

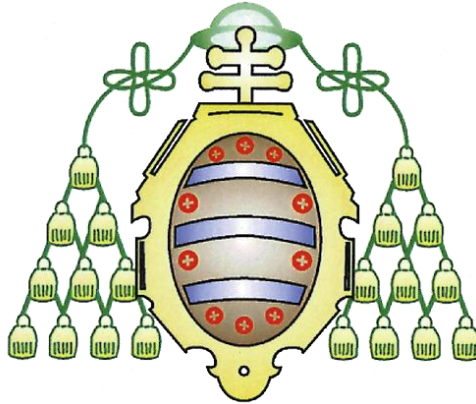
**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**La proteína hexoquinasa 2 controla la expresión génica en  
*Saccharomyces cerevisiae* por interacción proteína-proteína con el  
factor mediador Med8**

**TESIS DOCTORAL**

**Tamara de la Cera Martínez**



## **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**La proteína hexoquinasa 2 controla la expresión génica en  
*Saccharomyces cerevisiae* por interacción proteína-proteína con el  
factor mediador Med8**

**MEMORIA QUE PRESENTA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
BIOQUÍMICA**

**Tamara de la Cera Martínez**

**D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> PAZ SUÁREZ RENDUELES**, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO.

AUTORIZA la presentación a la Comisión de Doctorado de la Tesis:

**“La proteína hexoquinasa 2 controla la expresión génica en *Saccharomyces cerevisiae* por interacción proteína-proteína con el factor mediador Med8”**, realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por D<sup>a</sup> Tamara de la Cera Martínez y dirigida por la Dra. D<sup>a</sup> Pilar Herrero Espílez y el Dr. D Fernando Moreno Sanz.

Fdo: M<sup>a</sup> Paz Suárez Rendueles  
Oviedo, a 20 de Mayo de 2002

**A mis padres**

**“La clave de cualquier problema biológico  
tiene que buscarse finalmente en la célula”**

**E. B. Wilson**

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años no sólo he adquirido experiencia y conocimientos sino que también he contado con el apoyo y la ayuda inestimables de muchas personas, que han contribuido a que este trabajo evolucionase transformándose en una realidad. A todos ellas quisiera expresarles mi agradecimiento:

A los Dres. D<sup>a</sup> Pilar Herrero Espílez y D. Fernando Moreno Sanz, co-directores ambos de esta Tesis por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, así como por el apoyo, dedicación y formación que me han transmitido.

A la Dra. D<sup>a</sup> Rosaura Rodicio Rodicio, por sus sugerencias y útiles consejos brindados siempre que los he necesitado.

A la Dra. M<sup>a</sup> Paz Suárez Rendueles, por permitir mi incorporación al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y por su disponibilidad en todo momento.

A mis actuales compañeros de laboratorio, Alberto, Aarón, Inma y Marta, por la paciencia y comprensión que han tenido siempre conmigo. En especial a Alberto por su contribución en la configuración de la portada.

A Eva, M<sup>a</sup> Luz, Begoña, Oscar y Romina, por prestarme su ayuda tanto material como personal y por los buenos ratos compartidos.

A Arantxa, simplemente por ser una AMIGA, por su apoyo incondicional a lo largo de todos los momentos compartidos.

A todos mis compañeros de Bioquímica y a todos los que directa o indirectamente me ayudaron.

A Miguel por ser una persona especial, por su comprensión, paciencia y cariño y por estar siempre ahí apoyándome en mis decisiones.

A mi familia, sobre todo a mis padres, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí, alegrándose en mis buenos momentos y preocupándose por mí en los malos.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de una beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad de Oviedo.

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Regulación de la utilización de la glucosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.1. Vías de señalización	1
1.2. Mecanismo de represión por glucosa	5
1.2.1. La proteína Mig1 y otros represores	6
1.2.2. El co-represor Ssn6(Cyc8)-Tup1	9
1.2.3. ¿Cómo la glucosa regula a la proteína-quinasa Snf1?	15
1.2.4. La señal de represión por glucosa	19
1.2.5. Regulación de los activadores transcripcionales de genes reprimidos por glucosa	21
1.2.6. Elementos que juegan un papel indirecto	23
1.2.7. Otros mecanismos de señalización	25
1.3. El mecanismo de inducción por glucosa	27
1.3.1. Regulación de los transportadores de glucosa	28
1.3.2. La señal de inducción por glucosa	31
2. La proteína Hxk2 y la señalización por glucosa	34
2.1. El sistema fosforilador de la glucosa en <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2. Hxk2 puede entrar al núcleo	37
2.3. Hxk2 es un enzima central en la señalización por glucosa	40
3. La represión por glucosa del gen <i>SUC2</i>	42
4. Elementos reguladores implicados en la expresión de los genes <i>HXK2</i> , <i>GLK1</i> y <i>HXK1</i>	45
4.1. La expresión del gen <i>HXK2</i>	45
4.2. La expresión del gen <i>GLK1</i>	46
4.3. La expresión del gen <i>HXK1</i>	50
5. Un enzima fosforilador de glucosa también involucrado en señalización por glucosa en otras células	51

6. Objetivos	52
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
1. Microorganismos utilizados	55
1.1. Levaduras	55
1.2. Bacterias	56
2. Medios y condiciones de cultivo	57
2.1. Levaduras	57
2.2. Bacterias	58
3. Vectores de clonación	59
4. Genoteca	62
5. Técnicas de manipulación del ADN	62
5.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	62
5.2. Aislamiento de ADN plasmídico de levaduras	62
5.3. Aislamiento de ADN cromosómico de levaduras	63
5.4. Análisis de restricción del ADN	63
5.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	63
5.6. Construcción de plásmidos	63
5.6.1. Construcción de plásmidos conteniendo diferentes alelos del gen <i>HXK2</i> y fusiones del gen <i>lacZ</i>	64
5.7. Transformación de bacterias	66
5.8. Transformación de levaduras	66
5.9. Preparación de sondas de ADN radiactivas	67
5.10. Hibridación ADN-ADN. Análisis Southern	67
5.11. Secuencia de los oligodesoxinucleótidos utilizados	68
5.12. Fosforilación y anillado de oligodesoxinucleótidos	69
5.13. Relleno de los extremos cohesivos con ( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)dCTP	69



---

5.14. Relleno de los extremos cohesivos con 14-dATP-Biotina	70
5.15. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	70
5.16. Secuenciación	71
6. Técnicas de manipulación del ARN	71
6.1. Aislamiento de ARN total de levaduras	71
6.2. Separación de moléculas de ARN en geles de agarosa- formaldehído	71
6.3. Hibridación ARN-ADN. Análisis Northern	72
7. Métodos bioquímicos	72
7.1. Obtención de extractos proteicos libres de células	72
7.2. Determinación de proteínas	73
7.3. Secuenciación de proteínas: Identificación mediante <i>fingerprinting</i> y fragmentación PSD	73
7.4. Determinación de la actividad fosforiladora de hexosas	74
7.4.1. Actividad fosforiladora de la glucosa	74
7.4.2. Actividad fosforiladora de la fructosa	74
7.5. Determinación de la actividad invertasa	74
7.6. Determinación de actividades $\beta$ -galactosidasa	75
7.6.1. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa en colonias de levadura transformadas con vectores de expresión	75
7.6.2. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa	75
7.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	76
7.8. Purificación de proteínas unidas a GST en columnas de glutathion-sepharosa	77
7.9. Purificación de proteínas etiquetadas con histidinas en columnas de níquel	78

8. Métodos inmunológicos	79
8.1. Transferencia electroforética de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa	79
8.2. Inmunodetección de antígenos: Western-Blot	80
9. Métodos de estudio de las interacciones ADN-proteína	80
9.1. Ensayos de retardo en gel	80
9.1.1. Preparación de extractos citosólicos	80
9.1.2. Preparación de extractos nucleares	81
9.1.3. Marcaje de los fragmentos de ADN	82
9.1.4. Reacción de unión ADN-proteína	83
9.2. Análisis Southwestern	83
9.3. Análisis “UV-Crosslinking”	84
9.4. Purificación de proteínas que se unen al ADN utilizando sistemas de afinidad Biotina/Streptavidina	85
10. Análisis de las interacciones proteína-proteína	86
10.1. Sistema del doble-híbrido	86
10.2. Coprecipitación o <i>pull-down</i> como fusiones con GST	89
10.3. Inmunoprecipitación	90
<b>III. RESULTADOS</b>	93
1. La expresión de los genes del sistema de fosforilación de la glucosa está controlada por la proteína Hxk2 nuclear	94
1.1. Expresión de los genes <i>HXK1</i> y <i>GLK1</i> en presencia y ausencia de la proteína Hxk2	95
1.2. Regulación de la expresión de los genes <i>GLK1</i> , <i>HXK1</i> y <i>HXK2</i> a través de la proteína Hxk2	99
2. Numerosos genes regulados por glucosa contienen en sus promotores un motivo heptamérico común	102

---

2.1.	Análisis de la interacción ADN-proteína entre el motivo común heptamérico o sitio MED8 presente en los genes regulados por glucosa y la proteína Med8	104
2.2.	Influencia de la proteína Hxk2 en las interacciones ADN-proteína a través del sitio MED8	108
3.	Identificación de proteínas que se unen directamente a la secuencia MED8 <sub>GLK1</sub> del promotor <i>GLK1</i>	110
3.1.	Estudio de las interacciones ADN-proteína entre MED8 <sub>GLK1</sub> y extractos proteicos de células crecidas en condiciones de represión y desrepresión	112
3.2.	Análisis Southwestern	114
3.3.	Análisis “UV-Crosslinking” de proteínas al oligonucleótido MED8 <sub>GLK1</sub>	116
4.	Purificación de proteínas que se unen al sitio MED8 <sub>GLK1</sub> utilizando sistemas de cromatografía de afinidad Biotina-Streptavidina	119
4.1.	Análisis de la interacción ADN-proteína entre MED8 <sub>GLK1</sub> y la proteína p55 purificada a partir del elemento MED8 del gen <i>GLK1</i>	122
4.2.	Identificación del gen que codifica la proteína p55	124
4.3.	Expresión del gen <i>TEF1</i> en <i>E. coli</i>	126
4.4.	Análisis de la interacción ADN-proteína de Tef1 con MED8 <sub>GLK1</sub>	130
5.	Obtención de mutantes afectados en la represión del gen <i>GLK1</i> a través del sitio MED8	133
5.1.	Selección de mutantes afectados en la actividad represora del elemento MED8 del gen <i>GLK1</i>	135
5.2.	Selección de transformantes con reversión del fenotipo actividad β-galactosidasa	138

5.3. Recuperación y análisis de los plásmidos clonados	140
6. Análisis de las interacciones proteína-proteína entre los diferentes factores que forman parte del sistema de transducción de la señal glucosa dependiente de Hxk2	144
6.1. Análisis de la interacción Hxk2-Med8 mediante doble-híbrido	146
6.2. Identificación de los dominios de Med8 y Hxk2 involucrados en la interacción	149
6.3. Análisis de la interacción Hxk2-Med8 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> mediante ensayos de inmunoprecipitación y coprecipitación como fusiones con GST	152
6.4. Colocalización de Hxk2 y Med8 mediante ensayos de retardo en gel	158
6.5. Análisis de la interacción Hxk2-Mig1 mediante doble-híbrido	160
6.6. Análisis de la interacción Hxk2-Mig1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> mediante ensayos de inmunoprecipitación y coprecipitación como fusiones con GST	162
6.7. Colocalización de Hxk2 y Mig1 mediante ensayos de retardo en gel	165
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	169
<b>V. CONCLUSIONES</b>	191
<b>VI. ANEXO</b>	193
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	199

**A:** adenina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de alanina)

**AD:** *Activation Domain* (dominio de activación)

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADP:** adenosina-5'-difosfato

**AFM:** *Atomic Force Microscopy* (microscopía de fuerza atómica)

**AMP:** adenosina-5'-monofosfato

**Amp:** ampicilina

**AMP<sub>c</sub>:** adenosina monofosfato cíclico

**AMPK:** proteína-quinasa activada por AMP

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARN<sub>m</sub>:** ARN mensajero

**ARN<sub>PII</sub>:** ARN polimerasa II

**ARN<sub>r</sub>:** ARN ribosómico

**ARN<sub>t</sub>:** ARN de transferencia

**ATP:** adenosina-5'-trifosfato

**BD:** *Binding Domain* (dominio de unión)

**°C:** grados centígrados

**C:** citosina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de carbono ó cisteína)

**CBS:** Cistationín β-sintasa

**CNB:** Centro Nacional de Biotecnología

**CoA:** Coenzima A

**CSIC:** Centro Superior de Investigaciones Científicas

**CSRE:** *Carbon Source Responsive Element* (elemento de respuesta a fuente de carbono)

**CTD:** dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II

**C-terminal:** carboxilo terminal

**D:** glucosa

**Da:** Daltons

**DAS:** *Downstream Activating Sequence* (secuencia activadora posterior)

**dATP:** desoxiadenosina-5'-trifosfato

**dCTP:** desoxicitosina-5'-trifosfato

**dGTP:** desoxiguanosina-5'-trifosfato

**DM:** doble mutante

**DME:** extracto de cepa doble mutante

**dNTP:** desoxinucleótido trifosfato

**DO:** densidad óptica

## Abreviaturas

---

**DRS:** *Downstream Repressing Sequence* (secuencia represora posterior)

**DTT:** ditioneitol

**dTTP:** desoxitimidina-5'-trifosfato

**E:** etanol (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de glutamato ó eluido)

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EMS:** etilmetanosulfonato

**EMSA:** *Electromobility Shift Assay* (ensayo de alteración de la movilidad electroforética)

**ERA:** *Ethanol Repression Autoregulation*

**EtOH:** Etanol

**G:** guanosina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de glicina)

**GFP:** *Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)

**Glc:** glucosa

**GPCR:** *G-protein-coupled receptor system*

**GSH:** glutation reducido

**GST:** glutation S-transferasa

**GTP:** guanosina-5'-trifosfato

**H:** histidina

**HA:** hemaglutinina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de tipo de filtro de nitrocelulosa)

**HDAC:** deacetilasa

**HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico

**I:** inducida

**IPTG:** isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido

**K:** lisina

**Kan:** kanamicina

**Kb:** kilobases

**kDa:** kilodaltons

**LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani

**Lys:** lisina

**M:** metionina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de marcadores)

**MCS:** *Multiple Cloning Site* (sitio de clonación múltiple)

**MED/Med:** mediador/a

**Met:** metionina

**MOPS:** ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

**NADP<sup>+</sup>:** fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida

**NADPH:** fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida (forma reducida)

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Información Biotecnológica)

**NI:** no inducida

**Ni-NTA:** ácido níquel-nitrilotriacético

**nm:** nanómetros

**N-terminal:** amino terminal

**ONPG:** orto-nitrofenil β-D-galactopiranosido

**ori:** origen de replicación

**cPKA:** proteín-quinasa dependiente de AMP cíclico

**p/v:** peso/volumen

**P:** fósforo (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de prolina)

**PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida

**pb:** pares de bases

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

**PKA:** proteín-quinasa A

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonato

**PP1:** proteín-fosfatasa 1

**PPi:** pirofosfato inorgánico

**PSD:** *Post Source Decay* (decaimiento post-fuente)

**Q:** glutamina

**R:** arginina

**rev/min:** revoluciones por minuto

**rpm:** revoluciones por minuto

**S:** serina

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**Ser:** serina

**SGD:** *Saccharomyces Genome Database* (base de datos del genoma de *Saccharomyces*)

## Abreviaturas

---

**SLN:** señal de localización nuclear

**SSC:** solución de cloruro y citrato sódico

**STRE:** *Stress Responsive Element*

**T:** timina (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de treonina)

**T<sup>a</sup>:** temperatura

**TAB:** TA box (caja TA)

**TBE:** tampón Tris-Borato-EDTA

**TBP:** *TATA binding proteins* (proteínas de unión a la caja TATA)

**TEMED:** N, N, N', N'-tetrametil etilen diamina

**Thr:** treonina

**TPR:** *TetratricoPeptide Repeat*

**Tris:** tris (hidroximetil) aminometano

**Tris-HCl:** hidrocloreuro de Tris

**U:** unidades

**UA:** unidades arbitrarias

**UAS:** *Upstream Activating Sequence* (secuencia activadora anterior)

**Ub:** ubiquitina

**URS:** *Upstream Repressing Sequence* (secuencia represora anterior)

**UV:** ultravioleta

**v/v:** volumen/volumen

**W:** vatios (en ocasiones se ha usado también como abreviatura de *wash* ó lavado)

**WT:** *wild type* (tipo silvestre)

**WTE:** extracto de cepa silvestre (*wild type*)

**X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopiranosido

**Y:** citosina o timina

**YNB:** *Yeast Nitrogen Base* (medio base nitrogenado)



## **1.- REGULACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE LA GLUCOSA EN *Saccharomyces cerevisiae***

### **1.1**

#### **1.1 Vías de señalización**

La glucosa, el monosacárido más abundante en la naturaleza, es también el principal combustible para muchas células. Además de ser el principal nutriente, la glucosa puede actuar como una “hormona de crecimiento” para regular varios aspectos del crecimiento celular, metabolismo y desarrollo. *Saccharomyces cerevisiae* y muchas otras levaduras pueden crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, aunque prefieren la glucosa como fuente de energía. Esta capacidad de crecer en diferentes medios implica el desarrollo de sofisticados mecanismos de regulación para enfrentarse a las fluctuaciones en los niveles de glucosa disponible. Adaptarse a éstos y otros cambios en el medio ambiente es crítico para su supervivencia lo que ha permitido que a lo largo de la evolución hayan sido seleccionados determinados sistemas de diferente complejidad.

Estos mecanismos de regulación son particularmente importantes para la levadura *S. cerevisiae*, porque contribuyen a su estilo de vida fermentativo asegurando que la mayor parte de la glucosa disponible sea fermentada (por inhibición de la respiración). Así la producción de grandes cantidades de etanol y dióxido de carbono han hecho a esta levadura de gran utilidad durante miles de años. Una de las principales rutas por la cual la glucosa refuerza su propio uso y estimula la fermentación es por la regulación de la expresión génica.

Cambios en el medio externo generan señales que son transmitidas al interior de la célula, generando cambios en la expresión génica (Johnston, 1987) principalmente a nivel transcripcional aunque también contribuyen

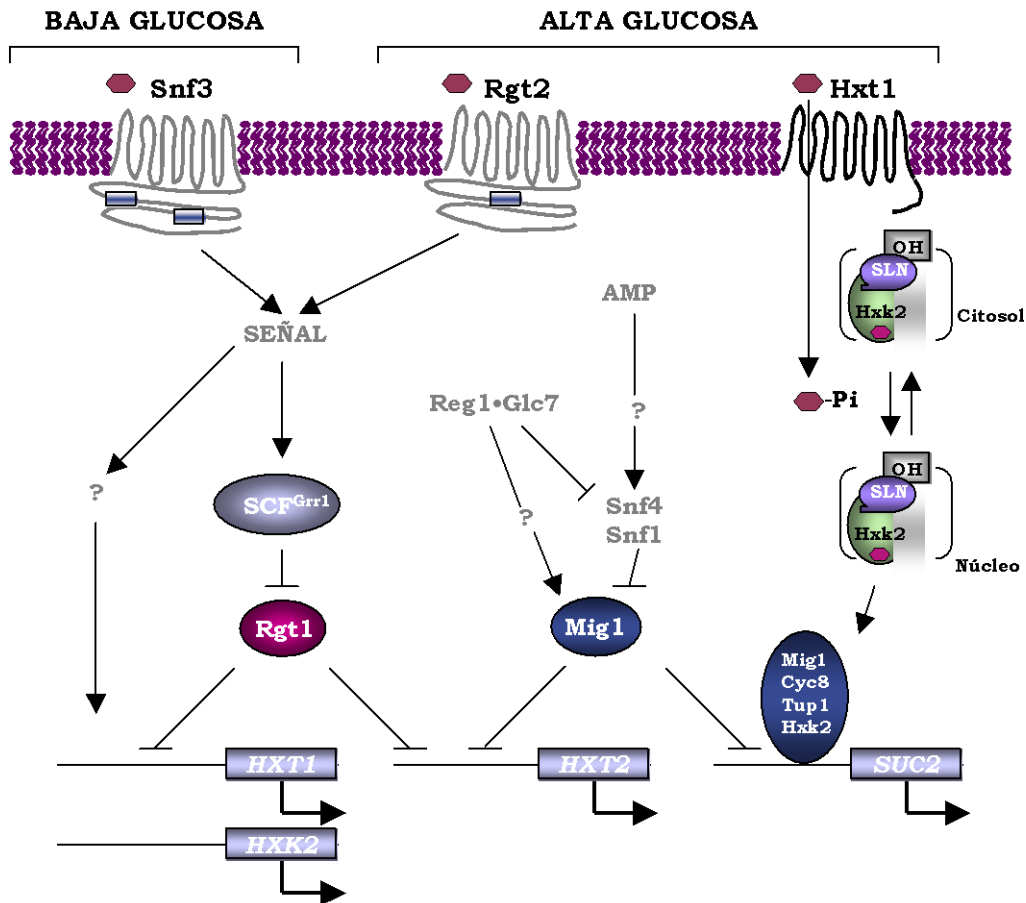
otros mecanismos como la estabilidad en el ARNm (Cereghino y col., 1996), modificaciones post-traduccionales (Gancedo, 1971) y proteólisis (Ronne, 1995).

Algunos de los mecanismos por los que la glucosa afecta a la expresión génica en levaduras han sido caracterizados recientemente de tal forma que muchas de las afirmaciones generadas pueden dar información de cómo células de otros organismos responden a la glucosa.

La glucosa tiene dos efectos principales sobre la expresión en *S. cerevisiae* desencadenándose simultáneamente dos cascadas de señalización con objetivos bien diferentes; por un lado reprime la expresión de muchos genes, incluyendo aquellos involucrados en la utilización de fuentes de carbono alternativas, genes gluconeogénicos, de los ciclos del glioxilato y de Krebs, respiración y funciones peroxisomales, fenómeno que se conoce como represión por glucosa (Trumbly, 1992). Al mismo tiempo induce la expresión de genes requeridos para la utilización de glucosa como genes que codifican varios enzimas glucolíticos y transportadores de glucosa (Özcan y Johnston, 1999), fenómeno conocido como inducción por glucosa.

Sin embargo, cuando la glucosa en el medio es limitante, la célula responde con una rápida desrepresión de los genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono y energía alternativas.

Este es el esquema básico de la regulación de la utilización de la glucosa en *S. cerevisiae*; niveles altos de glucosa desencadenan una vía de señalización negativa encaminada a reprimir la expresión de genes que no son necesarios en dichas condiciones metabólicas, mientras que niveles bajos de glucosa desencadenan una vía de señalización positiva encaminada a desreprimir la expresión de dichos genes (Fig. 1.1).



**FIGURA 1.1.- MECANISMOS DE REPRESIÓN E INDUCCIÓN POR GLUCOSA.**

Las flechas significan activación de la función; las líneas terminadas en una barra significan inhibición de la función. Represión por glucosa: Altos niveles de glucosa son transportados al interior de la célula principalmente por el transportador de baja afinidad Hxt1. La glucosa intracelular es fosforilada por Hxk2 citosólica, fermentando a etanol y CO<sub>2</sub>. La consecuente producción de ATP disminuye los niveles de AMP, el cual puede ser la señal que activa a Snf1-Snf4. Con niveles bajos de AMP, Snf1 está inactiva, y además no inhibe a Mig1, el cual entra al núcleo y reprime la expresión de muchos genes. Mediante algún mecanismo desconocido, Hxk2 es transportada al núcleo, donde forma parte de un complejo proteico implicado en la represión por glucosa del gen SUC2. La proteína-fosfatasa Glc7•Reg1 también regula la función de Snf1, pudiendo también defosforilar a Mig1. Bajos niveles de glucosa aumentan los niveles de AMP, el cual activa a Snf1 que fosforila a Mig1, provocando su salida al citosol desreprimiendo la expresión génica. Inducción por glucosa. Bajos y altos niveles de glucosa se unen a los sensores Snf3 y Rgt2 respectivamente, generando una señal intracelular no identificada que activa al complejo SCFGrr1, inhibiendo la función del represor Rgt1 lo que provoca la desrepresión de los genes HXT, aumentando la concentración de transportadores de glucosa en la membrana y de proteína Hxk2. A este nivel actúan otros componentes como Mth1 y Std1 (Véase Introducción).

El estudio de la represión por glucosa ha sido abordado mediante la obtención de mutantes afectados en ambas vías de señalización. Estos estudios han contribuido a caracterizar en detalle varias vías de señalización que permiten a la célula percibir el nivel de glucosa e iniciar la respuesta apropiada (Gancedo, 1998; Rolland y col., 2001). En levaduras, los diferentes azúcares no actúan directamente sobre proteínas unidas a ADN sino que producen señales que son transmitidas a través de una serie de proteínas a los promotores de los correspondientes genes. Para aclarar los mecanismos de la represión por glucosa e identificar los elementos que participan en la cascada de reacciones entre la glucosa y la diana final, es necesario identificar las señales producidas por el azúcar, las proteínas que responden a ellas y sus sustratos, hasta las proteínas de unión a los promotores de los genes regulados.

Entre los numerosos elementos implicados en el sistema se pueden destacar los siguientes:

- ❶ Elementos implicados en la regulación de la expresión de los transportadores de glucosa, como los sensores de glucosa Snf3 y Rgt2.
- ❷ Represores que interaccionan con secuencias específicas de ADN localizadas en los genes sometidos a represión, como es el caso de las proteínas Mig1 y Rgt1.
- ❸ Co-represores que forman parte de los complejos represores pero no interaccionan directamente con las secuencias diana, como es el caso del complejo Ssn6(Cyc8)-Tup1, o de la proteína Hxk2.
- ❹ Elementos intermediarios que juegan un papel crucial en los fenómenos de represión/desrepresión, como es el caso de los complejos Snf1 y Glc7·Reg1, con actividades proteín-quinasa y fosfatasa respectivamente.
- ❺ Activadores que interaccionan con secuencias específicas de ADN localizadas en los promotores de dichos genes, como es el caso de las proteínas Sip4 y Cat8.

⑥ Elementos que juegan un papel indirecto, como el complejo Snf/Swi, el complejo mediador o el complejo Ada/Gcn5.

Aunque varios de los genes implicados en la vía que controla la represión e inducción por glucosa han sido identificados (Gancedo, 1998), aún no se conoce totalmente cómo funciona este complejo mecanismo de regulación. De hecho la posición de cada factor implicado en la cascada así como las interacciones entre ellos todavía no están bien determinados. Sin embargo, en los últimos años se han realizado importantes avances en este campo a diferentes niveles de control (Gancedo, 1998; Rolland y col., 2001).

Por ello en este trabajo hemos querido aportar datos sobre algunos de estos eslabones desconocidos, en especial sobre un factor importante en la vía de transducción de la señal glucosa, como es la hexoquinasa 2, una proteína que además de su papel metabólico fosforilador de la glucosa, desempeña un importante papel en la señalización por glucosa.

A lo largo de esta introducción trataremos de abordar cada uno de los elementos implicados en ambas vías de señalización por glucosa, con el fin de esclarecer su funcionamiento y aportar información de ayuda a nuestros objetivos.

Para obtener una mayor información acerca de otros elementos implicados en el sistema se pueden consultar las revisiones de Trumbly, 1992; Gancedo, 1998; Carlson, 1998 y 1999 y Johnston, 1999.

## **1.2 Mecanismo de represión por glucosa**

Los componentes centrales de la principal vía para la represión de la expresión génica son; Mig1, un represor transcripcional (Ostling y col., 1996) y su co-represor Ssn6(Cyc8)-Tup1 (Keleher y col., 1992); Snf1, una proteína-quinasa (Hardie y col., 1998) y sus reguladores (Snf4 y tres

miembros de la familia de proteínas Sip) (Yang y col., 1994); y Glc7, una proteína-fosfatasa 1 (PP1) y su subunidad reguladora Reg1 (Tu y Carlson, 1995).

### **1.2.1 La proteína Mig1 y otros represores**

La represión por glucosa de numerosos genes está mediada por el represor Mig1 en la levadura *S. cerevisiae*. Es una proteína con dedos de zinc de tipo C2H2 a través del cual se une a secuencias específicas ricas en GC, de secuencia consenso (G/C)(C/T)GGGG, encontradas en los promotores de muchos genes reprimibles por glucosa (Nehlin y Ronne, 1990; Klein y col., 1998). Además la unión requiere una región rica en residuos AT flanqueando dicha secuencia que parece necesaria para estabilizar la interacción (Lundin y col., 1994). Su papel fisiológico en la represión ha sido demostrado para los genes GAL1 y GAL4, del metabolismo de la galactosa (Griggs y Johnston, 1991), MAL para la utilización de la maltosa (Wang y col., 1997), genes respiratorios (Lundin y col., 1994) y genes que codifican para enzimas gluconeogénicos (Randez-Gil y col., 1997). En algunos promotores, Mig1 también compite con activadores por la unión al ADN (Wang y col., 1997; Bu y Schmidt, 1998).

La represión ejercida parece estar regulada a través de la fosforilación de Mig1 (Treitel y Carlson, 1995; DeVit y col., 1997). El estado de fosforilación de Mig1 está incrementado en un medio con glucosa limitante. Los cambios en la fosforilación requieren la actividad de la proteína-quinasa Snf1, la cual es activada también con baja glucosa.

La represión ejercida por Mig1 requiere el complejo co-represor Ssn6 (Cyc8)-Tup1 (Treitel y Carlson, 1995). Mig1 es el principal responsable de la represión aunque también Mig2 colabora con Mig1 en la represión de algunos genes (Lutfiyya y col., 1998).

La localización nuclear de Mig1 está regulada por glucosa; internalizándose rápidamente al núcleo en presencia de glucosa y permaneciendo en el citoplasma cuando se elimina la glucosa del medio (DeVit y col., 1997). Como ya se ha mencionado este movimiento parece ser debido a la fosforilación catalizada por Snf1, ya que en mutantes *snf1*, Mig1 permanece en el núcleo. La glucosa inhibe la actividad de Snf1 (Woods y col., 1994; Wilson y col., 1996), permitiendo la defosforilación de Mig1 causando su entrada al núcleo donde reprime la expresión génica de todos aquellos genes con sitios Mig1 en sus promotores. La eliminación de la glucosa activa a Snf1, fosforilando a Mig1 y por tanto causando su salida del núcleo resultando en una desrepresión de los genes reprimidos por glucosa.

Aún no se ha establecido si Snf1 actúa directa o indirectamente sobre Mig1, aunque parece que lo hace de forma directa, ya que Mig1 contiene cuatro secuencias consenso para la fosforilación de Snf1 y el cambio de los cuatro residuos reduce el nivel de fosforilación, reteniendo a Mig1 en el núcleo reprimiendo la transcripción (Ostling y Ronne, 1998; Treitel y col., 1998). Además se ha determinado que Snf1 fosforila a Mig1 uniéndose a él, evidencia que resulta de experimentos de co-inmunoprecipitación (Treitel y col., 1998). Se sostiene que Mig1 contiene una nueva señal de exportación nuclear que es fosforilada por Snf1 cuando la glucosa se elimina, causando que sea reconocido por la exportina nuclear Msn5 y llevado al citoplasma contribuyendo a la desrepresión de genes reprimidos por glucosa (DeVit y Johnston, 1999).

Todavía no se ha identificado la proteína-fosfatasa que actúa sobre Mig1. Reg1·Glc7 es un posible candidato porque mutantes *reg1* y *glc7* provocan una hiperfosforilación de Mig1 permaneciendo éste en el citoplasma.

Una vía de señalización bien diferente debe afectar a Mig2 porque su regulación es distinta de Mig1; ni está afectada por Snf1, ni su localización nuclear está regulada por glucosa (Lutfiyya y col., 1998). Esto resulta sorprendente sabiendo que estas dos proteínas se unen a la misma secuencia de ADN, aunque con diferentes afinidades, y llevan a cabo la misma función en la respuesta a glucosa.

El producto del gen YER028, Yel8, es otra proteína que junto a Mig1 y Mig2 posee dedos de zinc y está relacionada con la represión por glucosa aunque en este caso no han sido identificados los genes a los que reprime (Lutfiyya y col., 1998).

Otro represor de unión a ADN es la proteína Sfl1 que se une a un sitio 5' inmediato a la secuencia TATA del gen *SUC2* (invertasa) e interacciona con las proteínas del complejo Srb/mediador (Song y Carlson, 1998). Las proteínas de este complejo, que serán comentadas más adelante, están asociadas con el holoenzima ARN polimerasa II y han sido implicadas en la represión por el co-represor Ssn6(Cyc8)-Tup1 (Kuchin y Carlson, 1998).

Recientemente, un gen no caracterizado, *NRG1* (*regulador negativo de genes reprimibles por glucosa*) parece ser requerido para la represión por glucosa del gen *STA* implicado en la utilización del almidón por *S. cerevisiae* (Park y col., 1999). Estos estudios demuestran que Nrg1 se comporta como un represor dependiente de glucosa, y de Ssn6 y Tup1 donde además Nrg1 y Ssn6 interaccionan en un ensayo de doble-híbrido y co-precipitación, indicando que Nrg1 puede reprimir la misma vía que Mig1.

*NRG1* codifica una proteína de 231 aminoácidos con dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en el extremo C-terminal, la cual juega un papel en la represión por glucosa de los genes *SUC2* y *GAL* en *S. cerevisiae* (Zhou y Winston, 2001). Resultados recientes han demostrado una interacción entre Snf1 y Nrg1 (Vyas y col., 2001).



### 1.2.2 El co-represor Ssn6(Cyc8)-Tup1

El complejo formado por las proteínas Ssn6 (también llamada Cyc8) y Tup1, llamado represor Ssn6-Tup1, forma uno de los principales y más importantes circuitos de regulación génica en levaduras.

Las células eucariotas tienen varias formas de llevar a cabo la represión de diversos genes, incluyendo la modulación en el estado de acetilación de las histonas, la construcción de estructuras especializadas de cromatina, la interferencia con los activadores o directamente con la maquinaria transcripcional. Pero este circuito regulador en el que participa Ssn6-Tup1 puede usar todos estos mecanismos para la represión génica.

La represión ejercida por Ssn6-Tup1 tiene varias características distinguibles, incluyendo su eficiente represión, el gran número de genes reprimibles (3% de los genes de *S. cerevisiae*) y su versatilidad con respecto a la naturaleza y número de activadores. Sin embargo, aunque parece que Ssn6-Tup1 es un represor específicamente potente, la represión ejercida probablemente resulta de varios mecanismos diferentes actuando juntos.

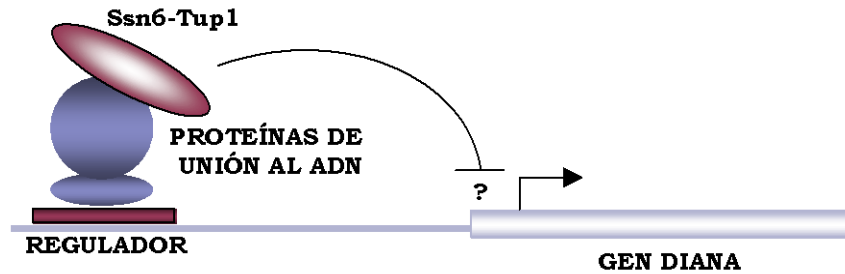
Ssn6 y Tup1 pertenecen a una familia de proteínas muy conservada en levaduras, moscas, gusanos y mamíferos no sólo en secuencia sino también en función (Grbavec y col., 1999). La delección de uno o ambos genes no es letal para las células, aunque los mutantes tienen un crecimiento más lento y comparten distintos fenotipos incluyendo floculación, esporulación pobre, capacidad de tomar timidina del medio (no visto en líneas normales) y pérdida de algunos aspectos de la represión por glucosa. Ssn6-Tup1 reprime a más de 150 genes y la variedad de fenotipos exhibidos por sus mutantes es causado por la expresión inapropiada de estos genes (DeRisi y col., 1997).

Ssn6-Tup1 reprime genes que podemos dividir en grupos diferentes de acuerdo al proceso celular en el cual funciona el gen. Cada grupo de genes

tiene unas proteínas de unión a secuencias específicas en el ADN que reconocen uno ó más sitios en la región promotora de los genes. Estas proteínas de unión a ADN atraen al represor Ssn6-Tup1 localizándolo en la región reguladora de los genes, donde tiene lugar la represión transcripcional (Keleher y col., 1992; Tzamarias y Struhl, 1994; Treitel y Carlson, 1995). Por ejemplo muchos genes reprimibles por glucosa son reconocidos por la proteína Mig1 (Nehlin y col., 1991) o Nrg1 (Park y col., 1999), genes inducibles por daño al ADN son reconocidos por Crt1 (Huang y col., 1998) y genes inducidos por hipoxia son reconocidos por Rox1 (Balasubramanian y col., 1993; Kastaniotis y col., 2000).

Cómo estas proteínas atraen al represor Ssn6-Tup1; estudios bioquímicos del complejo purificado muestran que está compuesto de cuatro moléculas de Tup1 y una molécula de Ssn6 que adopta una conformación alargada (Varanasi y col., 1996), la cual establece una débil interacción con la proteína que lo recluta. Además forman parte de este complejo proteínas adicionales como Rox3, Sin4, Srb8, Srb9, Srb10 y Srb11, siendo éstas últimas componentes del complejo mediador de la transcripción, lo que condiciona su efecto altamente pleiotrópico (Björklund y Kim, 1996). Este complejo Ssn6-Tup1 también interviene en la selección del tipo sexual asociado con  $\text{Mat}\alpha 2$  (Keleher y col., 1992) y también se ha descrito que puede presentar un efecto activador, por ejemplo sobre el factor Hap1, por lo que se le atribuye un papel global en la regulación de genes que están bajo el control del oxígeno (Zhang y Guarente, 1994).

Tanto Ssn6 como Tup1 carecen de motivos de unión al ADN, lo que sugiere que median su función represora vía interacción proteína-proteína con distintos factores transcripcionales (Fig. 1.2).



**FIGURA 1.2.- EL CO-REPRESOR Ssn6-Tup1 REPRIME LA TRANSCRIPCIÓN DE MUCHOS GENES EN *S. cerevisiae*.**

Ssn6-Tup1 reprime genes que funcionan en diferentes vías celulares y reconoce diferentes proteínas de unión al ADN siendo reclutado por ellas hacia los promotores. En algunos casos, dichas proteínas que interaccionan con Ssn6-Tup1 no han sido aún identificadas.

Ssn6 contiene 10 copias del motivo de 34 aminoácidos TPR (*Tetratricopeptide Repeat*) en la región N-terminal. Algunas de estas TPRs son necesarias para las interacciones proteína-proteína, mediando así las funciones de Ssn6 (Schultz y col., 1990). Mediante el sistema del doble híbrido se ha visto que la región N-terminal de Ssn6, que comprende tres TPR, interacciona con Tup1 (Tzamarias y Struhl, 1995). Mutaciones puntuales en las dos primeras TPRs impiden dicha interacción, que no se ve afectada por mutaciones en las TPRs 5 y 8 (Limbach y Zitomer, 2000). También se ha comprobado que Ssn6 interacciona con Mig1, estando implicadas en dicha interacción las TPRs 8 a 10 (Tzamarias y Struhl, 1995).

Tup1 contiene en la región C-terminal 7 copias de un motivo  $\beta$ -transducina que parecen jugar un papel importante en su función, si bien no se requieren para la represión ni para la interacción con Ssn6. El dominio responsable de la represión incluye al menos dos regiones separadas que presentan pocas similitudes, entre ellas la abundancia de alaninas y la ausencia de residuos cargados. En cuanto a la interacción

con Ssn6, 72 residuos del extremo N-terminal son necesarios y suficientes para la misma (Tzamarias y Struhl, 1994).

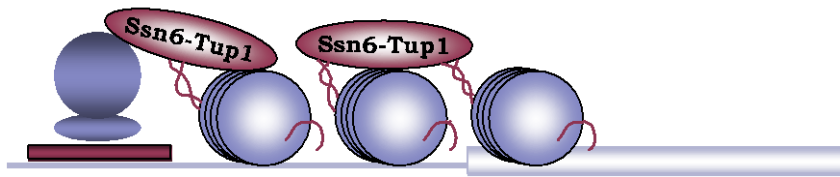
Cómo Ssn6-Tup1 puede reprimir la transcripción, una vez ha sido conducido al ADN. La mayoría de los modelos que explican tal mecanismo se pueden agrupar en tres clases:

❶ *Por interferencia directa con el activador.* Es el caso de *GAL4* donde Ssn6-Tup1 puede ejercer una elevada represión mientras permite la unión del activador a las UAS (Redd y col., 1996). Esto sugiere que su primer mecanismo no es prevenir al activador del sitio de unión al ADN, ya que puede reprimir en varias posiciones con respecto a las UAS. Sin embargo, Ssn6-Tup1 podría en principio, unirse al activador una vez unido éste al ADN, comprometiendo su capacidad para activar la transcripción (Han y col., 1989). Aunque no hay datos directos que confirmen o desmientan esta hipótesis, éste no puede ser el único mecanismo de represión.

❷ *Represión por alteración en la estructura local de la cromatina.* Se ha encontrado que cuando los genes son reprimidos por Ssn6-Tup1, los nucleosomas se encuentran en una posición obstruyendo la unión de proteínas alrededor de la caja TATA y del sitio de iniciación de la transcripción (Shimizu y col., 1991; Patterton y Simpson, 1994). Además, Tup1 interacciona *in vitro* con las colas N-terminal de las histonas H3 y H4 y mutaciones de estas colas alivian parcialmente la represión ejercida por Ssn6-Tup1 *in vivo* (Edmondson y col., 1996) (Fig. 1.3).

*In vitro*, Tup1 interacciona preferentemente con isoformas poco deacetiladas de H3 y H4, sugiriendo que la acetilación de las histonas puede modular las funciones *in vivo* de Tup1. Así la hiperacetilación causada por mutaciones en genes que codifican para deacetilasas (HDACs) Rpd3, Hos1 y Hos2 anula la represión de Ssn6-Tup1, lo que sugiere que Ssn6-Tup1 recluta las actividades deacetilasa para deacetilar nucleosomas

adyacentes y promueven las interacciones Tup1-histona (Watson y col., 2000; Wu y col., 2001).



**FIGURA 1.3.- MODELO DEL PAPEL DE LOS NUCLEOSOMAS EN LA REPRESIÓN MEDIADA POR Ssn6-Tup1.**

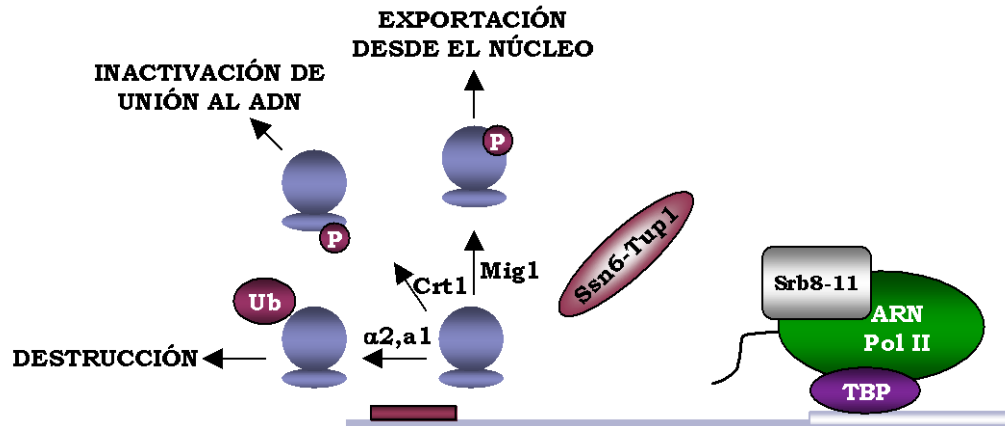
Tup1 interacciona con las colas de las histonas H3 y H4 favoreciendo la formación de una fila de nucleosomas en formación, volviendo al ADN menos accesible a la maquinaria transcripcional (adaptado de Ducker y Simpson, 2000).

Sin embargo, varios experimentos indican que el posicionamiento del nucleosoma no es absolutamente requerido para la eficiente represión. Así por ejemplo en el promotor del gen hipóxico *ANB1*, sometido a represión por el complejo Rox1-Mot3-Ssn6-Tup1, un nucleosoma se encuentra posicionado sobre la caja TATA en condiciones de represión. Una delección en el extremo N-terminal de la histona H4 produce la pérdida de dicho nucleosoma, manteniéndose el gen correctamente reprimido. Estos resultados apuntan a que el posicionamiento del nucleosoma producido por el complejo Rox1-Mot3-Ssn6-Tup1 no juega ningún papel en la represión, contrastando la hipótesis de una represión cromatina-dependiente (Kastaniotis y col., 2000). Esto sugiere que los efectos cuantitativos en la estructura de la cromatina sobre la represión varían de un gen a otro.

③ *Interacción con la maquinaria general de la transcripción.* De acuerdo a este modelo, Ssn6-Tup1 contactaría con la maquinaria general de la transcripción unida al promotor previniendo el inicio de la transcripción.

En este punto intervienen otras proteínas asociadas; Srb8, Srb9, Srb10, Srb11, Rgr1, Sin4 y Rox3 cuya función no se conoce en detalle aunque se sabe que están asociadas bioquímicamente con la ARN polimerasa II (Myer y Young, 1998). Mutaciones en estos componentes del holoenzima alivian parcialmente la represión ejercida por Ssn6-Tup1 (Lee y col., 2000; Papamichos-Chronakis y col., 2000). Los efectos en estas mutaciones sobre la represión por Ssn6-Tup1 no son debidas a la redundancia entre los componentes de la maquinaria. Estas observaciones sugieren que la represión involucra funciones redundantes con o entre la cromatina y el holoenzima.

Muchos de los genes reprimidos son esenciales para la supervivencia de la célula y por lo tanto la desrepresión debe de ser rápida y eficaz. Por tanto en contra, cómo se relaja la represión ejercida por Ssn6-Tup1. No hay señales que directamente inactiven a Ssn6-Tup1, ya que podría generar una desrepresión masiva de todos los genes y no de aquellos que son necesarios en un momento dado. La desrepresión viene dada a través de la inactivación de proteínas individuales que contactan con Ssn6-Tup1 (Fig. 1.4). Las estrategias son diferentes dependiendo de la proteína; Rox1 en bajas concentraciones de oxígeno está regulada a la baja resultando en una desrepresión de los genes hipóxicos (Keng, 1992; Zitomer y col., 1997). Sobre el daño al ADN, Crt1 es hiperfosforilada destruyendo su capacidad de unirse al ADN (Huang y col., 1998). Cuando los niveles de glucosa son bajos, Mig1 es fosforilado y exportado desde núcleo al citosol lo que resulta en una desrepresión de los genes reprimibles por glucosa (Ostling y Ronne, 1998). Sin embargo, en ocasiones durante meiosis y choque térmico, Srb11 es destruido generando desrepresión.



**FIGURA 1.4.- MODELO DE DESREPRESIÓN MEDIADA POR Ssn6-Tup1.**

El alivio de la represión viene a través de la destrucción de las proteínas de unión al ADN o por inactivación de su actividad de unión; presumiblemente liberando el co-represor Ssn6-Tup1 de estos promotores. P (fosforilación), TBP (proteínas de unión a TATA), Ub (ubiquitina).

### 1.2.3 ¿Cómo la glucosa regula a la proteín-quinasa Snf1?

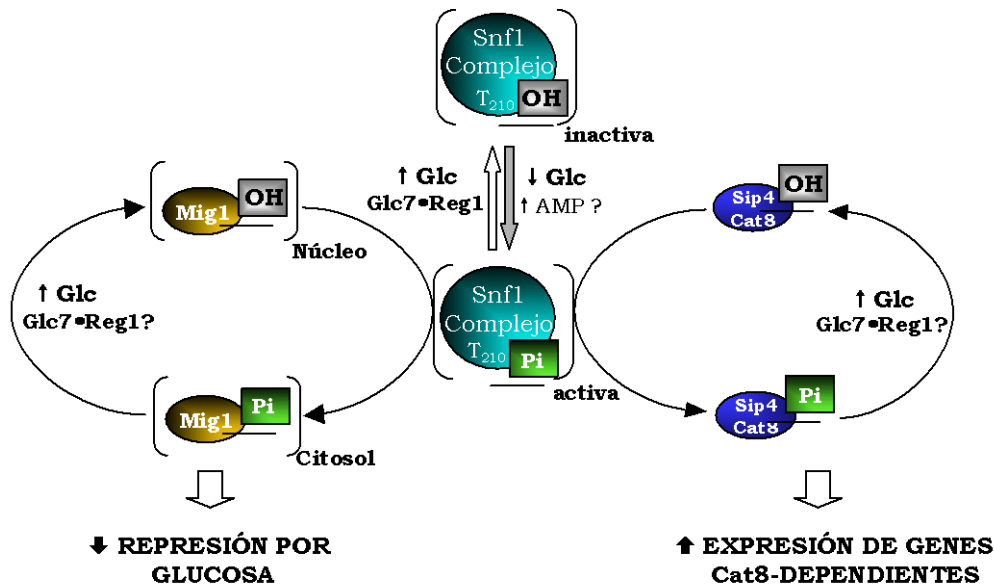
La familia de proteín-quinasas Snf1 (Cat1, Ccr1) ha estado conservada en eucariotas (plantas y mamíferos), donde está involucrada en respuesta al estrés (Hardie y col., 1998). En *S. cerevisiae*, Snf1 (*S*ucose *N*on-*F*ermenting) es esencial para la transcripción de genes reprimibles por glucosa en respuesta a la falta de ésta (Celenza y Carlson, 1986). Además, Snf1 afecta al almacenamiento del glucógeno y fosforila a la acetil-CoA carboxilasa, un papel compartido por su homólogo mamífero, la subunidad  $\alpha$  de la proteín-quinasa activada por AMP (AMPK) (Woods y col., 1994; Mitchelhill y col., 1994) que regula los enzimas metabólicos en respuesta al estrés causado por el agotamiento de ATP, recientemente implicado en control transcripcional (Foretz y col., 1998; Leclerc y col., 1998). En levaduras, la actividad quinasa de Snf1 es requerida también para la

esporulación, termotolerancia (Hardie y col., 1998) y en varios pasos de la meiosis (Honigberg y Lee, 1998).

Como componente central de la vía de señalización para la represión por glucosa en levaduras, estudios recientes han caracterizado los mecanismos por los que Snf1 controla la represión y activación de genes reprimidos por glucosa. Importantes avances incluyen evidencias de que Snf1 regula la localización del represor Mig1 y que Snf1 funciona en múltiples puntos para controlar a Cat8 y Sip4, los activadores de genes gluconeogénicos (Fig. 1.5).

La quinasa Snf1 está activada cuando la glucosa es limitante. Esta activación parece estar asociada con un cambio conformacional del complejo. En vista a un largo número de evidencias genéticas se cree que es debido a la interacción del dominio regulador C-terminal de Snf1 con su dominio catalítico, o con Snf4 (Cat3), una subunidad de Snf1 que realiza su función (Jiang y Carlson, 1996; Ludin y col., 1998). Snf4 consta de cuatro secuencias repetidas denominadas dominio cistationín- $\beta$ -sintasa (CBS) (Bateman, 1997). Se cree que el dominio regulador de Snf1 enmascara al dominio catalítico cuando las células crecen en altos niveles de glucosa. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa disminuyen, Snf4 se une al dominio regulador de Snf1 activando el enzima. Esto lo realiza de forma activa, provocando la liberación del dominio catalítico o pasivamente, estabilizando la forma activa del enzima. Snf4 es asistida en este proceso por uno de los miembros de la familia de proteínas Sip (Sip1, Sip2 y Gal83) (Yang y col., 1994), lo cual parece servir como andamiaje para el complejo proteico y podría ser el responsable del reclutamiento de los sustratos (Jiang y Carlson, 1997). La familia Sip1/Sip2/Gal83 no es esencial para muchas de las funciones de Snf1 *in vivo*, simplemente optimiza la respuesta reguladora a la falta de glucosa.





**FIGURA 1.5.- PAPEL DEL COMPLEJO Snf1 PROTEÍN-QUINASA EN LA DESREPRESIÓN.**

En presencia de glucosa el complejo Snf1 proteín-quinasa se encuentra defosforilado y permanece inactivo. Cuando la glucosa es limitante el complejo es fosforilado en la treonina 210 y se activa. La fosforilación la puede llevar a cabo el propio complejo aunque no se descarta la existencia de una quinasa. El complejo activo fosforila al represor Mig1 en el núcleo, lo que induce la exportación de dicha proteína al citosol y la consiguiente desrepresión de los genes con dianas para Mig1. Paralelamente, Snf1 fosforila a los activadores Cat8 y Sip4, que de esta forma pueden hacer diana en los sitios CSRE activando así la expresión de los genes Cat8-dependientes. La adición de glucosa induce la defosforilación de Snf1 por la proteín-fosfatasa Glc7•Reg1, inactivándose y por tanto siendo incapaz de fosforilar a Mig1, Cat8 y Sip4. Esta misma proteín-fosfatasa podría ser la responsable de la defosforilación de las proteínas Mig1, Cat8 y Sip4. Mig1 defosforilada se localiza en el núcleo, donde participa en la represión por glucosa de muchos genes. Cat8 y Sip4 defosforiladas no pueden hacer diana en los CSRE, manteniendo reprimidos a los genes Cat8-dependientes.

Estudios recientes de Vincent y Carlson (1999) muestran que Gal83 también interacciona con una diana de la quinasa, el activador transcripcional Sip4. Un papel que también desempeña Gal83 es la de regular a través de su subunidad  $\beta$  la localización subcelular de Snf1 dirigiéndola hacia el núcleo de una forma regulada por glucosa (Vincent y col., 2001). Estos autores identificaron una nueva vía de señalización que

controla esta localización nuclear en respuesta a la fosforilación de glucosa. Esta vía es distinta de la vía de señalización por glucosa que inhibe la actividad de la quinasa Snf1 y responde no sólo a glucosa sino también a galactosa y sacarosa.

Son varios los hallazgos que implican la fosforilación en el control de la actividad de Snf1. Primero una treonina conservada (Thr 210), la cual también es fosforilada durante la activación de otras quinasas y que es esencial para la activación del complejo Snf1 (Estruch y col., 1992; Ludin y col., 1998). En segundo lugar, Snf1 es activado por proteína-fosfatasa de mamíferos y reactivada por AMPK quinasa y por un factor en levaduras (Woods y col., 1994; Wilson y col., 1996) y finalmente otra evidencia es que la proteína-fosfatasa 1 (PP1) ó Glc7 de levadura y su subunidad reguladora Reg1, la cual dirige la participación de PP1 en el mecanismo de represión por glucosa (Tu y Carlson, 1995), regula las interacciones proteicas dentro del complejo Snf1 *in vivo* en respuesta a la señal glucosa.

Se sugiere que Reg1 se une al dominio catalítico de la forma activa de Snf1 (en glucosa limitante), presumiblemente dirigiendo a Glc7 para retirar el fosfato de Snf1, lo cual previene a Snf4 de secuestrar el dominio regulador desviando a Snf1 a su estado inactivo (en alta glucosa). La incapacidad de Snf4 para unirse al dominio regulador de Snf1 cuando los niveles de glucosa son altos, puede ser debido a la retirada del fosfato de la treonina T210. Además las dos proteínas, Snf4 y Reg1 determinan si el dominio regulador inhibe al dominio catalítico de Snf1. Parece que la función de Snf1 está regulada por otro mecanismo no definido, porque su actividad es regulada por glucosa incluso en ausencia de su dominio regulador y de Reg1 (Ludin y col., 1998). Se ha demostrado una interacción directa de Reg1 con Glc7 y Snf1 en baja glucosa por lo que Reg1 es fosforilado por Snf1 y además Hxk2 estimula tanto dicha unión como el

estado de fosforilación de Reg1, o inhibe la defosforilación de Reg1 por Glc7; lo cual es de vital importancia para el efecto de Hxk2 sobre la función de Snf1 (Sanz y col., 2000a). Además resultados recientes de Sanz y col., (2000b) sugieren que una nueva proteína identificada, Sip5, interacciona con ambas, Snf1 y Reg1/Glc7 facilitando la interacción entre éstas.

#### **1.2.4 La señal de represión por glucosa**

¿Cuál es la señal glucosa que afecta a la función de Snf1?

La señal que regula la función de Snf1 e inicia la represión es aún desconocida. La glucosa debe ser transportada al interior de la célula para causar la represión; sin embargo, ninguno de los principales transportadores de hexosas merecen la función de percibir ni señalizar para la represión por glucosa (Reifenberger y col., 1997). Dos proteínas de la familia de transportadores de las que se comentará en detalle más adelante, Snf3 y Rgt2, median señales para la inducción por glucosa de los genes que codifican para los transportadores pero no tienen mayores efectos sobre el mecanismo de represión por glucosa (Liang y Gaber, 1996; Özcan y col., 1998). Trabajos recientes indican que la señal para la represión por glucosa está relacionada más bien con la concentración de glucosa que con el flujo de ésta (Gancedo y Gancedo, 1985; Meijer y col., 1998) y manifiestan que las células tienen concentraciones significantes de glucosa intracelular, proponiendo que la propia glucosa o un metabolito de ésta podría ser una molécula señalizadora (Teusink y col., 1998).

Un perfecto candidato propuesto para la señal glucosa es el AMP o la proporción AMP:ATP ó ADP:ATP, la cual disminuye en células creciendo en glucosa debido a la generación de ATP en la glucólisis. Esta intuición es debida a que los tres componentes de la quinasa Snf1 (Snf1, Snf4 y las

proteínas Sip) son similares a las subunidades de la proteína-quinasa activada por AMP de mamíferos (AMPK) (Woods y col., 1994; Stapleton y col., 1994). A diferencia de AMPK, Snf1 no es activada directamente por AMP, pero su actividad se correlaciona notablemente con la proporción AMP:ATP, la cual aumenta más de doscientas veces en glucosa limitante (Wilson y col., 1996). Estas observaciones sugieren que en células creciendo con abundante glucosa, la generación de ATP por la glucólisis disminuye el AMP (baja la proporción AMP:ATP), permitiendo la inactivación de Snf1; en contra células privadas de glucosa tienen niveles elevados de AMP (aumenta la proporción AMP:ATP), lo cual podría resultar en la activación de Snf1.

Retomando como candidato la proporción AMP:ATP, ésta regula la actividad de Snf1 y probablemente lo hace indirectamente, porque Snf1 no parece estar activado por AMP. El AMP puede activar a Snf1 por activación de una quinasa del complejo Snf1, la cual parece existir (Wilson y col., 1996) aunque no ha sido aún identificada. De nuevo esto es por analogía a AMPK, cuya actividad además de estar activada por AMP, está regulada por otra proteína-quinasa que también es regulada por AMP (Hardie y Carling, 1997).

El homólogo de Snf1 en mamíferos, AMPK, está involucrado en la respuesta celular al estrés como ya comentamos con anterioridad. La actividad de AMPK está incrementada por una gran variedad de causas de estrés (choque térmico, hipoxia); todas ellas incrementan la proporción AMP:ATP y causan la fosforilación de AMPK inactivando enzimas biosintéticos, probablemente con el propósito de conservar el ATP. Su homólogo en levaduras también juega este papel, ya que la falta de glucosa es una de las principales causas para el estrés, al menos durante el tiempo que lleva a la célula movilizar la maquinaria necesaria para usar fuentes de

carbono alternativas. En estas condiciones la activación de Snf1 es para incrementar la producción de ATP. Las plantas también parecen poseer un sistema similar de respuesta al estrés, ya que tienen homólogos de Snf1 que son responsables de la represión de la expresión génica por sacarosa (Halford y col., 1994).

Además, la señal para la represión por glucosa puede ser generada durante el metabolismo de la glucosa. Evidencias genéticas han implicado a la hexoquinasa 2 (Hxk2), el enzima responsable de catalizar el primer paso de la glucólisis cuando la glucosa es abundante, en la señalización de la represión por glucosa aunque el mecanismo por el cual opera es desconocido (Gancedo, 1998). Una aportación principal consistente con ambas funciones es su doble localización citosólica-nuclear (Randez-Gil y col., 1998a), de la cual se hablará más adelante, y que es necesaria para la señalización de la represión por glucosa. Además, la proteína Hxk2 participa en complejos ADN-proteína con elementos reguladores del promotor de *SUC2* (Herrero y col., 1998), pudiendo interactuar directamente con factores transcripcionales.

### **1.2.5 Regulación de los activadores transcripcionales de genes reprimidos por glucosa**

La quinasa Snf1 controla la transcripción de algunos genes reprimidos por glucosa no sólo por inhibición de los represores sino también por regulación de los activadores transcripcionales de estos genes. Snf1 alivia la represión por glucosa mediada por Mig1 de algunos genes que codifican activadores como Gal4 (Gancedo, 1998). En trabajos recientes, Snf1 se ha mostrado como regulador de la función y de la expresión de dos proteínas activadoras pertenecientes a la familia de proteínas con dedos de zinc de tipo C<sub>6</sub> en su estructura, Cat8 y Sip4. Ambas son capaces de unirse a las

secuencias CSRE de los promotores de los genes gluconeogénicos y del ciclo del glioxilato, activando su expresión en condiciones de desrepresión (Lesage y col., 1996; Vincent y Carlson, 1998; Rahner y col., 1999). Un ejemplo de gen regulado vía CSRE sería *ACR1* entre otros, que codifica el transportador de succinato-fumarato esencial para el crecimiento de la levadura en etanol (Redruello y col., 1999).

El gen *CAT8* fue identificado en una búsqueda de mutantes incapaces de desreprimir a *ICL1* (Hedges y col., 1995). La expresión de *CAT8* es reprimida por Mig1, y la función activadora de Cat8 es inhibida por glucosa y dependiente de Snf1; además, la fosforilación de Cat8 en respuesta a la limitación de glucosa es en parte dependiente de Snf1 (Rahner y col., 1996; Randez-Gil y col., 1997).

La expresión de *SIP4* está activada por Cat8 (Vincent y Carlson, 1998). Sip4 también contribuye a la activación de los genes gluconeogénicos y al igual que Cat8, puede activar la expresión de otras proteínas de unión a CSRE. La función de Sip4 como un activador transcripcional es inhibida por glucosa y depende de Snf1. Sip4 es fosforilado de forma dependiente de glucosa y Snf1 (Lesage y col., 1996). Aunque no se ha mostrado que Sip4 sea sustrato de Snf1; Sip4 fue primeramente identificado mediante doble híbrido por interacción con Snf1 (Yang y col., 1992; Lesage y col., 1996). Como también se comentó en apartados anteriores, la proteína Gal83 es requerida para un rápido incremento, dependiente de Snf1, en la función del activador Sip4 en respuesta a limitación de glucosa (Vincent y Carlson, 1999).

Un posible modelo es que Sip4 y Cat8 funcionen juntos en la activación por CSRE, con Cat8 sirviendo como regulador principal (Vincent y Carlson, 1998). Durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, Snf1 libera la represión del gen *CAT8* y regula la función activadora de Cat8. Cat8 entonces activa la transcripción de genes que codifican para factores

de unión a CSRE, los cuales activan los genes regulados por elementos CSRE.

### **1.2.6 Elementos que juegan un papel indirecto**

Existen proteínas cuya actividad no está regulada por fuente de carbono y que afectan a la expresión de los genes sometidos a represión. Muchas de ellas forman parte de grandes complejos con un papel general en la transcripción.

#### ***El complejo Snf/Swi y la proteína Gcn5***

El complejo formado por las proteínas Snf y Swi está implicado en el remodelamiento de cromatina dependiente de ATP necesario para activar y mantener la expresión del gen *SUC2* (Matallana y col., 1992; Peterson y Tamkun, 1995; Sudarsanam y col., 1999).

La proteína Gcn5, subunidad catalítica de muchas acetiltransferasas de histonas nucleares, contribuye a la desrepresión de *SUC2* por Snf/Swi, lo que sugiere que en la desrepresión de genes reprimidos por nucleosomas funcionan simultáneamente dos mecanismos; el remodelamiento de nucleosomas y la acetilación de histonas (Sudarsanam y col., 1999).

Experimentos llevados a cabo con un doble mutante *gcn5 snf5* sugieren que la acetilación de histonas puede jugar a favor o en contra de la actividad remodeladora de Snf/Swi (Limbach y Zitomer, 2000). Los mismos autores han encontrado que Snf/Swi parece actuar sobre el dominio N-terminal de la histona H2B, puesto que la eliminación de dicha región restaura la expresión de *SUC2* en mutantes *snf5*.

#### ***El complejo Srb/mediador***

Algunas proteínas implicadas en el fenómeno de represión por glucosa forman parte del complejo mediador de la transcripción. Dicho complejo se

encuentra asociado al dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II y es esencial para la activación de la transcripción.

Las siguientes proteínas del complejo mediador están relacionadas con el fenómeno de represión por glucosa:

Srb2, Srb10 y Srb11 parecen necesarias para la activación de genes controlados por el promotor *GAL10* (Liao y col., 1995).

Srb8, Srb9, Srb10 y Srb11 no son proteínas esenciales, pero mutaciones en los genes que las codifican afectan al crecimiento de la levadura, especialmente en galactosa y en fuentes de carbono gluconeogénicas. Dichas mutaciones impiden una correcta inducción del promotor del gen *GAL1* y contrarrestan débilmente la incapacidad de mutantes *snf1* para desreprimir a *SUC2* (Carlson y col., 1984; Song y col., 1996).

*RGR1* es un gen esencial y mutantes *rgr1* desreprimen a *SUC2* en presencia de glucosa (Sakai y col., 1990).

Gal11 está implicada en la desrepresión de los genes *GAL* (Suzuki y col., 1988).

Mutaciones en el gen que codifica a Sin4 restauran el efecto de mutaciones en los genes *SNF1*, *SWI1* y *SNF2* en la expresión de *SUC2* (Carlson y col., 1984; Jiang y Stillman, 1992; Song y col., 1996).

Una mutación en el gen *ROX3*, identificada como *ssn7*, actúa sinérgicamente con *mig1* restaurando la represión por glucosa de la invertasa, además de complementar el fenotipo de mutantes *snf1* (Song y col., 1996).

Una mutación en el gen esencial *MED6* disminuye el crecimiento en todas las fuentes de carbono excepto en glucosa inhibiendo la transcripción de *GAL1* y *SUC2* en condiciones de desrepresión (Lee y col., 1997).

Mutaciones en el gen *SUG1* corrigen los defectos en la transcripción causados por una mutación en *GAL4* (Swaffield y col., 1996).



Todos estos datos indican que el complejo mediador es necesario para mantener unas velocidades de transcripción óptimas, posiblemente vía interacción con reguladores transcripcionales específicos. Esto explicaría el hecho de que mutaciones en cualquiera de sus componentes impiden una correcta represión por glucosa de varios genes produciendo asimismo una desrepresión incompleta en ausencia de glucosa. No obstante, las funciones de los componentes del mediador no parecen estar relacionados con la señal glucosa (Gancedo, 1998).

### ***El complejo Ada/Gcn5***

Las proteínas Ada2 y Ada3 se asocian para formar complejos multiproteicos de los que pueden formar parte las proteínas Ada1, Gcn5/Ada4 y Ada5/Spt20. Ada3 interacciona con Ada2 y con Gcn5 funcionando como un adaptador para formar el complejo Ada/Gcn5 (Horiuchi y col., 1995). La ausencia de Ada2 o Ada3 potencia la represión por glucosa en algunos casos.

### **1.2.7 Otros mecanismos de señalización**

Aunque la quinasa Snf1 controla la principal vía de señalización en la represión por glucosa, las células de levadura no sólo cuentan con una única vía para tan importante respuesta reguladora. Prueba de esto, es que un doble mutante *snf1 mig1* todavía muestra represión del gen *SUC2* (Vallier y Carlson, 1994), y además la función de Mig2 no parece estar regulada por Snf1 (Lutfiyya y col., 1998); sin embargo esta vía tan relevante que parece existir permanece sin identificar.

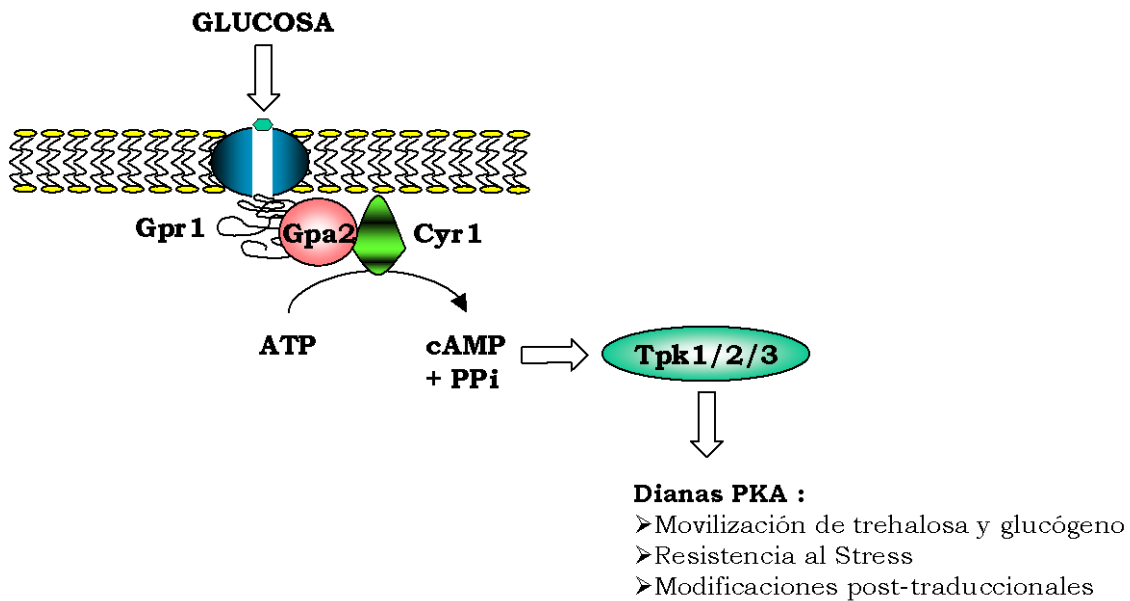
La vía de señalización Ras-AMP<sub>c</sub> también afecta a la represión por glucosa de algunos genes (Gancedo, 1998). Así la señal glucosa no sólo afecta a la población de transportadores de hexosas en la membrana, sino

también a la concentración intracelular de AMP cíclico (AMP<sub>C</sub>). Esta vía de señalización tiene un papel fundamental en el control del metabolismo, resistencia al estrés y proliferación celular admitiéndose que actúa indicando a la maquinaria intracelular los nutrientes disponibles en cada momento.

En presencia de glucosa los niveles de AMP<sub>C</sub> y la actividad de la proteína-quinasa A son muy altos (Thevelein, 1994; Tatchell, 1993). Las proteínas Ras conducen la señal a la adenilato ciclasa jugando un papel similar al de las proteínas G en eucariotas superiores (Wigler y col., 1988). Estas proteínas poseen dos conformaciones, la activa cuando están unidas a GTP y la inactiva si están defosforiladas.

La adenilato ciclasa de *S. cerevisiae* puede estimularse también independientemente de las proteínas Ras. Se ha identificado un sistema de tipo GPCR (*G-protein-coupled receptor system*) similar al de eucariotas superiores (Gilman, 1987; Versele y col., 2001) formado por la proteína receptora Gpr1 y por el equivalente a la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G (Colombo y col., 1998; Kraakman y col., 1999).

El aumento en los niveles de AMP<sub>C</sub> en respuesta a la presencia de glucosa depende de la proteína Gpa2 (Colombo y col., 1998). Kraakman y col., (1999), utilizando a Gpa2 como cebo en el sistema del doble híbrido, han identificado el extremo C-terminal de la proteína de membrana Gpr1. En una cepa mutante *gpr1* los niveles de AMP<sub>C</sub> no aumentan en presencia de glucosa. Estos autores proponen un modelo según el cual la glucosa interacciona con Gpr1 en el exterior de la célula, induciendo en el interior la interacción del dominio C-terminal de Gpr1 con la proteína Gpa2. Gpa2 activaría a la adenilato ciclasa, induciendo la síntesis de AMP<sub>C</sub>, y con ello, una cascada de fosforilaciones mediadas por la proteína-quinasa A (PKA). El aumento de AMP<sub>C</sub> favorece la movilización de trehalosa y glucógeno en la célula, así como la represión de los genes de respuesta a estrés ([Fig. 1.6](#)).



**FIGURA 1.6.- LOS NIVELES DE AMP<sub>c</sub> AUMENTAN EN RESPUESTA A LA PRESENCIA DE GLUCOSA EXOCELULAR.**

Modelo de señalización propuesto por Kraakman y col., (1999). Para una explicación detallada véase el texto.

### 1.3 El mecanismo de inducción por glucosa

La segunda vía de regulación por glucosa de la expresión génica asegura que las levaduras pueden vivir bien en glucosa. Es decir las células de levadura creciendo en altos niveles de glucosa obtienen la mayor parte de su energía de la fermentación (Lagunas, 1979), lo cual genera sólo unas pocas moléculas de ATP por molécula de glucosa. Así deben pasar grandes cantidades de glucosa a través de la glucólisis para generar suficiente energía. Para lograr una gran capacidad glucolítica, la expresión de muchos genes que codifican para enzimas de la glucólisis (Müller y col., 1995), así como varios genes *HXT*, codificadores de los transportadores de glucosa (Özcan y Johnston, 1995) son inducidos. Vías separadas de la

transducción de la señal parecen ser las responsables para la inducción de la expresión de estas dos clases de genes.

### 1.3.1 Regulación de los transportadores de glucosa

El primer paso limitante en el metabolismo de la glucosa es su transporte a través de la membrana plasmática. Son múltiples las vías que regulan la transcripción de varios miembros de la familia de genes *HXT* en respuesta a diferentes niveles de glucosa. Los componentes centrales que forman parte de esta vía de señalización son; Rgt1, un represor transcripcional (Özcan y col., 1996); SCF<sup>Grr1</sup>, un complejo multiproteico que inhibe la función del represor (Li y Johnston, 1997; Kishi y col., 1998) y Snf3 y Rgt2, sensores de glucosa en la membrana que generan una señal intracelular inducida por glucosa para la transcripción de los genes *HXT* (Özcan y col., 1996).

*S. cerevisiae* tiene 20 genes que codifican para transportadores de glucosa (*HXT1* a *HXT17*, *GAL2*, *SNF3* y *RGT2*). Seis de ellos (*HXT1-HXT4*, *HXT6* y *HXT7*) codifican para los principales responsables del transporte, el cual ocurre por difusión facilitada (Kruckeberg, 1996; Boles y Hollenberg, 1997). Todos ellos son proteínas de membrana con un pequeño dominio hidrofílico localizado en el citosol, de no más de 50 aminoácidos. Estos transportadores tienen diferentes afinidades por la glucosa y los genes son inducidos y/o reprimidos por diferentes niveles de ésta. Así por ejemplo, *HXT3* se induce por glucosa independiente de la concentración de azúcar, *HXT2* y *HXT4* se inducen sólo por bajos niveles de glucosa y *HXT1* se induce sólo por altas concentraciones de glucosa (Özcan y Johnston, 1995). Estas tres respuestas a glucosa son debidas a la acción de tres vías de regulación solapantes. Primero, la inducción por glucosa de los cuatro genes es debido al mecanismo de represión mediado por el represor Rgt1, el

cual se une a través de su dominio en dedos de zinc a los promotores de los genes *HXT* e inhibe su expresión en ausencia de glucosa, probablemente por reclutamiento del represor general Ssn6-Tup1 (Özcan y col., 1996). Ambas; altas y bajas concentraciones de glucosa inducen la transcripción de *HXT* inhibiendo la función del represor Rgt1. La proteína Grr1 (*G*lucose *R*epression *R*esistant) es requerida para la inhibición por glucosa de la función de Rgt1. La señal intracelular de glucosa responsable de la inhibición de Rgt1 mediada por Grr1 parece estar generada por Snf3 y Rgt2, dos proteínas también pertenecientes a esta familia de transportadores pero cuya función es la de sensor para bajas y altas concentraciones de glucosa respectivamente.

Segundo, los transportadores de alta afinidad son más útiles cuando la glucosa es escasa y así *HXT2* y *HXT4* sólo se expresan cuando los niveles de glucosa son bajos; y por tanto, están sujetos a represión por glucosa, mediada por el represor Mig1, el cual actúa sobre otros muchos genes reprimidos por glucosa, y la proteína-quinasa Snf1 que regula la función de Mig1. En ausencia de glucosa, Rgt1 impide su expresión mientras que en presencia de ésta, es Mig1 quien la impide. La imposición de esta vía reguladora sobre la mediada por Rgt1 en los promotores de *HXT2* y *HXT4* resulta en una inducción de estos genes sólo por bajas concentraciones de glucosa.

Tercero, los transportadores de baja afinidad son más útiles cuando la glucosa es abundante y así la expresión de *HXT1* requiere un mecanismo inducido por alta glucosa, cuyos componentes no han sido aún identificados. Este mecanismo acoplado con el mediado por Rgt1 provoca una expresión de *HXT1* sólo en células creciendo en altos niveles de glucosa. A causa de estos tres mecanismos solapados, la célula expresa los transportadores apropiados para la cantidad de glucosa disponible.

En la inhibición de la función del represor Rgt1 parece estar implicada la ubiquitina o una proteína relacionada con ésta. El complejo modificador de proteínas SCF, es llamado así por las proteínas que lo constituyen (Skp1, Cdc53 y Cdc34 y una proteína conteniendo un motivo *F-box*) (Skowyra y col., 1997). Se sabe que otros complejos SCF dirigen la ubiquitinación de proteínas (Bai y col., 1996). El componente central de estos complejos es la ubiquitina Cdc34 (Ubc3), mientras que los otros dos componentes Skp1 y Cdc53 sirven de andamiaje para las interacciones proteína-proteína. Estos complejos difieren en la proteína de motivo *F-box* que interacciona con Skp1, el cual recluta sustratos hacia el complejo. Así de esta forma Grr1 recluta al represor Rgt1 (o a una proteína no identificada que regula Rgt1) hacia el complejo SCF<sup>Grr1</sup> a través de su dominio de interacción proteico (repeticiones ricas en leucina). La modificación resultante de Rgt1 (o de su regulador) con ubiquitina podría inhibir su capacidad para reprimir la transcripción, y estimular su función como un activador transcripcional de los genes *HXT* necesarios para introducir la glucosa en la célula. Sin embargo, no se conoce si Rgt1 llega a ser modificado con ubiquitina. Es posible que sea modificado por una de las proteínas relacionadas con la ubiquitina (Smt3 o Rub1) (Johnson y Blobel, 1997; Lamer y col., 1998). Se sabe que Grr1 interacciona con las ciclinas Cln1 y Cln2 responsables de empezar el ciclo celular (Barral y col., 1995). Ya que la glucosa es el nutriente cuya disponibilidad tiene una mayor influencia sobre el ciclo celular, se puede decir que Grr1 juega un papel central en acoplar la disponibilidad de nutriente para la expresión génica y progresión del ciclo celular. No está claro cómo la glucosa estimula la modificación de Rgt1 mediada por SCF<sup>Grr1</sup>. Este complejo es de hecho más abundante en células creciendo en altos niveles de glucosa, probablemente debido a una interacción más eficiente de Grr1 con los componentes del complejo.

Sin embargo, es posible que la función del complejo no esté regulada y que la señal de glucosa actúe en otra parte para estimular la inactivación del represor Rgt1.

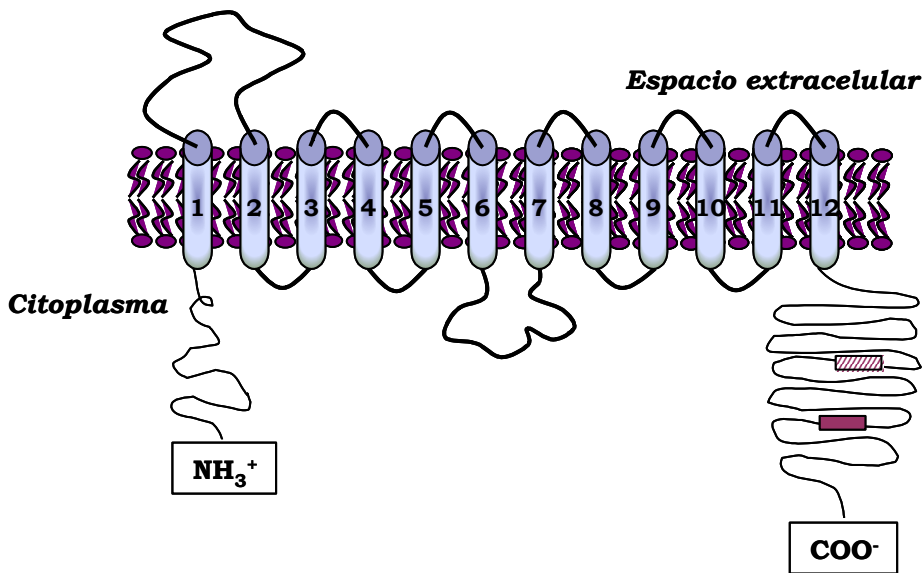
### **1.3.2 La señal de inducción por glucosa**

La señal glucosa es generada por los sensores Snf3 y Rgt2 que residen en la membrana celular. Estas dos proteínas aunque son muy similares a los transportadores de glucosa, con 12 dominios transmembrana (Marshall-Carlson y col., 1990; Özcan y col., 1996), son incapaces de transportar glucosa (Özcan y col., 1998). Parecen servir como receptores de glucosa que generan una señal intracelular sobre la unión de glucosa extracelular.

Snf3 y Rgt2 son requeridas para la inducción por glucosa de la expresión de los genes *HXT* (Wendell y Bisson, 1994; Özcan y col., 1996). Ya que Snf3 es requerido para la inducción de la expresión génica por bajos niveles de glucosa, se cree que es un receptor de alta afinidad por glucosa. Por el contrario, Rgt2 es requerido para la inducción de genes inducidos por alta glucosa, por lo que se cree que es un receptor de baja afinidad.

Lo que diferencia a Snf3 y Rgt2 del resto de transportadores son sus largos dominios hidrofílicos C-terminales localizados en el citoplasma, de más de 200 residuos (Fig. 1.7). La cola C-terminal de Snf3 parece ser suficiente para la señalización, puesto que cuando se fusiona al extremo carboxilo de los transportadores Hxt1 y Hxt2 les convierte en sensores capaces de generar la señal de inducción (Özcan y col., 1998). En las colas C-terminales de los dos sensores existe un motivo común de 26 aminoácidos que en el caso de Snf3 aparece por duplicado, y que parece ser crítico en la señalización. Además una mutación que altere un simple aminoácido de estas proteínas (una arginina conservada en todos los

transportadores, localizada en el dominio citoplasmático justo por delante del quinto dominio transmembrana) provoca que siempre generen una señal que induce la expresión de los genes *HXT*, incluso en ausencia de glucosa, presumiblemente por conversión a su forma unida a glucosa (Özcan y col., 1996). Esto demuestra que el metabolismo de la glucosa no es requerido para la señal de inducción por glucosa.



**FIGURA 1.7.- DOMINIOS TRANSMEMBRANA DE LOS SENSORES DE GLUCOSA.**

Se muestran los dominios transmembrana de los sensores de glucosa Rgt2 y Snf3 en la membrana plasmática basados en el modelo de Glut1. Los dominios predichos se enumeran del 1 al 12. Las cajas sobre la cola C-terminal indican los motivos comunes de 26 aminoácidos (Snf3 tiene dos copias y Rgt2 tiene una sola copia).

¿Cómo es la señal generada por estos receptores? Aunque la señal no se conoce parece que la glucosa se une a los receptores fuera de la célula e induce un cambio conformacional en ellos que es transmitido al dominio C-terminal y que lleva consigo numerosas consecuencias en el interior de la



célula. Podemos estimar que la glucosa está actuando como algunas hormonas, cuya señal se realiza a través de un proceso mediado por receptor. Los elementos principales en este proceso son las colas C-terminales de los receptores (Marshall-Carlson y col., 1990) que son imprescindibles para la generación de la señal glucosa (Coons y col., 1997; Vagnoli y col., 1998). Se especula que la secuencia de 26 aminoácidos localizada en estas colas interacciona con el siguiente componente de la vía de transducción de la señal, y que la generación de la señal es la alteración de la interacción que resulta cuando la conformación de los sensores cambia al unirse la glucosa.

Otros componentes de la vía de inducción por glucosa son las proteínas Mth1 (Htr1) y Std1 (Msn3). *MTH1* podría codificar un componente del mecanismo de inducción por glucosa que regula la expresión de los genes *HXT*. Además una mutación en *MTH1* genera una transcripción defectuosa de varios genes *HXT* (Özcan y col., 1993). La función de ambas, Mth1 y Std1 es aún un misterio aunque se han encontrado tanto en el núcleo como en la membrana. La localización nuclear puede ser el hecho de que interaccione con la caja TATA estando entonces involucradas en transcripción. Además Std1 interacciona con las colas C-terminal de Rgt2 y Snf3, y Mth1 interacciona con la cola C-terminal de Snf3 pudiendo estar relacionadas con la transducción de la señal desde la membrana al núcleo (Schmidt y col., 1999). Lafuente y col., (2000) proponen un modelo según el cual en ausencia de glucosa los dominios citosólicos de los sensores adquieren una conformación cerrada que les impide interaccionar con Mth1 y Std1. De esta forma, los represores quedan libres para inhibir la expresión de los transportadores de glucosa. Mth1 inhibe fuertemente la expresión de los transportadores *HXT1-4*. Std1 también inhibe fuertemente la expresión de *HXT1*, siendo menor su efecto inhibitorio sobre la expresión de los genes *HXT2-4*. En presencia de bajas concentraciones de glucosa, la

cola citoplasmática de Snf3 se abre e interacciona con Mth1, impidiendo la represión de los genes *HXT2-4*. En estas condiciones, la interacción de Std1 con Snf3 es extremadamente débil, de tal forma que *HXT1* se mantiene reprimido. Por otra parte, Rgt2 no reconoce a la glucosa en bajas concentraciones, de tal forma que su cola citosólica mantiene la conformación cerrada que le impide interaccionar con proteínas en el interior de la célula. Finalmente, en presencia de altos niveles de glucosa exocelulares, la glucosa se une a Rgt2 induciendo el cambio conformacional en la cola citosólica que le va a permitir interaccionar con Std1 y Mth1, aliviando de esta forma la represión de los genes *HXT1-4*. No obstante, en estas condiciones solamente se expresan *HXT2* y *HXT3*, puesto que *HXT2* y *HXT4* se encuentran reprimidos por la proteína Mig1.

Pero además debe existir algún mecanismo adicional para desencadenar la señal glucosa, puesto que una cepa mutante en los genes *SNF3*, *RGT2*, *STD1* y *MTH1* sigue siendo capaz de regular la expresión del gen *SUC2* en respuesta a los cambios de glucosa (Schmidt y col., 1999).

## **2.- LA PROTEÍNA H<sub>xk</sub>2 Y LA SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA**

### **2.1 El sistema fosforilador de la glucosa en *S. cerevisiae***

En *S. cerevisiae* el metabolismo de la glucosa comienza con la fosforilación de la glucosa en el C6. Son tres los enzimas, Hxk1, Glk1 y Hxk2 (codificados respectivamente por los genes *HXK1*, *GLK1* y *HXK2*), que pueden catalizar este primer paso irreversible del metabolismo intracelular de la glucosa. Sin embargo, análisis *Northern* muestran que cuando la glucosa es usada como fuente de carbono, sólo el gen *HXK2* está altamente expresado. Por el contrario, la expresión de los genes *HXK1* y *GLK1* sólo es importante cuando el medio de cultivo contiene fuentes de carbono no

fermentables o galactosa (Herrero y col., 1995). Estos hallazgos indican que en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*, sólo *HXK2* es importante para la fosforilación de glucosa *in vivo*. Por tanto o Hxk1 o Glk1 son capaces de mantener el crecimiento de mutantes en los cuales Hxk2 esté ausente (Gancedo, 1992), indicando que estas proteínas son capaces de actuar *in vivo*, y que su irrelevancia para el metabolismo de la glucosa es debido a la pobre expresión de los genes que las codifican.

Qué hace de Hxk2 una proteína especial, la cual no sólo es el enzima responsable de la fosforilación de la glucosa, sino que también está implicada en la represión por glucosa (Gancedo, 1998). Se ha encontrado que mutaciones nulas del gen *HXK2* (Ma y Botstein, 1986) bloquean la represión por glucosa de ciertos genes. En este sentido, la inducción de la expresión por glucosa del gen *HXT1* está debilitado en mutantes *hvk2* (Özcan y Johnston, 1995), y la represión de un gran grupo de genes (*SUC2*, *MAL*, *GAL...*) se ve aliviada en estos mutantes (Gancedo, 1998). También la síntesis de maltasa, malato deshidrogenasa (Entian y col., 1977), galactoquinasa, citocromo c reductasa y citocromo c oxidasa (Michels y col., 1983) no están reprimidas en mutantes *hvk2*. Se produce una redirección del flujo de carbono en el mutante *hvk2* hacia la producción de biomasa como consecuencia de una reducción en la represión por glucosa (Diderich y col., 2001). Este segundo papel de Hxk2 no es compartido por los otros dos enzimas fosforiladores de glucosa presentes en la levadura, de los cuales se comentará más extensamente.

Son varias las propiedades de Hxk2 que pueden estar involucradas en la represión por glucosa; ❶ la actividad fosforiladora de azúcar sugiriendo estar directamente correlacionada con la represión (Ma y col., 1989) ❷ la doble localización citosólica-nuclear (Randez-Gil y col., 1998a) ❸ tanto Hxk1 como Hxk2 existen en dos isoformas *in vitro*, como monómero o como dímero, las cuales tienen diferentes afinidades por la glucosa (Behlke y col.,

1998). La fosforilación en la serina-14 convierte a la hexoquinasa 2 en su forma monomérica que parece ser esencial para la represión por glucosa (Kriegel y col., 1994; Randez-Gil y col., 1998b).

La actividad fosforiladora de glucosa se ve reducida en los correspondientes extractos por lo que la idea de que existiera una correlación entre la actividad fosforiladora de Hxk2 y la represión por glucosa parece tener cada vez mayor atractivo (Ma y col., 1989; Rose y col., 1991). Sin embargo, esta idea se ve perturbada debido a los siguientes hallazgos; (1) cuando el gen *GLK1* está sobre-expresado en un doble mutante *hxk1 hxk2*, las cepas transformadas son todavía insensibles a la represión por glucosa, incluso aunque se logre un aumento de hasta tres veces en la actividad fosforiladora (Rose y col., 1991); (2) la represión por glucosa no se ve aliviada linealmente con un decremento de la actividad quinasa, indicando que la actividad quinasa y la señalización por glucosa son mediadas al menos en parte por dominios separados de Hxk2 (Hohmann y col., 1999; Kraakman y col., 1999); (3) mutantes con baja actividad catalítica aún son funcionales en la señalización por glucosa (Mayordomo y Sanz, 2001).

Trabajos recientes indican que la correlación entre actividad enzimática y regulación de la señal glucosa no pueden ser siempre directas. Hohmann y col., (1999) aislaron un mutante *hxc2* (*hxk2-129*; sustitución E457G), el cual muestra un 70% de la actividad enzimática de la cepa silvestre y tiene el proceso de regulación por glucosa desregulado. Sin embargo, una excepción de tal correlación fue descrita recientemente (Randez-Gil y col., 1998b); estos autores muestran que el intercambio de la Ser 14 por una alanina causa efectos en la señalización por glucosa, probablemente a causa de la ausencia de fosforilación en esta parte de la molécula, un evento que sucede cuando las células están creciendo en baja glucosa (Vojtek y Fraenkel, 1990; Kriegel y col., 1994).

En este contexto también es interesante apuntar que la represión por glucosa del gen *SUC2* no requiere específicamente Hxk2 (Sanz y col., 1996) y que Hxk2 es sólo necesaria para la represión por glucosa a largo plazo (DeWinde y col., 1996). La correlación entre ambas funciones, actividad fosforiladora y represión por glucosa, parece ser menos prometedora en el presente.

La doble función de la hexoquinasa, como enzima metabólico y proteína reguladora, no es única en el metabolismo de los azúcares. Recientemente, se ha encontrado que la galactoquinasa de levadura (Gal1), tiene también una doble función: funciona como un enzima en la fosforilación de la galactosa y como un regulador transcripcional. En presencia de galactosa y ATP, Gal1 activa al factor transcripcional Gal4 por unión directa al inhibidor de Gal4, Gal80 (Zenke y col., 1996). Esta doble función tampoco es única en levaduras ya que un enzima del metabolismo central de *Bacillus subtilis*, la glutamina sintetasa interacciona directamente con el factor transcripcional TnrA y regula su actividad de unión al ADN (Wray y col., 2001).

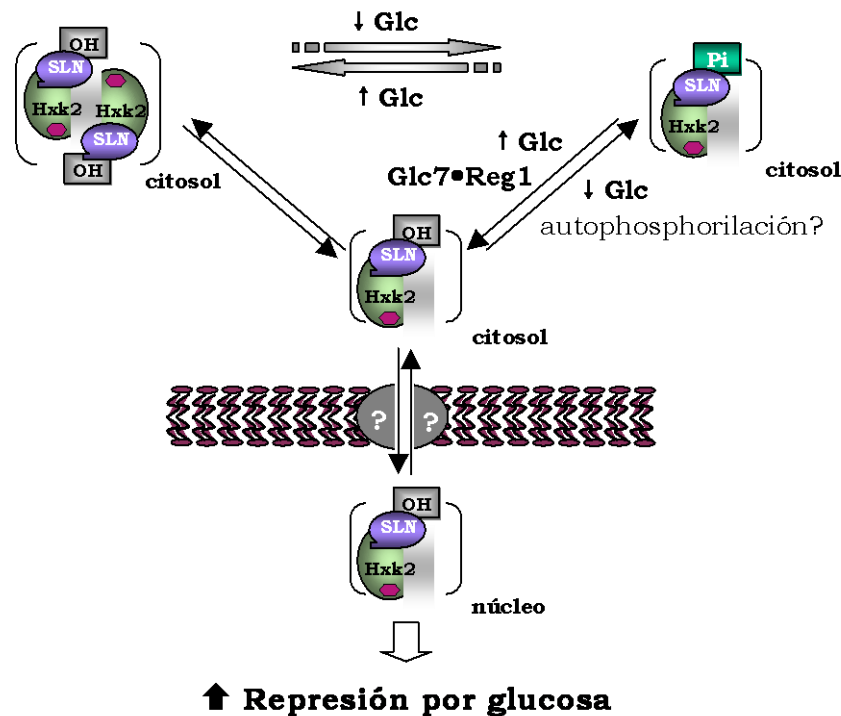
## **2.2 Hxk2 puede entrar al núcleo**

Si Hxk2 juega un papel como regulador transcripcional, uno podría esperar que bajo estas condiciones el enzima estuviese presente en el núcleo. Varios resultados utilizando diferentes aproximaciones apoyan tal localización. Hxk2 fue localizada en núcleos aislados por anticuerpos específicos anti-Hxk2 además de detectarse la correspondiente actividad hexoquinasa en dichas preparaciones (Randez-Gil y col., 1998a). Además la expresión de la proteína de fusión Hxk2-GFP reveló que una fracción de la Hxk2 total estaba presente en el núcleo, siendo improbable que estos hallazgos se debieran a contaminación durante el fraccionamiento

subcelular (Randez-Gil y col., 1998a). Por otro lado se ha encontrado que una secuencia de aminoácidos en la región N-terminal de la proteína (SLN, *Señal de Localización Nuclear*) es indispensable para el transporte al núcleo de Hxk2-GFP. Esta secuencia está localizada entre los residuos Lys<sup>7</sup> y Met<sup>16</sup> (KKPQARKGSM) (Herrero y col., 1998). La eliminación de esta secuencia suprime tanto la localización nuclear de Hxk2 como la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998).

Los mecanismos que regulan el transporte al núcleo de Hxk2 en respuesta a los niveles de glucosa aún son desconocidos. El transporte al núcleo de muchas proteínas está regulado por fosforilación, como es el caso de Mig1.

Hxk2 obedece a las condiciones necesarias para participar directamente en el control transcripcional de varios genes. En células creciendo en ausencia de glucosa, Hxk2 es fosforilado en la serina-14 (Kriegel y col., 1994). Esta fosforilación catalizada por una quinasa todavía desconocida tiene varias consecuencias: (1) Hxk2 es sensible a la inhibición por ATP libre, permitiendo a la célula integrar la concentración de ATP intracelular al control de la fosforilación de glucosa (Moreno y col., 1986; Golbik y col., 2001); (2) la autofosforilación en la serina-157 es estimulada, una reacción que resulta en la inhibición de la actividad enzimática de Hxk2 (Golbik y col., 2001). Cómo puede afectar la conformación del difosfoenzima a la señalización por glucosa se desconoce por el momento; (3) el equilibrio entre las dos isoformas de hxk2, el monómero y el dímero (Derechin y col., 1972; Easterby y Rosemeyer, 1972; Furman y Neet, 1983) está dirigido hacia la forma monomérica (Randez-Gil y col., 1998b; Golbik y col., 2001) (Fig.1.8).



**FIGURA 1.8.- LA HEXOQUINASA 2 PUEDE EXISTIR COMO MONÓMERO O COMO DÍMERO.**

Randez-Gil y col., (1998b) han descrito que Hxk2 en condiciones de desrepresión existe como un monómero fosforilado en la serina-14, y en condiciones de represión como un dímero defosforilado. Alms y col., (1999) proponen que en presencia de glucosa la proteína-fosfatasa Glc7 dirigida por Reg1 defosforila a Hxk2. Resultados de Herrero y col., (1998) indican que la fosforilación en la serina-14 no está implicada en la represión por glucosa del gen *SUC2*, por lo que se sugiere un estado intermedio dentro del equilibrio entre las formas monomérica fosforilada y dimérica defosforilada, previo a la dimerización una vez que ha tenido lugar la defosforilación por Glc7. Esta forma monomérica no fosforilada, por algún mecanismo aún desconocido en el que estaría implicada la SLN, sería transportada al núcleo donde participaría en la regulación de genes sometidos a represión, como es el caso de *SUC2*.

En presencia de glucosa, la proteína Reg1 dirige a la proteína-fosfatasa 1 Glc7, para defosforilar a la serina-14 en la hexoquinasa 2 (Alms y col., 1999), desplazando el equilibrio hacia la forma homo-dimérica (Randez-Gil y col., 1998b; Golbik y col., 2001). Ya que la serina-14, puede ser fosforilada *in vivo*, dentro de la secuencia SLN, no fue ilógico pensar que el estado de fosforilación de este residuo podría regular la función de SLN. Sin embargo, la expresión de un gen mutante *HXK2 (S14A)* en el que se ha realizado el cambio de la serina-14 por una alanina, en una cepa doble mutante *hvk1 hvk2* permite la localización nuclear de la proteína mutante y restaura la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998; Mayordomo y Sanz, 2001).

Otros autores, sin embargo, defienden que la fosforilación de Hvk2 en la serina-14 es esencial para la represión por glucosa de *SUC2* y la expresión inducida por glucosa de los transportadores (Randez-Gil y col., 1998b). Estas discrepancias entre resultados podrían ser debidas a diferencias en la cantidad de hexoquinasa producida por diferentes cepas transformadas.

### **2.3 Hvk2 es un enzima central en la señalización por glucosa**

En cuanto al papel de Hvk2 en la transducción de la señal glucosa, se ha sugerido que Hvk2 interacciona con el extremo C-terminal de los sensores Snf3 y Rgt2 (Özcan y col., 1998). Sin embargo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran mediante el sistema del doble-híbrido que no existe interacción entre las colas citoplasmáticas de Snf3/Rgt2 y Hvk2. Por otra parte, se ha descrito que el funcionamiento correcto de los transportadores de glucosa requiere de la presencia de Hvk1, Glk1 o Hvk2 (Johnston y Carlson, 1992; Bisson y col., 1993; Ciriacy y Reifengerger, 1997). Parece ser que la interacción entre las quinasas y el extremo C-terminal de los transportadores es necesaria para la correcta



función de éstos últimos (Clifton y col., 1993), sugiriendo que podría estar involucrada en generar una señal intracelular. Es interesante resaltar que la única hexoquinasa de *Kluyveromyces lactis*, Rag5, es esencial para la transcripción inducida por glucosa del gen RAG1, que codifica para un transportador de baja afinidad por la glucosa (Prior y col., 1993). Durante el crecimiento en glucosa, un mutante *hvk2* presenta transporte de alta afinidad por glucosa, asociada con una elevada transcripción de los genes HXT2 y HXT7, ambos transportadores de alta afinidad; y una disminución en la expresión de los genes HXT1 y HXT3, ambos de baja afinidad. La expresión de genes codificadores de hexoquinasas de *S. pombe* o *Yarrowia lipolytica* en un triple mutante *hvk1 hvk2 glk1* previene la desrepresión de los transportadores de alta afinidad a altas concentraciones de glucosa (Petit y col., 2000). Por tanto, podemos sugerir que HXK2 influye en la expresión de los genes HXT aunque tal regulación no está bien caracterizada.

Además experimentos recientes muestran que Hvk2 interviene en el control transcripcional del sistema de fosforilación de la glucosa, estando implicada en la represión por glucosa de los genes *HVK1* y *GLK1* y en la expresión inducida por glucosa de *HVK2* (Rodríguez y col., 2001); conclusiones que veremos con mayor detalle a lo largo de los resultados de esta Tesis. Además evidencias derivadas de un mutante *hvk2* expresando una versión truncada de Hvk2 incapaz de entrar al núcleo, muestran que la localización nuclear es necesaria para la represión de *HVK1* y *GLK1*, la expresión de *HVK2* y la represión del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998; Rodríguez y col., 2001).

A la vista de todos estos hallazgos, parece que la proteína Hvk2 es una pieza clave en la regulación de la utilización de la glucosa en *S. cerevisiae* (Moreno y Herrero, 2002). En respuesta a altos niveles de glucosa en el

medio, se favorece la interacción de Hxk2 con los dominios hidrofílicos de los transportadores de baja afinidad de glucosa, favoreciendo el transporte de la molécula al interior de la célula y posiblemente su fosforilación. En estas condiciones, algún mecanismo aún desconocido dispara el transporte al núcleo de Hxk2 donde la proteína participa como un factor transcripcional formando parte de complejos implicados en la represión de genes como *SUC2* (Herrero y col., 1998). El mecanismo de acción sería por interacción con factores transcripcionales relacionados con esta vía aunque las proteínas afectadas aún no se conocen. Asimismo, la fracción de Hxk2 localizada en el núcleo autoceba su propia expresión y está implicada en el bloqueo indirecto de la expresión de los genes *HXK1* y *GLK1*.

### **3.- LA REPRESIÓN POR GLUCOSA DEL GEN *SUC2***

Multitud de genes de diferentes vías son reprimidos por glucosa a nivel transcripcional como hemos visto. En este sentido el gen *SUC2* está regulado casi enteramente por represión por glucosa y ha servido como un gen modelo para estudiar los mecanismos de esta regulación.

El gen *SUC2* codifica para las dos formas de la invertasa, exocelular e intracelular, a través de dos ARN mensajeros (Carlson y Botstein, 1982). El enzima exocelular es la forma fisiológicamente importante de la proteína, un enzima periplásmico que hidroliza la sacarosa externa en glucosa y fructosa. Se han descrito varias secuencias (UAS<sub>s</sub>) necesarias para una correcta expresión de *SUC2* en condiciones de desrepresión, una de las cuales solapa con un sitio de unión para el represor Mig1 (Bu y Schmidt, 1998) y cuya secuencia consenso es (C/A)(G/A)(G/A)AAAT. Contiene dos sitios de unión para Mig1 en su promotor que son principalmente responsables de su represión. Análisis genéticos han identificado numerosas mutaciones reguladoras que o bien previenen la desrepresión

esta manera se han podido identificar los elementos implicados en esta vía de represión vistos hasta el momento. Mientras mutaciones en los genes *SSN6* o *TUP1* alivian completamente la represión por glucosa, la delección de *MIG1* sólo la suprime parcialmente (Vallier y Carlson, 1994). Además hay otros mecanismos independientes de Mig1 para la represión de *SUC2* (Nehlin y col., 1992; Vallier y Carlson, 1994; Treitel y Carlson, 1995). Es el caso de la proteína Mig2 (Lutfiyya y Johnston, 1996) donde su mutación no afecta de forma significativa a la represión de *SUC2*, sin embargo un doble mutante *mig1 mig2* elimina completamente dicha represión. En el promotor de *SUC2* la delección de ambos sitios Mig1 reduce la actividad de transcripción, indicando que el sitio Mig1 media tanto la activación como la represión de la transcripción (Trumbly, 1992). También hemos hablado en el apartado 1.2.1 de esta *Introducción* de una proteína recientemente identificada, Nrg1 que podría reprimir la misma vía al igual que Mig1 (Zhou y Winston, 2001).

Adicionalmente, en condiciones de alta glucosa el promotor de *SUC2* está ocupado por posicionamiento de nucleosomas, donde ellos mismos podrían causar su represión (Gavin y Simpson, 1997; Wu y Winston, 1997).

Recientemente, tratando de identificar nuevos factores requeridos para la expresión de *SUC2*, se identificó una proteína, Med8, la cual se une de forma específica a las secuencias activadoras (UAS<sub>s</sub>) de *SUC2* y también a la DRS<sub>s</sub> del gen *HXK2* (Chaves y col., 1999; Moreno-Herrero y col., 1999). Hay que destacar que la secuencia consenso de 7 pb (C/A)(G/A)(G/A)AAAT de ambas DRS<sub>s</sub> de *HXK2* es la misma que la encontrada en el gen *SUC2* (Bu y Schmidt, 1998) y *SUC7* (Sarokin y Carlson, 1985). En el caso del gen *SUC2*, se ha demostrado su papel regulador, ya que cuando se deleciona una secuencia que contiene dos copias de este motivo separadas por 12

pares de bases, la expresión del gen en condiciones de desrepresión disminuye (Sarokin y Carlson, 1985; Bu y Schmidt, 1998).

El gen *MED8* tiene una pauta abierta de lectura de 671 pb que codifica para una proteína de 223 aminoácidos. Dicha proteína posee una cremallera de leucina potencial entre los aminoácidos 69 y 90, que podría ser responsable de interacciones proteína-proteína e incluso estar relacionada con las interacciones ADN-proteína a través de la formación de homo o hetero-dímeros. También cabe destacar la abundancia de residuos básicos y de residuos hidroxilados en su extremo carboxilo terminal susceptibles de fosforilación, siendo 8 de los 10 últimos aminoácidos, serinas y treoninas. La proteína Med8 se localiza en el núcleo de la levadura aunque aún se desconoce la secuencia de localización nuclear que podría mediar su transporte al núcleo desde el citosol, ni si la translocación al núcleo está regulada por fosforilación/defosforilación de alguno de sus residuos como es el caso de Mig1 (DeVit y col., 1997).

La proteína Med8 ha sido descrita como una subunidad del complejo Srb/mediador que interacciona con el dominio carboxilo terminal (CTD) de la ARN polimerasa II (Myers y col., 1998; Myers y Kornberg, 2000). El hecho de que una proteína mediadora de la transcripción interaccione con elementos reguladores de genes implicados en el fenómeno de represión por glucosa, sugiere que su función podría ser la de actuar como un factor acoplando la maquinaria general de la transcripción con sistemas de regulación génica.

Unido a esto y como hemos descrito hasta el momento Hxk2 actúa tanto en la represión como en la inducción por glucosa, por lo que ambas vías parecen compartir algunos de los componentes implicados y pueden responder a las mismas señales derivadas de la glucosa. Por ello debe existir una conexión entre estas dos vías que aún no está completamente

entendida, sin embargo un nuevo punto de conexión podría ser el ejercido por ambas proteínas, Hxk2 y Med8.

#### **4.- ELEMENTOS REGULADORES IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *HXK2*, *GLK1* Y *HXK1***

##### **4.1 La expresión del gen *HXK2***

Los enzimas fosforiladores de glucosa en *S. cerevisiae* están principalmente regulados a nivel transcripcional por mecanismos que no están totalmente aclarados (Herrero y col., 1995).

En el caso de *HXK2* en la región codificadora del gen se han identificado dos secuencias reguladoras, DRS1 y DRS2 (*Downstream Repressor Sequence*) necesarias para bloquear la transcripción del mismo, en condiciones de crecimiento en etanol (Herrero y col., 1996). En nuestro grupo también se han identificado dos secuencias activadoras anteriores, UAS1 y UAS2 (datos no publicados). Los elementos reguladores dentro de la secuencia codificadora, ya descritos en células de mamíferos, son hasta el momento poco conocidos en levaduras. En el gen *LPD1* y en los retrotransposones Ty1 y Ty2 se han descrito, además de DRSs, secuencias activadoras posteriores (DAS) (Farabaugh y col., 1993; Sinclair y col., 1994).

Las secuencias de los elementos DRS1 y DRS2 tienen la característica de reprimir dentro y fuera de la región codificadora, siempre que se mantenga la fuente de carbono en la cual son capaces de cumplir su función. Similares resultados han obtenido Farabaugh y col., (1993) y Sinclair y col., (1994) con el gen *LPD1* que codifica la lipoamida deshidrogenasa. Esto indica que las proteínas reguladoras a nivel de secuencia codificadora no son específicas para esta región, sino que su acción viene determinada por

la correspondiente secuencia de ADN y por otras proteínas que actúan como factores accesorios.

Resultados obtenidos al subclonarse la DRS1 y la DRS2 en el sitio de clonación múltiple del vector pNI9 han demostrado que cada DRS es capaz de reprimir autónomamente la transcripción y con un carácter represor acumulativo siendo DRS2 más eficiente que DRS1 (Herrero y col., 1996).

Experimentos de competencia cruzada con ambos elementos indican que ambos unen específicamente las mismas proteínas, lo que sugiere la existencia de motivos comunes en ambos elementos que son esenciales para su función. Efectivamente, en ambas DRSS se identificaron secuencias consenso (C/A)(G/A)(G/A)AAAT. Se han descrito complejos ADN-proteína (Martínez-Campa y col., 1996; Herrero y col., 1996) con ambas secuencias DRSS donde los factores reguladores que operan a través de ellas reprimen la transcripción de HXK2 bajo condiciones limitantes de azúcar o cuando el etanol es usado como fuente de carbono (Herrero y col., 1995).

Se han identificado dos proteínas que se unen específicamente a ambas DRSS, una de 18 kDa y otra de 27 kDa (Herrero y col., 1996), siendo ésta última la proteína Med8 (Chaves y col., 1999; Moreno-Herrero y col., 1999).

#### **4.2 La expresión del gen *GLK1***

Como comentamos anteriormente, en levaduras existen otros dos enzimas capaces de fosforilar a la glucosa, la hexoquinasa 1 y la glucoquinasa. No es corriente que exista en la célula más de un enzima capaz de catalizar la misma reacción, a no ser que tenga una regulación diferenciada.

El gen *GLK1* codifica al enzima glucoquinasa, estando la expresión de este gen regulada por la fuente de carbono presente en el medio. Se expresa fuertemente cuando el medio de cultivo contiene fuentes de

carbono no fermentables o galactosa, mientras que cuando la glucosa está presente, no se expresa, lo que indica que no ejerce ningún papel en la fosforilación de la glucosa in vivo, y que tampoco está implicada en la vía glucolítica de *S. cerevisiae* (Herrero y col., 1995; Herrero y col., 1999).

El hecho de que este gen se exprese bajo condiciones de estrés nutricional, sugiere que puede desempeñar algún papel fisiológico en la célula. Cuando en el medio de cultivo no existe una fuente de carbono preferente como glucosa, fructosa o manosa, GLK1 puede tener un papel crítico en la adaptación ambiental en condiciones de estrés nutricional. Esto hizo pensar que este gen pudiera tener un papel en el ciclo celular en condiciones de estrés nutricional. En la fase G1 del ciclo celular las células de levadura acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa o glucógeno, estando así preparadas para sobrevivir en condiciones extremas durante largos períodos de tiempo (Singer y Lindquist, 1998), y así poder reanudar el ciclo de división celular cuando las condiciones mejoran (Silljé y col., 1997), por degradación de sus carbohidratos de reserva, y de este modo incrementar el flujo glucolítico (Silljé y col., 1999). La degradación de la trehalosa genera glucosa intracelular, que ha de ser fosforilada para su utilización, existiendo una correlación entre la cantidad de trehalosa catabolizada y el nivel de expresión de GLK1.

Las secuencias necesarias para permitir un alto nivel de expresión de GLK1 residen en 881 pb de la zona promotora y además los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa sólo son significativos en etanol (Herrero y col., 1999). La regulación de este gen es debida al efecto combinatorio de tres secuencias reguladoras identificadas mediante delecciones (Herrero y col., 1999); una secuencia STRE (stress-responsive element) (Martínez-Pastor y col., 1996; Schmitt y McEntee, 1996), un elemento de represión en etanol denominado ERA/TAB (Ethanol Repression Autoregulation/TA box) (Liesen

y col., 1996) y un sitio de unión a Gcr1 (Baker, 1986; Chambers y col., 1995; Uemura y col., 1997).

Al analizar el papel de estos elementos reguladores en condiciones de crecimiento en glucosa y en etanol se identificaron tres proteínas de unión al ADN. Las proteínas Msn2 y Msn4 interaccionan con el elemento regulador STRE cuya secuencia consenso es AGGGG y actúan induciendo la transcripción de genes que participan en la respuesta a una variedad de condiciones de estrés y represión de un gran número de genes (Mager y Kruijff, 1996; Boy-Marcotte y col., 1998; Estruch, 2000) por la vía de señalización del AMPC (Marchler y col., 1993; Varela y col., 1995; Görner y col., 1998). Este elemento ha sido identificado en la región promotora de diversos genes de levaduras (Ruis y Schuller, 1995). Msn2 y Msn4 son activadores en trans que controlan la expresión del gen GLK1, y forman complejos ADN-proteína con los tres elementos STRE de este promotor ubicados en las posiciones -163, -170 y -178, activando la expresión del gen en condiciones de crecimiento en etanol. Por lo que existe una unión proteica específica y diferencial con extractos de células reprimidas y desreprimidas (Herrero y col., 1999). La localización nuclear de Msn2 está modulada por una proteína-quinasa dependiente de AMPC (CPKA). Así en células crecidas en glucosa, donde existe una alta actividad CPKA, Msn2 se localiza en el citosol, mientras que en condiciones de estrés se transloca al núcleo (Gorner y col., 1998).

El gen GCR1 parece tener un papel central en la regulación coordinada de la expresión de genes glucolíticos. La proteína Gcr1 (glycolysis regulatory protein) actúa también como un factor activador en trans que interacciona con el motivo CTTCC contribuyendo a una activación constitutiva de la mayoría de los genes glucolíticos (Uemura y col., 1997) y del retrotransposón Ty2-917 (Turkel y col., 1997).



La región del promotor designada como ERA/TAB (Liesen y col., 1996) fue analizada en la base de datos de *S. cerevisiae* (SGD). Esta secuencia está seguida del elemento TA box (TAB). La funcionalidad de este elemento se determinó mediante deleciones del promotor y así mientras la eliminación del elemento TAB tiene un efecto moderado incrementando en un 39% la actividad  $\beta$ -galactosidasa en etanol, la deleción que contiene ambos elementos (ERA/TAB) resulta en un importante aumento de la expresión, indicando que ERA es un elemento esencial en todos los casos para que exista una expresión fisiológica del gen y que actúa como represor del gen GLK1.

Este efecto represor puede ser parcialmente aliviado por el efecto activador de los elementos STRE y GCR1 en condiciones de crecimiento en etanol. Aunque en presencia de glucosa, tiene lugar la activación del elemento GCR1, esta activación no es suficiente para vencer el efecto represor causado por el elemento ERA/TAB, puesto que el elemento STRE está inactivado dada la alta actividad de la proteína-quinasa CPKA, y en estas condiciones metabólicas las células no expresan el gen GLK1. Se ha propuesto que el sistema Msn2/Msn4-STRE actúa como una señal positiva que es requerida para la transcripción de GLK1 (Herrero y col., 1999).

Hasta entonces no se habían identificado proteínas que interaccionan con la región ERA/TAB, eslabón pendiente para completar la caracterización funcional del promotor del gen GLK1, sin embargo algunos de los resultados de esta Tesis están dirigidos a la identificación de estos factores.

### **4.3 La expresión del gen *HXK1***

La máxima expresión del gen *HXK1*, que codifica para la hexoquinasa 1, se produce cuando la célula utiliza galactosa o etanol como fuente de carbono, siendo esta expresión prácticamente nula en manosa, glucosa y fructosa (Herrero y col., 1995).

El hecho de que este gen no se exprese cuando existe glucosa en el medio, permitió afirmar que *Hxk1* no juega ningún papel en la fosforilación de la glucosa in vivo y no está implicada en la vía glucolítica de *S. cerevisiae* (Herrero y col., 1995).

Es importante señalar que la glucosa, fructosa y manosa son sustratos del enzima codificado por el gen *HXK1*, mientras que la galactosa o el etanol no son sustratos para dicho enzima, por lo que este hecho lleva a pensar en un aparente error metabólico, puesto que este isoenzima es sintetizado en condiciones en las que aparentemente no es necesario.

El gen *HXK1* es transcrito activamente en condiciones de estrés nutricional, térmico y osmótico, los cuales a través de rutas de señalización no del todo conocidas, inducen la transcripción de los genes reguladores *MSN2* y *MSN4*, que expresan las proteínas *Msn2* y *Msn4* respectivamente de interacción con los elementos *STRE* presentes en el promotor del gen *HXK1*.

Se han identificado cinco secuencias consenso *AGGGG* en dicho promotor que corresponden al elemento *STRE*, estableciéndose la implicación de estas secuencias en la inducción de la transcripción de *HXK1* como respuesta a las diferentes condiciones de estrés. La transcripción de *HXK1* está también reprimida en presencia de glucosa por factores reguladores que operan a través del elemento *ERA* (resultados no publicados de nuestro grupo de investigación).

## **5.- UN ENZIMA FOSFORILADOR DE GLUCOSA TAMBIÉN INVOLUCRADO EN SEÑALIZACIÓN POR GLUCOSA EN OTRAS CÉLULAS**

La vía de señalización por glucosa de *S. cerevisiae* tiene ciertas similitudes con la vía que controla la expresión inducida por glucosa de insulina en las células  $\beta$  del páncreas.

En la mayoría de tejidos sensibles a glucosa en mamíferos, la entrada de glucosa está mediada por transportadores específicos, tales como Glut2 en hígado y células  $\beta$ , y Glut4, un transportador sensible a insulina en adipocitos y músculo. Se ha sugerido que la larga cola intracitoplasmática de Glut2 podría también jugar un papel en la transmisión de la señal (Lamothe y col., 1998; Guillemain y col., 2000), siendo considerado que su función tiene similitudes con el sistema sensor de glucosa Snf3/Rgt2 de levaduras.

La glucosa regula la producción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas por estimulación de la transcripción del gen de la insulina. Esto es mediado por un factor de transcripción (PDX1), el cual se une a elementos reguladores específicos contenidos en el promotor del gen de la insulina humano y al promotor de varios genes expresados preferentemente en las células  $\beta$ , incluyendo los que codifican Glut2 y glucoquinasa (GlcB) (Macfarlane y col., 2000). La glucosa activa a PDX1 por fosforilación de la forma citoplasmática del factor que transloca al núcleo (Macfarlane y col., 1999) a través de un mecanismo descrito para Mig1 en levaduras.

La glucoquinasa de las células  $\beta$  e hígado, la cual se ha propuesto que actúa como un sensor de glucosa (Grupe y col., 1995; Postic y col., 2001), tiene una doble localización citosólica-nuclear regulada por la proteína nuclear Gkr y por la concentración de glucosa (Agius y col., 1996; Fernández-Novell y col., 1999; de la Iglesia y col., 2000). Además la glucoquinasa de mamíferos y la hexoquinasa 2 de levaduras tienen una

distribución subcelular similar y ambas son necesarias para una regulación apropiada de genes de respuesta a glucosa. Así la expresión del gen de la GlkB en un mutante *hvk2* de levadura restaura ambos procesos de inducción y represión por glucosa, mostrando que actúa de forma similar a su homólogo en levadura (Mayordomo y Sanz, 2001).

## **6.- OBJETIVOS**

Son varias las evidencias genéticas que han implicado a la hexoquinasa 2 en la señalización por glucosa; entre ellas, su localización nuclear y su participación formando parte de complejos implicados en la represión de genes como SUC2 (UASS) a través de un motivo común encontrado también en el gen HXK2 (DRSS) a los que se une la proteína mediadora de la transcripción, recientemente identificada, Med8. Este motivo común de 7 pb (C/A)(G/A)(G/A)AAAT al que denominamos sitio MED8 se ha encontrado además en los promotores de genes regulados por glucosa como HXK1, GLK1 y HXT1, donde además solapa con una secuencia represora denominada ERA en el caso de los genes HXK1 y GLK1, y con un sitio de unión para Mig1 en el gen SUC2. El mecanismo de acción de Hvk2 podría ser por interacción con factores transcripcionales relacionados con esta vía, aunque las proteínas afectadas aún no se conocen. Sin embargo, el hecho de encontrar dos proteínas, Hvk2 y Med8, formando parte de un mismo complejo resulta interesante.

Con el fin de identificar los factores transcripcionales implicados en esta vía de regulación así como aportar información de cómo Hvk2 actúa en el complejo mecanismo de represión por glucosa se han propuesto los siguientes objetivos:

- ❶ Implicación de la proteína Hvk2 nuclear en la regulación de la expresión de los genes HXK1, GLK1 y HXK2.

- ② Análisis de la interacción entre la proteína Med8 y el motivo común heptamérico encontrado en los genes regulados por glucosa; así como la influencia de Hxk2 en dichas interacciones.
- ③ Identificación y purificación de proteínas que se unen directamente al sitio MED8 del promotor GLK1 mediante sistemas de cromatografía de afinidad Biotina-Streptavidina y obtención de mutantes reguladores.
- ④ Análisis de las interacciones proteína-proteína entre los diferentes factores que forman parte del sistema de transducción de la señal glucosa dependiente de Hxk2, mediante el sistema del doble-híbrido, inmunoprecipitación y coprecipitación.

## **1.-MICROORGANISMOS UTILIZADOS**

### **1.1 Levaduras**

En la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

**AMW-13C<sup>+</sup>** (*MATa; trp1(fs); ura3(fs); leu2-3,112; his3-11,15; can1*). En su genotipo, (fs) significa mutación por cambio en la pauta de lectura.

**DBY1315** (*MATa; ura3-52; leu2-3,112; lys2-801; gal2*). Cedida por D. Botsein. (Harvard Medical School, Boston, USA).

**DBY2052** (*MATa; hxk1::LEU2; hxk2-202; ura3-52; leu2-3,2-112; lys2-801; gal2*). Cedida por D. Botsein. (Harvard Medical School, Boston, USA).

**DBY2053** (*MATa; hxk1::LEU2; ura3-52; leu2-3,2-112; lys2-801; gal2*). Cedida por D. Botsein. (Harvard Medical School, Boston, USA).

**DBY2184** (*MATa; hxk2-202; ura3-52; leu2-3,2-112; lys2-801; gal2*). Cedida por D. Botsein. (Harvard Medical School, Boston, USA).

**Y187** (*MATa; ura3-52; his3-200; ade2-101; trp1-901; leu2-3,112; gal4Δ; gal80Δ; URA3::GALI<sub>UAS</sub>-GALI<sub>TATA</sub>-lacZ*), utilizada para detectar interacciones proteína-proteína mediante el método del doble-híbrido.

En la Tabla 2.1 se muestran las cepas de levadura utilizadas durante la realización del apartado 1 de Resultados.

CEPA	GENOTIPO
FMY151	Isogénica a DBY1315 con <i>HXK1::lacZ</i>
FMY521	Isogénica a DBY2052 con <i>HXK1::lacZ</i>
FMY531	Isogénica a DBY2053 con <i>HXK1::lacZ</i>
FMY841	Isogénica a DBY2184 con <i>HXK1::lacZ</i>
FMY152	Isogénica a DBY1315 con <i>HXK2::lacZ</i>
FMY522	Isogénica a DBY2052 con <i>HXK2::lacZ</i>
FMY532	Isogénica a DBY2053 con <i>HXK2::lacZ</i>
FMY842	Isogénica a DBY2184 con <i>HXK2::lacZ</i>
FMY153	Isogénica a DBY1315 con <i>GLK1::lacZ</i>
FMY523	Isogénica a DBY2052 con <i>GLK1::lacZ</i>
FMY533	Isogénica a DBY2053 con <i>GLK1::lacZ</i>
FMY843	Isogénica a DBY2184 con <i>GLK1::lacZ</i>

## 1.2 Bacterias

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas, y sus genotipos, se señalan a continuación:

**BL21** [ $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3)], utilizada para llevar a cabo la inducción de la expresión de los genes subclonados en vectores pGEX.

**MC1061** [ $F^-$ , *hsdR2* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *mcrA*, *mcrB1*, *araD139*,  $\Delta$ (*araABC-leu*)7697,  $\Delta$ (*lac*)X74, *galE15*, *galK16*, *rpsL*(*str<sup>r</sup>*), *thi* ], utilizada como huésped en la selección y amplificación de plásmidos recombinantes.

**XL1-Blue** {*recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *hsdR17*( $r_K^-$ ,  $m_K^-$ ), *supE44*, *relA1*, *lac*, [ ( $F'$ , *proAB<sup>+</sup>*, *lacI<sub>q</sub>ZAM15*,  $::Tn10$ (*tet<sup>R</sup>*)]}, utilizada para llevar a cabo la inducción de la expresión de los genes subclonados en el vector pQE30.

**HB101** [ *thi-1*, *hsdS20*( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ), *supE44*, *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*(*str<sup>r</sup>*), *xyl-5*, *mtl-1*], utilizada como huésped en la selección y amplificación de plásmidos recombinantes.

## **2.-MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO**

### **2.1 Levaduras**

Los medios utilizados para el cultivo de las cepas de levadura fueron los siguientes:

**-YEP:** Medio complejo cuya composición incluye extracto de levadura al 1% y peptona al 2%, suplementado con glucosa al 2% o al 4% (**YEPD**) o etanol al 3% (**YEPE**) como fuentes de carbono.

**-SC:** Medio sintético mineral que contiene medio base en nitrógeno con sulfato amónico sin aminoácidos (YNB w/o aminoacids) al 0.67% y glucosa al 2% (**SCD**) o etanol al 3% (**SCE**). El medio es suplementado con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas necesarios para el crecimiento de las levaduras, excepto aquellos que se utilizan como marcadores. En todos los casos, se preparó medio sólido añadiendo agar al 2%. Los medios se esterilizaron en autoclave a una atmósfera de presión durante 20 minutos.



El crecimiento de las células en medio sólido se llevó a cabo en placas Petri, por incubación en una estufa a 28°C.

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 28°C y 200 rev/min.

El crecimiento celular se ha determinado midiendo la turbidez del cultivo a 600 nm.

## **2.2 Bacterias**

Para el crecimiento de las bacterias se emplearon los siguientes medios:

**-LB:** Consta de triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%.

Los medios sólidos se prepararon adicionando agar al 2%. En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, se añadió el correspondiente antibiótico, ampicilina (100 mg/l) o kanamicina (50 mg/l). La esterilización se realizó en un autoclave, durante 20 minutos y a una atmósfera de presión.

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 rev/min a 37°C en matraces Erlenmeyer de tal manera que el volumen no fuera superior al 20% del recipiente, con el fin de tener una buena aireación.

El crecimiento celular se determinó midiendo la turbidez del cultivo a 600 nm.

### **3.- VECTORES DE CLONACIÓN**

En este apartado se describen los vectores utilizados en la realización del presente trabajo (Véase Anexo):

**YEp351** (Hill y col., 1986). Es un vector episomal que puede replicarse autónomamente en *S. cerevisiae*, pues contiene un fragmento del círculo de  $2\mu$ , lo que permite su aparición en un alto número de copias por célula. Contiene el gen LEU2 como marcador para levaduras y porta la maquinaria necesaria para su replicación en bacterias, derivada del vector pUC18, así como el marcador de resistencia a ampicilina (Anexo, Fig. 1).

**YEp352** (Hill y col., 1986). Es un vector episomal que puede replicarse autónomamente en *S. cerevisiae*, pues contiene un fragmento del círculo de  $2\mu$ , lo que permite su aparición en un alto número de copias por célula. Contiene el gen URA3 como marcador para levaduras y porta la maquinaria necesaria para su replicación en bacterias, derivada del vector pUC18, así como el marcador de resistencia a ampicilina (Anexo, Fig. 2).

**pJJH215** (Cedido por el Dr. Heinisch de la Universidad de Düsseldorf, Alemania). Es un vector episomal que puede replicarse autónomamente en *S. cerevisiae*, pues contiene un fragmento del círculo de  $2\mu$ , lo que permite su aparición en un alto número de copias por célula. Contiene el gen LEU2 como marcador para levaduras, así como el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección para bacterias. También contiene el fragmento  $\alpha$  del gen lacZ, que está interrumpido por el promotor GAL1/10, el cual se localiza justo a continuación de la zona del promotor del gen lacZ que presenta múltiples sitios de clonación que favorecen la inserción de fragmentos de ADN en esta región. (Anexo, Fig. 3).

**pGEX-2T y 4T-1** (Obtenidos de Amersham Biosciences). Vectores de expresión en *E. coli* que contienen el promotor *tac* químicamente inducible mediante un análogo de la lactosa como es el IPTG, el gen represor *lacIq*, un gen de resistencia a ampicilina (*Ampr*), un origen de replicación *pBR322 ori*, y finalmente el gen codificador de la proteína GST. Dicha proteína se sintetiza fusionada a la proteína de interés generando una estructura adecuada para su purificación por cromatografía de afinidad. Asimismo, posee un sitio de reconocimiento para digerir con trombina (Amersham Biosciences), permitiendo así obtener la proteína de interés en forma nativa. Los distintos vectores pGEX presentan sitios de clonación múltiple (MCSs, Multiple Cloning Sites) para las tres pautas de lectura así como señales de terminación (Anexo, [Fig. 4](#)).

**pQE30** (Bujard y col., 1987). Vector de expresión de proteínas etiquetadas con una cola de seis histidinas en *E. coli*, que consta de un elemento promotor-operador consistente en el promotor T5 y dos secuencias *lac*, un sitio de unión ribosomal RBSII, una secuencia que codifica una etiqueta de 6 histidinas en el extremo N-terminal, un sitio de clonación múltiple (MCS) y señales de terminación (*t0* del fago  $\lambda$  y T1 del operón *rrnB* de *E. coli*), el gen de la  $\beta$ -lactamasa (*bla*) que le confiere resistencia a ampicilina y un origen de replicación (Anexo, [Fig. 5](#)).

**pGBKT7** (Obtenido de Clontech). Vector utilizado en el sistema del doble híbrido (Materiales y Métodos, 10.1). Está diseñado para producir proteínas fusionadas a los aminoácidos 1-147 del dominio de unión (BD) de la proteína Gal4, estando la expresión del gen de fusión controlada por el promotor ADH1. La transcripción finaliza en las secuencias de terminación de los genes T7 y ADH1. Contiene un MCS, y puede replicarse

autónomamente en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, conteniendo un gen de resistencia a kanamicina y el gen TRP1, para llevar a cabo las selecciones en bacterias y levaduras respectivamente (Anexo, Fig. 6).

**pGADT7** (Obtenido de Clontech). Vector utilizado en el sistema del doble híbrido que permite producir proteínas fusionadas a los aminoácidos 768-881 del dominio de activación (AD) de la proteína Gal4. La expresión tiene lugar bajo el control del promotor ADH1, finalizando en la señal de terminación de la transcripción de dicho gen. La proteína de fusión es transportada al núcleo por la SLN del antígeno SV40-T. El MCS posee sitios de restricción únicos en pauta con el extremo 3' de GAL4AD. También contiene el promotor T7 y un epítipo HA. Se puede replicar autónomamente en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, portando un gen de resistencia a ampicilina y el gen LEU2 para llevar a cabo las selecciones en bacterias y en levaduras respectivamente (Anexo, Fig. 7).

**pGEM-T/pGEM-T Easy** (Obtenidos de Promega). Se trata de sistemas convenientes para la clonación de productos de PCR. Los vectores están preparados por digestión con EcoRV de los vectores pGEM-5Zf(+) y pGEM-T Easy y posterior adición de una timidina a ambos extremos terminales 3'. Este simple extremo 3'-T da lugar a la eficiente ligación de productos de PCR que normalmente son generados con una deoxiadenosina en sus extremos. Estos vectores contienen los promotores de la T7 y SP6 ARN polimerasa flanqueando un sitio de clonación múltiple. Esta región de clonación permite crear perfectos sitios de corte en el producto de PCR mediante digestión con enzimas de restricción con el fin de poder ser subclonado posteriormente en cualquier otro vector (Anexo, Fig. 8).

#### **4.- GENOTECA**

En este trabajo se ha empleado la genoteca MW90 construida según Waldherr y col., (1993) en el vector multicopia YEp351 (Hill y col., 1986), y amablemente cedida por la Dra. Suárez Rendueles (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo).

#### **5.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL ADN**

##### **5.1 Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias**

a.- Preparaciones a gran escala:

Para la obtención de ADN plasmídico de bacterias a gran escala (100 µg aproximadamente), se utilizó el kit comercial Quiagen Plasmid Midi.

b.- Preparaciones rápidas:

Se ha empleado el método de mini-prep descrito por Matson, (1989). En este método las células fueron tratadas con tampón STET (Sacarosa 8%, Tritón X-100 al 5%, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 8.0) y lisozima, para posteriormente purificar el ADN plasmídico.

##### **5.2 Aislamiento de ADN plasmídico de levaduras**

Para la obtención de ADN plasmídico de *S. cerevisiae* se ha empleado el método descrito por Hoffman y Winston, (1987). A partir de colonias de levaduras conteniendo plásmidos de interés, se prepararon cultivos celulares de 2 ml en el medio mínimo selectivo correspondiente. Se llevó a cabo la rotura mecánica de las células con bolas de vidrio de Ballotini de diámetro comprendido entre 0.45-0.50 mm, en presencia de 200 µl de tampón de rotura (Tritón X-100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, EDTA 1 mM) y 200 µl de fenol/cloroformo (1:1).

El sobrenadante de este extracto obtenido por centrifugación se utilizó directamente para transformar bacterias.

### **5.3 Aislamiento de ADN cromosómico de levaduras**

Para la obtención de ADN cromosómico de *S. cerevisiae* se ha empleado el método descrito por Ciriacy y Williamson, (1981), el cual se basa en la producción de protoplastos utilizando zimoliasa y su lisis en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). El ADN cromosómico se obtiene mediante precipitaciones con etanol, en presencia de acetato amónico 5 M.

### **5.4 Análisis de restricción del ADN**

Se han utilizado endonucleasas de restricción suministradas por Roche Diagnostics o por Amersham Biosciences, siguiendo las condiciones indicadas por la casa comercial correspondiente.

### **5.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Se ha seguido fundamentalmente el protocolo descrito por Meyers y col., (1976). Se han empleado geles horizontales de agarosa al 1% 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.

### **5.6 Construcción de plásmidos**

La construcción de los distintos plásmidos recombinantes se realizó mediante la subclonación de fragmentos de ADN en los vectores descritos en el apartado 3. En aquellos casos en los que el vector se digirió con un solo enzima de restricción o con dos enzimas generando sitios de corte compatibles, se trató a continuación con fosfatasa alcalina de ternera para evitar así su religación. Las ligaciones con el fragmento deseado se realizaron utilizando ADN ligasa del fago T<sub>4</sub>.

La purificación de los fragmentos de ADN a subclonar se llevó a cabo según las instrucciones de la casa comercial GIBCO BRL para CONCERT™ Matriz Gel Extraction System.

### **5.6.1 Construcción de plásmidos conteniendo diferentes alelos del gen HXK2 y fusiones del gen lacZ**

Para la fusión del gen HXK1 con el gen bacteriano lacZ codificante para la  $\beta$ -galactosidasa se utilizó un fragmento de 621 pb Sau3A-XmnI conteniendo 582 nucleótidos de la región 5' no codificadora y 39 pb de la secuencia codificadora. Este fragmento se ligó en pauta de lectura al gen lacZ en el vector YIp358R (Myers y col., 1986) digerido previamente con BamHI y SmaI dando lugar al plásmido YIp621.

Para la fusión entre HXK2 y lacZ se utilizó un fragmento de 1242 pb BamHI-HindIII conteniendo 838 nucleótidos de la región 5' no codificadora y 404 pb de la región codificadora. Este fragmento se ligó en pauta de lectura al gen lacZ en el vector YIp356 (Myers y col., 1986) dando lugar al plásmido YIp1242 (Martínez-Campa y col., 1996).

Por último la fusión entre GLK1 y lacZ, se realizó fusionando un fragmento de 944 pb en el que estaban contenidos 63 pb de la región codificadora y el resto correspondiente a la región 5' no codificadora. Este fragmento se obtuvo por PCR utilizando como molde ADN genómico de la cepa DBY1315 y los oligonucleótidos 5'- ATCTGCAGTCGATGCTAACAAAG-

TTC-3' con sitio PstI y 5'-ATCTGCAGGGCCAAGGTAATGTTTT-3' con sitio EcoRI. El producto amplificado se digirió con los enzimas PstI y EcoRI y se subclonó en pauta con el gen lacZ en el vector YIp358R (Myers y col., 1986) digerido con los mismos enzimas resultando el plásmido YIp944 (Herrero y col., 1999).

Los plásmidos YIp621, YIp944 y YIp1242 se usaron para transformar las cepas DBY1315, DBY2052, DBY2184 y DBY2053, integrados en el locus URA3 en una única copia, confirmado mediante análisis Southern. Las cepas generadas se describen en la Tabla 2.1 de este capítulo.

El fragmento de ADN correspondiente al promotor completo de HXK2 fue aislado del vector pRS-HXK2 (Martínez-Campa y col., 1996) como un fragmento de 0.88 kb de extremos SphI-NcoI y subclonado en el vector pSP73-HG, digerido previamente con los mismos enzimas (este plásmido contiene la región codificadora completa del gen HXK2 y 254 pb de la región 5' no codificadora, siendo el tamaño de este fragmento de 2.75 kb). El plásmido resultante pSP73-HXK2, contiene el gen completo HXK2 bajo el control de su propio promotor en un fragmento de 3.35 kb de extremos SphI-EcoRI. Este fragmento fue subclonado en el vector YEp352 (Hill y col., 1986) y pJH215 dando lugar a los plásmidos YEp352-HXK2 y pJH215-HXK2 (Rodríguez y col., 2000).

Los oligonucleótidos 5'-ATGAACCATTTTATT-3' y 5'-GGTTCATGGCCG-ATGTG-3' se usaron para generar la construcción pSP73-HXK2 $\Delta$ K7M16 por PCR. El plásmido resultante pSP73-HXK2 $\Delta$ K7M16 se digirió con los enzimas SphI y EcoRI obteniéndose un fragmento de 3.35 kb que fue subclonado en los vectores YEp352 y pJH215 cortados previamente con los mismos enzimas. Los plásmidos resultantes, YEp352-HXK2 $\Delta$ K7M16 y pJH215-HXK2 $\Delta$ K7M16 presentan una delección de 30 nucleótidos entre las posiciones +19 y +48 del gen HXK2. La expresión de este gen mutado, genera una proteína truncada con actividad específica similar a la encontrada en Hxk2 silvestre, pero con una delección entre los aminoácidos Lys7-Met16 que le impide dirigirse al núcleo (Herrero y col., 1998). Estos plásmidos se usaron para transformar diferentes cepas y determinar el



efecto de Hxk2 sobre la expresión de los genes del sistema fosforilador de la glucosa.

### **5.7 Transformación de bacterias**

Para la transformación de bacterias con ADN plasmídico se prepararon células competentes de las cepas de *E. coli* descritas en el apartado 1 de este capítulo siguiendo el método de Hanahan, (1985).

Básicamente, las células se cultivaron en medio LB, cuya composición se describe en el apartado 2 de este capítulo, hasta que alcanzan una densidad óptica a 600 nm no superior a 0.6. Para hacerlas competentes se tratan sucesivamente con dos soluciones RF1 (RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 10 mM ajustada a un pH de 5.8), y RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, glicerol 15% a pH 6.8), y se almacenan a -70°C hasta su utilización. Para la transformación, el ADN plasmídico se añade en una proporción de 50 ng por cada 2x10<sup>8</sup> células, sembrándose a continuación en medio selectivo.

### **5.8 Transformación de levaduras**

Se ha utilizado el método descrito por Klebe y col., (1983).

Las células competentes se preparan a partir de un cultivo de células recogidas en fase de crecimiento exponencial, que se tratan con una solución que contiene sorbitol 1 M, bicina 10 mM y etilenglicol 3% a pH 8.35. A continuación se almacenan rápidamente a -70°C y se mantienen a esta temperatura un mínimo de dos horas antes de llevar a cabo la transformación. Las células preparadas siguiendo este método permanecen competentes varios meses. La cantidad de ADN plasmídico empleada en la transformación es de 5-10 µg ADN/10<sup>8</sup> células.

La selección de las células transformadas se realiza mediante crecimiento en un medio selectivo de acuerdo con el gen marcador presente en el plásmido introducido.

### **5.9 Preparación de sondas de ADN radiactivas**

Las sondas empleadas a lo largo de este trabajo (1-5 pmol de ADN) fueron marcadas radiactivamente con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP utilizando los kits comerciales Ready-To-Go o Redi-prime de la casa comercial Amersham Biosciences, basados en el método desarrollado por Feinberg y Vogelstein, (1983).

### **5.10 Hibridación ADN-ADN. Análisis Southern**

Esta técnica se empleó para detectar secuencias de ADN en el genoma de la levadura. En primer lugar se obtuvo ADN genómico según se indica en el apartado 5.3 de este capítulo. A continuación, el ADN se digirió con los enzimas de restricción convenientes y los fragmentos así obtenidos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7%. Seguidamente, según el protocolo descrito por Wahl y col., (1979), el ADN de doble hebra fue desnaturalizado por hidrólisis ácida tratando el gel con HCl 0.25 N, tras lo cual se neutralizó lavando el gel con NaOH 0.5 N, y se transfirió a un filtro de nitrocelulosa (Southern, 1975).

El filtro fue prehibridado durante 2 horas a 68°C en presencia de 5xSSPE (NaCl 3 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 0.2 M, EDTA 0.5 M a pH 7.4), 5xDenhardt's (suministrado por la casa comercial Sigma), SDS 10% y ADN de salmón 100 µg/ml. Posteriormente se hibridó a 68°C en presencia de la misma solución incorporando la sonda. El lavado de la membrana se realizó según Maniatis y col., (1982), y finalmente el filtro se expuso a autorradiografía.

### 5.11 Secuencia de los oligodesoxinucleótidos utilizados

Los oligodesoxinucleótidos correspondientes a las dos hebras del sitio MED8, solapando con el elemento ERA, presente en los genes regulados por glucosa fueron sintetizados con una secuencia nucleotídica protuberante TCGA en el extremo 5'-terminal. El motivo consenso encontrado en todos ellos aparece subrayado:

Secuencias consenso:

**Sitio MED8** (Med8), (C/A)(G/A)(G/A)AAAT (subrayado en AZUL)

**ERA** (Tef1), AAATGCA (subrayado en NEGRO)

**MED8<sub>GLK1</sub> sentido:**

5'-tcgaCAAGAAAAATGCACGCGTAACAAAATATATATATATA-3'

**MED8<sub>GLK1</sub> antisentido:**

5'-tcgaTATATATATATATATATTTTGTACGCGTGCATTTTCCTG-3'

**MED8<sub>HXK1</sub> sentido:**

5'-tcgaGACCTAAGAACTATGCATTTTTTTTTAAGGG-3'

**MED8<sub>HXK1</sub> antisentido:**

5'-tcgaCCCTTAAAAAAAAATGCATAGTTCTTAGGTC-3'

**MED8<sub>HXK2</sub> (DRS1) sentido:**

5'-tcgaCTTCATTTCCGAATTGGAAAAGGG-3'

**MED8<sub>HXK2</sub> (DRS1) antisentido:**

5'-tcgaCCCTTTTCCAATTCCGGAAAATGAAG-3'

**MED8<sub>HXK2</sub> (DRS2) sentido:**

5'-tcgaGAATCCGGTGATTTTCTTGGC-3'

**MED8<sub>HXK2</sub> (DRS2) antisentido:**

5'-tcgaGCCAAGAAATCACCGGATTC-3'

**MED8<sub>SUC2</sub> sentido:**

5'-tcgaGTTTAGGAAATTATCCGGGGGCGAAGAAATACGC-3'

**MED8<sub>SUC2</sub> antisentido:**

5'-tcgaGCGTATTTCTTCGCCCCCGGATAATTTCTCCTAAAC-3'

**MED8<sub>HXT1</sub> sentido:**

5'-tcgaACTAGGAAGAAATGCTGCAGGGCA-3'

**MED8<sub>HXT1</sub> antisentido:**

5'-tcgaTGCCCTGCAGCATTTCTTCCTAGT-3'

El oligonucleótido Universal 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y el oligonucleótido reverso 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3' se utilizaron para secuenciar el plásmido YEp351/insertoX recuperado a partir de la genoteca MW90 de *S. cerevisiae*. El oligonucleótido 5'-GCCTGTATGTGTCAGC-3' se utilizó para secuenciar el plásmido pNI9/MED8GLK1.

El resto de oligonucleótidos utilizados se describen a lo largo del capítulo de Resultados.

## 5.12 Fosforilación y anillado de oligodesoxinucleótidos

La fosforilación y anillado de los oligodesoxinucleótidos se realizó empleando T4 polinucleótido kinasa de acuerdo a Sambroock y col., (1989). Para realizar el anillado se empleó 5xannealing buffer (Tris-HCl 200 mM a pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, NaCl 250 mM) incubándose a 70°C y posteriormente enfriando lentamente hasta 30°C.

## 5.13 Relleno de los extremos cohesivos con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP

Para rellenar los extremos protuberantes de los oligodesoxinucleótidos se marcaron entre 1 y 5 pmol de cada fragmento de ADN fosforilado y anillado utilizando 2  $\mu$ l de klenow polimerase buffer (Tris-HCl 0.5 M a pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M), 2  $\mu$ l de una mezcla 1 mM de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP), 2  $\mu$ l de DTT 10 mM, 0.1  $\mu$ l de klenow polimerasa y 2  $\mu$ l de ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP, de acuerdo

a Sambrock y col., (1989). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos y los oligodesoxinucleótidos se purificaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial BIO 101 para Mermaid.

#### **5.14 Relleno de los extremos cohesivos con 14-dATP-Biotina**

Para rellenar los extremos protuberantes de los oligodesoxinucleótidos se marcaron 280 µg de cada fragmento de ADN fosforilado, anillado y ligado en tandem, utilizando 4 µl de klenow polimerase buffer (Tris-HCl 0.5 M a pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M), 4 µl de una mezcla 1 mM de dNTPs (dCTP, dGTP y dTTP), 4 µl de DTT 10 mM, 1 µl de klenow polimerasa y 4 µl de dATP14-Biotina. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos y los oligodesoxinucleótidos se purificaron mediante precipitación con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%. El ADN así obtenido se usó para llevar a cabo la cromatografía de afinidad Biotina-Streptavidina.

#### **5.15 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)**

El protocolo a seguir fue diseñado por Mullis y col., (1986) y modificado por Innis y col., (1990).

Se emplean 1 µg de ADN molde, 0.1 µg de los oligonucleótidos necesarios, 2.5 U de Taq ADN polimerasa (Amersham Biosciences), 0.2 mM de dNTPs (Roche Diagnostics) en un volumen de 50 µl, y se somete la mezcla de reacción a un proceso de 30 ciclos, donde cada ciclo consta de tres etapas sucesivas, la primera de 30 segundos a 94°C para separar las hebras del ADN molde, la segunda de 1.5 minutos a 55°C para que se produzca el anillado de los oligonucleótidos a las hebras del molde y la

elongación de los mismos por la polimerasa y una última etapa de 60 segundos a 72°C para finalizar el ciclo.

### **5.16 Secuenciación**

El método de secuenciación de ADN empleado fue el de terminación de la cadena con didesoxinucleótidos de Sanger y col., (1977). Para ello se utilizó el kit Sequenase suministrado por la casa Amersham Biosciences, que emplea una variante genética de la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Los productos de las reacciones de secuencia fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% en tampón TBE cuya composición se cita en el apartado 5.5 de este capítulo.

## **6.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL ARN**

### **6.1 Aislamiento de ARN total de levaduras**

El método empleado fue el descrito por Sherman y col., (1986).

El ARN se extrajo rompiendo las células con bolas de vidrio Ballotini (0.45-0.50 mm de diámetro) en presencia de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 0.01 M, Tris-HCl 0.01 M a pH 7.5, SDS 0.2%) y de fenol equilibrado con este mismo tampón. Posteriormente se realizaron varias extracciones con fenol/cloroformo y finalmente el ARN se precipitó con etanol enfriado a -20°C en presencia de LiCl 0.5 M.

La cuantificación del ARN se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm.

### **6.2 Separación de moléculas de ARN en geles de agarosa-formaldehído**

Los geles se prepararon según Lerach y col., (1977) en tampón MOPS a pH 7.0 (MOPS 0.2 M, acetato sódico 50 mM, EDTA 10 mM) que contenía agarosa al 1% y formaldehído al 1.9%. La electroforesis se realizó en el

mismo tampón. Las muestras de ARN se mezclaron en una proporción de 3:1 con un tampón de desnaturalización que contenía formamida desionizada al 50%, tampón MOPS a pH 7.0 al 10%, formaldehído al 15%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.05%. Las muestras se calentaron a 70°C durante 10 minutos para ser sometidas a continuación a electroforesis durante 2 horas a 70 V. Como patrones se utilizaron los marcadores internos correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S, así como ADN del fago lambda digerido con EcoRI y HindIII. Las bandas de ARN se visualizaron por la presencia de bromuro de etidio.

### **6.3 Hibridación ARN-ADN. Análisis Northern**

Para cuantificar niveles de transcripción en distintas condiciones metabólicas, se recurrió a la hibridación de sondas radiactivas de ADN con preparaciones de ARN mensajero, previamente transferidas a un filtro de nitrocelulosa siguiendo el mismo protocolo que el empleado para el ADN (Southern, 1975). La prehibridación e hibridación se realizaron según ha descrito Thomas, (1980), durante una noche a 42°C. El lavado del filtro se realizó según Maniatis y col., (1982). Finalmente, el filtro fue expuesto a autorradiografía.

## **7.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS**

### **7.1 Obtención de extractos proteicos libres de células**

Los extractos proteicos fueron preparados de la siguiente forma: se inocularon células de levadura en medios ricos (YEPD e YEPE) o mínimos, carentes del marcador o marcadores correspondientes (SCD y SCE) y se incubaron a 28°C y 200 rev/min de agitación hasta una densidad óptica a 600 nm igual a 1.0 creciendo en glucosa y 2.0 creciendo en etanol. Las

células se recogieron por centrifugación y se lavaron con tampón Z (16.1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 5.5 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.27% β-mercapto-etanol, ajustado a pH 7.0). Posteriormente se rompieron en 1 ml del mismo tampón y volúmenes iguales de bolas de vidrio Ballotini (0.45-0.50 mm de diámetro) durante 10 minutos en un IKA-VIBRAX-VXR a 4°C. La suspensión resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos tras lo cual se recogió el sobrenadante, que constituye el extracto libre de células utilizado para la cuantificación de proteína.

## **7.2 Determinación de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Lowry y col., (1951), utilizando seroalbúmina bovina para construir simultáneamente una recta patrón.

## **7.3 Secuenciación de proteínas: Identificación mediante fingerprinting y fragmentación PSD**

La secuenciación de la proteína fue llevada a cabo en el laboratorio de proteómica del CNB-CSIC. La proteína se digirió in situ en el gel con tripsina y los péptidos trípticos generados se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Reflex III dotado con extracción retardada de iones, obteniéndose así el fingerprinting de la proteína digerida. Las masas peptídicas obtenidas se volcaron en el programa ProFound para cotejarlas con las procedentes de la digestión tríptica teórica de todas las proteínas presentes en la base de datos en el intervalo de masas de 45 a 65 kDa sin más restricciones. Así se obtuvo una lista de proteínas candidatas donde la principal arrojaba una probabilidad del 99%, siendo la probabilidad de las restantes mucho menor. Por otro lado, se seleccionó el péptido con  $m/z = 1326.700$  cuya secuencia es



EHALLAFTLGVR, para realizar un experimento de fragmentación PSD (Post Source Decay, Decaimiento-Post-Fuente) a fin de obtener información de secuencia. Aunque dicho péptido sólo pudo fragmentarse parcialmente, los fragmentos registrados corroboraron hasta el 50% de la secuencia indicada, confirmando así la identificación derivada del fingerprinting peptídico.

#### **7.4 Determinación de la actividad fosforiladora de hexosas**

##### **7.4.1 Actividad fosforiladora de la glucosa**

Para valorar la actividad fosforiladora de la glucosa se ha seguido el método descrito por Chou y Wilson, (1975). Se basa en la medida espectrofotométrica del incremento de la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH por acoplamiento con la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contiene 0.9 ml de glucosa 3.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 7.5 mM disueltos en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 7.5, 0.2 ml de NADP<sup>+</sup> 25 mg/ml, 0.2 ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (100 U/ml) y 0.5 ml de ATP 15 mM a pH 7.0.

##### **7.4.2 Actividad fosforiladora de la fructosa**

Para valorar la actividad fosforiladora de la fructosa se ha seguido el método descrito por Hirai y col., (1977). Cuando se utiliza la fructosa como sustrato, en la mezcla de reacción descrita anteriormente se sustituye por fructosa 25 mM y se le adiciona 0.2 ml de fosfoglucoisomerasa (100 U/ml).

#### **7.5 Determinación de la actividad invertasa**

La actividad invertasa se determina siguiendo el método descrito por Gascón y Lampen, (1968), con algunas modificaciones, y que consta de dos

etapas sucesivas. En la primera tiene lugar la hidrólisis de la sacarosa por el enzima y en la segunda se valora la glucosa liberada.

A 50  $\mu$ l de la preparación enzimática se le adicionan 100  $\mu$ l de tampón acetato 0.1 M a pH 5.0 y 50  $\mu$ l de sacarosa 0.5 M. Se incuba a 30°C durante 15 minutos al cabo de los cuales se añaden 2 ml de una mezcla que contiene 200  $\mu$ g de glucosa-oxidasa, 10  $\mu$ g de peroxidasa y 60  $\mu$ g de ortodianisina. La reacción se detiene por cambio brusco del pH al adicionar 2.5 ml de HCl 6 N. El color desarrollado se lee a 540 nm.

## **7.6 Determinación de actividades $\beta$ -galactosidasa**

### **7.6.1 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa en colonias de levadura transformadas con vectores de expresión**

El método consistió básicamente en replicar las colonias a filtros de nitrocelulosa Millipore tipo HA. Los filtros se atravesaron con una aguja de forma asimétrica y se dejaron en contacto con la placa durante aproximadamente 10 minutos. A continuación se sumergieron en un recipiente metálico conteniendo nitrógeno líquido durante no más de 10 segundos, con el fin de permeabilizar las células, e inmediatamente se colocaron sobre una placa Petri conteniendo un papel Whatman 3MM humedecido con 2 ml de solución A (2 ml tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0, 7.5  $\mu$ l (0.6 mg) de una solución de X-Gal de 80 mg/ml). Se taparon las placas y se incubaron a 30°C en estufa hasta la aparición del color.

### **7.6.2 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa**

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó siguiendo el método descrito por Miller, (1972). La reacción se realizó en tampón Z (16.1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 5.5 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l

MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.27% β-mercapto-etanol, ajustado a pH 7.0) al cual se le adicionó 200 μl del extracto proteico sin centrifugar. La reacción enzimática se inició añadiendo el sustrato o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (ONPG) a una concentración final de 0.8 mg/ml siendo el volumen final de la reacción de 1 ml. Las muestras se incubaron a 30°C hasta la aparición de color, parándose la reacción con 500 μl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. A continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm con objeto de eliminar los restos celulares. El color desarrollado se lee a 420 nm.

La unidad de actividad específica se define como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 μmol de ONPG por minuto y por mg de proteína en las condiciones del ensayo. El coeficiente de extinción molar a 420 nm para el ONPG ( $\epsilon_{420}$ ) es de  $4.5 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **7.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Las proteínas presentes en los extractos libres de células se separaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y β-mercaptoetanol siguiendo fundamentalmente el método descrito por Britton y col., (1982). El gel de empaquetamiento fue preparado a partir de una disolución de acrilamida y N,N'-metilen-bis-acrilamida al 3.5% y el gel de separación a partir de la misma disolución al 12%. El método se basa en el hecho de que en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (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 ánodo, de forma que el desplazamiento es inversamente proporcional al logaritmo de la masa molecular.

## **7.8 Purificación de proteínas unidas a GST en columnas de glutation-sepharosa**

El método consiste en poner en contacto un extracto celular enriquecido en la proteína de interés fusionada a GST con una columna de glutation-sepharosa (Amersham Biosciences) a un pH fisiológico para que la GST interaccione con el glutation de la columna. Después de lavar varias veces la columna para eliminar posibles contaminantes se procede a eluir la proteína de interés en un tampón de alto pH enriquecido en glutation; o bien se procede a escindir dicha proteína de la GST mediante digestión con 2.5 U de la proteasa trombina durante 2 horas a 4°C. Para ello, la cepa de *E. coli* BL21 se transformó con los vectores pGEX-2T o 4T-1 conteniendo el gen de interés. Se cultivó durante una noche a 37°C un preinóculo de una colonia en 10 ml de LB con ampicilina, que a la mañana siguiente se diluyó con 100 ml del mismo medio. Se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM cuando las células se encontraban a una DO600 de 0.6 y se siguió la inducción a 37°C durante 4 horas.

Se comprobó que la inducción era máxima a las 3 horas de añadir el IPTG. Se recogieron las células, se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM a pH 7.3) o de Tris-HCl 50 mM a pH 7.5. Se les añadió 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 y el extracto libre de células se puso en contacto con 100 µl de glutation-sepharosa 4B equilibrados con 5 ml de PBS durante un mínimo de 1 hora a 4°C y con agitación. Se retiró el extracto y se lavó la columna con 5 ml de PBS antes de eluir la proteína fusionada a GST con 10 mM glutation en Tris-HCl 250 mM a pH 8.5 o bien mediante PBS con 2.5 U de trombina con el fin de escindir la proteína de interés de

la GST. Se recogieron 5 fracciones de elución de 200  $\mu$ l para analizar por SDS-PAGE.

### **7.9 Purificación de proteínas etiquetadas con histidinas en columnas de níquel**

La cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados es una técnica basada en las propiedades quelantes de las proteínas. El método se basa en la capacidad de las histidinas para complejar al níquel (II). La proteína de interés, se sintetiza con una cola de seis histidinas, siendo capaz de formar compuestos de coordinación con metales de transición como el níquel. De esta manera son las cadenas de histidina, al actuar como dadoras de electrones, las responsables de la capacidad quelante. Esta proteína de fusión con la etiqueta de afinidad se pone en contacto con una columna Ni-NTA de Amersham Biosciences. Tras sucesivos lavados de la misma, se procede a la elución de la proteína en presencia de altas concentraciones de imidazol, que compite con las histidinas por la complejación del níquel.

Para ello, la cepa de *E. coli* XL1-Blue se transformó con el vector pQE30 conteniendo el gen de interés. Se cultivó durante una noche a 37°C un preinóculo de una colonia en 10 ml de LB con ampicilina, que a la mañana siguiente se diluyó con 100 ml del mismo medio. Se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM cuando las células se encontraban a una DO600 de 0.6.

Transcurridas 3 horas de inducción se recogieron las células, se lavaron y se resuspendieron en 1ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM). Se les añadió 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 y el extracto libre de células se puso en contacto con 100  $\mu$ l de Ni-NTA (Amersham Biosciences) previamente equilibrados con 5 ml del mismo tampón. Se mantuvo la mezcla en agitación a 4°C durante 1 hora, tras lo cual se lavó la columna con 5 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM) y se eluyó la proteína en 5 pasos con 200  $\mu$ l de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM). Finalmente, las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE.

## **8.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS**

### **8.1 Transferencia electroforética de proteínas desde geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa**

La transferencia de proteínas separadas en geles de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa se realiza según el método descrito por Burnette, (1981), utilizando el equipo comercializado por BIO-RAD. La transferencia se lleva a cabo 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, y utilizando membranas de Immobilon-P (Millipore).

Para verificar la eficacia de la transferencia se tiñe el filtro de nitrocelulosa con rojo Ponceau (Ponceau S al 0.01% p/v en ácido acético glacial al 0.1% v/v), a fin de visualizar las proteínas. Una vez comprobado, se elimina el colorante lavando el filtro con TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, tween 20 al 0.1%), para proceder a la inmunodetección de los antígenos.

## **8.2 Inmunodetección de antígenos: Western-Blot**

Una vez transferidas las proteínas al filtro de nitrocelulosa, se incuba éste durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente en solución de bloqueo TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM a pH 7.5, NaCl 150 mM, tween 20 al 0.1%) con 5% de leche en polvo). A continuación se añade el correspondiente anticuerpo, diluido convenientemente (1:10.000) en TBS-Tween con un 5% de leche en polvo y se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar el filtro varias veces con TBS-Tween se incuba 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente con una dilución 1:10.000 de anticuerpo secundario proteína A peroxidasa (Roche Diagnostics) en TBS-Tween.

Finalmente se lava el filtro con TBS-Tween y se procede al revelado de los complejos antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia, según las instrucciones de Amersham Biosciences para el kit comercial ECL.

## **9.- MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ADN-PROTEÍNA**

### **9.1 Ensayos de retardo en gel**

El ensayo de retardo en gel es uno de los métodos más utilizados en el análisis cualitativo y cuantitativo de las interacciones ADN-proteína. Se basa en la observación de que la movilidad electroforética de un ácido nucleico a través de un gel de poliacrilamida puede ser alterada cuando una proteína se ha unido a él.

#### **9.1.1 Preparación de extractos citosólicos**

Para obtener los extractos citosólicos las células fueron cultivadas en medios ricos (YEPD e YEPE), con las condiciones de crecimiento adecuadas, hasta una DO600 de 1.0 para las células crecidas en glucosa y de 2.0 para las células crecidas en etanol. Posteriormente fueron recogidas

y lavadas con sorbitol 1 M. La rotura de las mismas se llevó a cabo en un tampón que contiene glicerol al 25%, HEPES 20 mM a pH 8.0, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y NaCl 0.42 mM, añadiendo para la rotura un volumen igual de bolas de vidrio Ballotini (0.45-0.50 mm de diámetro). Tras romper durante 10 minutos en un IKA-VIBRAX-VXR a 4°C la suspensión resultante se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. El sobrenadante obtenido constituye el extracto proteico utilizado en los ensayos de retardo en gel.

### **9.1.2 Preparación de extractos nucleares**

Para obtener los extractos nucleares, se crecieron las células en medios ricos (YEPD e YEPE), con las condiciones de crecimiento adecuadas. Los núcleos de levadura se obtienen a partir de protoplastos (se trata de una célula de levadura sin pared celular, es decir, la membrana plasmática y todo el contenido interior). Para obtener protoplastos, las células de levadura se crecieron en 300 ml del medio correspondiente (YEPD e YEPE) hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0 para las células crecidas en glucosa y de 2.0 para las células crecidas en etanol. El peso en gramos del pellet celular húmedo se consideró como 1 volumen (en ml) para los sucesivos pasos del protocolo. Se lavó con 2-4 volúmenes de agua estéril y se resuspendió en 1 volumen de tampón de zymoliasa (Tris-HCl 50 mM a pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sorbitol 1 M) con DTT 30 mM. Se incubaron las células en dicho tampón durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, se centrifugaron y se resuspendieron en 3 volúmenes de tampón de zymoliasa con DTT 1 mM. Se añadieron 200 unidades de zymoliasa por mililitro de volumen celular original y se incubaron las células durante 1 hora a 30°C en agitación. La formación de protoplastos se verificó por la lisis osmótica en agua de los mismos, tras lo cual se lavaron en tres pasos con 2 volúmenes de tampón de zymoliasa con



DTT 1 mM, con objeto de eliminar de la preparación las enzimas componentes de la zymoliasa.

El pellet constituido por los protoplastos lavados se resuspendió en varios volúmenes de tampón de Ficoll (Ficoll-400 al 18%, Tris-HCl 10 mM a pH 7.5, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 3 mM, PMSF 1 mM), y se homogeneizó mediante varios golpes de potter, produciéndose así la rotura de los protoplastos. Se centrifugó la suspensión a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares y los protoplastos no lisados. El sobrenadante se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C; este precipitado contiene los núcleos. La rotura de los mismos se llevó a cabo en un tampón que contiene glicerol 25%, HEPES 20 mM a pH 8.0, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y NaCl 0.42 mM con volúmenes iguales de bolas de vidrio Ballotini (0.2 mm de diámetro). Tras romper durante 10 minutos en un IKA-VIBRAX-VXR a 4°C la suspensión resultante se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde a los extractos nucleares utilizados en los ensayos de retardo en gel.

### **9.1.3 Marcaje de los fragmentos de ADN**

Se marcaron entre 1 y 5 pmol de cada fragmento de ADN fosforilado y anillado, tal y como se describe en el apartado 5.13, con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP en presencia de DTT 10 mM (2  $\mu$ l), Fragmento Klenow (0.1  $\mu$ l), tampón Klenow (2  $\mu$ l), 1 mM dNTPs (dTTP, dATP, dGTP) (2  $\mu$ l), en un volumen final de 20  $\mu$ l. A continuación se incubaron a T<sup>a</sup> ambiente durante 25 minutos y se purificaron siguiendo la metodología recomendada por la casa comercial Bio 101 para Mermaid.

#### **9.1.4 Reacción de unión ADN-proteína**

Para los ensayos de retardo en gel, se mezclaron (90 µg/µl) del extracto proteico obtenido según se describe en los apartados 9.1.1 y 9.1.2 con 1 µl de ADN marcado radiactivamente (apartado 9.1.3), 1 µl de poly dI-dC (4 mg/ml), 5 µl de un tampón que contiene HEPES 50 mM a pH 7.0 y DTT 5 mM, en un volumen final de 25 µl. La mezcla se incubó durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente y se le añadieron 2.5 µl de tampón de electroforesis (glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4%, xileno cianol 0.4%). Los complejos ADN-proteína se separaron del ADN libre por electroforesis nativa en gel de poliacrilamida del 4%. El gel fue precorrido durante 45 minutos en 0.5xTBE, y corrido en el mismo tampón. Posteriormente se secó el gel y se expuso a autorradiografía.

#### **9.2 Análisis Southwestern**

El protocolo utilizado fue el descrito por Miskimins y col., (1985), con las siguientes modificaciones:

El extracto proteico se mezcló con el tampón de disociación (Tris-HCl 62.5 mM a pH 6.8, SDS 3%, glicerol 10%, β-Mercaptoetanol 0.6 M, azul de bromofenol 0.01%), y se hirvió durante 3 minutos.

Las proteínas se separaron por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE), a 15 V/cm, durante 2 horas en un gel al 12% de acrilamida y se transfirieron a un papel de nitrocelulosa utilizando un Mini Trans-Blot (BIO-RAD) a 100 V en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM a pH 8.8, glicina 192 mM, metanol 20% v/v).

El papel de nitrocelulosa se secó a T<sup>a</sup> ambiente y se sumergió en el tampón de unión (HEPES 25 mM a pH 7.6, KCl 60 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM) suplementado con cloruro de guanidinio 6 M, con el que se mantuvo lentamente en agitación durante 10 minutos. En lavados sucesivos se

disminuye la concentración de cloruro de guanidinio hasta que finalmente es eliminado. El filtro es bloqueado con una solución que contiene tampón de unión, leche en polvo 0.25% y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón durante 1 hora a  $T^a$  ambiente, lavándose a continuación con tampón de unión para eliminar la leche. Posteriormente el filtro se hibrida con una solución que contiene 6  $\mu\text{l}$  de fragmento marcado radiactivamente (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  poly[d(I-C)] (4 mg/ml), 15  $\mu\text{l}$  del tampón que contiene HEPES 50 mM a pH 7.0 y DTT 5 mM, 36  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O y 42  $\mu\text{l}$  del tampón de unión descrito previamente e incubándose toda la noche a  $T^a$  ambiente.

Finalmente, el filtro se lavó con tampón de unión y se expuso a autorradiografía.

### **9.3 Análisis “UV-Crosslinking”**

La irradiación de los complejos ADN-proteína con luz ultravioleta provoca uniones covalentes entre el ADN y las proteínas que están en contacto. Por ello es una técnica utilizada para determinar el peso molecular de las proteínas que interaccionan de forma específica con el ADN.

El procedimiento puede dividirse en tres pasos; el primero consistente en la incubación del extracto conteniendo las proteínas de interés con un fragmento de ADN uniformemente marcado y que contiene un sitio de unión para la proteína. Se marcó el fragmento de ADN fosforilado y anillado con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP, tal y como se describe en el apartado 5.13, y se llevó a cabo una reacción de unión como la descrita en el apartado 9.1.4.

El segundo paso consistió en la irradiación con luz UV de los complejos ADN-proteína y posterior digestión con nucleasa del ADN no protegido dejando sólo aquellos fragmentos de ADN que están en contacto con la proteína. La irradiación se llevó a cabo en UV Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 desde 5 a

60 minutos a 5 cm de distancia y con luz UV de 305 nm e intensidad de 7000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Para la digestión con nucleasa se añadió a la reacción de unión 1  $\mu\text{l}$  DNasa I (4  $\mu\text{g}$ ) y 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  0.5 M manteniéndose 30 minutos a 37°C. El tercer paso consistió en determinar el peso molecular de las proteínas unidas al ADN por electroforesis SDS-PAGE seguido por autorradiografía.

#### **9.4 Purificación de proteínas que se unen al ADN utilizando sistemas de afinidad Biotina/Streptavidina**

El protocolo utilizado fue el descrito por Ausubel y col., (1995).

El sistema de purificación Biotina/Streptavidina está basado en la fuerte unión irreversible del complejo que forman estos compuestos con el ADN, y por tanto se utilizó para la purificación de proteínas que se unen de forma específica a secuencias de ADN. Los oligonucleótidos que contienen la secuencia de interés fueron fosforilados en el extremo 3' con T4 polinucleótido quinasa, anillados y ligados con T4 ADN ligasa para obtener cadenas multiméricas, que fueron biotinizadas como se describe en el apartado 5.14. Se llevó a cabo una reacción de unión incubando un extracto proteico (200  $\mu\text{g}$ ) (descrito para la obtención de los extractos celulares utilizados en los experimentos de retardo en gel, apartado 9) con el ADN biotinizado (280  $\mu\text{g}$ ), 3  $\mu\text{l}$  de poly[d(I-C)] (4 mg/ml), 20  $\mu\text{l}$  de un tampón que contiene HEPES 50 mM a pH 7.0 y DTT 5 mM, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . La mezcla se incubó durante 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente en las condiciones de la reacción de unión.

Se equilibraron 0.5 ml de agarosa-Streptavidina (Sigma) con tampón F (HEPES 10 mM a pH 7.6, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, DTT 1.0 mM, Nonidet P-40 0.2%, PMSF 0.1 mM, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de poly[d(I-C)]), y se añadió a la mezcla de ADN y extracto proteico.

Después de incubar durante 4 horas a 4°C, la mezcla se cargó en una columna de 1 ml y se lavó varias veces con el tampón N (HEPES 10 mM a pH 7.6, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.1 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 10%). Las proteínas unidas al ADN-Biotina/Streptavidina se eluyeron en tampón B (Tris-HCl 10 mM a pH 6.8, DTT 1.0 mM, EDTA 0.1 mM, Nonidet P-40 0.2%, PMSF 0.1 mM, glicerol 10%) con un gradiente discontinuo de KCl (50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 500 y 750 mM) (Bassel-Duby y col., 1992; Kadonaga, 1991). Se recogieron fracciones de 150 µl a diferentes concentraciones. Las alícuotas de las fracciones se analizaron mediante un gel de SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas tiñendo el gel con azul de Coomassie.

## **10. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA**

### **10.1 Sistema del doble-híbrido**

Para la detección de interacciones proteína-proteína se ha utilizado el kit MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 de la casa comercial CLONTECH, basado en el sistema del doble-híbrido descrito por Fields y Song, (1989).

Dicho sistema permite seleccionar, a partir de una genoteca, las proteínas que interaccionan con una proteína conocida que se utiliza como cebo. También permite, de una forma más directa, detectar la interacción entre dos proteínas conocidas. El kit incluye elementos que reducen la incidencia de falsos positivos y ayudan a identificar y a confirmar las interacciones proteína-proteína.

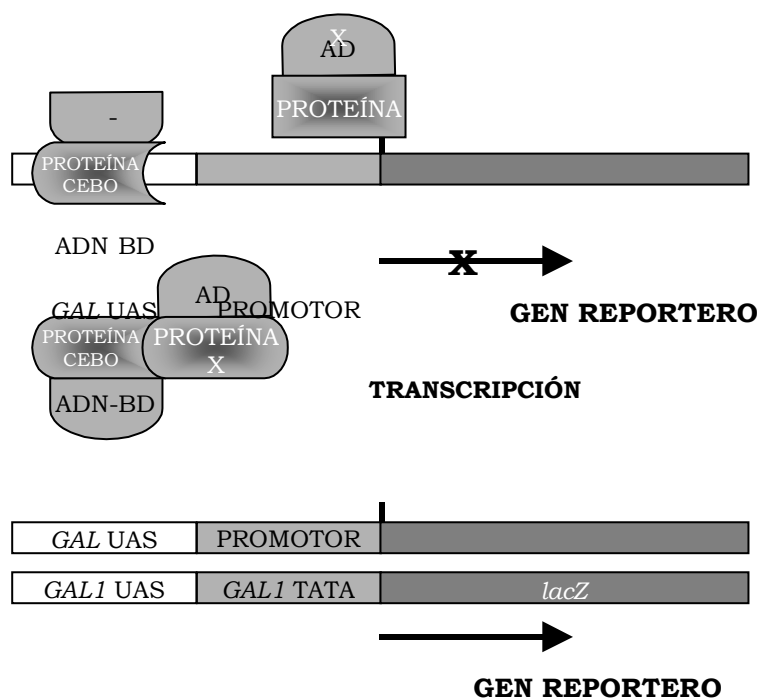
El fundamento del método se presenta esquemáticamente en la Fig. 2.1. La proteína Gal4 activa la expresión del gen GAL1 a través de dos dominios en su secuencia: un dominio de unión a elementos reguladores en cis

(Gal4BD) y un dominio de activación (Gal4AD). Ninguno de los dominios es capaz por se de activar la transcripción.

El kit cuenta con dos cepas de *S. cerevisiae*: AH109, recomendada para seleccionar proteínas que interaccionan con una dada a partir de una genoteca, e Y187, recomendada para comprobar la interacción entre dos proteínas conocidas. En este trabajo solamente se ha utilizado la cepa Y187, cuyo genotipo se especifica en el apartado 1.1 de este capítulo. La cepa AH109 contiene integradas en su genoma tres construcciones de tal forma que los genes HIS3, ADE2 y lacZ, que se usan como marcadores, se expresan bajo el control de tres promotores heterólogos que contienen respectivamente las secuencias de las UAS de los genes GAL1, GAL2 y MEL1. La cepa Y187 cuenta con una única construcción integrada en su genoma, donde lacZ se expresa bajo el control de un promotor que contiene la UAS de GAL1. El kit también proporciona los vectores pGBKT7 y pGADT7, descritos en el apartado 3 de este capítulo (Figs. 6 y 7), diseñados para expresar dos tipos de proteínas recombinantes. El primero permite expresar proteínas fusionadas al dominio de unión de Gal4, al que nos referiremos como Gal4BD, o simplemente BD. A dicho dominio se fusiona el gen que codifica la proteína que se quiere utilizar como cebo. El segundo permite expresar proteínas fusionadas al dominio de activación, al que nos referimos como Gal4AD, o simplemente AD. A este dominio se fusionan los fragmentos de la genoteca que se desea utilizar, o bien el gen que codifica la segunda proteína de la cual queremos averiguar si interacciona con el cebo. Con el mismo fin se pueden utilizar los vectores pGBT9 y pACT2, análogos a pGBKT7 y pGADT7 respectivamente.

Para comprobar si dos proteínas interaccionan, una vez se tienen las construcciones pGBKT7-GENA y pGADT7-GENB, se procede a transformar con ambas la cepa Y187 de *S. cerevisiae*, seleccionando los

cotransformantes en placas de medio mínimo sin triptófano y sin leucina, marcadores de los vectores pGBKT7 y pGADT7 respectivamente.



**FIGURA 2.1.- FUNDAMENTO DEL SISTEMA DEL DOBLE-HÍBRIDO.**

El método se basa en co-transformar la cepa Y187 de *S. cerevisiae* de tal forma que pueda producir simultáneamente una proteína fusionada al dominio de unión de Gal4 y otra a su dominio de activación. Si las dos proteínas interactúan se formará un complejo donde estarán presentes los dominios de unión y de activación de Gal4, permitiendo la inducción de la expresión de cualquier promotor Gal4-dependiente.

Asimismo, se obtienen extractos proteicos de los transformantes seleccionados en los que se ensaya la actividad  $\beta$ -galactosidasa, comparándola con las de una serie de cepas que se utilizan como controles. Para la valoración cualitativa de expresión del gen reportero *lacZ* se utilizó

X-gal como sustrato cromógeno para  $\beta$ -galactosidasa en filtro. Para la determinación cuantitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la absorbancia a 420 nm fue normalizada con la proteína total expresándose en mU/mg. La expresión de los niveles de las proteínas de fusión GAD y GBD fue controlada mediante análisis Western. Los experimentos fueron realizados un mínimo de tres veces mostrando valores representativos de los experimentos individuales. De establecerse interacción entre las dos proteínas, la unión de los dominios de Gal4 necesarios para activar la expresión del gen GAL1, nos permitiría detectarla, con sólo comprobar la expresión de lacZ.

### **10.2 Coprecipitación o pull-down como fusiones con GST**

La coprecipitación de proteínas es una técnica apropiada para testificar interacciones físicas entre proteínas de interés, sirviendo como apoyo al sistema del doble-híbrido. 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 glutation-sepharosa. Para ello, los vectores de expresión de proteínas fusionadas a GST (pGEX-HXK2 y -HXK2-C70) se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21 y las células se crecieron hasta alcanzar una DO600 de 0.6, momento en el cual se inducen con 0.5 mM de IPTG a 37°C durante 3 horas. Las células inducidas se recogen por centrifugación y se resuspenden en 1 ml de PBS (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM a pH 7.3). Se les añadió 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 libre de células se incubó con 100  $\mu$ l de glutation-sepharosa 4B equilibrados con 5 ml de PBS durante un mínimo de 1 hora a 4°C y con



agitación. Se retiró el extracto, se lavó la columna con 5 ml de PBS y se resuspendió en el mismo tampón. Las proteínas de fusión GST-Hxk2 y GST-Hxk2C70 acopladas a la resina fueron incubadas con 2.5 U de trombina durante 2 horas a 4°C con el fin de escindir la proteína de interés de la GST. Iguales cantidades de GST, GST-Med8 y GST-Mig1 acopladas a la resina de glutathion-sepharosa fueron incubadas con las proteínas purificadas Hxk2 y Hxk2C70 como se mencionó anteriormente, o con extractos proteicos de células de levadura de las cepas DBY1315 y DBY2052, durante 1 hora a 4°C en tampón PBS. Transcurrido este tiempo se lavó exhaustivamente la resina con 2.5 ml de PBS y se hirvió en 25 µl de tampón de disociación (Tris-HCl 50 mM a pH 6.8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%). Se analizó mediante SDS-PAGE seguida de análisis Western usando anticuerpos anti-Hxk2. El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia, según las instrucciones de Amersham Biosciences para el kit comercial ECL.

### **10.3 Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación es una técnica en la cual un antígeno es aislado por unión a un anticuerpo específico adherido a una matriz con capacidad para sedimentar. Estos experimentos fueron llevados a cabo utilizando extractos proteicos conteniendo las proteínas que interaccionan según el método descrito por Anderson y Blobel, (1983) con algunas modificaciones. Los extractos se incubaron con 1 µl de anticuerpo anti-Hxk2 durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se añadieron 200 µl de proteína A-Sepharosa (Amersham Biosciences) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó la Sepharosa con tampón Staph A (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM a pH 7.3, Tritón X-100 al 20%, SDS 1%

y deoxicolato 5%) y el inmunoprecipitado fue hervido en tampón de disociación. Se analizó mediante SDS-PAGE al 12% y se detectó por análisis Western usando anticuerpos anti-HA (HA, hemaglutinina). El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia, según las instrucciones de Amersham Biosciences para el kit comercial ECL.

A lo largo de la Introducción hemos descrito a través de qué secuencias reguladoras se controla a nivel transcripcional el sistema de fosforilación de la glucosa en *S. cerevisiae*. Sin embargo, a pesar de los grandes avances que se están realizando entorno a la represión por glucosa en levaduras, son muchos los mecanismos que aún permanecen sin esclarecer.

Destacamos algunos de los antecedentes que nos darán pié a desarrollar nuestros objetivos:

- Las secuencias de ambas DRSS de HXK2 también se encuentran en el promotor del gen SUC2 (Bu y Schmidt, 1998) portando un motivo común de 7 pb cuya secuencia es (C/A)(G/A)(G/A)**AAAT**.
- Recientemente, se ha identificado la proteína Med8, la cual interacciona con ambas secuencias comunes en los genes HXK2 y SUC2.
- La proteína Hxk2, a la que consideramos una pieza clave en la represión por glucosa por su localización nuclear, participa en la formación de complejos ADN-proteína con esta secuencia identificada en el gen SUC2 (Herrero y col., 1998); ya que la adición de anticuerpos anti-Hxk2 a la mezcla de reacción ADN-proteína consigue desplazar el complejo formado hacia una posición de menor movilidad electroforética. Esto sólo es posible si Hxk2 forma parte de dicho complejo.

Hemos encontrado que esta secuencia heptamérica también se ha localizado en los promotores de los genes HXT1, HXK1 y GLK1 solapando con el elemento ERA a través de la secuencia **AAAT**GCA en el caso de *HXK1* y *GLK1*.

Estos hallazgos sugieren un mecanismo de regulación coordinada de la expresión de tales genes a través de dicha secuencia con la participación de la proteína Hxk2, lo que nos ha llevado a planificar y llevar a cabo distintas estrategias con un objetivo común: la identificación de los factores

transcripcionales implicados en la regulación a través de estos elementos y su mecanismo de acción.

Uno de los primeros objetivos es el estudio de la participación de la proteína Hxk2 en la transducción de la señal de represión por glucosa a través del motivo heptamérico o sitio MED8 (C/A)(G/A)(G/A)**AAAT** presente en los promotores de los genes del sistema de fosforilación de la glucosa. Para ello, se determinó cómo afecta Hxk2 en la expresión de *HXK1*, *GLK1* y *HXK2* mediante análisis *Northern* y ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

Ya que este motivo heptamérico solapa con el elemento ERA (**AAATGCA**) encontrado en los promotores de los genes *HXK1* y *GLK1*, nos propusimos como segundo objetivo identificar proteínas que se unen directamente a ésta secuencia del gen *GLK1* mediante análisis *Southwestern* y *Croslinking* y su posterior purificación a través de técnicas de cromatografía de afinidad. Además también se llevó a cabo la obtención de mutantes reguladores afectados en la represión del gen *GLK1* a través del sitio MED8.

Por último nuestro tercer objetivo ha sido el análisis de interacciones proteína-proteína entre Hxk2 y factores transcripcionales implicados en esta vía de señalización por glucosa. Para ello se realizaron experimentos de doble-híbrido, coprecipitación e inmunoprecipitación.

## **1.- LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL SISTEMA DE FOSFORILACIÓN DE LA GLUCOSA ESTÁ CONTROLADA POR LA PROTEÍNA Hxk2 NUCLEAR**

El producto del gen *HXK2*, es un enzima fosforilador de la glucosa en *S. cerevisiae* que parece tener dos papeles fisiológicos en la célula. Por un lado, es el responsable del primer paso de la vía glucolítica, la fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato. Por otro lado, se ha descrito que Hxk2 está involucrada en la inducción y represión transcripcional por glucosa de

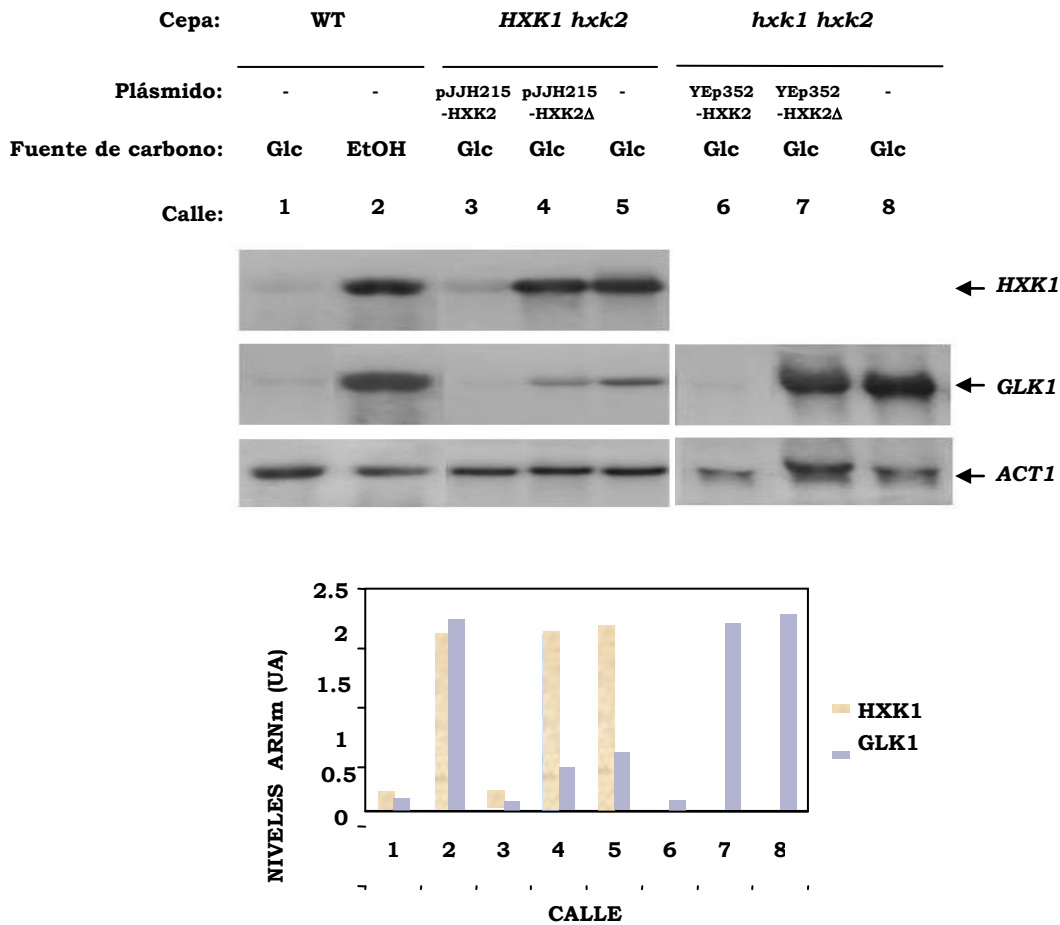
diferentes genes (Gancedo, 1998; Johnston, 1999). Además un gen mutante *HXK2Δ* (*HXK2ΔK<sup>7M16</sup>*) con una delección de 30 pb entre los nucleótidos +19 y +48, no puede llevar a cabo la represión por glucosa. La ausencia de este decapeptido en Hxk2 afecta a su localización nuclear, la cual es requerida para la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998).

Esta segunda función de Hxk2 no es compartida por los otros dos enzimas fosforiladores de glucosa presentes en la levadura, hexoquinasa 1 (Hxk1) y glucoquinasa (Glk1) (Gancedo, 1998). La expresión de los genes que codifican para estas proteínas tiene lugar cuando el medio de cultivo contiene fuentes de carbono no fermentables o galactosa (Herrero y col., 1995).

Con estos antecedentes y ya que la función in vivo de Hxk1 y Glk1 está aún sin determinar hemos propuesto una nueva función para Hxk2, como un factor controlador de la expresión génica del sistema fosforilador de la glucosa de *S. cerevisiae*.

### **1.1 Expresión de los genes HXK1 y GLK1 en presencia y ausencia de la proteína Hxk2**

El posible efecto regulador que Hxk2 puede ejercer sobre la expresión de los genes *HXK1* y *GLK1* se determinó mediante análisis *Northern*, con extracción de ARN total aislado de una cepa silvestre (*HXK1 HXK2 GLK1*) y dos cepas mutantes isogénicas, *hxk2Δ* y *hxk1Δhxk2Δ*. La cepa silvestre se creció en dos fuentes de carbono diferentes, en condiciones de represión (glucosa) y de desrepresión (etanol). Por el contrario las cepas mutantes y sus derivadas transformadas con plásmidos episomales se crecieron sólo en medio con glucosa. El ARN total fue aislado y extraído tal y como se describe en el apartado 6 de *Materiales y Métodos*.



**FIGURA 3.1.- EFECTO DE LA DISRUPCIÓN DEL GEN *HXK2* SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *HXK1* Y *GLK1* Y EFECTO DE LA DISRUPCIÓN DE LOS GENES *HXK1* Y *HXK2* SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *GLK1*.**

Las cepas de levadura DBY1315 (cepa silvestre con genotipo *HXK1 HXK2 GLK1*), DBY2184 (cepa mutante *HXK2Δ* con genotipo *HXK1 hck2 GLK1*), DBY2184 transformada con los plásmidos conteniendo *HXK2*- o *HXK2ΔK7M<sup>16</sup>*-, DBY2052 (cepa mutante *hck1Δ hck2Δ, hck1 hck2 GLK1*) y DBY2052 transformada con los plásmidos conteniendo *HXK2*- o *HXK2ΔK7M<sup>16</sup>*- fueron crecidas usando glucosa (Glc; YEPD) o etanol (EtOH; YEPE) como fuente de carbono, como se muestra en cada calle. Se aisló ARN total, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa horizontal y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que fue hibridada con sondas derivadas de *HXK1* y *GLK1*. Las sondas usadas se indican en la zona derecha de cada panel. Los niveles de ARNm fueron cuantificados en un *Instantimager*, y normalizados respecto a los niveles de ARNm de la actina (*Act1*). Los niveles de ARNm se expresan en unidades arbitrarias (UA).

Como sondas se utilizaron, por un lado un fragmento de ADN *Asp700-HindIII* de 1611 pb en el cual está contenida parte de la secuencia del gen *HXK1*, y por otro lado un fragmento de ADN *BglIII* de 1000 pb que contiene parte de la secuencia del gen *GLK1*; marcadas como se indica en el apartado 5.9 de *Materiales y Métodos*.

Los resultados se muestran en la [Fig. 3.1](#). Los niveles de ARNm fueron cuantificados mediante análisis densitométrico y normalizados con respecto a los niveles de ARNm de actina, expresándose en unidades arbitrarias.

Como previamente habían descrito Herrero y col., (1995), los genes *HXK1* y *GLK1* son reprimidos por glucosa y desreprimidos en ausencia de un azúcar preferencial o cuando las células crecen en etanol como fuente de carbono (calles 1 y 2). La delección del gen *HXK2* provoca un incremento en los niveles de *HXK1* de hasta 10 veces en el medio con glucosa (calle 5). Además cabe destacar que estos niveles en condiciones de represión de la cepa *hvk2Δ* son muy similares a los encontrados en la cepa silvestre crecida en etanol (comparar calles 2 y 5). Por tanto este patrón de regulación de *HXK1* es opuesto al encontrado en células conteniendo *HXK2*, indicando que la mutación *hvk2Δ* convierte al gen *HXK1* reprimible por glucosa en un gen no reprimible.

Para confirmar si la proteína Hvk2 es necesaria en la regulación del gen *HXK1*, se transformó el mutante *hvk2Δ* con dos plásmidos diferentes (Véase el apartado 5.6.1 de *Materiales y Métodos*); uno conteniendo el gen nativo *HXK2* bajo el control de su propio promotor y el otro conteniendo una versión trunca de *HXK2*, la cual genera una proteína similar a Hvk2 pero con la eliminación de la señal de localización nuclear como se comentó al

comienzo de este capítulo. Esta delección *HXK2ΔK<sup>7M16</sup>* (*HXK2Δ*) también está bajo el control del promotor del gen *HXK2*.

El fenotipo silvestre se restauró después de transformar la cepa mutante *hvk2Δ* con el plásmido que contenía el gen completo *HXK2* (calle 3). Sin embargo, este fenotipo silvestre no se restaura cuando la cepa mutante *hvk2Δ* se transforma con el plásmido que contiene la delección *HXK2ΔK<sup>7M16</sup>* (calle 4). Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de *HXK1* depende de la localización nuclear de la proteína Hvk2.

Del mismo modo se realizó un experimento paralelo, utilizando el mismo filtro pero hibridado con la sonda de *GLK1*. El patrón de regulación de *GLK1* es muy similar al descrito para *HXK1*. El gen *GLK1* es reprimido por glucosa y desreprimido en ausencia de ésta cuando las células se crecen en etanol (calles 1 y 2). Sin embargo, en este caso la delección del gen *HXK2* sólo incrementa 4 veces los niveles del transcrito Glk1 en glucosa (calle 5), lo cual representa un 30% de los niveles de ARNm Glk1 detectados en la cepa silvestre en etanol. Esta diferencia puede ser debida a que en una cepa con disrupción del gen *HXK2* está sobre-expresada la proteína Hvk1, lo cual aliviaría parcialmente el requerimiento de Hvk2 mimetizando su efecto en la represión por glucosa (Ma y Botstein, 1986).

Por ello para estudiar el efecto que provoca Hvk2 sobre la expresión de *GLK1* se ha usado una cepa doble mutante *hvk1Δhvk2Δ*. La disrupción de ambos genes permite un incremento de hasta 14 veces en los niveles de expresión de *GLK1* bajo condiciones de represión (calle 8). Además estos niveles alcanzados en la cepa *hvk1Δhvk2Δ* en condiciones de represión son similares a los de la cepa silvestre en etanol (comparar calles 2 y 8). Por tanto este patrón de regulación de *GLK1* es opuesto al encontrado en



células conteniendo *HXK2*, indicando que la mutación *hvk1Δhvk2Δ* convierte al gen *GLK1* reprimible por glucosa en un gen no reprimible.

Además también confirmamos que los niveles intracelulares de Hvk1 pueden aliviar la ausencia de Hvk2 en la represión por glucosa.

El fenotipo de la cepa silvestre se restauró completamente después de transformar la cepa doble mutante *hvk1Δhvk2Δ* con el plásmido que contenía el gen completo *HXK2* (calle 6), indicando que la proteína Hvk2 es suficiente para llevar a cabo la represión por glucosa del gen *GLK1* en un doble mutante. Sin embargo, este fenotipo silvestre no se restaura después de transformar el doble mutante con el plásmido que contiene la delección *HXK2ΔK<sup>7M16</sup>* (calle 7), sugiriendo que es necesaria la localización de Hvk2 en el núcleo en la represión por glucosa.

A la vista de estos resultados podemos concluir que la represión por glucosa de los genes *HXK1* y *GLK1* requiere la proteína Hvk2 operando a nivel nuclear.

## **1.2 Regulación de la expresión de los genes *HXK1*, *HXK2* y *GLK1* a través de la proteína Hvk2**

La expresión de los genes *HXK1* y *GLK1* en un mutante *hvk2Δ* visto en el análisis *Northern* nos ha sugerido que estos fenotipos son mediados por la proteína Hvk2. Para analizarlo y crear un sistema analítico que permita estudiar la expresión del gen *HXK2* se procedió a estudiar la actividad β-galactosidasa de una serie de cepas conteniendo la fusión de los promotores *HXK1*, *HXK2* y *GLK1* con el gen *lacZ* (Véase el apartado 5.6.1 *Materiales y Métodos*) integrada en una única copia en el locus *URA3* de la cepa silvestre DBY1315 y las cepas mutantes DBY2184, DBY2052 y DBY2053 (Tabla 2.1 de *Materiales y Métodos*). Además para completar este sistema de estudio también transformamos las cepas mutantes *hvk2Δ* y

*hvk1Δhvk2Δ* con dos plásmidos diferentes vistos anteriormente; uno conteniendo el gen completo *HVK2* bajo el control de su propio promotor y el otro conteniendo la delección *HVK2ΔK7M16* (*HVK2Δ*) también bajo el control de su propio promotor.

La expresión de ambos genes se determinó por actividad fosforiladora de fructosa y análisis *Western* con anticuerpos anti-Hvk2 (datos no mostrados). Las células se crecieron en glucosa hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1.0, obteniéndose los extractos proteicos utilizados para determinar la actividad β-galactosidasa. Los resultados se muestran en la [Tabla 3.1](#).

Actividad β-galactosidasa (mU/mg)								
CEPA	<i>hvk1 hvk2</i>		<i>hvk1 HVK2</i>	<i>HVK1 HVK2</i>	<i>HVK1 hvk2</i>			
PLÁSMIDO	-	<i>HVK2Δ</i>	<i>HVK2</i>	-	-	<i>HVK2</i>	<i>HVK2Δ</i>	-
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>HVK1::lacZ</i>	900	930	115	118	128	125	920	920
<i>HVK2::lacZ</i>	102	110	1103	1445	306	290	106	86
<i>GLK1::lacZ</i>	925	965	121	114	116	110	310	302

**TABLA 3.1.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *HVK1*, *HVK2* Y *GLK1* EN CEPAS SILVESTRE Y MUTANTES.**

Una única copia de las fusiones *HVK2::lacZ*, *HVK1::lacZ* o *GLK1::lacZ* fueron integradas en el cromosoma en el locus *URA3* de la cepa silvestre DBY1315 y las cepas mutantes DBY2184, DBY2052 y DBY2053 conteniendo el alelo de *HVK2* que se indica. Los valores de actividad β-galactosidasa, ensayados en extractos crudos, son los resultados obtenidos de 5 ó 6 experimentos independientes. Las levaduras se crecieron en medio YEPD hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1.0 (3 mg peso seco/ml).

Se puede observar aproximadamente un incremento de 7 a 8 veces en la actividad de Hvk1-lacZ y Glk1-lacZ en la cepa doble mutante *hvk1Δhvk2Δ*, sobre

la actividad de la misma fusión en la cepa silvestre (comparar columna 1 y 5). Estos resultados podrían ser atribuidos a un mecanismo regulador dependiente de Hxk2, porque la expresión del gen *HXK2* en el doble mutante *hvk1Δhvk2Δ* (columna 3) o en un mutante *hvk2Δ* (columna 6) provoca un descenso en las actividades de Hxk1-lacZ y Glk1-lacZ, restaurando los niveles basales del gen reportero en la cepa silvestre (columna 5).

Además si comparamos las actividades observadas en la columna 1 con la 3 y 4, y la columna 5 con la 8, nos indica que Hxk2 no sólo reprime a los genes *HXK1* y *GLK1* sino que también induce la expresión de *HXK2*. Comparando la columna 3 con la 4 y la columna 5 con la 6 observamos que no existe diferencia entre el gen *HXK2* cromosómico ó el plasmídico aunque éste sea episomal.

Además es lógico que esta función se lleve a cabo en el núcleo, por lo que también comparamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa en unas condiciones en las que la proteína Hxk2 es incapaz de ir al núcleo donde realizar tal función. De esta manera si comparamos las columnas 1 y 2 y las columnas 7 y 8 vemos cómo la versión truncada de Hxk2 (*HXK2Δ*) no es funcional en este mecanismo regulador, por lo que para que Hxk2 funcione como un represor en el control de *HXK1* y *GLK1* y como inductor de *HXK2* es necesaria su localización en el núcleo.

Finalmente, la reducción en la actividad de aquellos transformantes llevando la mutación *hvk2Δ* y la fusión *GLK1::lacZ* (columna 8) sugiere que la actividad observada es causada por el incremento en el nivel de Hxk1 presente. Cuando Hxk2 está presente, Hxk1 reprime la expresión de *HXK2-lacZ* (comparar la columna 4 con la 5). Sin embargo, en ausencia de Hxk2, Hxk1 reprime parcialmente la expresión de *GLK1-lacZ* (comparar la columna 1 con la 8).

## 2.- NUMEROSOS GENES REGULADOS POR GLUCOSA CONTIENEN EN SUS PROMOTORES UN MOTIVO HEPTAMÉRICO COMÚN

Llevando a cabo una comparación del motivo heptamérico (C/A)(G/A)(G/A)AAAT, al que denominamos sitio MED8 encontrado en ambas DRSs del gen *HXK2* (Herrero y col., 1996) y en la UAS del gen *SUC2* (Bu y Schmidt, 1998), con posibles reguladores homólogos contenidos en los promotores de otros genes regulados por glucosa, detectamos que esta secuencia está presente también en genes como *HXK1*, *GLK1* y *HXT1*. Además esta secuencia se encuentra solapando con el elemento ERA (AAATGCA) en los promotores de los genes *GLK1* y *HXK1* como se muestra en la [Tabla 3.2](#).

GEN (elementos en <i>cis</i> )	REGIÓN REGULADORA
<i>HXT1</i> (Sitio MED8)	ACTAGGA <u>AAGAAAT</u> GCTGCAGG
<i>HXK1</i> (ERA)	CTTAAAA <u>AAAAAT</u> GCATAGTT
<i>GLK1</i> (ERA)	GCAACA <u>AAGAAAT</u> GCACGCGT
<i>HXK2</i> (DRS1)	CCAATT <u>CGAAAT</u> GAAATGCT
<i>HXK2</i> (DRS2)	ATGGCCA <u>AAGAAAT</u> CACCGGAT
<i>SUC2</i> (UAS <sub><i>SUC2</i></sub> /MIG1)	<u>TTAGGAATTTATCCGGGGCGAAGAAAT</u> ACGCGTAG

**TABLA 3.2.- SECUENCIA DE ADN DE REGIONES REGULADORAS EN LOS PROMOTORES HXT1, HXK1, GLK1, HXK2 Y SUC2.**

Se indican los elementos más importantes de esta secuencia incluyendo: para todos los genes, la secuencia reguladora a la que denominamos sitio MED8 en *HXT1*, *HXK1*, *GLK1*, *HXK2* (DRS1 y DRS2) y *SUC2* (UAS) subrayada en NEGRO, el elemento regulador ERA subrayado en VIOLETA y para el promotor *SUC2* un sitio de unión para Mig1 doblemente subrayado en GRIS, solapando con el primer sitio MED8.

Este motivo heptamérico está implicado en la unión directa de la proteína Med8 controlando la expresión de los genes *HXK2* y *SUC2* (Chaves y col., 1999; Moreno-Herrero y col., 1999). Med8 ha sido descrita como un miembro de una familia de proteínas que forman parte del complejo multiproteico llamado Srb/mediador, que interacciona directamente con el dominio carboxilo terminal (CTD) de la ARN polimerasa II, indispensable para la activación de la transcripción en *S. cerevisiae* (Myers y col., 1998; Myers y Kornberg, 2000). Por lo que su función podría ser la de actuar como un factor de acoplamiento que conecta los complejos activadores y represores de la transcripción con la maquinaria transcripcional general.

Esta proteína de 27 kDa fue identificada en nuestro laboratorio mediante análisis *Southwestern* y cromatografía de afinidad, utilizando las UAS de *SUC2* y las DRSs de *HXK2* a las que denominamos sitio MED8 (Herrero y col., 1996), donde además de ser mediador de la transcripción general, se le atribuyó el papel de factor transcripcional.

Por otro lado la proteína Hxk2 actúa como un componente central de la vía de señalización por glucosa no sólo en su papel metabólico de fosforilación de la glucosa sino por su actuación como factor transcripcional en la represión inducida por glucosa. Como se ha visto en el apartado 1 de este capítulo la localización nuclear de Hxk2 es importante en el control de la expresión génica del sistema fosforilador de la glucosa de *S. cerevisiae*. De esta manera participa en la represión inducida por glucosa de los genes *HXK1*, *GLK1* y *SUC2* y en la expresión inducida por glucosa del gen *HXK2* (Rodríguez y col., 2001).

Además estudios previos en nuestro laboratorio muestran que Hxk2 forma parte de un complejo regulador de la expresión del gen *SUC2* a través del motivo heptamérico a nivel de la UAS (Herrero y col., 1998).

Con estos antecedentes otro de los objetivos a desarrollar sería comprobar si este mecanismo de regulación génica se realiza a través del sitio MED8 con la implicación de Med8 y además comprobar el efecto que provocaría Hxk2 en la formación de los complejos ADN-proteína.

### **2.1 Análisis de la interacción ADN-proteína entre el motivo común heptamérico o sitio MED8 presente en los genes regulados por glucosa y la proteína Med8**

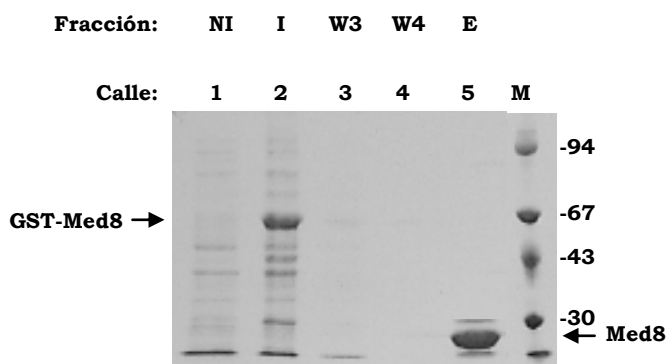
Para expresar la proteína Med8, se utilizó la construcción pGEX-MED8 realizada por Chaves y col., 1999. El vector de expresión pGEX-2T, descrito en el apartado 3 de *Materiales y Métodos* (Véase Fig. 4 de *Anexo*) tiene la particularidad de expresar proteínas de fusión a GST que serán purificadas mediante columnas de glutation-sepharosa y además se podrá escindir la proteína de interés de la GST mediante digestión con trombina.

El plásmido pGEX-MED8 se usó para transformar la cepa de *E. coli*. BL21 descrita en el apartado 1.2 de *Materiales y Métodos*, que se cultivó a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6. Se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM y transcurridas 3 horas de inducción se recogieron las células, se lavaron y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se les añadió 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. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 20.000 rpm durante 30 minutos y el extracto proteico libre de células se puso en contacto con 100 µl de una resina de glutation-sepharosa previamente equilibrada con PBS, durante 1 hora.

Tras lavar varias veces la resina con PBS, la proteína de fusión inmovilizada a la resina fue incubada con 2.5 U de trombina durante 2

horas a 4°C para separar GST de Med8. Las muestras recogidas se analizaron mediante SDS-PAGE, mostrándose los resultados en la [Fig. 3.2](#).

En la calle 1 se muestran las células no inducidas de la cepa bacteriana BL21 transformada con la construcción pGEX-MED8 y en la calle 2 las mismas células inducidas con IPTG observándose la inducción de una proteína de 56 kDa correspondiente a la proteína de fusión GST-Med8. En las calles 3 y 4 se muestran las dos últimas fracciones de lavado respectivamente, tras mantener el extracto proteico en contacto con la resina. La proteína de fusión inmovilizada a la resina y tras los sucesivos lavados fue tratada con trombina y el eluido en la calle 5 muestra la aparición de la proteína Med8 de 27 kDa libre de GST.



### FIGURA 3.2.- PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Med8 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

Las células de la cepa de *E. coli* BL21 transformadas con la construcción pGEX-MED8 no inducidas (calle 1) e inducidas con IPTG (calle 2) se hirvieron en tampón de disociación y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 12% donde se observa la inducción de la proteína de fusión GST-Med8. Tras incubar los extractos conteniendo la proteína de fusión GST-Med8 con la resina de glutation-sepharosa, las proteínas inespecíficas fueron eluidas con PBS hasta no detectar proteínas (calles 3 y 4, correspondientes a los dos últimos lavados). La resina con la proteína de fusión GST-Med8 inmovilizada y libre de contaminantes se incubó con PBS y 2.5 U de trombina durante 2 horas; recogiendo en una única fracción de 150 µl la proteína Med8 de 27 kDa libre de GST (calle 5). Se indican los marcadores de bajo peso molecular (M). Las flechas señalan las proteínas de 56 kDa correspondiente a GST-Med8 y de 27 kDa correspondiente a Med8. La identidad de Med8 fue confirmada mediante análisis *Western* con la utilización de anticuerpos anti-Med8.

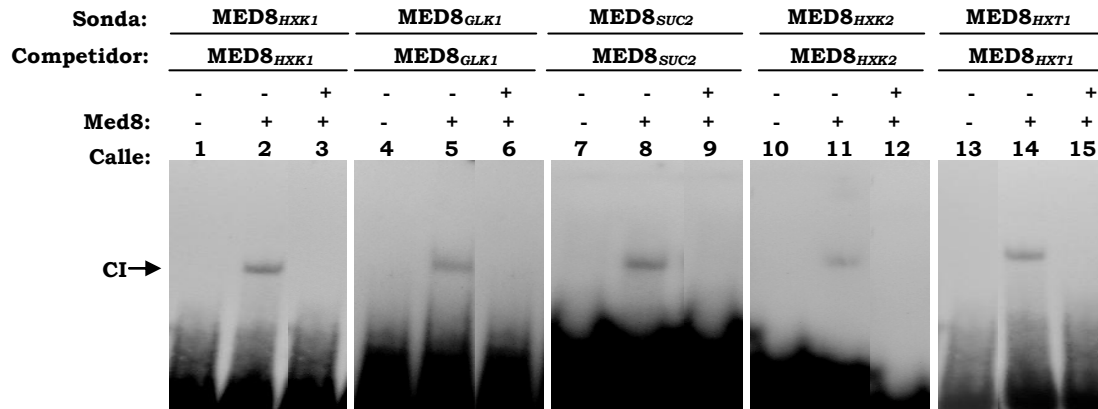
El entendimiento de los mecanismos reguladores de los genes, tales como el control de la transcripción en respuesta a señales ambientales y otros procesos biológicos basados en las interacciones ácido nucleico-proteína requiere caracterizar las secuencias de ADN responsables de esta regulación. Para el estudio de estas interacciones se han desarrollado una serie de métodos indirectos, entre los cuales cabe destacar el gel de retardo ó EMSA, donde las proteínas son detectadas por su capacidad para retardar la movilidad de un fragmento de ADN marcado radiactivamente a través de un gel de poliacrilamida cuando se unen a él (Carey, 1991).

La proteína Med8 purificada anteriormente, fue utilizada para llevar a cabo los experimentos de retardo de la movilidad electroforética. Los resultados se muestran en la Fig. 3.3.

Como sonda utilizamos los oligonucleótidos que contienen el sitio MED8 en los promotores *HXK1*, *GLK1*, *SUC2*, *HXK2* y *HXT1* (Véase Tabla 3.2 y apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*) marcados con ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). También se llevaron a cabo simultáneamente ensayos de competencia específica en presencia de oligonucleótido no marcado.

La reacción de unión ADN-proteína se realizó a temperatura ambiente y a continuación, los complejos ADN-proteína fueron separados del ADN libre por medio de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 4% (*Materiales y Métodos*, 9.1.4). El gel se secó y se expuso a autorradiografía a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.





**FIGURA 3.3.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Med8 CON LAS SECUENCIAS REGULADORAS CONTIENIENDO EL SITIO MED8 DE LOS PROMOTORES HXK1, GLK1, SUC2, HXT1 Y LA REGIÓN CODIFICADORA HXK2.**

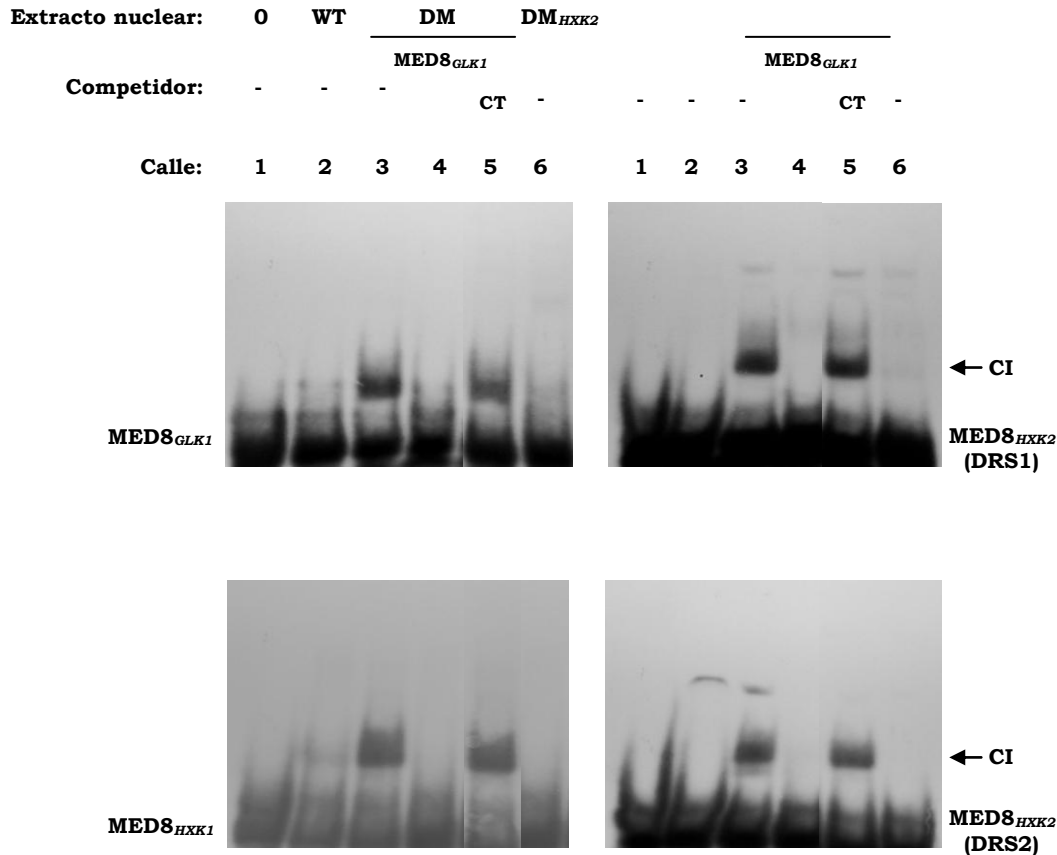
Cada reacción incluye 0.5 ng de (<sup>32</sup>P)MED8<sub>GEN</sub> como sonda de ADN y, excepto en las calles 1, 4, 7, 10 y 13; 6 µl (3 µg) de la proteína Med8 purificada mediante cromatografía de afinidad (calles 2, 5, 8, 11 y 14). Como competidor específico se utilizó 20 ng del correspondiente oligonucleótido anillado MED8 no marcado radiactivamente (calles 3, 6, 9, 12 y 15). Los complejos núcleo-proteicos fueron resueltos del ADN libre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La flecha indica la localización del complejo ADN-proteína (CI) formado con cada oligonucleótido y con la proteína Med8 purificada.

Se observa que la presencia de la proteína Med8 afecta a la movilidad electroforética no sólo de los oligonucleótidos MED8<sub>SUC2</sub> y MED8<sub>HXK2</sub> (calles 8 y 11) como había sido descrito por Chaves y col., (1999), sino también de los oligonucleótidos MED8<sub>HXK1</sub>, MED8<sub>GLK1</sub> y MED8<sub>HXT1</sub> (calles 2, 5 y 14). La especificidad de los complejos ADN-proteína se constató mediante ensayos de competencia en presencia de 50 ng de los oligonucleótidos no marcados (calles 3, 6, 9, 12 y 15), lo cual indica que la interacción de la proteína Med8 con el motivo heptamérico presente en los genes regulados por glucosa es específica.

## 2.2 Influencia de la proteína Hxk2 en las interacciones ADN-proteína a través del sitio MED8

Con los resultados obtenidos hasta el momento podemos afirmar que la localización nuclear de Hxk2 es necesaria para la represión por glucosa de los genes *SUC2*, *HXK1* y *GLK1*, así como para la expresión de su propio gen. Por ello y para comprobar que Hxk2 es una pieza clave en la expresión de estos genes, nuestro interés se centró en determinar si existe un patrón de bandas diferencial entre los extractos proteicos nucleares de la cepa silvestre DBY1315 y una doble mutante *hvk1Δhvk2Δ* crecidas en presencia de glucosa y los elementos reguladores previamente identificados como sitio MED8 en los promotores de *GLK1*, *HXK1* y *HXK2*. Como sonda utilizamos los oligonucleótidos que contienen el sitio MED8 de los genes *GLK1*, *HXK1* y *HXK2* (DRS1<sub>HXK2</sub> y DRS2<sub>HXK2</sub>) marcados con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). Se llevó a cabo la reacción de unión ADN-proteína según lo descrito en el apartado 9.1.4 de *Materiales y Métodos*. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.4](#).

Observamos que la mutación *hvk1Δhvk2Δ* influye en la formación del complejo ADN-proteína con las cuatro secuencias homólogas (Tabla 3.2). Las cuatro sondas dieron lugar a la formación de un complejo (CI) con extractos preparados a partir de la cepa *hvk1Δhvk2Δ* (calle 3). En este experimento únicamente nos hemos centrado en este complejo diferencial, ya que la formación de los otros complejos será comentada más adelante. Sin embargo, este complejo no fue detectado cuando los extractos procedían de la cepa silvestre (calle 2). Incluso después de transformar la cepa doble mutante con el plásmido conteniendo el gen *HXK2*, el complejo CI desaparece (calle 6), lo que nos sugiere que Hxk2 perjudica la formación del complejo CI, el cual sólo aparece en ausencia de Hxk2.



**FIGURA 3.4.- INFLUENCIA DE LA PROTEÍNA Hxk2 EN LAS INTERACCIONES A TRAVÉS DEL SITIO MED8.**

Los ensayos de retardo en gel fueron realizados con los oligonucleótidos conteniendo el sitio MED8 de *GLK1*, *HXK1* y *HXK2* (Ver apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*) marcados con <sup>32</sup>P, en presencia de extractos nucleares de células de levadura de las cepas que se indican crecidas en glucosa y preparadas como se describe en *Materiales y Métodos*. El oligonucleótido no marcado MED8<sub>GLK1</sub> y el ADN de tимо de ternera (CT) se usaron como competidores. En la calle 1 no se añade proteína, en la calle 2 las proteínas proceden de extractos nucleares obtenidos de células reprimidas de una cepa silvestre (WT), en las calles 3-5 las proteínas proceden de extractos nucleares obtenidos de células reprimidas de una cepa doble mutante *hvk1Δhvk2Δ* (DM), en la calle 6 las proteínas proceden de extractos nucleares obtenidos de células reprimidas de una cepa doble mutante *hvk1Δhvk2Δ* (DM) transformada con el plásmido YEp352-HXK2. La reacción de unión ADN no competidor (-), un exceso de 100 ng de ADN competidor (calle 4) o un exceso de 300 ng de ADN de tимо de ternera (calle 5). Las flechas indican la localización del complejo ADN-proteína diferencial (CI) formado con cada oligonucleótido y con extractos nucleares obtenidos de una cepa silvestre o una doble mutante *hvk1Δhvk2Δ*.

La idéntica movilidad observada por el complejo, independiente de la sonda utilizada en el experimento nos indica que las interacciones ADN-proteína podrían ocurrir con las mismas proteínas. Para comprobarlo se realizaron experimentos de competencia cruzada con un exceso de oligonucleótido no marcado conteniendo el sitio MED8 de *GLK1*, como competidor específico y ADN de timo de ternera como competidor inespecífico. De esta forma el ADN de timo de ternera fue un inefectivo competidor no desplazando la marca radiactiva (calle 5), mientras que el oligonucleótido conteniendo el sitio de unión MED8<sub>GLK1</sub> fue un competidor específico (calle 4) con respecto a MED8<sub>HXK1</sub> y MED8<sub>HXK2</sub> (DRS1 y DRS2), así como a su propia sonda. El que este oligonucleótido fuese capaz de competir con todas las sondas nos da a entender que son idénticas proteínas las responsables de la formación de dicho complejo.

### **3.- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN DIRECTAMENTE A LA SECUENCIA MED8<sub>GLK1</sub> DEL PROMOTOR *GLK1***

Con el fin de identificar y caracterizar el mayor número posible de los factores que participan en los complejos reguladores de la expresión génica en los que interviene el elemento MED8 y las proteínas Med8 y Hxk2, hemos seleccionado el elemento MED8<sub>GLK1</sub> como punto de partida de nuestro estudio por las siguientes razones:

El gen *GLK1* está transcripcionalmente regulado en respuesta a la fuente de carbono presente en el medio de cultivo (Herrero y col., 1995). Sabemos que *GLK1* se expresa cuando las células crecen en condiciones de estrés nutricional en presencia de etanol y también ambientales como la presión osmótica o la temperatura, mientras que la presencia de glucosa impide su expresión (Herrero y col., 1999).

El hecho de que el gen *GLK1* se exprese en presencia de una fuente de carbono no fermentable como el etanol y la consideración de que el crecimiento en etanol constituye una condición de estrés nutricional para la levadura, sugiere que este gen podría desempeñar un papel fisiológico para la célula, preparándola para utilizar fuentes de carbono fermentables que le permitan salir del estrés nutricional, lo cual supondría una gran ventaja para su supervivencia.

En nuestro laboratorio hemos realizado un análisis del promotor del gen *GLK1* identificando los elementos requeridos para su regulación transcripcional (Herrero y col., 1999). Entre los elementos en *cis* que controlan su expresión, se ha identificado un elemento represor, ya que su delección produce un aumento considerable de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en etanol, al que denominamos ERA (*Ethanol Repression Autoregulation*) con la siguiente secuencia AAATGCA que se solapa con el sitio MED8 mencionado en la Tabla 3.2 de este capítulo y al que como hemos visto se une la proteína Med8.

También se identificaron los elementos en *trans* que interaccionan de forma específica con sus secuencias reguladoras, sin embargo hasta el momento no se habían identificado las proteínas que operan a través de este elemento ERA.

Además ERA también ha sido detectado en los promotores de muchos genes involucrados en el metabolismo del carbono tales como, *PDC1*, *PDC5*, *PYK1*, *AAC1*, *HXT7*, *PFK1* y *GPM1* (Liesen y col., 1996). Esto nos hace pensar que si el elemento ERA es funcional en todos estos promotores y se demuestra que participa regulando la expresión de tal número de genes, se podría considerar como un importante sistema de represión de la transcripción.

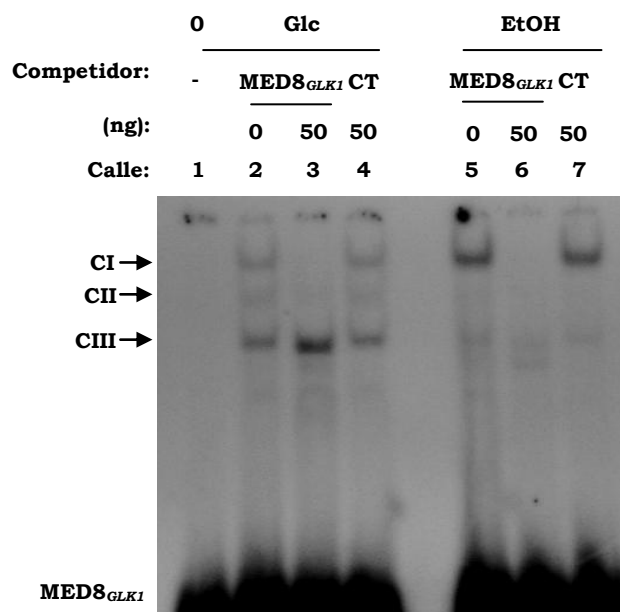
Ya que el oligonucleótido del que disponemos abarca tanto el sitio MED8 como el elemento ERA, nos propusimos identificar los factores transcripcionales que bien de forma directa por su unión al ADN o indirecta formando parte del complejo, están implicados en la regulación de la expresión del gen *GLK1*.

### **3.1 Estudio de las interacciones ADN-proteína entre MED8<sub>GLK1</sub> y extractos proteicos de células crecidas en condiciones de represión y desrepresión**

Para realizar ensayos de retardo en gel (*Materiales y Métodos*, 9.1) previamente se obtuvieron los extractos proteicos a partir de células de la cepa silvestre DBY1315 crecidas en condiciones de represión utilizando glucosa (YEPE) y desrepresión utilizando etanol (YEPE) como medios de cultivo según se especifica en el apartado 9.1.1 de *Materiales y Métodos*, con la variante de que las células se rompieron en un tampón sin sal ni glicerol.

A continuación, se llevó a cabo la reacción de unión ADN-proteína (*Materiales y Métodos*, 9.1.4), incubando los extractos durante media hora con los oligonucleótidos MED8<sub>GLK1</sub> anillados y marcados (*Materiales y Métodos*, 9.1.3).

Posteriormente, los complejos ADN-proteína se separaron del ADN libre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 4%. El gel se secó y se expuso a autorradiografía durante toda la noche a -70°C. Los resultados se muestran en la Fig. 3.5.



**FIGURA 3.5.- ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE EL SITIO MED8 DEL PROMOTOR *GLK1* Y EXTRACTOS PROTEICOS DE UNA CEPA SILVESTRE CRECIDA EN CONDICIONES DE REPRESIÓN Y DESREPRESIÓN.**

Los ensayos de retardo en gel fueron realizados con el oligonucleótido conteniendo el sitio MED8 de *GLK1* (Ver apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*) marcado con  $^{32}\text{P}$ , en presencia de extractos proteicos de células de levadura de la cepa silvestre DBY1315 crecidas en el medio represor (Glc) y desrepresor (EtOH) preparadas como se describe en *Materiales y Métodos*. El oligonucleótido no marcado MED8<sub>GLK1</sub> y el ADN de timo de ternera (CT) se usaron como competidores. En la calle 1 no se añade proteína, en las calles 2-4 las proteínas proceden de extractos proteicos obtenidos de células reprimidas de una cepa silvestre, en las calles 5-7 las proteínas proceden de extractos proteicos obtenidos de células desreprimidas de una cepa silvestre. La reacción de unión contiene ADN no competidor (0), un exceso de 50 ng de ADN competidor (calles 3 y 6) o un exceso de 50 ng de ADN de timo de ternera (calles 4 y 7). Las flechas indican la localización de tres complejos ADN-proteína (CI, CII y CIII) formados con dicho oligonucleótido y con los extractos proteicos obtenidos de una cepa silvestre.

En la calle 1 se cargó solamente el oligonucleótido que contiene la secuencia MED8<sub>GLK1</sub> marcada, con objeto de conocer su movilidad electroforética en ausencia de proteínas con las que pueda interaccionar.

En las calles 2 y 5 aparecen los patrones de bandas de los complejos ADN-proteína a los que dan lugar las proteínas de la cepa silvestre en presencia de la sonda MED8<sub>GLK1</sub>, cuando se han crecido las células en medios con glucosa y etanol respectivamente como fuentes de carbono. Este patrón da lugar a la formación de tres complejos MED8<sub>GLK1</sub>-proteína (CI, CII y CIII) y demuestra que la formación de los mismos no está sujeta a regulación nutricional, detectándose tanto en extractos de células creciendo en presencia de glucosa como etanol como única fuente de carbono.

Simultáneamente se llevaron a cabo ensayos de competencia específica e inespecífica usando oligonucleótido no marcado y ADN de timo de ternera respectivamente. Estos experimentos de competencia generan la formación de dos complejos específicos, ya que la competencia no específica con ADN de timo de ternera no reduce la formación de los tres complejos (calles 4 y 7) mientras que la competencia específica produce una disminución en la marca radiactiva en los complejos CI y CII (calles 3 y 6).

Estos experimentos muestran que la secuencia CAAGAA**AAAT**GCACGCG une proteínas de forma específica, lo cual nos dirige hacia la realización de experimentos de purificación de dichas proteínas.

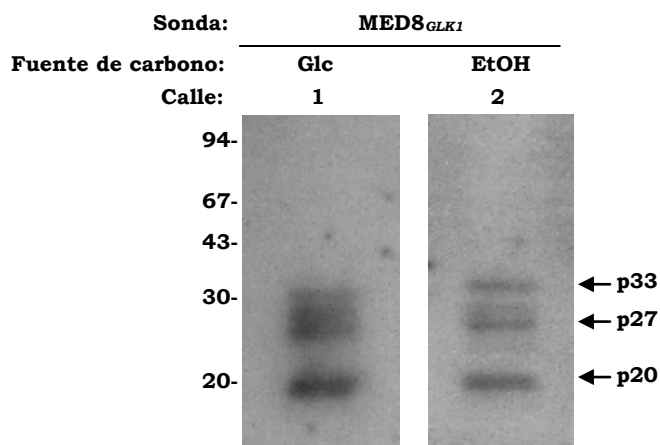
### **3.2 Análisis Southwestern**

Después de detectar la unión de proteínas y determinar la especificidad de unión es necesario identificar y purificar dichas proteínas. Una de las técnicas apropiadas para determinar la masa molecular del factor o factores que se unen específicamente al elemento MED8 del promotor *GLK1* es el análisis *Southwestern*.



Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de las células de la cepa silvestre DBY1315 (*Materiales y Métodos*, 9.1.1) crecidas tanto en el medio represor YEPD como en el no represor YEPE, empleando el tampón C sin sal y sin glicerol (HEPES 20 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM y PMSF 0.5 mM) para facilitar su separación en el gel de acrilamida. Una vez hervido el extracto, se llevó a cabo la electroforesis SDS-PAGE al 12% (*Materiales y Métodos*, 7.7), tras lo cual se transfirieron las proteínas a un papel de nitrocelulosa (*Materiales y Métodos*, 8.1). A continuación las proteínas se renaturalizaron sumergiendo el papel de nitrocelulosa en soluciones de concentración decreciente de cloruro de guanidinio. Finalmente se sumergió en tampón BLOTTO y se le añadió la sonda conteniendo el elemento MED8 de *GLK1* (*Materiales y Métodos*, 5.9), marcada con ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )dCTP. La autorradiografía del filtro se muestra en la [Fig. 3.6](#).

Mediante este sistema como se puede observar en esta figura se han podido identificar tres proteínas que se unen al elemento MED8 del gen *GLK1* tanto en condiciones de represión (glucosa) como de desrepresión (etanol). Sus tamaños son de aproximadamente 20, 27 y 33 kDa en relación al marcador de proteínas de bajo peso molecular.



**FIGURA 3.6.- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL SITIO MED8 DEL PROMOTOR *GLK1*.**

Las proteínas de un extracto proteico procedente de la cepa silvestre DBY1315 crecida en medio con glucosa (Glc) (calle 1) y etanol (EtOH) (calle 2), se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). Posteriormente, se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se renaturalizaron y se incubaron con el oligonucleótido conteniendo el sitio MED8 de *GLK1* marcado radiactivamente. El tamaño (kDa) de los marcadores de peso molecular se indican en la parte izquierda. Las flechas indican tres de las proteínas identificadas con sus correspondientes tamaños moleculares (en kDa).

### 3.3 Análisis “UV-Crosslinking” de proteínas al oligonucleótido MED8<sub>GLK1</sub>

El análisis *Crosslinking* de proteínas a ácidos nucleicos con luz UV es otro método para la rápida y precisa determinación del peso molecular de una proteína de unión a ADN. Además la especificidad del complejo ADN-proteína también puede ser rigurosamente determinada por medición de la capacidad de un exceso de ADN competidor no marcado para competir por los sitios de unión de la proteína.

Esta técnica consiste en la irradiación con luz UV de los complejos ADN-proteína. La simple irradiación del ADN provoca radicales libres de purinas y pirimidinas, con lo que si una molécula se encuentra próxima a los

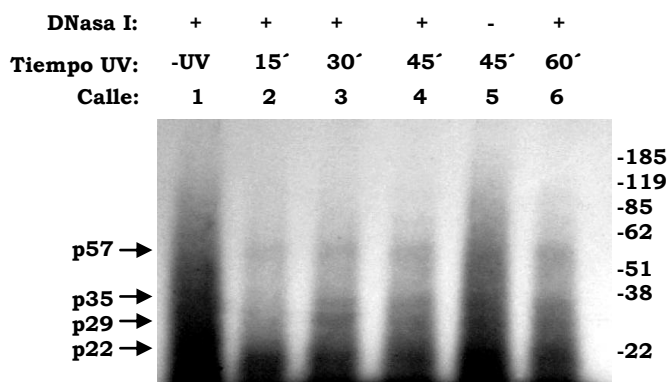
radicales libres se forma una unión covalente o *crosslinking* de la proteína al ADN. Además permite variar una serie de parámetros como el tiempo de irradiación o las condiciones de unión.

Tras llevar a cabo una reacción de unión ADN-proteína (*Materiales y Métodos*, 9.1.4), incubando los extractos proteicos de las células de la cepa silvestre DBY1315 (*Materiales y Métodos*, 9.1.1) crecidas tan solo en el medio YEPE, durante media hora con el oligonucleótido MED8<sub>GLK1</sub> marcado (*Materiales y Métodos*, 9.1.3), se irradió con luz UV a 305 nm y una intensidad de 7000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  a una distancia de 5 cm.

Seguidamente, se añadió a la mezcla de reacción irradiada 4  $\mu\text{g}$  de DN<sub>asa</sub>I durante 30 minutos a 37°C con el fin de digerir el ADN no protegido por proteínas (*Materiales y Métodos*, 9.3).

Posteriormente, los complejos ADN-proteína se separaron del ADN libre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 4%. El gel se secó y se expuso a autorradiografía durante toda la noche a -70°C. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.7](#).

Tal y como se comprueba en la figura cuando la irradiación UV es omitida (calle 1) no se generan marcas de fragmento resistentes a la acción de la nucleasa, debido a la total desprotección del ADN de las proteínas unidas a él por enlaces covalentes generados por la luz UV. Sin embargo, cuando las mezclas de reacción fueron irradiadas y analizadas (calles 2, 3, 4, 5 y 6), se generaron al menos cuatro marcas, migrando a 22, 29, 35 y 57 kDa. El incremento del tiempo de irradiación desde 15 a 60 minutos incrementó la marca radiactiva. Sin embargo, aunque la sonda de ADN irradiada durante 60 minutos todavía era capaz de unir proteínas, tal tiempo de exposición comienza a degradar el ADN (calle 6). Por otro lado el no tratamiento con DN<sub>asa</sub> I implica un aumento del *background* debido al tamaño del ADN irradiado.



**FIGURA 3.7.- ANÁLISIS “UV-CROSSLINKING”.**

El análisis implica la irradiación con luz UV de los complejos ADN-proteína formados entre un extracto proteico de células de levadura de la cepa silvestre DBY1315 crecidas en el medio desrepresor (EtOH) y el fragmento de ADN MED8<sub>GLK1</sub> utilizado como sonda. Posteriormente se digiere el ADN libre con DN<sub>asa</sub> I y las muestras que contienen las mezclas de reacción se analizan en un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes al 12%. En la calle 1 se omite la irradiación UV (-UV), en la calle 2 se muestra la irradiación durante 15 minutos de la reacción de unión, en la calle 3 se muestra la irradiación durante 30 minutos, en las calles 4 y 5 se muestra la irradiación durante 45 minutos y en la calle 6 se muestra la irradiación durante 1 hora. El tratamiento con DN<sub>asa</sub> I se muestra como (+). En la calle 5 la no adición de DN<sub>asa</sub> I se muestra como (-). El tamaño de los marcadores de peso molecular se indican en la parte derecha. Las flechas indican cuatro de las proteínas identificadas con sus correspondientes tamaños moleculares (en kDa).

Estos datos de peso molecular corroboran los mostrados anteriormente mediante *Southwestern*, a excepción de la aparición de una proteína de 57 kDa sólo detectada mediante la técnica de *Crosslinking*. Esto podría tener una sencilla explicación y sería que basándonos en que el *Southwestern* consiste en la hibridación de ADN a un filtro con proteínas renaturalizadas, si bien éstas o alguna de ellas no alcanza una total renaturalización siendo imposible su detección. De ahí que la identificación de proteínas a su sitio de unión requiere el análisis de estas dos técnicas conjuntamente.

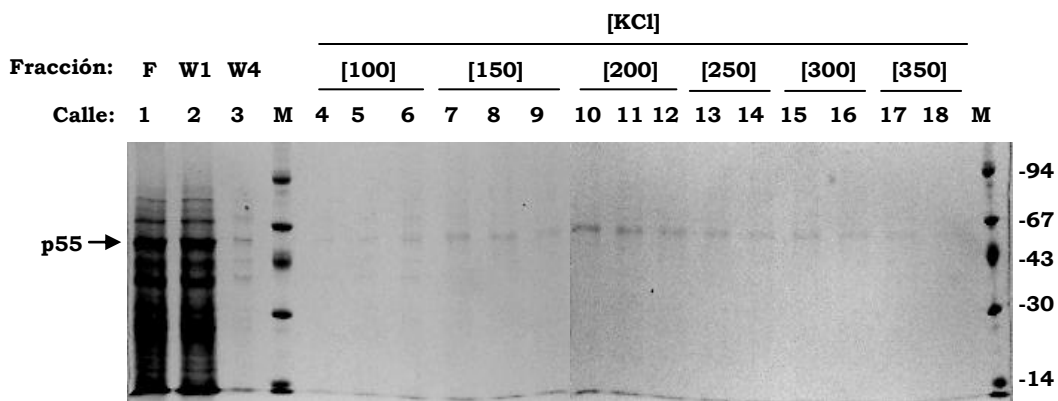
El hecho de que los tamaños de estas proteínas superen en dos unidades a las encontradas mediante *Southwestern* es debido al ADN que se encuentra unido de forma covalente a las proteínas, por eso consideramos que los tamaños son coincidentes ya sea con una u otra técnica.

#### **4.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL SITIO MED8<sub>GLK1</sub> UTILIZANDO SISTEMAS DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD BIOTINA-STREPTAVIDINA**

Hasta ahora hemos demostrado que la secuencia de ADN a la que denominamos MED8<sub>GLK1</sub> une proteínas de forma específica de las cuales lo único que se ha determinado es su peso molecular por lo que nuestro siguiente objetivo se basa en purificar dichas proteínas. Esto puede ser complejo usando técnicas de cromatografía *standard* y ensayando las fracciones por ensayos de retardo en gel. Sin embargo, el uso de columnas de afinidad conteniendo grandes cantidades de ADN portando el sitio de unión para dichas proteínas, proporcionan una gran herramienta para la purificación.

El sistema de purificación Biotina/Streptavidina está basado en la estrecha e irreversible unión que forma la biotina con la streptavidina. Para ello, se fosforilaron los oligonucleótidos sintéticos MED8<sub>GLK1</sub> sentido y antisentido (*Materiales y Métodos*, 5.11), se anillaron originando de esta manera la secuencia MED8<sub>GLK1</sub> que se purificó por precipitación con acetato de sodio 3 M y etanol, y se sometieron a ligación empleando T4 ADN ligasa. Los extremos protuberantes de los polímeros resultantes se rellenaron utilizando el fragmento *klenow* de la ADN polimerasa en presencia de 14-dATP-Biotina y mezcla de dNTPs (dCTP, dTTP, dGTP) como se indica en el apartado 5.14 de *Materiales y Métodos*.

Para llevar a cabo el aislamiento de la/s proteína/s que se unen a MED8<sub>GLK1</sub>, se incubó el ADN biotinizado durante 30 minutos con el extracto proteico de la cepa DBY1315 crecidas en el medio YEPE (*Materiales y Métodos*, 9.1.1). A continuación se incubó esta mezcla durante 4 horas con Streptavidina-agarosa, previamente equilibrada como se describe en el apartado 9.4 de *Materiales y Métodos*, y finalmente se cargó todo ello en una columna y se lavó varias veces bajo condiciones que maximizan la estabilidad del complejo con el fin de retirar las proteínas contaminantes. Las proteínas unidas de forma específica al ADN-Biotina/Streptavidina se eluyeron con un gradiente discontinuo de KCl (50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 500 y 750 mM). Las fracciones de elución se analizaron en gel de poliacrilamida al 12% y se visualizaron las proteínas tiñendo el gel con azul de Coomassie. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.8](#).



**FIGURA 3.8.- PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA p55 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Se muestran los extractos proteicos de la cepa silvestre de levadura DBY1315 pasados a través de la columna de Streptavidina-agarosa (F), a la que se encuentra unido el ADN que contiene la secuencia de unión sitio MED8. Tras incubar los extractos crecidos en condiciones de desrepresión, las proteínas inespecíficas fueron eluidas con tampón de lavado hasta no detectar proteínas (calles 2 y 3, correspondientes al primer (W1) y último (W4) lavado respectivamente). Posteriormente se eluyeron las proteínas unidas de forma específica al ADN con un tampón conteniendo concentraciones crecientes de KCl (calles 4-18), recogiendo varias fracciones de 150  $\mu$ l analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%. Se indican los marcadores de bajo peso molecular (M). La flecha señala una proteína de 55 kDa enriquecida cuando se eluye la columna con 200 mM de KCl.

De esta manera sólo se consiguió purificar parcialmente la proteína de 55 kDa que ya se identificó mediante el análisis *Crosslinking* de proteínas a la secuencia MED8<sub>GLK1</sub>. En la calle 1 se cargó el extracto proteico pasado a través de la columna (F) y en las calles 2 y 3 (W1 y W2) se cargaron la primera fracción de lavado y la última respectivamente, comprobándose la eliminación de proteínas contaminantes. Los complejos de ADN-proteína específicos son estables a concentraciones moderadas de sal mientras que muchos de los complejos no específicos son desorganizados incluso a bajas concentraciones. En las sucesivas calles se cargaron las fracciones de eluidos a concentraciones crecientes de KCl. Tal y como se aprecia en el gel

de poliacrilamida una proteína de 55 kDa se encuentra enriquecida en las fracciones en que se eluye la columna con 200 mM de KCl.

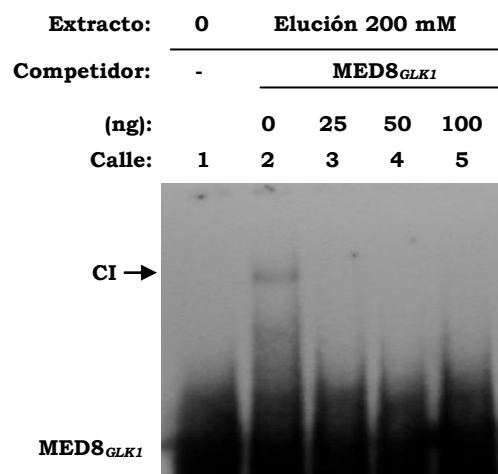
#### **4.1 Análisis de la interacción ADN-proteína entre MED8<sub>GLK1</sub> y la proteína p55 purificada a partir del sitio MED8 del gen *GLK1***

La fracción de eluido que contiene la proteína p55, purificada parcialmente a partir de la unidad reguladora MED8 del gen *GLK1*, fue utilizada para llevar a cabo los experimentos de retardo de la movilidad electroforética. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.9](#).

Como sonda utilizamos el oligonucleótido que contiene el sitio MED8 del promotor *GLK1* marcado con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). Se llevaron a cabo simultáneamente ensayos de competencia específica usando oligonucleótido no marcado.

La reacción de unión ADN-proteína se realizó a temperatura ambiente. A continuación, los complejos ADN-proteína fueron separados del ADN libre por medio de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 4% (*Materiales y Métodos*, 9.1.4). El gel se secó y se expuso a autorradiografía a -70°C durante toda la noche.





**FIGURA 3.9.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL SITIO MED8 DEL PROMOTOR *GLK1* Y LA PROTEÍNA p55.**

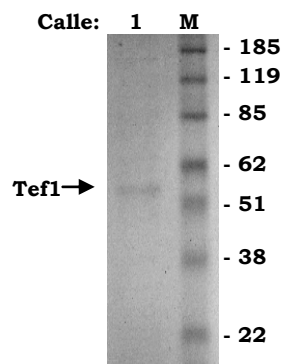
Los ensayos de retardo en gel fueron realizados con el oligonucleótido conteniendo el sitio MED8 de *GLK1* (Ver apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*) marcado con  $^{32}\text{P}$ , en presencia de la fracción eluida de la columna que contiene la proteína p55 purificada. El oligonucleótido no marcado MED8<sub>GLK1</sub> se usó como competidor específico a concentraciones crecientes. En la calle 1 no se añade proteína, en la calle 2 la proteína procede de la fracción eluida. La reacción de unión contiene ADN no competidor (0), un exceso de 25 ng de ADN competidor (calle 3), un exceso de 50 ng de ADN competidor (calle 4) y un exceso de 100 ng de ADN competidor (calle 5). La flecha indica la localización del complejo ADN-proteína (CI) formado con dicho oligonucleótido y con la fracción que contiene la proteína p55.

Como se puede observar, en la calle 2 aparece un complejo con menor movilidad electroforética que la del control (calle 1). Esto se debe a la formación de complejos ADN-proteína por interacción del oligonucleótido MED8<sub>GLK1</sub> con la proteína de 55 kDa, lo que produce retrasos en la movilidad original del mismo. Además este complejo es desplazado por concentraciones crecientes de oligonucleótido sin marcar (calles 3, 4 y 5), lo cual indica que la interacción de la proteína p55 parcialmente purificada con el sitio MED8 del gen *GLK1* es específica.

## 4.2 Identificación del gen que codifica la proteína p55

La proteína de 55 kDa purificada según se ha descrito anteriormente, se separó en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (*Materiales y Métodos*, 7.7) (Fig. 3.10) y fue secuenciada mediante *fingerprinting* peptídico. La proteína se digirió *in situ* en el gel con tripsina y los péptidos tripticos generados se analizaron en un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF Bruker Reflex III dotado con extracción retardada de iones, obteniéndose así el *fingerprinting* de la proteína digerida. Tras descartar los péptidos atribuibles a la digestión de queratinas y los péptidos procedentes de la autoproteólisis de la tripsina, se volcaron las restantes masas peptídicas en el programa *ProFound* para cotejarlas con las procedentes de la digestión triptica teórica de todas las proteínas presentes en la base de datos en el intervalo de masas de 45 a 65 kDa sin más restricciones. De esta manera, se encontró que la secuencia correspondía, con una probabilidad del 99%, al factor de elongación traduccional EF-1 $\alpha$  de *S. cerevisiae*, cuya masa molecular es de 55 kDa y que se encuentra localizado en el cromosoma XVI codificado por el gen *YPR080W*.

Por otro lado, se seleccionó el péptido con  $m/z= 1326.700$  cuya secuencia es EHALLAFTLGVR, para realizar un experimento de fragmentación PSD (*Post Source Decay*, decaimiento post-fuente) a fin de obtener información de secuencia. Aunque dicho péptido sólo pudo fragmentarse parcialmente, los fragmentos registrados corroboraron hasta el 50% de la secuencia indicada, confirmando así la identificación derivada del *fingerprinting* peptídico. Para localizar esta secuencia en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* (SGD, *Saccharomyces Genome Database*, Stanford University) se utilizó el programa BLASTP del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).



**FIGURA 3.10.- ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES DE LA PROTEÍNA PURIFICADA p55.**

Se muestra la proteína de 55 kDa purificada mediante cromatografía de afinidad separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%. Se indica el tamaño (kDa) de los marcadores de peso molecular (M). El trozo de gel conteniendo la proteína se recortó y se utilizó para digerir *in situ* y secuenciar los péptidos generados. La flecha señala la proteína de 55 kDa correspondiente según datos de secuenciación al factor de elongación Tef1.

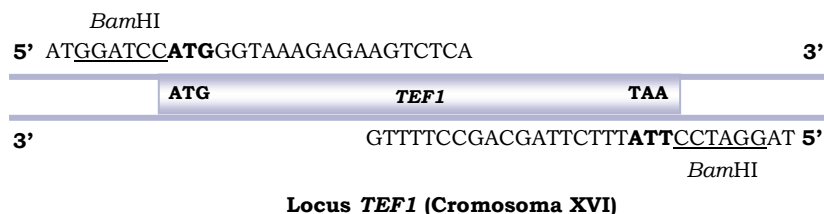
El factor de elongación traduccional EF-1 $\alpha$  de *S. cerevisiae* está codificado por dos genes, denominados *TEF1* y *TEF2*. Ambos genes codifican casi idénticas proteínas (Schirmaier y col., 1984) que además se encuentran con la misma homología de secuencia en varias especies de levadura. Esto determina que una única copia funcional de EF-1 $\alpha$  es viable, mientras que la interrupción de ambos es letal. Este factor es un miembro del grupo de proteínas requeridas para la elongación de la cadena durante la síntesis polipeptídica en el ribosoma mediando el correcto acoplamiento del aminoacil-ARNt sobre el locus A del ribosoma en una reacción dependiente de GTP, aunque también provoca la reorganización del citoesqueleto de la célula uniéndose al filamento de actina a través de un dominio rico en prolina (Umikawa y col., 1998).

La síntesis de proteínas en levaduras es inhibida por la eliminación de la fuente de carbono del medio de cultivo, mientras que la transcripción no se ve afectada (Ashe y col., 2000), y además esa inhibición es reversible sin la necesidad de establecer de nuevo un patrón de transcripción. De esta forma el aparato traduccional está altamente controlado por el estado nutricional de la célula, existiendo un paso previo no descrito el cual permite la rápida inhibición de la síntesis proteica en respuesta a cambios ambientales. De ahí que podamos atribuir la presencia de un factor traduccional conectado con la transcripción (Véase *Discusión*).

#### **4.3 Expresión del gen *TEF1* en *E. coli***

Para comprobar si p55 y Tef1 eran la misma proteína se expresó el gen *TEF1* en *E. coli* y se analizó la interacción de la proteína Tef1 recombinante con el sitio MED8<sub>GLK1</sub>. De esta forma se eliminaría la posibilidad de contaminación por otras proteínas de levadura, ya que los posibles complejos formados con proteínas bacterianas serían totalmente inespecíficos.

Como vector de expresión en *E. coli* se utilizó el plásmido pQE-30, descrito en el apartado 3 de *Materiales y Métodos* (Véase Fig. 5 de *Anexo*). Mediante PCR se amplificó, a partir del ADN genómico de la cepa DBY1315 de *S. cerevisiae*, un fragmento de 1377 pb del cromosoma XVI que contiene la secuencia codificadora completa del gen *TEF1*, usando los oligonucleótidos que se indican en la [Fig. 3.11](#), diseñados con sitios de corte para el enzima de restricción *Bam*HI.



**FIGURA 3.11.- OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN *TEF1* CON EXTREMOS *Bam*HI.**

Se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR la secuencia del gen *TEF1* localizado en el cromosoma XVI.

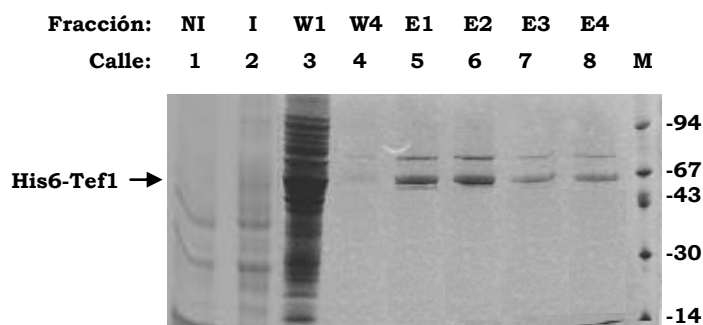
La estrategia seguida para la construcción del plásmido pQE30-TEF1 se indica a continuación. El producto de PCR fue subclonado en el vector pGEM-T (Véase Fig. 7 de *Anexo*), cuya característica es la de poseer una timina en sus extremos 3' (3'-T) con el fin de aumentar la eficacia de ligación con un producto de PCR dando lugar a la recircularización del vector y proporcionando una proyección para los productos de PCR generados por ciertas polimerasas. Estas polimerasas a menudo añaden una adenina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados. La mezcla de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* HB101 descrita en el apartado 1 de *Materiales y Métodos*, seleccionando los transformantes mediante crecimiento en placas de LB con ampicilina. Se obtuvo ADN plasmídico, el cual se cortó con el enzima de restricción *Bam*HI, y se subclonó en el vector pQE30 previamente digerido con el enzima de restricción *Bam*HI. La mezcla de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* HB101, seleccionando los transformantes mediante crecimiento en placas de LB con ampicilina. Se obtuvo ADN plasmídico, el cual se cortó con diferentes enzimas de restricción y se secuenció con objeto de seleccionar la construcción adecuada. Se obtuvo así la construcción

pQE30-TEF1 que nos permitiría producir en *E. coli* la proteína Tef1 con una cola de seis histidinas en su extremo amino-terminal.

El plásmido pQE30-TEF1 se usó para transformar varias cepas de *E. coli*. Esto nos permitió comprobar que las células de *E. coli* sintetizaban correctamente la proteína His6-Tef1 en respuesta a la presencia de IPTG en el medio de cultivo y también seleccionar la cepa más adecuada para expresar la proteína de fusión. Se seleccionó la cepa XL1-Blue descrita en el apartado 1.2 de *Materiales y Métodos*.

Una vez demostrada la correcta producción de la proteína, se procedió a purificarla a partir de un extracto de células XL1-Blue transformadas con el plásmido pQE30-TEF1. Se cultivó durante una noche a 37°C un preinóculo de una colonia en 10 ml de LB con ampicilina, que a la mañana siguiente se diluyó con 100 ml del mismo medio. Se añadió IPTG a una concentración final de 0.5 mM cuando las células se encontraban a una DO<sub>600</sub> de 0.6. Transcurridas 3 horas de inducción se recogieron las células, se lavaron y se resuspendieron en 1ml de tampón de lisis. Se les añadió 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. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 20.000 rpm durante 30 minutos y el extracto proteico libre de células se puso en contacto con 100 µl de resina *Ni-NTA* previamente equilibrados con 5 ml del mismo tampón de lisis, durante 1 hora.

Las proteínas contaminantes se eluyeron con tampón de lavado y la proteína His6-Tef1 con tampón de elución según se especifica en el apartado 7.9 de *Materiales y Métodos*. Finalmente, las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE, mostrándose los resultados en la [Fig. 3.12](#).



**FIGURA 3.12.- PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA His6-Tef1 MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD.**

Las células de la cepa de *E. coli* XL1-Blue transformadas con la construcción pQE30-TEF1 no inducidas (calle 1) e inducidas con IPTG (calle 2) se hirvieron en tampón de disociación y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 12% donde se observa la inducción de la proteína de fusión His6-Tef1. Tras incubar los extractos conteniendo la proteína de fusión His6-Tef1 con la resina de *Ni-NTA*, las proteínas inespecíficas fueron eluidas con tampón de lavado hasta no detectar proteínas (calles 3 y 4, correspondientes al primer W1 y último W4 lavado respectivamente). Entonces se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de elución recogiendo varias fracciones de eluido (calles 5-8). Se indican los marcadores de bajo peso molecular (M). La flecha señala la proteína de 55 kDa correspondiente a His6-Tef1.

En las calles 1 y 2 se cargaron las células no inducidas (NI) e inducidas (I) y en las calles 3 y 4 (W1 y W2) se cargaron la primera fracción de lavado y la última respectivamente, comprobándose la eliminación de proteínas contaminantes. En las sucesivas calles se cargaron las fracciones de eluidos. Tras la separación por SDS-PAGE y la tinción con azul de Coomassie se observó un alto número de bandas de proteínas en las fracciones correspondientes a los primeros lavados (calle 3), no detectándose bandas en la calle correspondiente al último lavado (calle 4). En las calles correspondientes a los eluidos se detectó una banda de proteína mayoritaria con un tamaño aproximado de 55 kDa, que coincide con el esperado para la proteína His6-Tef1. El pequeño tamaño de la cola de histidinas no supone cambio en el peso molecular de la proteína.

#### 4.4 Análisis de la interacción ADN-proteína de Tef1 con MED8<sub>GLK1</sub>

Los ensayos de retardo en gel para analizar la interacción de Tef1 con el elemento regulador de interés se llevaron a cabo con la proteína His6-Tef1, asumiendo que la cola de histidinas no interfiere en su unión con el ADN.

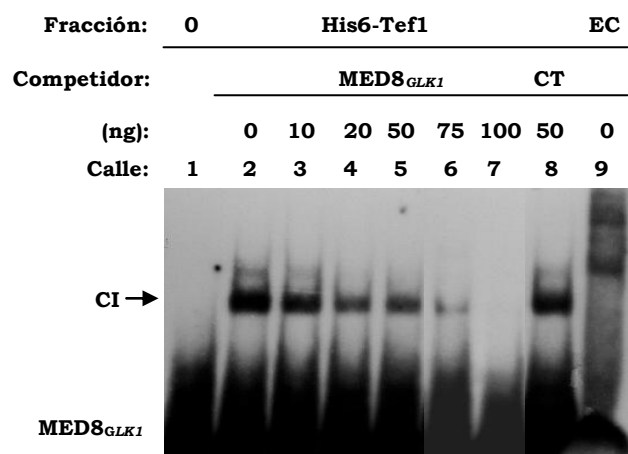
Como sonda utilizamos los oligonucleótidos que contienen el sitio MED8 del promotor *GLK1* marcado con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). Se llevaron a cabo simultáneamente ensayos de competencia específica e inespecífica usando oligonucleótido no marcado y ADN de timo de ternera respectivamente.

La reacción de unión ADN-proteína se realizó a temperatura ambiente. A continuación, los complejos ADN-proteína fueron separados del ADN libre por medio de una electroforesis nativa en gel de poliacrilamida al 4% (*Materiales y Métodos*, 9.1.4). El gel se secó y se expuso a autorradiografía a -70°C durante toda la noche. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.13](#).

Como se puede observar, en la calle 2 aparece un complejo CI con menor movilidad electroforética que la del control (calle 1). Esto se debe a la formación de complejos ADN-proteína por interacción de los oligonucleótidos MED8<sub>GLK1</sub> con la proteína His6-Tef1 de 55 kDa, lo que produce retrasos en la movilidad original del mismo. Además este complejo es desplazado por concentraciones crecientes de oligonucleótido sin marcar (calles 3, 4, 5, 6 y 7), mientras que la competencia no específica con ADN de timo de ternera (calle 8) no reduce la formación de dicho complejo, lo cual indica que la interacción de la proteína His6-Tef1 purificada con el oligonucleótido MED8 del gen *GLK1* es específica. Como control se incubó la sonda de ADN con un extracto proteico de células de *E. coli* de la cepa XL1-Blue transformadas con el vector de expresión pQE30 y crecidas durante 3 horas en presencia de IPTG 0.5 mM, con el fin de comprobar que las posibles proteínas bacterianas contaminantes no interfieran con



nuestra proteína de interés. En la calle 9 se muestra la formación de dos complejos inespecíficos cuando se utiliza dicho extracto.

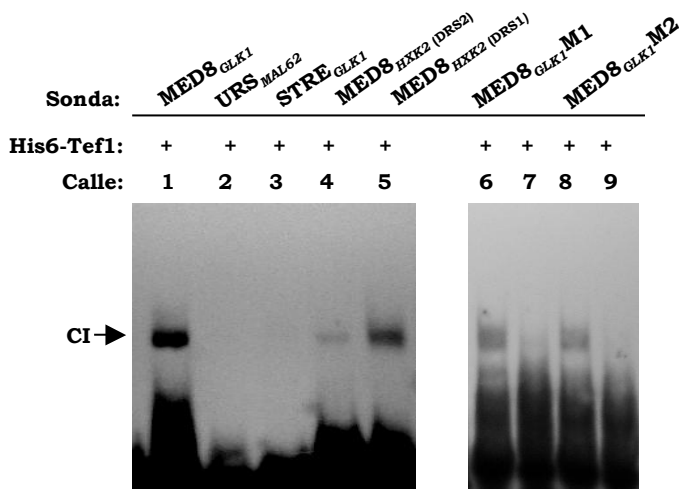


**FIGURA 3.13.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL SITIO MED8 DEL PROMOTOR *GLK1* Y LA PROTEÍNA His6-Tef1.**

Los ensayos de retardo en gel fueron realizados con el oligonucleótido conteniendo el sitio MED8 de *GLK1* (Ver apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*) marcado con  $^{32}\text{P}$ , en presencia de las fracciones de eluido que contienen la proteína de fusión His6-Tef1. El oligonucleótido no marcado MED8<sub>GLK1</sub> se usó como competidor específico a concentraciones crecientes y el ADN de timo de ternera como competidor inespecífico. En la calle 1 no se añade proteína, en la calle 2 la proteína procede de la fracción eluida. La reacción de unión contiene ADN no competidor (0), un exceso de 10 ng de ADN competidor (calle 3), un exceso de 20 ng de ADN competidor (calle 4), 50 ng (calle 5), 75 ng (calle 6) y un exceso de 100 ng de ADN competidor (calle 7). También contiene un exceso de 50 ng de ADN de timo de ternera (calle 8). En la calle 9 la mezcla de reacción contiene un extracto de *E. coli* que no contiene la proteína de interés. La flecha indica la localización del complejo ADN-proteína (CI) formado con dicho oligonucleótido y con la proteína His6-Tef1.

La especificidad de este complejo también se comprobó mediante experimentos de competencia específica utilizando otros elementos reguladores. Por un lado las secuencias que contienen el sitio MED8 en *HXK2* (DRS1 y DRS2), y que también abarcan el elemento ERA aunque no

totalmente conservado (calles 4 y 5). Como se puede observar la falta de conservación de secuencia afecta en la unión, sobre todo con DRS2. Por otro lado se utilizaron dos secuencias homólogas a ERA que incluyen un cambio de una purina por una pirimidina o viceversa a los que denominamos M1 (ACATGCA) y M2 (AAAGGCA) cuyos cambios no afectan en la unión de Tef1 aunque sí a la afinidad de dicha proteína por la secuencia (calles 6 y 8). Como control también utilizamos otros elementos cuya secuencia carece del elemento ERA como  $STRE_{GLK1}$  o  $URS_{MAL62}$  (calles 2 y 3). La influencia de estas sondas sobre la proteína His6-Tef1 se muestran en la Fig. 3.14.



**FIGURA 3.14.- ANÁLISIS DE COMPETENCIA ESPECÍFICA ENTRE DIFERENTES SONDAS Y LA PROTEÍNA His6-Tef1.**

Los ensayos de retardo en gel fueron realizados con el oligonucleótido conteniendo el sitio  $MED8$  de  $GLK1$  marcado con  $^{32}P$ , en presencia de la proteína His6-Tef1 (calle 1), con el oligonucleótido  $URS_{MAL62}$  (calle 2),  $STRE_{GLK1}$  (calle 3), los oligonucleótidos conteniendo el sitio  $MED8$  de  $HXK2$  (DRS2 en la calle 4) y (DRS1 en la calle 5). Además se comprobó la especificidad utilizando secuencias homólogas que incluyen el cambio de una base (calle 6 y 8). Con estas últimas sondas se utilizó el oligonucleótido no marcado  $MED8_{GLK1}$  M1 y M2 como competidor (calles 7 y 9). La flecha indica la localización del complejo ADN-proteína (CI) formado con dichos oligonucleótidos y con la proteína His6-Tef1.

La utilización de estas secuencias nos permite afirmar que esta proteína se une a la secuencia que comprende tanto el sitio MED8 como el elemento ERA del gen *GLK1*, aunque parece estar afectada esta unión cuando hay algún cambio de bases en la secuencia correspondiente a ERA.

## **5.- OBTENCIÓN DE MUTANTES AFECTADOS EN LA REPRESIÓN DEL GEN *GLK1* A TRAVÉS DEL SITIO MED8**

El método consistió en someter a mutagénesis *in vivo* a una cepa silvestre de levadura en cuyo genoma se había integrado una copia de la construcción pNI9-MED8 (incluye sitio MED8 y ERA aunque lo denominaremos conjuntamente MED8) que se muestra en la [Fig. 3.15](#), o en su caso una copia de la construcción pNI9-MED8/TAB. Esta última construcción posee además una secuencia de (TA)<sub>12</sub> repetidas las cuales contribuyen a un mayor descenso en la actividad β-galactosidasa (Herrero y col., 1999).

Dichas construcciones permiten que la expresión del gen *lacZ* tenga lugar bajo el control del sitio MED8/ERA, lo cual se ha comprobado examinando la actividad β-galactosidasa cuando las células han crecido en medios con glucosa y etanol como fuentes de carbono. La secuencia MED8 genera una disminución en los niveles de expresión del gen *lacZ* con respecto al control pNI9, en condiciones de desrepresión; siendo esta represión aún más drástica cuando en esta secuencia se incluye la caja TA (Véase el apartado 4.2 de *Introducción*). El efecto represor generado no es debido a un aumento en el distanciamiento de la caja TATA, ya que un fragmento de 140 pb del gen *HXK2*, careciendo de las DRS<sub>s</sub>, bajo el promotor *CYC1* genera la misma actividad que el control pNI9 (Herrero y col., 1996).

El hecho de que MED8 bloquee la expresión del gen *lacZ* cuando estas células crecen en condiciones de desrepresión ha sido el fundamento de la estrategia. Las células conteniendo en su genoma la construcción pNI9-MED8 presentan una actividad  $\beta$ -galactosidasa en etanol de 27 mU/mg y cuando se trata de la construcción pNI9-MED8/TAB los valores de actividad son de 8 mU/mg.

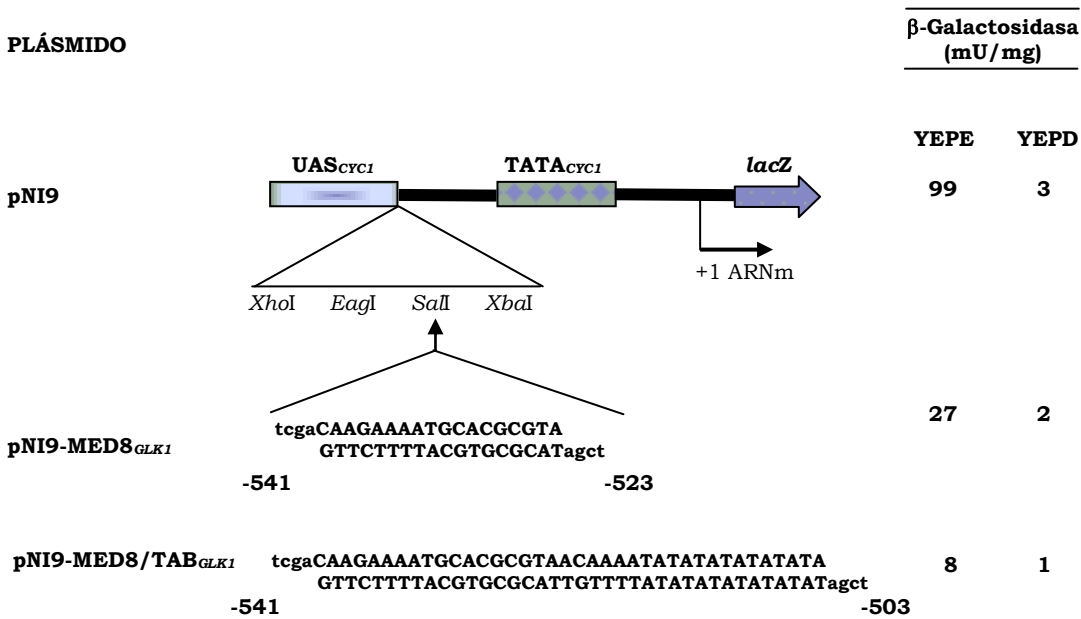


FIGURA 3.15.- REPRESIÓN DEL GEN *lacZ* POR EL SITIO MED8 DEL GEN *GLK1*.

Los oligonucleótidos conteniendo el sitio MED8 y el sitio MED8 seguido de la secuencia TA box fueron subclonados en el sitio *SalI* del vector pNI9. Una copia de cada construcción por separado se integró en el genoma de la cepa silvestre AMW13-C<sup>+</sup>. Las cepas transformantes se crecieron en YEPE (etanol) y en YEPD (glucosa) obteniéndose a continuación extractos libres de células para ensayar la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Empleando extractos proteicos de células crecidas en etanol se observó que el sitio MED8 reprime la expresión, siendo mayor el efecto represor cuando incluye la secuencia TA box.

Una vez mutagenizadas, se seleccionaron mutantes con altos niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de desrepresión. Posteriormente, dichos mutantes se transformaron con una genoteca de *S. cerevisiae* con objeto de seleccionar transformantes con reversión del fenotipo actividad  $\beta$ -galactosidasa. La recuperación del ADN plasmídico de dichos transformantes nos permitiría llevar a cabo estudios con los genes clonados encaminados a verificar si los productos que codifican están realmente implicados en la regulación del gen *GLK1* a través del sitio MED8 y complementan una mutación en una proteína represora.

### **5.1 Selección de mutantes afectados en la actividad represora del sitio MED8 del gen *GLK1***

Se ha utilizado, como punto de partida, las células de la cepa silvestre AMW13- $C^+$  transformadas con las construcciones pNI9-MED8 o pNI9-MED8/TAB respectivamente (Fig. 3.15). Dichas secuencias se encuentran subclonadas en el sitio *SaII* delante de las UAS<sub>s</sub> del promotor del gen *CYC1*, que a su vez está fusionado en pauta de lectura al gen *lacZ* de *E. coli*. Dichas construcciones se encuentran integradas en copia única en el locus *URA3* del genoma de la levadura, lo que ha sido corroborado mediante análisis *Southern* (datos no mostrados).

Las células pNI9-MED8 o pNI9-MED8/TAB, en fase de crecimiento exponencial, se incubaron durante 30 minutos con el agente mutagénico etilmetanosulfonato (EMS), tras lo cual se lavaron tres veces con agua estéril y se inocularon en placas de medio rico con etanol (YEPE). Las colonias crecidas en estas placas se sometieron a un primer *screening* con objeto de seleccionar posibles mutantes afectados en la represión del gen *lacZ*. El experimento consistió en analizar la actividad  $\beta$ -galactosidasa de todas las colonias simultáneamente. Para ello, las colonias fueron

transferidas a filtros de nitrocelulosa, y las células de las mismas, permeabilizadas con nitrógeno líquido. A continuación, los filtros de nitrocelulosa conteniendo células permeabilizadas de todas las colonias, se pusieron en contacto con filtros idénticos humedecidos con 2 ml de tampón Z conteniendo el sustrato cromogénico X-gal (*Materiales y Métodos*, 7.6.1), y se incubaron en una estufa a 30°C hasta que se observó la aparición de color.

Esto nos permitió llevar a cabo una primera selección de mutantes reguladores por comparación del color azul desarrollado con respecto al generado por las células pNI9-MED8 sin mutagenizar. Se seleccionaron aquellas colonias que desarrollaron un color azul más intenso que las células pNI9-MED8, y que por lo tanto habían perdido la capacidad de reprimir la expresión del gen *lacZ* a través del sitio MED8.



**FIGURA 3.16.- SELECCIÓN DE COLONIAS QUE HAN DESARROLLADO UN COLOR AZUL MÁS INTENSO QUE EL CONTROL.**

Se muestra una fotografía del filtro donde se llevó a cabo la segunda selección de actividad  $\beta$ -galactosidasa en placa. De esta forma se seleccionaron los tres mutantes (M1, M2 y M3) afectados en la regulación de *lacZ* a través del sitio MED8.

Las colonias seleccionadas se replicaron a placas de medio rico con etanol (YEPE) para analizarlas por segunda vez. Asimismo, se crecieron en medio líquido complejo con etanol (YEPE) y se les ensayó la actividad  $\beta$ -galactosidasa (*Materiales y Métodos*, 7.6.2).

Este método nos permitió seleccionar los tres mutantes que se muestran en la [Fig. 3.16](#) y que parecen estar afectados en la regulación de *lacZ* a través del sitio MED8.

<b>CEPA</b>	<b><math>\beta</math>-galactosidasa (mU/mg)</b>
<b>CONTROL</b> pNI9-MED8	27
<b>CONTROL</b> pNI9-MED8/TAB	8
<b>M1</b>	78
<b>M2</b>	64
<b>M3</b>	30

**TABLA 3.3.- MUTANTES AFECTADOS EN LA REPRESIÓN DEL GEN *lacZ* POR EL SITIO MED8 DEL GEN *GLK1*.**

La cepa control contiene en su genoma una copia de la construcción donde se ha subclonado en el sitio *SaII* del vector pNI9 (Fig. 3.15) la secuencia MED8 que abarca el elemento ERA o el elemento ERA/TAB. Esta cepa se mutagenizó con EMS y posteriormente se seleccionaron mutantes de alta actividad  $\beta$ -galactosidasa. En la tabla se muestran los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio líquido, de las cepas control y los tres mutantes seleccionados.

En la figura 3.16 se muestran las células control pNI9-MED8 y pNI9-MED8/TAB, junto a las células de los mutantes MED8-M1, MED8-M2 y MED8/TAB-M3, todas ellas en el filtro de nitrocelulosa donde se ha llevado a cabo el segundo *screening*. Como se puede apreciar, los tres mutantes han desarrollado un color azul visiblemente más intenso que las células control, especialmente el mutante MED8-M1.

En la [Tabla 3.3](#), se muestran los resultados de los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio líquido de todas las cepas, donde como vemos, los valores obtenidos son consistentes con la selección llevada a cabo por ensayos en placa. Las células pNI9-MED8 y pNI9-MED8/TAB utilizadas como control dan unos valores de actividad en etanol de 27 y 8 mU/mg respectivamente, las células del mutante MED8-M1 y MED8-M2 dan unas

actividades de 78 y 64 mU/mg, triplicando y doblando respectivamente la actividad de las células control; y las células del mutante MED8/TAB-M3 dan una actividad de 30 mU/mg, casi cuatro veces mayor que las de las células control.

## **5.2. Selección de transformantes con reversión del fenotipo actividad $\beta$ -galactosidasa**

Una vez seleccionado el conjunto de candidatos a mutantes en proteínas represoras, el siguiente paso es identificar los genes que codifican estas proteínas. Para ello, los mutantes seleccionados se transformaron con ADN de una genoteca de *S. cerevisiae*, con objeto de complementar la mutación producida y así recuperar los genes afectados en forma de plásmidos.

Las células de las cepas mutantes MED8-M1, MED8-M2 y MED8/TAB-M3 se transformaron con 1  $\mu$ l de ADN de la genoteca MW-90 de *S. cerevisiae* que, como se especifica en el apartado 4 de *Materiales y Métodos*, está construida en el vector episomal YEp351 (Véase Fig.1 de *Anexo*) que posee como marcador el gen *LEU2*. Por cada transformación realizada en base al protocolo que se describe en el apartado 5.8 de *Materiales y Métodos*, se prepararon dos alícuotas de células que se inocularon a placas de medio mínimo con etanol y sin leucina (SCE-leu-) (*Materiales y Métodos*, 2.1).

Las colonias de levaduras transformadas con los plásmidos de la genoteca, se analizaron mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en placa similares a los efectuados en la selección de los mutantes, descritos en el apartado 5.1 de este capítulo. Se trataba en este caso de seleccionar colonias que desarrollasen un color azul menos intenso que el desarrollado por el mutante de procedencia o en su caso colonias que desarrollasen un color azul de intensidad igual que la cepa control pNI9-MED8 o pNI9-MED8/TAB a partir de las cuales se obtuvieron los mutantes.



En este primer *screening* se seleccionó un gran número de transformantes, que se replicaron a nuevas placas de medio mínimo sin leucina para repetir el análisis. Muchos de ellos resultaron ser falsos positivos pero con el resto se prepararon cultivos en medio mínimo con etanol y sin leucina (SCE-leu-) y se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

De esta manera se obtuvieron con cada uno de los mutantes una serie de transformantes de los que se seleccionaron algunas cepas capaces de revertir su fenotipo, en este caso actividad  $\beta$ -galactosidasa, igualándose al control pNI9-MED8 o pNI9-MED8/TAB. Sus niveles de actividad en medio YEPE se muestran en la Tabla 3.4.

Como se puede comprobar, los transformantes MED8/M1-T1.3, MED8/M2-T1.14 y MED8/TAB/M3-T3.6 recuperan el fenotipo observado para la cepa control en cuanto a niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

CEPA	pNI9MED8/M1	pNI9MED8/M2	pNI9MED8/TAB/M3
CONTROL	27	27	8
MUTANTE	78	64	30
TRANSFORMANTE	23	28	9

**TABLA 3.4.- ACTIVIDAD  $\beta$ -GALACTOSIDASA DE LOS TRANSFORMANTES SELECCIONADOS.**

Una vez seleccionados los mutantes, se transformaron con una genoteca de *S. cerevisiae* y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de dichos transformantes. En este caso se seleccionaron colonias que desarrollasen un color azul menos intenso que el desarrollado por el mutante de procedencia o en su caso colonias que desarrollasen un color azul de intensidad igual que la cepa control. De esta manera se obtuvieron con cada uno de los mutantes una serie de transformantes capaces de revertir su fenotipo.

### 5.3 Recuperación y análisis de los plásmidos clonados

Con las premisas anteriores nos propusimos recuperar los plásmidos MED8/M1-T1.3, MED8/M2-T1.14 y MED8/TAB/M3-T3.6 a partir de las levaduras. Para ello, se crecieron las tres cepas en medio líquido SCE sin leucina y se resuspendió el *pellet* de células de 1.5 ml de cada cultivo en 200  $\mu$ l de tampón de rotura, 200  $\mu$ l de una mezcla fenol/cloroformo (1:1) y 0.3 gramos de bolas de Ballotini. Se rompieron las células agitando en *vortex* 5 minutos y se recogió la fase superior, la cual se precipitó con acetato amónico 7.5 M, según se describe en el apartado 5.2 de *Materiales y Métodos*. A partir de esta preparación se transformó la cepa de *E. coli* HB101.

La eficacia de transformación fue baja con independencia de la cantidad de ADN utilizada para transformar. Todas las colonias de bacterias fueron analizadas y el plásmido recuperado se sometió a sucesivas digestiones con diferentes enzimas de restricción dando lugar algunas de ellas a plásmidos con inserto. Del resto sólo se recuperó el vector YEp351 en el cual está construida la genoteca.

Los plásmidos con inserto fueron analizados mediante secuenciación y sucesivas digestiones con distintos enzimas. Se determinó de esta manera que el tamaño aproximado del inserto era de 4.000 pb.

Esta construcción se digirió con los enzimas *Pst*I y *Eco*RI obteniéndose tres fragmentos; un fragmento de aproximadamente 5600 pb correspondiente al vector YEp351, un fragmento *Pst*I/*Eco*RI de aproximadamente 2900 pb y un fragmento *Eco*RI/*Eco*RI de aproximadamente 1000 pb correspondientes al inserto desconocido subclonado en el vector YEp351. El fragmento *Pst*I/*Eco*RI se subclonó en el vector YEp531 previamente digerido con los enzimas *Pst*I y *Eco*RI. El fragmento *Eco*RI se subclonó en el vector YEp531 previamente digerido con

---

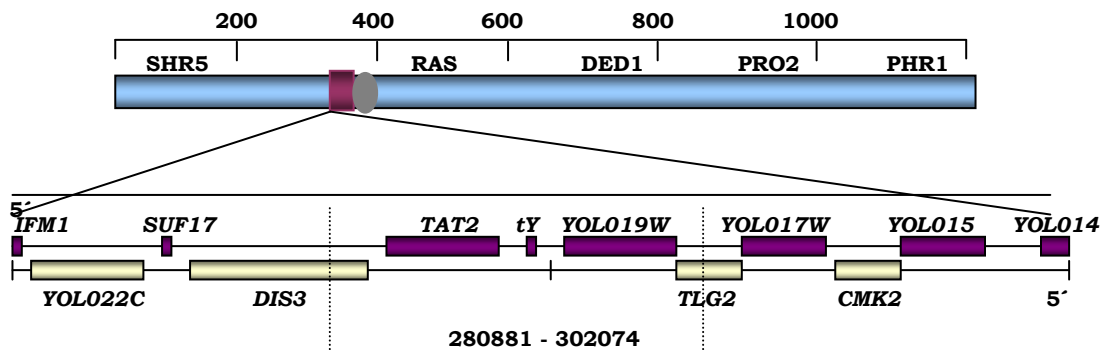
el enzima *EcoRI*. Ambas construcciones fueron secuenciadas utilizando como cebadores los oligonucleótidos universal y reverso descritos en el apartado 5.11 de *Materiales y Métodos*.

Se leyeron unas 110 pb del inserto y dichas secuencias se compararon con la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) y las secuencias de proteínas con la base de datos NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) mediante el programa FASTA (Pearson y Lipman., 1988) y BLASTP (Altschul y col., 1990). Ambas secuencias se localizaron con una gran homología en el brazo corto del cromosoma XV de *S. cerevisiae* en el locus *YOL019W*. La localización se muestra en la [Fig. 3.17](#).

Anterior a este locus se encuentran los locus *TAT2* de 1779 pb y *DIS3* de 3006 pb; éste último no llegaría a ser abarcado por nuestro fragmento *PstI/EcoRI*. Posterior a él se encuentra el locus *TLG2* de 1194 pb que tampoco fue totalmente abarcado por nuestro fragmento.

La razón que nos llevó a acotar la secuencia del inserto al locus *YOL019W* o recientemente identificado *TOS7* de 1656 pb, fue el de tratarse de una secuencia que codificaba para una proteína de función desconocida denominada Tos7, por lo que nos pareció más apropiado para ser un perfecto candidato a desempeñar una función en la ruta de señalización por glucosa. Por el contrario, *TAT2* codifica para una triptófano permeasa de alta afinidad, lo que nos hace descartarlo como un posible factor transcripcional implicado en el sistema de represión por glucosa. Asimismo el producto del gen *DIS3* es una subunidad del complejo de la 3'-5' exoribonucleasa siendo un posible componente de la ruta RCC1-Ran. Por su parte *TLG2* codifica para un miembro de la familia de las sintaxinas t-SNAREs cuya función afecta a la fusión de vesículas en el aparato de Golgi.

El plásmido YEp351/TOS7 fue usado para transformar de nuevo la cepa mutante MED8-M1. Se analizaron los transformantes mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa similares a los efectuados en la selección de los mutantes, descritos en el apartado 5.1 de este capítulo.



**FIGURA 3.17.- LOCALIZACIÓN DEL INSERTO CLONADO POR COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL EN EL CROMOSOMA XV DE *S. cerevisiae*.**

Se muestran los elementos del cromosoma XV localizados entre las coordenadas 280881-302074 pb. Las franjas discontinuas verticales acotan la región del cromosoma que abarca el inserto clonado. En dicha región se encuentran los genes *TAT2*, *YOL019W* y parte de *DIS3* y *TLG2*.

En este caso el fenotipo ha de ser equivalente al del transformante MED8/M1-T1.3 (Tabla 3.4) donde los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa eran iguales a los de la cepa control pNI9-MED8. Se obtuvieron varios transformantes todos ellos con valores similares cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.5.

<b>CEPA</b>	<b>pNI9-MED8/M1</b>
<b>CONTROL</b>	27
<b>MUTANTE</b>	70
<b>TRANSFORMANTE</b>	26

**TABLA 3.5.- ACTIVIDAD  $\beta$ -GALACTOSIDASA DEL TRANSFORMANTE YEp351/TOS7.**

El mutante M1 se utilizó para transformar con el plásmido YEp351/TOS7 midiéndose la actividad  $\beta$ -galactosidasa. En este caso se seleccionaron colonias que desarrollasen un color azul menos intenso que el desarrollado por el mutante de procedencia o en su caso colonias que desarrollasen un color azul de intensidad igual que la cepa control.

Los datos son satisfactorios con lo esperado por lo que parece que la proteína Tos7 de algún modo está implicada en la regulación a través del elemento MED8. Actualmente, el propósito sería construir un mutante nulo interrumpiendo el gen *TOS7* con el marcador *URA3*, experimentos encaminados a comprobar si realmente el producto de este gen está implicado en la regulación del gen *GLK1* a través del elemento MED8.

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento muestran claramente a Hxk2 nuclear como un importante factor participando en el complejo sistema regulador que media la represión y la inducción por glucosa. Esta función la ejerce a través del sitio MED8, motivo de 7 pb, encontrado en los promotores de los genes *SUC2*, *HXK2*, *HXK1* y *GLK1*, en la que su implicación ha quedado demostrada no sólo con la participación en complejos ADN-proteicos en el caso del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998) sino también por las diferencias de expresión de estos genes en presencia o ausencia de Hxk2. Además la proteína Hxk2 influye en las interacciones ADN-proteína a través del sitio MED8 encontrándose un patrón de bandas diferencial en su presencia.

La proteína Med8 identificada como un factor transcripcional de unión al motivo heptamérico presente en el gen *SUC2*, también forma complejos con el sitio MED8 de los demás genes que lo contienen.

Aprovechando que este motivo contenía en su secuencia el elemento ERA en el gen *GLK1* y tratando de identificar los factores que operan a través de esta secuencia se han identificado y clonado dos genes cuyos productos participan en el control de esta vía de señalización. Así se han identificado las proteínas Tef1 y Tos7 como dos factores implicados en la señalización de la vía. Sin embargo, se desconoce el mecanismo a través del cual participan.

#### **6.- ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA ENTRE LOS DIFERENTES FACTORES QUE FORMAN PARTE DEL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL GLUCOSA DEPENDIENTE DE Hxk2**

Una de las formas de actuación más directas de la proteína Hxk2 en la señalización por glucosa podría ser la de interactuar con otros factores implicados en la transducción de la señal. Su localización nuclear y su participación en complejos ADN-proteína con elementos reguladores del gen *SUC2* actuando en *cis* son puntos de partida interesantes. La proteína Hxk2 forma parte de un complejo regulador de la expresión del gen *SUC2* a nivel del sitio MED8, al cual se une la proteína Med8. Esto sugiere que Med8 y Hxk2 forman parte de un mismo complejo ADN-proteína regulador implicado en la represión de la transcripción del gen *SUC2*, siendo de gran interés confirmar la interacción entre Hxk2 y Med8, así como determinar la interacción con otros factores transcripcionales como Mig1. Recordemos que uno de los sitios MED8 del promotor del gen *SUC2* solapa con el sitio de unión para Mig1.

Para estudiar estas posibles interacciones utilizamos el sistema del doble-híbrido, experimentos de co-precipitación e inmunoprecipitación. Además para identificar los dominios de estas proteínas implicados en dicha interacción utilizamos una serie de deleciones en el extremo 3' del gen MED8, de las que disponíamos en nuestro laboratorio.

Una de estas deleciones carece de 10 aminoácidos de su extremo C-terminal (Med8-C10), 8 de los cuales contienen grupos hidroxilo. Por sus funciones Med8 debe localizarse en el núcleo donde interacciona con proteínas del complejo Srb/mediador y con secuencias específicas de ADN. Tanto las interacciones entre proteínas como con el ADN pueden estar reguladas por fosforilación/defosforilación. En el caso de Mig1, el transporte al núcleo está regulado por fosforilación de algún residuo hidroxilado y esta deleción en Med8 incluye 8 residuos hidroxilados.

Las otras dos deleciones carecen respectivamente de 47 y 63 aminoácidos del extremo C-terminal (Med8-C47 y Med8-C63), entre los cuales existen abundantes residuos básicos (lisinas y argininas) e hidroxilados. En numerosas proteínas nucleares, entre ellas Hxk2, se ha identificado una señal SLN (Véase apartado 2.2 de *Introducción*) de localización nuclear que consiste en dos residuos básicos separados por tres aminoácidos uno de los cuales es prolina (Herrero y col., 1998). La eliminación de estos residuos podría afectar al transporte al núcleo o a su capacidad para unirse al ADN o a otras proteínas. Las tres proteínas truncadas mantienen intacto el extremo amino-terminal donde se localiza el motivo de cremallera de leucina.

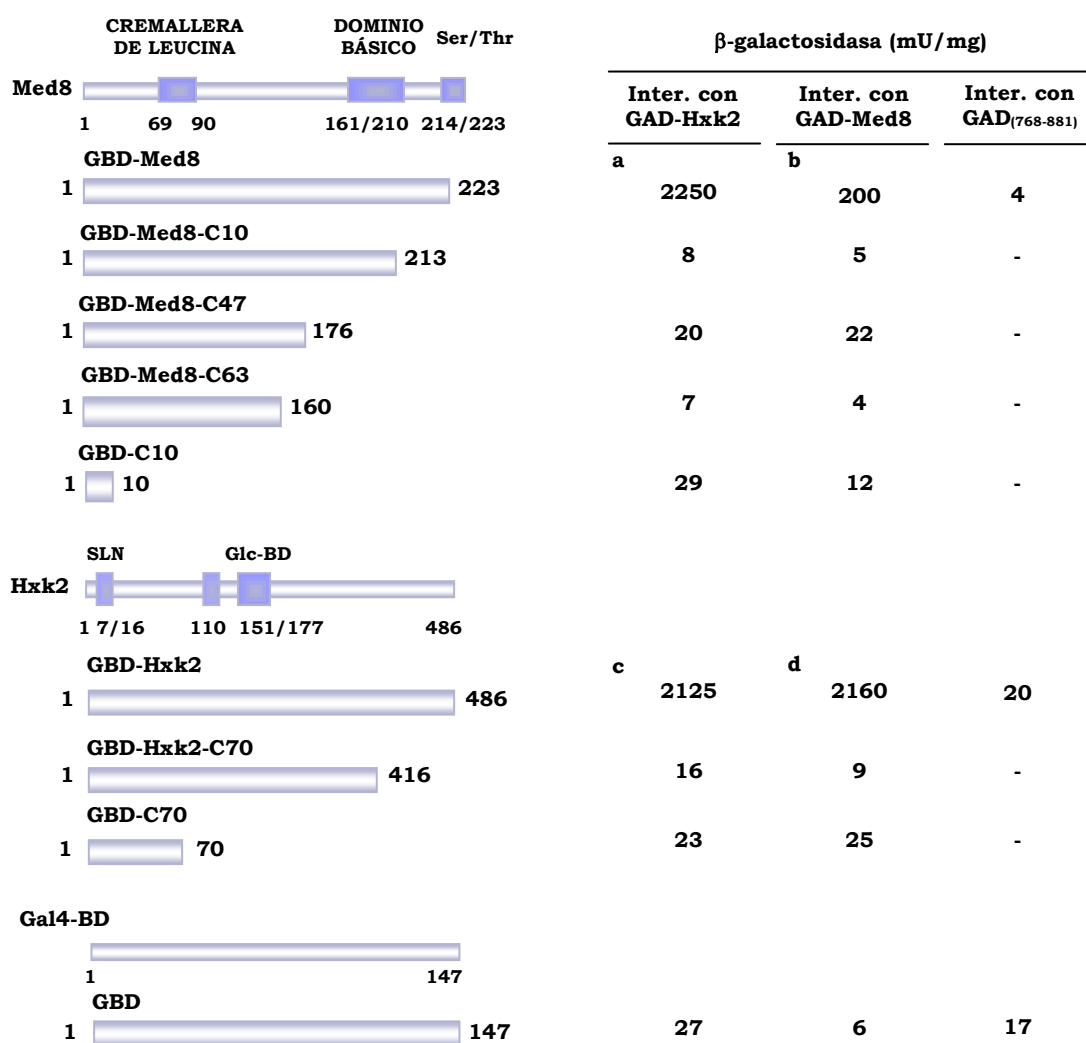
Para una mayor información acerca de las construcciones utilizadas en el sistema del doble-híbrido y fusiones con GST utilizadas en los ensayos de co-inmunoprecipitación, véase (de la Cera y col., 2002).

### 6.1 Análisis de la interacción Hxk2-Med8 mediante doble-híbrido

Para corroborar tal hipótesis se ha utilizado el sistema del doble-híbrido descrito en el apartado 10 de *Materiales y Métodos*. Consiste básicamente en detectar interacciones entre dos proteínas recombinantes Gal4BD-proteína X y Gal4AD-proteína Y, producidas por una cepa de levadura que contenga integrados en su genoma genes heterólogos que se expresan bajo el control de Gal4, y que por tanto se pueden usar como marcadores, en este caso *lacZ*.

Para ello, utilizamos la secuencia codificadora completa del gen *MED8* subclonada en el vector pGBKT7 (Véase Fig. 6 de *Anexo*); así de esta forma la proteína Med8 fusionada al dominio de unión de Gal4 *GAL4BD-MED8* se utilizó como cebo. Por otro lado en nuestro grupo de trabajo también disponíamos de Hxk2 fusionada al dominio de activación de Gal4 *GAL4AD-HXK2* utilizando el vector pGADT7 (Véase Fig. 7 de *Anexo*). El plásmido pGBKT7-MED8 fue co-transformado con un plásmido expresando una fusión del dominio de activación de *GAL4* con Hxk2 o un plásmido expresando una fusión del dominio de activación de *GAL4* con Med8 en la cepa de *S. cerevisiae* Y187. Los co-transformantes se seleccionaron en medio SCD sin triptófano y sin leucina, marcadores de los vectores pGBKT7 y pGADT7 respectivamente. La interacción entre las proteínas Hxk2-Med8, Med8-Med8 y Hxk2-Hxk2 se siguió mediante la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa, con ensayo en filtro y en medio líquido. Los datos de actividad se muestran en la [Fig. 3.18](#). La expresión de los niveles de las proteínas de fusión GAD y GBD fue controlada mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos policlonales anti-Hxk2 y anti-Med8 o bien anti-HA ya que el epítipo HA está fusionado al dominio Gal4AD en el vector pGADT7 (datos no mostrados).





**FIGURA 3.18.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Hxk2 CON Med8 Y DIMERIZACIÓN DE Hxk2 Y Med8 MEDIANTE DOBLE-HÍBRIDO.**

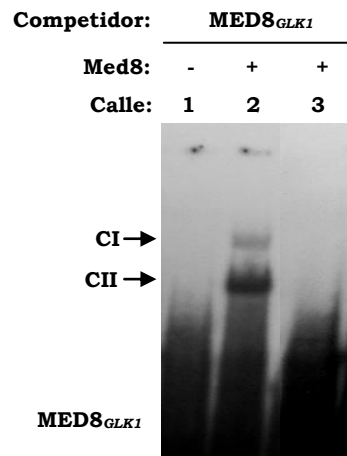
Las proteínas fragmentadas de Med8 (Med8-C10, aa 1-213; Med8-C47, aa 1-176 y Med8-C63, aa 1-160) y Med8 completa (Med8, aa 1-223) fusionadas al dominio de unión de Gal4 (GBD) fueron individualmente co-transformadas en la cepa de levadura Y187 con las construcciones codificando el dominio de activación GAD solo o fusionado a la proteína Hxk2 completa (a) (Hxk2, aa 1-485) o Med8 completa (b) (Med8, aa 1-223). La proteína truncada de Hxk2 (Hxk2-C70, aa 1-416) y Hxk2 completa (Hxk2, aa 1-485) fusionadas al dominio de unión de Gal4 (GBD) fueron individualmente co-transformadas en la cepa de levadura Y187 con las construcciones codificando el dominio de activación GAD fusionado a la proteína Hxk2 completa (c) (Hxk2, aa 1-485) o Med8 completa (d) (Med8, aa 1-223). Las interacciones proteína-proteína fueron examinadas en cada transformante mediante un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto cuantitativo como cualitativo. Los valores son la media de la actividad de tres de los transformantes.

Como se muestra en la [Fig. 3.18a](#), la proteína Med8 completa da lugar a una fuerte interacción con Hxk2. La magnitud de la señal obtenida podría estar afectada por otros factores además de las dos proteínas implicadas. Esto se deduce por la variación en dicha magnitud cuando ésta misma interacción se da entre proteínas con los dominios GAD y GBD intercambiados. Sin embargo, como se muestra en la [Fig. 3.18d](#), en nuestro estudio tal variación en la actividad  $\beta$ -galactosidasa no se detectó cuando Hxk2 y Med8 fueron intercambiadas entre GAD y GBD. Este resultado sugiere que la intensidad de la señal obtenida es principalmente debida a la unión entre Hxk2-Med8.

Dado que la proteína Med8 tiene un dominio de cremallera de leucina entre los aminoácidos 69 y 90, éste podría estar relacionado con su capacidad de unirse a otras proteínas formando homo- o hetero-dímeros. Intentando resolver si esta proteína forma parte de un monómero o un homo-dímero se ha hecho un estudio de doble híbrido con el par Med8-Med8 dando lugar, en el caso de la proteína completa, a una más débil pero significativa interacción ([Fig. 3.18b](#)). También se ha llevado a cabo un ensayo control entre el par Hxk2-Hxk2, cuya homodimerización ya había sido descrita (Furman y Neet, 1983; Randez-Gil y col., 1998b; Golbik y col., 2001). En la [Fig. 3.18c](#) se muestran los resultados obtenidos confirmando la capacidad de Hxk2 para interaccionar consigo misma formando un homo-dímero. En todos los casos y como control las proteínas completas o truncadas de Hxk2 y Med8 fueron individualmente co-transformadas con la construcción que codifica el dominio de activación de Gal4 solo (GAD) no detectándose interacción como era de esperar.

La formación de dímeros también se pone de manifiesto en la [Fig. 3.19](#) donde los dos complejos ADN-proteína que se forman entre Med8 y MED8<sub>GLK1</sub> son debidos a la concentración de proteína Med8 purificada. Es

decir, grandes concentraciones de la proteína Med8 permiten disponer de mayor cantidad de proteína capaz de formar dímeros. Por el contrario concentraciones menores de Med8 tan solo permite su unión como monómero.



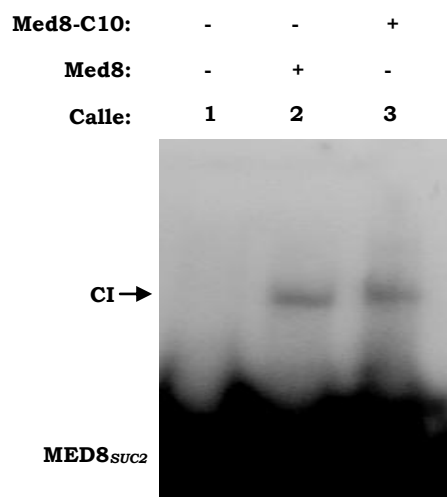
**FIGURA 3.19.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Med8 CON EL SITIO MED8 DEL PROMOTOR GLK1 EN FORMA DE HOMO-DÍMERO.**

La reacción incluye 0.5 ng de (<sup>32</sup>P)MED8<sub>GLK1</sub> como sonda de ADN y, excepto en la calle 1, 6 µl (3 µg) de la proteína Med8 purificada mediante cromatografía de afinidad (calles 2 y 3). Como competidor específico se utilizó 20 ng del correspondiente oligonucleótido anillado MED8 no marcado radiactivamente (calle 3). Los complejos núcleo-proteicos fueron resueltos del ADN libre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Las flechas indican la localización de los complejos ADN-proteína (CI y CII) formados con el oligonucleótido y con la proteína Med8 purificada. La formación de dos complejos indica la homo-dimerización de Med8 para unirse al ADN.

## 6.2 Identificación de los dominios de Med8 y Hxk2 involucrados en la interacción

Disponemos de tres construcciones a las que denominamos Med8-C10, Med8-C47 y Med8-C63, las cuales carecen de 10, 47 y 63 aminoácidos respectivamente. Muchos de estos aminoácidos eliminados son motivos ricos en serina/treonina y motivos básicos (Démolis y col., 1993).

Para comprobar si la eliminación de los 10 últimos aminoácidos afecta a la capacidad de unión al ADN se utilizó en el ensayo de retardo la proteína Med8-C10 purificada y como sonda el fragmento de ADN conteniendo el sitio MED8 del gen *SUC2*. Estos residuos son serinas y treoninas susceptibles de fosforilación, lo cual puede habilitar a una proteína reguladora para reconocer sus secuencias diana en el ADN. La capacidad de unión al ADN no se ve afectada en el caso de Med8-C10 como se comprueba en la [Fig. 3.20](#). En la calle 3 se observa la formación de un complejo idéntico al formado con la proteína completa (calle2).



**FIGURA 3.20.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Med8-C10 CON EL SITIO MED8 DEL PROMOTOR *SUC2*.**

La reacción incluye 0.5 ng de (<sup>32</sup>P)MED8<sub>SUC2</sub> como sonda de ADN y, excepto en la calle 1, 6 µl (3 µg) de la proteína Med8 (calle 2) y Med8-C10 (calle 3) purificadas mediante cromatografía de afinidad. Los complejos núcleo-proteicos fueron resueltos del ADN libre mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La flecha indica la localización del complejo ADN-proteína (CI) formado con el oligonucleótido y con las proteínas Med8 y Med8-C10 purificadas.

En el caso de la interacción proteína-proteína; se ha seguido la misma estrategia que en el apartado 6.1 de este capítulo pero utilizando las versiones truncadas del gen *MED8* subclonadas en el vector pGBKT7. Cada uno de estos plásmidos fue co-transformado con un plásmido expresando una fusión del dominio de activación con la proteína Hxk2 o con Med8 completas. También se utilizó una versión de Hxk2 a la que le faltan 70 aminoácidos del extremo C-terminal (Hxk2-C70) fusionada a Gal4BD, co-transformada con un plásmido expresando una fusión del dominio de activación con la proteína Hxk2 o con Med8 completas.

En este caso como se muestra en la [Fig. 3.18a](#) no se detectó interacción entre Hxk2 y cualquier delección de Med8. Los mismos resultados se obtuvieron cuando se analizó la interacción entre Med8 completa y las deleciones de Med8 ([Fig. 3.18b](#)). La ausencia de interacción no es debida a ausencia de expresión, ya que todas las fusiones GBD-Med8 fueron detectadas por análisis *Western* utilizando anticuerpos anti-c-Myc (epítipo presente en el dominio BD) (datos no mostrados). La fusión GBD-Med8-C10 no es capaz de interactuar ni con Hxk2 ni con Med8. La región delecionada en GBD-Med8-C10 contiene el dominio rico en serina/treonina con varios sitios potenciales de fosforilación. Estos resultados indican que el dominio de interacción de Med8 incluye el decapeptido C-terminal, lo que sugiere que la fosforilación de esta región podría estar involucrada en la modulación de la unión de ambas proteínas.

Por otro lado y respecto al dominio de Hxk2 que es importante para la interacción de estas proteínas, en nuestros resultados no obtuvimos interacción entre Hxk2-C70 y Hxk2 completa o Med8 completa ([Fig. 3.18c](#), [3.18d](#)). Por tanto el dominio de interacción de Hxk2 puede incluir una región contenida en los 70 aminoácidos del extremo C-terminal. La expresión de GBD-Hxk2-C70 fue detectada mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos anti-Hxk2 (datos no mostrados).

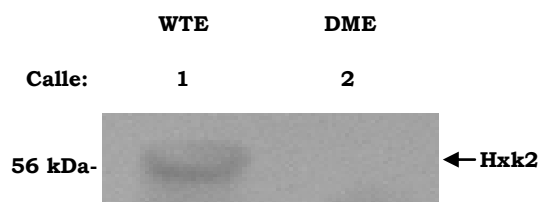
Para entender el modo de acción de ambas regiones, el decapeptido C-terminal de Med8 y los 70 aminoácidos de Hxk2, quisimos probar su interacción directa con las proteínas completas Med8 y Hxk2. Los resultados indican que ésta no es la única región de interacción con Med8 y Hxk2. Los péptidos aislados no interaccionan en el sistema del doble híbrido (Fig. 3.18a y 3.18c). En este contexto resulta enigmático que las construcciones en el dominio GBD del doble híbrido con fragmentos tan pequeños portando sólo los péptidos del extremo C-terminal de Med8 y Hxk2 fracasaran en su interacción con las proteínas completas. Sin embargo, esto podría ser causado por la naturaleza artificial del propio sistema del doble-híbrido, debido en parte a que una proteína de fusión con sólo parte de su extremo C-terminal de Med8 o Hxk2 puede resultar en un plegamiento incorrecto de los dominios de interacción de Med8 o Hxk2. De esta forma la superficie de la proteína necesaria para la interacción no queda accesible.

Podemos concluir que el sistema del doble-híbrido nos ha permitido demostrar que Med8 y Hxk2 interaccionan y que esta interacción depende de los 10 aminoácidos del extremo C-terminal de Med8 y de los 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2, aunque estos dominios de las proteínas no son suficientes para establecer la interacción.

### **6.3 Análisis de la interacción Hxk2-Med8 *in vivo* e *in vitro* mediante ensayos de inmunoprecipitación y coprecipitación como fusiones con GST**

Para completar los resultados del doble-híbrido procedimos a realizar ensayos de coprecipitación de proteínas o *pull down* con extractos proteicos y con proteínas purificadas. Para ello partimos purificando la proteína Med8 como fusión con GST a partir de la construcción pGEX-MED8. Esta

construcción se transformó en la cepa de *E. coli* BL21, induciéndose con 0.5 mM de IPTG a 37°C durante 3 horas. Las células inducidas se recogieron por centrifugación y se procedió a su purificación como se ha comentado en el apartado 7.8 de *Materiales y Métodos*. El extracto libre de células se incubó con 100 µl de glutation-sepharosa 4B equilibrados con 5 ml de PBS durante un mínimo de 1 hora a 4°C y con agitación. Se retiró el extracto y se lavó la columna con 5 ml de PBS. La proteína de fusión GST-Med8 acoplada a la resina se incubó con extractos proteicos (*Materiales y Métodos*, 7.1) procedentes de una cepa silvestre DBY1315 de levadura y una cepa doble mutante DBY2052 (*hxx1Δhxx2Δ*) durante 1 hora a 4°C en tampón PBS (*Materiales y Métodos*, 10.2). Transcurrido este tiempo se lavó exhaustivamente la resina con 2.5 ml de PBS y se hirvió en 25 µl de tampón de disociación (Tris-HCl 50 mM a pH 6.8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%). Se analizó mediante SDS-PAGE seguida de análisis *Western* usando anticuerpos anti-Hxx2. El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia, según las instrucciones de *Amersham Biosciencias* para el *kit* comercial *ECL*. En la [Fig. 3.21](#) se observa una fuerte retención de la proteína Hxx2 en las muestras conteniendo GST-Med8 y extractos de levadura de la cepa silvestre DBY1315 (calle 1). Sin embargo, cuando el extracto incubado con GST-Med8 es un doble mutante *hxx1Δhxx2Δ* (calle 2) como es lógico no se observa retención de Hxx2, lo que además sirve para comprobar que dicha unión es específica y no debida a otras proteínas presentes en el extracto.



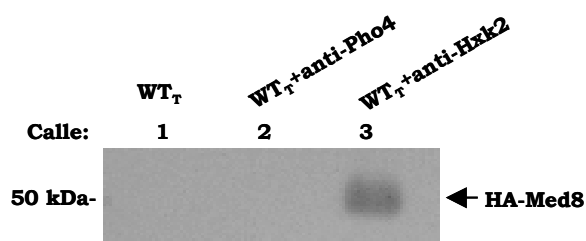
**FIGURA 3.21.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxk2-Med8 MEDIANTE COPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTRACTOS PROTEICOS.**

La proteína Med8 co-precipita junto con Hxk2 procedente de extractos celulares. Los extractos de la cepa silvestre de levadura (WTE) (DBY1315, *HXK1 HXK2*) (calle 1) y doble mutante (DME) (DBY2052, *hxk1Δhxk2Δ*) (calle 2) fueron incubadas con la proteína GST-Med8 inmovilizada sobre glutation-sepharosa. Las proteínas co-precipitadas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y visualizadas mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos anti-Hxk2.

Para confirmar la interacción Hxk2-Med8 en condiciones fisiológicas realizamos ensayos de inmunoprecipitación. Para ello partimos de una cepa de levadura transformada expresando la proteína Med8 completa junto con el epítipo HA en su extremo N-terminal. Se prepararon extractos proteicos y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos que se indican a continuación (*Materiales y Métodos*, 10.3). Los extractos se incubaron con 1  $\mu$ l de anticuerpo anti-Hxk2 durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de proteína A-Sepharosa (*Amersham Biosciencics*) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó la Sepharosa con tampón Staph A (NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 101 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM a pH 7.3, Tritón X-100 al 20%, SDS 1% y deoxicolato 5%) y el inmunoprecipitado se hirvió en tampón de disociación. Se analizó mediante SDS-PAGE al 12% y se detectó por análisis *Western* usando anticuerpos anti-HA. El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia, según las instrucciones de *Amersham Biosciencics* para el *kit* comercial *ECL*.



En la [Fig. 3.22](#) se observa una fuerte y específica señal cuando se inmunoprecipita la muestra con anticuerpos anti-Hxk2 (calle 3). Por el contrario, no se observa señal cuando se usan anticuerpos policlonales anti-Pho4 para detectar inmunoprecipitación inespecífica (calle 2) ó cuando no se usan anticuerpos para detectar posibles uniones proteicas inespecíficas al anticuerpo anti-HA-Med8 (calle 1).

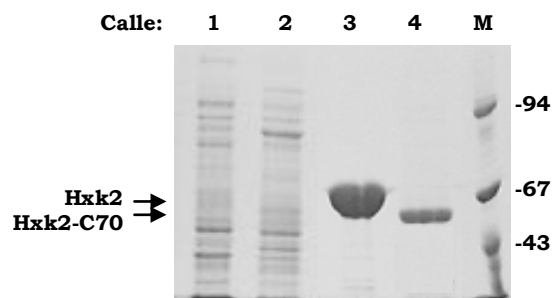


**FIGURA 3.22.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxk2-Med8 MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN.**

Se muestra la co-inmunoprecipitación *in vivo* de Med8 con Hxk2. Las células de la cepa Y187 de *S. cerevisiae* fueron transformadas con GAD-Med8 etiquetada con el epítipo HA. Los extractos celulares de la cepa silvestre Y187 transformada WT<sub>T</sub> (calle 1) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal de Pho4 (calle 2) o un anticuerpo policlonal de Hxk2 (calle 3). Los inmunoprecipitados fueron separados mediante SDS-PAGE al 12% y los co-precipitados GAD-Med8 fueron visualizados mediante análisis *Western* con anticuerpos anti-HA con la ayuda de un epítipo HA presente en el dominio GAD.

Con los resultados obtenidos hasta el momento no podemos excluir la posibilidad de que algunas proteínas desconocidas puedan estar presentes mediando la interacción entre Hxk2 y Med8. Por ello decidimos realizar experimentos de co-precipitación con proteínas purificadas mostrando una interacción directa. Primeramente purificamos las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70 según se especifica en el apartado 7.8 de *Materiales y Métodos*. Los vectores de expresión de proteínas fusionadas a GST (pGEX-HXK2, -HXK2-C70) de los que disponíamos en nuestro laboratorio se transformaron en la

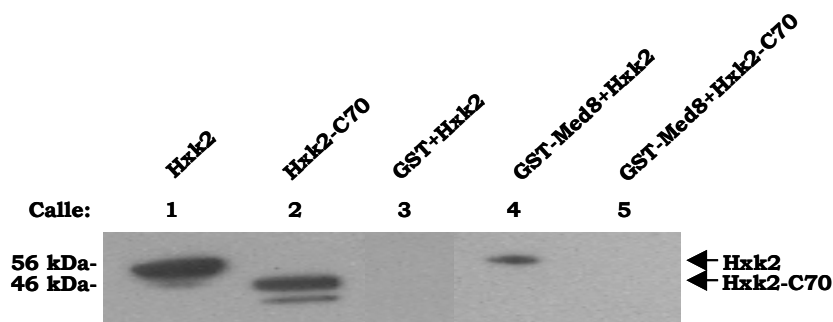
cepa de *E. coli* BL21 y las células se crecieron hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.6, induciéndose con 0.5 mM de IPTG a 37°C durante 3 horas. Las células inducidas se recogieron por centrifugación y el extracto libre de células se incubó con 100  $\mu$ l de glutation-sepharosa 4B equilibrados con 5 ml de PBS durante un mínimo de 1 hora a 4°C y con agitación. Se retiró el extracto y se lavó la columna con 5 ml de PBS y se resuspendió en el mismo tampón. Las proteínas de fusión GST-Hxk2 y GST-Hxk2-C70 acopladas a la resina se incubaron con 2.5 U de trombina durante 2 horas a 4°C con el fin de escindir estas proteínas de la GST. Los resultados de purificación se muestran en la [Fig. 3.23](#) donde se muestra en la calle 3 la proteína Hxk2 de 60 kDa purificada libre de GST y en la calle 4 la proteína Hxk2-C70.



**FIGURA 3.23.- PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Hxk2 Y Hxk2-C70 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Las células de la cepa de *E. coli* BL21 transformadas con la construcción pGEX-HXK2 no inducidas (calle 1) e inducidas con IPTG (calle 2) se hirvieron en tampón de disociación y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% donde se observa la inducción de la proteína de fusión GST-Hxk2. Tras incubar los extractos conteniendo la proteína de fusión GST-Hxk2 ó GST-Hxk2-C70 con la resina de glutation-sepharosa, las proteínas inespecíficas fueron eluidas con PBS hasta no detectar proteínas. La resina con las proteínas GST-Hxk2 ó GST-Hxk2-C70 inmovilizadas y libres de contaminantes se incubaron independientemente con PBS y 2.5 U de trombina durante 2 horas; recogiendo en una única fracción (E) de 150  $\mu$ l las proteínas Hxk2 ó en su caso Hxk2-C70 libres de GST (calles 3 y 4). Se indican los marcadores de bajo peso molecular (M). Las flechas señalan las proteínas de 56 kDa y 46 kDa correspondientes a Hxk2 y Hxk2-C70 respectivamente. La identidad de Hxk2 fue confirmada mediante análisis *Western* con la utilización de anticuerpos anti-Hxk2.

Procedimos del mismo modo que con los extractos incubando la proteína de fusión GST-Med8 y la proteína GST utilizada como control acopladas a la resina con las proteínas purificadas Hxk2 y Hxk2-C70 y utilizando anticuerpos anti-Hxk2. En la [Fig. 3.24](#) se observa una fuerte y específica retención de Hxk2 completa (calle 4) con la muestra conteniendo la fusión GST-Med8, y sin embargo, esta retención no ocurre con la versión truncada Hxk2-C70 (calle 5). El control (calle 3) sirve de nuevo para comprobar la posible unión inespecífica de otras proteínas de *E. coli* que pudiesen ser purificadas conjuntamente con Hxk2.



**FIGURA 3.24.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxk2-Med8 MEDIANTE COPRECIPITACIÓN CON PROTEÍNAS PURIFICADAS.**

Las proteínas de fusión GST-Hxk2 y GST-Hxk2-C70 fueron purificadas en columnas de glutatión e incubadas con trombina, como hemos visto en la figura 3.23, para aislar Hxk2 nativa (calle 1) y Hxk2-C70 (calle 2) respectivamente. Hxk2 fue incubada con la proteína purificada GST inmovilizada a las columnas de glutatión (calle 3) y lavada exhaustivamente. Ambas proteínas, Hxk2 (calle 4) ó Hxk2-C70 (calle 5), fueron también incubadas con la proteína GST-Med8 inmovilizada al glutatión y lavadas exhaustivamente. Las proteínas co-precipitadas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70 se visualizaron mediante análisis *Western* con anticuerpos anti-Hxk2.

Estos resultados junto con el doble-híbrido demuestran que la proteína Hxk2 completa es capaz de interactuar directamente con la proteína Med8 completa *in vivo* e *in vitro*. Además de todo ello se deduce que los 70

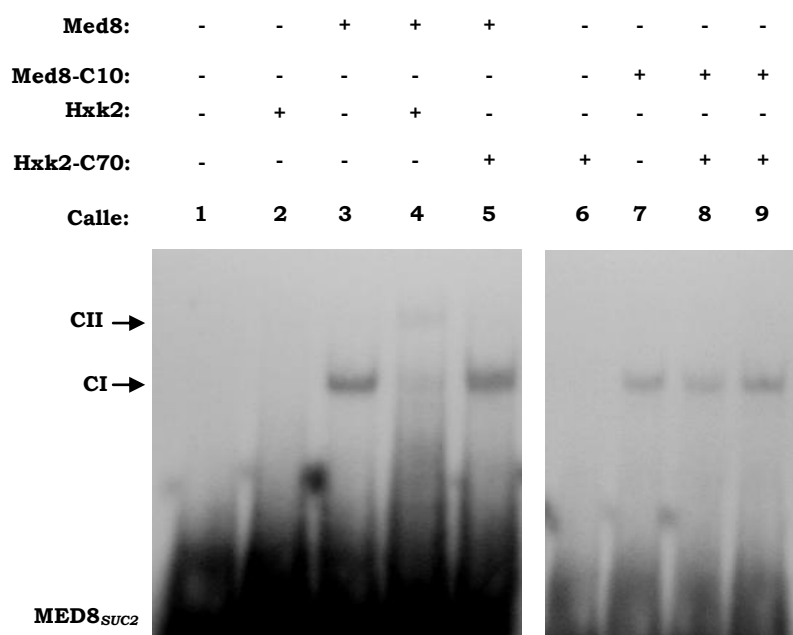
aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2 y el decapeptido C-terminal de Med8 son requeridos para la interacción Hxk2-Med8.

#### **6.4 Colocalización de Hxk2 y Med8 mediante ensayos de retardo en gel**

Para determinar la significancia biológica de la interacción entre Hxk2 y Med8, tratamos de comprobar si éstas dos proteínas colocalizan en el mismo complejo de unión ADN-proteína mediante ensayos de retardo en gel. Lo que cabría esperar sería que detectásemos un patrón de bandas diferencial entre Med8 y la interacción Hxk2-Med8 con el sitio MED8 del ADN. Para ello necesitamos purificar las proteínas Med8 completa, Med8-C10, Hxk2 completa y Hxk2-C70 según hemos comentado en los apartados anteriores de este capítulo. Como sonda utilizamos el oligonucleótido que contiene el sitio MED8 del gen *SUC2* marcado con ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). Se llevó a cabo la reacción de unión ADN-proteína según lo descrito en el apartado 9.1.4 de *Materiales y Métodos*. Los resultados se muestran en la [Fig. 3.25](#).

Como es de esperar se forma un complejo ADN-proteína entre Med8 y el sitio MED8 (calle 3), cuya especificidad ha quedado demostrada con la utilización de oligonucleótido no marcado en la Fig. 3.3 de este capítulo. Este mismo resultado había sido observado con la proteína de fusión GST-Med8 (Chaves y col., 1999). Considerando el efecto de Hxk2 sobre la formación del complejo Med8-MED8<sub>*SUC2*</sub>, se puede observar en la calle 4 que la incorporación de Hxk2 a la mezcla de reacción cambia la posición del complejo CI Med8-ADN hacia la parte superior del gel, dando lugar a un

complejo CII de menor movilidad. Se obtienen resultados similares cuando Hxk2 es añadida a la mezcla después de permitir la formación del complejo Med8-ADN (datos no mostrados).



**FIGURA 3.25.- ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA ENTRE Med8 Y LA INTERACCIÓN Hxk2-Med8 CON LA REGIÓN REGULADORA MED8<sub>suc2</sub>.**

Los experimentos de retardo en gel se llevan a cabo como ya se ha descrito en la leyenda de la figura 3.3. Se obtuvieron las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70, respectivamente de las fusiones GST-Hxk2 y GST-Hxk2-C70 acopladas a la glutation-sepharosa por escisión con trombina. Para el control se añadió solamente ADN marcado (calle 1). CI, indica la posición del complejo observado con las proteínas purificadas Med8 ó Med8-C10 y CII, indica la posición del complejo observado con las proteínas purificadas Med8 y Hxk2.

Para confirmar que el complejo CII estaba causado por la interacción entre Hxk2 y Med8 y no directamente por unión al ADN realizamos dos ensayos; uno de ellos analizando la actividad de unión al ADN de la proteína Hxk2 con el sitio MED8 y otro consistente en estudiar el efecto de Hxk2-C70, la cual no interacciona con Med8 en los ensayos de doble-híbrido e inmunoprecipitación, sobre la formación del complejo Med8-MED8<sub>suc2</sub>. Como se puede ver en las calles 2 y 5, la proteína Hxk2 no se une al ADN y la Hxk2-C70 no tiene efecto sobre el patrón de bandas observado con Med8. Además Hxk2-C70 no se une al ADN (calle 6). Por lo

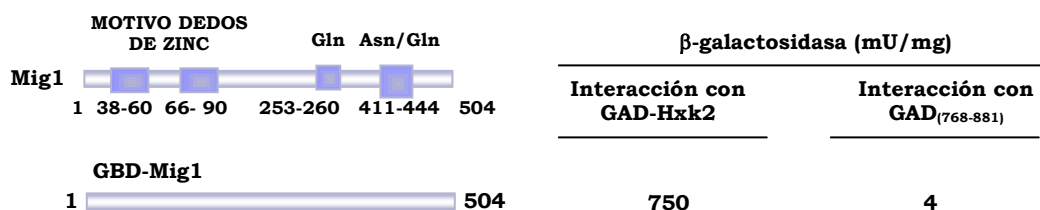
que concluimos que Hxk2 confiere una menor movilidad al complejo CI por interacción con el componente Med8 del complejo núcleo-proteico.

Para analizar el papel del decapeptido C-terminal sobre la unión de Med8 al sitio MED8, utilizamos esta versión truncada de Med8 para medir su afinidad por dicho sitio. En la calle 7 comprobamos que la unión de Med8p-C10 es tan eficiente como la de la proteína completa como se muestra también en la Fig. 3.20 de este capítulo. También por ello comprobamos el efecto de Hxk2 y Hxk2-C70 sobre la formación de dicho complejo, y como cabría esperar no tienen efecto alguno sobre el patrón de bandas observado con Med8-C10 (calles 8 y 9) coincidiendo con los resultados anteriores de doble-híbrido e inmunoprecipitación. Esto sugiere que la delección de los 10 aminoácidos del extremo C-terminal no elimina la actividad de unión al ADN aunque sí la de interacción con Hxk2.

### **6.5 Análisis de la interacción Hxk2-Mig1 mediante doble-híbrido**

Uno de los principales represores identificados en la vía de señalización por glucosa es Mig1 (Treitel y Carlson., 1995), cuya localización nuclear está controlada por este azúcar. La función represora es ejercida a través de la secuencia consenso T(G/C)(C/T)GGGG presente en numerosos genes reprimibles por glucosa, entre ellos el gen *SUC2*. Este motivo de unión a Mig1 se encuentra solapando con una de las dos secuencias de unión a Med8. Hasta el momento hemos demostrado la unión existente entre Med8 y Hxk2 formando parte de un mismo complejo ADN-proteína regulador. Por ello sugerimos la posibilidad de que Mig1 forme parte de este complejo a través de su unión a Hxk2 en otras condiciones metabólicas impidiendo la función de Med8.

Uno de los primeros experimentos para comprobar esta unión fue el ensayo del doble-híbrido, procediendo del mismo modo que en el apartado 6.1 de este capítulo. Utilizamos en este caso la secuencia codificadora completa del gen *MIG1* subclonada en el vector pGBKT7; así de esta forma la proteína Mig1 fusionada al dominio de unión de Gal4 *GAL4BD-MIG1* se utilizó como cebo. El plásmido pGBKT7-MIG1 fue co-transformado con un plásmido expresando una fusión del dominio de activación *GAL4* con Hxk2 en la cepa de *S. cerevisiae* Y187. Los co-transformantes se seleccionaron en medio SCD sin triptófano y sin leucina, marcadores de los vectores pGBKT7 y pGADT7 respectivamente y la interacción entre las proteínas Hxk2-Mig1 se siguió mediante la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa, con ensayo en filtro y en medio líquido. Los datos de actividad se muestran en la [Fig. 3.26](#). La expresión de los niveles de la proteína de fusión GBD fue controlada mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos policlonales anti-c-Myc (epítipo presente en el dominio BD) (datos no mostrados).



**FIGURA 3.26.- ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE Hxk2 CON Mig1 MEDIANTE DOBLE-HÍBRIDO.**

La proteína Mig1 completa (Mig1, aa 1-504) fusionada al dominio de unión de Gal4 (GBD) fue individualmente co-transformada en la cepa de levadura Y187 con la construcción codificando el dominio de activación GAD fusionado a la proteína Hxk2 completa (Hxk2, aa 1-485) o el dominio de activación GAD solo. Las interacciones proteína-proteína fueron examinadas en cada transformante mediante un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa tanto cuantitativo como cualitativo. Los valores son la media de la actividad de tres de los transformantes.

Como se muestra en esta figura, la proteína Mig1 completa da lugar a una interacción con Hxk2, aunque la magnitud de la señal obtenida es más débil que en la interacción Hxk2-Med8.

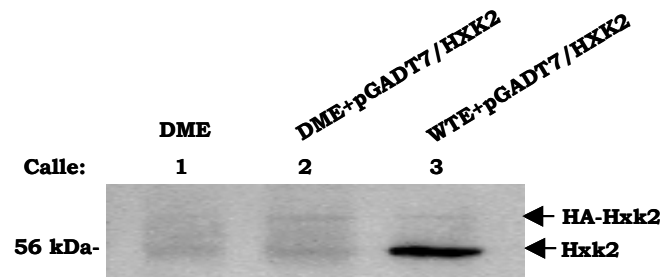
### **6.6 Análisis de la interacción Hxk2-Mig1 *in vivo* e *in vitro* mediante ensayos de inmunoprecipitación y coprecipitación como fusiones con GST**

De nuevo quisimos comprobar la veracidad de los resultados del doble-híbrido mediante ensayos de coprecipitación de proteínas con extractos proteicos y con proteínas purificadas. Se purificó la proteína Mig1 como fusión con GST a partir de la construcción pGEX-MIG1 (disponible en nuestro grupo) según se ha comentado en el apartado 7.8 de *Materiales y Métodos*. La proteína de fusión GST-Mig1 acoplada a la resina se incubó con extractos proteicos (*Materiales y Métodos*, 7.1) procedentes de una cepa de levadura doble mutante DBY2052 (*hxk1Δhxk2Δ*), una doble mutante DBY2052 (*hxk1Δhxk2Δ*) transformada con el plásmido pGADT7 expresando la proteína recombinante Hxk2 unida al epítipo HA y una cepa silvestre DBY1315 transformada con el mismo plásmido. La expresión de *HXK2* se determinó por actividad fosforiladora de fructosa (datos no mostrados) (*Materiales y Métodos*, 7.4.2). Tras la incubación y después de lavar la resina con 2.5 ml de PBS, se hirvió en 25  $\mu$ l de tampón de disociación (Tris-HCl 50 mM a pH 6.8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, glicerol 10%). Se analizó mediante SDS-PAGE seguida de análisis *Western* usando anticuerpos anti-Hxk2. El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia.

En la [Fig. 3.27](#) no se observa retención de la proteína Hxk2 en las muestras conteniendo GST-Mig1 y extractos de levadura de la cepa doble mutante (*hxk1Δhxk2Δ*) (calle 1). Sin embargo, cuando el extracto incubado



con GST-Mig1 es un doble mutante (*hxx1Δhxx2Δ*) expresando una proteína Hxx2 recombinante (calle 2) sólo se observa retención de la proteína recombinante Hxx2. En la calle 3 la retención es debida no sólo a la proteína Hxx2 recombinante sino también a la nativa.



**FIGURA 3.27.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxx2-Mig1 MEDIANTE COPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON EXTRACTOS PROTEICOS.**

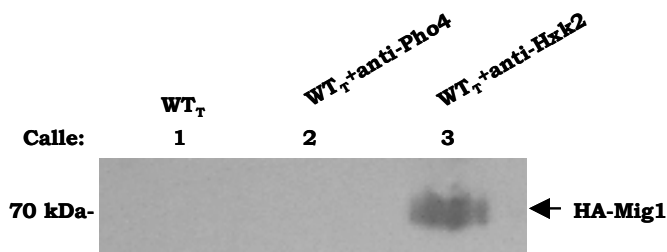
La proteína Mig1 co-precipita junto con Hxx2 procedente de extractos celulares. Los extractos de la cepa doble mutante de levadura (DME) (DBY2052, *hxx1Δhxx2Δ*) (calle 1), doble mutante transformada con el plásmido pGADT7 expresando la proteína Hxx2 (calle 2) y una cepa silvestre(WTE) (DBY1315, *HXX1 HXX2*) transformada con el plásmido pGADT7 expresando la proteína Hxx2 (calle 3) fueron incubadas con la proteína GST-Mig1 inmovilizada sobre glutation-sepharosa. Las proteínas co-precipitadas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y visualizadas mediante análisis *Western* utilizando anticuerpos anti-Hxx2. Las flechas indican las posiciones de la proteína nativa y recombinante respectivamente.

La interacción Hxx2-Mig1 en condiciones fisiológicas se analizó mediante ensayos de inmunoprecipitación. Partimos de una cepa de levadura transformada expresando la proteína Mig1 completa junto con el epítipo HA en su extremo N-terminal. Se prepararon extractos enteros que se incubaron con 1  $\mu$ l de anticuerpo anti-Hxx2 durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de proteína A-Sepharosa (*Amersham*

*Biosciencíes*) y se incubó durante 1 hora a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó la Sepharosa con tampón Staph A y el inmunoprecipitado se hirvió en tampón de disociación. Se analizó mediante SDS-PAGE al 12% y se detectó

por análisis *Western* usando anticuerpos anti-HA. El revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se siguió por quimioluminiscencia.

En la [Fig. 3.28](#) se observa una fuerte y específica señal cuando se inmunoprecipita la muestra con anticuerpos anti-Hxk2 (calle 3). Por el contrario, no se observa señal cuando se usan anticuerpos policlonales anti-Pho4 para detectar inmunoprecipitación inespecífica (calle 2) ó cuando no se usan anticuerpos para detectar posibles uniones proteicas inespecíficas al anticuerpo anti-HA-Mig1 (calle 1).

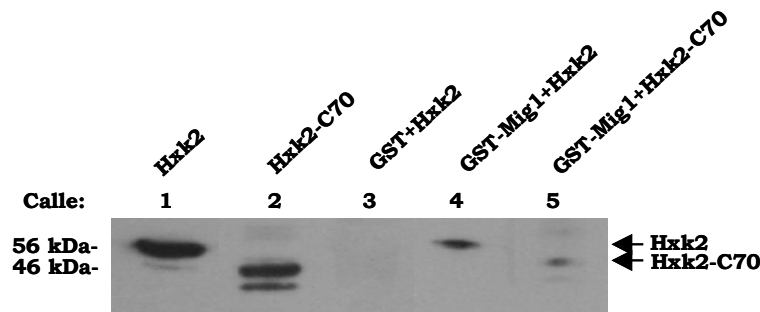


**FIGURA 3.28.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxk2-Mig1 MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN.**

Se muestra la co-inmunoprecipitación *in vivo* de Mig1 con Hxk2. Las células de la cepa Y187 de *S. cerevisiae* fueron transformadas con GAD-Mig1 etiquetada con el epítipo HA. Los extractos celulares de la cepa silvestre Y187 transformada (calle 1) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal de Pho4 (calle 2) o un anticuerpo policlonal de Hxk2 (calle 3). Los inmunoprecipitados fueron separados mediante SDS-PAGE al 12% y los co-precipitados GAD-Mig1 fueron visualizados mediante análisis *Western* con anticuerpos anti-HA con la ayuda de un epítipo HA presente en el dominio GAD.

Al igual que en el caso de Med8 llevamos a cabo un mismo experimento con proteínas purificadas con el fin de excluir la posibilidad de que algunas proteínas desconocidas puedan mediar la interacción entre Hxk2 y Mig1. Se utilizaron las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70 purificadas mostradas en la [Fig. 3.23](#), para incubar con la proteína de fusión GST-Mig1 y la proteína GST utilizada como control acopladas a la resina. En la detección se utilizaron anticuerpos anti-Hxk2. En la [Fig. 3.29](#) se observa una fuerte y específica retención de Hxk2 completa (calle 4) con la muestra conteniendo

la fusión GST-Mig1, al igual que en la calle 5 donde se comprueba que en este caso la versión truncada de Hxk2 sí interacciona con Mig1. Con el control (calle 3) comprobamos que no existe unión inespecífica a la resina.



**FIGURA 3.29.- ENSAYO DE LA INTERACCIÓN Hxk2-Mig1 MEDIANTE COPRECIPITACIÓN CON PROTEÍNAS PURIFICADAS.**

Las proteínas de fusión GST-Hxk2 y GST-Hxk2-C70 fueron purificadas en columnas de glutation e incubadas con trombina, como hemos visto en la figura 3.23, para aislar Hxk2 nativa (calle 1) y Hxk2-C70 (calle 2) respectivamente. Hxk2 fue incubada con la proteína purificada GST inmovilizada a las columnas de glutation (calle 3) y lavada exhaustivamente. Ambas proteínas, Hxk2 (calle 4) ó Hxk2-C70 (calle 5), fueron también incubadas con la proteína GST-Mig1 inmovilizada al glutation y lavadas exhaustivamente. Las proteínas co-precipitadas fueron separadas en un gel de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70 se visualizaron mediante análisis *Western* con anticuerpos anti-Hxk2.

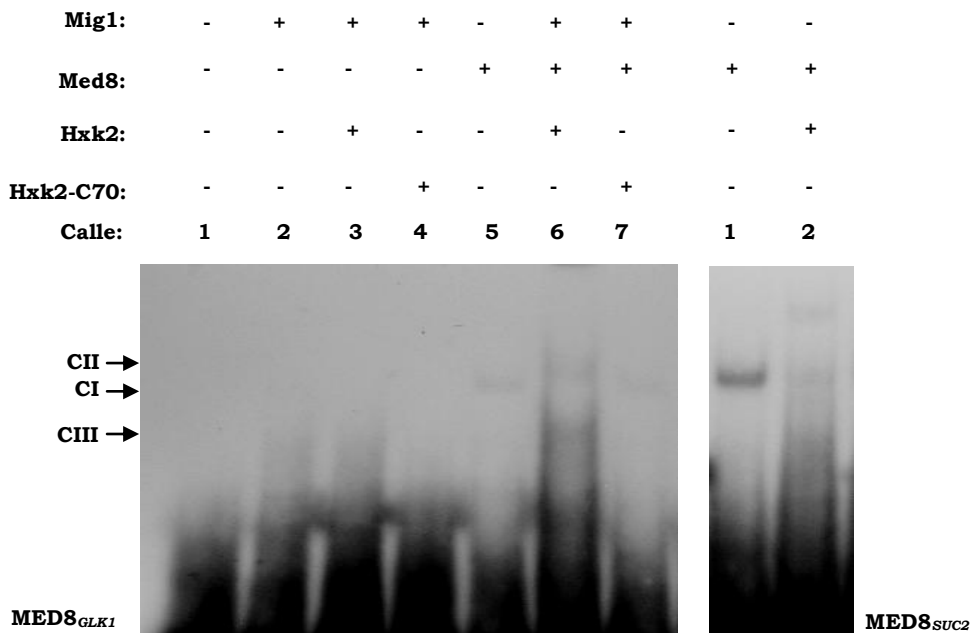
Estos resultados muestran que la proteína Mig1 es capaz de interactuar *in vivo* e *in vitro* directamente con la proteína Hxk2 completa y con la versión truncada a la que le faltan 70 aminoácidos. Por lo que se deduce para la interacción Hxk2-Mig1 no se requieren los 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2 teniendo lugar a través de un dominio diferente.

### 6.7 Colocalización de Hxk2 y Mig1 mediante ensayos de retardo en gel

Al igual que en el caso de la interacción Hxk2-Med8 para comprobar si Mig1 y Hxk2 colocalizan en el mismo complejo de unión ADN-proteína se

realizaron ensayos de retardo en gel, con el fin de detectar un patrón de bandas diferencial entre Med8 y la interacción Med8-Hxk2-Mig1 con el sitio MED8 del ADN. Además posiblemente este patrón de bandas sea diferente también del formado por la interacción Hxk2-Med8 (Fig. 3.25, calle 4). Para ello utilizamos las proteínas Med8 completa, Hxk2 completa, Mig1 completa y Hxk2-C70 purificadas y como sonda utilizamos el oligonucleótido que contiene el sitio MED8 del gen *GLK1* marcado con ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )dCTP (*Materiales y Métodos*, 5.13). La necesidad de utilizar este oligonucleótido se debe a que carece de sitio de unión a Mig1, mientras que el oligonucleótido correspondiente al sitio MED8 del gen *SUC2* tiene un sitio de unión a Mig1 localizado solapando con el primer sitio MED8; lo que supondría la formación de complejos diferenciales debidos a su unión al ADN y no debidos a unión entre proteínas. Se llevó a cabo la reacción de unión ADN-proteína (*Materiales y Métodos*, 9.1.4). Los resultados se muestran en la Fig. 3.30.

Se comprueba que Mig1 no se une a este sitio (calle 2) y que ni Hxk2 completa ni Hxk2-C70 tampoco lo hacen cuando éstas se añaden a la reacción (calles 3 y 4). Se forma el complejo ADN-proteína esperado entre Med8 y el sitio MED8 (calle 5). Para comprobar si la unión Hxk2-Mig1 es significativa en esta mezcla de reacción de Med8-MED8<sub>GLK1</sub> se incorporan las proteínas Hxk2 y Mig1. Además de considerar el efecto que causa Hxk2 sobre la formación del complejo Med8-MED8<sub>SUC2</sub> visto en la figura 3.25 también cabe considerar ahora el efecto de Mig1 sobre éste mismo complejo al unirse a Hxk2 dando lugar a la interacción Med8-Hxk2-Mig1. La incorporación de ambas proteínas (calle 6) no sólo cambia la posición del complejo CI Med8-ADN hacia la parte superior del gel, dando lugar a un complejo CII de menor movilidad, sino que también da lugar a la formación de un nuevo complejo CIII de mayor movilidad.



**FIGURA 3.30.- ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA ENTRE Med8 Y LA INTERACCIÓN Med8-Hxk2-Mig1 CON LA REGIÓN REGULADORA MED8<sub>GLK1</sub>.**

Los experimentos de retardo en gel se llevan a cabo como ya se ha descrito en la leyenda de la figura 3.3. Se obtuvieron las proteínas Hxk2 y Hxk2-C70, respectivamente de las fusiones GST-Hxk2 y GST-Hxk2-C70 acopladas a la glutation-sepharosa por escisión con trombina. Para el control se añadió solamente ADN marcado (calle 1). CI, indica la posición del complejo observado con la proteína purificada Med8; CII y CIII, indican la posición de los complejos observados con las proteínas purificadas Med8, Hxk2 y Mig1. Este patrón de bandas es diferente del encontrado con las proteínas Med8 y Hxk2. Como comparación se muestra el ensayo de retardo generado por las proteínas Med8 y Hxk2 correspondiente a la figura 3.25.

Este patrón de bandas es diferente al obtenido cuando sólo tiene lugar la interacción Hxk2-Med8 (Fig. 3.25). Se obtienen resultados similares cuando Hxk2 y Mig1 son añadidas a la mezcla después de permitir la formación del complejo Med8-ADN (datos no mostrados). La ausencia de complejo en las calles 3 y 4 confirma que los complejos CII y CIII están causados por la interacción entre Med8-Hxk2-Mig1 y no directamente por unión al ADN. Además quisimos

comprobar el efecto de Hxk2-C70 ya que no parece estar afectada en su unión con Mig1 en los ensayos de doble-híbrido e inmunoprecipitación. El hecho de que Med8 no interaccione con Hxk2-C70 hace que ésta no actúe de puente en la interacción Med8-Hxk2-C70-Mig1, por lo que en éste caso la interacción no se pone de manifiesto aunque exista (Véase datos del doble-híbrido y ensayos de inmunoprecipitación entre Hxk2-C70 y Med8). Así en la calle 7 sólo se observa el complejo formado por Med8.

La importancia de la represión por glucosa en levaduras fisiológicamente ya estaba bien establecida desde el año 1950 en base a la observación de que la respiración en levaduras se encontraba suprimida en presencia de glucosa. La represión por glucosa de genes involucrados en el metabolismo de fuentes de carbono alternativas ha sido ampliamente estudiada aunque son muchos los procesos que aún no se conocen. Se ha sugerido que para muchos de los efectos reguladores de la glucosa sobre las células de levadura, se requiere el transporte y la fosforilación del azúcar. El transporte parece ser requerido sólo para sostener la fosforilación, sugiriendo que los transportadores de glucosa no tienen un papel regulador en este proceso (Reifenberger y col., 1997). La fosforilación de la glucosa en *S. cerevisiae* está catalizada por tres quinasas, Hxk1, Hxk2 y Glk1, pero la represión específicamente requiere Hxk2. La hexoquinasa 2 con su doble localización citosólica-nuclear es la única que tiene un papel adicional en la señalización por glucosa y además sólo *HXK2* es importante para la fosforilación de la glucosa *in vivo*, siendo su expresión mayoritaria en glucosa, fructosa o manosa.

La hexoquinasa 2 es el más activo de los tres enzimas fosforiladores (particularmente en células creciendo en glucosa) y existe como monómero fosforilado y dímero no fosforilado. Sin embargo, sigue sin quedar claro exactamente cómo Hxk2 está involucrada en la represión por glucosa. Se han propuesto varias hipótesis; entre ellas la existencia de una correlación entre la represión por glucosa y la actividad catalítica asociada con alelos mutantes de *HXK2*, sugiriendo que el fosfato puede actuar como un transmisor de la señal (Ma y col., 1989; Rose y col., 1991). En este sentido Randez-Gil y col., (1998b) muestran que el intercambio de la serina-14 por una alanina causa efectos en la señalización por glucosa, quizás por ausencia de fosforilación en esta parte de la molécula.

Sin embargo, recientemente se han identificado alelos mutantes en los que estos dos fenómenos (capacidad fosforiladora de azúcares y su función en la represión por glucosa) están desacoplados, sugiriendo un papel para la propia actividad hexoquinasa (Hohmann y col., 1999) e incluso llegando a asumir que Hxk2 tiene un dominio regulador específico requerido para la represión. De esta forma se han encontrado mutantes con baja actividad catalítica pero aún funcionales en la señalización por glucosa (Mayordomo y Sanz, 2001). Por tanto son otros factores y no la actividad catalítica de Hxk2, la importante para su funcionalidad en la represión.

Un dato importante es la localización nuclear de Hxk2 (Randez-Gil y col., 1998a), encontrándose una señal de localización nuclear indispensable para su transporte al núcleo cuyo mecanismo se desconoce. La eliminación de esta secuencia suprime tanto la localización nuclear de Hxk2 como la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998).

En células creciendo en ausencia de glucosa, Hxk2 es fosforilado en la serina-14 (Kriegel y col., 1994) por una quinasa todavía desconocida, lo que implica la incorporación del ATP intracelular al control de la fosforilación de glucosa (Moreno y col., 1986; Golbik y col., 2001), la estimulación de la autofosforilación en la serina-157 de Hxk2 inhibiendo su actividad enzimática (Golbik y col., 2001); donde además el equilibrio entre las dos isoformas de hxc2 (Furman y Neet, 1983) está dirigido hacia el monómero (Randez-Gil y col., 1998b; Golbik y col., 2001).

Ya que la serina-14 se encuentra dentro de la señal de localización nuclear; esta fosforilación podría regular la función de dicha señal. Sin embargo, un dato más que apoya el desacoplamiento de ambas funciones (catalítica y represora) es que un gen mutante *HXK2 (S14A)* con un cambio de la serina-14 por una alanina



permite la localización nuclear de la proteína restaurando la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998; Mayordomo y Sanz, 2001). La conformación del estado catalítico puede específicamente permitir la interacción de Hxk2 con una proteína de la señal de transducción.

Podríamos pensar que la existencia de tres enzimas que fosforilan la glucosa supone un gasto innecesario para la célula, a no ser que este sistema de fosforilación esté bien regulado dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la levadura. Esto es, en el caso de que la célula no disponga de alguno de ellos esta función debe ser suplantada por otro, o en

el caso de hallarse en una situación extrema; recordemos que los genes de los otros dos enzimas, Hxk1 y Glk1, se expresan cuando el medio de cultivo contiene fuentes de carbono no fermentables como etanol, lo que supone un estrés para la célula. Hxk1 y Glk1 son capaces de mantener el crecimiento en mutantes *hxk2* (Gancedo, 1992), indicando que estas proteínas son capaces de actuar *in vivo* pero su irrelevancia para el metabolismo de la glucosa es debido a la pobre expresión de sus genes.

Además *HXK2* es inducido por glucosa mientras que las otras dos quinasas son reprimidas, siendo Hxk2 requerida para una represión a largo plazo. La represión por glucosa involucra dos mecanismos distintos; una respuesta inicial rápida mediada por cualquiera de las quinasas y una represión a largo plazo lo que requiere tan sólo a Hxk2 (De Winde y col., 1996). En primer lugar, el sistema de señalización dependiente de hexoquinasa 2 interfiere directa o indirectamente con el complejo Snf1, requerido para la desrepresión de genes reprimidos por glucosa por inactivación del represor Mig1. También es posible que Hxk2 interaccione directamente con la maquinaria transcripcional, recordemos su localización nuclear necesaria para la represión y además se ha encontrado a Hxk2 participando en complejos ADN-proteína con elementos reguladores en *cis*

del promotor *SUC2* (Herrero y col., 1998). Además la inducción por glucosa de los genes de ciertos transportadores también requieren Hxk2.

Como hemos ido describiendo son varias las vías de señalización en las que Hxk2 juega un papel principal. Por todas sus características que la implican en el fenómeno de represión por glucosa podría controlar la expresión del sistema fosforilador de la glucosa en *S. cerevisiae*. Un punto de partida importante lo constituye el hecho de encontrar a Hxk2 formando parte de un complejo ADN-proteico en el promotor de *SUC2*. Este promotor contiene en su secuencia un motivo de 7 pb (C/A)(G/A)(G/A)AAAT (Bu y Schmidt, 1998) también encontrado en las DRS<sub>s</sub> de *HXK2* (Herrero y col., 1996) y en los promotores de *HXK1* y *GLK1*, sugiriendo un mecanismo de regulación común en presencia de la proteína Hxk2 nuclear.

El experimento se abordó mediante la expresión de los genes *HXK1* Y *GLK1* en presencia o ausencia de la proteína Hxk2. Así hemos demostrado cómo la expresión de ambos genes en condiciones de represión se ve impedida en presencia de Hxk2, mientras que en estas mismas condiciones pero en ausencia de Hxk2 su expresión es similar en el caso de *HXK1* a la encontrada en condiciones de desrepresión. Por tanto *HXK1* y *GLK1* se expresan normalmente en unas condiciones que no son las más adecuadas para la célula, es decir en etanol o bien se expresan para suplir la función de Hxk2 en ausencia de ésta. De hecho la expresión de *GLK1* en condiciones de represión no se iguala a la encontrada en etanol, no siendo suficiente la ausencia de Hxk2 sino que también es necesaria la ausencia de Hxk1, encontrándose ésta última mimetizando los efectos de Hxk2.

También es importante señalar que la localización nuclear de Hxk2 es la responsable de sus efectos. El mutante *hvk2* expresando una versión truncada de Hxk2 incapaz de entrar al núcleo, muestra que su localización

nuclear es necesaria para la represión inducida por glucosa de *HXK1* y *GLK1*, para la expresión inducida por glucosa de *HXK2* y para la represión por glucosa de *SUC2* (Herrero y col., 1998; Rodríguez y col., 2001).

Los mismos resultados se obtuvieron determinando la expresión de estos genes fusionados a *lacZ* en diferentes cepas de levadura. No sólo se confirman estos resultados sino que además se comprueba que *Hxk2* induce su propia expresión y que *Hxk1* es un factor negativo en la expresión de *GLK1* y *HXK2*.

Por tanto el producto de un gen glucolítico, que normalmente reside en el citosol, se transloca al núcleo por un mecanismo aún sin definir e interacciona con proteínas nucleares para regular la transcripción de *HXK1* y *GLK1* y autorregular su propia transcripción.

Ocupándose de los elementos reguladores que controlan la expresión de *HXK2* y *SUC2*, resultados previos en nuestro laboratorio identifican la proteína Med8 como una proteína de unión a la región reguladora de ambos genes (Chaves y col., 1999; Moreno-Herrero y col., 1999) a través del motivo heptamérico que hemos nombrado anteriormente y al que denominamos sitio MED8; compartiendo la misma secuencia consenso (C/A)(G/A)(G/A)AAAT. En el caso de *HXK2* interacciona con secuencias represoras de la región codificadora y en *SUC2* lo hace con secuencias activadoras de la región promotora (Herrero y col., 1996). Esta secuencia de unión a Med8 se ha encontrado en muchos genes controlados por inducción y represión por glucosa como se ha comentado anteriormente (*HXT1*, *HXK1*, *GLK1*, *HXK2* y *SUC2*).

Para comprobar que la proteína Med8 identificada a partir del sitio MED8 de *HXK2* se une también a esta misma región presente en los promotores de los genes *HXT1*, *HXK1* y *GLK1* llevamos a cabo ensayos de retardo en gel con la secuencia que contiene el sitio MED8 de estos genes y

la proteína Med8 purificada como una proteína de fusión con GST previamente digerida con trombina. Efectivamente, Med8 dio lugar también a la formación del mismo complejo ADN-proteína con estos genes, resultado que apunta a una posible regulación coordinada de la expresión entre ellos en el mecanismo de represión por glucosa. Entre estos genes *HXT1* y *HXK2* (Herrero y col., 1995; Özcan y Johnston, 1999) son inducidos mientras que *HXK1*, *GLK1* y *SUC2* (Herrero y col., 1995; Bu y Schmidt, 1998) son reprimidos por altos niveles de glucosa.

Respecto al gen *HXT1* que codifica para uno de los transportadores de la levadura, ya hemos comentado la importancia de la proteína Hxk2 en la expresión de los genes *HXT*, donde mutantes *hvk2* presentan una elevada transcripción de transportadores de alta afinidad y una disminución en los transportadores de baja afinidad (Özcan y Johnston, 1995). Como hemos visto *HXT1* tiene también en su secuencia un sitio MED8 de unión a la proteína Med8, además de dos sitios de unión para Rgt1. Quizás la implicación de Hxk2 en este sentido podría ser a través de la proteína Med8 en el mismo complejo proteico, pero mediante un mecanismo independiente de Rgt1. Resultados recientes en nuestro laboratorio indican que Med8 actúa como un represor de *HXT1* tanto en glucosa como en etanol, mientras que Rgt1 actúa como un activador en glucosa.

Dado que la proteína Hxk2 se ha encontrado en complejos proteicos de unión a *SUC2* (Herrero y col., 1998), en nuestros experimentos quisimos comprobar la importancia de Hxk2 en las interacciones ADN-proteína de extractos proteicos con el sitio MED8 de los genes *HXK1*, *GLK1* y *HXK2*, la cual se puso de manifiesto al aparecer un complejo diferencial cuando Hxk2 está ausente y además su idéntica movilidad independientemente del gen, indica que son iguales las proteínas que lo forman.

Esto sugiere un mecanismo de regulación génica conjunta donde en

presencia de glucosa, la proteína Hxk2 nuclear debilita la activación de la transcripción a través del motivo heptamérico contenido en los promotores de *SUC2*, *HXK1* y *GLK1* y dificulta el bloqueo de la transcripción de *HXK2*.

Teniendo en cuenta toda la información generada hasta el momento podríamos especular en un modelo, en el cual la participación de las proteínas Hxk2 y Hxk1 son requeridas para la modulación de la expresión de *HXK1*, *GLK1* y *HXK2*. En presencia de glucosa, los sitios MED8 tanto de *GLK1* como de *HXK2* no son operativos en el control de su expresión. Es decir, cuando la glucosa está presente en el medio de cultivo, *GLK1* o no se expresa o se expresa a un nivel muy bajo. No se observan diferencias entre aquellas cepas de levadura con o sin el sitio MED8 (conteniendo ERA) del promotor de *GLK1* en términos de expresión (Herrero y col., 1999). Igualmente, en medio rico con glucosa la presencia o ausencia del sitio MED8 (DRS<sub>s</sub>) en *HXK2* no afecta a su expresión (Martínez-Campa y col., 1996). Además estos sitios en ambos genes no tienen función reguladora bajo estas condiciones metabólicas por lo que no se detecta el complejo ADN-proteína diferencial. Sin embargo, aparecen otros complejos de menor movilidad cuya formación no está sujeta a regulación nutricional (Véase figuras 3.4 y 3.5 de *Resultados*) (Herrero y col., 1996; Herrero y col., 1999).

Por el contrario, la falta de glucosa o incluso en su presencia pero en un mutante *hvk2*, ambos sitios son operativos y funcionan en el control negativo de la expresión de *GLK1* y *HXK2* (Martínez-Campa y col., 1996; Herrero y col., 1999). En estas condiciones se detecta el complejo diferencial de mayor movilidad formado por proteínas no conocidas y siendo un complejo funcional bajo el control negativo de la expresión de *GLK1* y *HXK2*.

La delección de *HXK2* induce una sobre-expresión de *HXK1* y esto tiene un efecto represor sobre *GLK1* y *HXK2*. Una posible explicación sería que

Hxk1 actúa como un análogo de Hxk2 con respecto al sitio MED8 de *GLK1* y como un competidor de Hxk2 con respecto al sitio MED8 de *HXK2*.

Hemos considerado al gen *GLK1* objeto de posteriores estudios por varias razones. Este gen se expresa en presencia de fuentes de carbono no fermentables, como el etanol, lo que constituye una situación de estrés nutricional para la célula, por lo que *GLK1* podría desempeñar una función preparando a la levadura para utilizar fuentes de carbono fermentables que le permitan salir del estrés nutricional. Por otro lado hemos encontrado que a través del elemento regulador llamado sitio MED8 se une la proteína Med8, una proteína esencial para la activación de la transcripción de los genes ARN polimerasa II-dependientes. Además estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio para caracterizar el funcionamiento del promotor de *GLK1* (Herrero y col., 1999) han encontrado entre otros elementos una secuencia represora en etanol denominada ERA. Sin embargo, los factores transcripcionales que modulan su función no son conocidos. Además esta secuencia ERA reside a -530 pb del ATG inicial solapando con el sitio MED8, y está seguido de una secuencia de 12 TA repetidas. Esto unido a las características del gen, expresándose sólo en condiciones de estrés nutricional y estando su expresión controlada por la proteína Hxk2 y en ausencia de ésta por Hxk1, generan un especial atractivo por identificar y caracterizar todos los factores implicados en su regulación.

Este objetivo fue abordado mediante dos estrategias diferentes; la identificación de proteínas de unión directa a esta secuencia y la obtención de mutantes afectados en la regulación a través de dicha secuencia.

Para determinar su funcionalidad, este elemento ha sido deletado generando en el caso de la caja TA (TAB) un efecto moderado incrementando la actividad  $\beta$ -galactosidasa en un 39% en células creciendo

en etanol. Sin embargo, la delección de ambos, ERA y TAB resulta en un importante incremento en la expresión indicando que se trata de un elemento esencial para la expresión del gen y parece ser el elemento represor del promotor de *GLK1* (Herrero y col., 1999). La importancia del elemento ERA radica en su localización en los promotores de numerosos genes implicados en el metabolismo del carbono (Liesen y col., 1996), donde si resulta ser funcional en todos ellos podría ser considerado un importante sistema de represión de la transcripción. Liesen y col., (1996) describen este elemento mediando la represión por etanol en el gen *PDC1* que codifica para la piruvato descarboxilasa, donde además la misma secuencia es la responsable de un proceso de autorregulación en cepas con una delección *pdc1*. De ahí las iniciales ERA de *Ethanol Repression Autoregulation*, sin embargo en el caso de *GLK1* podríamos prescindir de dicha autorregulación aunque sigamos denominándole ERA.

Hemos determinado que la secuencia CAAGA**AAAT**GCACGCG que abarca tanto el motivo de unión a Med8 como el elemento ERA, llamado conjuntamente sitio MED8, una proteínas de forma específica aunque la capacidad de unirse no está alterada por la fuente de carbono, encontrándose los mismos complejos en glucosa y también en etanol. Este patrón de bandas es al que nos referíamos cuando hablamos del complejo diferencial formado en ausencia de Hxk2.

Los ensayos *Southwestern* y *Crosslinking* nos han permitido identificar cuatro proteínas de tamaños, 20, 27, 33 y 55 kDa de unión a esta secuencia. Esta última sólo se ha podido identificar mediante *Crosslinking* quizás debido en gran parte a las características de la técnica como se comentó en los resultados. De todas ellas sólo logramos purificar la proteína de 55 kDa utilizando la cromatografía de afinidad, comprobando además su interacción específica con el sitio MED8 de *GLK1*.

Podríamos afirmar que la proteína de 27 kDa es Med8 debido a la coincidencia en tamaño y a su unión específica a dicha secuencia mediante ensayos de retardo, sin embargo no hemos logrado purificar dicha proteína utilizando esta secuencia perteneciente al promotor de *GLK1*. Como ya hemos comentado Med8 había sido purificada con anterioridad en nuestro laboratorio utilizando la secuencia constituida por el sitio MED8 de *HXK2*.

Una secuenciación de la proteína de 55 kDa nos ha permitido identificar el gen que la codifica. Tratándose de un factor implicado en la síntesis proteica, el factor de elongación traduccional EF-1 $\alpha$  de *S. cerevisiae*, nos permite indagar en algún proceso que conecte la transcripción con la capacidad de traducción. Este factor está codificado por dos genes denominados *TEF1* y *TEF2*, ambos codifican proteínas casi idénticas que además se encuentran con la misma homología de secuencia en varias especies de levadura. Esto determina que una única copia funcional de EF-1 $\alpha$  es viable, mientras que la interrupción de ambos es letal.

La capacidad para detectar y responder a cambios en el medio es esencial para la flexibilidad del crecimiento mostrado por *S. cerevisiae*. A lo largo de la *Introducción* de este trabajo se ha hablado extensamente del fenómeno de represión por glucosa donde la señal que controla esta flexibilidad puede ser inducida por niveles de nutrientes específicos como aminoácidos y glucosa; y tales cambios originan modificaciones en la expresión génica, normalmente en transcripción pero también hay modificaciones post-traduccionales (Thevelein, 1994). Los nutrientes también controlan el nivel en la síntesis de proteínas y así la falta de aminoácidos o purinas ocasiona una inhibición en la traducción así como la activación de genes involucrados en su síntesis (Hinnebusch, 1984; Tzamarias y col., 1989; Rolfes y Hinnebusch, 1993). Otro ejemplo de señal mediada por control traduccional es la inhibición de la quinasa TOR, la



cual es inhabilitada por falta de nutrientes y por rapamicina (Barbet y col., 1996).

Como sabemos la glucosa es uno de los principales nutrientes para *S. cerevisiae* o más bien, es su fuente de carbono preferida y son varias las vías que permiten a la célula percibir el nivel de glucosa e iniciar la apropiada respuesta (Thevelein, 1994; Gancedo, 1998). En general, muchas de estas respuestas generan alteraciones en programas de expresión génica sobre todo a nivel de transcripción de ARNm. Pero además, los efectos de la falta de glucosa van más allá actuando sobre la síntesis proteica. Ashe y col., (2000) han descrito que la retirada de glucosa del medio de crecimiento permite una rápida inhibición de la síntesis de proteínas y este efecto es rápidamente revertido cuando se reañade glucosa. La inhibición es rápida, reversible y específica para la retirada de glucosa o fructosa. Ni la inhibición ni la reactivación de la traducción requieren nueva transcripción.

Esta inhibición tampoco requiere la activación de la vía de inanición de aminoácidos ni la vía de inactivación de la quinasa TOR. Sin embargo, mutantes en represión por glucosa (*reg1*, *glc7*, *hvk2* y *ssn6*), sensores de glucosa (*snf3 rgt2*) y proteín-quinasas dependientes de AMP<sub>C</sub> fueron resistentes a los efectos inhibitorios de la retirada de glucosa sobre la traducción. La inhibición y su reversión no requieren nueva transcripción. Sin embargo, la inhibición es superada en la represión por glucosa, inducción de los transportadores y en mutantes de proteín-quinasas dependientes de AMP<sub>C</sub>. Esto sugiere que el aparato traduccional de la levadura está altamente controlado por el estado nutricional de la célula, indicando la existencia de una vía previa no descrita que puede permitir la rápida inhibición de la síntesis proteica en respuesta a cambios ambientales.

Con ello, intentamos establecer cómo una proteína que forma parte del aparato traduccional actúa a otro nivel, quizás conectando el estado nutricional de la célula y su capacidad traduccional, lo que podría definir un nuevo campo de regulación post-transcripcional en levaduras.

La proteína Tef1 se ha expresado en un sistema bacteriano con una cola de histidinas en su extremo amino-terminal y se utilizó para comprobar si realmente el producto codificado por el gen *TEF1* interacciona específicamente con el sitio MED8<sub>GLK1</sub>. La cola de histidinas es tan pequeña que no interfiere en su plegamiento ni afecta a la unión. Hemos comprobado la especificidad de interacción, lo que se ha corroborado con la utilización de las secuencias que contienen el sitio MED8 de *HXK2* (DRS1 y DRS2). Si recordamos la secuencia de ERA (AAATGCA), DRS1 mantiene en su secuencia gran parte de este elemento (AAATGAA) mientras que DRS2 carece de tanta homología (AAATCAC). De hecho la unión de Tef1 con DRS1 casi no se ve afectada mientras que con DRS2 dicha interacción se encuentra perjudicada. Asimismo, quisimos comprobar cómo afectaban otros cambios de bases en dicha unión para lo cual se utilizaron dos oligonucleótidos con secuencias (ACATGCA) y (AAAGGCA). Estos cambios de bases no implicaron cambios en la unión aunque sí detectamos cambios en la afinidad. Estos experimentos nos han permitido discernir entre ambas secuencias solapantes ya que la unión de Tef1 parece afectar en mayor medida al elemento ERA.

En la caracterización de Tef1 realizada en la base de datos de *S. cerevisiae* no parece tener motivos descritos de unión al ADN, lo cual resulta paradójico respecto a los resultados obtenidos en la especificidad de interacción de Tef1 al ADN. La existencia de dos genes con idéntica homología de secuencia en varias especies codificando proteínas casi análogas (Schirmaier y col., 1984) nos puede permitir generar una serie de

experimentos con el fin de esclarecer los resultados actuales. Para ello, sería preciso delecionar alguno de los genes y comprobar los posibles efectos. Por tanto, es un resultado sobre el cual hasta el momento tan sólo caben especulaciones.

La otra vía utilizada para identificar factores de unión que participan a través del sitio MED8 del gen *GLK1* ha sido la obtención de mutantes reguladores. El punto de partida ha sido el hecho de que el elemento ERA tiene un carácter represor en etanol, particularidad que sirve para idear un método encaminado a la obtención de dichos mutantes. Esto nos ha permitido seleccionar tres mutantes, uno de los cuales tenía una diferencia de actividad respecto al control bastante significativa. Tras la transformación de una genoteca de *S. cerevisiae* con el fin de recuperar los genes afectados en forma de plásmidos, sólo se obtuvo un plásmido con un inserto, el cual fue digerido con varios enzimas de restricción para obtener un mapa de restricción aproximado estimándose su tamaño en 4.000 pb. Las secuencias leídas a partir del sitio *EcoRI* interno en ambas direcciones resultaron estar localizadas en el brazo corto del cromosoma XV de *S. cerevisiae*. El fragmento de 4.000 pb abarca dos pautas de lectura completas correspondientes a los genes *TAT2* y *TOS7*. Además abarca parte de la secuencia de los genes *DIS3* y *TLG2* no en su totalidad. A excepción de *TOS7* todos ellos quedaron descartados como posibles factores transcripcionales implicados en la vía de represión por glucosa, debido a las funciones que desempeñan. Sin embargo, la proteína Tos7 ha sido identificada en el proyecto genoma de *S. cerevisiae*, y su función celular se desconoce hasta el momento. Por tanto podríamos sugerir un papel funcional para ella, concretamente puede participar en el control transcripcional que se ejerce a través del sitio MED8 de los genes que lo contienen. De qué forma afecta una mutación en *TOS7* en la represión de

estos genes no es posible determinarlo dada la escasa información de la que disponemos respecto a la proteína.

Por tanto hemos identificado dos proteínas, Tef1 y Tos7 participando ya sea de forma directa o indirecta a través del sitio MED8 de *GLK1* aunque quizás su intervención se desarrolle en mayor medida a través de ERA.

Pero además se ha comprobado que, la proteína Med8 se une al sitio MED8 de todos los genes que lo contienen, con la participación de Hxk2.

Puesto que ambas forman parte del mismo complejo de proteínas decidimos comprobar si interaccionan entre sí y qué dominios son los responsables de dicha interacción.

Son varias las características de la proteína Med8 que nos llevaron a pensar en una posible interacción. Básicamente podríamos describir a Med8 como una proteína que en la región próxima al extremo N-terminal posee un dominio potencial de cremallera de leucina que la podría habilitar para formar homo o hetero-dímeros, y además presenta una región C-terminal muy interesante. De los 10 últimos residuos, 8 son serinas y treoninas, residuos hidroxilados susceptibles de fosforilación. La fosforilación de uno o varios residuos hidroxilados puede habilitar a una proteína reguladora para reconocer sus secuencias diana en el ADN, como es el caso de Sip4 y Cat8. En el caso de Mig1, la fosforilación en cuatro residuos impide su localización nuclear y por tanto, el acceso a sus secuencias diana en los genes sometidos a represión por glucosa, entre ellos, *SUC2*. Otro ejemplo, también comentado, es el del complejo Snf1 proteína-quinasa, cuya fosforilación en la treonina-210 permite su activación, induciendo varias cascadas de desrepresión cuando la glucosa es limitante. También podemos citar el caso de la proteína Hxk2 aunque existe cierta controversia al respecto.

Algunos autores defienden que la fosforilación en la serina-14 no es necesaria para la represión por glucosa del gen *SUC2* (Herrero y col., 1998), mientras que otros describen lo contrario (Randez-Gil y col., 1998). No cabe duda de que la modificación covalente por fosforilación-defosforilación es un mecanismo de regulación importante. Por ello y para la realización de algunos resultados disponemos de la proteína Med8-C10, a la que se han eliminado los 10 últimos aminoácidos de la región C-terminal.

No obstante, entre los últimos 65 residuos de dicha región existen también abundantes residuos básicos (lisinas y argininas) e hidroxilados. Med8 tiene una localización nuclear donde constituye una subunidad esencial del complejo Srb/mediador. Muchas proteínas nucleares contienen secuencias específicas para su importación al núcleo. En el caso de Hxk2, la SLN consiste en 4 residuos básicos separados dos a dos por tres aminoácidos uno de los cuales es prolina (Herrero y col., 1998) y no es el único caso de SLN rica en residuos básicos que se ha descrito (Dingwall y Laskey, 1991).

Tenemos evidencias de que las proteínas Hxk2 y Med8 están físicamente asociadas. Los hallazgos más importantes con respecto al mecanismo de acción de Hxk2 es que los ensayos del doble-híbrido, experimentos de coprecipitación y análisis de retardo en gel con proteínas purificadas involucradas en la vía de señalización por glucosa de *S. cerevisiae*, demuestran que la proteína Hxk2 completa interacciona directamente a través de su región C-terminal con la región aminoacídica que comprende los residuos desde la posición 213 a 223 de Med8 (de la Cera y col., 2002). La asociación representa una fuerte interacción, ya que el complejo supera los experimentos de coprecipitación bajo condiciones de concentraciones moderadas de sal y detergente. Además, ensayos de retardo sugieren que estas interacciones Hxk2-Med8 son de significancia fisiológica porque

interaccionan en un agregado con fragmentos de ADN conteniendo el sitio MED8.

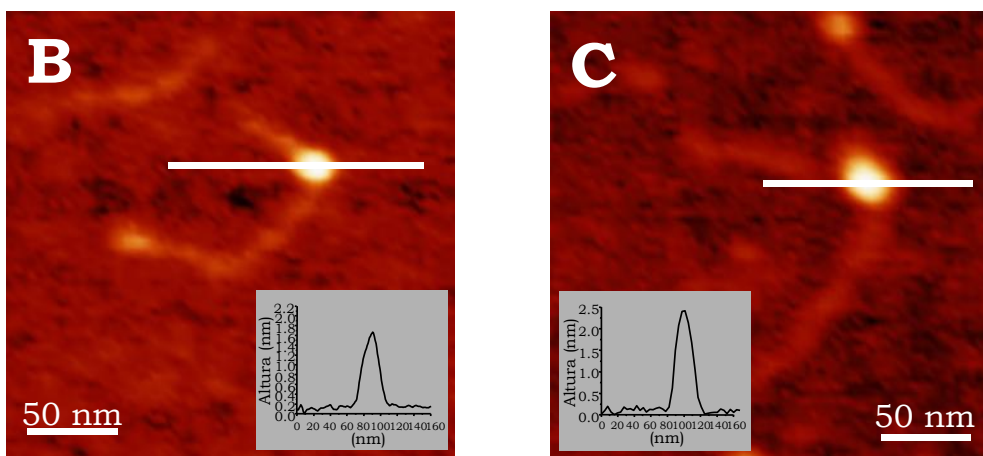
Estos hallazgos estipulan una base molecular para entender el efecto de Hxk2 sobre la vía de transducción de la señal glucosa de *S. cerevisiae*. Teniendo en cuenta que un complejo Hxk2-Med8-ADN parece ser requerido para la inhibición de la función activadora de Med8 por altos niveles de glucosa, el simple modelo consecuente con evidencias genéticas y bioquímicas es que Hxk2 nuclear (Rodríguez y col., 2001) afecta negativamente la función de Med8 en genes reprimibles por glucosa en virtud de su presencia en este complejo junto con la proteína mediadora. Esta idea es consistente con evidencias que sugieren que la delección del decapeptido C-terminal de Med8 resulta en una proteína truncada con función residual (unión al ADN) que es independiente de la interacción de Hxk2. También cabría la posibilidad de imaginar algún otro mecanismo en la función de Hxk2; por ejemplo, no podemos excluir la posibilidad de que Hxk2 active o interaccione con un efector negativo de Med8.

En presencia de glucosa la proteína reguladora Reg1 dirige a Glc7 a defosforilar la serina-14 en Hxk2 (Alms y col., 1999) y el equilibrio entre las dos isoformas de Hxk2, monómero y dímero (Furman y Neet, 1983) está desplazado hacia la forma homodimérica (Randez-Gil y col., 1998; Golbik y col., 2001). En células creciendo en ausencia de glucosa, Hxk2 es fosforilado en la serina-14 (Kriegel y col., 1994) y desplaza el equilibrio hacia la forma monomérica. Cómo la nueva conformación del fosfoenzima puede afectar a Hxk2 nuclear no se sabe en el momento. Una hipótesis podría ser que, en células desreprimidas, Hxk2 fosforilada es translocada al citosol, como sucede con Mig1 (DeVit y col., 1997) y la ausencia de Hxk2 nuclear causa que Med8 funcione como un activador transcripcional por posicionamiento correcto del holoenzima ARN polimerasa de la maquinaria transcripcional.

También hemos visto cómo Med8 forma dímeros y que la delección de los 10 últimos residuos impide esta dimerización. Además Med8 se puede unir al sitio MED8 como monómero y como dímero, sin embargo nuestros resultados aunque muestran que Med8 puede formar parte de un homo-dímero no revelan si la dimerización de la proteína es requerida para la unión al ADN. Por ello y como ensayo independiente la interacción ADN-Med8 también ha sido confirmada mediante técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM) en colaboración con Fernando Moreno-Herrero del departamento de Física de la Materia Condensada en la Universidad Autónoma de Madrid.

Para ello se utilizó un fragmento de 538 pb del promotor de *HXT1* conteniendo la secuencia consenso del sitio MED8 a 174 pb del final del fragmento utilizado. Las imágenes de AFM (Fig. 4.1) muestran la formación de complejos Med8-*HXT1*, demostrando que Med8 cubre una región sobre la molécula de ADN. Este sistema permite también detectar uniones inespecíficas, por lo que se utilizaron dos fragmentos del promotor de *HXT1* sin los sitios Med8 en experimentos control, demostrándose su especificidad. Esta técnica también ha permitido medir la altura de los complejos Med8-ADN. En la Fig. 4.1 se muestra el histograma de la altura de los complejos. Esta medida se ha hecho según una distribución bimodal con los diámetros más probables situados a  $1.7 \pm 0.3$  nm y  $2.1 \pm 0.3$  nm. Este resultado apoya la idea de que Med8 se puede unir a secuencias de unión en el promotor de *HXT1* como monómero o como homo-dímero. En el caso de que la unión encontrada fuese de dos monómeros no asociados la técnica de AFM no tiene una gran resolución para resolver si en este caso o en el caso de un simple monómero los diámetros son iguales. Podríamos configurar un modelo en el que se considerara a Med8 como una esfera. El radio del monómero unido al ADN es de 1.7 nm. Si la proteína aparece

como un dímero entonces el volumen se duplica y el nuevo radio de la proteína con forma de esfera será de 2.14 nm, lo cual está de acuerdo con los valores medidos. El fenómeno de deshidratación, el cual está siempre presente en muestras de material biológico en AFM cuando se trabaja en contacto con el aire, podría afectar al monómero y al dímero en la misma proporción así que la relación entre los radios (dímero/monómero) no se verá afectada.



**FIGURA 4.1.- ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE Med8 AL PROMOTOR *HXT1* MEDIANTE AFM.**

Se analizaron las alturas de los complejos formados por Med8 con *HXT1* construyendo un histograma. La altura medida de Med8 interaccionando con el ADN es una distribución bimodal con las alturas más probables situadas a  $1.7(\pm 0.3)$  nm y  $2.1(\pm 0.3)$  nm. En B y C se muestran los dos complejos núcleo-proteicos. El perfil de la proteína se muestra en la esquina de cada panel. La altura medida de Med8 en B es compatible con la unión de Med8 como monómero y la altura medida en C es compatible con la unión de Med8 como un homo-dímero.

Un estudio alternativo con proteínas Med8 no asociadas al ADN fue llevado a cabo con el fin de comprobar si Med8 formaba homo-dímeros sin interactuar con el ADN. Los valores obtenidos en este caso desveló que



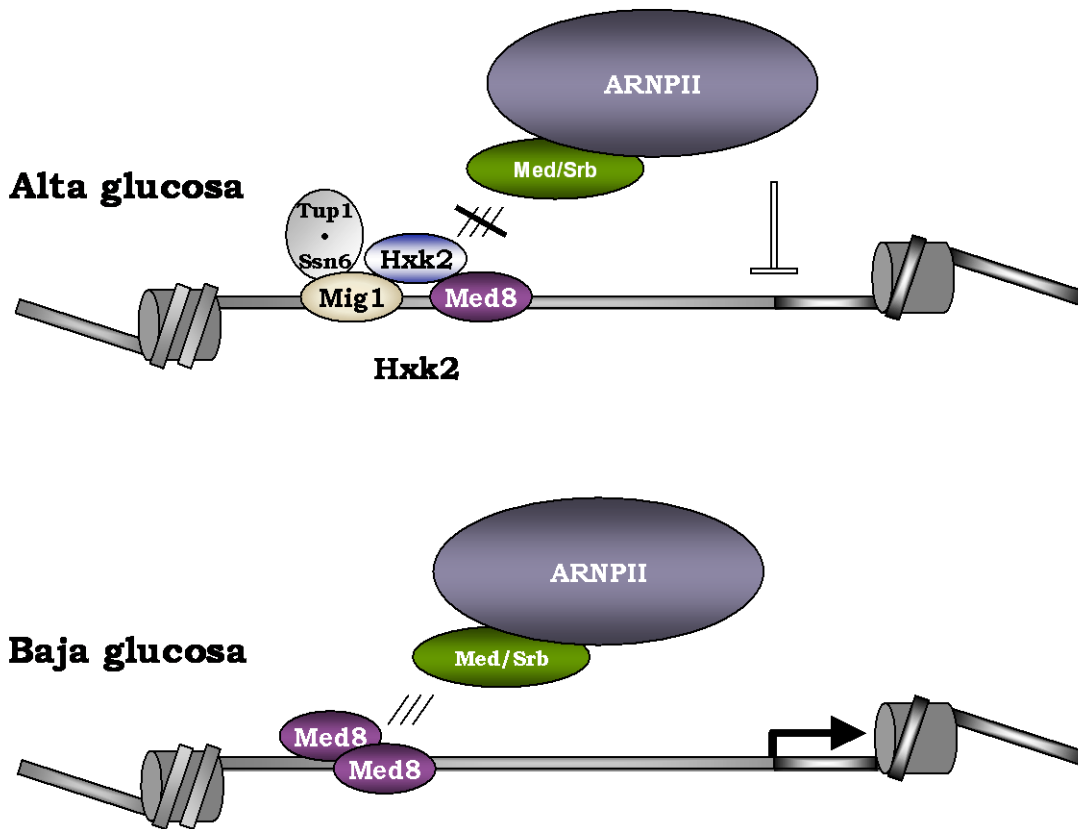
Med8 libre tenía una amplia distribución de diámetros comprendidos entre  $1.3\pm 0.3$  y  $1.6\pm 0.3$  nm (datos no mostrados). Estos valores son compatibles con los datos del análisis Med8-ADN si se añade la medida del ADN que es de  $0.6\pm 0.1$  nm. La amplia distribución indica que las estructuras están más distorsionadas cuando están libres de interactuar con el ADN que cuando interactúan con él. Por tanto, Med8 libre también puede dimerizar.

Respecto a las interacciones de Hxk2 con factores implicados en la represión por glucosa, también hemos implicado a la proteína Mig1 interactuando con ella. Una de las razones principales es en el caso de *SUC2* donde la secuencia de unión a Mig1 solapa con uno de los dos sitios MED8 al que se une la proteína Med8. Ya que se ha demostrado la unión existente entre Med8 y Hxk2 formando parte de un mismo complejo regulador, sugerimos la posibilidad de que Mig1 también forme parte de este complejo a través de su unión con Hxk2. La interacción entre Hxk2 y Mig1 ha quedado demostrada mediante doble-híbrido e inmunoprecipitación. Sin embargo, parece ser otra región de Hxk2 la responsable de su interacción ya que dicha unión persiste incluso en ausencia de los 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2. Esto apoya el hecho de que las tres proteínas interactúen juntas formando parte de un complejo ADN-proteína involucrado en la regulación de la represión por glucosa. Además experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio indican que la interacción entre Hxk2 y Mig1 depende de la fuente de carbono.

Un posible modelo de cómo Hxk2 y Mig1 reprimen la transcripción del gen *SUC2* se muestra en la [Fig. 4.2](#). Sabemos que la proteína Hxk2 autoceba su propia expresión en respuesta a glucosa, bloqueando los elementos represores DRS1 y DRS2 (sitio MED8) del gen *HXK2*, lo que

sugiere que también podría impedir la expresión de *SUC2* en las mismas condiciones mediante un mecanismo similar de bloqueo de los dos motivos

heptaméricos de la UAS de *SUC2*. La interacción Hxk2-Med8 nos permite formular una hipótesis acerca de cómo Hxk2 puede impedir a Med8 desreprimir a *SUC2* en condiciones de alta glucosa.



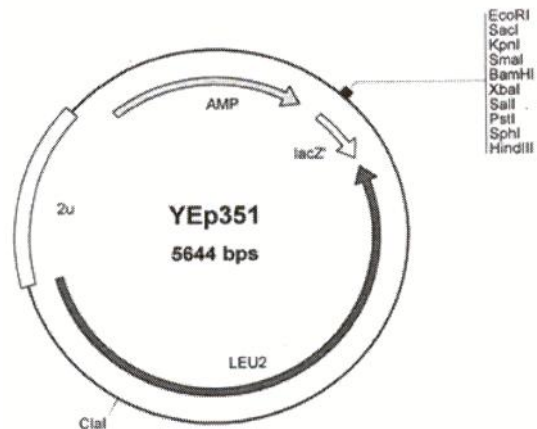
**FIGURA 4.2.- MODELO ESQUEMÁTICO DE LA PARTICIPACIÓN DE Hxk2 EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.**

Se muestra el caso de la regulación de *SUC2*. En alta glucosa Mig1 está en el núcleo ocupando su sitio de unión que solapa con uno de los sitios MED8 en el promotor *SUC2*. Hxk2 nuclear interacciona a través de diferentes dominios con Mig1 y con Med8 debilitando la función de Med8 y facilitando la represión a través de Mig1. En baja glucosa, Mig1 es fosforilado y translocado al citosol. *HXX2* no se expresa; Med8 se une a sus sitios de interacción en el promotor, facilitando su unión con la maquinaria transcripcional teniendo lugar la transcripción. La ARN polimerasa II (ARNPII) representa en el dibujo la maquinaria transcripcional.

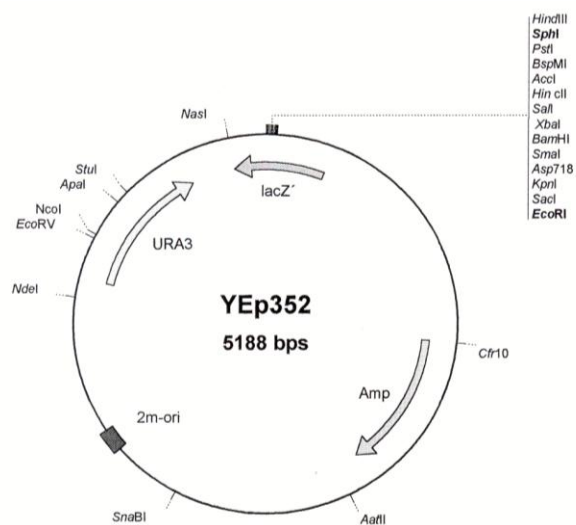
En un medio con alta glucosa, la proteína Mig1 está presente en el núcleo y se une a su sitio de unión específico, que solapa con uno de los sitios MED8 en el promotor de *SUC2*. La proteína Hxk2 nuclear puede interactuar a través de diferentes dominios proteicos con ambas, Mig1 y Med8, debilitando la función de Med8 y facilitando la represión de la transcripción a través de Mig1. En ausencia de glucosa, Mig1 es fosforilado por la proteína-quinasa Snf1 y translocada al citosol. *HXK2* es expresado a muy bajos niveles o bien no se expresa; Med8 se une a ambos sitios de unión en el promotor reclutando la maquinaria transcripcional y por tanto, restableciendo la transcripción del gen.

- 1) La expresión de los genes *HXK1* y *GLK1* está reprimida por la presencia de glucosa en el medio de cultivo y dicha represión depende de la localización nuclear de la hexoquinasa 2.
- 3) El gen *HXK1* está sobre-expresado en un mutante *hvk2*. La proteína Hvk1 actúa como un factor negativo en la expresión de los genes *GLK1* y *HXK2*.
- 4) La proteína Hvk2 nuclear induce la expresión de su propio gen.
- 5) Se ha identificado un motivo común heptamérico en los promotores de varios genes regulados por glucosa, al que denominamos sitio MED8 y al que se une de forma directa y específica la proteína Med8 (subunidad del complejo mediador) formando monómeros u homo-dímeros; sugiriendo un mecanismo de regulación coordinada de la expresión de tales genes.
- 6) Se ha identificado la proteína Tef1 como un factor que forma complejos específicos ADN-proteína con el elemento ERA del promotor *GLK1*.
- 7) Se ha identificado el producto del gen *TOS7* como un posible factor implicado en el control transcripcional del sistema de represión por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*.
- 8) Las proteínas Hvk2 y Med8; y Hvk2 y Mig1 interaccionan directamente en el sistema del doble híbrido, coprecipitan e inmunoprecipitan.

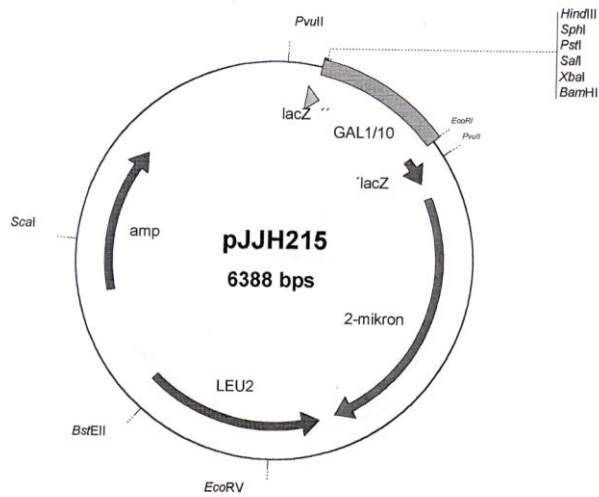
- 9) La interacción Hxk2-Med8 depende de los 10 aminoácidos del extremo C-terminal de Med8 y de los 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2, aunque estos dominios de las proteínas no son suficientes para establecer dicha interacción. Sin embargo, los 70 aminoácidos del extremo C-terminal de Hxk2 no son esenciales para su interacción con Mig1.
  
- 10) Las proteínas Hxk2, Med8 y Mig1 colocalizan en el mismo complejo ADN-proteína.
  
- 11) Los 10 aminoácidos del extremo C-terminal de Med8 no son esenciales para su interacción con el sitio MED8.
  
- 12) La proteína Hxk2 participa en la señalización de la represión por glucosa a través del sitio MED8, mediante la interacción con las proteínas Med8 y Mig1.



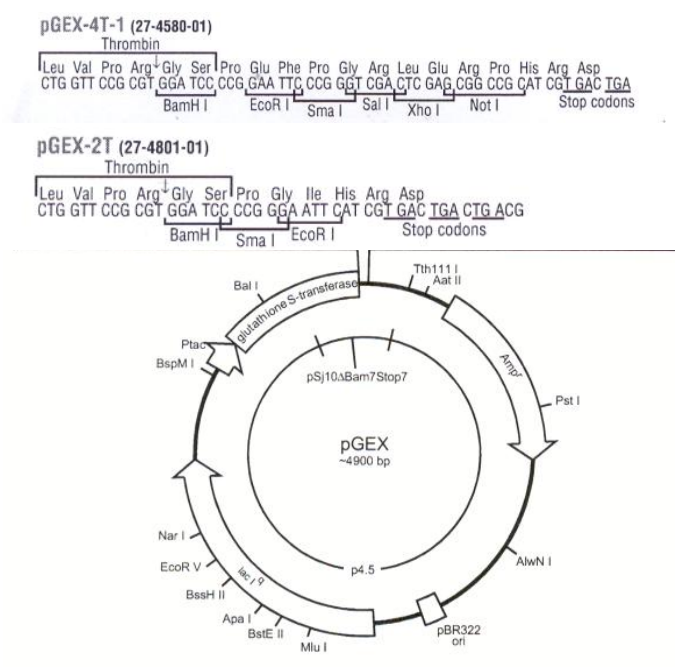
**Fig. 1** Mapa de restricción del vector YEp351



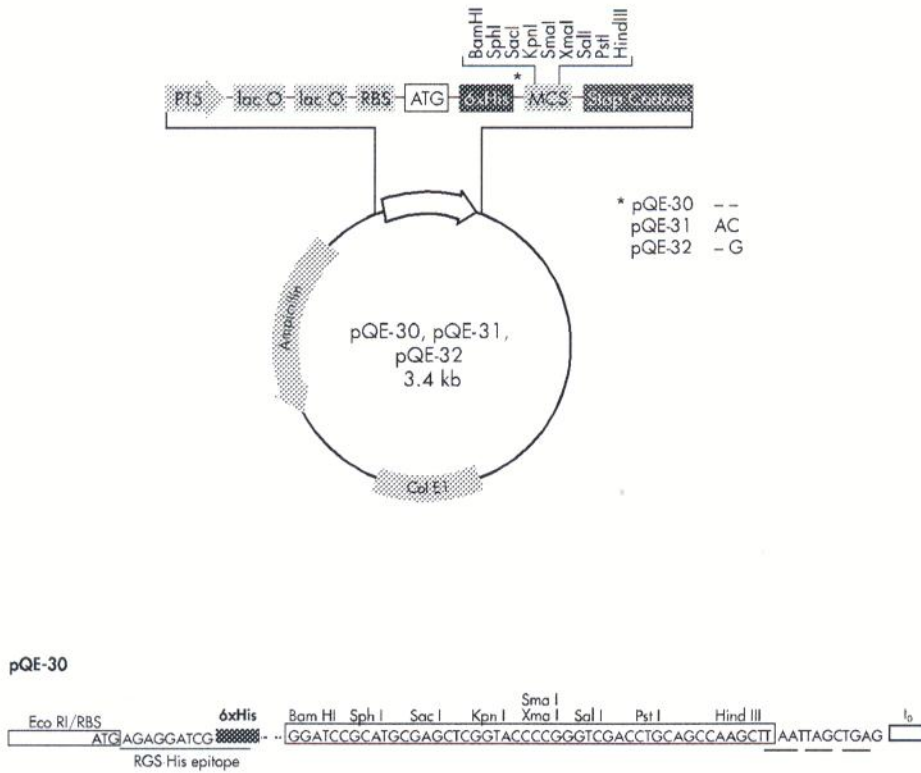
**Fig. 2** Mapa de restricción del vector YEp352



**Fig. 3 Mapa de restricción del vector pJJH215**

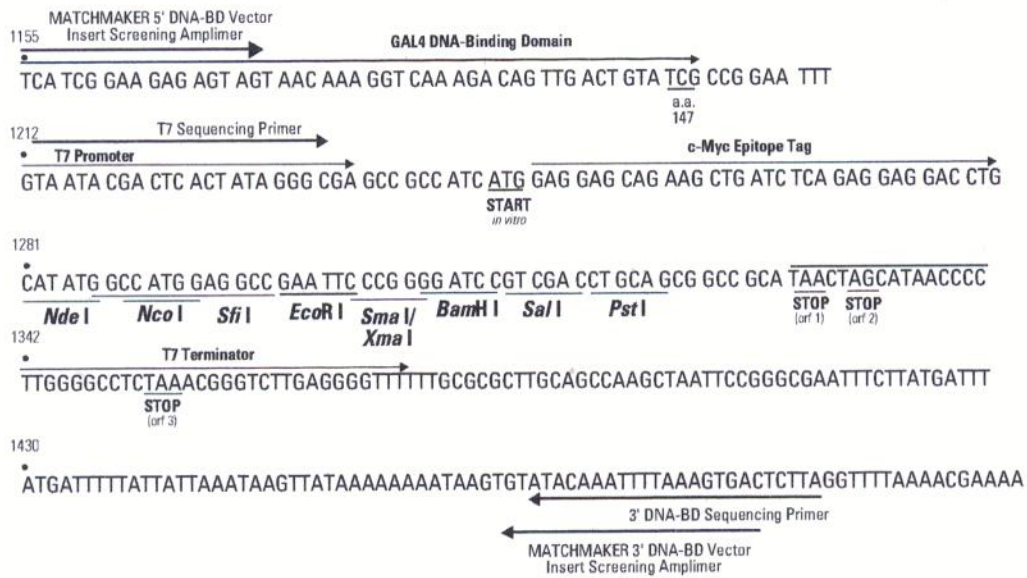
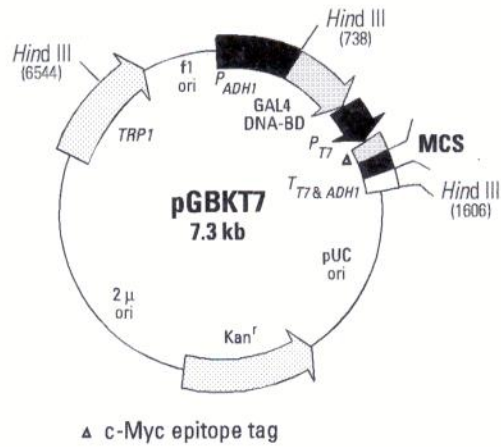


**Fig. 4 Mapa de restricción del vector pGEX-2T/4T-1**

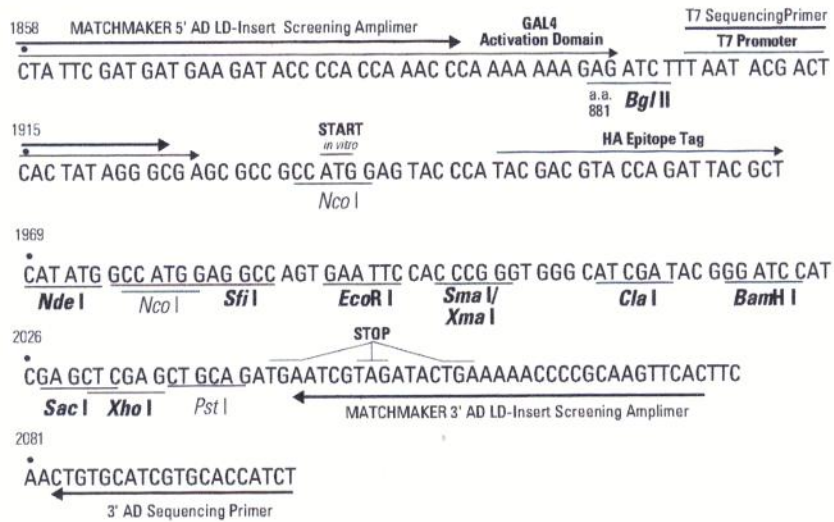
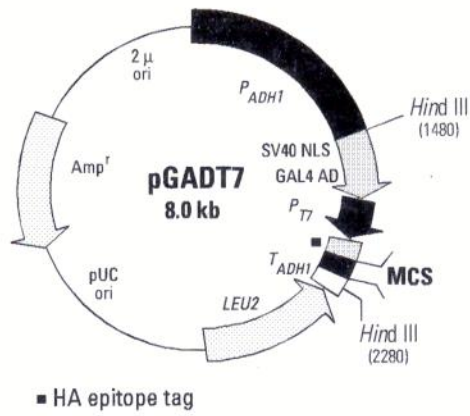


**Fig. 5 Mapa de restricción del vector pQE30**

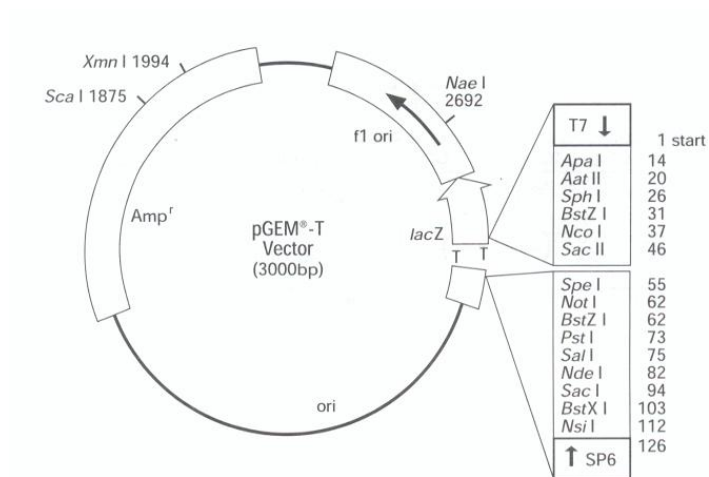




**Fig. 6 Mapa de restricción del vector pGBKT7**



**Fig. 7 Mapa de restricción del vector pGADT7**



**Fig. 8 Mapa de restricción del vector pGEM-T**

- AGIUS, L., PEAK, M., NEWGARD, C. B., GÓMEZ-FOIX, A. M. & GUINOVART, J. J. (1996).** Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 271:30479-30486.
- ALMS, G. R., SANZ, P., CARLSON, M. & HAYSTEAD, T. A. J. (1999).** Reg1p targets protein phosphatase 1 to dephosphorylate hexokinase II in *Saccharomyces cerevisiae*: characterizing the effects of a phosphatase subunit on the yeast proteome. *EMBO J.* 18:4157-4168.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- ANDERSON, D. J. & BLOBEL, G. (1983).** Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods Enzymol.* 96:111-120.
- ASHE, M. P., DE LONG, S. K. & SACHS, A. B. (2000).** Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 11:833-848.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. & STRUHL, K. (1998).** *Current protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.), New York, NY.
- BAI, C., SEN, P., HOFMANN, K., MA, L., GOEBL, M., HARPER, J. W. & ELLEDGE, S. J. (1996).** SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 86:263-274.
- BAKER, H. V. (1986).** Glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence of GCR1, null mutants, and evidence for expression. *Mol. Cell. Biol.* 6:3774-3784.
- BALASUBRAMANIAN, B., LOWRY, C. V. & ZITOMER, R. S. (1993).** The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell. Biol.* 13:6071-6078.
- BARBET, N. C., SCHNEIDER, U., HELLIWELL, S. B., STANSFIELD, I., TUIITE, M. F. & HALL, M. N. (1996).** TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 7:25-42.

- 
- BARRAL, Y., JENTSCH, S. & MANN, C. (1995).** G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev.* 9:399-409.
- BASSEL-DUBY, R., HERNÁNDEZ, M. D., GONZÁLEZ, M. A., KRUEGER, J. K. & WILLIAMS, R. S. (1992).** A 40-kilodalton protein binds specifically to an upstream sequence element essential for muscle-specific transcription of the human myoglobin promoter. *Mol. Cell. Biol.* 12:5024-5032.
- BATEMAN, A. (1997).** The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* 22:12-13.
- BEHLKE, J., HEIDRICH, K., NAUMANN, M., MULLER, E. C., OTTO, A., REUTER, R. & KRIEGEL, T. (1998).** Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of oligomeric structure by *in vivo* phosphorylation at serine-14. *Biochemistry.* 37:11989-11995.
- BISSON, L. F., COONS, D. M., KRUCKEBERG, A. L. & LEWIS, D. A. (1993).** Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28:259-308.
- BJÖRKLUND, S. & KIM, Y. J. (1996).** Mediator of transcriptional regulation. *Trends. Biochem. Sci.* 21:335-337.
- BOLES, E. & HOLLENBERG, C. P. (1997).** The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 21:85-111.
- BOY-MARCOTTE, E., PERROT, M., BUSSEREAU, F., BOUCHERIE, H. & JACQUET, M. (1998).** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180:1044-1052.
- BRITTON, P., MURFITT, D., PARRA, F., JONES-MORTIMER, M. C. & KORNBERG, H. L. (1982).** Phosphotransferase-mediated regulation of carbohydrate utilization in *E. coli* k12: identification of the products of genes on the specialised transducing phages  $\lambda$  iex (ccr) and  $\lambda$  grs (tgs). *EMBO J.* 1:907-911.

- BU, Y. & SCHMIDT, M. C. (1998).** Identification of *cis*-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 26:1002-1009.
- BUJARD, H., GENTZ, R., LANZER, M., STUEBER, D., MUELLER, M., IBRAHIMI, I., HAETUPLE, M. T. & DOBBERSTEIN, B. (1987).** A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzymol.* 155:416-433.
- BURNETTE, W. N. (1981).** Western-blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels unmodified nitrocellulose and radiographic detection with radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* 112:4811-4819.
- CAREY, J. (1991).** Gel retardation. *Meth. Enzymol.* 208:103-117.
- CARLSON, M. (1998).** Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:560-564.
- CARLSON, M. (1999).** Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:202-207.
- CARLSON, M. & BOTSTEIN, D. (1982).** Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell.* 28:145-154.
- CARLSON, M., OSMOND, B. C. & BOTSTEIN, D. (1984).** A suppressor of *snf1* mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics.* 107:19-32.
- CELENZA, J. L. & CARLSON, M. (1986).** A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science.* 233:1175-1180.
- CEREGHINO, G. P. SCHEFFLER, I.E. (1996).** Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. *EMBO J.* 15: 363-374.
- CHAMBERS, A., PACKHAM, E. A. & GRAHAM, I. R. (1995).** Control of glycolytic gene expression in the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Curr. Genet.* 29:1-9.

- CHAVES, R. S., HERRERO, P. & MORENO, F. (1999).** Med8, a subunit of the mediator CTD complex of RNA polymerase II, directly binds to regulatory elements of *SUC2* and *HXK2* genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254:345-350.
- CHOU, A. C. & WILSON, J. E. (1975).** Hexokinase of rat brain. *Methods Enzymol.* 42:20-25.
- CIRIACY, M. & REIFENBERGER, E. (1997).** Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications. *Technomic*. Lancaster. 45-47.
- CIRIACY, M. & WILLIAMSON, V. M. (1981).** Analysis of mutations affecting Ty-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 182:159-163.
- CLIFTON, D., WALSH, R. B. & FRAENKEL, D. G. (1993).** Functional studies of yeast glucokinase. *J. Bacteriol.* 175: 3289-3294.
- COLOMBO, S., MA, P., CAUWENBERG, L., WINDERICKX, J., CRAUWELS, M., TEUNISSEN, A., NAUWELAERS, D., DE WINDE, J. H., GORWA, M.-F., COLAVIZZA, D. & THEVELEIN, J. M. (1998).** Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17:3326-3341.
- COONS, D. M., VAGNOLI, P. & BISSON, L. F. (1997).** The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: SNF3 functions in glucose recognition. *Yeast.* 13:9-20.
- DE LA CERA, T., HERRERO, P., MORENO-HERRERO, F., CHAVES, R. S. & MORENO, F. (2002).** Mediator factor Med8p interacts with the hexokinase 2: implication in the glucose signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 319:703-714.
- DE LA IGLESIA, N., MUKHTAR, M., SEOANE, J., GUINOVART, J. J. & AGIUS, L. (2000).** The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* 275:10597-10603.
- DÉMOLIS, N., MALLET, L., BUSSEREAU, F. & JACQUET, M. (1993).** *RIM2*, *MSI1* and *PGI1* are located within an 8 kb segment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II, which also contains the putative ribosomal gene *L21* and a new putative essential gene with a leucine zipper motif. *Yeast.* 9:645-659.

- DERECHIN, M., RUSTUM, Y. M. & BARNARD, E. A. (1972).** Dissociation of yeast hexokinase under the influence of substrates. *Biochemistry*. 11:1793-1797.
- DERISI, J. L., IYER, V. R. & BROWN, P. O. (1997).** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 278:680-686.
- DEVIT, M. J. & JOHNSTON, M. (1999).** The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol*. 9:1231-1241.
- DEVIT, M. J., WADDLE, J. A. & JOHNSTON, M. (1997).** Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell*. 8:1603-1618.
- DEWINDE, J. H., CRAUWELS, M., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M. & WINDERICKX, J. (1996).** Differential requirements of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem*. 241:633-643.
- DIDERICH, J. A., RAAMSDONK, L. M., KRUCKEBERG, A. L., BERDEN, J. A. & VAN DAM, K. (2001).** Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *App. Environ. Microbiol*. 67:1587-1593.
- DINGWALL, C. & LASKEY, R. A. (1991).** Nuclear targeting sequences: a consensus? *Trends. Biochem. Sci*. 16:478-481.
- DUCKER, C. E. & SIMPSON, R. T. (2000).** The organized chromatin domain of the repressed yeast a-specific gene *STE6* contains two molecules of the corepressor Tup1 per nucleosome. *EMBO J*. 19:400-409.
- EASTERBY, J. S. & ROSEMEYER, M. A. (1972).** Purification and subunit interactions of yeast hexokinase. *Eur. J. Biochem*. 28:241-252.
- EDMONDSON, D. G., SMITH, M. M. & ROTH, S. Y. (1996).** Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev*. 10:1247-1259.



- ENTIAN, K.-D., ZIMMERMANN, F. K. & SCHEEL, I. (1977).** A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexose phosphorylation. *Mol. Gen. Genet.* 156:99-105.
- ESTRUCH, F. (2000).** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:469-486.
- ESTRUCH, F., TREITEL, M. A. YANG, X. & CARLSON, M. (1992).** N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics.* 132:639-650.
- FARABAUGH, P. J., VIMALADITHAN, A., TÜRKEL, S., JOHNSON, R. & ZHAO, H. (1993).** Three downstream sites repress transcription of a Ty2 retrotransposon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17:6982-6993.
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. (1983).** A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M., CASTEL, S., BELLIDO, D., FERRER, J. C., VILARO, S. & GUINOVART, J. J. (1999).** Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during the fasted to refeed transition in rats. *FEBS Lett.* 459:211-214.
- FIELDS, S. & SONG, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-246.
- FORETZ, M., CARLING, D., GUICHARD, C., FERRE, P. & FOUFELLE, F. (1998).** AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 273:14767-14771.
- FURMAN, T. C. & NEET, K. E. (1983).** Association equilibria and reacting enzyme gel filtration of yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* 258:4930-4936.
- GANCEDO, C. (1971).** Inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase by glucose in yeast. *J. Bacteriol.* 107:401-405.

- GANCEDO, J. M. (1992).** Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206:297-313.
- GANCEDO, J. M. (1998).** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:334-361.
- GANCEDO, C. & GANCEDO, J. M. (1985).** Phosphorylation of 3-O-methyl-D-glucose and catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 148:593-597.
- GASCÓN, S. & LAMPEN, J. O. (1968).** Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* 243:1567-1572.
- GAVIN, I. M. & SIMPSON, R. T. (1997).** Interplay of yeast global transcriptional regulators Ssn6p-Tup1 and Swi-Snf and their effect on chromatin structure. *EMBO J.* 16:6263-6271.
- GILMAN, A. G. (1987).** G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-649.
- GOLBIK, R., NAUMANN, M., OTTO, A., MULLER, E., BEHLKE, J., REUTER, R., HUBNER, G. & KRIEGEL, T. M. (2001).** Regulation of phosphotransferase activity of hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by modification at serine-14. *Biochemistry.* 40:1083-1090.
- GÖRNER, W., DURCHSCHLAG, E., MARTÍNEZ-PASTOR, M. T., ESTRUCH, F., AMMERER, G., HAMILTON, B., RUIS, H. & SCHÜLLER, C. (1998).** Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes. Dev.* 12:586-597.
- GRBAVEC, D., LO, R., LIU, Y., GREENFIELD, A. & STIFANI, S. (1999).** 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.
- GRIGGS, D. W. & JOHNSTON, M. (1991).** 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.

- GRUPE, A., HULTGREN, B., RYAN, A., MA, Y. H., BAUER, M. & STEWART, T. A. (1995).** Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic  $\beta$  cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell*. 83:69-78.
- GUILLEMAIN, G., LOIZEAU, M., PINCON-RAYMOND, M., GIRARD, J. & LETURQUE, A. (2000).** The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J. Cell. Sci.* 113:841-847.
- HALFORD, N. G., MAN, A. L., BARKER, J. H., MONGER, W., SHEWRY, P. R., SMITH, A. & PURCELL, P. C. (1994).** Investigating the role of plant SNF1-related protein kinases. *Biochem. Soc. Trans.* 22:953-957.
- HAN, K., LEVINE, M. S. & MANLEY, J. L. (1989).** Synergistic activation and repression of transcription by *Drosophila* homeobox proteins. *Cell*. 56:573-583.
- HANAHAH, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In DNA cloning: a practical approach. D. M. Glover vol. 1:109-135, IRL Press, Oxford.
- HARDIE, D. G. & CARLING, D. (1997).** The AMP-activated protein kinase. Fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246:259-273.
- HARDIE, D. G., CARLING, D. & CARLSON, M. (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67:821-855.
- HEDGES, D., PROFT, M. & 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.
- HERRERO, P., FLORES, L., DE LA CERA, T. & MORENO, F. (1999).** Functional characterization of transcriptional regulatory elements in the upstream region of the yeast *GLK1* gene. *Biochem. J.* 343:319-325.
- HERRERO, P., GALÍNDEZ, J., RUIZ, N., MARTÍNEZ-CAMPA, C. & MORENO, F. (1995).** Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXX1*, *HXX2* and *GLK1* genes. *Yeast*. 11:137-144.

- HERRERO, P., MARTÍNEZ-CAMPA, C. & MORENO, F. (1998).** 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.
- HERRERO, P., RAMÍREZ, M., MARTÍNEZ-CAMPA, C. & MORENO, F. (1996).** Identification and characterization of two transcriptional repressor elements within the coding sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK2* gene. *Nucleic Acids Res.* 24:1822-1828.
- HILL, J. E., MYERS, A. M., KOERNER, T. J. & TZAGOLOFF, A. (1986).** Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast.* 2:163-167.
- HINNEBUSCH, A. G. (1984).** Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6442-6446.
- HIRAI, M., OKTANI, E., TANAKA, A. & FUKUI, S. (1977).** Glucose-phosphorylating enzymes of *Candida* yeasts and their regulation *in vivo*. *Biochem. & Biophys. Acta.* 480:357-366.
- HOFFMAN, C. S. & WINSTON, F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57:267-272.
- HOHMANN, S., WINDERICKX, J., DE WINDE, J. H., VALCKX, D., COBBAERT, P., LUYTEN, K., DE MEIRSMAN, C., RAMOS, J. & THEVELEIN, J. M. (1999).** Novel alleles of yeast hexokinase PII with distinct effects on catalytic activity and catabolite repression of *SUC2*. *Microbiology.* 145:703-714.
- HONIGBERG, S. M. & LEE, R. H. (1998).** Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18:4548-4555.
- HORIUCHI, J., SILVERMAN, N., MARCUS, G. A. & GUARENTE, L. (1995).** ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* 15:1203-1209.
- HUANG, M., ZHOU, Z. & ELLEDGE, S. I. (1998).** The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell.* 94:595-605.

- 
- INNIS, M. A., GELFLAND, D. H., SNINSLI, J. J. & WHITE, T. J. (1990).** PCR Protocols. A guide to Methods and Applications. Academic press, Inc. San Diego, Ca.
- JIANG, R. & CARLSON, M. (1996).** Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10:3105-3115.
- JIANG, R. & CARLSON, M. (1997).** The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17:2099-2106.
- JIANG, Y. W. & STILLMAN, D. J. (1992).** Involvement of the *SIN4* global transcriptional regulator in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12:4503-4514.
- JOHNSON, E. S. & BLOBEL, G. (1997).** Ubc9 is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* 272:26799-26802.
- JOHNSTON, M. & CARLSON, M. (1992).** Regulation of carbon and phosphate utilization. In *E. W. Jones, J. R. Pringle, and J. R. Broach* (ed). 193-281.
- JOHNSTON, M. (1987).** A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51:458-476.
- JOHNSTON, M. (1999).** Feasting, fasting and fermenting: glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* 15:29-33.
- KADONAGA, J. T. (1991).** Purification of sequence-specific binding proteins by DNA affinity chromatography. *Meth. Enzymol.* 208:10-23.
- KASTANIOTIS, A. J., MENELLA, T. A., KONRAD, C., TORRES, A. M. & ZITOMER, R. S. (2000).** Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene *ANB1* in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20:7088-7098.
- KELEHER, C. A., REDD, M. J., SCHULTZ, J., CARLSON, M. & JOHNSON, A. D. (1992).** Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell.* 68:709-719.

- KENG, T. (1992).** *HAP1* and *ROX1* form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12:2616-2623.
- KISHI, T., SENO, T. & YAMAO, F. (1998).** Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol. Gen. Genet.* 257:143-148.
- KLEBE, R. J., HARRIS, J. V., SHARP, Z. D. & DOUGLAS, M. G. (1983).** A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Cell.* 68:709-719.
- KLEIN, C. J. L., OLSSON, L. & NIELSEN, J. (1998).** Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology.* 144:13-24.
- KRAAKMAN, L., LEMAIRE, K., MA, P., TEUNISSEN, A. W. R. H., DONATON, M. C. V., VAN DIJCK, P., WINDERICKX, J., DE WINDE, J. H. & THEVELEIN, J. M. (1999).** A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32:1002-1012.
- KRIEGEL, T. M., RUSH, J., VOJTEK, A. B., CLIFTON, D. & FRAENKEL, D. G. (1994).** *In vivo* phosphorylation site of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 33:148-152.
- KRUCKEBERG, A. L. (1996).** The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166:283-292.
- KUCHIN, S. & CARLSON, M. (1998).** Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-1, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol. Cell. Biol.* 18:1163-1171.
- LAFUENTE, M. J., GANCEDO, C., JAUNIAUX, J. C. & GANCEDO, J. M. (2000).** Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35:161-172.

- LAGUNAS, R. (1979).** Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cell. Biochem.* 27:139-146.
- LAMMER, D., MATHIAS, N., LAPLAZA, J. M., JIANG, W., LIU, Y., CALLIS, J., GOEBL, M. & ESTELLE, M. (1998).** Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein Rub1p affects function of the SCF<sup>Cdc4</sup> complex. *Genes Dev.* 12:914-926.
- LAMOTHE, B., BAUDRY, A., DESBOIS, P., LAMOTTE, L., BUCCHINI, D., DE MEYTS, P. & JOSHI, R. L. (1998).** Genetic engineering in mice: impact on insulin signalling and action. *Biochem. J.* 335:193-204.
- LECLERC, I., KAHN, A. & DOIRON, B. (1998).** The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett.* 431:180-184.
- LEE, M., CHATTERJEE, S. & STRUHL, K. (2000).** Genetic analysis of the role of Pol II holoenzyme components in repression by the Cyc8-Tup1 corepressor in yeast. *Genetics.* 155:1535-1542.
- LEE, Y. C., MIN, S., GIM, B. S. & KIM, Y.-J. (1997).** A transcriptional mediator protein that is required for activation of many RNA polymerase II promoters and is conserved from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* 17:4622-4632.
- LERACH, H., DIAMOND, D., WOZNEY, J. M. & BOEDTKER, H. (1977).** RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* 16:4743-4751.
- LESAGE, P., YANG, X. & CARLSON, M. (1996).** Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C<sub>6</sub> zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol. Cell. Biol.* 16:1921-1928.
- LI, F. N. & JOHNSTON, M. (1997).** Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* 16:5629-5638.
- LIANG, H. & GABER, R. F. (1996).** A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol. Cell. Biol.* 7:1953-1966.

- LIAO, S. M., ZHANG, J., JEFFERY, D. A., KOLESKE, A. J., THOMPSON, C. M., CHAO, D. M., VILJOEN, M., VAN VUUREN, H. J. & YOUNG, R. A. (1995).** A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* (London) 374:193-196.
- LIESEN, T., HOLLENBERG, C. P. & HEINISCH, J. J. (1996).** ERA, a novel *cis*-acting element required for autoregulation and ethanol repression of *PDC1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 21:621-632.
- LIMBACH, M. P. & ZITOMER, R. S. (2000).** The isolation and characterization of missense mutants in the general repressor protein Ssn6 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 263:455-462.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- LUDIN, K., JIANG, R. & CARLSON, M. (1998).** Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6245-6250.
- LUNDIN, M., NEHLIN, J. O. & RONNE, H. (1994).** Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* 14:1979-1985.
- LUTFIYYA, L. L. & JOHNSTON, M. (1996).** Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell. Biol.* 16:4790-4797.
- LUTFIYYA, L. L., IYER, V. R., DE RISI, J., DEVIT, M. J., BROWN, P. O. & JOHNSTON, M. (1998).** Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 150:1377-1391.
- MA, H. & BOTSTEIN, D. (1986).** Effects of null mutations in the hexokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae* on catabolite repression. *Mol. Cell. Biol.* 6:4046-4052.
- MA, H., BLOOM, L. M., WALSH, C. T. & BOTSTEIN, D. (1989).** The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9:5643-5649.



- MACFARLANE, W. M., MCKINNON, C. M., FELTON-EDKINS, Z. A., CRAGG, H., JAMES, R. F. & DOCHERTY, K. (1999).** Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX-1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 274:1011-1016.
- MACFARLANE, W. M., SHEPHERD, R. M., COSGROVE, K. E., JAMES, R. F., DUNNE, M. J. & DOCHERTY, K. (2000).** Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Diabetes.* 49:418-423.
- MAGER, W. H. & DE KRUIJFF, A. J. (1995).** Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59:506-531.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. (1982).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., ADAM, G. & RUIS, H. (1993).** A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12:1997-2003.
- MARSHALL-CARLSON, L., CELENZA, J. L., LAURENT, B. C. & CARLSON, M. (1990).** Mutational analysis of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:1105-1115.
- MARTÍNEZ-CAMPA, C., HERRERO, P., RAMÍREZ, M. & MORENO, F. (1996).** Molecular analysis of the promoter region of the hexokinase 2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett.* 137:69-74.
- MARTÍNEZ-PASTOR, M. T., MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., MARCHLER-BAUER, A., RUIS, H. & ESTRUCH, F. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15:2227-2235.
- MATALLANA, E., FRANCO, L. & PÉREZ-ORTIN, J. E. (1992).** Chromatin structure of the yeast *SUC2* promoter in regulatory mutants. *Mol. Gen. Genet.* 231:395-400.

- MATSON, S. W. (1989).** Comments Vol. 16 N° 1 p. 18. United States Biochemical Corp, Cleveland, OH.
- MAYORDOMO, I & SANZ, P. (2001a).** Hexokinase PII: structural analysis and glucose signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 18:923-930.
- MAYORDOMO, I. & SANZ, P. (2001b).** Human pancreatic glucokinase (GlkB) complements the glucose signalling defect of *Saccharomyces cerevisiae hck2* mutants. *Yeast*. 18:1309-1316.
- MEIJER, M. M. C., BOONSTRA, J., VERKLEIJ, A. J. & VERRIPS, C. T. (1998).** Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J. Biol. Chem.* 273:24102-24107.
- MEYERS, J. A., SÁNCHEZ, D., ELWELL, L. P. & FALCOW, S. (1976).** Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127:1529-1537.
- MICHELS, C. A., HALMENBERGER, K. M. & SILVESTRE, Y. (1983).** Pleiotropic mutations regulating resistance to glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are allelic to the structural gene for hexokinase B. *J. Bacteriol.* 153:574-578.
- MILLER, J. H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics, p. 403. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- MISKIMINS, W. K., ROBERTS, M. P., McCLELLAND, A. & RUDDLE, F.H. (1985).** Use a protein-blotting procedure and a specific DNA probe to identify nuclear proteins that recognize the promoter region of the transferrin receptor gene. *Proc. Natl. Acad. USA.* 86:6741-6744.
- MITCHELHILL, K. I., STAPLETON, D., GAO, G., HOUSE, C., MICHELL, B., KATSI, F., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. (1994).** Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269:2361-2364.

- MORENO, F. & HERRERO, P. (2002).** The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:83-90.
- MORENO, F., FERNÁNDEZ, T., FERNÁNDEZ, R. & HERRERO, P. (1986).** Hexokinase PII from *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by changes in the cytosolic Mg<sup>2+</sup>-free ATP concentration. *Eur. J. Biochem.* 161:565-569.
- MORENO-HERRERO, F., HERRERO, P., COLCHERO, J., BARÓ, A. M. & MORENO, F. (1999).** Analysis by atomic force microscopy of Med8 binding to *cis*-acting regulatory elements of the *SUC2* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 459:427-432.
- MÜLLER, S., BOLES, E., MAY, M. & ZIMMERMANN, F. K. (1995).** Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177:4517-4519.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A., SHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-269.
- MYER, V. E. & YOUNG, R. A. (1998).** RNA polymerase II holoenzyme and subcomplexes. *J. Biol. Chem.* 273:27757-27760.
- MYERS, A. M. TZAGOLOFF, A., KINNEY, D. M. & LUSTY, C. J. (1986).** Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene.* 45:299-310.
- MYERS, L. C. & KORNBERG, R. D. (2000).** Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69:729-749.
- MYERS, L. C., GUSTAFSSON, C. M., BUSHNELL, D. A., LUI, M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPEST, P. & KORNBERG, R. D. (1998).** The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 12:45-54.
- NEHLIN, J. O. & RONNE, H. (1990).** Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.* 9:2891-2898.

- NEHLIN, J. O., CARLBERG, M. & RONNE, H. (1991).** Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor, a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* 10:3373-3377.
- NEHLIN, J. O., CARLBERG, M. & RONNE, H. (1992).** 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.
- OSTLING, J. & RONNE, H. (1998).** Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur. J. Biochem.* 252:162-168.
- OSTLING, J., CARLBERG, M. & RONNE, H. (1996).** Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* 16:753-761.
- ÖZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1995).** Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15:1564-1572.
- ÖZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1999).** Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 554-569.
- ÖZCAN, S., DOVER, J. & JOHNSTON, M. (1998).** Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17:2566-2573.
- ÖZCAN, S., FREIDEL, K., LEUKER, A. & CIRIACY, M. (1993).** Glucose uptake and catabolite repression in dominant *HTR1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 175:5520-5528.
- ÖZCAN, S., LEONG, T. & JOHNSTON, M. (1996).** Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 16:6419-6426.
- PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M., STEVEN CONLAN, R., GOUNALAKI, N., COPF, T. & TZAMARIAS, D. (2000).** Hrs1/Med3 is a Cyc8-Tup1 corepressor target in the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 275:8397-8403.

- 
- PARK, S. H., KOH, S. S., CHUN, J. H., HWANG, H. J. & KANG, H. S. (1999).** Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STA1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19:2044-2050.
- PATTERTON, H. G. & SIMPSON, R. T. (1994).** Nucleosomal location of the STE6 TATA box and Mat alpha 2p-mediated repression. *Mol. Cell. Biol.* 14:4002-4010.
- PEARSON, W. R. & LIPMAN, D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448.
- PETERSON, C. L. & TAMKUN, J. W. (1995).** The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends. Biochem. Sci.* 20:143-146.
- PETIT, T., DIDERICH, J. A., KRUCKEBERG, A. L., GANCEDO, C. & VAN DAM, K. (2000).** Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182:6815-6818.
- POSTIC, C., SHIOTA, M. & MAGNUSON, M. A. (2001).** Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. *Recent. Prog. Horm. Res.* 56:195-217.
- PRIOR, C., MAMESSIER, P., FUKUHARA, H., CHEN, X. J. & WESOLOWSKI-LOUVEL, M. (1993).** The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.* 13:3882-3889.
- RAHNER, A., HIESINGER, M. & SCHÜLER, H.-J. (1999).** Deregulation of gluconeogenic structural genes by variants of the transcriptional activator Cat8p of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 34:146-156.
- RAHNER, A., SCHOLER, A., MARTENS, E., GOLLWITZER, B. & SCHÜLER, 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*. *Nucl. Acids Res.* 24:2331-2337.
- RANDEZ-GIL, F., BOJUNGA, N., PROFT, M. & ENTIAN, K.-D. (1997).** Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell. Biol.* 17:2502-2510.

- RANDEZ-GIL, F., HERRERO, P., SANZ, P., PRIETO, J. A. & MORENO, F. (1998a).** Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 425:475-478.
- RANDEZ-GIL, F., SANZ, P., ENTIAN, K.-D. & PRIETO, J. A. (1998b).** Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18:2940-2948.
- REDD, M. J., STARK, M. R. & JOHNSON, A. D. (1996).** Accessibility of  $\alpha$ 2-repressed promoters to the activator Gal4. *Mol. Cell. Biol.* 16:2865-2869.
- REDRUELLO, B., VALDÉS, E., LÓPEZ, M. L. & RODICIO, R. (1999).** Multiple regulatory elements control the expression of the yeast *ACR1* gene. *FEBS Lett.* 445:246-250.
- REIFENBERGER, E., BOLES, E. & CIRIACY, M. (1997).** Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245:324-333.
- RODRÍGUEZ, A., DE LA CERA, T., HERRERO, P. & MORENO, F. (2001).** The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXK1* and *HXK2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355:625-631.
- ROLFES, R. J. & HINNEBUSCH, A. G. (1993).** Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol. Cell. Biol.* 13:5099-5111.
- ROLLAND, F., WINDERICKX, J. & THEVELEIN, J. M. (2001).** Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* 26:310-317.
- RONNE, H. (1995).** Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11:12-17.
- ROSE, M., ALBIG, W. & ENTIAN, K.-D. (1991).** Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur. J. Biochem.* 199:511-518.
- RUIS, H. & SCHÜLLER, C. (1995).** Stress signaling in yeast. *Bioessays.* 17:959-965.

- 
- SAKAI, A., SHIMIZU, Y., KONDOU, S., CHIBAZAKURA, T. & HISHINUMA, F. (1990).** Structure and molecular analysis of *RGR1*, a gene required for glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4130-4138.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., & MANIATIS, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER, F., HICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
- SANZ, P., ALMS, G. R., HAYSTEAD, T. A. J. & CARLSON, M. (2000a).** Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20:1321-1328.
- SANZ, P., LUDIN, K. & CARLSON, M. (2000b).** Sip5 interacts with both the Reg1/Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 154:99-107.
- SANZ, P., NIETO, A. & PRIETO, J. A. (1996).** Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements. *J. Bacteriol.* 178:4721-4723.
- SAROKIN, L. & CARLSON, M. (1985).** Comparison of two yeast invertase genes: conservation of the upstream regulatory region: *Nucleic Acids Res.* 13:6089-6113.
- SCHIRMAIER, F. & PHILIPPSSEN, P. (1984).** Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 3:3311-3315.
- SCHMIDT, M. C., McCARTNEY, R. R., ZHANG, X., TILLMAN, T. S., SOLIMEO, H., WOLFI, S., ALMONTE, C. & WATKINS, S. C. (1999).** Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19:4561-4571.
- SCHMITT, A. P. & McENTEE, K. (1996).** Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5777-5782.

- SCHULTZ, J., MARSHALL-CARLSON, L. & CARLSON, M. (1990).** The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:4744-4756.
- SHERMAN, F., FINK, G. R. & HICKS, J. B. (1986).** Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- SHIMIZU, M., ROTH, S. Y., SZENT-GYORGYI, C. & SIMPSON, R.T. (1991).** Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha 2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 10:3033-3041.
- SILLJÉ, H. H. W., PAALMAN, J. W. G., TER SCHURE, E. G., OLSTHOORN, S. Q. B., VERKLEIJ, A. J., BOONSTRA, J. & VERRIPS, C. T. (1999).** Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181:396-400.
- SILLJÉ, H. H. W., TER SCHURE, E. G., ROMMENS, A. J. M., HULS, P. G., WOLDRINGH, C. L., VERKLEIJ, A. J., BOONSTRA, J. & VERRIPS, C. T. (1997).** Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression and reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179:6560-6565.
- SINCLAIR, D. A., KORNFELD, G. D. & DAWES, I. W. (1994).** Yeast intragenic transcriptional control: activation and repression sites within the coding region of the *Saccharomyces cerevisiae* *LPD1* gene. *Mol. Cell. Biol.* 14:214-225.
- SINGER, M. A. & LINDQUIST, S. (1998).** Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.* 1:639-648.
- SKOWYRA, D., CRAIG, K. L., TYERS, M., ELLEDGE, S. J. & HARPER, J. W. (1997).** F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell.* 91:209-219.
- SONG, W. & CARLSON, M. (1998).** Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J.* 17:5757-5765.



- SONG, W., TREICH, I., QIAN, N., KUCHIN, S. & CARLSON, M. (1996).** *SSN* genes that affect transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae* encode SIN4, ROX3 and SRB proteins associated with RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 16:115-120.
- SOUTHERN, E. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- STAPLETON, D., GAO, G., MICHELL, B. J., WIDMER, J., MITCHELHILL, K., TEH, T., HOUSE, C. M., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. (1994).** Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269:29343-29346.
- SUDARSANAM, P., CAO, Y., WU, L., LAURENT, B. C. & WINSTON, F. (1999).** The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription *in vivo* and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5. *EMBO J.* 18:3101-3106.
- SUZUKI, Y., NOGI, Y., ABE, A. & FUKASAWA, T. (1988).** Gal11 protein, an auxiliary transcription activator for genes encoding galactose-metabolizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8:4991-4999.
- SWAFFIELD, J. C., MELCHER, K. & JOHNSTON, S. A. (1996).** A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein. *Nature (London)* 379:658-669.
- TATCHELL, K. (1993).** *RAS* genes in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In signal transduction prokaryotic and simple eukaryotic systems. Kurjan, J. & Taylor, b. j. (eds.). San Diego: Academic Press. 147-188.
- TEUSINK, B., DIDERICH, J. A., WESTERHOFF, H. V., VAN DAM, K. & WALSH, M. C. (1998).** Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* 180:556-562.
- THEVELEIN, J. M. (1994).** Signal transduction in yeast. *Yeast.* 10:1753-1790.
- THOMAS, P. S. (1980).** Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205.

- TREITEL, M. A. & CARLSON, M. (1995).** Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3132-3136.
- TREITEL, M. A., KUCHIN, S. & CARLSON, M. (1998).** Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18:6273-6280.
- TRUMBLY, R. J. (1992).** Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6:15-21.
- TU, J. & CARLSON, M. (1995).** REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14:5939-5946.
- TURKEL, S., LIAO, X. B. & FARABAUGH, P. J. (1997).** GCR1-dependent transcriptional activation of yeast retrotransposon Ty2-917. *Yeast.* 13:917-930.
- TZAMARIAS, D. & STRUHL, K. (1994).** Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature (London).* 369:758-761.
- TZAMARIAS, D. & STRUHL, K. (1995).** Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes Dev.* 9:821-831.
- TZAMARIAS, D., ROUSSOU, I. & THIREOS, G. (1989).** Coupling of GCN4 mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation. *Cell.* 57:947-954.
- UEMURA, K., ATOMI, H., KANAI, T., TAKESHITA, S., KANAYAMA, N., UEDA, M. & TANAKA, A. (1997).** Derepression of gene expression mediated by the 5' upstream region of the isocitrate lyase gene of *Candida tropicalis* is controlled by two distinct regulatory pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 243:748-752.
- UMIKAWA, M., TANAKA, K., KAMEI, T., SHIMIZU, K., IMAMURA, H., SASAKI, T. & TAKAI, Y. (1998).** Interaction of Rho1p target with F-actin-binding elongation factor 1 alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene.* 16:2011-2016.

- VAGNOLI, P., COONS, D. M. & BISSON, L. F. (1998).** The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:31-36.
- VALLIER, L. G. & CARLSON, M. (1994).** Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 137:49-54.
- VARANASI, U. A., KLIS, M., MIKESELL, P. B. & TRUMBLY, R. J. (1996).** The Cyc8(Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol. Cell. Biol.* 16:6707-6714.
- VARELA, J. C., PRAEKELT, U. M., MEACOCK, P. A., PLANTA, R. J. & MAGER, W. H. (1995).** The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 15:6232-6245.
- VERSELE, M., LEMAIRE, K. & THEVELEIN, J. M. (2001).** Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep.* 2:574-579.
- VINCENT, O. & CARLSON, M. (1998).** Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J.* 17:7002-7008.
- VINCENT, O. & CARLSON, M. (1999).** Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* 18:6672-6681.
- VINCENT, O., TOWNLEY, R., KUCHIN, S. & 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.
- VOJTEK, A. B. & FRAENKEL, D. G. (1990).** Phosphorylation of yeast hexokinases. *Eur. J. Biochem.* 190:371-375.
- VYAS, V. K., KUCHIN, S. & CARLSON, M. (2001).** Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 158:563-572.

- WAHL, G. M., STERN, M. & STARK, G. R. (1979).** Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethylpaper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3683-3687.
- WALDHERR, M., RAGNINI, A., JANK, B., TEPLY, R., WIESENBERGER, G. & SCHWEYEN, R. J. (1993).** A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr. Genet.* 24:301-306.
- WANG, J., SIRENKO, O. & NEEDLEMAN, R. (1997).** 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.
- WATSON, A. D., EDMONDSON, D. G., BONE, J. R., MUKAI, Y., YU, Y., DU, W., STILLMAN, D. J. & ROTH, S. Y. (2000).** Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev.* 14:2737-2744.
- WENDELL, D. L. & BISSON, L. F. (1994).** Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* 176:3730-3737.
- WIGLER, M. J., FIELD, J., POWERS, S., BROEK, D., TODA, T., CAMERON, S., NIKAWA, J., MICHAELI, T., COLICELLI, J. & FERGUSON, K. (1988).** Studies of RAS function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53:649-655.
- WILSON, W. A., HAWLEY, S. A. & HARDIE, D. G. (1996).** Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* 6:1426-1434.
- WOODS, A., MUNDAY, M. R., SCOTT, J., YANG, X., CARLSON, M. & CARLING, D. (1994).** Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 269:19509-19516.
- WRAY, L. V., ZALIECKAS, J. M. & FISHER, S. H. (2001).** *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell.* 107:427-435.

- 
- WU, J., SUKA, N., CARLSON, M. & GRUNSTEIN, M. (2001).** TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell.* 7:117-126.
- WU, L. & WINSTON, F. (1997).** Evidence that Snf-Swi controls chromatin structure over both the TATA and UAS regions of the *SUC2* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 25:4230-4234.
- YANG, X., HUBBARD, E. J. A. & CARLSON, M. (1992).** A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science.* 257:680-682.
- YANG, X., JIANG, R. & 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.
- ZENKE, F. T., ENGELS, R., VOLLENBROICH, V., MEYER, J., HOLLENBERG, C. P. & BREUNIG, K. D. (1996).** Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science.* 272:1662-1665.
- ZHANG, L. & GUARENTE, L. (1994).** Evidence that *TUP1/SSN6* has a positive effect on the activity of the yeast activator HAP1. *Genetics.* 136:813-817.
- ZHOU, H. & WINSTON, F. (2001).** *NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genetics.* 2:5-12.
- ZITOMER, R. S., LIMBACH, M. P., RODRÍGUEZ-TORRES, A. M., BALASUBRAMANIAN, B., DECKERT, J. & SNOW, P. M. (1997).** Approaches to the study of Rox1 repression of the hypoxic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods.* 11:279-288.