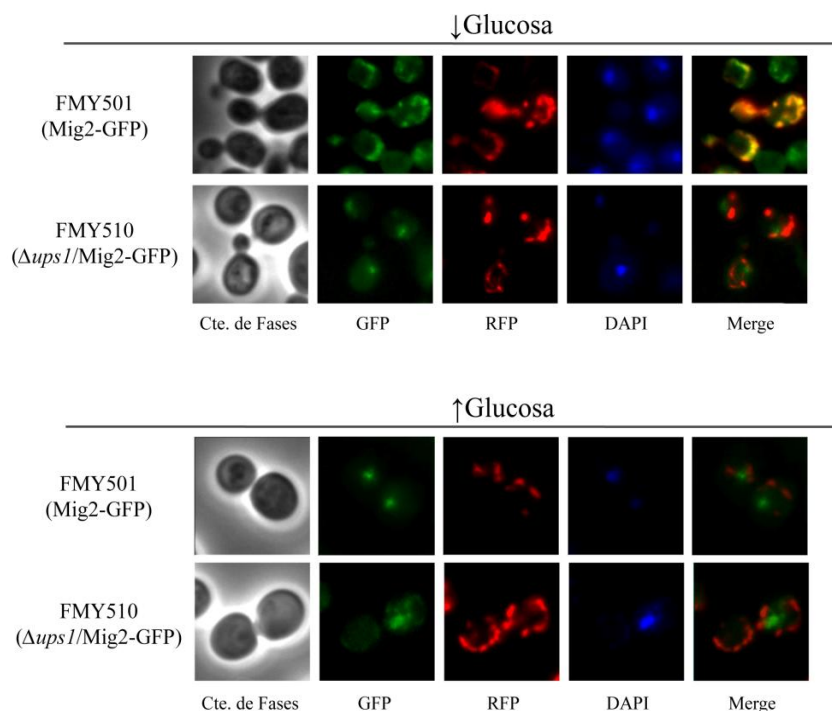


Figura R-4.3A: Localización de Mig2 en diferentes fracciones subcelulares en presencia y ausencia de *Ups1*. En ausencia de *Ups1*, la cantidad de Mig2 presente en las mitocondrias desciende drásticamente en condiciones de baja glucosa.

Para confirmar estos resultados, decidimos analizar mediante microscopía de fluorescencia la localización subcelular de Mig2-GFP en una cepa mutante $\Delta ups1$. Para ello, la cepa FMY510 se creció en las mismas condiciones utilizadas a lo largo del resto del trabajo, sufriendo un pase de 5 minutos a baja glucosa. Tras este tiempo, las muestras correspondientes al crecimiento en alta y baja glucosa se procesaron y observaron al microscopio de fluorescencia.

En presencia de glucosa, tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante $\Delta ups1$, Mig2 se acumula en el núcleo. Por el contrario, tras permanecer durante 5 minutos en un medio con baja glucosa, la localización de Mig2 en ambas cepas es diferente. Mientras que en una cepa silvestre la proteína Mig2 se encuentra asociada a la red mitocondrial en el 98% de las células, en ausencia de *Ups1*, aproximadamente el 79% de las células muestran una localización nuclear de Mig2.



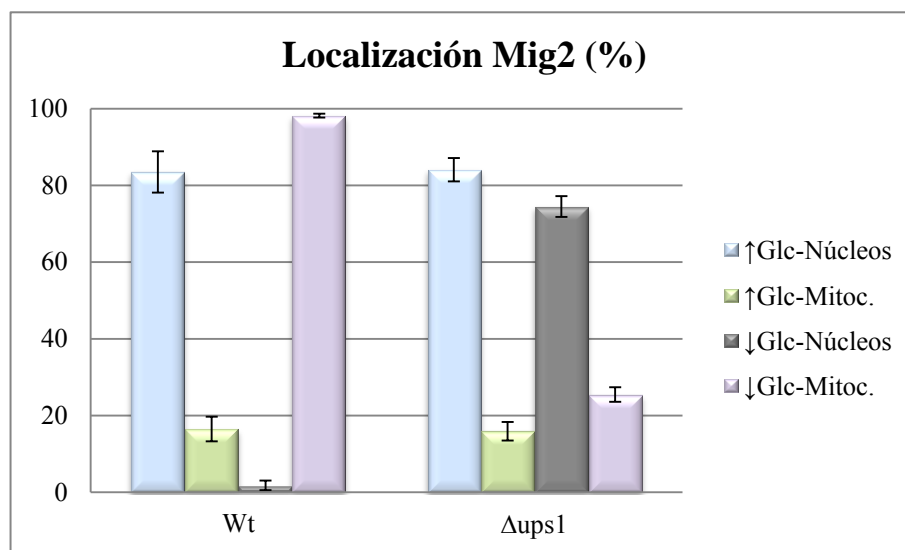


Figura R-4.3B: Localización subcelular de Mig2-GFP en las cepas FMY501 y FMY510. La ausencia de la proteína Ups1 provoca que, en baja glucosa, una gran parte de Mig2 quede retenida en el núcleo y no se asocie a la red mitocondrial.

Estos resultados, unidos a los obtenidos mediante los ensayos de fraccionamiento subcelular, muestran la importancia de la interacción entre Ups1 y Mig2 para la asociación de esta última a la red mitocondrial en ausencia de glucosa.

4.4. El represor Mig2 no está implicado en la regulación de los niveles intracelulares de Ups1.

El hecho de que la asociación de Mig2 a la red mitocondrial sea dependiente de su interacción con Ups1, nos llevó a plantear la posibilidad de que la función del represor transcripcional en este orgánulo estuviera relacionada con la regulación de los niveles intracelulares de la proteína mitocondrial Ups1. Con el fin de confirmar esta hipótesis, realizamos un ensayo *Western Blot* en las cepas YRJ2012 (Ups1-myc) y FMY504 ($\Delta mig2$ /Ups1-myc). Para llevar a cabo dicho experimento, las cepas mencionadas crecieron en 10 ml de YEP con alta glucosa hasta una DO_{600} de 0,8, momento en el cual se dio un pase de una hora a YEP con baja glucosa a la mitad del cultivo. Ambas muestras se procesaron según se indica en Materiales y Métodos.

Los extractos obtenidos se analizaron por *Western Blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-myc. Como se observa en la figura R-4.4, la ausencia de la proteína Mig2 no parece tener gran repercusión sobre los niveles intracelulares de Ups1.

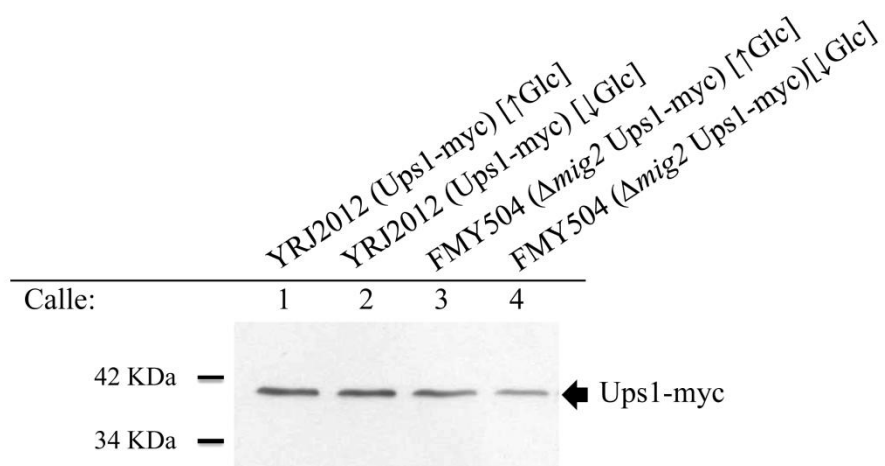


Figura R-4.4: Niveles intracelulares de Ups1-myc en una cepa silvestre (YRJ2012) y en un mutante $\Delta mig2$ (FMY504). Los niveles de Ups1 presentes en la célula son constantes en alta y baja glucosa (calles 1 y 2) y no se ven alterados significativamente por la ausencia de Mig2 (calles 3 y 4).

4.5. Mig2 está implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, posiblemente, mediante su participación en la ruta de fusión.

Tras observar que la ausencia de Mig2 no conlleva, a simple vista, defectos en la capacidad de crecimiento de la levadura en presencia de fuentes de carbono no fermentables, que Mig2 interacciona con Ups1 y que Mig2 depende de Ups1 para asociarse a las mitocondrias, nos planteamos la posibilidad de que la función de Mig2 en estos orgánulos pudiera estar relacionada con alguno de los papeles que Ups1 juega en los mismos.

Una de las funciones de Ups1 en las mitocondrias es la regulación de su morfología posiblemente a través del papel que juega en la topogénesis de la proteína Mgm1. En ausencia de Ups1 y presencia de glucosa Pcp1 no es capaz de procesar a Mgm1, de tal manera que sólo está presente la forma l-Mgm1. El mutante $\Delta ups1$ se caracteriza por presentar problemas de crecimiento en presencia de glucosa, así como por una morfología mitocondrial anómala caracterizada por túbulos incompletos y fragmentos mitocondriales, fenotipo propio de mutantes de fusión como $\Delta fzo1$.

Para comprobar si, al igual que Ups1, Mig2 está implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial nos propusimos analizar la morfología de estos orgánulos en una cepa mutante $\Delta mig2$ y comprobar el fenotipo observado con diferentes mutantes tanto de la ruta de fusión como de la ruta de fisión mitocondrial.

Las cepas utilizadas en estos experimentos se muestran a continuación:

Nombre	Genotipo
BY4742	<i>MATα; his3Δ 1; leu2Δ 0; met15Δ 0; ura3Δ 0.</i>
YRJ2011	<i>MATα; his3; leu2; lys2; trp1; ura3; ups1::kanMX4.</i>
Y01489	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; dnm1::kanMX4.</i>
Y03319	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; fzo1::kanMX4.</i>
Y14575	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; mig2::kanMX4.</i>

Tabla R-4.5: Cepas utilizadas en los estudios de morfología mitocondrial.

Las levaduras indicadas se transformaron con el plásmido pRS316/Su9-RFP para permitir la observación de las mitocondrias. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo sólido sin uracilo y con glucosa para, posteriormente, crecer durante 16 horas en medio líquido con agitación a 28°C. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada ($DO_{600} = 1,0$) los cultivos sufrieron un pase a medio con baja glucosa durante una hora. A continuación, las muestras se procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia.

En presencia de glucosa, una cepa silvestre se caracteriza por presentar redes mitocondriales simples con pocos túbulos y ramas. En condiciones de estrés nutricional, esta morfología se vuelve más compleja y ramificada. Como podemos observar en la figura R-4.5A, la cepa $\Delta mig2$ presenta el mismo fenotipo que una cepa silvestre en presencia de glucosa. Por el contrario, al descender la cantidad de glucosa en el medio, un mutante para la proteína Mig2 presenta un fenotipo mitocondrial anómalo, caracterizado por la presencia de fragmentos y acúmulos mitocondriales.

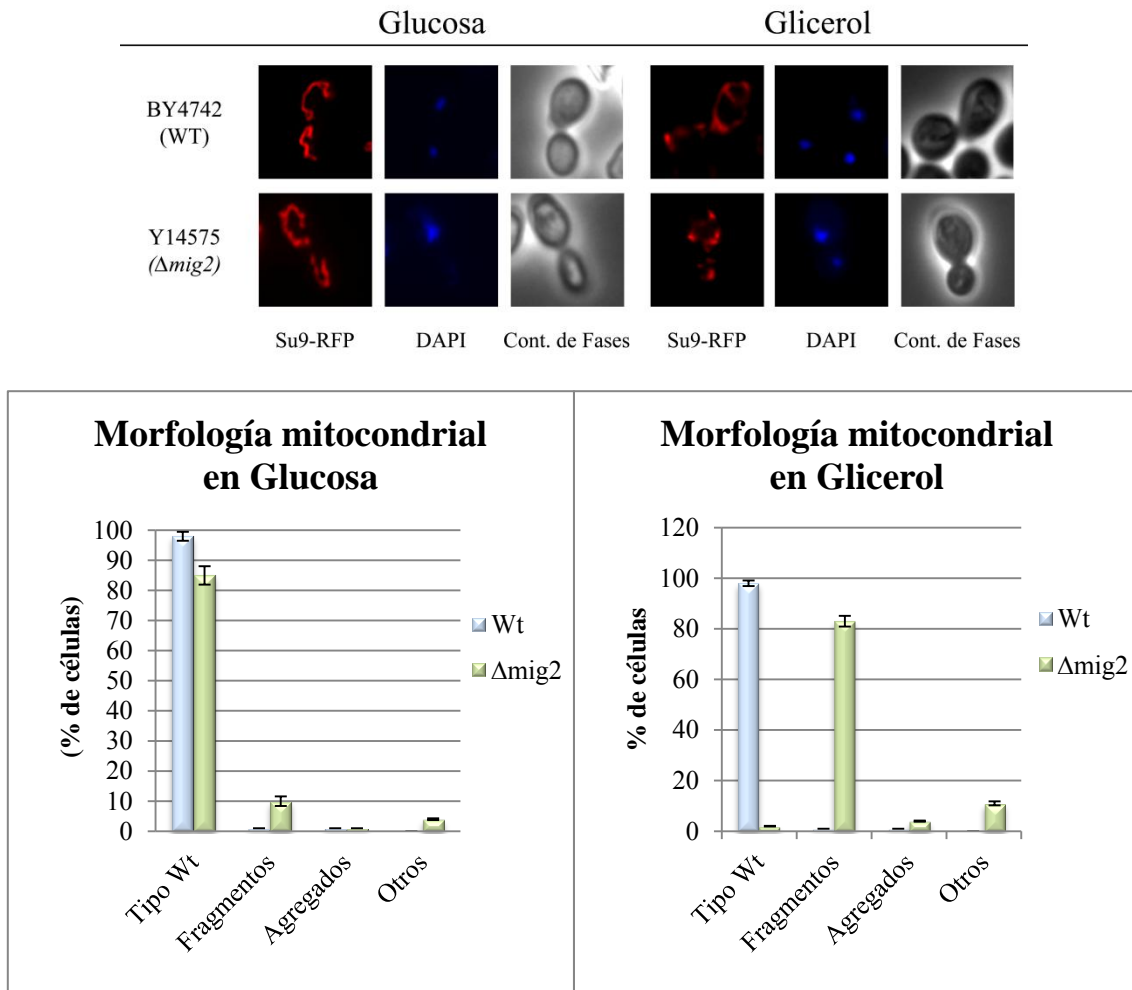


Figura R-4.5A: Morfología mitocondrial en una cepa silvestre y un mutante $\Delta mig2$ en alta y baja glucosa. La ausencia de la proteína Mig2 origina un fenotipo anómalo en la morfología mitocondrial cuando la levadura crece en presencia de glicerol.

Con el fin de confirmar que el fenotipo observado se asemeja al presentado por otros mutantes de fusión como $\Delta ups1$ y $\Delta fzo1$ analizamos la morfología mitocondrial propia de estas cepas. Así mismo, también se estudió la morfología presentada por mutantes en la ruta de fisión mitocondrial, como la proteína Dnm1. Dado que sólo observamos modificaciones en la morfología de estos orgánulos cuando la levadura crece en glicerol, a partir de este punto, los estudios se realizaron siempre en estas condiciones metabólicas.

Como podemos observar en la figura R-4.5B, mutantes en la ruta de fisión mitocondrial, como es el caso del mutante $\Delta dnm1$, se caracterizan por presentar todas sus mitocondrias acumuladas en un gran agregado. Las mitocondrias de estos mutantes no son capaces de dividirse, originando redes complejas que contienen muchas ramificaciones interconectadas entre sí. En el caso de mutantes de fusión como $\Delta fzo1$ y $\Delta ups1$, la incapacidad de las mitocondrias de unirse entre sí, unida al exceso de

episodios de división, originan fragmentos mitocondriales dispersos a lo largo de la célula.

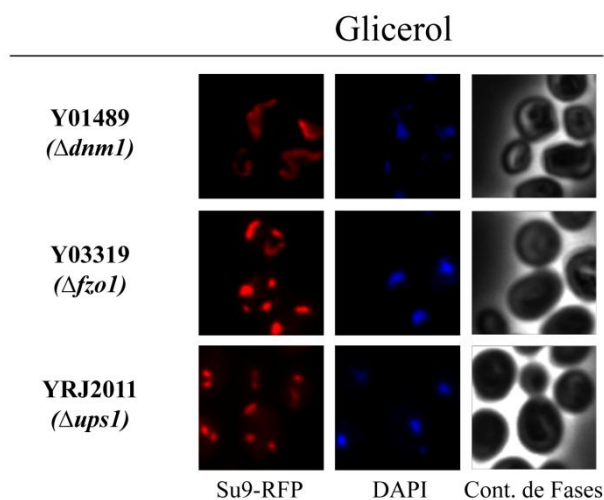


Figura R-4.5B: Morfología mitocondrial de las cepas mutantes $\Delta dnm1$, $\Delta fzo1$ y $\Delta ups1$. Mutantes en componentes de la ruta de fisión, como *Dnm1*, muestran agregados mitocondriales, mientras que, mutantes de fusión como $\Delta fzo1$ o $\Delta ups1$ se caracterizan por presentar fragmentos mitocondriales.

El fenotipo anómalo mostrado por el mutante $\Delta mig2$ presenta una gran similitud al fenotipo propio de los mutantes $\Delta fzo1$ y $\Delta ups1$. Este hecho nos llevó a plantear la posibilidad de que *Mig2* estuviera implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, posiblemente, a través de su participación en la ruta de fusión. Con el fin de comprobar esta hipótesis, decidimos verificar si la ausencia del gen *MIG2* era capaz de revertir el fenotipo aberrante de alguno de los mutantes mostrados en la figura anterior, ya que está descrito que el exceso de fragmentación propio de mutantes en componentes de la ruta de fusión puede ser rescatado por la delección de algunos genes esenciales de la ruta de fisión y viceversa (¹⁵⁵).

En primer lugar, procedimos a sustituir el gen *MIG2* por *HIS3* en las cepas $\Delta dnm1$ y $\Delta fzo1$ y el gen *UPS1* por *HIS3* en la cepa $\Delta mig2$. Para llevar a cabo dicha sustitución, amplificamos por PCR el gen *HIS3* utilizando como molde el plásmido pFA6a-*HIS3Mx6* y los oligos apropiados para cada uno de los genes. Una vez obtenidos los casetes de, se transformaron las cepas correspondientes para, finalmente, generar los dobles mutantes FMY505 ($\Delta dnm1/\Delta mig2$), FMY506 ($\Delta fzo1/\Delta mig2$) y FMY512 ($\Delta mig2/\Delta ups1$).

Una vez obtenidos los dobles mutantes, se transformaron con el plásmido pRS316/Su9-RFP a modo de marcador mitocondrial y se observaron al microscopio de fluorescencia.

El análisis de estas células nos permitió observar que el fenotipo mitocondrial de los dobles mutantes $\Delta fzo1/\Delta mig2$ y $\Delta mig2/\Delta ups1$ no muestra diferencias respecto al manifestado por los correspondientes mutantes simples. Por el contrario, el doble mutante $\Delta dnm1/\Delta mig2$ no presenta las mitocondrias agregadas e interconectadas

propias del mutante $\Delta dnm1$, sino que estos orgánulos se organizan formando un único anillo localizado en la periferia de la célula.

El hecho de que el doble mutante $\Delta dnm1/\Delta mig2$ sea capaz, al menos parcialmente, de recuperar la capacidad de formación de túbulos mitocondriales, parece indicar que el papel de Mig2 en la morfología mitocondrial se ejerce a través de su participación en la ruta de fusión. Un efecto curioso de esta doble mutación es el hecho de que se forme un único túbulo completo sin divisiones, aparentemente próximo a la membrana celular.

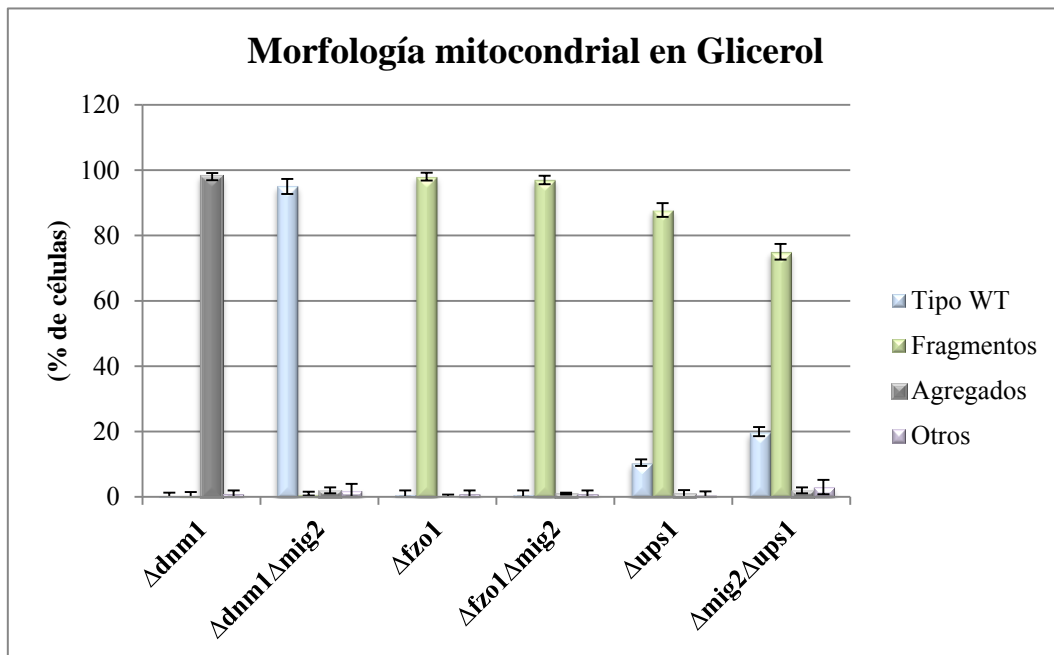
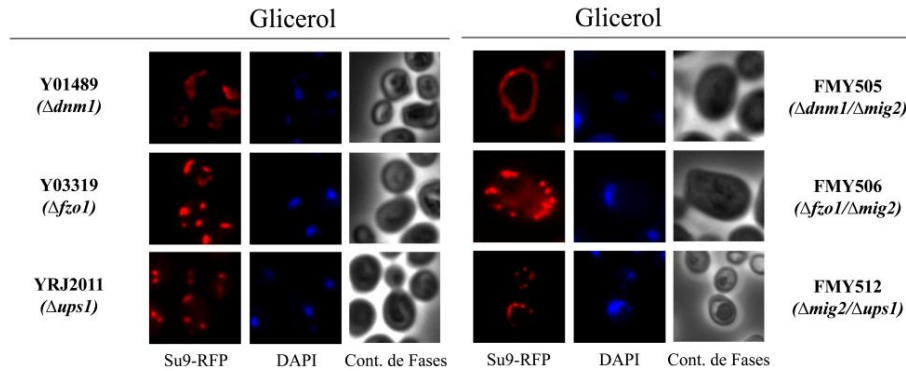


Figura R-4.5C: Morfología mitocondrial de las cepas mutantes $\Delta dnm1$, $\Delta fzo1$, $\Delta ups1$, $\Delta dnm1/\Delta mig2$, $\Delta fzo1/\Delta mig2$ y $\Delta mig2/\Delta ups1$. La ausencia de la proteína Mig2 parece ser capaz de revertir parcialmente el fenotipo anómalo del mutante de fisión mitocondrial $\Delta dnm1$, por el contrario, no parece tener efecto sobre el fenotipo de los mutantes de fusión $\Delta ups1$ y $\Delta fzo1$.

4.6. La ausencia de la proteína Mig2 no conlleva problemas de segregación del mtDNA.

Una vez confirmada la participación de Mig2 en los procesos de morfología mitocondrial, nos propusimos profundizar más en el estudio de la función que lleva a cabo en estos orgánulos.

Los componentes de la ruta de fusión mitocondrial, al igual que sucede en todo sistema biológico, no tienen la misma importancia o participan de la misma manera en el proceso que regulan. Se ha descrito que la ausencia de proteínas fundamentales en la fusión, como Fzo1, provoca problemas en la segregación mitocondrial entre células hijas con la consiguiente pérdida de viabilidad por pérdida del mtDNA en presencia de sustratos no fermentables. Con el fin de comprender un poco más el papel de Mig2 en las mitocondrias, decidimos llevar a cabo estudios de herencia del mtDNA en una cepa $\Delta mig2$, así como en los dobles mutantes de esta proteína utilizados anteriormente.

Para abordar estos estudios, las cepas Wt, $\Delta mig2$, $\Delta ups1$, $\Delta fzo1$, $\Delta mig2/\Delta ups1$ y $\Delta fzo1/\Delta mig2$ se crecieron en YEP con alta glucosa a 28°C y 37°C hasta una DO_{600} de 0,3. Una vez alcanzada dicha densidad óptica se obtuvieron muestras a las 0 h, 2,5 h, 5 h, 7,5 h y 24 h. A continuación, estas muestras se diluyeron de forma adecuada para permitir el crecimiento de un número cuantificable de colonias por placa. Las colonias se dejaron crecer durante 24 horas en placas de YEP con glucosa a la temperatura correspondiente y, posteriormente, se replicaron en placas de YEP con baja glucosa donde crecieron durante 48 horas. El porcentaje de colonias supervivientes en baja glucosa tras la réplica nos indica las colonias capaces de crecer en ausencia de fuentes de carbono no fermentables y, por tanto, es un reflejo de estabilidad del mtDNA.

Los datos obtenidos indican que a 28°C sólo hay dos cepas que muestran serios problemas de crecimiento en presencia de fuentes de carbono no fermentables, el mutante $\Delta fzo1$ y la cepa derivada de ésta, la $\Delta fzo1/\Delta mig2$ (Fig. R-4.6A). El resto de cepas no presentan problemas lo que indica que son capaces de transmitir el mtDNA a las células hijas.

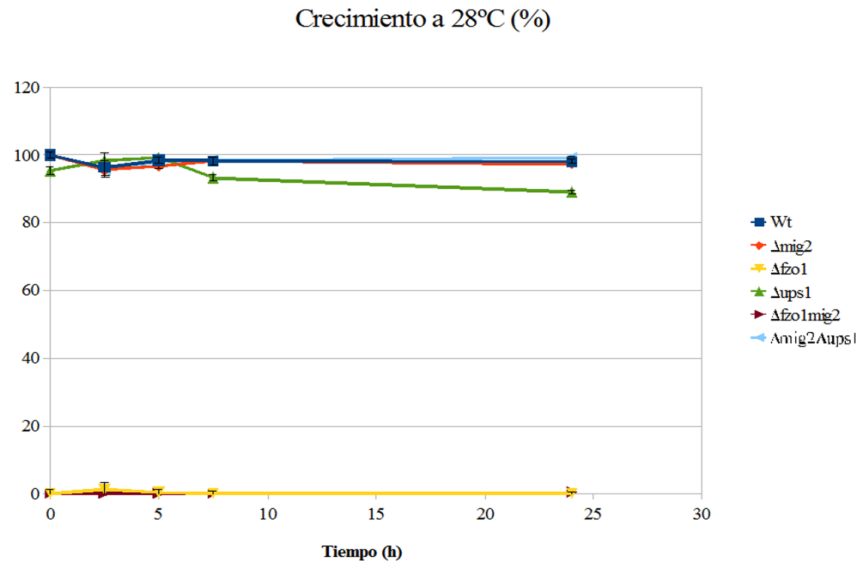


Figura R-4.6A: Estudio de la herencia del mtDNA en las cepas Wt, $\Delta mig2$, $\Delta ups1$, $\Delta fzo1$, $\Delta mig2/\Delta ups1$ y $\Delta fzo1/\Delta mig2$ a 28°C. Aquellas levaduras con problemas en la segregación del mtDNA muestran defectos de crecimiento en ausencia de fuentes de carbono fermentables.

A 37°C cuando, las condiciones son más restrictivas, hay una ligera modificación de la capacidad de crecimiento. Las cepas que ya presentaban dificultades de herencia del mtDNA a 28°C, evidentemente, continúan mostrando los mismos problemas. Por el contrario, la cepa $\Delta ups1$ que no mostraba dificultades de crecimiento a 28°C pierde de forma muy acusada su capacidad para crecer en presencia de etanol. Inesperadamente, $\Delta mig2$ no sólo no presenta ningún problema de crecimiento a esta temperatura, sino que es capaz de rescatar parcialmente el fenotipo mostrado por el mutante $\Delta ups1$.

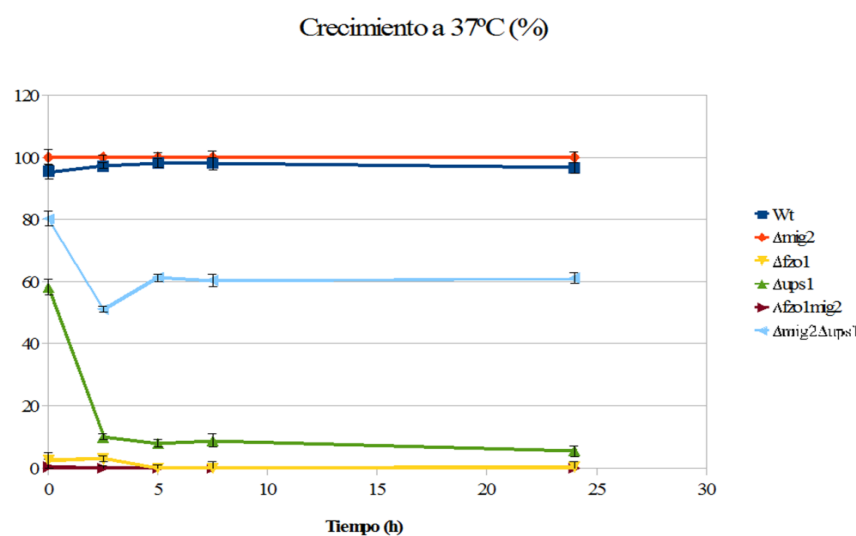


Figura R-4.6B: Estudio de la herencia del mtDNA en las cepas Wt, $\Delta mig2$, $\Delta ups1$, $\Delta fzo1$, $\Delta mig2/\Delta ups1$ y $\Delta fzo1/\Delta mig2$ a 37°C. Aquellas levaduras con problemas en la segregación del mtDNA muestran defectos de crecimiento en ausencia de fuentes de carbono fermentables.

Para confirmar estos datos, las muestras obtenidas de cada una de las cepas a las 24 horas, tanto a 28°C como a 37°C, se observaron al microscopio de fluorescencia tras su tinción con DAPI, lo que permite la visualización del mtDNA. Los datos obtenidos (no mostrados) coinciden con los mostrados en las gráficas anteriores. Mientras que las cepas Wt, $\Delta mig2$, $\Delta ups1$ y $\Delta mig2/\Delta ups1$ son capaces de conservar el mtDNA, no se observa rastro alguno de éste en los mutantes $\Delta fzo1$ y $\Delta fzo1/\Delta mig2$.

4.7. La ausencia de Mig2 es capaz de revertir parcialmente los problemas de crecimiento en un mutante $\Delta ups1$.

Los datos obtenidos en el apartado anterior muestran que el doble mutante $\Delta mig2/\Delta ups1$ presenta una mayor capacidad que el mutante simple $\Delta ups1$ a la hora de segregar su mtDNA. Por tanto, decidimos comprobar si la ausencia de la proteína Mig2 tiene alguna influencia sobre la capacidad de crecimiento del mutante $\Delta ups1$.

Como podemos apreciar en la figura R-4.7, la ausencia de Mig2 permite que el mutante $\Delta ups1$ pueda crecer en presencia de sustratos no fermentables como etanol o glicerol, al mismo tiempo que mejora la capacidad de crecimiento de esta cepa en un medio rico en glucosa.

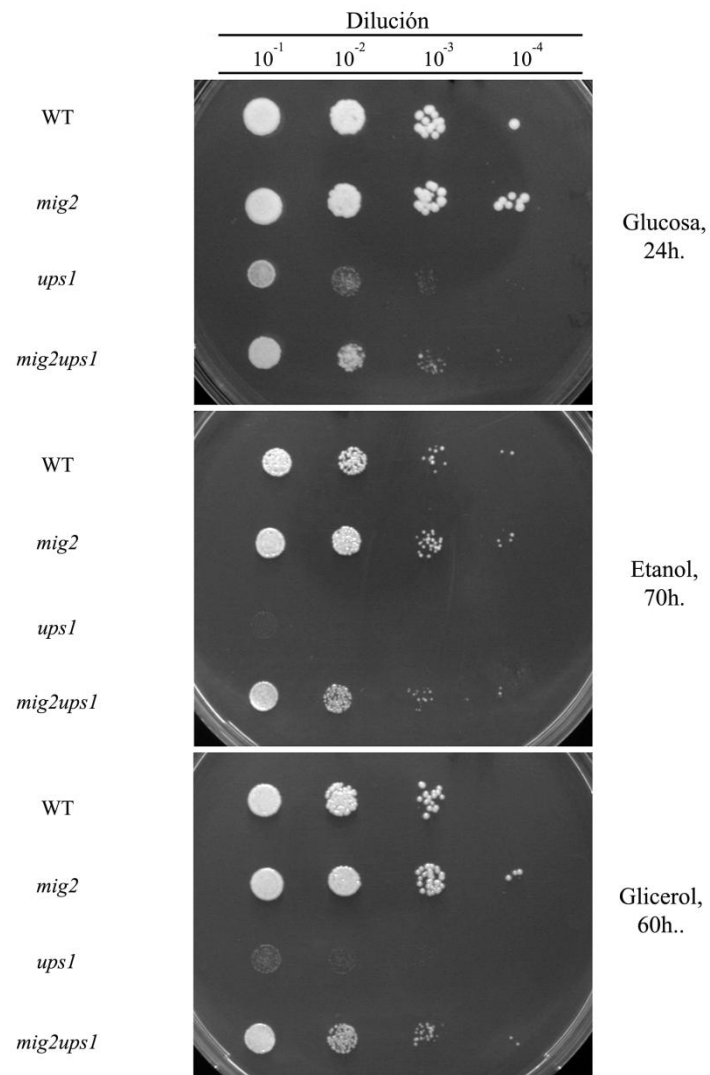


Figura R-4.7: Estudio del crecimiento de las cepas Wt, $\Delta mig2$, $\Delta ups1$ y $\Delta mig2/\Delta ups1$. La falta del gen *MIG2* es capaz de revertir los problemas de crecimiento presentados por el mutante $\Delta ups1$ en presencia de etanol y glicerol, así como mejorar la capacidad de crecimiento de esta cepa en presencia de glucosa.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

En la introducción hacíamos referencia a la necesidad, por parte de todos los seres vivos, de una adaptación dinámica y constante a las fluctuaciones del medio. Los microorganismos, generalmente, viven en ambientes muy variables, hecho que propició el desarrollo de un sofisticado programa genético capaz de responder a las variaciones ambientales.

En cuanto a la disponibilidad de nutrientes, de entre los múltiples azúcares presentes en la naturaleza la levadura utiliza de forma preferente la glucosa. Cuando esta fuente de carbono está presente en el medio, se activa un complejo sistema de respuesta que comprende la modificación en el patrón de expresión de multitud de genes, posibilitando la utilización del monosacárido y reprimiendo la expresión de aquellos genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono alternativas.

Las teorías actuales muestran la señalización por glucosa como un mecanismo dinámico generado en respuesta a estrés nutricional. Este modelo se basa en el establecimiento de equilibrios dinámicos entre las fracciones proteicas responsables, en última instancia, de la expresión génica, de tal manera que tanto la localización como las interacciones entre componentes, son función de la concentración de glucosa presente en el medio, permitiendo que la célula alcance un estado metabólico óptimo, resultado de la integración de multitud de señales extracelulares (^{222,223}).

El establecimiento de equilibrios dinámicos para la consecución de una adecuada regulación génica resulta razonable teniendo en cuenta que los microorganismos, de forma natural, crecen en ambientes sometidos a cambios constantes. De este modo, la célula consigue una adaptación rápida, precisa y flexible en cada situación.

Estos mecanismos de adaptación a fluctuaciones ambientales están muy conservados evolutivamente. De hecho, el sistema de señalización en respuesta a glucosa de *S. cerevisiae* es, a nivel molecular, similar al presente en eucariotas superiores. Cuando la glucosa presente en el medio se detecta, origina una señal que se transmite al interior de la célula y desencadena una respuesta que, en última instancia, conlleva una modificación en los patrones de expresión génica con la consiguiente adaptación del metabolismo celular.

La importancia del sistema de señalización por glucosa en levaduras puede verse reflejada en la gran complejidad que presenta. En primer lugar, la existencia de múltiples vías de detección y señalización de glucosa (Ras/cAMP, Gpr1/Gpa2 y Snf3/Rgt2) permite a la célula estimar con gran precisión la concentración este azúcar presente en el medio externo y generar la respuesta adecuada. Así mismo, la presencia simultánea de distintos reguladores transcripcionales capaces de unirse a motivos de DNA muy similares, pero con distinta afinidad, permite a la célula modular el grado de esta respuesta. Tal es el caso de los represores transcripcionales Mig1 y Mig2. Ambas

proteínas presentan en su estructura motivos de dedos de zinc y son capaces de unirse a secuencias de DNA casi idénticas, ricas en GC. Varios trabajos demuestran que Mig1 y Mig2 son capaces de llevar a cabo una regulación combinada, si bien Mig1 sería el represor principal y Mig2 actuaría como un modulador, permitiendo este sistema de dos componentes una regulación más fina en respuesta a pequeñas fluctuaciones de glucosa. El hecho de que Mig1 sea el regulador principal puede deberse a la mayor afinidad que presenta por los motivos presentes en los promotores de los genes que regula⁽⁵⁵⁾ o bien a la expresión diferencial de ambos factores en función de las condiciones. En este sentido, se ha descrito que la expresión de *MIG2* aumenta en presencia de glucosa, respecto a los valores mostrados en galactosa, a través de la vía Snf3/Rgt2, mientras que la expresión de *MIG1* se encuentra controlada de forma negativa en presencia del monosacárido, tanto por Mig2 como por la propia proteína Mig1⁽²²⁴⁾.

Además de la compleja regulación a la que está sometida la expresión de ambas proteínas y la diferente afinidad que muestran por el DNA, está descrito que tanto Mig1 como Mig2 se unen con diferente intensidad a los motivos de unión presentes en el promotor del gen *SUC2*⁽⁵⁵⁾. La existencia de dos sitios de unión, uno de alta y otro de baja afinidad, en un mismo promotor ha sido identificada como un mecanismo que permite a la célula modular la intensidad de la respuesta⁽²²⁵⁾.

Dentro del sistema de represión por glucosa del gen *SUC2*, componentes esenciales como Mig1^(31,47,43), Hxk2^(21,28,30,226) y Snf1^(35,36,48) han sido ampliamente estudiados a lo largo de los años, mientras que las investigaciones relativas a la proteína Mig2 son escasas y sólo asignan a ésta un papel modulador de la función del represor transcripcional Mig1. Pese a la importancia del binomio Mig1/Mig2 en la regulación por glucosa, resulta difícil creer que la única función de Mig2 sea actuar como represor secundario de Mig1. Por tanto, en este trabajo nos planteamos profundizar en el estudio de esta proteína a fin de poder construir un modelo más detallado de la regulación por glucosa del gen *SUC2* y como descubrir si, efectivamente, la función de Mig2 no va más allá de modular el papel represor de Mig1.

Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis nos permiten presentar el siguiente modelo de regulación de *SUC2* basado en equilibrios dinámicos, de tal manera que tanto los desplazamientos entre el núcleo y el citoplasma, como las interacciones entre los componentes del complejo represor, vienen definidos por la cantidad de glucosa presente (Fig. D-1, pág. 158).

Cuando la glucosa está presente en el medio, se detecta por los receptores de membrana Snf3 y Rgt2, lo que genera una señal a través de Grr1^{SCF} que, finalmente, llega hasta Rgt1. En estas condiciones, Rgt1 se encuentra hiperfosforilado debido a la acción de Tpk3, disociándose del complejo represor de ciertos genes como *HXX2*⁽¹¹⁾ o *MIG2*⁽²²⁴⁾ y permitiendo su expresión. El heterotrímero Snf1 se encuentra, mayoritariamente, en su forma inactiva en el citoplasma, aunque aún existe una pequeña fracción del complejo en forma activa capaz de localizarse en el núcleo, fosforilar a Mig1 e interaccionar con Mig2 (apartado 2.2.6 de Resultados). Así mismo, la reducida

cantidad de Hxk2 presente en el núcleo es capaz de evitar la fosforilación de Mig1 mediante su interacción con Mig1 y Snf1. Tanto Mig1 como Hxk2 son capaces de interactuar con Mig2 en estas condiciones (apartados 2.2.5 y 2.2.6 de Resultados). Esta red de interacciones es capaz de mantener a los represores transcripcionales Mig1 y Mig2 en su conformación activa y, por tanto, la represión de *SUC2* se mantiene (apartados 2.2.1 y 2.2.3 de Resultados). No se puede excluir la posibilidad de que la pequeña cantidad de Mig2 presente en el citosol se una a la fracción desensamblada de Snf1 y a las fracciones de Hxk2 y Mig1 presentes en este compartimento. También existe una pequeña fracción de Mig2 que, en presencia de glucosa, es capaz de asociarse a la red mitocondrial (apartado 1.9 de Resultados).

Al disminuir la glucosa intracelular se produce la activación de ciertas quinasas como Sak1, Tos3 y Elm1 (aunque Sak1 es la quinasa fundamental en el sistema de señalización por glucosa) que fosforilan a Snf1 en su dominio de activación (²²⁷) provocando que una fracción muy importante de la misma se localice en el núcleo gracias a Gal83. Una vez en el núcleo, debido a que Hxk2 deja de interactuar con Mig1 y ya no forma parte del complejo represor, Snf1 fosforila a Mig1 en la Ser₃₁₁ provocando que la mayor parte de esta proteína salga del núcleo (³⁰). Así mismo, la fracción nuclear de Snf1 es capaz de interactuar con la pequeña cantidad de Mig2 presente en este compartimento (apartado 2.2.6 de Resultados), aunque no parece que Snf1 sea la quinasa responsable de la regulación de esta proteína (⁵⁶). En estas condiciones, Hxk2 se fosforila en la Ser14 estimulándose su interacción con Xpo1 y su exportación nuclear (²⁶). Aún es capaz de mantener cierta interacción con Mig2, aunque desconocemos el compartimento subcelular en el que ésta tiene lugar (apartado 2.2.6 de Resultados). En condiciones de baja glucosa, sólo una pequeña fracción de Mig1 se localiza en el núcleo (quizás debido a la traducción de nueva proteína, a la acción de Reg1/Glc7 (u otra fosfatasa) o a que no toda la proteína es fosforilada por Snf1). Este remanente nuclear de Mig1 mantiene, en colaboración con Mig2, cierto grado de represión del gen *SUC2* (apartados 2.2.1, 2.2.3 y 2.2.5 de Resultados).

También cabe destacar la presencia de una pequeña fracción de Mig2 en el núcleo, tanto en alta como en baja glucosa, capaz de llevar a cabo la represión del gen *SUC2* en ausencia del represor transcripcional Mig1 (apartados 2.2.1 y 2.2.4 de Resultados).

Con anterioridad hacíamos alusión a la importancia de una regulación precisa, fruto de la integración de multitud de señales del medio externo, para el mantenimiento de un sistema homeostático. Como indicábamos, para que la célula mantenga todos los parámetros dentro del rango deseado es necesario el establecimiento constante de ajustes a nivel metabólico, obtenidos en parte, a través de variaciones a nivel transcripcional, bien modificando la tasa de transcripción, bien la estabilidad del mRNA.

En cuanto a la regulación por glucosa, Mig1 y, en menor medida, Mig2, juegan un papel fundamental en la modulación de la expresión génica. A su vez, ambas proteínas están sometidas a una compleja regulación por parte del monosacárido. Se ha descrito

que tanto Mig1 como Mig2 median la autorregulación de la vía de represión por glucosa, ya que la expresión del gen *MIG1* se encuentra reprimida, en presencia de glucosa, tanto por Mig2 como por la propia Mig1 manteniendo, de este modo, unos niveles adecuados del represor y evitando la sobreexpresión del mismo (²²⁴). Del mismo modo, a lo largo de este trabajo, hemos visto como la expresión del gen *MIG2* se encuentra regulada por Mig1 a través del mismo complejo represor encargado de adecuar la expresión de *SUC2* a los niveles de glucosa presentes en el medio (apartados 1.4, 1.6 y 1.7 de Resultados).

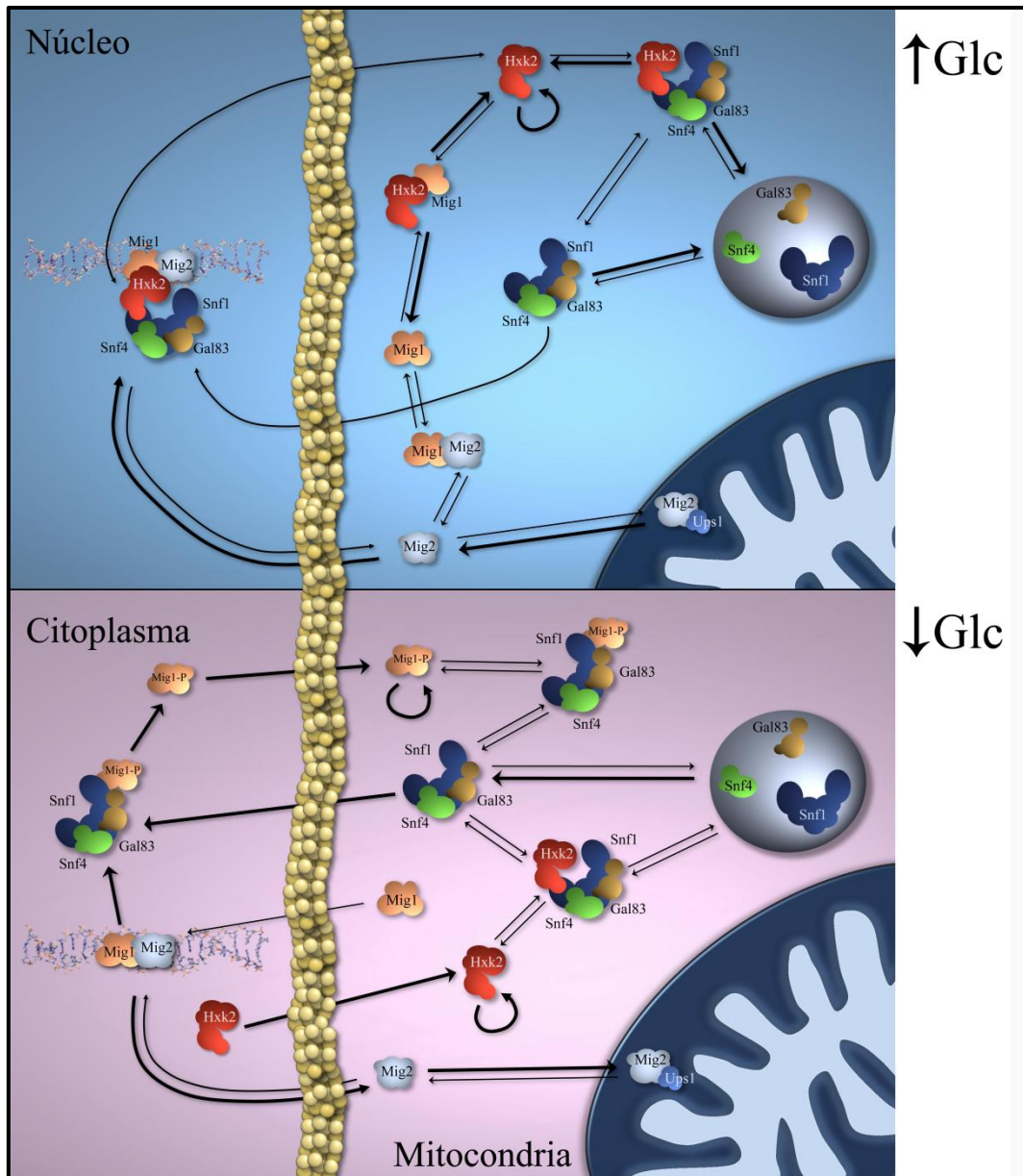


Figura D-1: Regulación del gen *SUC2*. En la figura se representa el sistema de regulación tanto en alta glucosa (parte superior de la imagen, fondo azul) como en baja glucosa (parte inferior de la imagen, fondo rosa). El compartimento nuclear se encuentra a la izquierda de la membrana (representada mediante esferas amarillas), mientras que el citoplasma se localiza en la parte derecha. En la parte inferior derecha se representa la red mitocondrial. Los movimientos posibles para cada proteína en un momento determinado se indican mediante flechas; dos flechas orientadas en sentidos opuestos representan un equilibrio en su desplazamiento, en caso de que éste se encuentre desplazado, las flechas presentan diferentes grosores; una flecha circular indica el nicho subcelular mayoritario en esa situación metabólica.

El desarrollo por parte de los eucariotas de una membrana nuclear capaz de contener la mayor parte del material genético en su interior, da lugar a una separación física entre procesos tales como la replicación o la transcripción de procesos metabólicos o la síntesis de proteínas, entre otros. Esta separación, además, contribuye a la generación de un gradiente de aquellos elementos implicados directamente en la regulación de la expresión génica. Para regular el paso de estas moléculas entre ambos compartimentos, la célula desarrolló unas estructuras complejas, denominadas poros nucleares, que permiten la comunicación entre el núcleo y el citosol.

Como ya se mencionó, el paso a través del complejo del poro nuclear suele ser, para moléculas mayores de 40 kDa, un transporte activo que requiere tanto la presencia de transportadores pertenecientes a la familia de las Carioferinas como un gradiente de la proteína Ran-GTP (Gsp1 en levaduras) entre el núcleo y el citosol (^{62,228}).

En este trabajo, se demuestra la presencia de una fracción de Mig2 en el interior del núcleo (apartado 1.9 de Resultados). Dada la importancia de esta proteína en la regulación de la represión por glucosa, nos planteamos el estudio de los mecanismos de importación y exportación de la misma al núcleo celular.

En primer lugar, ya que el papel de esta proteína en el núcleo está ligado al represor transcripcional Mig1, no era ilógico pensar que ambas compartieran el mismo sistema de exportación (por el momento no se conoce el sistema de importación de Mig1); esta hipótesis la tuvimos que descartar en vista de que el mutante $\Delta msn5$ no muestra una acumulación nuclear de Mig2, fenotipo esperado si Msn5 actuara como exportina de la proteína. Debido a que Msn5 es la única Carioferina capaz de mediar tanto en la importación como en la exportación, aprovechamos para comprobar si estaba relacionada con la importación de Mig2, teoría que rechazamos al no verificar ninguna alteración en la acumulación nuclear de esta proteína en el mutante $\Delta msn5$ (apartado 3.1.1 de Resultados).

Tras descartar nuestra primera opción, mediante el análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de Mig2 pudimos identificar la presencia de dos posibles NLSs necesarias para el reconocimiento e importación de la proteína a través del sistema Kap60/Kap95 (⁸⁹). Los estudios de localización de Mig2 mediante microscopía de fluorescencia, permitieron demostrar que Kap95 es imprescindible para la entrada de Mig2 al interior del núcleo (apartado 3.1.2 de Resultados), mientras que la presencia del adaptador Kap60 no parece indispensable. El hecho de no apreciar acumulación nuclear de Mig2 en el mutante $kap95^{TS}$ tras 15 minutos a temperatura restrictiva, es un indicativo de que la importina- β es la encargada, en última instancia, del transporte mayoritario de Mig2, aunque no podemos excluir la participación minoritaria de otras vías como moduladoras de la vía principal de importación.

Mediante ensayos tanto de coimmunoprecipitación como de GST *pull-down* confirmamos la interacción de Mig2 con Kap60 y Kap95, en presencia y ausencia de glucosa (apartado 3.1.3 de Resultados). Si bien esperábamos diferencias más acusadas en la intensidad de esta interacción en función de la fuente de carbono presente, no se

puede descartar la existencia de una regulación posterior que explique el gradiente núcleo-citoplasmático de Mig2 observado por microscopía. Ésta podría llevarse a cabo mediante regulación de la entrada del trímero importina- α • β •Mig2 (a través de la interacción del complejo con las Nups), o bien, mediante un aumento en la tasa de exportación de Mig2 en ausencia de glucosa. La interacción de Mig2 con los componentes de la ruta de importación respalda los resultados obtenidos mediante los ensayos de DNA ChIP, en los cuales observamos una fracción de Mig2 unida siempre al promotor del gen *SUC2*, aún en ausencia de glucosa (apartado 2.2.3 de Resultados), así como los datos de actividad invertasa que muestran cierta represión del gen *SUC2* en baja glucosa (apartado 2.2.1 de Resultados).

El estudio con proteínas purificadas nos permitió comprobar la existencia de una interacción directa entre Kap60 y Mig2, mientras que Kap95 parece unirse de forma indirecta al represor transcripcional (apartado 3.1.3 de Resultados). Mediante el estudio de estas interacciones en mutantes verificamos el mantenimiento de cierta interacción entre Kap95 y Mig2 en ausencia de Kap60. Estos resultados podrían explicarse a través de una interacción directa de Mig2 con Kap95, por la presencia de otra proteína adaptadora capaz de mediar la interacción entre ambas proteínas cuando la importina- α no está presente, o bien porque Mig2 sea arrastrada, en su entrada al núcleo, por otra proteína con la que interaccione.

Como indicamos con anterioridad, se identificaron dos regiones que podrían actuar como NLSs. La primera está localizada dentro de uno de los motivos de dedos de zinc de Mig2 (NLS intercalada, ³²KKRHLR³⁷), encontrándose la segunda entre los residuos 75 y 79. Los estudios llevados a cabo para determinar la funcionalidad de estas secuencias permitieron confirmar la importancia de las mismas, asignando el papel principal a la NLS intercalada (NLS1), si bien no descartamos una participación de la NLS2. La importancia de la NLS1 quedó patente al observar la falta de acumulación de Mig2 en el núcleo al mutar esta secuencia. Así mismo, observamos una desrepresión del gen *SUC2*, equivalente a la presentada por el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$, en la cepa $\Delta mig1/Mig2_{NLS1}$ -GFP, indicando que Mig2 no se localiza en el núcleo y, por tanto, no puede llevar a cabo su papel como represor (apartado 3.1.4 de Resultados). Sin embargo, la mutación de la secuencia correspondiente a la NLS2 de Mig2 no impide la localización nuclear de la proteína, aunque disminuye la presencia de la misma en este compartimento. Además, la cepa mutante $\Delta mig1/Mig2_{NLS2}$ -GFP muestra unos niveles de actividad invertasa intermedios entre los presentados por la cepa $\Delta mig1$ y el doble mutante $\Delta mig1/\Delta mig2$, indicando que Mig2 está parcial, pero no totalmente, excluida del núcleo (apartado 3.1.4 de Resultados). Pese a comprobar teóricamente que las mutaciones introducidas en la NLS1 no afectan a aminoácidos clave en la interacción con el DNA, sería necesario confirmar que la proteína Mig2_{NLS1} conserva la capacidad de unirse al promotor del gen *SUC2*.

El mecanismo general de importación mediado por el dímero Kap60/Kap95 comienza con el reconocimiento por parte de Kap60 de la NLS presente en la proteína a transportar. A continuación, Kap95 interacciona con el dominio IBB de Kap60

permitiendo el reconocimiento del trímero importina- $\alpha\beta$ •*cargo* por las FG-Nups y su posterior translocación al interior del núcleo. A simple vista, parece que Mig2 se ajusta a este modelo, ya que, como mencionamos, interacciona de manera directa con Kap60 pero no con Kap95. Basándonos en este modelo y en los resultados obtenidos mediante la generación de mutaciones puntuales de las NLSs, esperaríamos que la proteína Mig2_{NLS1} perdiera la capacidad de interaccionar con Kap60. Sorprendentemente, observamos que esta proteína continúa siendo capaz de interaccionar de manera directa con Kap60 (apartado 3.1.5 de Resultados). Por el contrario, la mutación de la NLS1 provoca una caída bastante acusada de la interacción entre Mig2 y Kap95 en glucosa, y una desaparición de la misma en ausencia del monosacárido (apartado 3.1.5 de Resultados). Estas observaciones parecen indicar que el reconocimiento de la NLS1 se realiza a través de la importina- β , siendo posible que Kap60 reconozca a Mig2 a través de otro motivo diferente. Así mismo, parece necesaria una interacción previa entre Mig2 y Kap60 para que el regulador transcripcional pueda ser reconocido por Kap95.

El hecho de que se produzca una leve interacción entre Kap95 y Mig2_{NLS1} (apartado 3.1.5 de Resultados), y que ésta desaparezca al eliminar Mig1 (apartado 3.1.6 de Resultados), plantea la posibilidad de que Mig2 utilice, además de la vía presentada, una segunda ruta paralela dependiente de Mig1. En esta segunda vía, Mig1 mediante su propia ruta de importación, posiblemente mediada por Kap95 (apartado 3.1.7 de Resultados), arrastraría una pequeña fracción de Mig2 al interior del núcleo, (recordemos que ambas proteínas interaccionan de manera constitutiva, apartado 2.2.5 de Resultados). Otra opción sería que Mig1 y Mig2 entraran al núcleo conjuntamente, de tal manera que sería necesaria la interacción de ambos represores con Kap60 para hacer posible su reconocimiento por parte de Kap95. La existencia de esta segunda vía podría explicar por qué no se aprecia acumulación nuclear de Mig2 en una cepa mutante $\Delta mig1$. La entrada de Mig2 a través de la primera vía no sería suficiente para permitir su detección en este compartimento mediante microscopía de fluorescencia (apartado 1.10 de Resultados).

En cuanto al mecanismo de exportación de Mig2, la presencia de tres posibles secuencias NESs planteó la posibilidad de que Xpo1 fuera la exportina responsable de la salida de Mig2 del núcleo. El hecho de que Xpo1 y Mig2 sean capaces de interaccionar tanto *in vivo* como *in vitro* parecía apoyar esta teoría (apartado 3.2.1 de Resultados). Lamentablemente, la mutación de las posibles secuencias de exportación demostró que, por separado, ninguna de ellas era imprescindible para esta interacción o para la salida de la proteína al citosol (apartado 3.2.2 de Resultados). Estudios de localización de la proteína Mig2 en un mutante termosensible para Xpo1 demostraron que el represor transcripcional es capaz de salir del núcleo en ausencia de una proteína Xpo1 funcional (apartado 3.2.3 de Resultados). Por tanto, aunque Mig2 y Xpo1 interaccionan, esta vía de exportación no parece ser el mecanismo principal de salida de Mig2.

Según lo expuesto, el mecanismo de importación y exportación de Mig2 podría explicarse de la siguiente manera (Fig. D-2, Pág. 163).

En alta glucosa la importina Kap60 sería capaz de reconocer a la proteína Mig2 e interactuar con ella, posiblemente a través de la NLS2, lo que provocaría un cambio conformacional en el represor que permitiría el reconocimiento por parte de Kap95 de la NLS1. El trímero Kap60•Mig2•Kap95 sería reconocido por las FG-Nups permitiendo su translocación al interior del núcleo y, por tanto, la función represora de Mig2. Una vez en el núcleo, debido a la alta concentración de Gsp1GTP, se produciría la interacción entre Kap95 y Gsp1GTP provocando la liberación del dímero Kap60•Mig2. A continuación, este dímero se uniría a Nup2 y a Cse1•Gsp1GTP causando la liberación de Mig2 en el núcleo. Así mismo, una pequeña parte de la proteína sería arrastrada al interior de este compartimento gracias a su interacción con Mig1, aunque tampoco se puede excluir que ambas proteínas entren al núcleo de forma conjunta. De esta manera, gracias a las dos vías de importación, Mig2 se encontraría localizada en el núcleo de forma mayoritaria en presencia de glucosa. En estas condiciones, una pequeña fracción de Mig2 saldría del núcleo mediante una ruta de exportación no identificada, aunque no podemos descartar una participación de la vía mediada por Xpo1.

Tras el pase a baja glucosa, una fracción de Mig2 continúa entrando al núcleo a través de las vías descritas, permitiendo que siempre exista una pequeña cantidad de Mig2 en este orgánulo capaz de mantener cierta represión de los genes que regula, por ejemplo *SUC2*. Sin embargo, la mayor parte de Mig2 estaría siendo expulsada del núcleo a través de una vía sin identificar, con cierta colaboración de la exportina Xpo1; dicha vía se estimularía fuertemente en condiciones de baja glucosa. En el caso de la exportación, en el interior del núcleo, se formaría un complejo ternario entre Mig2, la exportina responsable y Gsp1GTP que sería reconocido por las proteínas del complejo del poro provocando su translocación al citosol. Una vez en el citoplasma, la hidrólisis de Gsp1GTP provocaría la disociación del complejo y la liberación de Mig2. En estas condiciones, Mig2 se encontraría de forma mayoritaria en el citosol posibilitando su interacción con Ups1 y, por tanto, su asociación con la red mitocondrial.

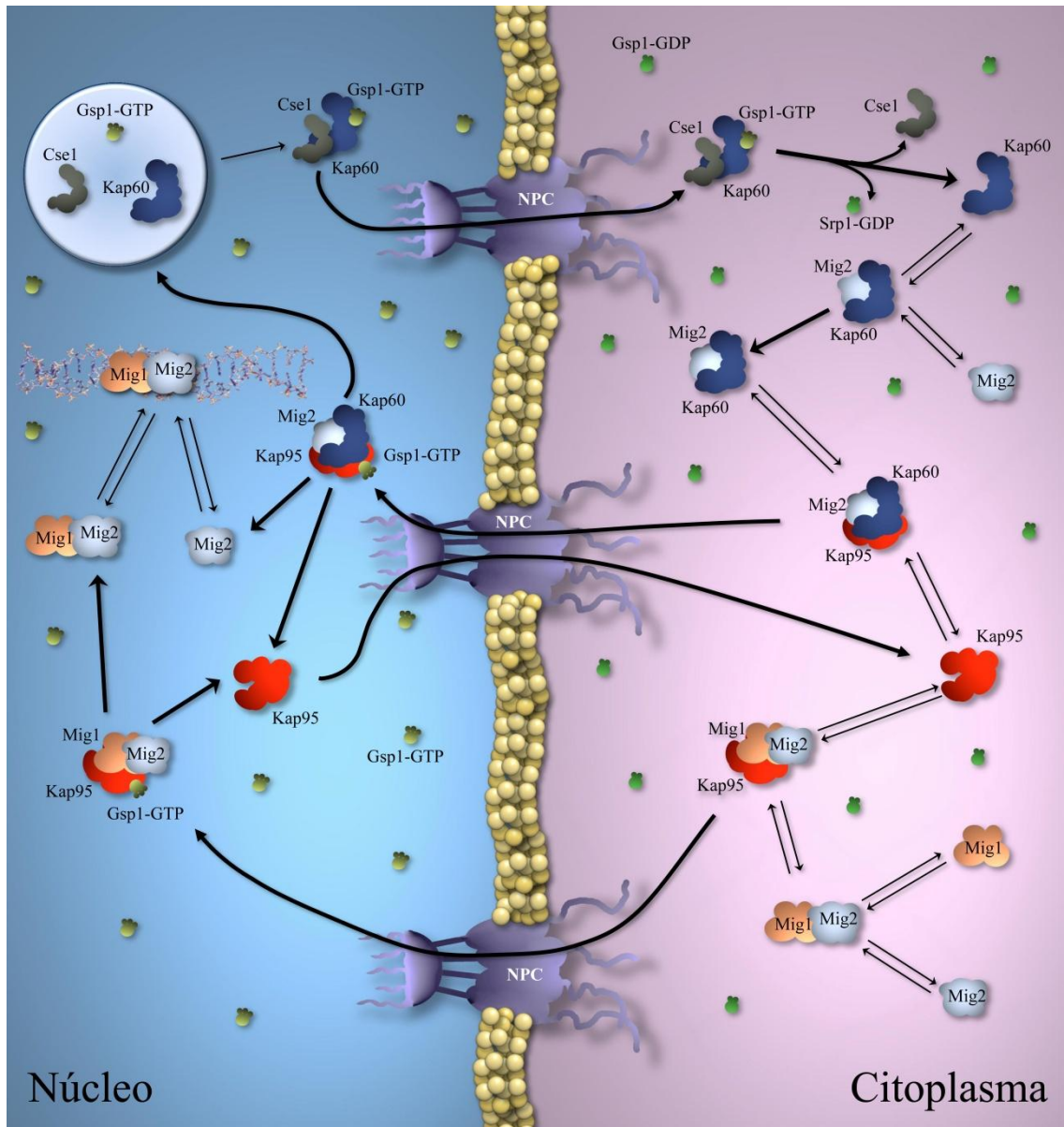


Figura D-2: Sistema de importación de Mig2. En la figura se representa el mecanismo de importación de Mig2, tanto en alta como en baja glucosa. El compartimento nuclear se encuentra en la parte izquierda de la imagen (fondo azul), mientras que el citoplasma se localiza en la parte derecha (fondo rosa), ambos compartimentos están separados mediante la membrana nuclear (representada por esferas amarillas). Atravesando dicha membrana se encuentran los complejos del poro nuclear (NPC). Los movimientos posibles para cada proteína en un momento determinado se indican mediante flechas; dos flechas orientadas en sentidos opuestos representan un equilibrio en su desplazamiento.

En condiciones de estrés nutricional, la fracción citosólica de Mig2 interacciona con la proteína mitocondrial Ups1 (apartado 4.2 de Resultados), posibilitando que Mig2 se encuentre asociada, de forma mayoritaria, a la red mitocondrial (apartado 1.9 de Resultados). Esta fracción mitocondrial de la proteína Mig2 podría participar, a través de Ups1, en el intercambio de información entre el núcleo y la red mitocondrial para adecuar el metabolismo de carbohidratos a los requerimientos energéticos de la célula en cada momento. En este sentido, se ha descrito que proteínas de la ruta de fusión

mitocondrial de eucariotas superiores, como Mitofusina 2 (Mfn2), son capaces de desempeñar tal papel. Ratones *knockdown* y *knockout* para esta proteína presentan una reducción de los niveles de actividad del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones, provocando un incremento de la captación de glucosa del medio y de la tasa de glucólisis, así como un descenso en la síntesis de glucógeno, con el fin de mantener el metabolismo energético de la célula (^{229,230}). En nuestro caso, Mig2 podría señalar a la mitocondria para incrementar la respiración celular en respuesta a unos bajos niveles de glucosa en el medio extracelular, coordinando simultáneamente la expresión de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos.

La mitocondria está formada por dos compartimentos independientes: la matriz y el espacio intermembrana (EIM). Tras su síntesis en los ribosomas, las proteínas son dirigidas mediante diversas etiquetas a través de las translocasas de la membrana externa (TOM) o interna (TIM) al interior del orgánulo (²³¹). Las proteínas del EIM suelen presentar señales ricas en cisteína o una presecuencia bipartita aunque, a menudo, carecen de tales secuencias (o bien aún no han sido identificadas). Los mecanismos que median la asociación de estas proteínas a la mitocondria son complejos y, por el momento, poco conocidos.

Las proteínas críticas para la homeostasis lipídica, Ups1 y Ups2, se localizan en el EIM aunque carecen de secuencias conocidas que posibiliten tal localización. Recientemente, se ha descrito que ambas proteínas utilizan un novedoso sistema que permite su asociación con este orgánulo (^{153,232}). En esta vía, Ups1 y Ups2 interactúan con las subunidades Tom20 y Tom22 del sistema de importación de la membrana externa, siendo translocadas al EIM, una vez en este compartimento, Mdm35 actuaría como un aceptor intramitocondrial que estabilizaría ambas proteínas.

En el caso de Mig2, al igual que ocurre con las proteínas Ups, el análisis de la estructura primaria no ha permitido identificar motivo alguno que explique su localización mitocondrial. A pesar de haber demostrado que la interacción entre Ups1 y Mig2 es necesaria para la asociación de esta última a la red mitocondrial en ausencia de glucosa, no hemos identificado el compartimento mitocondrial en el cual Mig2 está presente. Si bien nuestros datos sugieren, dada la localización mitocondrial de Ups1, que probablemente Mig2 se localiza en el espacio intermembrana. En este sentido, nos proponemos llevar a cabo experimentos de subfraccionamiento mitocondrial para confirmar, de forma definitiva, la localización de Mig2 en este orgánulo.

En cuanto al papel desempeñado por Mig2 en la red mitocondrial, el fenotipo mostrado por el mutante $\Delta mig2$ en ausencia de glucosa (apartado 4.4 de Resultados) parece indicar su participación en el mantenimiento de la morfología de estos orgánulos. El hecho de que el doble mutante $\Delta dnm1/\Delta mig2$ no presente una red mitocondrial agregada y compleja con múltiples conexiones (apartado 4.4 de Resultados) podría indicarnos un posible papel para Mig2 en la regulación, a través de Ups1, de la fusión mitocondrial.

Un efecto curioso de la disrupción de *MIG2* en el mutante $\Delta dnm1$ es la formación de un único túbulo mitocondrial, localizado en la periferia de la célula. El hecho de que aparezca un único túbulo parece indicar que, al menos, las membranas mitocondriales externas son capaces de fusionarse, mostrando que la maquinaria de fusión (o parte de la misma) está operativa. La morfología y disposición de las mitocondrias en este mutante hace pensar que los episodios de fusión sólo son posibles en los polos de las mitocondrias. Sería interesante comprobar si, en ausencia de Mig2, existe una modificación en el patrón de distribución de los principales componentes de la vía de fusión como Fzo1, Ugo1 y Mgm1, dentro de la mitocondria.

Dado que no hemos sido capaces de encontrar evidencias que muestren una regulación de los niveles intracelulares de Ups1 por parte de Mig2 (apartado 4.4 de Resultados), el efecto de esta proteína sobre la morfología mitocondrial podría tener lugar a través de su interacción con Ups1, regulando su función.

Una de las funciones asignadas a Ups1 es el mantenimiento de los niveles de cardiolipina (¹⁵²). La cardiolipina es un lípido presente de manera exclusiva en la membrana mitocondrial interna, llegando a constituir un 20% de su composición lipídica. Su función es esencial para mantener la estabilidad de los complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones (²³³), así como la del complejo Tam41-Mmp37 (²³⁴) necesario para la asociación TIM23-PAM y, por tanto, indispensable para la importación de multitud de proteínas mitocondriales, así como para el procesamiento de Mgm1. Modificaciones en el contenido o estructura de este lípido han sido descritas en varias enfermedades como Parkinson (²³⁵) o el Síndrome de Barth (²³⁶). Una posibilidad sería que Mig2 colaborase, de alguna manera, con Ups1 en el mantenimiento de los niveles de cardiolipina de la célula. Sería interesante comprobar si la ausencia de Mig2 altera, en alguna medida, la composición lipídica de la membrana mitocondrial.

Ups1 también está asociada al correcto procesamiento de la proteína de fusión Mgm1 en glucosa, de tal manera que la ausencia de Ups1 provoca un desequilibrio en el procesamiento de la misma, desplazando éste hacia la forma l-Mgm1 (¹⁵¹). Ambas formas, l-Mgm1 y s-Mgm1, son necesarias para la actividad GTPasa de la proteína (²³⁷). Mgm1 parece ser clave en la fusión entre membranas mitocondriales internas y en la estabilidad de las crestas mitocondriales. Quizás la función de Mig2 podría estar asociada a la regulación del procesamiento de Mgm1 en ausencia de glucosa. Una posibilidad a tener en cuenta es que el efecto de Ups1 sobre Mgm1 no sea más que una consecuencia indirecta del cambio en la composición lipídica (a través de los niveles de cardiolipina) de la membrana interna, provocando la inestabilidad de la proteasa Pcp1 e impidiendo el procesamiento de la misma.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los niveles de expresión del gen *MIG2* no muestran diferencias significativas cuando la levadura crece en glucosa o en glicerol.
2. Los 267 primeros nucleótidos de la secuencia codificante del gen *MIG2* contienen elementos reguladores en *cis* indispensables para la transcripción del gen. Dentro de esta región, el fragmento comprendido entre las bases 16 y 131 contiene uno o varios elementos represores sensibles a glucosa.
3. Mig1 regula la expresión de *MIG2*, tanto en alta como en baja glucosa, a través de su unión a dos sitios de la ORF de Mig2.
4. Además de Mig1, las proteínas del heterotrímero Snf1 y Hxk2 forman parte del complejo represor de *MIG2*.
5. La localización subcelular de la proteína Mig2 está regulada por estrés nutricional y oxidativo. Mig2 se acumula en el núcleo en condiciones de alta glucosa, pasando a asociarse a la red mitocondrial en baja glucosa o en presencia de agentes oxidantes.
6. La ausencia de las proteínas Mig1 y Hxk2 dificulta la acumulación de Mig2 en el núcleo en alta glucosa, por el contrario, la ausencia de Snf1 parece no tener efecto sobre la localización de Mig2.
7. Mig2 forma parte del complejo represor del gen *SUC2*, tanto en alta como en baja glucosa, con independencia de la presencia o ausencia de las proteínas Mig1, Hxk2 y Snf1.
8. Mig2 regula la expresión del gen *SUC2* a través de su unión directa a los sitios SUC2A y SUC2B del promotor de dicho gen con independencia de la fuente de carbono presente.
9. Mig2 utiliza el sistema de importación Kap60/Kap95 como vía de entrada al núcleo celular, aunque sólo la presencia de Kap95 es esencial para la misma.
10. La región comprendida entre la Lys₃₂ y la Arg₃₇ corresponde a una NLS funcional indispensable para la localización nuclear de Mig2. Dicha secuencia es necesaria para la interacción de Mig2 con la importina Kap95.
11. La carioferina Msn5 no está implicada en el transporte núcleo-citosólico de Mig2.

12. Aunque Mig2 interacciona con Xpo1 tanto *in vitro* como *in vivo*, ésta no parece ser la ruta de exportación principal implicada en la salida de Mig2 del núcleo.
13. Se han identificado tres posibles NESs en Mig2, aunque la mutación individual de estas secuencias no parece comprometer la salida de Mig2 del núcleo.
14. Mig2 interacciona físicamente con la proteína mitocondrial Ups1 de manera dependiente de glucosa.
15. Ensayos de microscopía de fluorescencia y de fraccionamiento subcelular han demostrado que la presencia de Ups1 es necesaria para que Mig2 se asocie a la red mitocondrial en condiciones de estrés nutricional.
16. Mig2 está implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, posiblemente a través de su participación en la ruta de fusión.
17. La ausencia de Mig2 es capaz de revertir parcialmente los problemas de crecimiento mostrados en un mutante $\Delta ups1$.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Wang, Y., Pierce, M., Schneper, C., Guldal, G., Zhang, X., Tavazoide, S. and Broach, J. R. **Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast.** *PLoS Biol.* **2**, 610-622 (2004).
2. Gancedo, J.M. **Yeast carbon catabolite repression.** *Micro. Mol. Biol. Reviews* **62**, 334-361 (1998).
3. Penheiter, K.L., Washburn, T.M., Porter, S.E., Hoffman, M.G. and Jaehning, J.A. **A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets.** *Mol. Cell.* **20**, 213-223 (2005).
4. Wang, G. and Deschenes, R. J. **Plasma membrane localization of Ras requires class C Vps proteins and functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.* **26**, 3243- 3255 (2006).
5. Özcan, S., Dover, J. and Johnston, M. **Glucose sensing and signalling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *EMBO J.* **17**, 2566–2573 (1998).
6. Özcan, S. and Johnston, M. **Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose.** *Mol. Cell Biol.* **16**, 5536-5545 (1996).
7. La Rue, J., Tokarz, S. and Lanker, S. **^{SCF}Grr1-mediated ubiquitination of Gis4 modulates glucose response in yeast.** *J. Mol. Biol.* **349**, 685-698 (2005).
8. Kim, J. H., Brachet, V., Moriya, H. and Johnston, M. **Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryot.* **5**, 167-173 (2006).
9. Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K. and Özcan, S. **Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator.** *J. Biol. Chem.* **278**, 10322-10327 (2003).
10. Palomino, A., Herrero, P. and Moreno, F. **Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the *HXX2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem J.* **388**, 697-703 (2005).
11. Palomino, A., Herrero, P. and Moreno F. **Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* *HXX2* promoter.** *Nucleic. Acids. Res.* **34**, 1427-1438 (2006).
12. Santangelo, G.M. **Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 253-282 (2006).
13. Xue, Y., Batlle, M. and Hirsch, J.P. **GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p alpha subunit and functions in a Ras-independent pathway.** *EMBO J.* **17**, 1996-2007 (1998).
14. Rolland, F., Wanke, V., Cauwenberg, L., Ma, P., Boles, E., Vanoni, M., de Winde, J.H., Thevelein, J.M. and Winderickx, J. **The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS yeast Res.* **1**, 33-45 (2001).
15. Herrero, P., Galíndez, J., Ruiz, N., Martínez-Campa, C. and Moreno, F. **Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXX1*, *HXX2* and *GLK1* genes.** *Yeast* **11**, 137-144 (1995).
16. Ma, H. and Botstein, D. **Effects of null mutations in the hexokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae* on catabolite repression.** *Mol. Cell Biol.* **6**, 4046-4052 (1986).

17. Ma, H., Bloom, L.M., Walsh, C.T. and Botstein, D. **The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5643-5649 (1989).
18. Rande-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J.A. and Moreno, F. **Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Lett.* **425**, 475-478 (1998).
19. Behlke, J., Heidrich, K., Naumann, M., Müller, E.C., Otto, A., Reuter, R. and Kriegel, T. **Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of oligomeric structure by *in vivo* phosphorylation at serine-14.** *Biochemistry.* **37**, 11989–11995 (1998).
20. Rose, M., Albtg, W. and Entian, K.D. **Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII.** *Eur. J. Biochem.* **199**, 511-518 (1991).
21. Peláez, R., Herrero, P. and Moreno, F. **Functional domains of yeast hexokinase 2.** *Biochem J.* **432**, 181-190 (2010).
22. Rande-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.D. and Prieto, J.A. **Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast.** *Mol. Cell Biol.* **18**, 2940-2948 (1998).
23. Kriegel, T.M., Rush, J., Vojtek, A.B., Clifton, D. and Fraenkel, D.G. ***In vivo* phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemistry.* **33**, 148-152 (1994).
24. Alms, G.R., Sanz, P., Carlson, M. and Haystead, T.A. **Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of aphosphatase subunit on the yeast proteome.** *EMBO J.* **18**, 4157-4168 (1999).
25. Golbik, R., Naumann, M., Otto, A., Muller, E., Behlke, J., Reuter, R., Hubner, G. and Kriegel, T.M. **Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14.** *Biochemistry.* **40**, 1083-1090 (2001).
26. Peláez, R., Herrero, P. and Moreno, F. **Nuclear export of the yeast hexokinase 2 protein requires the Xpo1 (Crm1)-dependent pathway.** *J. Biol. Chem.* **284**, 20548-20555 (2009).
27. Herrero, P., Martinez-Campa, C. and Moreno, F. **The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the SUC2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Lett.* **434**, 71-76 (1998).
28. Mayordomo, I. and Sanz, P. **Hexokinase PII: structural analysis and glucose signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* **18**, 923-930 (2001).
29. Ahuatzí, D., Herrero, P., de la Cera, T. and Moreno, F. **The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent.** *J. Biol. Chem.* **279**, 14440-14446 (2004).
30. Ahuatzí, D., Riera, A., Peláez, R., Herrero, P. and Moreno, F. **Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution.** *J. Biol. Chem.* **282**, 4485-4493 (2007).
31. DeVit, M.J., Waddle, J.A. and Johnston, M. **Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor.** *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1603–1618 (1997).
32. Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M. and Carling, D. **Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*.** *J. Biol. Chem.* **269**, 19509-19515 (1994).

33. Hardy, T.A., Huang, D. and Roach, P.J. **Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.* **269**, 27907-27913 (1994).
34. Jiang, R. and Carlson, M. **Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex.** *Genes Dev.* **10**, 3105-3115 (1996).
35. Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D. and Carlson, M. **Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8839-8843 (2003).
36. Jiang, R. and Carlson, M. **The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex.** *Mol. Cell Biol.* **17**, 2099-2106 (1997).
37. Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S. and Carlson, M. **Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism.** *Genes Dev.* **15**, 1104-1114 (2001).
38. Tomas-Cobos, L. and Sanz, P. **Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HXT1 glucose transporter gene.** *Biochem J.* **368**, 657- 663 (2002).
39. Lundin, M., Nehlin, J.O. and Ronne, H. **Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein Mig1.** *Mol. Cell Biol.* **14**, 1979-1985 (1994).
40. Klein, C.J., Olsson, L. and Nielsen, J. **Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions.** *Microbiology* **144**, 13-24 (1998).
41. Nehlin, J.O. and Ronne, H. **Yeast Mig1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins.** *EMBO J.* **9**, 2891-2898 (1990).
42. Griggs, D.W. and Johnston, M. **Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8597-8601 (1991).
43. Trumbly, R.J. **Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology* **6**, 15-21 (1992).
44. Wang, J., Sirenko, O. and Needleman, R. **Genomic footprinting of Mig1p in the *MAL62* promoter. Binding is dependent upon carbon source and competitive with the Mal63p activator.** *J. Biol. Chem.* **272**, 4613-4622 (1997).
45. Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M. and Entian, K.D. **Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p.** *Mol. Cell Biol.* **17**, 2502-2510 (1997).
46. Smith, F.C., Davies, S.P., Wilson, W.A., Carling, D. and Hardie, D.G. **The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p *in vitro* at four sites within or near regulatory domain 1.** *FEBS Lett.* **453**, 219-223 (1999).
47. Treitel, M.A. and Carlson, M. **Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3132-3136 (1995).
48. Treitel, M.A., Kuchin, S. and Carlson, M. **Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.* **18**, 6273- 6280 (1998).
49. Grbavec, D., Lo, R., Liu, Y., Greenfield, A. and Stifani, S. **Groucho/transducin-like enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor Ssn6 and mammalian Ssn6-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms.** *Biochem J.* **337**, 13-17 (1999).

50. DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. **Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.** *Science* **278**, 680-686 (1997).
51. Sarokin, L. and Carlson, M. **Short repeated elements in the upstream regulatory region of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2324-33 (1986).
52. Bu, Y. and Schmidt, M.C. **Identification of cis-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription.** *Nucleic. Acids. Res.* **26**, 1002-1009 (1998).
53. Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. **Yeast *SKO1* gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription.** *Nucleic. Acids. Res.* **20**, 5271- 5278 (1992).
54. Vallier, L.G. and Carlson, M. **Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* **137**, 49-54 (1994).
55. Lutfiyya, L.L. and Johnston, M. **Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression.** *Mol. Cell Biol.* **16**, 4790-4797 (1996).
56. Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O. and Johnston, M. **Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* **150**, 1377-1391 (1998).
57. Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U. **The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 391-401 (1999).
58. Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T. **The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism.** *J. Cell Biol.* **148**, 635-651 (2000).
59. Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. and Matunis, M.J. **Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex.** *J. Cell Biol.* **158**, 915-927 (2002).
60. Suntharalingam, M. and Wenthe, S.R. **Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly and function.** *Dev. Cell* **775-789** (2003).
61. Rout, M.P., Aitchison, J.D., Magnasco, M.O. and Chait, B.T. **Virtual gating and nuclear transport: the hole picture.** *Trends Cell Biol.* **13**, 622-628 (2003).
62. Görlich, D. and Kutay, U. **Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.** *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607-660 (1999).
63. Mosammaparast M. and Pemberton L.F. **Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-functions regulators.** *Trend Cell Biol.* **14**, 547-556 (2004).
64. Ribbeck, K. and Görlich, D. **Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes.** *EMBO J.* **20**, 1320-1330 (2001).
65. Weis, K. **Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle.** *Cell* **112**, 441-451 (2003).
66. Ribbeck, K. and Görlich, D. **The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion.** *EMBO J.* **21**, 2664-2671 (2002).
67. Shah, S., Tugendreich, S. and Forbes, D. **Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr.** *J. Cell Biol.* **141**, 31-49 (1998).
68. Ben-Efraim, I. and Gerace, L. **Gradient of increasing affinity of import β for nucleoporins along the pathway of nuclear import.** *J. Cell Biol.* **152**, 411-417 (2001).

69. Pyhtila, B. and Rexach, M. **A gradient of affinity for the karyopherin Kap95 along the yeast nuclear pore complex.** *J. Biol. Chem.* **278**, 42699-42709 (2003).
70. Radu, A., Blobel, G. and Moore, M.S. **Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1769-1773 (1995).
71. Tran, E.J., Bolger, T.A. and Wentz, S.R. **SnapShot: nuclear transport.** *Cell* **131**, 420 (2007).
72. Quan, Y., Ji, Z.L., Wang, X., Tartakoff, A.M. and Tao, T. **Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin β superfamily proteins.** *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1254-1269 (2008).
73. Chook, Y.M. and Süel, K.E. **Nuclear import by karyopherin- β s: recognition and inhibition.** *Biochim. Biophys. Acta* (2010).
74. Chook, Y.M. and Blobel, G. **Structure of the nuclear transport complex karyopherin- β 2-Ran x GppNHp.** *Nature* **399**, 230-237 (1999).
75. Groves, M.R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B.A. and Barford, D. **The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs.** *Cell* **96**, 99-110 (1999).
76. Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. and Wittinghofer, A. **Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution.** *Cell* **97**, 635-646 (1999).
77. Matsuura, Y. and Stewart, M. **Structural basis for the assembly of a nuclear export complex.** *Nature*. **432**, 872-877 (2004).
78. Conti, E., Müller, C.W. and Stewart, M. **Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 237-244 (2006).
79. Muhlhauser, P., Müller, E.C., Otto, A. and Kutay, U. **Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones.** *EMBO Rep.* **2**, 690-696 (2001).
80. Chook, Y.M. and Blobel, G. **Karyopherins and nuclear import.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 703-715 (2001).
81. Conti, E. **Structures of importins.** *Results Probl. Cell Differ.* **35**, 93-113 (2002).
82. Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. and Lührmann, R. **Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure.** *EMBO J.* **17**, 4114-4126 (1998).
83. Conti, E. and Izaurralde, E. **Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 310-319 (2001).
84. Bischoff, F.R. and Ponstingl, H. **Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1.** *Meth. Enzymol.* **257**, 135-144 (1995).
85. Scheffzek, K., Klebe, C., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W. and Wittinghofer, A. **Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form.** *Nature* **374**, 378-381 (1995).
86. Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. **Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts.** *Science* **295**, 2452-2456 (2002).
87. Cook, A., Bono, F., Jinek, M. and Conti, E. **Structural biology of nucleocytoplasmic transport.** *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 647-671 (2007).
88. Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M. and Görlich, D. **NTF2 mediates nuclear import of Ran.** *EMBO J.* **17**, 6587-6598 (1998).
89. Dingwall, C., Sharnick, S.V. and Laskey, R.A. **A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus.** *Cell* **30**, 449-458 (1982).

90. Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z. and Chook, Y.M. **Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2.** *Cell* **126**, 543–558 (2006).
91. Hatayama, M., Tomizawa, T., Sakai-Kato, K., Bouvagnet, P., Kose, S., Imamoto, N., Yokoyama, S., Utsunomiya-Tate, N., Mikoshiba, K., Kigawa, T. and Aruga, J. **Functional and structural basis of the nuclear localization signal in the ZIC3 zinc finger domain.** *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3459-3473 (2008).
92. Riddick, G. and Macara, I.G. **The adapter importin-alpha provides flexible control of nuclear import at the expense of efficiency.** *Mol. Syst. Biol.* **3**, 118 (2007).
93. Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. and Yanagawa, H. **Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha.** *J. Biol. Chem.* **284**, 478–485 (2009).
94. Hodel, M.R., Corbett, A.H. and Hodel, A.E. **Dissection of a nuclear localization signal.** *J. Biol. Chem.* **276**, 1317–1325 (2001).
95. Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. **Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha.** *Cell* **94**, 193-204 (1998).
96. Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. and Hartmann, E. **A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus.** *EMBO J.* **15**, 1810–1817 (1996).
97. Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Muller, C.W. **Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha.** *Nature.* **399**, 221–229 (1999).
98. Chook, Y.M., Jung, A., Rosen, M.K. and Blobel, G. **Uncoupling Kap 2 substrate dissociation and Ran binding.** *Biochemistry.* **41**, 6955-6966 (2002).
99. Hood, J.K. and Silver, P.A. **Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biol. Chem.* **273**, 35142-35146 (1998).
100. Pemberton, L.F. and Paschal, B.M. **Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export.** *Traffic* **6**, 187-198 (2005).
101. Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. and Taylor, S.S. **Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus.** *Cell.* **82**, 463-473 (1995).
102. Henderson, B.R. and Eleftheriou, A. **A comparison of the activity, sequence specificity, and Crm1-dependence of different nuclear export signals.** *Exp. Cell. Res.* **256**, 213-224 (2000).
103. La Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. and Brunak, S. **Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals.** *Protein. Eng. Des. Sel.* **17**, 527-536 (2004).
104. Holaska, J.M., Black, B.E., Love, D.C., Hanover, J.A., Leszyk, J. and Paschal, B.M. **Calreticulin Is a receptor for nuclear export.** *J. Cell Biol.* **152**, 127-140 (2001).
105. Arts, G.J., Fornerod, M. and Mattaj, I.W. **Identification of a nuclear export receptor for tRNA.** *Curr. Biol.* **8**, 305–314 (1998).
106. Yoshida, K. and Blobel, G. **The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins.** *J. Cell Biol.* **152**, 729-740 (2001).
107. Pemberton, L.F., Blobel, G. and Rosenblum, J.S. **Transport routes through the nuclear pore complex.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 392-399 (1998).
108. Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I.W. and Muller, C.W. **Architecture of Crm1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex.** *Mol. Cell.* **16**, 761–775 (2004).

109. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. **Leptomycin B inactivates Crm1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9112–9117 (1999).
110. Mitrousis, G., Olia, A. S., Walker-Kopp, N. and Cingolani, G. **Molecular basis for the recognition of snurportin 1 by importin beta.** *J. Biol. Chem.* **283**, 7877–7884 (2008).
111. Dong, X., Biswas, A., Suel, K.E., Jackson, L.K., Martinez, R., Gu, H. and Chook, Y.M. **Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by Crm1.** *Nature.* **458**, 1136–1141 (2009).
112. Zhu, J. and McKeon, F. **NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin.** *Nature.* **398**, 256–260 (1998).
113. Riviere, Y., Blank, V., Kourilsky, P. and Israel, A. **Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection.** *Nature.* **350**, 625 - 626 (1991).
114. Briggs, L.J., Stein, D., Goltz, J, Corrigan, V.C, Efthymiadis, A., Hubner, S. and Jans, D.A. **The cAMP-dependent protein kinase site (Ser312) enhances dorsal nuclear import through facilitating nuclear localization sequence/importin interaction.** *J. Biol. Chem.* **273**, 22745–2275 (1998).
115. Tagoa, K., Tsukahara, F., Naruse, M., Yoshioka, T and Takano, K. **Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90.** *Molecular and Cellular Endocrinology.* **213**, 131–138 (2004).
116. Jans, D.A., Xiao, C.Y. and Lam, M.H. **Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?** *Bioessays* **22**, 532–544 (2000).
117. Fang, X., Chen, T., Tran, K. and Parker, C.S. **Developmental regulation of the heat shock response by nuclear transport factor karyopherin-alpha3.** *Development.* **128**, 3349–3358 (2001).
118. Scheffler, I.E. **A century of mitochondrial research: achievements and perspectives.** *Mitochondrion* **1**, 3–31 (2000).
119. Attardi, G. and Schatz, G. **Biogenesis of mitochondria.** *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 289–333 (1988).
120. Bereiter-Hahn, J. **Behavior of mitochondria in the living cell.** *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63 (1990).
121. Tzagoloff, A., and Dieckmann, C.L. **PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol. Rev.* **54**, 211–225 (1990).
122. Hermann, G.J., and Shaw, J.M. **Mitochondrial dynamics in yeast.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 265–303 (1998).
123. Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. and Westermann, B. **Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Biol. Cell* **13**, 847–853 (2002).
124. McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A., and Yaffe, M.P. **Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance.** *J. Cell Biol.* **111**, 967–976 (1990).
125. Kato, M. and Wickner, W. **Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion.** *EMBO J.* **20**, 4035–4040 (2001).
126. Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., and Westermann, B. **Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion.** *J. Cell Biol.* **152**, 683–692 (2001).

- 127.Hermann,G.J., Thatcher, J.V., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. and Shaw, J.M. **Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p.** *J. Cell Biol.* **143**, 359–373 (1998).
- 128.Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. and Mihara, K. **Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion.** *J. Biochem.* **134**, 333-344 (2003).
- 129.Sesaki, H., and Jensen, R.E. **UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion.** *J. Cell Biol.* **152**, 1123–1134 (2001).
- 130.Coonrod, E.M., Karren, M.A. and Shaw, J.M. **Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion.** *Traffic* **8**, 500-511 (2007).
- 131.Belenkiy, R., Haefele, A., Eisen, M.B. and Wohlrab, H. **The yeast mitochondrial transport proteins: new sequences and consensus residues, lack of direct relation between consensus residues and transmembrane helices, expression patterns of the transport protein genes, and protein-protein interactions with other proteins.** *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 207–218 (2000).
- 132.Kunji, E.R. **The role and structure of mitochondrial carriers.** *FEBS Lett.* **564**, 239–244 (2004).
- 133.Guan, K., Farh, L., Marshall, T.K. and Deschenes, R.J. **Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamin-like product of the MGMI gene.** *Curr. Genet.* **24**, 141-148 (1993).
- 134.Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. **The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?** *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147 (2004).
- 135.Fekkes, P., Shepard, K.A. and Yaffe, M.P. **Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules.** *J. Cell Biol.* **151**, 333–340 (2000).
- 136.Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinske, T.J., Cassidy-Stone, A. and Nunnari, J. **The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion.** *J. Cell Biol.* **160**, 303-311 (2003).
- 137.Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E. and Jensen, R.E. **Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 276-283 (2003).
- 138.Okamoto, K. and Shaw, J.M. **Mitochondrial dynamics in yeast and multicellular eukaryotes.** *Ann. Rev. Genetics* **39**, 503-536 (2005).
- 139.Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P. and Jensen, R.E. **Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane.** *Mol. Biol. Cell* **14**, 2342-2356 (2003).
- 140.Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. and Wissinger, B. **OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28.** *Nat. Genet.* **26**, 211-215 (2000).
- 141.Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W. and Reichert, A.S. **Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA.** *J. Biol. Chem.* **278**, 27781-27788 (2003).

142. Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A.S. **Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor.** *J. Cell Biol.* **165**, 167-173 (2004).
143. Sesaki, H. and Jensen, R.E. **Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion.** *J. Biol. Chem.* **279**, 28298–28303 (2004).
144. Meeusen, S. and Nunnari, J. **How mitochondrial fuse.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 389-394 (2005).
145. Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M. and Chan, D.C. **Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes.** *Science* **305**, 858-862 (2004).
146. Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H. and Rothman, J.E. **SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion.** *Cell.* **92**, 759-772 (1998).
147. Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J. **The machines that fuse and divide mitochondria.** *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 751-780 (2007).
148. Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A. and Rojo M. **Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes.** *EMBO Rep.* **6**, 853-859 (2005).
149. Craig, K.L. and Tyers, M. **The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction.** *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 299–328 (1999).
150. Fritz, S., Weinbach, N., and Westermann, B. **Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast.** *Mol. Biol. Cell* **14**, 2303-2313 (2003).
151. Sesaki, H., Dunn, C.D., Iijima, M., Shepard, K.A., Yaffe, M.P., Machamer, C.E. and Jensen, R.E. **Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p.** *J. Cell Biol.* **173**, 651–658 (2006).
152. Tamura, Y., Endo, T., Iijima, M. and Sesaki, H. **Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria.** *J. Cell Biol.* **185**, 1029–1045 (2009).
153. Potting, C., Wilmes, C., Engmann, T., Osman, C. and Langer, T. **Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35.** *EMBO J.* **29**, 2888 - 2898 (2010).
154. Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy A., Tieu Q., Nunnari, J. and Shaw, J.M. **The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast.** *Nat. Cell Biol.* **1**, 298-304 (1999).
155. Sesaki, H., and Jensen, R.E. **Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape.** *J. Cell Biol.* **147**, 699–706 (1999).
156. Prokisch, H., Neupert, W., and Westermann, B. **Role of MMM1 in maintaining mitochondrial morphology in *Neurospora crassa*.** *Mol. Biol. Cell* **11**, 2961-2971 (2000).
157. Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J., Hermann, G.J., Bleazard, W. and Shaw, J.M. **The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast.** *J. Cell Biol.* **143**, 333-349 (1998).
158. Cerveny K.L. and Jensen, R.E. **The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria.** *Mol. Biol. Cell.* **14**, 4126-4139 (2003).

159. Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W. and Shaw, J.M. **The AH/GED sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission.** *Mol. Biol. Cell* **12**, 2756-2767 (2001).
160. Mozdy, A.D., McCaffery, J.M. and Shaw, J.M. **Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p.** *J. Cell Biol.* **151**, 367-379 (2000).
161. Dohm, J.A., Lee, S.J., Hardwick, J.M., Hill, R.B. and Gittis, A.G. **Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein Fis1 adopts a TPR fold.** *Proteins* **54**, 153-156 (2004).
162. Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. and Nunnari, J. **The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission.** *J. Cell Biol.* **158**, 445-452 (2002).
163. Tieu, Q. and Nunnari, J. **Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division.** *J. Cell Biol.* **151**, 353-365 (2000).
164. Griffin, E.E., Graumann, J. and Chan, D.C. **The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria.** *J. Cell Biol.* **170**, 237-248 (2005).
165. Nunnari, J. and Shaw J.M. **Mitochondrial dynamics and division in budding yeast.** *Trends Cell Biol.* **12**, 178-184 (2002).
166. Osteryoung, K. and Nunnari J. **The division of endosymbiotic organelles.** *Science* **302**, 1698-1704 (2003).
167. Ingerman, E., McCaffrey, J.M, Hinshaw, J. and Nunnari J. **Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria.** *J. Cell Biol.* **170**, 1021-1027 (2005).
168. Legesse-Miller, A., Massol, R.H. and Kirchhausen, T. **Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission.** *Mol. Biol. Cell* **14**, 1953-1963 (2003).
169. Burgess, S.M., Delannoy, M. and Jensen, R.E. **MMMI encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria.** *J. Cell Biol.* **126**, 1375-1391 (1994).
170. Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. and Jensen, R.E. **Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability.** *J. Cell Biol.* **152**, 401-410 (2001).
171. Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. and Pon, L.A. **Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p.** *J. Cell Biol.* **141**, 1371-1381 (1998).
172. Sogo, L.F. and Yaffe, M.P. **Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane.** *J. Cell Biol.* **126**, 1361-1373 (1994).
173. Berger, K.H., Sogo, L.F. and Yaffe, M.P. **Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast.** *J. Cell Biol.* **136**, 545-553 (1997).
174. Fuchs, F., Prokisch, H., Neupert, W. and Westermann, B. **Interaction of mitochondria with microtubules in the filamentous fungus *Neurospora crassa*.** *J. Cell Biol.* **115**, 1931-1937 (2002).

- 175.Kondo-Okamoto, N., Shaw, J.M., and Okamoto, K. **Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes, and contains distinct domains for targeting and foci formation.** *J. Biol. Chem.* **278**, 48997-9005 (2003).
- 176.Meeusen, S. and Nunnari, J. **Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome.** *J. Cell Biol.* **63**, 503-510 (2003).
- 177.Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schröder, J.M. and Vance, J.M. **Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A.** *Nat. Genet.* **36**, 449-451 (2004).
- 178.Kijima, K., Numakura, C., Izumino, H., Umetsu, K., Nezu, A., Shiiki, T., Ogawa, M., Ishizaki, Y., Kitamura, T., Shozawa, Y., Hayasaka, K. **Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A.** *Hum. Genet.* **116**, 23-27 (2005).
- 179.Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelles, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., Hamel, C.P. **Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy.** *Nat. Genet.* **26**, 207-210 (2000).
- 180.Olichon, A., Guillou, E., Delettre, C., Landes, T., Arnauné-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Daloyau, M., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Lenaers, G., Belenguer, P. **Mitochondrial dynamics and disease, *OPA1*.** *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 500-509 (2006).
- 181.Ferré, M., Amati-Bonneau, P., Tourmen, Y., Malthiery, Y., Reynier, P. **eOPA1: an online database for *OPA1* mutations.** *Hum. Mutat.* **25**, 423-428 (2005).
- 182.Puomila, A., Huoponen, K., Ntyjarvi, M., Hamalainen, M., Paananen, R., Sankila, E.M., Savontaus, M.L., Somer, M., Nikoskelainen, E. **Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies.** *Acta Ophthalmol. Scand.* **83**, 337-346 (2005).
- 183.Thiselton, D.L., Alexander, C., Taanman, J.W., Brooks, S., Rosenberg, T., Eiberg, H., Andreasson, S., Van Regemorter, N., Munier, F.L., Moore, A.T., Bhattacharya, S.S., Votruba, M. **A comprehensive survey of mutations in the *OPA1* gene in patients with autosomal dominant optic atrophy.** *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **43**, 1715-1724 (2002).
- 184.Amati-Bonneau, P., Guichet, A., Olichon, A., Chevrollier, A., Viala, F., Miot, S., Ayuso, C., Odent, S., Arrouet, C., Verny, C., Calmels, M.N., Simard, G., Belenguer, P., Wang, J., Puel, J.L., Hamel, C., Malthiery, Y., Bonneau, D., Lenaers, G., Reynier, P. ***OPA1* R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness.** *Ann. Neurol.* **58**, 958-963 (2005).
- 185.Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. **Cell death: critical control points.** *Cell.* **116**, 205-219 (2004).
- 186.Desagher, S. and Martinou, J.C. **Mitochondria as the central control point of apoptosis.** *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377 (2000).
- 187.Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L. and Youle, R.J. **The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis.** *Dev. Cell.* **1**, 515-525 (2001).

- 188.Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R. Youle, R.J. and Rizzuto, R. **Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis.** *Mol. Cell.* **16**, 59–68 (2004).
- 189.James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y. and Martinou, J.C. **hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery.** *J. Biol. Chem.* **278**, 36373–36379 (2003).
- 190.Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. and Rothstein, R. **A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase.** *Cell* **58**, 409-419 (1998).
- 191.Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. **Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.** *Yeast* **14**, 115-132 (1998).
- 192.Iovine, M.K. and Went, S.R. **A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p.** *J. Cell Biol.* **137**, 797-811 (1997).
- 193.Taberner, F.J. and Igual, J.C. **Yeast karyopherin Kap95 is required for cell cycle progression at Start.** *BMC Cell Biology* **11**, 1471-2121 (2010).
- 194.Peiró-Chova, L. and Estruch, F. **The yeast RNA Polymerase II-associated factor Iwr1p is involved in the basal and regulated transcription of specific genes.** *J. Biol. Chem.* **284**, 28958–28967 (2009).
- 195.Mercado, J. J., Vincent, O. and Gancedo, J.M. **Regions in the promoter of the yeast *FBPI* gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene *MIG1*.** *FEBS Lett.* **291**, 97-100 (1991).
- 196.Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K. **Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids.** *Cell* **91**, 35–45 (1997).
- 197.Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. **Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* **14**, 953–996 (1998).
- 198.Krieg, P.A. and Melton, D.A. ***In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase.** *Meth. Enzymol.* **55**, 397-415 (1987).
- 199.Song, W. and Carlson, M. **Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1.** *EMBO J.* **17**, 5757-5765 (1998).
- 200.Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. **Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites.** *Yeast* **2**, 163-167 (1986).
- 201.Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M. and Lusty, C.J. **Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions.** *Gene* **45**, 299-310 (1986).
- 202.De la Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero, F., Chaves, R.S. and Moreno, F. **Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: implication in the glucose signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Mol. Biol.* **319**, 703-714 (2002).
- 203.Hammell, C.M., Gross, S., Zenklusen, D., Heath, C.V., Stutz, F., Moore, C. and Cole, C.N. **Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export.** *Mol. Cell Biol.* **22**, 6441-6457 (2002).
- 204.Ciriacy, M. and Williamson, V.M. **Analysis of mutations affecting Ty-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Gen. Genet.* **182**, 159-163 (1981).

205. Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R. **Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria.** *Meth. Enzymol.* **204**, 63-113 (1991).
206. Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. and Douglas, M.G. **A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast.** *Gene* **25**, 333-341 (1983).
207. Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. **A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.** *Anal. Biochem.* **132**, 6-13 (1983).
208. Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R. **Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 3683-3687 (1979).
209. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. **Molecular cloning, a laboratory manual.** New York (1982).
210. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. **Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273 (1986).
211. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T. J. **Pcr protocols. A guide to Methods and Applications.** San Diego, Ca. (1990).
212. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods.* **25**, 402-408 (2001).
213. Daum, G., Böhni, P.C. and Schatz, G. **Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria.** *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033 (1982).
214. Gascon, S., Neumann, N.P. and Lampen, J.O. **Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast.** *J. Biol. Chem.* **243**, 1573-1577 (1968).
215. Miller, J.H. **Experiments in molecular genetics.** New York.
216. Britton, P., Murfitt, D., Parra, F., Jones-Mortimer, M.C. and Kornberg, H.L. **Phosphotransferase-mediated regulation of carbohydrate utilisation in *Escherichia coli* K12: identification of the products of genes on the specialised transducing phages lambda iex (crr) and lambda gsr (tgs).** *EMBO J.* **1**, 907-911 (1982).
217. Burnette, W.N. **«Western blotting»: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A.** *Anal. Biochem.* **112**, 195-203 (1981).
218. Anderson, D.J. and Blobel, G. **Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations.** *Meth. Enzymol.* **96**, 111-120 (1983).
219. Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V. and Ammerer, G. **Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes.** *Mol. Cell.* **7**, 767-777 (2001).
220. Rodríguez, A., de la Cera, T., Herrero, P. and Moreno, F. **The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem J.* **355**, 625-631 (2001).
221. Hedbacker, K. and Carlson, M. **Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase.** *Eukaryot. Cell* **5**, 1950-1956 (2006).
222. Belinchón, M.M. and Gancedo, J.M. **Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast.** *FEMS Yeast Res.* **7**, 40-47 (2007).

- 223.Sarma, N.J., Haley, T.M., Barbara, K.E., Buford, T.D., Willis, K.A. and Santangelo, G.M. **Glucose-responsive regulators of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* function at the nuclear periphery via a reverse recruitment mechanism.** *Genetics* **175**, 1127-1135 (2007).
- 224.Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J. and Johnston, M. **Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Eukaryot. Cell* **3**, 221–231 (2004).
- 225.Gertz, J., Siggia, E.D. and Cohen, B.A. **Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters.** *Nature Letters*. **457**, 215-219 (2009).
- 226.Moreno, F., Palomino, A., Ahuatzí, D., Riera, A. and Herrero, P. **Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway.** *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 265-268 (2005).
- 227.Elbing, K., McCartney, R.R. and Schmidt, M.C. **Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem J.* **393**, 797–805 (2006).
- 228.Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. **A novel class of RanGTP binding proteins.** *J. Cell Biol.* **138**, 65-80 (1997).
- 229.Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M. and Zorzano A. **Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity.** *J. Biol. Chem.* **278**, 17190-17197 (2003).
- 230.Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M. and Zorzano A. **The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system.** *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1405-1415 (2005).
- 231.Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. and Pfanner, N. **Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms.** *Cell* **138**, 628-644 (2009).
- 232.Tamura, Y., Iijima, M. and Sesaki, H. **Mdm35p imports Ups proteins into the mitochondrial intermembrane space by functional complex formation.** *EMBO J.* **29**, 2875 - 2887 (2010).
- 233.Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. **Cardiolipin is essential for organization of Complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria.** *J. Biol. Chem.* **280**, 29403-29408 (2005).
- 234.Kutik, S., Rissler, M., Guan, X.L., Guiard, B., Shui, G., Gebert, N., Heacock, P.N., Rehling, P., Dowhan, W., Wenk, M.R., Pfanner, N. and Wiedemann, N. **The translocator maintenance protein Tam41is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis.** *J. Cell Biol.* **183**, 1213–1221 (2008).
- 235.Chicco, A.J. and Sparagna, G.C. **Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease.** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C33–C44 (2007).
- 236.Li, G., Chen, S., Thompson, M.N., Greenberg, M.L. **New insights into the regulation of cardiolipin biosynthesis in yeast: implications for Barth syndrome.** *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 432-441 (2007).
- 237.Hoppins, S. and Nunnari, J. **The molecular mechanism of mitochondrial fusion.** *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 20–26 (2009).

ANEXOS

ANEXOS.

A continuación se muestran las tablas con el análisis de los niveles de expresión tanto en la cepa silvestre como en el mutante $\Delta mig2$. Aquellas filas sombreadas corresponden a genes que se comportan de forma diferente, en cuanto a su expresión, en ambas cepas.

Genes sobreexpresados en una cepa silvestre en condiciones de estrés nutricional.						
N	X	LOD	P	P_adj	attrib ID	attrib name
6	23	1,11370077	3,41E-05	0,028	GO:0005984	disaccharide metabolic process
9	39	1,04476838	1,06E-06	0	GO:0004553	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
9	47	0,94295838	5,60E-06	0,001	GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
16	177	0,57058737	3,99E-05	0,029	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process

Genes sobreexpresados en una cepa mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés nutricional.						
N	X	LOD	P	P_adj	attrib ID	attrib name
8	43	1,04638064	3,63E-06	0,001	GO:0009310	amine catabolic process
8	43	1,04638064	3,63E-06	0,001	GO:0044270	nitrogen compound catabolic process
7	40	1,01362438	2,31E-05	0,02	GO:0009063	amino acid catabolic process

Genes subexpresados en una cepa silvestre en condiciones de estrés nutricional						
N	X	LOD	P-valor	P_adj	attrib ID	attrib name
115	469	0,766031075	6,89E-38	0	GO:0030529	ribonucleoprotein complex
75	225	0,911209669	9,28E-34	0	GO:0005840	ribosome
66	181	0,961572259	2,38E-32	0	GO:0044445	cytosolic part
64	194	0,891262124	1,95E-28	0	GO:0003735	structural constituent of ribosome
90	397	0,687429312	2,46E-26	0	GO:0006412	translation
61	195	0,853061567	1,13E-25	0	GO:0033279	ribosomal subunit
113	652	0,555808005	1,18E-22	0	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle
113	652	0,555808005	1,18E-22	0	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle
40	104	0,969410991	9,19E-21	0	GO:0030684	priribosome
32	69	1,101663002	9,25E-20	0	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit
27	51	1,208943436	9,37E-19	0	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit
67	316	0,623250469	8,24E-18	0	GO:0005198	structural molecule activity
28	61	1,089035482	2,84E-17	0	GO:0030686	90S preribosome
102	649	0,487080098	4,77E-17	0	GO:0034660	ncRNA metabolic process
52	211	0,696188987	7,64E-17	0	GO:0006364	rRNA processing
87	512	0,516633014	1,42E-16	0	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
71	368	0,573096527	1,68E-16	0	GO:0005622	intracellular
83	476	0,527370116	1,72E-16	0	GO:0016072	rRNA metabolic process
87	525	0,502369611	7,12E-16	0	GO:0044085	cellular component biogenesis
62	304	0,595996533	1,22E-15	0	GO:0034470	ncRNA processing
84	502	0,504954871	1,42E-15	0	GO:0042254	ribosome biogenesis
29	83	0,892102672	4,78E-14	0	GO:0015935	small ribosomal subunit
20	40	1,150669885	1,44E-13	0	GO:0032040	small-subunit processome
22	51	1,034665767	3,94E-13	0	GO:0000462	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
22	52	1,020103335	6,40E-13	0	GO:0030490	maturation of SSU-rRNA
32	112	0,766239539	1,30E-12	0	GO:0015934	large ribosomal subunit
69	453	0,438759401	7,90E-11	0	GO:0006396	RNA processing
57	338	0,484859554	8,21E-11	0	GO:0003723	RNA binding
120	1012	0,340076929	9,13E-11	0	GO:0016070	RNA metabolic process
38	178	0,600256299	1,61E-10	0	GO:0005730	nucleolus

130	1143	0,323804564	1,95E-10	0	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process
128	1132	0,318498988	4,42E-10	0	GO:0043284	biopolymer biosynthetic process
118	1053	0,304693649	5,52E-09	0	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process
18	53	0,863961663	5,91E-09	0	GO:0042255	ribosome assembly
17	48	0,890897849	7,61E-09	0	GO:0042257	ribosomal subunit assembly
116	1043	0,298592907	1,26E-08	0	GO:0034961	cellular biopolymer biosynthetic process
173	1809	0,249475257	7,60E-08	0	GO:0005737	cytoplasm
152	1541	0,252604652	1,21E-07	0	GO:0009058	biosynthetic process
11	24	1,071002857	1,63E-07	0	GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process
11	25	1,039884278	2,73E-07	0	GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process
10	22	1,063838071	6,71E-07	0	GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
153	1601	0,232419313	9,34E-07	0	GO:0032991	macromolecular complex
10	23	1,030329987	1,12E-06	0	GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process
17	66	0,693077131	1,42E-06	0	GO:0044452	nucleolar part
11	29	0,933743006	1,65E-06	0,001	GO:0019843	rRNA binding
8	15	1,192018512	2,02E-06	0,002	GO:0006414	translational elongation
228	2676	0,211945549	2,97E-06	0,002	GO:0043283	biopolymer metabolic process
259	3139	0,217910917	3,23E-06	0,002	GO:0044238	primary metabolic process
12	37	0,831162849	3,78E-06	0,003	GO:0000478	endonucleolytic cleavages during rRNA processing
12	37	0,831162849	3,78E-06	0,003	GO:0000479	endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
16	64	0,675288045	4,44E-06	0,003	GO:0009260	ribonucleotide biosynthetic process
154	1656	0,214871724	4,93E-06	0,003	GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
230	2720	0,207193718	4,93E-06	0,003	GO:0043170	macromolecule metabolic process
20	95	0,579806916	5,14E-06	0,003	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly
16	66	0,657568544	6,84E-06	0,003	GO:0009259	ribonucleotide metabolic process
7	13	1,198737948	8,47E-06	0,005	GO:0022626	cytosolic ribosome
10	28	0,893070136	9,35E-06	0,006	GO:0000967	rRNA 5'-end processing
10	28	0,893070136	9,35E-06	0,006	GO:0034471	ncRNA 5'-end processing
138	1463	0,213066933	1,03E-05	0,007	GO:0044249	cellular biosynthetic process
10	29	0,870122826	1,34E-05	0,007	GO:0000966	RNA 5'-end processing
20	102	0,540701953	1,59E-05	0,007	GO:0009165	nucleotide biosynthetic process
14	56	0,674677	1,77E-05	0,01	GO:0000469	cleavages during rRNA processing

11	36	0,793783218	1,84E-05	0,01	GO:0000447	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5,8 rRNA and LSU-rRNA from tritricornic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5,8S rRNA, LSU-rRNA).
11	37	0,776992982	2,46E-05	0,021	GO:0000027	ribosomal large subunit assembly
9	25	0,898299816	2,46E-05	0,021	GO:0000480	endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tritricornic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5,8S rRNA, LSU-rRNA).
7	15	1,082063901	2,81E-05	0,023	GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
218	2602	0,187066518	3,08E-05	0,03	GO:0034960	cellular biopolymer metabolic process
6	11	1,208072948	3,58E-05	0,033	GO:0000028	ribosomal small subunit assembly
7	16	1,033674958	4,71E-05	0,042	GO:0009127	purine nucleoside monophosphate biosynthetic process
7	16	1,033674958	4,71E-05	0,042	GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process
9	27	0,848443226	4,99E-05	0,044	GO:0000472	endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5,8S rRNA, LSU-rRNA).

Genes subexpresados en una cepa mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés nutricional						
N	X	LOD	P	P_adj	attrib ID	attrib name
178	466	0,842142831	2,51E-62	0	GO:0030529	ribonucleoprotein complex
102	179	1,118082276	1,32E-54	0	GO:0044445	cytosolic part
194	651	0,680226969	2,36E-48	0	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle
194	651	0,680226969	2,36E-48	0	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle
107	223	0,962700621	1,57E-47	0	GO:0005840	ribosome
95	193	0,97517908	2,76E-43	0	GO:0033279	ribosomal subunit
94	192	0,969733685	1,46E-42	0	GO:0003735	structural constituent of ribosome
53	68	1,498757341	3,99E-39	0	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit
64	105	1,158908747	1,31E-36	0	GO:0030684	preribosome
91	211	0,863581156	1,50E-35	0	GO:0006364	rRNA processing
125	393	0,669839058	6,65E-33	0	GO:0006412	translation
40	51	1,497485608	6,76E-30	0	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit
101	302	0,686734362	2,25E-28	0	GO:0034470	ncRNA processing
102	315	0,665653284	2,37E-27	0	GO:0005198	structural molecule activity
73	178	0,812188289	8,14E-27	0	GO:0005730	nucleolus
41	61	1,257016252	3,52E-26	0	GO:0030686	90S preribosome
107	363	0,607133947	6,96E-25	0	GO:0005622	intracellular

124	469	0,548705059	3,79E-24	0	GO:0016072	rRNA metabolic process
53	111	0,918120437	1,96E-23	0	GO:0015934	large ribosomal subunit
35	53	1,229247499	4,21E-22	0	GO:0030490	maturation of SSU-rRNA
34	52	1,216058538	2,74E-21	0	GO:0000462	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
145	639	0,466307109	3,45E-21	0	GO:0034660	ncRNA metabolic process
42	82	0,970674543	2,98E-20	0	GO:0015935	small ribosomal subunit
113	449	0,510745042	4,83E-20	0	GO:0006396	RNA processing
121	503	0,487635165	1,01E-19	0	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
121	516	0,471878183	9,67E-19	0	GO:0044085	cellular component biogenesis
116	492	0,472232383	3,84E-18	0	GO:0042254	ribosome biogenesis
29	48	1,121232578	6,03E-17	0	GO:0042257	ribosomal subunit assembly
30	53	1,055096365	2,20E-16	0	GO:0042255	ribosome assembly
86	332	0,512511944	4,46E-16	0	GO:0003723	RNA binding
257	1597	0,314752781	8,59E-16	0	GO:0032991	macromolecular complex
25	39	1,1839815	1,19E-15	0	GO:0032040	small-subunit processome
39	94	0,798347152	6,20E-15	0	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly
175	1000	0,321734022	2,63E-13	0	GO:0016070	RNA metabolic process
22	37	1,098278056	6,07E-13	0	GO:0000027	ribosomal large subunit assembly
176	1037	0,30288612	4,06E-12	0	GO:0034961	cellular biopolymer biosynthetic process
177	1047	0,300912175	4,93E-12	0	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process
25	55	0,859635166	4,60E-11	0	GO:0000469	cleavages during rRNA processing
183	1126	0,278838237	7,18E-11	0	GO:0043284	biopolymer biosynthetic process
184	1137	0,27659478	9,14E-11	0	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process
261	1793	0,24469788	1,99E-10	0	GO:0005737	cytoplasm
19	37	0,956743435	7,55E-10	0	GO:0000478	endonucleolytic cleavages during rRNA processing
19	37	0,956743435	7,55E-10	0	GO:0000479	endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
17	32	0,985337282	3,0581E-09	0	GO:0030687	preribosome, large subunit precursor
18	36	0,933122621	3,74E-09	0	GO:0000447	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
16	29	1,019202337	4,34E-09	0	GO:0019843	rRNA binding
141	856	0,267712998	1,1157E-08	0	GO:0003676	nucleic acid binding

214	1452	0,22940504	1,1238E-08	0	GO:0044249	cellular biosynthetic process
222	1530	0,222429527	2,09E-08	0	GO:0009058	biosynthetic process
24	66	0,696342123	2,60E-08	0	GO:0044452	nucleolar part
395	3125	0,210851855	4,45E-08	0	GO:0044238	primary metabolic process
232	1647	0,206295158	1,28E-07	0	GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
334	2589	0,188429819	4,11E-07	0	GO:0034960	cellular biopolymer metabolic process
339	2636	0,188515344	4,1645E-07	0	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process
12	22	1,005029415	4,74E-07	0	GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process
345	2705	0,184320019	7,5779E-07	0	GO:0043170	macromolecule metabolic process
12	23	0,965432675	8,96E-07	0	GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process
340	2663	0,18232648	9,54E-07	0	GO:0043283	biopolymer metabolic process
12	24	0,929132285	1,62E-06	0	GO:0009124	nucleoside monophosphate biosynthetic process
13	28	0,869619672	1,72E-06	0	GO:0000967	rRNA 5'-end processing
13	28	0,869619672	1,72E-06	0	GO:0034471	ncRNA 5'-end processing
12	25	0,895620294	2,82E-06	0,001	GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process
13	29	0,842379137	2,82E-06	0,001	GO:0000966	RNA 5'-end processing
13	30	0,816736725	4,501E-06	0,002	GO:0004004	ATP-dependent RNA helicase activity
13	30	0,816736725	4,501E-06	0,002	GO:0008186	RNA-dependent ATPase activity
9	15	1,09222908	4,78E-06	0,002	GO:0006414	translational elongation
12	27	0,835445839	7,69E-06	0,003	GO:0000472	endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
8	13	1,115818247	1,2925E-05	0,008	GO:0006450	regulation of translational fidelity
5	5	1,966367822	1,3794E-05	0,013	GO:0016281	eukaryotic translation initiation factor 4F complex
14	38	0,701775645	1,851E-05	0,015	GO:0003724	RNA helicase activity
11	25	0,82753685	2,09E-05	0,016	GO:0000480	endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA).
8	14	1,04317947	2,734E-05	0,019	GO:0005736	DNA-directed RNA polymerase I complex
9	18	0,927154394	3,4487E-05	0,027	GO:0030515	snoRNA binding
7	11	1,147955197	3,48E-05	0,028	GO:0000028	ribosomal small subunit assembly
8	15	0,980943435	5,31E-05	0,038	GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis

Genes sobreexpresados en una cepa silvestre en condiciones de estrés oxidativo.						
N	X	LOD	P	P adj	attrib ID	attrib name
3	3	2,336134754	3,1371E-05	0,039	GO:0008106	alcohol dehydrogenase (NADP+) activity
3	3	2,336134754	3,14E-05	0,039	GO:0015343	siderophore-iron transmembrane transporter activity
3	3	2,336134754	3,14E-05	0,039	GO:0042927	siderophore transporter activity
5	6	2,060291578	1,77E-07	0	GO:0015891	siderophore transport
6	11	1,570800212	3,7827E-07	0	GO:0004033	aldo-keto reductase activity
9	27	1,215498028	7,5762E-08	0	GO:0009636	response to toxin
9	30	1,149986578	2,13E-07	0	GO:0016209	antioxidant activity
7	26	1,084705578	1,13E-05	0,011	GO:0046915	transition metal ion transmembrane transporter activity
8	33	1,024653097	6,14E-06	0,003	GO:0015082	di-, tri-valent inorganic cation transmembrane transporter activity
8	39	0,932392504	2,31E-05	0,021	GO:0015674	di-, tri-valent inorganic cation transport
8	39	0,932392504	2,31E-05	0,021	GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity
9	50	0,862741948	2,16E-05	0,021	GO:0000041	transition metal ion transport
13	75	0,84635767	4,7879E-07	0	GO:0016616	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor
13	82	0,799676895	1,3898E-06	0	GO:0016614	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors
34	302	0,663597197	4,00E-11	0	GO:0016491	oxidoreductase activity
31	343	0,545290162	7,05E-08	0	GO:0055114	oxidation reduction

Genes sobreexpresados en una cepa mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés oxidativo.						
N	X	LOD	P	P adj	attrib ID	attrib name
3	3	2,589972502	5,78E-06	0,011	GO:0015343	siderophore-iron transmembrane transporter activity
3	3	2,589972502	5,78E-06	0,011	GO:0042927	siderophore transporter activity
5	6	2,318066979	1,05E-08	0,001	GO:0015891	siderophore transport
3	4	2,11277109	2,2806E-05	0,02	GO:0015688	iron chelate transport
3	4	2,11277109	2,2806E-05	0,02	GO:0015892	siderophore-iron transport
4	10	1,589169753	1,9614E-05	0,014	GO:0005381	iron ion transmembrane transporter activity
5	18	1,362861421	1,2564E-05	0,013	GO:0004601	peroxidase activity
5	18	1,362861421	1,2564E-05	0,013	GO:0016684	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor
6	26	1,258000793	5,23E-06	0,009	GO:0046915	transition metal ion transmembrane transporter activity

6	27	1,237235739	6,6268E-06	0,012	GO:0006826	iron ion transport
6	30	1,180266661	1,27E-05	0,013	GO:0016209	antioxidant activity
6	33	1,129858464	2,27E-05	0,015	GO:0015082	di-, tri-valent inorganic cation transmembrane transporter activity
7	39	1,123672956	4,97E-06	0,009	GO:0015674	di-, tri-valent inorganic cation transport
8	50	1,065387913	2,51E-06	0,007	GO:0000041	transition metal ion transport
6	39	1,043662771	6,13E-05	0,05	GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity
8	75	0,86244895	5,4417E-05	0,034	GO:0030001	metal ion transport
10	113	0,775144493	3,2089E-05	0,023	GO:0007039	vacuolar protein catabolic process
10	115	0,766668945	3,7385E-05	0,026	GO:0044257	cellular protein catabolic process
17	302	0,576159027	2,38E-05	0,021	GO:0016491	oxidoreductase activity

Genes subexpresados en una cepa silvestre en condiciones de estrés oxidativo.						
N	X	LOD	P	P_adj	attrib ID	attrib name
9	43	1,1065278	3,23E-07	0,001	GO:0032040	small-subunit processome
7	36	1,0648116	1,19E-05	0,012	GO:0030687	preribosome, large subunit precursor
8	43	1,0419889	3,89E-06	0,005	GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis
16	112	0,9216798	2,48E-09	0	GO:0030684	preribosome
9	63	0,906327	9,30E-06	0,008	GO:0030686	90S preribosome
9	68	0,8677998	1,761E-05	0,015	GO:0044452	nucleolar part
19	151	0,8657584	6,42E-10	0	GO:0042254	ribosome biogenesis
22	179	0,8633021	3,86E-11	0	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
22	189	0,8357379	1,146E-10	0	GO:0044085	cellular component biogenesis
24	225	0,7981851	9,39E-11	0	GO:0005730	nucleolus
22	223	0,7526437	2,85E-09	0	GO:0006364	rRNA processing
22	233	0,7307714	6,53E-09	0	GO:0016072	rRNA metabolic process
25	317	0,6503742	2,17E-08	0	GO:0034470	ncRNA processing
28	370	0,6391633	6,52E-09	0	GO:0034660	ncRNA metabolic process
30	467	0,5631527	7,58E-08	0	GO:0006396	RNA processing
30	484	0,545105	1,69E-07	0	GO:0030529	ribonucleoprotein complex
35	725	0,4317551	5,33E-06	0,006	GO:0016070	RNA metabolic process
34	723	0,415242	1,36E-05	0,014	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle
34	723	0,415242	1,36E-05	0,014	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle

Genes subexpresados en una cepa mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés oxidativo.						
N	X	LOD	P	P_adj	attrib ID	attrib name
19	43	1,1493658	2,52E-13	0	GO:0032040	small-subunit processome
19	44	1,1319079	4,216E-13	0	GO:0042257	ribosomal subunit assembly
21	51	1,0991126	7,448E-14	0	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit
23	57	1,0868874	7,824E-15	0	GO:0042255	ribosome assembly

11	27	1,0806623	8,854E-08	0	GO:0000480	endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
43	112	1,0783965	7,00E-26	0	GO:0030684	preribosome
25	63	1,0774034	8,07E-16	0	GO:0030686	90S preribosome
14	35	1,070317	1,933E-09	0	GO:0000027	ribosomal large subunit assembly
27	69	1,0699739	8,18E-17	0	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit
11	29	1,0308072	2,121E-07	0,001	GO:0000472	endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
11	30	1,0078606	3,182E-07	0,002	GO:0000967	rRNA 5'-end processing
11	30	1,0078606	3,182E-07	0,002	GO:0034471	ncRNA 5'-end processing
13	36	0,9990284	3,22E-08	0	GO:0030687	preribosome, large subunit precursor
11	31	0,9860576	4,69E-07	0,002	GO:0000966	rRNA 5'-end processing
15	43	0,97775	4,74E-09	0	GO:0042273	ribosomal large subunit biogenesis
49	151	0,9727903	1,50E-25	0	GO:0042254	ribosome biogenesis
20	59	0,9638827	2,153E-11	0	GO:0030490	maturation of SSU-rRNA
18	53	0,9630358	2,162E-10	0	GO:0000462	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
14	41	0,96292	2,156E-08	0	GO:0000478	endonucleolytic cleavage involved in rRNA processing
14	41	0,96292	2,156E-08	0	GO:0000479	endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
56	179	0,9592388	2,90E-28	0	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
13	39	0,9465991	9,70E-08	0	GO:0000447	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
56	189	0,9245695	6,69E-27	0	GO:0044085	cellular component biogenesis
24	77	0,914361	1,589E-12	0	GO:0070925	organelle assembly
62	225	0,8881098	7,535E-28	0	GO:0005730	nucleolus
50	181	0,8724583	1,698E-22	0	GO:0044445	cytosolic part
58	223	0,8470258	1,34E-24	0	GO:0006364	rRNA processing
50	196	0,8242613	8,201E-21	0	GO:0033279	ribosomal subunit
58	233	0,8206846	1,55E-23	0	GO:0016072	rRNA metabolic process
11	41	0,8126736	1,051E-05	0,013	GO:0000054	ribosomal subunit export from nucleus
11	41	0,8126736	1,051E-05	0,013	GO:0033753	establishment of ribosome localization

18	68	0,8087115	1,959E-08	0	GO:0044452	nucleolar part
104	484	0,8054658	2,896E-37	0	GO:0030529	ribonucleoprotein complex
16	61	0,8017751	1,414E-07	0,001	GO:0000469	cleavage involved in rRNA processing
29	113	0,8015136	1,737E-12	0	GO:0015934	large ribosomal subunit
21	83	0,7848399	3,044E-09	0	GO:0015935	small ribosomal subunit
27	108	0,7839138	2,061E-11	0	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly
46	195	0,772769	1,043E-17	0	GO:0003735	structural constituent of ribosome
51	225	0,7560741	9,023E-19	0	GO:0005840	ribosome
126	723	0,7211567	5,09E-36	0	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle
126	723	0,7211567	5,09E-36	0	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle
62	317	0,686243	2,91E-19	0	GO:0034470	ncRNA processing
60	306	0,6850135	1,076E-18	0	GO:0006412	translation
23	116	0,6489136	7,888E-08	0	GO:0051168	nuclear export
65	370	0,6298308	1,22E-17	0	GO:0034660	ncRNA metabolic process
25	134	0,6174439	7,489E-08	0	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport
25	134	0,6174439	7,489E-08	0	GO:0051169	nuclear transport
31	173	0,6011851	5,175E-09	0	GO:0006417	regulation of translation
55	327	0,5931703	4,217E-14	0	GO:0005198	structural molecule activity
18	101	0,5875286	1,04E-05	0,012	GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
73	467	0,5752129	7,09E-17	0	GO:0006396	RNA processing
33	195	0,5722705	7,23E-09	0	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process
31	185	0,5650415	2,715E-08	0	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression
56	358	0,5546154	5,773E-13	0	GO:0003723	RNA binding
54	360	0,5295178	9,021E-12	0	GO:0005622	intracellular
86	725	0,4378026	1,72E-12	0	GO:0016070	RNA metabolic process
33	255	0,4305983	4,644E-06	0,006	GO:0051246	regulation of protein metabolic process
98	971	0,3597144	5,218E-10	0	GO:0044428	nuclear part
148	1679	0,3385263	4,697E-11	0	GO:0032991	macromolecular complex
85	890	0,3145317	1,688E-07	0,001	GO:0003676	nucleic acid binding
106	1263	0,2585254	2,387E-06	0,004	GO:0090304	nucleic acid metabolic process
179	2410	0,2569576	2,896E-07	0,002	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process
182	2480	0,251367	5,221E-07	0,002	GO:0043170	macromolecule metabolic process
96	1146	0,2485162	1,026E-05	0,012	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process

96	1153	0,2449001	1,34E-05	0,015	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process
115	1475	0,2206995	2,94E-05	0,026	GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
133	1786	0,2062174	4,915E-05	0,047	GO:0005634	nucleus
171	2424	0,2042142	3,624E-05	0,029	GO:0044422	organelle part
171	2424	0,2042142	3,624E-05	0,029	GO:0044446	intracellular organelle part

Como resumen, se presenta una serie de tablas en las que están señalados aquellos genes cuyo patrón de expresión se altera a causa de la delección del gen *MIG2*.

Genes sobreexpresados en un mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés nutricional.				
X	N	P-value	attribute ID	attribute name
8	43	3,63E-06	GO:0009310	amine catabolic process
8	43	3,63E-06	GO:0044270	nitrogen compound catabolic process
7	40	2,31E-05	GO:0009063	amino acid catabolic process

Genes subexpresados en un mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés nutricional.				
X	N	P-value	attribute ID	attribute name
101	302	2,25E-28	GO:0034470	ncRNA processing
121	503	1,01E-19	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
184	1137	9,14E-11	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process
17	32	3,05814E-09	GO:0030687	preribosome, large subunit precursor
141	856	1,1157E-08	GO:0003676	nucleic acid binding
214	1452	1,12384E-08	GO:0044249	cellular biosynthetic process
339	2636	4,16452E-07	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process
345	2705	7,57792E-07	GO:0043170	macromolecule metabolic process
13	30	4,50104E-06	GO:0004004	ATP-dependent RNA helicase activity
13	30	4,50104E-06	GO:0008186	RNA-dependent ATPase activity
8	13	1,29254E-05	GO:0006450	regulation of translational fidelity
5	5	1,37942E-05	GO:0016281	eukaryotic translation initiation factor 4F complex
14	38	1,85097E-05	GO:0003724	RNA helicase activity
8	14	2,73404E-05	GO:0005736	DNA-directed RNA polymerase I complex
9	18	3,44867E-05	GO:0030515	snoRNA binding

Genes sobreexpresados en un mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés oxidativo.				
X	N	P-value	attribute ID	attribute name
3	4	2,28058E-05	GO:0015688	iron chelate transport
3	4	2,28058E-05	GO:0015892	siderophore-iron transport
4	10	1,96135E-05	GO:0005381	iron ion transmembrane transporter activity
5	18	1,25638E-05	GO:0004601	peroxidase activity
5	18	1,25638E-05	GO:0016684	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor
6	27	6,62683E-06	GO:0006826	iron ion transport
8	75	5,44173E-05	GO:0030001	metal ion transport
10	113	3,20885E-05	GO:0007039	vacuolar protein catabolic process
10	115	3,73852E-05	GO:0044257	cellular protein catabolic process

Genes subexpresados en un mutante <i>mig2</i> en condiciones de estrés oxidativo.				
X	N	P-value	attribute ID	attribute name
19	44	4,21602E-13	GO:0042257	ribosomal subunit assembly
21	51	7,44772E-14	GO:0022627	cytosolic small ribosomal subunit
23	57	7,82425E-15	GO:0042255	ribosome assembly
11	27	8,85373E-08	GO:0000480	endonucleolytic cleavage in 5'-ETS of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
14	35	1,93339E-09	GO:0000027	ribosomal large subunit assembly
27	69	8,18046E-17	GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit
11	29	2,12118E-07	GO:0000472	endonucleolytic cleavage to generate mature 5'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
11	30	3,18242E-07	GO:0000967	rRNA 5'-end processing
11	30	3,18242E-07	GO:0034471	ncRNA 5'-end processing
11	31	4,68962E-07	GO:0000966	RNA 5'-end processing
20	59	2,15257E-11	GO:0030490	maturation of SSU-rRNA
18	53	2,16184E-10	GO:0000462	maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
14	41	2,1559E-08	GO:0000478	endonucleolytic cleavage involved in rRNA processing
14	41	2,1559E-08	GO:0000479	endonucleolytic cleavage of tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)
24	77	1,58873E-12	GO:0070925	organelle assembly
62	225	7,53469E-28	GO:0005730	nucleolus
50	181	1,69831E-22	GO:0044445	cytosolic part
50	196	8,20087E-21	GO:0033279	ribosomal subunit
11	41	1,05144E-05	GO:0000054	ribosomal subunit export from nucleus
11	41	1,05144E-05	GO:0033753	establishment of ribosome localization
18	68	1,95865E-08	GO:0044452	nucleolar part
104	484	2,89604E-37	GO:0030529	ribonucleoprotein complex
16	61	1,4137E-07	GO:0000469	cleavage involved in rRNA processing
29	113	1,73667E-12	GO:0015934	large ribosomal subunit
21	83	3,0441E-09	GO:0015935	small ribosomal subunit
27	108	2,06093E-11	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly
46	195	1,04278E-17	GO:0003735	structural constituent of ribosome
51	225	9,02304E-19	GO:0005840	ribosome
60	306	1,07596E-18	GO:0006412	translation
23	116	7,88767E-08	GO:0051168	nuclear export
25	134	7,4888E-08	GO:0006913	nucleocytoplasmic transport
25	134	7,4888E-08	GO:0051169	nuclear transport
31	173	5,17506E-09	GO:0006417	regulation of translation
55	327	4,21749E-14	GO:0005198	structural molecule activity
18	101	1,04001E-05	GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
33	195	7,22956E-09	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process
31	185	2,71477E-08	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression
56	358	5,77329E-13	GO:0003723	RNA binding
54	360	9,0209E-12	GO:0005622	intracellular
33	255	4,64412E-06	GO:0051246	regulation of protein metabolic process
98	971	5,21836E-10	GO:0044428	nuclear part
148	1679	4,69683E-11	GO:0032991	macromolecular complex
85	890	1,68781E-07	GO:0003676	nucleic acid binding
106	1263	2,38702E-06	GO:0090304	nucleic acid metabolic process
179	2410	2,89613E-07	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process
182	2480	5,22143E-07	GO:0043170	macromolecule metabolic process
96	1146	1,02603E-05	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process
96	1153	1,33976E-05	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process
115	1475	2,94019E-05	GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
133	1786	4,91456E-05	GO:0005634	nucleus
171	2424	3,62358E-05	GO:0044422	organelle part
171	2424	3,62358E-05	GO:0044446	intracellular organelle part

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES.

Los artículos que a continuación se citan (se adjuntas en las páginas siguientes) se publicaron durante el desarrollo de esta tesis.

1.- R. Rodicio, M.L. López, S. Cuadrado, **A. F.-Cid**, B. Redruello, F. Moreno, J.J. Heinisch, A.K. Hegewald and K.D. Breunig (2008). “Differential control of isocitrate lyase gene transcription by non-fermentable carbon sources in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*”. *FEBS Lett.* **5**, 549-557.

2.- **Alejandra Fernández-Cid**, Alberto Riera, Pilar Herrero and Fernando Moreno. “Mig2, a new component of the mitochondrial fusion machinery.” (Manuscrito sometido a revisión).

Otros resultados obtenidos durante esta tesis están en este momento pendientes de publicación, en fase de redacción de los manuscritos correspondientes.

Differential control of isocitrate lyase gene transcription by non-fermentable carbon sources in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*

Rosaura Rodicio^{a,*}, Maria Luz López^a, Sara Cuadrado^a, Alejandra F. Cid^a, Begoña Redruello^a, Fernando Moreno^a, Jürgen J. Heinisch^b, Anne-Kathrin Hegewald^c, Karin D. Breunig^c

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular and Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Campus del Cristo, 33006 Oviedo, Spain

^b Universität Osnabrück, Fachbereich Biologie/Chemie, AG Genetik, Barbarastrasse 11, D-49076 Osnabrück, Germany

^c Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie/Genetik, D-06099 Halle, Germany

Received 8 October 2007; revised 15 January 2008; accepted 18 January 2008

Available online 31 January 2008

Edited by Ivan Sadowski

Abstract The *KIICL1* gene, encoding isocitrate lyase in *Kluyveromyces lactis*, is essential for ethanol utilization. Deletion analyses identified two functional promoter elements, CSRE-A and CSRE-B. Transcription is activated on ethanol, but not on glucose, glycerol or lactate. Expression depends on the KICat8p transcription factor and KISip4p binds to the promoter elements. Glycerol diminishes *KIICL1* expression and a single carbon source responsive element (CSRE) sequence is both necessary and sufficient to mediate this regulation. The glycerol effect is less pronounced in *Saccharomyces cerevisiae* than in *K. lactis*. Mutants lacking *KIGUT2* (which encodes the glycerol 3-phosphate dehydrogenase) still show reduced expression in glycerol, whereas mutants deficient in glycerol kinase (*Klgut1*) do not. We conclude that a metabolite of glycerol is required for this regulation.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ethanol metabolism; Isocitrate lyase; Carbon source responsive element; *CAT8*; *SIP4*; Yeast

1. Introduction

The yeasts *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* share a similar life-cycle and are closely related from an evolutionary point of view, but *S. cerevisiae* is believed to have undergone a whole genome duplication that *K. lactis* did not [1,2]. Both yeasts can grow on fermentable carbon sources as expected from their natural environments (i.e. sugar-rich fruit juices and milk with lactose). *S. cerevisiae* is specialized in alcoholic fermentation whereas *K. lactis* is Crabtree-negative and relies on a more respiratory metabolism. Accordingly, major differences are observed in the regulatory circuits which govern their central metabolism (for reviews see [3–5]). *S. cerevisiae* and *K. lactis* are also able to grow on alternative, non-fermentable, carbon sources such as ethanol or glycerol. Sugar phosphates are then supplied through gluconeogenesis and the

energy demand is met by respiration. If ethanol is to be used as a sole carbon source, the glyoxylate cycle becomes essential as an anaplerotic pathway to replenish C4-metabolites to the tricarboxylic acid cycle (for reviews see [6,7]). Gluconeogenesis and the glyoxylate cycle are coordinately regulated in *S. cerevisiae*. Thus, transcription of the genes encoding the respective enzymes proceeds in the presence of ethanol and is repressed by glucose (for reviews see [7–10]).

Glucose repression in *S. cerevisiae* is mediated by the Snf1-complex, named after the catalytic Snf1p (=Cat1p) subunit, a member of a family of serine/threonine kinases, which is highly conserved in all eukaryotes [11]. Snf1p is closely associated with the regulatory protein Snf4p (=Cat3p [12]), which stimulates its kinase activity by binding the auto-inhibitory domain [13]. A third component of the complex is either one of three subunits encoded by *SIP1*, *SIP2* or *GAL83* [14,15]. If activated, the Snf1-complex phosphorylates Cat8p, which binds DNA at the so-called carbon source responsive element (CSRE) promoter sequences (for carbon source responsive element [16,17]). CSREs are found in the promoters of genes encoding gluconeogenic and glyoxylate cycle enzymes and account for the above mentioned coordinate regulation (see [7] and references therein). Consequently, *cat8* mutants fail to grow on non-fermentable carbon sources such as glycerol or ethanol. *CAT8* gene expression is negatively regulated by the general Mig1p repressor in *S. cerevisiae* [16]. Besides Cat8p, the zinc cluster protein Sip4p has also been shown to bind to CSRE sequences, but a *sip4* deletion does not display a marked growth defect on non-fermentable carbon sources [18].

These regulatory relationships are less well studied in *K. lactis*. In contrast to *S. cerevisiae*, gluconeogenesis and the glyoxylate pathway seem to be regulated independently. Thus, *Kicat8* mutants lack the ability to utilize ethanol but still grow on glycerol as a sole carbon source. KICat8p is not required for synthesis of the gluconeogenic enzymes fructose 1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Yet, it is essential for the expression of *KIICL1* and *KIMLS1*, which encode the glyoxylate cycle enzymes isocitrate lyase and malate synthase, respectively [19]. Transcription of *KIACS1* and *KIACS2* (which encode isozymes of acetyl coenzyme A synthases), *KIJEN1* and *KIJEN2* (which encode carboxylic acid permeases) and *KIQCR8* (which encodes the 11 kDa subunit VIII of the mitochondrial bc1-complex) are also regulated by KICat8p [20–22]. Analogous to *S. cerevisiae*, KICat8p

*Corresponding author. Fax: +34 985 103157.

E-mail address: Rosaura@fq.uniovi.es (R. Rodicio).

Abbreviations: CSRE, carbon source responsive element; nt, nucleotide; PCR, polymerase chain reaction

phosphorylation depends on the *KISNF1* (=FOG2) product [23]. The *GAL83/SIP1/SIP2* gene family of *S. cerevisiae* is represented by the sole *FOG1* gene in *K. lactis* [24].

In previous works, we isolated and characterized the *KIICL1* gene, which is essential for ethanol utilization and whose expression is repressed by glucose and strongly increased on ethanol [25]. Derepression requires a functional KICat8p transcription factor [19,25]. In contrast to the enzyme from *S. cerevisiae*, KICat8p is not subject to catabolite inactivation [25].

In this paper, we describe the identification of two CSRE elements in the *KIICL1* promoter and show that these are bound by the KICat8p dependent transcription factor KISip4p. We also demonstrate that the activity of these CSREs is not only down-regulated by glucose but also by glycerol.

2. Materials and methods

2.1. Strains, media and enzymatic analysis

The *K. lactis* strains used in this work are listed in Table 1. The *S. cerevisiae* strain FMY401 (*MAT α icl1::LEU2 ura3(fs) leu2-3,112 his3-11,15*) was also employed. In order to obtain a *Klcat8* mutant strain that lacks β -galactosidase activity, strains MW190-9B (*lac4*) and IG8 (*Klcat8*) were crossed on plates containing 5% malt extract and 3% agar and diploids were selected by complementation of auxotrophic markers. After sporulation, the segregant Kbc3 (Table 1), which does not grow on ethanol medium and fails to produce β -galactosidase, was chosen for further studies. That this strain is indeed mutated in *KICAT8* was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). For genetic manipulations in *Escherichia coli*, strain DH5 α from InVitrogen (Karlsruhe/Germany) was used.

Media, preparation of crude extracts and enzymatic determinations have been described, previously [25].

2.2. Nucleic acid preparations, hybridization and sequencing

Yeast cells were transformed by the method of Klebe et al. [26] modified as described in [27]. Other DNA manipulations were performed by the standard methods described in [28].

Custom sequencing was done by SCT (Oviedo/Spain) or Secugen (Madrid/Spain).

2.3. Plasmids

2.3.1. *KIICL1lacZ* fusions. A Sall/HindIII fragment containing 831 nucleotides (nt) from the 5' non-coding region and 26 bp of the *KIICL1* coding sequence (Gene Bank accession number AY124768) was obtained by PCR with the oligonucleotides OLI-13 and OLI-26 (Table 2) and *KIICL1KEp* [25] as template, and cloned in frame to *lacZ* into pXW3 [29] to yield plasmid pXWKIICL1 (Fig. 1) or into pUK1921 [30] to give pUK-KIICL1. Unidirectional deletions were obtained by PCR using pXW-KIICL1 as template and oligonucleotides listed in Table 2 together with the universal primer. The amplified products were cloned into pXW3, and the resulting plasmids were named according to the oligonucleotide number.

Starting with pUK-KIICL1, internal promoter deletions were introduced by inverse PCR. By using suitable inside-out oligonucleotides (see Table 2) all plasmid sequences but the ones to be deleted were amplified. From the pUK-derivatives the *KIICL1* promoter deletions were cloned into pXW3 as Sall/HindIII fragments. The plasmids were named according to the corresponding oligonucleotide pairs.

Construct pXW-39 (see Fig. 1) was used to study the function of putative CSRE elements. All the inserts were obtained by annealing two complementary oligonucleotides (Table 2) and cloned into pXW-39 digested with BamHI/Sall to give plasmids pXW-39-#, with # corresponding to the numbers of the complementary oligonucleotides.

To obtain a *KIACS2-lacZ* fusion, a BamHI/HindIII fragment containing 809 nt from the 5' non-coding region and 20 bp of the *KIACS2* coding sequence, was generated by PCR with the oligonucleotides OLI176 and OLI177 (Table 2) and genomic DNA from the wild-type strain KB6-2C as template and cloned in frame to *lacZ* into pXW3 [29] to yield pXW-KIACS2* (Fig. 3). *KIICL1*-CSRE-B, obtained by annealing the complementary oligonucleotides OLI180 and OLI181 (Table 2), was cloned into pXW-KIACS2 digested with BamHI (vector) and XbaI to give pXW-KIACS2-CSRE_{ICL}-B. Plasmid pXW-KIACS2 was prepared as a control by digesting pXW-KIACS2* with XbaI and BamHI, end-filling with the Klenow fragment of DNA polymerase I and religation.

To investigate the effect of glycerol on the *S. cerevisiae* enzyme in *K. lactis*, the deletion strain *Klicl1 Δ 13*, which carries the centromeric plasmid *ScICL1pCXJ* with the *ScICL1* gene, was used. For the *S. cerevisiae* studies, plasmid *KIICL1YIp* integrated at the *URA3* locus of the *ScICL1* deletion strain FMY401 was employed [25].

The respective promoter regions of all constructs described were verified by sequence analyses.

2.4. Construction of *Klgut1* and *Klgut2* deletions

The *Klgut1* deletion was obtained by transformation of the wild-type strain MW270-7B with a PCR product carrying the *KanMX* cassette flanked by *KIGUT1* sequences. Primers OLI-06.139 and OLI-06.140 were used with pUG6 [31] as a template. Transformants were selected on YEPD/sorbitol medium containing 110 mg/l G418 and replica-plated onto synthetic medium containing glycerol as a sole carbon source. Two colonies that did not grow on the latter medium had *KIGUT1* substituted by the *KanMX* cassette, verified by two different PCR approaches. A similar strategy was used for the construction of the *Klgut2* deletion strain, i.e. with the oligonucleotide pair OLI-06.141/06.142 as primers for the PCR reaction. Transformants selected on G418 that did not grow on synthetic medium with glycerol were shown to contain the correct deletion by PCR.

2.5. Quantification of expression levels by real-time RT-PCR

Total RNA was isolated with the FastRNA[®] Pro Red Kit from Bio 101[®] Systems and treated with deoxyribonuclease I (RNase-free). cDNA and PCR reactions were performed in an ABI PRISM[®] 7000 (Applied Biosystems) with the SuperScript[™] III Platinum[®] SYBR[®] GREEN One-Step qRT-PCR kit from InVitrogen. All procedures were performed according to the instructions of the manufacturers. The primers 06.102-Ov/06.103-Ov and 06.104-Ov/06.105-Ov (Table 2) were used to amplify internal sequences of *KIICL1* and *KIAC1* (control), respectively. PCR conditions were: an initial cDNA synthesis step at

Table 1
Kluyveromyces lactis strains employed in this work

Strain	Genotype	Source
KB6-2C	<i>MATα ura3-12 his3-35 ade⁻</i>	K.D. Breunig [36]
MW270-7B	<i>MATα leu2 uraA1-1 met1-1</i>	M. Wésolowski-Louvel [27]
MW190-9B	<i>MATα Klura3 lac4-8 Rag⁺</i>	M. Wésolowski-Louvel [29]
Kbc3	<i>MATα ura3-12 lac4-8 Klcat8Δ</i>	This work
<i>Klicl1Δ13</i>	<i>MATα ura3-12 his3-35 ade⁻ Klicl1::ScHis3</i>	López [25]
PM6-7A-KltpiA	<i>MATα uraA1-1 adeT-600 tpi1::KanMx</i>	Compagno [37]
CBS2359/pgi1	<i>MATα rag2::loxP</i>	Steensma [38]
MW270-7B-Klgut1 Δ	<i>MATα leu2 uraA1-1 met1-1</i>	This work
MW270-7B-Klgut2 Δ	<i>MATα leu2 uraA1-1 met1-1</i>	This work
JA6/SIP4HA	<i>MATα trp1-11 ura3-12 adeA-600 lac4::KISIP4-(HA)6::KITRPI</i>	L.Schild unpublished data

Table 2
Oligonucleotides used

Designation	Sequence
OLI-26	5' <u>acgaagc</u> ttGCAGCAGAAGCCTTAACGGAG3'
OLI-13	5' <u>acagtcgac</u> ACGATGGGAGAATTGAATC3'
OLI-54	5' <u>acgagtcgac</u> TCCGCCATTAACCGAAT3'
OLI-55	5' <u>acgagtcgac</u> TAAACCGAATGTGATAG3'
OLI-32	5' <u>acgctcgag</u> TTCTTCCCCTCCCTACAT3'
OLI-56	5' <u>acgagtcgac</u> TTTCGCATGAATGGGGAAA3'
OLI-38	5' <u>acgagtcgac</u> GGTTCCCTCAGCCAAATAG' 3'
OLI-39	5' <u>acgagtcGAC</u> GGCTTGAACCTGGTC3'
OLI-41	5' <u>acgagtcgac</u> GCACATACATGGTACCCT3'
OLI-8	5' <u>ggagctcgag</u> GAATTAGAGCCATGATTGG3'
OLI-33	5' <u>acgagtcgac</u> GTTCATATACCTTAAG3'
OLI-60	5' <u>ccgtagatc</u> tCCGAATGTGATAGTTTTTCC3'
OLI-61	5' <u>ccgtagatc</u> tATGATTCAATTCTCCCATC3'
OLI-62	5' <u>ccgtagatc</u> tGAAAGTTGACTCAGTTGACTC3'
OLI-64	5' <u>ccgtctcga</u> GAAAGTTGACTCAGTTGACTC
OLI-65	5' <u>ccgtctcga</u> GCGAAAATGTCGGTGAATTC
OLI-66	5' <u>ccgtagatc</u> tTTCTTCCCCTCCCTACATCC
OLI-50	5' <u>acgagatc</u> TCCGATGAATGGGGtcgacaca3'
OLI-51	5' <u>acggtcga</u> CCCCATTCATGCGAgatctaca3'
OLI-52	5' <u>acgagatc</u> TCCGGTTAATGGCGtcgacaca3'
OLI-53	5' <u>acggtcga</u> CCCATTAACCGagatctaca3'
OLI-80 D-Xba	5' <u>gacgagatc</u> TCCGATGAATGGGGtctagacagag3'
OLI-81 D-Xba	5' <u>ctcgtctaga</u> CCCCATTCATGCGAgatctcgtc3'
OLI-76 ACS2	5' <u>acgaagc</u> ttTGCAATTTATCCGACGACAT3'
OLI-77 ACS2	5' <u>agaggatcc</u> GAGCTGAACGGTGCAACA3'
OLI-06.139	CGTAGCATCAGGTGGAATAGAGCAAGATAACAGCAGACTTTTATTCGAGCAGATCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC
OLI-06.140	CATTCATCCATCCCTTAGATTCTCAATTCGAGTCTCCACATCTTCCAACCTCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
OLI-06.141	GCCAGTAAGGTTTTGCTGGGATCAGCTGTGTCTGCTGCCGAGTGTTCGGCGTGCCTTCGTACGCTGCAGGTCGAC
OLI-06.142	GTTGAATTTTCATCTTGTCTCTTTTTGGAATCCAGCCCAATTCATCTCCCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
OLI-06.102-Ov	CGATGACTTACAAAACCATCGAA
OLI-06.103-Ov	ACAATTCGGTACCACAATTC
OLI-06.104-Ov	TCCCAGGTATTGCTGAAAGAAT
OLI-06.105-Ov	TCCGTCGTATTCTTGTCTTGAGA
CSRE-KIIICL1AL	CGGGTATGATTAAACAGCGACA
CSRE-KIIICL1AR	ATGGATGTAGGGAGGGGAAG
CSRE-KIIICL1BL	CTTCCCCTCCCTACATCCAT
CSRE-KIIICL1BR	CGTGTCTTGTTCGTCCTATTG
KIKHT3-6-CW	GTATGCGTCAGTCGGATCGT
KIKHT3-9-CW	ATACCTGTATGGTCCATTGC

Capital letters represent the sequences present in the respective genes. Small letters show nucleotides added to the original sequences. Bases underlined indicate the restriction sites used for cloning. Italics correspond to sequences of the pUG6 vector.

50 °C for 30 min and a denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing-extension at 60 °C for 1 min.

2.6. Chromatin immunoprecipitation analyses (ChIP)

For ChIP assays, cells were pre-grown in YNB glucose (2%) medium to OD₆₀₀ of 1–1.5 and shifted to ethanol (3%) for 5 h for derepression before cross-linking with formaldehyde. Immunoprecipitation of sheared chromatin was performed with α -HA-antibodies (Santa Cruz) for 1 h at 4 °C. After reversal of cross-links and DNA extraction, input and ChIP were analysed using 25 cycles of standard PCR conditions.

3. Results

3.1. The *KIICL1* promoter contains two functional CSREs elements

Regulatory elements in the *KIICL1* promoter were first delimited by testing a set of sequential deletions from the 5'-end of the promoter for the reporter β -galactosidase activity under different growth conditions (Fig. 1A). Constructs carrying either 831 nt or 811 nt upstream from the ATG translation start codon confer high level expression on ethanol, which is repressed by glucose. A further deletion of 7 nt (–811 to

–804) causes a 40% reduction of the initial activity on ethanol and expression is slowly reduced by approximately 60% when sequences up to nt –732 are removed. All further deletions resulted in only basal level activities. Thus, all activating sequences are located between nt –811 and –690. This was confirmed by a construct lacking specifically this region (pXW-61/62), which again displayed only basal level activities (Fig. 1B). Closer inspection of the respective DNA fragment revealed the presence of two similar sequences, which resemble the consensus for CSRE elements of *S. cerevisiae* (Fig. 1). Therefore, the two elements were designated CSRE-A and CSRE-B.

Further investigations showed that deletion of CSRE-A causes an approximately 45% reduction in specific β -galactosidase activities. An even stronger effect (70% reduction) was observed in the deletion of CSRE-B. A construct lacking both elements lacked expression (Fig. 1B). This suggests that the two CSRE elements are both necessary and sufficient for activating transcription under derepressing conditions.

Each of the elements was then tested individually. For this purpose, a construct (pXW-39) which lacks all regulatory elements but retains the putative TATA-box and the transcription start points of the *KIICL1* promoter (located at –226

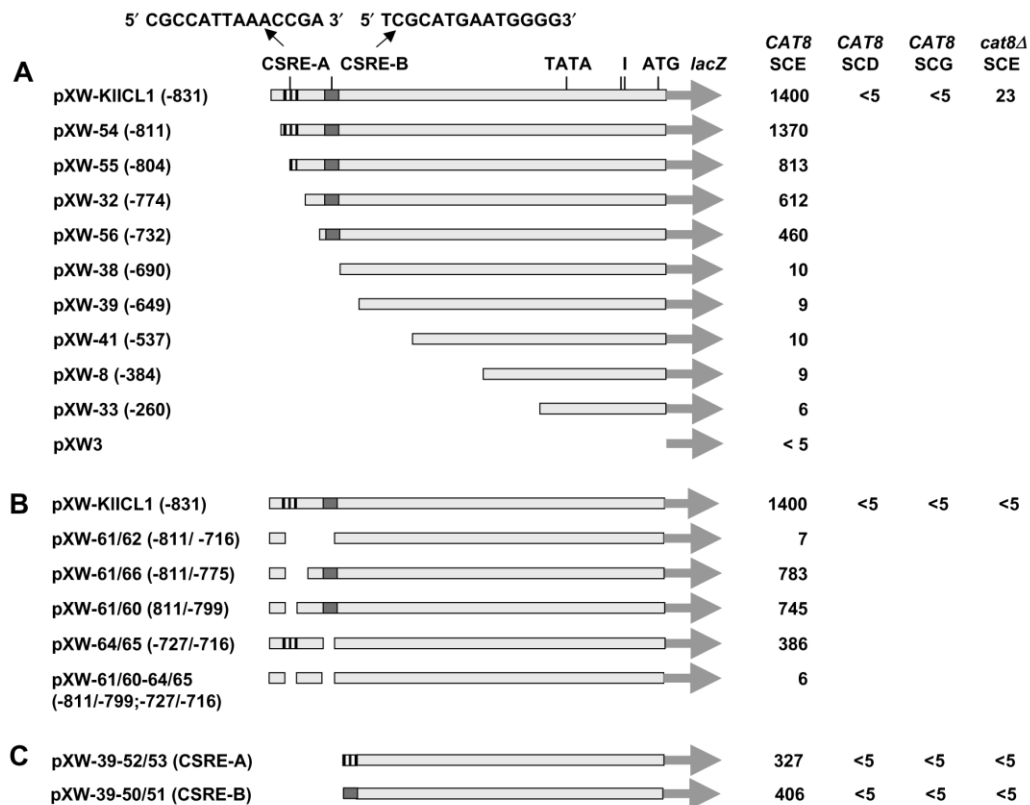


Fig. 1. *KIICLI* promoter analysis. The *KIICLI* promoter and part of the coding sequence was fused to the bacterial *lacZ* gene in the vector pXW3 and truncated constructs were obtained by PCR (see Section 2). Positions are numbered relative to the ATG translational start codon. Plasmids were transformed into the strains MW190-9B (*KICAT8 lac4-8*) or Kbc3 (*Kleat8 lac4-8*) both lacking β -galactosidase. For preparation of crude extracts, cells were grown on SC lacking uracil, with 4% glucose. The culture was either collected at an OD_{600} of approximately 2 (SCDura; repressing conditions) or was used after centrifugation to inoculate cultures containing the indicated media to an OD_{600} of 0.5 (*KICAT8*) or 1.5 (*Kleat8* mutant). The cells were incubated for a period of 6 h to allow for induction of enzyme synthesis. Repeated β -galactosidase determinations of different transformants did not differ by more than 30%.

and -113/-95 as described previously [25]) was employed. CSRE-A and CSRE-B were each reconstituted from pairs of 12 nt oligonucleotides and inserted into the reporter construct. Neither of these elements conferred a high level reporter gene expression in *K. lactis*. Therefore, CSRE-A and CSRE-B were again reconstituted, but from 14 nt oligonucleotides. These elements were fully functional and conferred high β -galactosidase activities on ethanol (Fig. 1C) and acetate (111 and 223 mU/mg, for CSRE-A and CSRE-B, respectively). Low basal activities were observed on glucose, glycerol (Fig. 1C) and lactate (<5 mU/mg). It should be noted that the kinetics of β -galactosidase activity in time-course experiments with constructs which carried either CSRE-A or CSRE-B did not reveal any significant differences. Thus, these data did not provide any evidence for a recognition of the CSREs by different factors. For both constructs activities started to increase 3 h after a shift from glucose to ethanol medium, and the strains carrying the CSRE-B construct always showed the higher activity.

For further investigation, we tested a *Kleat8* deletion, which lacks the ability to derepress *KIICLI* transcription on non-fermentable carbon sources [19,25]. Neither one of the pXW-39

derivatives employed, nor the construct carrying the entire *KIICLI* promoter, displayed significant β -galactosidase activities when ethanol was used as carbon source (Fig. 1). This strongly indicates that regulation through CSRE sequences depends on the presence of the KICat8p protein. However, attempts to demonstrate KICat8p binding have failed so far.

In *S. cerevisiae*, Cat8p is required for the transcription of *SIP4*, which encodes a second regulatory protein that has been shown to bind to CSRE sequences. We therefore tested whether KISip4p might bind to the identified elements within the *KIICLI* promoter. A strain with an HA-tagged version of the *KISIP4* gene was employed for ChIP analysis. Cells were pre-grown in glucose and shifted to ethanol medium for five hours. Chromatin precipitated with anti-HA antibodies was subjected to PCR with specific oligonucleotides to detect *KIICLI*-CSRE sequences. An unrelated sequences (from the *KIKHT3* gene) and a strain with an untagged *KISIP4* gene, were used as controls. As demonstrated in Fig. 2, the CSRE-A and CSRE-B elements of the *KIICLI* promoter were enriched in the precipitate over the input DNA. This indicates that KISip4p is able to bind to both CSREs. The weaker

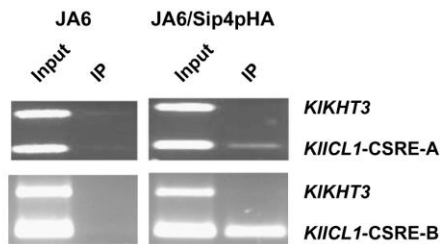


Fig. 2. ChIP data for binding of KISip4p-HA to CSRE sequences. Cells were shifted for 5 h to ethanol medium prior to the isolation of cross-linked chromatin. PCR reactions were carried out with oligonucleotides listed in Table 2 specific for CSRE-A (CSRE-KIICL1AL and CSRE-KIICL1AR) and CSRE-B (CSRE-KIICL1BL and CSRE-KIICL1BR), and the *KIKHT3* promoter (KIKHT3-6-CW and KIKHT3-9-CW) as a negative control. Reactions were also performed on input DNA to confirm the function of the PCR reaction. Analyses were exerted as described in [39].

signal for CSRE-A correlates with the weak influence of deletion of this element in the wild-type promoter context. This suggests that CSRE-B has a higher affinity for KISip4p than CSRE-A.

3.2. Glycerol regulates *KIICL1* expression through CSRE promoter sequences

The data presented above suggest that glycerol causes a reduction of *KIICL1* expression, even in the presence of ethanol. Therefore, specific isocitrate lyase activities were determined after overnight growth on glucose and transfer of the cells to synthetic medium with either ethanol or ethanol plus glycerol as carbon sources. As shown for the wild-type strain KB6-2C (Fig. 3A), an approximately 75% drop in activity was detected with glycerol plus ethanol, as compared to the ethanol control. Similar results were obtained in other genetic backgrounds, i.e. the effect is not strain specific, although considerable variations were observed for specific isocitrate lyase activities between different strains (data not shown). This was also observed when cultures were grown on rich media or when cells were pre-grown under inducing conditions (i.e. with ethanol as carbon source). The effect of glycerol is mediated by the promoter of *KIICL1*, as demonstrated by measurements of β -galactosidase activities in the *lacZ* fusion (pXW-KIICL1). As observed for isocitrate lyase, a reduction in β -galactosidase synthesis was caused by the presence of glycerol (Fig. 3A). These data were confirmed by the results of real-time RT-PCR experiments. As evident from Table 3, the relative levels of *KIICL1*-mRNA were 7–10-fold higher (after 6 h and 8 h following the shift from glucose, respectively) in cells grown on ethanol alone as compared to those where glycerol was added. Addition of glucose to the ethanol medium had an even stronger effect, with a 250-fold decrease in mRNA abundance after 8 h. Consistent with published data, growth on either glucose or glycerol alone also led to a basal level expression [19,23,25].

We also followed the KIIc1p activity after addition of glycerol to ethanol grown cells to investigate the dynamics of the down-regulation of *KIICL1* expression. Activities remained largely unaffected in the wild-type for the first 2 h (Fig. 3B). In this time interval, one would hardly detect changes in the level of gene expression, but rather the effect of proteolytic

events. After this period, KIIc1p activity significantly decreased, likely due to dilution during growth. This was also true for β -galactosidase activities in the respective reporter strain (Fig. 3B). Thus, glycerol most likely acts on *KIICL1* transcription rather than through inactivation of KIIc1p, consistent with the previously reported glucose-effect [25].

To investigate whether the observed effect is due to a regulatory system exclusively operating in *K. lactis*, we tested the behaviour of the *S. cerevisiae* isocitrate lyase on synthetic medium. Although activities are lower in the cultures containing glycerol, they always reached more than 70% of those of the ethanol cultures (on rich media the glycerol effect was more pronounced, data not shown). This also holds true for the *K. lactis* enzyme tested in a *S. cerevisiae icl1* deletion (Fig. 3C). Vice versa, isocitrate lyase activities are lower on glycerol in a *K. lactis* strain which expresses *ScIICL1* (Fig. 3C). This strongly indicates that glycerol acts distinctively on *K. lactis* metabolism.

To characterize the promoter elements mediating the glycerol regulation, a *lacZ* fusion of the *KIACS2* promoter (governing expression of a gene which encodes an acetyl-CoA synthase isozyme) was obtained. It confers β -galactosidase production on non-fermentable carbon sources which remains unaltered on glycerol (Fig. 3D) and is independent of Cat8p (i.e. activity levels decrease by a maximum of 10% in a *Klcat8* deletion strain; not shown). *KIICL1*-CSRE-B was introduced into this construct and again tested under different conditions. As shown in Fig. 3D, specific β -galactosidase activities in the hybrid construct carrying the CSRE-B element are 4–5-fold higher in ethanol but not in the presence of glycerol. The activity of both CSRE-A and CSRE-B was also affected by glycerol when tested individually with the pXW-39 reporter. These results clearly demonstrate that glycerol can regulate either CSRE-element.

We also investigated whether lactate has similar effects as glycerol on *KIICL1* expression. The results obtained strongly depended on the genetic background, since some of the wild-type strains are not able to grow on this carbon source. This is the case for KB6-2C, where lactate has no significant effect on isocitrate lyase synthesis (with activities varying between 82 and 75 mU/mg protein after 8 h of shift to ethanol/lactate medium). However, in the *lacZ* mutant strain (MW190-9B) we found that lactate interferes with isocitrate lyase expression to a similar extent as glycerol (i.e. a reduction of KIIc1p activity from 178 to 25 mU/mg protein after 8 h).

3.3. Glycerol metabolism is required to exert regulatory effects

To investigate how glycerol interferes with *KIICL1* expression, different deletions which affect carbohydrate metabolism were employed. Both a *rag2* and a *tim1* deletion (lacking phosphoglucose isomerase and triosephosphate isomerase, respectively) still showed diminished expression on glycerol. Thus, specific isocitrate lyase activities were reduced by at least 60% after the addition of glycerol as compared to those of the ethanol grown cultures (i.e. for the 8 h samples from 246 to 66 mU/mg protein for *rag2* and from 41 to 12 mU/mg protein for *tim1*, on ethanol or glycerol plus ethanol, respectively).

To more directly target glycerol metabolism, *KIGUT1* and *KIGUT2* (which encode the glycerol kinase and the mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase, respectively) were also deleted individually from the haploid *K. lactis* genome. As expected, neither strain retained the ability to grow on

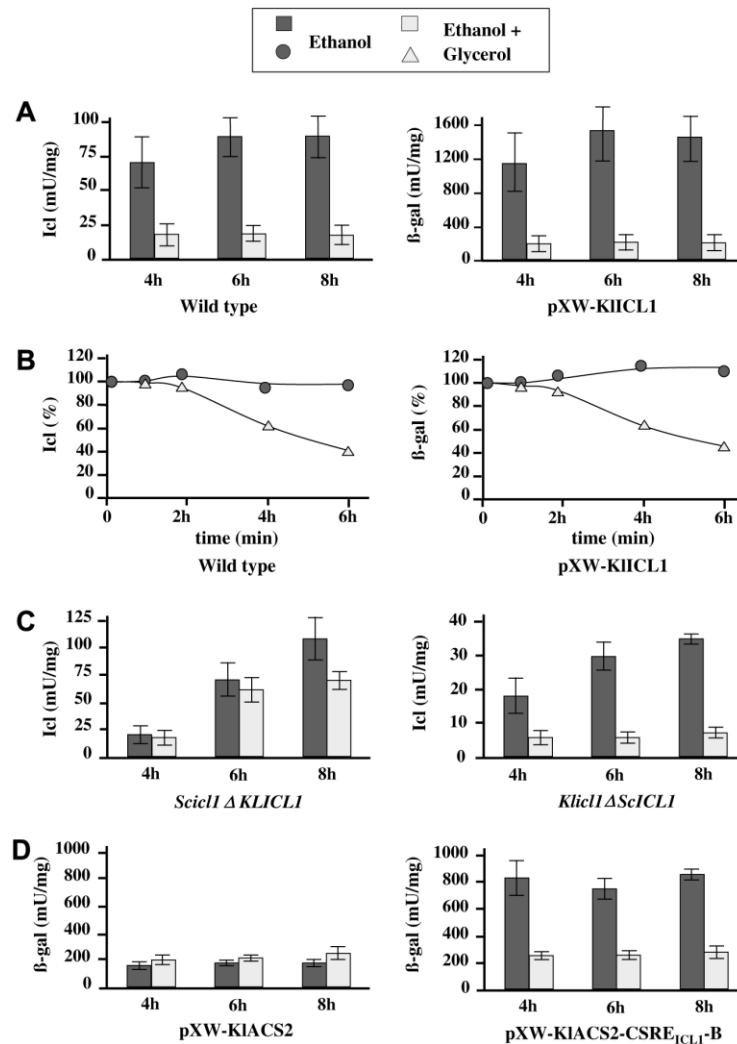


Fig. 3. Glycerol regulation of isocitrate lyase synthesis. A, C, and D represent assays to assess the effect of glycerol. Cells were grown overnight on SCD or SCDura (transformants) and then transferred to SCE to an OD₆₀₀ of 0.5. The culture was divided and 3% glycerol was added to one aliquot. Samples were obtained at different times for enzymatic determinations. (A) Wild-type (KB6-2C); pXW-KIIICL1 (MW190-9B (*Klura3 lac4-8*) transformed with pXW-KIIICL1). (C) *Sci11*Δ*KIIICL1* (FMY401 (*Sci11::LEU2*) carrying plasmid KIIICL1Yp integrated at the *URA3* locus) and *Klic11*Δ*ScIICL1* (*Klic11*Δ13 transformed with *ScIICL1*pCXJ). (D) pXW-KIACS2 and pXW-KIACS2-CSRE_{IICL1}-B (MW190-9B (*Klura3 lac4-8*) transformed with the respective plasmids). (B) Glycerol inactivation assays. Strains were pre-grown on SCD or SCDura (transformants). For derepression cells were transferred to YEPE medium and incubated overnight. Inactivation was started by addition of glycerol to a final concentration of 3% at time zero to one half of the culture. The remaining culture was further incubated on ethanol. Samples were taken at the times indicated. Wild-type (MW190-9B *ura3 lac4-8*); pXW-KIIICL1 (MW190-9B carrying pXW-KIIICL1).

glycerol as a sole carbon source (Fig. 4A). Glycerol causes a reduction in isocitrate lyase synthesis in the strain lacking the dehydrogenase (Fig. 4D), whereas expression was not affected in the kinase-less strain (Fig. 4C). Thus, glycerol must be at least initially phosphorylated to negatively regulate *KIIICL1* expression.

Finally, we also tested whether glucose has any effect on *KIIICL1* transcription in the *Klgut1* deletion mutant. Cells grown on medium containing glucose as a sole carbon source displayed only basal level isocitrate lyase activities (<2 mU/mg

protein) in wild-type and the *Klgut1* deletion. Growth on ethanol plus glucose showed intermediate activities in wild-type and the *Klgut1* mutant (Fig. 4E and F). Thus, in this strain background, glucose leads to a 3-fold decrease in *KIIICL1* expression in either strain. Therefore, the deregulation observed for the *Klgut1* deletion is specific for glycerol. However, it seems that KIGut1p has a negative regulatory influence on expression, since activities in the deletion strain are significantly higher than those of the corresponding wild-type. The molecular reason for this effect escapes our knowledge.

Table 3
Relative *KIIICLI*-mRNA levels determined by real-time RT-PCR

Carbon source	Relative mRNA levels (%)	
	6 h	8 h
3% ethanol	100.00	100.00
4% glucose	0.40	0.78
3% ethanol + 4% glucose	n.d.	0.39
3% glycerol	0.42	0.44
3% ethanol + 3% glycerol	14.50	9.56

Relative expression levels were determined in comparison to the *KIACIT1* gene expression as described in Section 2. n.d., not determined.

4. Discussion

Previous reports indicated that *KIIICLI* transcription is subject to carbon catabolite repression similar to its counterpart in *S. cerevisiae* [25]. The promoter deletion analyses presented here identified two putative CSRE sequences which we pro-

pose to confer the transcriptional regulation. Several lines of evidence lead to this conclusion: (i) CSRE-A and CSRE-B show similarities to the consensus CSRE sequence from *S. cerevisiae* (Table 4). However, it should be noted that a functional CSRE in *K. lactis* requires 14 bp, whereas in *S. cerevisiae* 12 bp have been shown to suffice. Moreover, a G at position N₁₀, which is found in CSRE-B, abolishes activity in *S. cerevisiae* [32]. (ii) Each of the elements is sufficient to confer transcription on ethanol to promoters lacking activating sequences. Both the original deletion analyses and the insertion of each element into the basal promoter show a slightly stronger effect for CSRE-B. Yet, for the intact *KIIICLI* promoter, the effects seem to be largely additive. (iii) The elements depend on a functional KICat8p, since the respective deletion mutant lacks reporter gene expression on all carbon sources. This is reminiscent of *S. cerevisiae*, where Cat8p has been shown to act through CSRE sequences. (iv) Whereas direct binding of KICat8p to the *KIIICLI* regulatory elements (CSRE-A and CSRE-B) could not be detected, ChIP showed

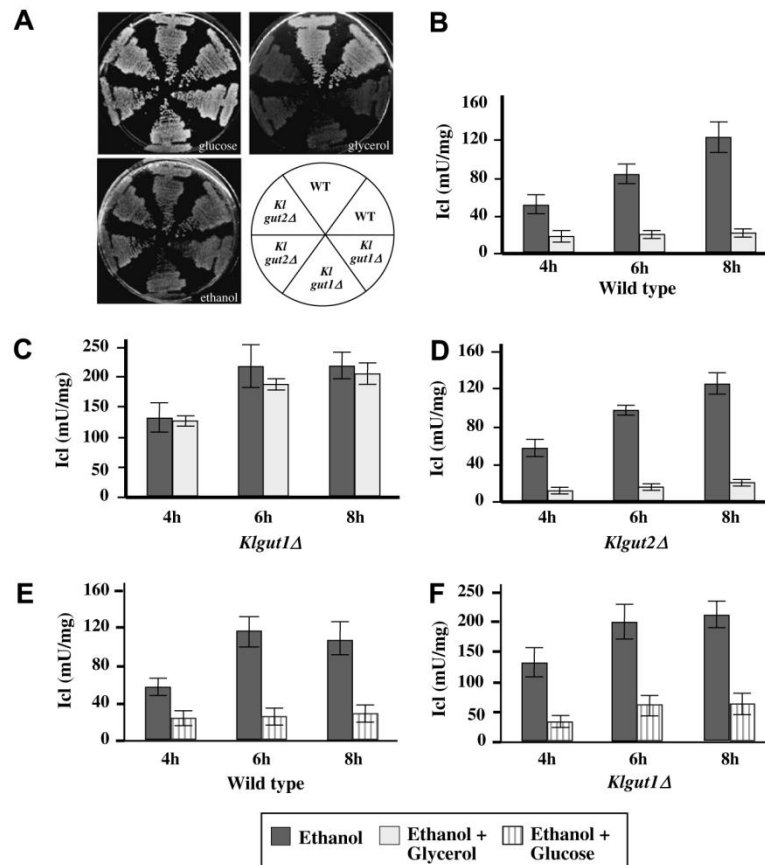


Fig. 4. Glycerol effect in *Klglut1Δ* and *Klglut2Δ* mutant strains. (A) Growth behaviour of the null mutants as compared to the wild-type strain. Strain MW270-7B (WT) and the isogenic deletion mutants *Klglut1::KanMX* (*Klglut1Δ*) and *Klglut2::KanMX* (*Klglut2Δ*) were grown on YEPD and then replica-plated onto SCD (glucose), SCE (ethanol) and SCG (glycerol) and incubated for 48 h at 28 °C. (B, C, D) Regulation by glycerol. Crude extracts for enzymatic determination were prepared from cells grown as described in the legend of Fig. 3A. (C, D) Wild-type (MW270-7B); *Klglut1Δ* (*Klglut1::KanMX*) and *Klglut2Δ* (*Klglut2::KanMX*). (E, F) Regulation by glucose. Cells were grown overnight on SCD and then inoculated in SCE with an OD₆₀₀ of 0.5. The cultures were each divided into two and 4% glucose was added to one set. Samples were obtained at the indicated times for enzymatic determinations. Wild-type (MW270-7B) and *Klglut1Δ* (*Klglut1::kanMX*).

Table 4
Alignment of known and putative CSRE sequences from *K. lactis*

Gene (promotor) ^a	Sequence (5'N ₀ to N ₁₃ 3') ^b
<i>KIICLI</i> _{CSRE-A(-811/-824)}	5'C GCG ATT AAA CCG A3'
<i>KIICLI</i> _{CSRE-B(-729/-742)}	5'C CCC ATT CAT GCG A3'
<i>KIMLSI</i> _(-726/-713)	5'T CCC ATT TGT GCG A3'
<i>KIACS2</i> _{(-1020/-1007)^c}	5'A CCC CTC TAT CCG T3'
<i>KISIP4</i> _(-467/-454)	5'T CCC TTT CAG CCG G3'
<i>KISIP4</i> _(-609/-596)	5'A GCC TTT CAT CCG G3'
<i>KISFCI</i> _(-1052/-1039)	5'T GCC ATT GAC CCG G3'
<i>LAC4</i> _{(-1123/-1110) [3]}	5'C CCC TTT CAT CCG A3'
<i>Kl-consensus</i>^d	5'H SCC WTT NRN SCG R3'
<i>Sc-consensus</i> [32]	5'N YCC NYT NRK CCG N3

^aNumbers refer to the translation start codon (ATG), with the A counting as +1.

^bAmbiguity code: H = C, A or T; Y = C or T; S = G or C; R = A or G; W = A or T; K = G or T.

^cThe putative *KIACS2* element has been omitted for generating the consensus.

KISip4p-HA to be mainly associated with CSRE-B and, to a lower extent, with CSRE-A. In line with this finding, *KIICLI* activation was shown to depend on KISip4p in addition to KICat8p (J.J. Krijger, L. Schild and K.D. Breunig, unpublished results). Interestingly, a putative CSRE sequence is also found in the promoter of *KIMLSI*, which encodes malate synthase, another key enzyme of the glyoxylate cycle (Table 4). This element is more similar to CSRE-B than to CSRE-A and the consensus from *S. cerevisiae* and it is likely to govern *KIMLSI* transcription in a similar manner. Two putative CSREs are also found in the *KISIP4* promoter. Taken together, our data indicate that KICat8p induces the expression of *KISIP4*, which in turn activates *KIICLI* and *KIMLSI* transcription by binding to the respective CSRE sequences.

For *K. lactis*, transcription of seven genes has been shown to depend on KICat8p, so far [19–22]. In contrast to *KIMLSI*, the promoters of all the other genes lack a consensus CSRE, which suggests that the influence of KICat8p may be indirect. This hypothesis is supported by the fact that *KIACS1* and *KIJEN1* are expressed on lactate [20,21], a carbon source, which, as demonstrated here, does not activate the *KIICLI*-CSREs. The *KIACS2* promoter used in our *KIACS2-lacZ* fusion is expressed on ethanol and glycerol independently of KICat8p. Thus, sequences which confer dependence on KICat8p must be located upstream of position –732 nt contained in this construct. A sequence close to the consensus for *K. lactis* CSREs is located at position –1020 nt in the *KIACS2* promoter (Table 4). Homologs of most of the other *S. cerevisiae* genes, which are regulated by CSREs in their promoters, also lack such sequences in *K. lactis*.

In *K. lactis*, it has been shown that the degree of glucose repression is highly strain dependent [3]. This is also true for the strains used here, where in the KB6-2C background a complete loss of *KIICLI* expression is observed on glucose, while in MW270-7B, only a 3-fold decrease is detected. The heterogeneity of *K. lactis* strains most likely is also responsible for the observed variations in specific isocitrate lyase activities in wild-type strains, *rag2* and *tim1* mutants.

K. lactis seems to prefer the utilization of three carbon compounds over ethanol, as indicated by the down-regulatory effect of glycerol. This is a clear difference to *S. cerevisiae*, where such a distinction between non-fermentable carbon sources does not seem to occur. As shown here, and similar to the glucose effect, glycerol acts through transcriptional reg-

ulation of *KIICLI*, rather than through catabolite inactivation. Although we observed an effect of glycerol on ethanol-grown cells also in *S. cerevisiae*, which confirms previous observations [33], it is much more pronounced in *K. lactis*. This effect is species- rather than gene-specific. Thus, *KIICLI* expression is only marginally reduced by glycerol in *S. cerevisiae*, whereas *ScIICLI* expression is strongly diminished by the addition of this compound in *K. lactis*. First hints as to how glycerol exerts this effect are provided by the mutant analyses presented here. The lack of this effect in a *Klgut1-*, but not a *Klgut2*-deletion strain, demonstrates that glycerol has to enter the cell and to get activated by phosphorylation prior to action. For lactate, a similar regulation requires the ability of the strain to grow on this carbon source. This is reminiscent of xylose in *S. cerevisiae*. There, too, metabolism of the five carbon compound is essential to exert catabolite repression [33]. Interestingly, in contrast to *S. cerevisiae*, a strain lacking the succinate dehydrogenase gene *KISDH1* in *K. lactis* displays high isocitrate lyase and malate synthase activities on glucose and also on lactate [34]. Taken together, these data suggest that intracellular metabolites are responsible for keeping isocitrate lyase gene expression low on glucose, glycerol and lactate. Mutations in genes such as *KIGUT1* or *KISDH1* would then cause a metabolic imbalance and result in a lack of down-regulation.

Since in the context of the *KIACS2-lacZ* reporter construct the glycerol control is mediated through the introduced *KIICLI*-CSRE-B, one can assume that signalling occurs through a pathway which connects with glucose repression at or downstream of the Snf1p kinase. This view is supported by the fact that glycerol metabolism also requires an active Snf1p complex [24]. Since *KICAT8* is constitutively expressed ([23], and our unpublished results) and *KISIP4* transcription seems to be controlled by KICat8p, the glycerol effect could be exerted by regulating directly the activity KICat8p. This view is consistent with published data showing that KICat8p is less active in glycerol- than in ethanol-grown cells and that a single point mutation in *KICAT8* results in a protein (KICat8pS661E) which allows activation on glycerol [23].

What could be the trigger of glycerol regulation? In *S. cerevisiae*, a new signalling pathway which is independent of Snf1p, has been shown to control the glucose-regulated localization of the β -subunit Gal83 [35]. It was shown that phosphorylation of glucose is necessary and sufficient to produce this effect. Our data indicate that regulation by glycerol also only depends on its phosphorylation. Thus, a Snf1p independent mechanism which regulates KICat8p or KISip4p, could be in operation. Further work to investigate this hypothesis is currently in progress.

Acknowledgements: We are grateful to M. Węsolowski-Louvel, C. Compagno and H.Y. Steensma for providing the *K. lactis* strains indicated in Table 1. We also like to thank Lydia Schild for constructing the strain which carries the KISip4p-HA tag and Pedro Zuazua-Villar for his help with all aspects of the real-time RT-PCR. This work was supported by the Grant DGE-SPAIN (BFU2004-02855-C02-02).

References

- [1] Wolfe, K.H. and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713.
- [2] Sherman, D., Durrrens, P., Beyne, E., Nikolski, M. and Souciet, J.L. (2004) Génolevures: comparative genomics and molecular

- evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.* 32, D315–D318.
- [3] Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I.I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wesolowski-Louvel, M. and Zeeman, A.M. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 771–780.
 - [4] Gonzalez-Siso, M.I., Freire-Picos, M.A., Ramil, E., Gonzalez-Dominguez, M., Rodriguez Torres, A. and Cerdan, M.E. (2000) Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 699–705.
 - [5] Flores, C.L., Rodriguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 507–529.
 - [6] Gancedo, C. and Serrano, R. (1989) Energy-yielding metabolism in: (Rose, A.H. and Harrison, J.S., Eds.), *The Yeasts. Metabolism and Physiology of Yeasts*, pp. 205–259, Academic Press, London.
 - [7] Schüller, H.J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 139–160.
 - [8] Entian, K.D. and Schüller, H.J. (1997) Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast in: *Yeast Sugar Metabolism* (Zimmermann, F.K. and Entian, K.-D., Eds.), pp. 409–434, Lancaster, Technomic.
 - [9] Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.
 - [10] Santangelo, G.M. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
 - [11] Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 821–855.
 - [12] Celenza, J.L., Eng, F.J. and Carlson, M. (1989) Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5045–5054.
 - [13] Jiang, R. and Carlson, M. (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10, 3105–3115.
 - [14] Yang, X., Jiang, R. and Carlson, M. (1994) A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* 13, 5878–5886.
 - [15] Schmidt, M.C. and McCartney, R.R. (2000) Beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *EMBO J.* 19, 4936–4943.
 - [16] Hedges, D., Proft, M. and Entian, K.D. (1995) *CAT8*, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1915–1922.
 - [17] Rahner, A., Schöler, A., Martens, E., Gollwitzer, B. and Schüller, H.J. (1996) Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon-source dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene *CAT8*. *Nucleic Acids Res.* 24, 2331–2337.
 - [18] Vincent, O. and Carlson, M. (1998) Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J.* 17, 7002–7008.
 - [19] Georis, I., Krijger, J.J., Breunig, K.D. and Vandenhaute, J. (2000) Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of *PCK1* and *FBP1* genes in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 264, 193–203.
 - [20] Lodi, T., Saliola, M., Donnini, C. and Goffrini, P. (2001) Three target genes for the transcriptional activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: acetyl coenzyme A synthetase genes *KIACS1* and *KIACS2* and lactate permease gene *KIJEN1*. *J. Bacteriol.* 183, 5257–5261.
 - [21] Lodi, T., Fontanesi, F., Ferrero, I. and Donnini, C. (2004) Carboxylic acid permeases in yeast: two genes in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 339, 111–119.
 - [22] Brons, J.F., Dryla, A.A., Plüger, E.B., Vinkenleugel, T.M., Hornig, N.C., Grivell, L.A. and Blom, J. (2001) Carbon source-dependent transcriptional regulation of the QCR8 gene in *Kluyveromyces lactis*. Identification of cis-acting regions and trans-acting factors in the KIQR8 upstream region. *Curr. Genet.* 39, 311–318.
 - [23] Charbon, G., Breunig, K.D., Wattiez, R., Vandenhaute, J. and Noël-Georis, I. (2004) Key role of Ser562/661 in Snf1-dependent regulation of Cat8p in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4083–4091.
 - [24] Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P.P. and Ferrero, I. (1996) *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29, 316–326.
 - [25] López, M.L., Redruello, B., Valdés, E., Moreno, F., Heinisch, J.J. and Rodicio, R. (2004) Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr. Genet.* 44, 305–316.
 - [26] Klebe, R.J., Harris, J.V., Sharp, Z.D. and Douglas, M.G. (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333–334.
 - [27] Rodicio, R., Buchwald, U., Schmitz, H.P. and Heinisch, J.J. (2007) Dissecting sensor functions in cell wall integrity signaling in *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.* doi:10.1016/j.fgb.2007.009.
 - [28] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 - [29] Chen, X.J., Wesolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H. (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.* 233, 97–105.
 - [30] Heinisch, J. (1993) *PFK2*, *ISP42*, *ERG2* and *RAD14* are located on the right arm of chromosome XIII. *Yeast* 9, 1103–1105.
 - [31] Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1065–1075.
 - [32] Roth, S., Kümme, J. and Schüller, H.J. (2004) Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 45, 121–128.
 - [33] Belinichon, M.M. and Gancedo, J.M. (2003) Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 180, 293–297.
 - [34] Saliola, M., Bartoccioni, P.C., de Maria, I., Lodi, T. and Falcone, C. (2004) The deletion of the succinate dehydrogenase gene *KISDHI* in *Kluyveromyces lactis* does not lead to respiratory deficiency. *Eukaryot. Cell* 3, 589–597.
 - [35] Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S. and Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* 15, 1104–1114.
 - [36] Vollenbroich, V., Meyer, J., Engels, R., Cardinali, G., Menezes, R.A. and Hollenberg, C.P. (1999) Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol. Gen. Genet.* 261, 495–507.
 - [37] Compagno, C., Boschi, F., Daleffe, A., Porro, D. and Ranzi, B.M. (1999) Isolation, nucleotide sequence, and physiological relevance of the gene encoding triose phosphate isomerase from *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4216–4219.
 - [38] Steensma, H.Y. and Ter Linde, J.J. (2001) Plasmids with the Cre recombinase and the dominant nat marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 18, 469–472.
 - [39] Aparicio, O., Geisberg, J.V., Sekinger, E., Yang, A., Moqtaderi, Z. and Struhl, K. (2005) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 21.3.1–21.3.33.

Mig2, a new component of the mitochondrial fusion machinery

Alejandra Fernández-Cid, Alberto Riera¹, Pilar Herrero and Fernando Moreno*

Department of Biochemistry and Molecular Biology. University of Oviedo, 33006-Oviedo, Spain.

ARTICLE INFO

Keywords:

Glucose repression

Glucose signalling

Mitochondrial

morphology

Mig2

Ups1

Yeast

ABSTRACT

Mig2 has been described as a transcriptional factor that in the absence of Mig1 protein is required for glucose repression of the *SUC2* gene. Thus, until now, the main role assigned to Mig2 has been the functional redundancy to Mig1. In this study, we report that Mig2 has a double subcellular localization. As expected, in high-glucose conditions it is accumulated in the nucleus but in low-glucose conditions Mig2 has an unexpected mitochondrial localization and role in mitochondrial morphology. We describe that Mig2 physically interacts with the mitochondrial protein Ups1 in a glucose-dependent manner. We also show that $\Delta mig2$ mutant cells exhibit a fragmented network of mitochondrial tubules, a phenotype similarly observed in cells lacking Fzo1 and Ups1. Furthermore, Mig2 acts antagonistically with respect to the fission-promoting components, because mitochondrial aggregation induced by *DNM1* deletion was rescued in the $\Delta dnm1 \Delta mig2$ double mutant. Thus, our studies have revealed an additional role for Mig2 as a novel factor required for the maintenance of fusion-competent mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and strongly suggest that Mig2 could be involved in a crossed talk between the nucleus and the mitochondria through Ups1 to regulate mitochondrial morphology in a glucose dependent manner.

1. Introduction

Mig2 was identified several years ago as a repressor that collaborates with Mig1 to cause glucose-induced repression of *SUC2* gene (Lutfiyya and Johnston, 1996). A genome wide expression profiling survey of the yeast genome revealed that all the genes regulated by Mig1 are also regulated by Mig2. Thus, it was postulated that Mig2 always works in conjunction with Mig1 (Lutfiyya et al., 1998). However, Mig1 appears to be the essential component, since its presence is necessary and sufficient to cause full repression of most genes even in the absence of Mig2. Although

the mechanism by which Mig2 participates in the glucose repression of *SUC2* gene is not completely understood, it is difficult to believe, that the sole role of Mig2 is to partially repress gene expression in the absence of Mig1. In this work we describe a new function for this protein; our results suggest that Mig2 is a mitochondrial fusion-promoting protein in *S. cerevisiae*.

The mitochondria of many cell types fuse and divide continuously in a highly regulated manner, such that their overall structure can change rapidly in response to different biological cues. The importance of mitochondrial dynamics in cell life is

demonstrated by the fact that defects in organelle fusion and fission lead to a variety of diseases in humans. Thus, mutations in mitochondrial-fusion components are associated with neurodegenerative diseases (Cho et al., 2010). Similarly, abnormalities in mitochondrial division are associated with defects in embryonic and postnatal development (Wakabayashi et al., 2009).

The major components of the mitochondrial fusion and fission machineries have been evolutionarily conserved from yeast to humans. Due to this conservation and the accumulated knowledge on the genetics and physiology of *S. cerevisiae*, this yeast emerged as one of the prime model organisms to study mitochondrial dynamics (Scott and Youle, 2010). Like other membrane-fusion events, mitochondria are first tethered together before their outer and inner membrane bilayers mix. Three conserved GTPases, Fzo1, Ugo1 and Mgm1, have central roles in mitochondrial fusion (Cohen et al., 2011; Herlan et al., 2004; Hermann et al., 1998; Sesaki et al., 2003; Zick et al., 2009). Similar to mitochondrial fusion, mitochondrial fission requires a GTPase, called Dnm1 (Bleazard et al., 1999; Otsuga et al., 1998). Fusion and fission processes are regulated by several proteins and it seems likely that additional yet unknown factors are involved. Among them, Ups1 a conserved intermembrane space protein was originally identified to affect the processing of the GTPase Mgm1, a central component on the mitochondrial fusion machinery (Herlan et al., 2004; Sesaki et al., 2003), and thereby mitochondrial shape (Sesaki et al., 2006).

Ups1 was later found to be required to maintain normal cardiolipin levels (Osman et al., 2009; Tamura et al., 2009), a phospholipid critical for mitochondrial structure and integrity. Thus, Ups1 regulates fusion by both alternative topogenesis of Mgm1 and control of mitochondrial cardiolipin metabolism. Dnm1 function is mainly regulated by Num1, assuring mitochondrial inheritance during mitosis (Cervený et al., 2007).

Here we describe Mig2 as a novel mitochondrial associated protein involved in maintaining the morphology of these organelles. We also describe the glucose-dependent interaction between Mig2 and Ups1 and discuss a role of Mig2 protein in mitochondrial fusion control.

2. Materials and Methods

2.1. Strains, growing conditions and plasmids

The *S. cerevisiae* strains used throughout this study were derived from W303.1A (Wallis et al., 1989) and BY4742 (Brachmann et al., 1998) haploid wild type strains and are listed in Table 1. Strain FMY501 expressing Mig2-GFP was constructed by homologous recombination in W303.1A using a GFP-HIS3 tagging cassette obtained from pFA6a-GFP-HIS3 plasmid (Longtine et al., 1998). FMY503 strain was constructed by homologous recombination in an Ups1-myc-TRP1 strain using a GFP-HIS3 tagging cassette obtained from pFA6a-GFP-HIS3 plasmid. FMY505 strain was constructed by homologous recombination in a $\Delta dnm1$ strain using a MIG2-His3MX6 deletion cassette obtained from the pFA6a-HIS3MX6 plasmid (Longtine et al., 1998). FMY506 strain was constructed by homologous recombination in a $\Delta fzo1$ strain using a MIG2-His3MX6 deletion cassette obtained from pFA6a-HIS3MX6 plasmid. FMY510 strain expressing Mig2-GFP was constructed by homologous recombination in a $\Delta ups1$ strain using a GFP-HIS3 tagging cassette obtained from pFA6a-GFP-HIS3 plasmid. FMY512 strain was constructed by homologous recombination in a $\Delta mig2$ strain using a UPS1-His3MX6 deletion

* To whom correspondence should be addressed:
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
Universidad de Oviedo. Campus de "El Cristo". 33006-
Oviedo, Spain.
Tel.: +34 985 103 567; Fax.: +34 985 103 157; Email:
fmoreno@uniovi.es.

¹ Present Address: Cell Biology and Biophysics Unit,
European Molecular Biology Laboratory (EMBL),
69117 Heidelberg, Germany.

cassette obtained from the pFA6a-HIS3MX6 plasmid. FMY534 strain was constructed by homologous recombination in a TetR-GFP strain using a Myc-TRP1 tagging cassette obtained from pFA6a-13Myc-TRP1 plasmid.

Escherichia coli DH5 α (*F* \emptyset 80*dlacZ* Δ *MI5 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k-r_k-)* *supE44 relA1 deoRA 99U169*) was the host bacterial strain used for plasmid construction and amplification.

Yeast cells were grown in the following media: YEPD (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract), YEPGly (0.05% glucose, 3% glycerol, 2% peptone, and 1% yeast extract) and synthetic selective media containing the appropriate carbon source (2% glucose (SD) or 3% glycerol and 0.05% glucose (SGly) and 0.69% yeast nitrogen base without amino acids. Amino acids were added at a final concentration of 20-150 μ g/ml. Solid media contained 2% agar in addition to the components described above.

pRS316-Su9-RFP a *CEN-URA3* plasmid expressing RFP fused to the presequence of subunit 9 of the F_o-ATPase of *Neurospora crassa* under control of the *ADH1* promoter was a gift from P. Sanz.

2.2. Fluorescence microscopy

Wild-type (Mig2-GFP) strain, Δ *mig2*, Δ *ups1*, Δ *dnm1*, Δ *fzo1*, Δ *dnm1* Δ *mig2* and Δ *fzo1* Δ *mig2* mutants were transformed with the centromeric plasmid pRS316-Su9-RFP and grown until early-logarithmic phase (OD₆₀₀ of less than 0.8) in synthetic high-glucose selective medium (SD). Then, half of the culture was shifted to synthetic low-glucose selective medium (SGly) for 5 min. 25 μ l of cells were loaded onto poly L-lysine-coated slides, and the remaining suspension was immediately withdrawn by aspiration. One μ l of DAPI (2.5 μ g/ml in 80% glycerol) was added, and a cover slide was placed over the samples. GFP, RFP and DAPI localization in live cultures was analysed by direct fluorescence using a Leica DM5000B microscope. To avoid fluorescent signal in the non-linear range, cells overexpressing GFP-

and RFP-tagged proteins were excluded from the analysis. Protein localization was estimated by visual inspection of the images. At least 100 cells were scored per experiment in three or more experiments. Fluorescence distribution was scored according to the following rule: N, denotes a nuclear fluorescence signal and M, mitochondrial fluorescence signal. Mitochondrial morphology was classified in four categories: wild type-like, fragmented, aggregated and others. Means and standard deviations are shown for at least three independent experiments. Representative images of the obtained results are shown. Images were processed using Adobe Photoshop CS.

2.3. Preparation of crude protein extracts

Yeast protein extracts were prepared as follows: yeasts were grown in 10 to 20 ml of synthetic glucose medium (SD; H-Glc) at 28°C to an A_{600nm} of 0.8-1.0. Then, half of the culture was shifted to synthetic low-glucose medium (SGly, L-Glc) for 1 h. Cells were collected, washed twice with 1ml distilled water and suspended in 200 μ l PBS (pH 7.5) buffer containing Roche Protease Inhibitor plus 1mM DTT and 0.1% Triton X100. Glass beads were added to the tubes and cells were broken using a FastPrep (Thermo Electron Co.) apparatus (two pulses of thirty seconds). Then, 200 μ l of the same buffer were added to the suspension. Supernatant was recovered after 30 minutes of centrifugation at 4°C (19,000 g). Supernatant was used as crude protein extract.

2.4. Isolation of mitochondria and nuclei

Cells were grown in 400 ml high-glucose YEPD at 28°C to an OD_{600nm} of 0.8. Then, half of the culture was shifted to low-glucose medium (YEPGly) for 1 h. Mitochondria were obtained as described previously (Daum et al., 1982) from half of the high and low glucose cultures. Nuclei were obtained from the remaining cultures as described previously (Randez-Gil et al., 1998).

2.5. Immunoblot analysis

Cells were grown to an OD_{600nm} of 0.8-1.0 in high-glucose selective medium and shifted

to high- and low-glucose conditions for 1 h. Cells were collected by centrifugation (3,000 g, 4°C, 1 min), and crude extracts were obtained as described above. For Western blot analysis, 20 to 40 µg of protein were separated by electrophoresis in a SDS-12% polyacrylamide gel and transferred to an enhanced chemi-luminescence PVDF membrane (Amersham Biosciences) by electroblotting. PVDF membrane was then incubated with polyclonal anti-GFP (Invitrogen), monoclonal anti-myc and anti-Nop1 (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz., CA) or anti-G6PD (Sigma) as primary antibodies and then the appropriate secondary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated protein-A was used as secondary reactant. West Pico Chemiluminescent system (Pierce) was used for detection.

2.6. Immunopurification analysis

Two liters of SDGlc ura⁻ and SGly ura⁻ synthetic media were inoculated with an overnight pre-culture of TetR-GFP strain expressing the GFP protein and FMY503 strain expressing Mig2-GFP and Ups1-myc fusion proteins. Cells were grown at 28°C to an OD₆₀₀ = 0.8 and harvested by centrifugation (2,200 g) at 4°C, washed twice with 50 ml of ice-cold PBS, and resuspended in 10 ml Lysis Buffer (PBS containing 1.0 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100 and Complete Protease Inhibitor from Roche). Cells were broken in the presence of glass beads with a planetary mono mill (Pulverisette 6). Then, cell extracts were spun-down twice, first at 2,200 g for 10 min at 4°C to remove gross cell debris and, second, at 14,700 g for 60 min at 4°C to clarify the extracts. Protein concentration in the extracts was determined by Bradford protein assay (Bio-Rad Protein Assay, BioRad). Proteins interacting with GFP alone and GFP-Mig2 were pulled down from cell extracts as follows: 100 µl of protein A-Sepharose CL-4B beads (GE) were equilibrated with distilled water and blocked with Blocking Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM glycine and 1% Tween-20) overnight at 4°C. Then, 5 µl of anti-GFP antibodies (Invitrogen) were added to the protein A-Sepharose and incubated on a

spinning wheel overnight at 4°C. After exhaustive washing with Lysis Buffer, 10 ml of cell extract were added to the beads and incubated on a spinning wheel overnight at 4°C. GFP and Mig2-GFP associated proteins were recovered by spinning down anti-GFP beads at 500 g for 10 min at 4°C. Finally, beads were thoroughly washed four times with ice-cold Lysis Buffer. GFP and Mig2-GFP protein complexes were eluted from the resin by boiling it in the presence of 80 µl Laemmli Buffer.

2.7. Co-immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation experiments were performed using whole cell extracts from different strains or immunopurified proteins. The extracts were incubated with anti-GFP, anti-myc or with anti-Pho4 antibodies for 3 h at 4°C. Protein A-Sepharose beads (Amersham Biosciences) were then added to the samples and incubated with them for 3 h at 4°C in a spinning wheel. After extensive washing with PBS, immuno-precipitated samples were boiled in Laemmli buffer and loaded into a 12% SDS-polyacrilamide gel. The proteins were transferred to an enhanced chemi-luminescence PVDF membrane and immunoblotted as described above using anti-GFP or anti-myc monoclonal primary antibodies.

3. Results

3.1. Nuclear-mitochondrial distribution of Mig2 is regulated by nutritional and oxidative stress

Previous analysis indicated that in high and low glucose conditions Mig2 exclusively localizes in the nucleus (Lutfiyya et al., 1998). However, since these studies were done using a plasmid containing a truncated *MIG2* ORF (encoding from amino acid 81 to amino acid 381) fused to GFP (Lutfiyya et al., 1998), we analysed the subcellular localization of the full-length Mig2-GFP fusion protein. To prevent non-physiological Mig2-GFP binding to cellular structures due to protein overexpression, we modified the endogenous *MIG2* locus by homologous recombination in

such a way that a Mig2 variant harboring C-terminal GFP fusion was expressed under the control of the native *MIG2* promoter. In high glucose conditions, nuclear accumulation of Mig2 was observed, although cytoplasmic background fluorescence was also detected (Fig. 1a). However, after a 5 min shift to low glucose-glycerol medium, strong green fluorescence of the characteristic branched tubular mitochondrial network was observed (Fig. 1b). RFP fused to the presequence of subunit 9 of the mitochondrial F_0 -ATPase protein was used as a mitochondrial marker and as seen in Fig. 1b, Mig2-GFP largely colocalizes with Su9-RFP protein. Thus, under nutritional stress, Mig2 is essentially a mitochondria associated protein (Fig. 1c). Moreover, the Mig2 translocation from the nucleus to the mitochondria is reversible, because Mig2 localize back to the nucleus after a shift from low to high glucose conditions (data not shown).

We also examined the effect of 5 mM H_2O_2 and 0.4 M NaCl on Mig2-GFP subcellular distribution. As shown in Fig. 1a and c, when cells grown in high glucose were challenged for 5 min. with 5mM H_2O_2 , 98% of Mig2 accumulated in the mitochondria and only 2% remained in the nucleus. This reveals an oxidative stress-dependent Mig2-GFP translocation from the nucleus to the mitochondria. In contrast, upon a 5 min. treatment with NaCl, 72% of the protein remained nuclear and 28% moved to the mitochondria. H_2O_2 and NaCl levels were chosen as to allow 100% cellular survival. Yeasts challenged with H_2O_2 and NaCl concentrations allowing only 50% of cellular survival showed the same Mig2-GFP localization pattern. In low glucose conditions, when cells were challenged for 5 min with 5mM H_2O_2 or 0.4M NaCl the mitochondrial associated fluorescence characteristic of Mig2-GFP under nutritional stress was observed (Fig. 1b and 1c).

To obtain a second line of evidence for Mig2 subcellular distribution under high and low-glucose conditions we performed a cell fractionation protocol (Fig. 2). A strain

expressing C-terminally tagged Ups1-myc and Mig2-GFP proteins at their native loci and under control of their respective promoters was grown in high and low-glucose. Cells were fractionated into cytosolic, mitochondrial and nuclear compartments and analysed by Western Blot. The efficiency of the fractionation was judged by the partitioning of G6PD, Ups1-myc and Nop1 proteins, which are cytoplasmic, mitochondrial and nuclear respectively. Under high glucose conditions Mig2-GFP was found mainly in the purified nuclear fraction but a minor amount of Mig2-GFP was found in the mitochondria (Fig. 2, lanes 3 and 4). Under low glucose conditions Mig2-GFP is largely excluded from nucleus and was found solely in the purified mitochondria fraction (Fig. 2, lane 7 and 8).

Together, these results show that Mig2 is able to interact with mitochondria. Interaction levels, assessed by fluorescence microscopy and mitochondria purification experiments suggest that Mig2 mitochondrial binding is rather specific in low-glucose conditions. Mig2-GFP relocates from the nucleus to the mitochondria in response to glucose starvation and oxidative stress. Moreover, Mig2 transport between nucleus and mitochondria is a fairly quick process, such that its subcellular localization can change rapidly in response to a shift from high to low-glucose conditions.

3.2. Mig2 protein is associated with Ups1 mitochondrial fusion factor in low glucose conditions

The genetic interaction network from high throughput data for a given factor provides clues to understand its role in the cellular context. To further uncover the molecular function of Mig2, we mined BIOGRID (<http://www.thebiogrid.org/>) and DRYGIN (<http://drygin.cbr.utoronto.ca/>) databases, searching for the complete interaction map of Mig2. We found 10 genetic interactions with a number of factors involved in different biochemical processes (Fig. 3). Seven of them were classified in metabolism/mitochondria category. One of these was Ups1, a protein of the mitochondrial intermembrane space that

associates at the periphery of the inner membrane with Mgm1 protein and is involved in its processing (Sesaki et al., 2006). Ups1 is also involved in the regulation of cardiolipin levels, integrity of mitochondrial membrane complexes and mitochondrial morphology (Sesaki et al., 2006; Tamura et al., 2009). The Ups1 protein is orthologous to human PRELI (Protein of Relevant Evolutionary and Lymphoid Interest) (Sesaki et al., 2006).

Since our fluorescence microscopy results suggest that Mig2 could be transiently associated with mitochondria, a tentative idea is that Mig2 interacts with the Ups1 protein in nutritional or oxidative stress to regulate mitochondrial morphology. To test this, we immunoprecipitated Mig2-GFP using anti GFP antibodies conjugated to sepharose beads. Cells expressing GFP or Mig2-GFP were grown in high and low-glucose conditions. Then, whole-cell extracts from these cells were incubated with the affinity resin. After exhaustive high-salt washes, bound proteins were eluted and analysed by Western blot (Fig. 4a). Interestingly, our results show that only a small amount of Ups1 is associated with Mig2 in high glucose. In contrast, a strong interaction is detected in low glucose.

Further evidence for Mig2-Ups1 interaction came from reciprocal immunoprecipitation assays performed with antibodies against the myc-tag of the Ups1-myc protein and subsequent detection of co-immunoprecipitated Mig2 via the GFP-tag. As shown in Fig. 4b (lanes 2 and 3), a strong and specific Mig2 signal was observed in no glucose (Glc <0.05 %) or low (0.05% Glucose + 3% Glycerol) conditions. Again, the signal was very weak or not present when doing the experiment with cells grown in high-glucose (Figure 4b, lane 1), although equal amounts of Ups1-myc protein were pulled-down in the two conditions. No signal was observed when using anti-Pho4 or no antibodies as a negative control. Interestingly, a weak Mig2-GFP signal was detected in immunoprecipitated samples from cells grown in high glucose after a 5 min shift to high glucose plus oxidative stress inducers H₂O₂ (5mM), t-BOOH

(0.1mM) or osmotic stress inducer NaCl (0.4M) (Figure 4b, lanes 4-6). This result suggests that the interaction between Mig2 and Ups1 is induced by nutritional stress but not by oxidative or osmotic stress.

Collectively, our findings show that Mig2 and Ups1 interact physically, and strongly suggest that this interaction could account for Mig2 mitochondrial localization in low glucose conditions.

3.3. Mitochondrial localization of Mig2 is Ups1-dependent.

To further understand the importance of Ups1 and Mig2 interaction we performed subcellular fractionation experiments in the presence or absence of the Ups1 protein. As shown in Fig.2, Mig2 is found associated with mitochondria preferentially in low glucose conditions whereas Ups1 is always bound to the organelle. As seen in Fig. 5a, the association of Mig2 with mitochondria in low glucose is strongly reduced in absence of Ups1 protein. These results support the notion that Mig2 mitochondrial accumulation is dependent to a large extent on Ups1.

To characterize the role of Ups1 in Mig2 mitochondrial association, we analysed Mig2 nucleocytoplasmic distribution in a $\Delta ups1$ null mutant strain. Wild type and $\Delta ups1$ cells expressing Mig2-GFP were grown until early logarithmic phase in high-glucose. Then, cells were shifted to low glucose-glycerol medium for 5 min and analysed by fluorescence microscopy. As shown in Fig. 5b, in high glucose conditions Mig2 nuclear accumulation was observed both in the wild type and $\Delta ups1$ null mutant strains. However, after a 5 min shift to low glucose-glycerol medium Mig2 from wild-type cells mostly localized in the mitochondrial network (Fig. 1 and Fig. 5b). Surprisingly, after a 5 min shift to low-glucose conditions, Mig2 nuclear localization was detected in 79% of $\Delta ups1$ mutant cells (Figure 5b and c). Thus, Mig2 distribution in $\Delta ups1$ cells points to a role for Ups1 as one of the most important mitochondrial targeting proteins for Mig2.

3.4. *Mig2 and mitochondrial fission machinery regulate mitochondrial morphology in an antagonistic manner*

Together, Mig2-Ups1 interaction and Mig2 mitochondrial localization results prompted us to investigate the influence of Mig2 in mitochondrial morphology during diauxic growth.

To investigate the role of Mig2 in mitochondrial morphogenesis, we analysed mitochondrial morphology in $\Delta mig2$ mutant cells and compared it with the characteristic mitochondrial phenotype in wild-type cells. Wild type and $\Delta mig2$ cells expressing Su9-RFP from a centromeric plasmid were grown until early logarithmic phase in high glucose. Then, cells were shifted to a low glucose-glycerol medium for 60 min and analysed by fluorescence microscopy. In high glucose, wild-type mitochondrial networks are relatively simple with rather few tubules and branches. In low glucose conditions, mitochondrial morphology is more complex and branched (Egner et al., 2002). As can be seen in Fig 6a, $\Delta mig2$ null-mutant cells grown in high-glucose conditions contain wild-type like mitochondria. However, the $\Delta mig2$ mutant strain displayed a strikingly altered mitochondrial morphology in low glucose conditions, including fragments and shorter tubules. Quantification of mitochondrial morphology in cells grown in low-glucose showed that only 2% of $\Delta mig2$ cells contained normal tubular mitochondria, unlike wild-type cells (98%), whereas a mitochondrial fragmented morphology was detected in 83% of cells.

This altered morphology is similar to the phenotype observed in $\Delta fzo1$ and $\Delta ups1$ mutants, involved in outer and inner mitochondrial membrane fusion, respectively (Meeusen et al., 2004; Sesaki et al., 2006; Tamura et al., 2009). The highly fragmented mitochondrial morphology is thought to be caused by on-going mitochondrial fission that is unopposed by fusion events. Thus, fragmentation in fusion-defective mutants for the mitochondrial network can be rescued by deletion of genes encoding essential

mitochondrial fission components (Sesaki and Jensen, 1999). To test whether *MIG2* gene deletion blocks mitochondrial tubular network formation in cells lacking the Dnm1 fission factor, we generated a $\Delta dnm1\Delta mig2$ double mutant. Indeed, mitochondria formed extended and highly interconnected nets in $\Delta dnm1$ mutant cells, but had wild type-like tubular morphology in the $\Delta dnm1\Delta mig2$ double mutant (Figure 6b). This suggests that the highly interconnected mitochondrial phenotype of fission-defective mutants can be partially rescued by deletion of the *MIG2* gene. Thus, Mig2 protein could play an essential role as a mitochondrial fusion component antagonizing Dnm1. In contrast, since mitochondrial fragmentation is the predominant phenotype in the $\Delta fzo1$ fusion mutant, and identical mitochondrial phenotype is observed in a $\Delta fzo1\Delta mig2$ double mutant (Figure 6b), we suggest that $\Delta fzo1$ mutation is epistatic to $\Delta mig2$. Moreover, the mitochondrial fragmentation observed in the $\Delta ups1$ fusion mutant in high-glucose, was not rescued in the $\Delta mig2\Delta ups1$ double mutant. Furthermore, the mitochondrial fragmentation observed in $\Delta mig2$ cells growing in low-glucose was indiscernible from the mitochondrial phenotype detected in $\Delta mig2\Delta ups1$ cells. These results suggest that Mig2 could be involved in a crossed talk between the nucleus and the mitochondria through Ups1 to regulate mitochondrial morphology in a glucose dependent manner.

4. Discussion

Several lines of evidence suggest that Mig2 protein subcellular localization is regulated by nutritional and oxidative stress. In response to high glucose conditions, Mig2 is imported into the nucleus. There, it is a transcriptional repressor and cooperates with Mig1 to repress *SUC2* expression (Lutfiyya et al., 1998). However, in low glucose or oxidative stress conditions, Mig2 accumulates in the mitochondrial network. In this work we describe a new function for this protein; our results establish that Mig2 is a novel mitochondrial factor, important for fusion-competent mitochondria maintenance in low-

glucose conditions. Similar to other mitochondrial fusion mutants (Fritz et al., 2003; Hermann et al., 1998; Sesaki et al., 2006; Wong et al., 2000), $\Delta mig2$ cells display fragmented mitochondria, and mitochondrial fusion is blocked. Our results indicate that Mig2 is a regulatory factor for the mitochondrial fusion machinery, because mitochondrial fusion is restored in $\Delta dnm1 \Delta mig2$ mutant cells and *MIG2* gene deletion in a $\Delta fzo1$ or $\Delta ups1$ mutant does not restore mitochondrial morphology defects. The fact that the mitochondrial fragmented phenotype of the $\Delta mig2$ mutant can be completely rescued by deletion of *DNM1* gene implies that regulation of mitochondrial fusion is the main function of Mig2 in low-glucose conditions.

Several proteins involved in mitochondrial dynamics have been already characterized. However, it is likely that additional proteins involved in mitochondrial distribution, fusion or fission will be identified in the future. It is also known that defects in some genes encoding mitochondrial fusion proteins cause human diseases, like the autosomal dominant optic atrophy or the Charcot-Marie-Tooth disease type 2A (Rintoul and Reynolds, 2010). Mitochondrial fusion activity is closely linked to mitochondrial function (Zorzano et al., 2010) however, the molecular mechanisms regulating the activity of the mitochondrial fusion machinery remain largely unknown. Thus, it is crucial to identify new factors involved in this process, as well as characterize its regulatory role in mitochondrial morphology rearrangement.

In this work, we describe a glucose dependent interaction between Mig2 and Ups1. We also show that mitochondrial localization of Mig2 is both glucose and Ups1 dependent. Our results strongly support a role of Mig2 regulating mitochondrial fusion machinery through Ups1 protein in low glucose conditions. One possibility is that Ups1 synthesis or turnover is regulated by Mig2 protein. However, we did not find a significant change in the amount of Ups1 in $\Delta mig2$ mutant cells compared to a wild-type

strain. Anyway, since in the $\Delta ups1$ strain many processes in addition to the mitochondrial morphology are affected, it is possible that Mig2, together with Ups1, also participates on them. Ups1 regulates the alternative topogenesis of Mgm1, a protein that presents two isoforms: the long one, anchored to the inner mitochondrial membrane, and a shorter version located into the intermembrane space (DeVay et al., 2009; Sesaki et al., 2006). Moreover, Ups1 protein is a key factor controlling mitochondrial cardiolipin level (Tamura et al., 2009). Cardiolipin is a mitochondrial inner membrane phospholipid (Li et al., 2007) that stabilizes electron transport chain complexes III, IV and the Tam41-Mmp37 complex, required for TIM23-PAM association (Kutik et al., 2008; Tamura et al., 2009; Zhang et al., 2005). Thus, it could be possible for Mig2 to be involved in the Ups1-dependent regulation of Mgm1 alternative topogenesis or for Mig2 and Ups1, plus other proteins, to link cardiolipin regulation and mitochondrial morphogenesis. Another possibility is that Mig2 could be involved in a crossed talk between the mitochondria and the nucleus, maybe through Ups1, to regulate glucose metabolism in a mitochondrial morphology dependent-manner. In fact, other fusion proteins in higher eukaryotes, like Mfn2, had been described to play this role. Mfn2 loss-of-function or knockdown mice have reduced activity of Krebs cycle and of electron transport chain causing an increase in glucose uptake and glycolysis rate and a drop of glycogen synthesis in order to maintain the energy metabolism of the cell (Bach et al., 2003; Pich et al., 2005).

Since the role of Ups1 and Mfn2 is conserved among eukaryotes (Sesaki et al., 2006), it would be important to directly determine whether Mig2 function is also conserved in humans. It will thus be interesting to explore whether Mig2 is required to Mgm1 processing, to maintain cardiolipin level or to regulate Krebs cycle and electron transport chain activity in future experiments in yeast.

Acknowledgements

We thank B. Petrova for critical comments on the manuscript. We also are grateful to the following people for generously providing yeast strains and plasmids: H. Sesaki for YRJ2012 and YRJ2011 strains and P. Sanz for plasmid pRS316-Su9-RFP. This work was

supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) BFU2007-66063-C02-02 and BFU2010-19628-C02-01 grants to F.M. and Ministerio de Educación (Spain) predoctoral training grant (FPU) to A. F-C.

References

- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacin, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M. and Zorzano, A., 2003. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*, 278(19): 17190-17197.
- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J.M., 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol*, 1(5): 298-304.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14(2): 115-132.
- Cervený, K.L., Studer, S.L., Jensen, R.E. and Sesaki, H., 2007. Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell*, 12(3): 363-375.
- Cohen, M.M., Amiott, E.A., Day, A.R., Leboucher, G.P., Pryce, E.N., Glickman, M.H., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Weissman, A.M., 2011. Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci*, 124(Pt 9): 1403-1410.
- Cho, D.H., Nakamura, T. and Lipton, S.A., 2010. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci*, 67(20): 3435-3447.
- Daum, G., Bohni, P.C. and Schatz, G., 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 257(21): 13028-13033.
- DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H. and Nunnari, J., 2009. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol*, 186(6): 793-803.
- Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S.W., 2002. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3370-3375.
- Fritz, S., Weinbach, N. and Westermann, B., 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*, 14(6): 2303-2313.
- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A.S., 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*, 165(2): 167-173.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J. and Shaw, J.M., 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*, 143(2): 359-373.
- Koh, J.L., Ding, H., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Toufighi, K., Bader, G.D., Myers, C.L., Andrews, B.J. and Boone, C., 2010. DRYGIN: a database of quantitative genetic interaction networks in yeast. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue): D502-507.
- Kutik, S., Rissler, M., Guan, X.L., Guiard, B., Shui, G., Gebert, N., Heacock, P.N., Rehling, P., Dowhan, W., Wenk, M.R., Pfanner, N. and Wiedemann, N., 2008. The translocator maintenance protein Tam41 is required for

- mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *J Cell Biol*, 183(7): 1213-1221.
- Li, G., Chen, S., Thompson, M.N. and Greenberg, M.L., 2007. New insights into the regulation of cardiolipin biosynthesis in yeast: implications for Barth syndrome. *Biochim Biophys Acta*, 1771(3): 432-441.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R., 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10): 953-961.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O. and Johnston, M., 1998. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150(4): 1377-1391.
- Lutfiyya, L.L. and Johnston, M., 1996. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression. *Mol Cell Biol*, 16(9): 4790-4797.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. and Nunnari, J., 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, 305(5691): 1747-1752.
- Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K., 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91(1): 35-45.
- Osman, C., Merkwirth, C. and Langer, T., 2009. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci*, 122(Pt 21): 3823-3830.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. and Shaw, J.M., 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*, 143(2): 333-349.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A., 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet*, 14(11): 1405-1415.
- Randez-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J.A. and Moreno, F., 1998. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 425(3): 475-478.
- Rintoul, G.L. and Reynolds, I.J., 2010. Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury. *Biochim Biophys Acta*, 1802(1): 143-150.
- Scott, I. and Youle, R.J., 2010. Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem*, 47: 85-98.
- Sesaki, H., Dunn, C.D., Iijima, M., Shepard, K.A., Yaffe, M.P., Machamer, C.E. and Jensen, R.E., 2006. Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol*, 173(5): 651-658.
- Sesaki, H. and Jensen, R.E., 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol*, 147(4): 699-706.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P. and Jensen, R.E., 2003. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*, 14(6): 2342-2356.
- Tamura, Y., Endo, T., Iijima, M. and Sesaki, H., 2009. Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J Cell Biol*, 185(6): 1029-1045.
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M. and Sesaki, H., 2009. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol*, 186(6): 805-816.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M. and Rothstein, R., 1989. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58(2): 409-419.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. and Nunnari, J., 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol*, 151(2): 341-352.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W., 2005. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 280(33): 29403-29408.
- Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schafer, A., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A.S., 2009. Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett*, 583(13): 2237-2243.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J. and Palacin, M., 2010. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 21(6): 566-574.

Table1.
Saccharomyces cerevisiae strains used in this study

Name	Relevant genotype	Source/Ref.
W303.1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	(Wallis et al., 1989)
BY4742	<i>MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0</i>	(Brachmann et al., 1998)
FMY501	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 MIG2::GFP</i>	This work
FMY503	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 UPS1-myc-TRP MIG2::GFP</i>	This work
FMY505	<i>MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0 dnm1::kanMX4 mig2::HIS3</i>	This work
FMY506	<i>MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0 fzo1::kanMX4 mig2::HIS3</i>	This work
FMY510	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ups1::kanMX4 MIG2::GFP</i>	This work
FMY512	<i>MATa his3Δ 1 leu2Δ 0 met15Δ 0 ura3Δ 0 mig2::kanMX4 ups1::HIS3</i>	This work
FMY534	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tetOx200::URA3 tetR-GFP::LEU2 UPS1-myc-TRP</i>	This work
TetR-GFP	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 tetOx200::URA3 tetR-GFP::LEU2</i>	(Michaelis et al., 1997)
YRJ2012	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 UPS1-myc-TRP</i>	(Sesaki et al., 2006)
YRJ2011	<i>MATa his3 leu2 lys2 trp1 ura3 ups1::kanMX4</i>	(Sesaki et al., 2006)
Y01489	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dnm1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y03319	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fzo1::kanMX4</i>	Euroscarf
Y14575	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 mig2::kanMX4</i>	Euroscarf

Figure Legends

Fig. 1. Nutritional and oxidative stresses regulate the subcellular localization of Mig2. Yeast strain FMY501 (Mig2-GFP) containing the GFP tagged *MIG2* gene at its chromosomal location and expressing Su9-RFP from plasmid pRS316-Su9-RFP, was grown on high-glucose SD *ura⁻* medium (H-Glucose) until an OD 600nm of 0.8 was reached (a) and then transferred to low glucose synthetic SGly medium (L-Glucose) for 5 min (b). The cells were stained with DAPI and imaged for GFP, RFP and DAPI fluorescence. 5mM H₂O₂ was added to FMY501 cells growing under high-glucose conditions and expressing both Mig2-GFP and Su9-RFP. The cells were incubated for 5 min at 28°C, harvested, stained with DAPI and imaged for GFP, RFP and DAPI fluorescence. 0.4M NaCl was added to FMY501 cells growing under high-glucose conditions. The cells were incubated for 5 min at 28°C, harvested, stained with DAPI and imaged for GFP, RFP and DAPI fluorescence. (c) The localization of Mig2-GFP protein was determined in at least 100 cells per growth condition. Error bars represent standard deviations for three independent experiments. N, denotes a nuclear fluorescence signal and M, mitochondrial fluorescence signal.

Fig. 2. Subcellular localization of Mig2.

Cells (FMY503) expressing both Mig2-GFP and Ups1-myc were grown on high-glucose YEPD medium (H-Glc) until an OD 600nm of 0.8 was reached and then transferred to low glucose YEPGly medium (L-Glc) for 1 h. Protoplasts were obtained from the harvested cells and total cell extract (C. Ext.), cytosolic (Cyt.), mitochondrial (Mit.) and nuclear (Nuc.) fractions were prepared. Similar amounts of protein of each fraction were analysed by Western blot using antibodies against GFP (Mig2-GFP), mitochondrial Ups1-myc, cytosolic G6PD and nuclear Nop1 proteins.

Fig. 3. Network showing Mig2 interactions.

Mig2 genetic interactions network with genes that participate in several processes. Dashed line axes represent positive genetic interactions and solid line axes represent negative genetic interactions. Node symbols correspond to gene ontology annotations as listed in the Data Repository of Yeast Genetic Interactions (DRYGIN) (Koh et al., 2010).

Fig. 4. Mig2 physically interacts with Ups1.

(a) Co-immunoprecipitation of Ups1 with Mig2. The TetR-GFP strain expressing the GFP protein and the FMY503 strain expressing Mig2-GFP and Ups1-myc fusion proteins were grown in high (H-Glc) and low-glucose (L-Glc) media. GFP and Mig2-GFP associated proteins were recovered by spinning down anti-GFP beads and the protein complexes were eluted from the resin by boiling it in the presence of 80 µl Laemmli Buffer. Eluted proteins were analysed by Western blot using anti-myc antibodies. Cell extracts (input), spinning down anti-GFP beads supernatant (last wash) and immunopurified eluates from the resin by boiling it in the presence of Laemmli Buffer (IP eluate). (b) Co-immunoprecipitation of Mig2 with Ups1. The FMY503 (Mig2-GFP Ups1-myc) strain was grown in high-glucose complex medium until an OD600 of 0.8 was reached and then shifted to high- (H-Glc) and low- (L-Glc) glucose conditions for 1 h. The cell extracts were immunoprecipitated with a monoclonal anti-myc antibody (lanes 1–6) or a polyclonal antibody against Pho4 (lanes 7 and 8). Immunoprecipitates were separated on 12% SDS-PAGE gel, and co-immunoprecipitated Mig2-GFP was visualized on a Western blot with a monoclonal

anti-GFP antibody. The level of immunoprecipitated Ups1 protein in the blotted samples was determined by using an anti-myc antibody.

Fig. 5. Mitochondrial association of Mig2 is Ups1-dependent.

(a) FMY501 (Mig2-GFP) and $\Delta ups1$ cells expressing Mig2-GFP (FMY510 strain) were grown on high-glucose YEPD medium (H-Glc) until an OD_{600nm} of 0.8 was reached and then transferred to low glucose YEPGly medium (L-Glc) for 1 h. Protoplasts were obtained from the harvested cells and total cell extract (C. Ext.), cytosol (Cyt.) and mitochondria (Mit.) fractions were prepared. Identical amounts of protein of each fraction were analysed by Western blot using antibodies against the GFP protein. (b) Yeast strains FMY501 (Mig2-GFP) and FMY510 ($\Delta ups1$ Mig2-GFP) with a complete deletion of the *UPS1* gene and containing the GFP tagged *MIG2* gene at its chromosomal location, were grown on high-glucose complex medium (H-Glc) until an OD_{600nm} of 0.8 was reached and then transferred to low glucose complex medium (L-Glc) for 5 min. The cells were stained with DAPI and imaged for GFP and DAPI fluorescence. (c) The localization of Mig2-GFP protein was determined in at least 100 cells per growth condition. Error bars represent standard deviations for three independent experiments. N, denotes a nuclear fluorescence signal and M, mitochondrial fluorescence signal.

Fig. 6. Mig2 is a fusion protein required for normal mitochondrial morphology.

(a) Wild type (BY4742) and $\Delta mig2$ (Y14575) strains transformed with the centromeric plasmid pRS316-Su9-RFP were grown on high-glucose SD *ura*⁻ medium (H-Glc) until an OD_{600nm} of 0.8 was reached and then transferred to low glucose synthetic SGly medium (L-Glc) for 5 min. The cells were stained with DAPI and imaged for RFP and DAPI fluorescence. The upper panel images contain representative cells. In the lower panel quantification of mitochondrial phenotypes are shown. Error bars represent standard deviations for three independent experiments with 100 cells per strain and growth conditions. (b) Yeast cells transformed with the centromeric plasmid pRS316-Su9-RFP were grown on low glucose synthetic SGly medium (L-Glc) until an OD_{600nm} of 1.0 was reached. The cells were stained with DAPI and imaged for RFP and DAPI fluorescence. In the upper panel images containing representative cells are shown. In the lower panel quantification of mitochondrial phenotypes are shown. Error bars represent standard deviations for three independent experiments with 100 cells per strain.

FIGURE 1
(Fernández-Cid et al.)

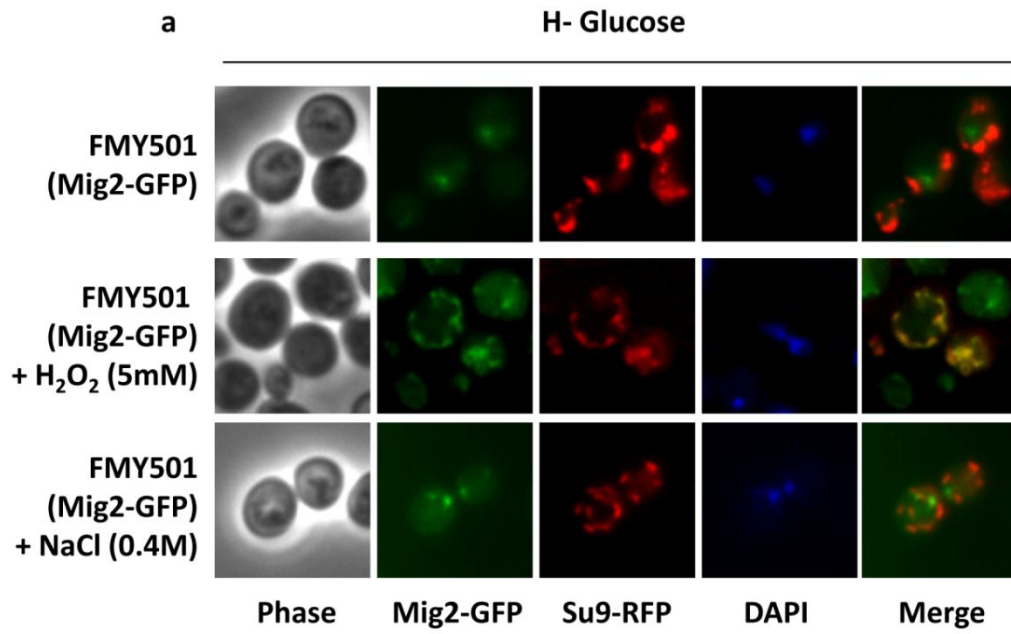


FIGURE 1
(Fernández-Cid et al.)

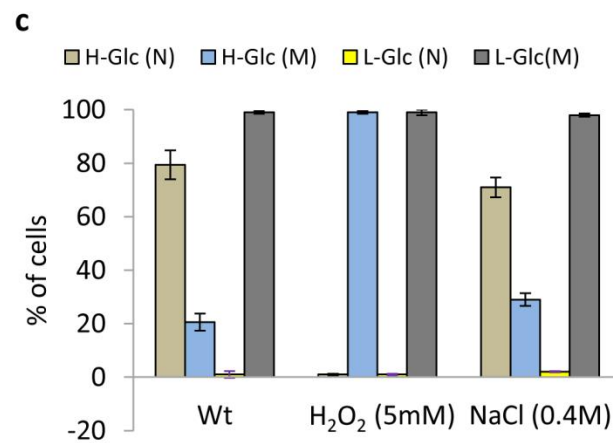
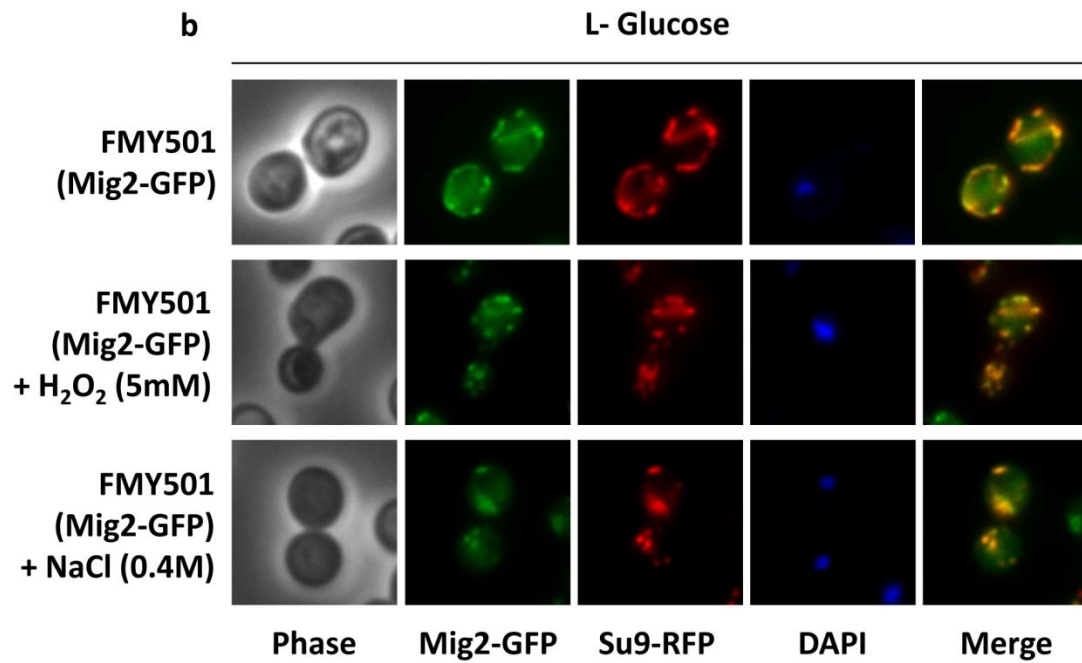


FIGURE 2

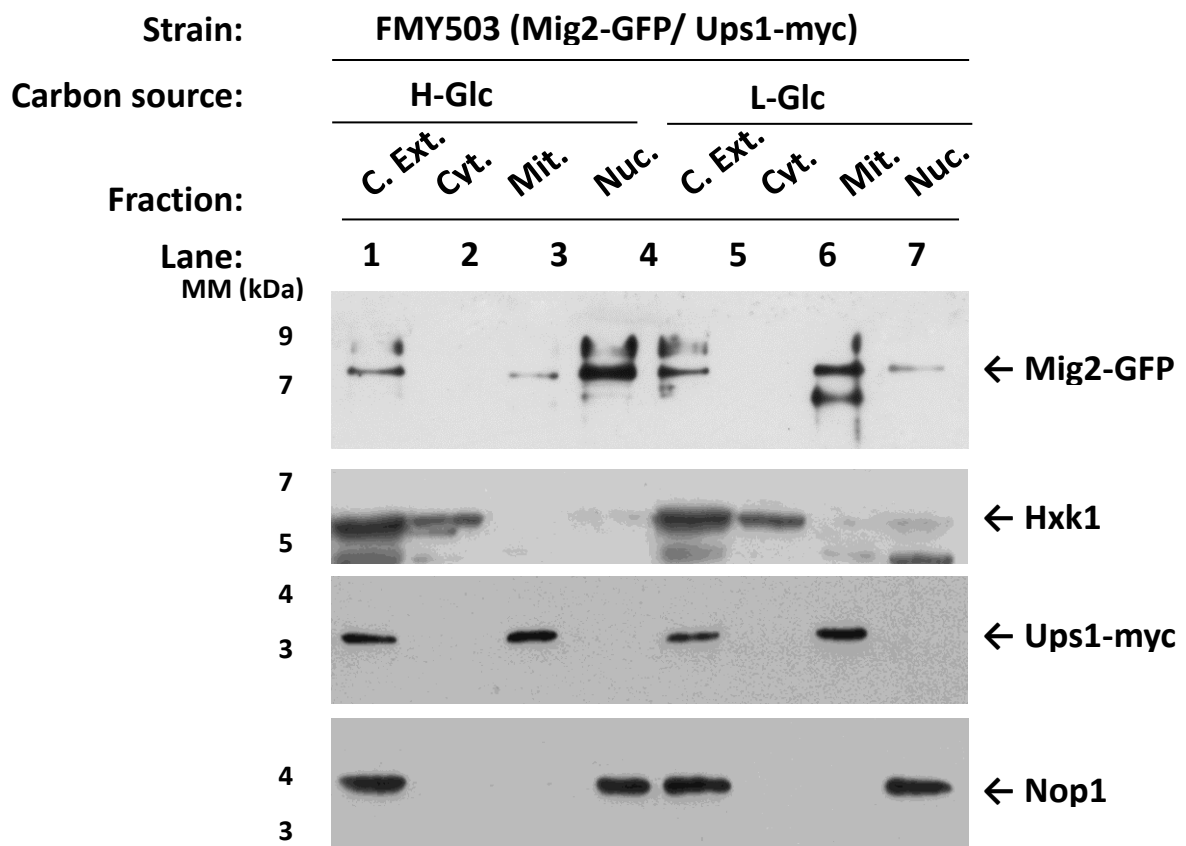
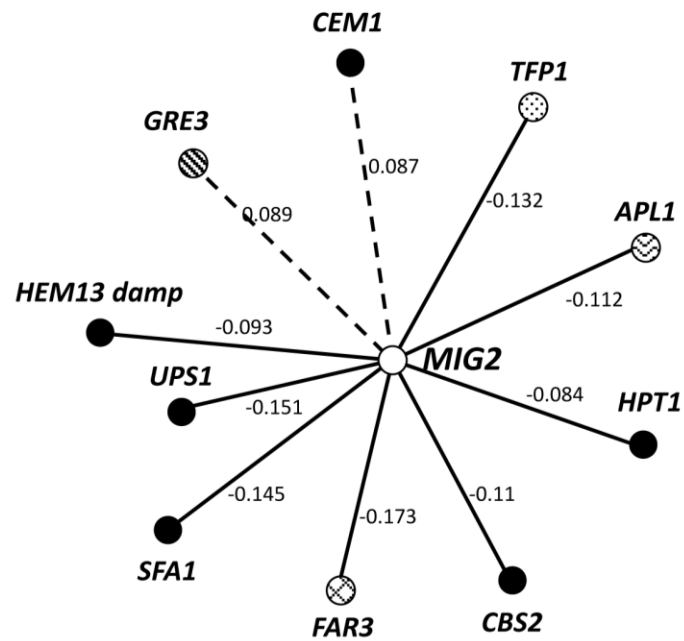
Fernández-Cid *et al.*

FIGURE 3

Fernández-Cid et al.



Legend

- (metabolism/mitochondria)
- ⊕ (metabolism/mitochondria)
(ribosome/translation)
- ⊗ (cell polarity/morphogenesis)
- ⊙ (Golgi/endosome/vacuole/sorting)
- (chromatin/transcription)
(metabolism/mitochondria)
- ▨ (signaling/stress response)
- ⊗ (metabolism/mitochondria)
(lipid/sterol/fatty acid biosynth.)
- ⊗ (lipid/sterol/fatty acid biosynth.)
- ⊞ (undefined)

FIGURE 4

Fernández-Cid et al.

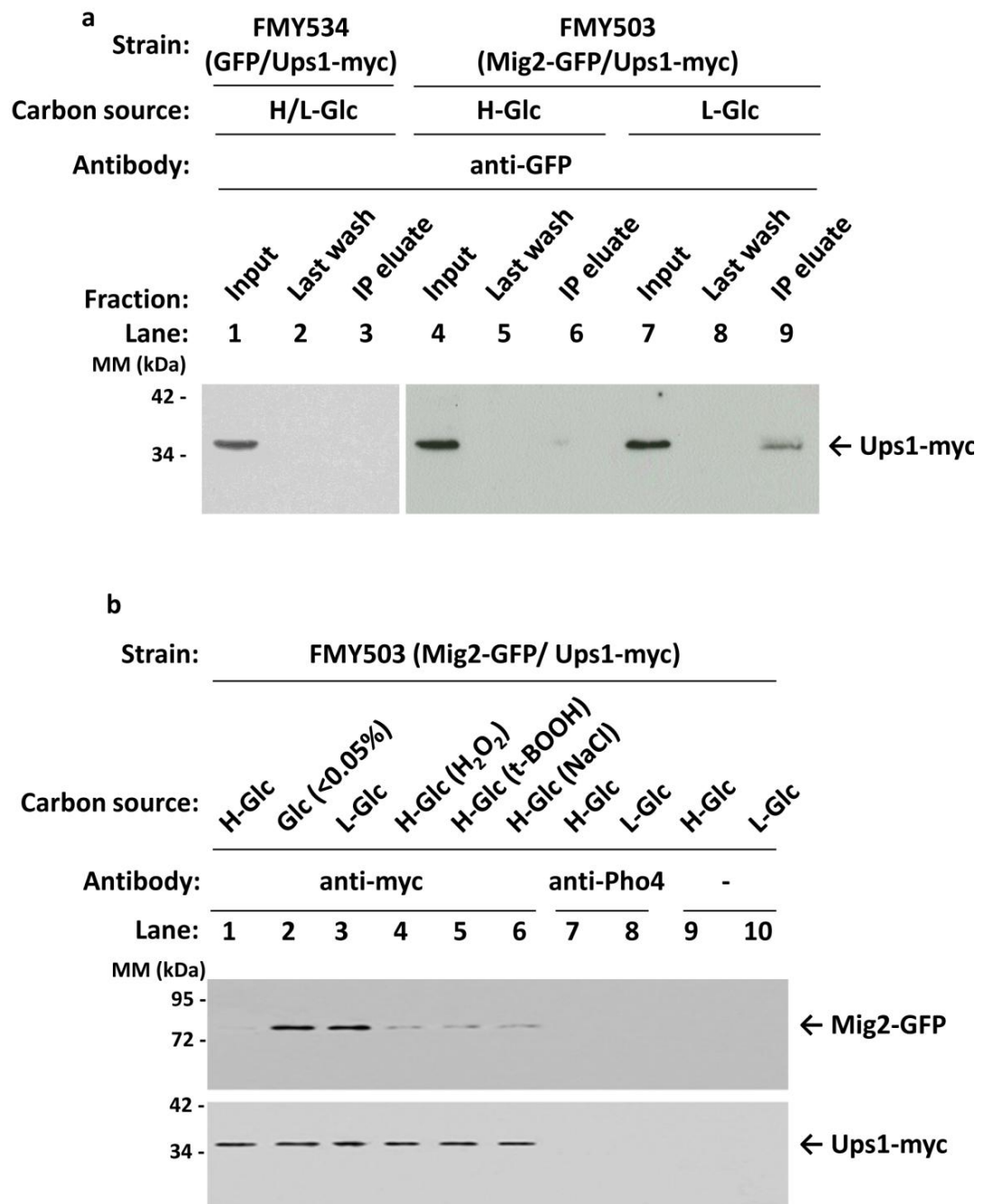


FIGURE 5
Fernández-Cid et al.

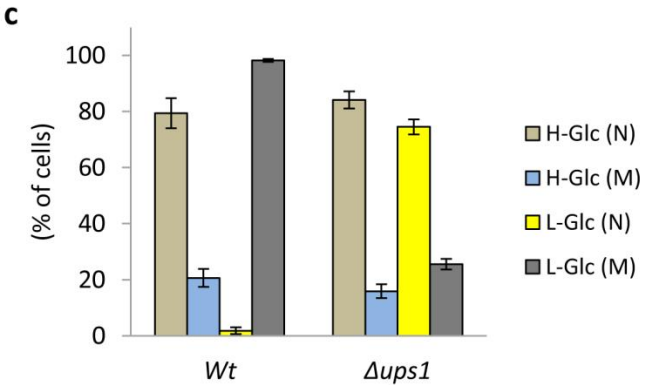
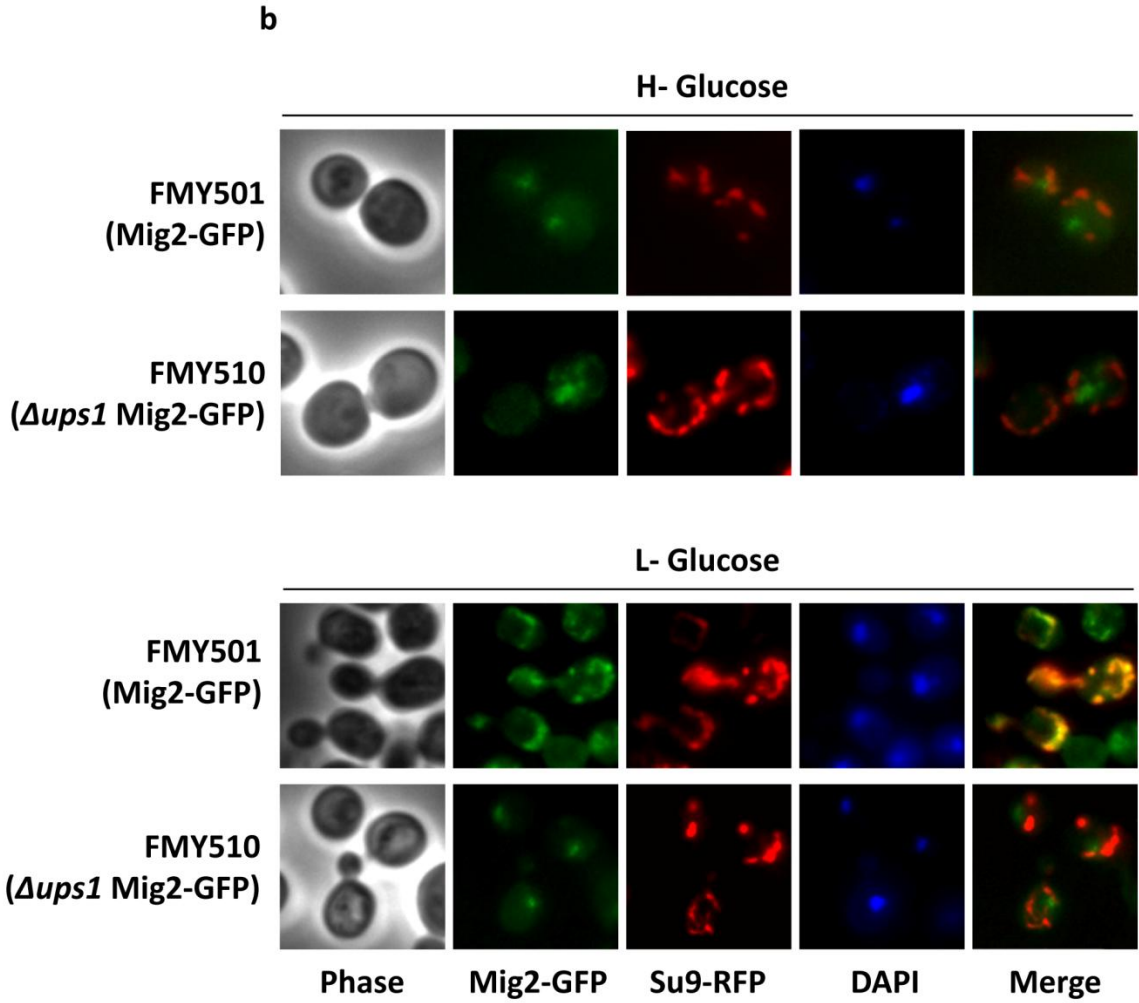


FIGURE 6
Fernández-Cid et al.

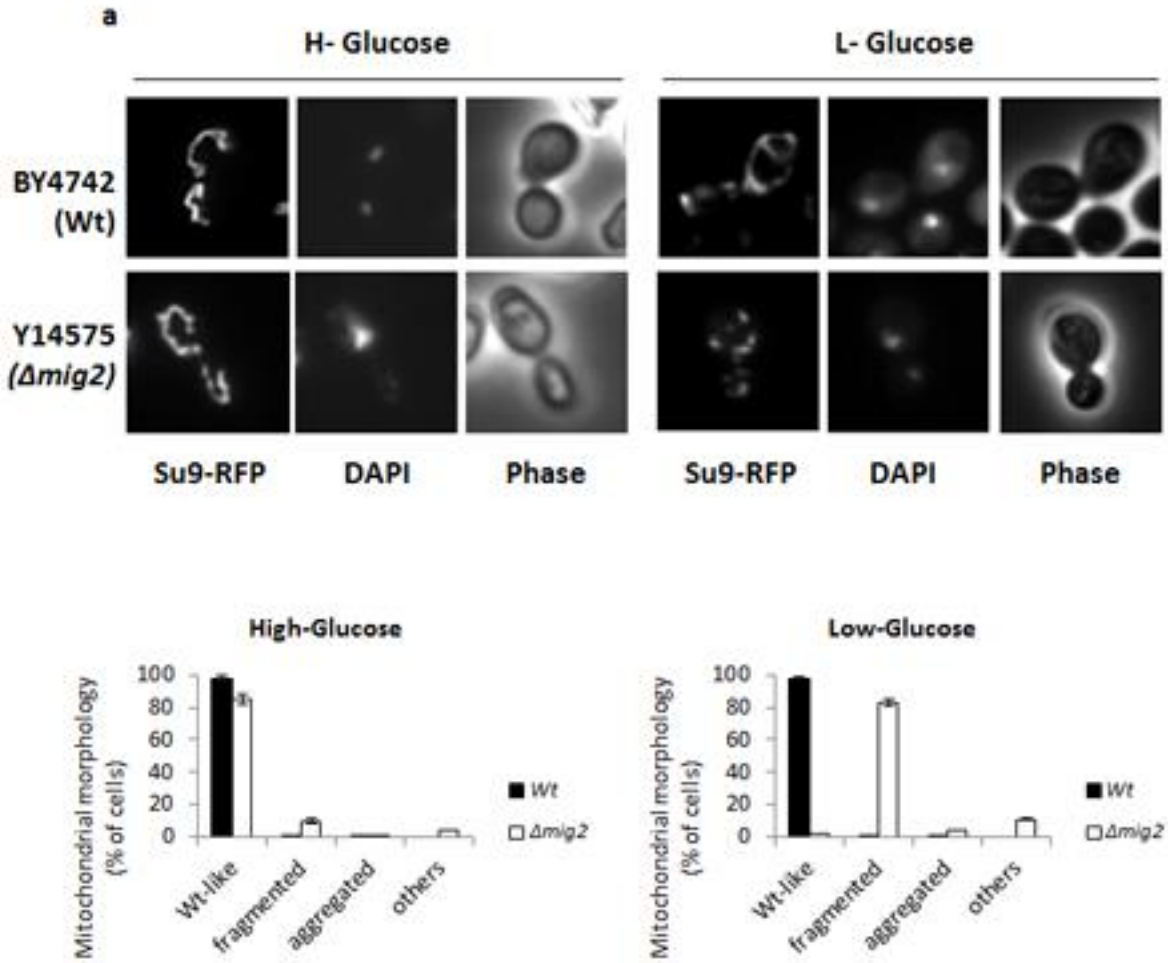
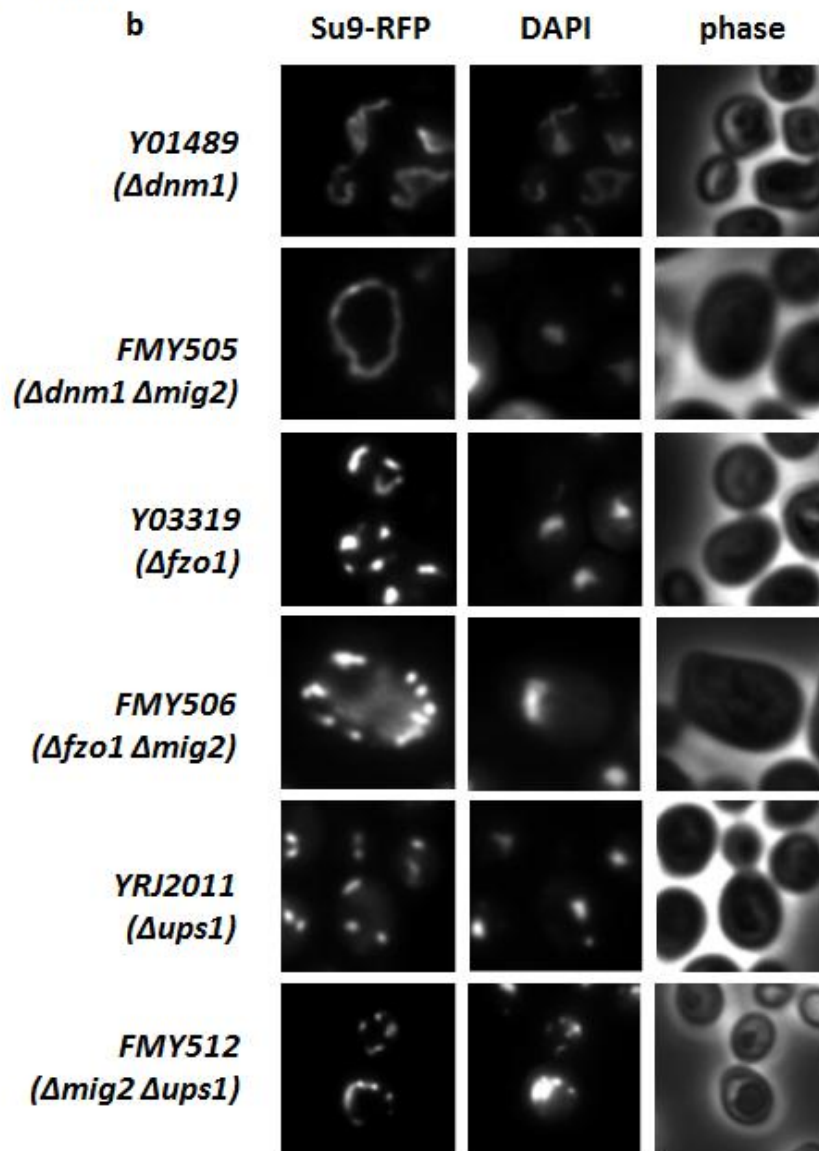


FIGURE 6

Fernández-Cid et al.



Low-Glucose

