

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Bioquímica

REGULACIÓN DIFERENCIAL
DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
QUE CODIFICAN ENZIMAS
GLUCONEOGÉNICAS
EN *Yarrowia lipolytica*

Raquel Jardón Martín

Madrid, 2006

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
Universidad Autónoma de Madrid

REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN
DE LOS GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS
GLUCONEOGÉNICAS EN *Yarrowia lipolytica*

Memoria que para optar al grado de Doctora presenta la Licenciada en Farmacia Raquel
Jardón Martín

Directores:

Dr. Carlos Gancedo Rodríguez
Profesor de Investigación del CSIC
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM

Dra. Carmen-Lisset Flores Mauriz
Doctora en Ciencias Biológicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM

Trabajo realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols
CSIC-UAM, Madrid 2006

Quiero aprovechar estas líneas para agradecer su ayuda a todos aquellos que de alguna forma han colaborado en la realización de este trabajo:

Al Dr. Carlos Gancedo, por ofrecerse a ser mi director y haber estado siempre dispuesto a poner a mi alcance todos sus conocimientos. Por ser un ejemplo para mi de vocación y dedicación profesional.

A la Dra. Carmen Lisset Flores, codirectora de este trabajo, por su compromiso con éste y conmigo, por la pasión que imprime a lo que hace, por enseñarme tanto sobre ciencia y sobre muchas otras cosas estos años; por las horas compartidas discutiendo y riendo.

A la Dra. Juana María Sempere, por su disposición para aportar ideas y una visión crítica de mi trabajo.

A la Dra. Mónica M. Belinchón, que siempre ha estado dispuesta a ayudarme y a compartir conmigo tardes y confidencias, por su cariño y amistad, gracias.

Al Dr. Eduardo Silles, que me cedió parte de su poyata a mi llegada, y al Dr. Francisco Javier Pérez por el apoyo y la amistad que me han brindado.

A la Dra. Pilar Eraso, por ser la tutora de este trabajo, por su interés y su tiempo.

A toda la unidad de levaduras, por escuchar las dificultades que me he encontrado a lo largo de este trabajo e intentar aportar soluciones, en especial a la Dra. María Jesús Mazón y a Eulalia Morgado, que me guiaron en la realización de mi primer western y estuvieron siempre dispuestas a aconsejarme desde su experiencia.

A las personas de dentro y fuera de este centro que han contribuido de distinta manera a la realización de esta tesis: los Dres. Claude Gaillardin, Anita Boisrame y Jean-Marc Nicaud (INRA, Grignon, Francia), el Dr. Dominique Swennen (Thiverval, Grignon, Francia) y el Dr. Gerold Barth (Universidad de Dresde, Alemania) que me cedieron distintas cepas, plásmidos y genotecas, el Dr. Ángel Domínguez (IMBQ, Salamanca) que me ayudó cuando el genoma de *Yarrowia* no era público, los Dres. Pilar Herrero y Fernando Moreno (Departamento de Bioquímica, Universidad de Oviedo) que me acogieron en su laboratorio y me enseñaron mucho sobre fusiones de proteínas, la Dra. Concepción Gil (Departamento de Microbiología, Facultad de

Farmacia, Universidad Complutense de Madrid) que identificó mediante MALDI-TOF la Fbp, la Dra. Carmen Hermida (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid) que tanto me ayudó en la obtención del anticuerpo, el Dr. Anselmo Otero (Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba) que me enseñó los trucos del ELISA y se sigue acordando de mí desde Cuba, el Profesor Abdelaziz Soukri y la licenciada Latifa Fourrat (Universidad Hasan II, Casablanca, Marruecos) que me cedieron un anticuerpo anti-Gapdh de *Yarrowia lipolytica*, la Dra. Carmen G. Vallejo y el Dr. Leandro Sastre (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid) que pacientemente me dejaron observar y fotografiar respectivamente levaduras en sus lupas, el Dr. Ramón Sendra (Departamento de Bioquímica, Universidad de Valencia) que me facilitó un anticuerpo contra la histona H3, el personal del animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid que cuidaron de mis ratones, el servicio de imagen que ha sacado tiempo para mis dibujos y mis fotos, en especial a Javier Pérez, por compartir sus cortos conmigo y ayudarme a domar el Illustrator. Quiero agradecer especialmente su ayuda a todos los miembros del laboratorio 2.9., a los que están ahora y a los que ya se han ido, por su ayuda, que ha sido tanta y tan variada que es imposible enumerarla aquí; sobre todo a la Dra. Eugenia Costamagna y a Miguel Ángel Zaballos, dos buenos amigos que han sufrido con paciencia infinita mi peticiones constantes. Muchísimas gracias.

Quiero también dar la gracias a Carolina Espina, que tantas veces se convirtió en mi proveedora....Carolinchi, ¡cuántas horas juntas! ¡cuántos baches superados! Sin duda tu amistad es de lo mejor que me llevo.

A todos ellos y a los que me pueda dejar en el tintero, gracias.

No quiero olvidarme de otra gente que me ha ayudado en el ámbito personal, sin la que tampoco existiría esta tesis: mis amigos de Salamanca que siempre me arropan (Sara, Mariajo, Pedro, Amanda y Manu), Cova y Noe que siguen 22 años después al pie del cañón, Estefanía que se enfrentó conmigo a un duro examen de alemán, los teatreros de la Cuarta Pared y los que siguen conmigo en Karpas (¡somos grandes! ...). Sin vosotros nada sería lo mismo.

Agradezco a mi familia por impulsarme a seguir siempre adelante: a mis padres, que tienen una fe ciega en mí y me apoyan de forma incondicional, por sentirse orgullosos antes y ahora y a mis hermanas, que me miman y me cuidan siempre. Os quiero.

Para terminar quiero agradecerle a la persona más importante, a Jesús, por las horas que ha pasado dibujando plásmidos incomprensibles, por escuchar mis charlas una y otra vez, por aguantar pacientemente la escritura de esta tesis cada fin de semana....gracias por tranquilizarme cuando me desespero, por cuidarme tanto, por verme capaz de todo, por pasar estos años conmigo y querer compartir muchos más...todos. Te quiero, pequeño.

Por último agradezco a los organismos que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral: al Ministerio de Educación y Ciencia, la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario, y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, el haber podido desarrollar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols.

APARTADO	PÁGINA
- Abreviaturas	1
- Resumen	3
- Summary	4
- Introducción	5
1.- Glicolisis y gluconeogénesis en <i>Yarrowia lipolytica</i>	7
2. - Regulación de reacciones glicolíticas irreversibles y sus antagónicas gluconeogénicas en levaduras	11
2.1.- Regulación alostérica	12
2.2.- Inactivación y represión catabólicas	14
2.2.1.- Inactivación catabólica	14
2.2.2.- Represión catabólica	15
2.2.2.1.- Represión catabólica en <i>S. cerevisiae</i> .	15
2.2.2.2.- La represión catabólica de los genes codificantes de enzimas gluconeogénicas sigue un esquema común	17
2.2.2.3.- La represión catabólica en levaduras no convencionales	19
- Objetivos	21
- Materiales y Métodos	22
1.- Material biológico	22
1.1.- Cepas de levadura	22
1.2.- Bacterias	23
1.3.- Genotecas	23
1.4.- Anticuerpos	23
2.- Medios y condiciones de crecimiento	24
3.- Métodos bioquímicos	24
3.1.- Obtención de extractos celulares de levadura	24
3.2.- Ensayos enzimáticos	24
3.3.- Valoración de metabolitos intracelulares	26
3.4.- Valoración de fuentes de carbono	27

4.- Métodos de biología molecular	27
4.1.- Técnicas de manipulación del DNA	27
4.2.- Reacciones de PCR	28
4.3.- Transformaciones celulares	29
4.3.1.- Transformación de bacterias	29
4.3.2.- Transformación de levaduras	29
4.3.2.1.- Obtención de células competentes de <i>Y. lipolytica</i>	29
4.3.2.2.- Transformación de células competentes de <i>Y. lipolytica</i>	30
4.4.- Plásmidos	31
4.5.- Análisis de Southern	34
4.6.- Análisis de northern	34
4.7.- Sondas empleadas	35
5.- Expresión de <i>YIFBP1</i> en <i>S. cerevisiae</i>	35
6.- Interrupción del gen <i>YIFBP1</i>	36
6.1.- Construcciones iniciales	36
6.2.- Desplazamiento de la interrupción hacia 5´	36
6.3.- Desplazamiento de la interrupción hacia 3´	36
6.4.- Ampliación de las zonas de homología flanqueantes	37
6.4.1.- Interrupción del gen <i>YIFBP1</i> con el gen <i>YIURA3</i>	37
6.4.2.- Interrupción del gen <i>YIFBP1</i> con el gen <i>YILEU2</i>	37
7.- Reintroducción del gen <i>YIFBP1</i> en mutantes <i>Yifbp1</i>	43
8.- Obtención de proteína YIFbp	44
9.- Tinción de geles de poliacrilamida	46
10.- Esquema de inmunización de ratones y obtención de anticuerpos	46
11.- Obtención de extractos nucleares de <i>Y. lipolytica</i>	47
- Resultados	49
1.- Las actividades de las enzimas gluconeogénicas en <i>Y. lipolytica</i> responden de distinta forma a la fuente de carbono del medio	49

2.- Aislamiento del gen <i>YIFBP1</i>	52
2.1.- Obtención de la región 5' no codificante.	54
2.2.- Obtención de la región 3' no codificante.	56
3.- Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>YIFBP1</i>	58
3.1.- Región codificante	58
3.2.- Región 5' no codificante	63
3.3.- Región 3' no codificante	67
4.- Análisis de la funcionalidad de <i>YIFBP1</i>	68
5.- Análisis de la posible existencia de otro gen codificante de una Fbp	71
6.- Interrupción de <i>YIFBP1</i> y consecuencias fenotípicas	72
6.1.- Diferencias morfológicas entre el mutante <i>Yifbp1</i> y la cepa silvestre	79
6.2.- Efectos de la interrupción de <i>YIFBP1</i> sobre la velocidad de crecimiento.	84
6.3. Competición cepa silvestre vs cepa mutante <i>Yifbp1</i>	85
6.4.- Valoración de metabolitos intracelulares	86
6.5. Características cinéticas de YIFbp y de YIXPasa	89
7.- Expresión de los genes que codifican enzimas gluconeogénicas	93
8.- Expresión de fusiones p <i>YIFBP1-lacZ</i>	95
9.- Niveles de proteína YIFbp	98
10.- Localización subcelular de YIFbp	100
- . Discusión	102
- . Conclusiones	114
- . Bibliografía	115

cAMP: AMP cíclico.

CAI: Índice de adaptación de codones (Codon Adaptation Index).

CPM/mm²: Cuentas por minuto/milímetro².

CSRE: Elemento de respuesta a fuente de carbono (Carbon Source Response Element).

Da: Daltons (KDa: KiloDaltons).

D.O.: Densidad óptica.

Fbp: Fructosa-1,6-bisfosfatasa.

β-galactosidasa: β-D-galactósido galactohidrolasa.

G6Pdh: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

GST: Glutation-S-transferasa.

Hxk: Hexokinasa.

Icl: Isocitrato liasa.

IPTG: Isopropil-β-D-galactopiranosido.

K_i: Constante de inhibición.

K_M: Constante de Michaelis-Menten.

LB: Medio Luria-Bertani (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7).

Mdh: Malato deshidrogenasa.

Mls: Malato sintasa.

OAA: Oxalacetato.

ORF: Región codificante de un gen (Open Reading Frame).

P: Grupo fosfato.

pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino (NaCl 136 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, Na₂HPO₄ 9.55 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.4).

Pi: Fosfato inorgánico.

Pck: Fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: Polietilén glicol.

PEP: Fosfoenolpiruvato.

Pfk: Fosfofructokinasa.

Pgi: Fosfoglucoosa isomerasa.

Pyc: Piruvato carboxilasa.

Pyk: Piruvato kinasa.

RNA_m: RNA mensajero.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

[S]: Concentración de sustrato.

18s RNA: RNA ribosomal 18s.

STRE: Elemento de respuesta a estrés (Stress Responsive Element).

TE: Tampón Tris EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8.5; 0.1 mM EDTA).

U: Unidades (mU: Miliunidades).

V_{máx}: Velocidad máxima.

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolil β-D-galactopiranosido.

YP: Medio rico. Y: Extracto de levadura (Yeast extract) P: Peptona.

YPD: Medio rico con glucosa como fuente de carbono.

YNB: Medio mínimo (Yeast Nitrogen Base).

Se ha estudiado la represión catabólica por glucosa de los genes *YIFBP1*, *YIPCK1* e *YIICL1*, que codifican respectivamente la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la fosfoenolpiruvato carboxikinasa y la isocitrato liasa en la levadura dimórfica, no convencional *Yarrowia lipolytica*. La actividad específica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp) resultó ser independiente de la fuente de carbono del medio de cultivo, mientras que las actividades de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa e isocitrato liasa estaban marcadamente disminuídas en la levadura crecida en glucosa. Un análisis de northern mostró que los RNAm correspondientes a sus genes codificantes seguían un patrón consistente con la ausencia de represión catabólica en el caso del gen *YIFBP1* y con una represión normal de los genes *YIPCK1* e *YIICL1*.

Se clonó el gen *YIFBP1* por homología de secuencia de aminoácidos con otras Fbps conocidas y se comprobó que codificaba una fructosa-1,6-bisfosfatasa genuína. La fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Y. lipolytica* presenta unas propiedades cinéticas similares a las de las Fbps de otros organismos: baja K_M para fructosa-1,6-bisfosfato (30 μ M) e inhibición por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato.

La interrupción del gen *YIFBP1* enlenteció el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas, pero no lo suprimió. En el mutante *Ylfbp1* se ha detectado una actividad fosfatásica con una K_M de 2.3 mM para fructosa-1,6-bisfosfato que podría ser la responsable del crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. La interrupción del gen *YIFBP1* causó además una alteración de la morfología colonial en medios con glicerina o etanol como fuentes de carbono.

Un fraccionamiento subcelular de *Y. lipolytica* indica que una fracción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa tiene una localización nuclear.

The control by glucose catabolite repression of the genes *YIFBP1*, *YIPCK1* and *YIICL1*, that encode the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and isocitrate lyase respectively in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*, has been studied. The specific activity of fructose-1,6-bisphosphatase (Fbp) turned out to be independent of the carbon source in the growth medium while the activities of the other two enzymes were markedly decreased in cells grown in glucose.

A northern analysis showed that the genes encoding *YIPCK1* and *YIICL1* were subjected to catabolite repression while *YIFBP1* was not.

The *YIFBP1* gene was cloned using aminoacid homology with other fructose-1,6-bisphosphatases and shown to encode a typical fructose-1,6-bisphosphatase. The enzyme showed kinetic properties similar to those of fructose-1,6-bisphosphatases from other organisms: low K_M value for fructose-1,6-bisphosphate (30 μ M) and inhibition by AMP and fructose-2,6-bisphosphate.

Disruption of the *YIFBP1* gene slowed growth in gluconeogenic carbon sources but did not abolish it. A phosphatase activity that likely allows the *Yifbp1* mutant to grow in gluconeogenic conditions was detected with a K_M value for fructose-1,6-bisphosphate of 2.3 mM.

Mutants lacking fructose-1,6-bisphosphatase showed also an alteration of the morphology of colonies when growing on glycerol or ethanol as carbon source.

A nuclear localization was found for a fraction of fructose-1,6-bisphosphatase.

El progreso de la biología en los últimos ciento cincuenta años se debe en gran parte a la introducción en los laboratorios de investigación de organismos modelo con unas características determinadas como facilidad de cultivo, crecimiento rápido y adecuadas herramientas genéticas para su estudio. Entre esos organismos modelo la levadura ha desempeñado un papel fundamental: desde los trabajos de Pasteur (Pasteur, 1876) pasando por el trabajo seminal de Buchner (Buchner, 1897) hasta la secuenciación de su genoma nuclear como el primero de un organismo eucariótico (Goffeau *et al.*, 1996), *Saccharomyces cerevisiae* - que ha pasado a considerarse la levadura por antonomasia - ha ocupado un lugar destacado en el proscenio biológico. La importancia de *S. cerevisiae* ha ocultado en gran parte la existencia de otras especies de levadura de gran interés, cuyo estudio apenas merecía atención ya que era considerado a menudo como una investigación por analogía, despreciada a veces bajo el calificativo despectivo de *stamp collecting*. Sin embargo desde hace algunos años el estudio de esas otras especies ha cobrado gran interés cuando algunas de ellas se han revelado como agentes implicados en distintos procesos importantes para la actividad humana; procesos que van desde los patológicos como es el caso de ciertas *Candida* o *Cryptococcus*, (Heitman *et al.*, 2006) hasta los biotecnológicos como ocurre con levaduras de los géneros *Kluyveromyces* (van den Berg *et al.*, 1990, Breunig y Steensma, 2003), *Pichia* (Cereghino y Cregg, 2000), *Yarrowia* (Barth y Gaillardin, 1996, Barth y Gaillardin, 1997), *Torulospora* (Almeida y Pais, 1996) o como especialistas en metabolismos particulares como estirpes del género de *Hansenula* [capaces de metabolizar metanol (van Dijken *et al.*, 1976)] o del género *Trichosporon* [capaces de consumir fenol (Godjevargova *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2001)]. Prueba del interés que han generado estos organismos es la publicación de libros dedicados específicamente a estas levaduras distintas de *S. cerevisiae* a las que, por conveniencia, se ha agrupado bajo el epígrafe de *no-convencionales* (Wolf, 1996, Wolf *et al.*, 2003).

Dentro de este gran grupo de levaduras no-convencionales destaca por una serie de características *Yarrowia lipolytica*, levadura que ha recibido varios nombres a lo largo de su estudio: *Candida lipolytica*, *Saccharomycopsis lipolytica*, y finalmente el

actual, *Yarrowia lipolytica*. La denominación *lipolytica*, que no varió en esos avatares taxonómicos, hace referencia a su capacidad de hidrólisis de grasas que, sin duda, es la base de su presencia en productos lácteos como queso, mantequilla u otros. En ellos ejerce acciones beneficiosas, como en la maduración y afinamiento de ciertos quesos, p. ej. Camembert (Roostita y Fleet, 1996) o Cheddar (Ferreira y Viljoen, 2003) o perjudiciales, como el obscurecimiento de otros, p. ej. *queijo da Serra* (Carreira *et al.*, 2001). Pero lo que incrementó el interés por el estudio de este organismo fue su capacidad de utilizar alcanos como fuente de carbono (Tsugawa *et al.*, 1969, Fickers *et al.*, 2005a). En un momento en que el precio del petróleo era muy bajo, y el interés en las proteínas derivadas de organismos unicelulares (*single cell proteins*) para la alimentación era elevado, la capacidad de *Y. lipolytica* de crecer sobre ese producto la hacía muy atractiva para obtener dichas proteínas. Posteriormente la evolución de los precios del crudo ha hecho que esta propiedad haya perdido interés aplicado. Sin embargo, durante los estudios realizados sobre la propiedad anteriormente mencionada se observó también su elevada capacidad de excretar al medio de cultivo compuestos orgánicos de interés, como ácido cítrico o alfa-cetoglutarico lo cual aumentaba el potencial industrial de esta levadura, potencial que sigue siendo considerado interesante. A ello hay que añadir su capacidad de excretar diversas proteínas como lipasas, proteasas o RNAsas, capacidad a la que el advenimiento de las técnicas de manipulación genética ha dado una nueva dimensión al permitir modificarla y controlarla, convirtiendo a esta levadura en un candidato importante para la producción de proteínas heterólogas en competencia con la más usada *P. pastoris* (Madzak *et al.*, 2004).

Otra característica importante de esta levadura es su dimorfismo; según las condiciones del cultivo es capaz de crecer en forma levaduriforme, o de formar pseudo-hifas o hifas (Figura 1). Esta propiedad ha hecho que algunos grupos la utilicen como modelo en determinados estudios de diferenciación (Domínguez *et al.*, 2000, Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002).

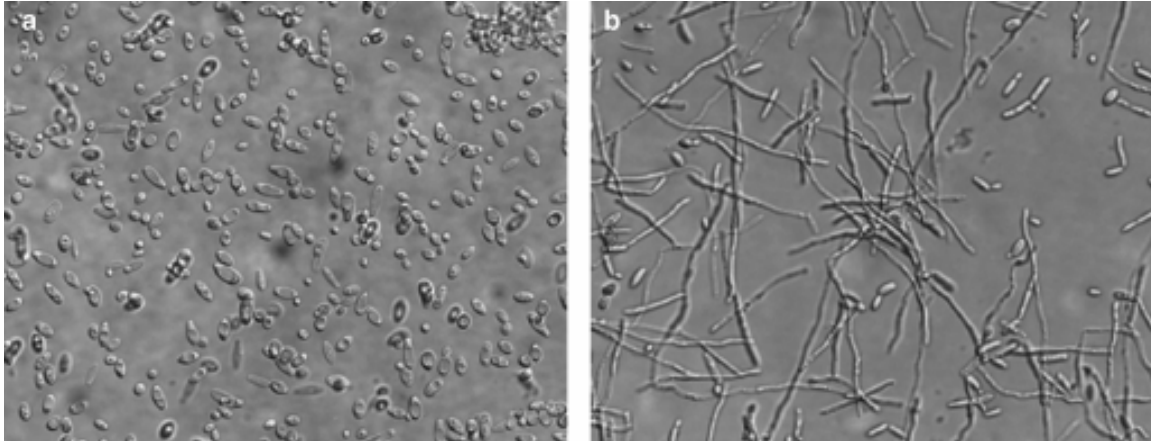


Figura 1. Imagen microscópica de cultivos de *Y. lipolytica*: a) en forma de levadura y b) en forma de hifa. Tomada de Cervantes-Chávez y Ruiz-Herrera (2006).

Actualmente y básicamente gracias al trabajo del consorcio francés Génolevures se conocen con cierto detalle las secuencias genómicas de una serie de levaduras no-convencionales, entre ellas *Y. lipolytica*. (Casaregola *et al.*, 2000). Ese trabajo ha culminando con la reciente apertura al público de una base de datos en la que se encuentran dichas secuencias y algunas anotaciones sobre ese material (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>).

Curiosamente, esa relativa abundancia de información sobre secuencias genómicas contrasta con la escasez de información sobre el funcionamiento y la regulación de vías metabólicas de *Y. lipolytica*.

1.- GLICOLISIS Y GLUCONEOGÉNESIS EN *Yarrowia lipolytica*.

La glicolisis es la columna vertebral del metabolismo glucídico en todos los organismos (Figura 2). *Y. lipolytica* utiliza glucosa de forma oxidativa estricta, es decir, todo el piruvato generado en la glicolisis es oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* que presenta normalmente un metabolismo fermentativo.

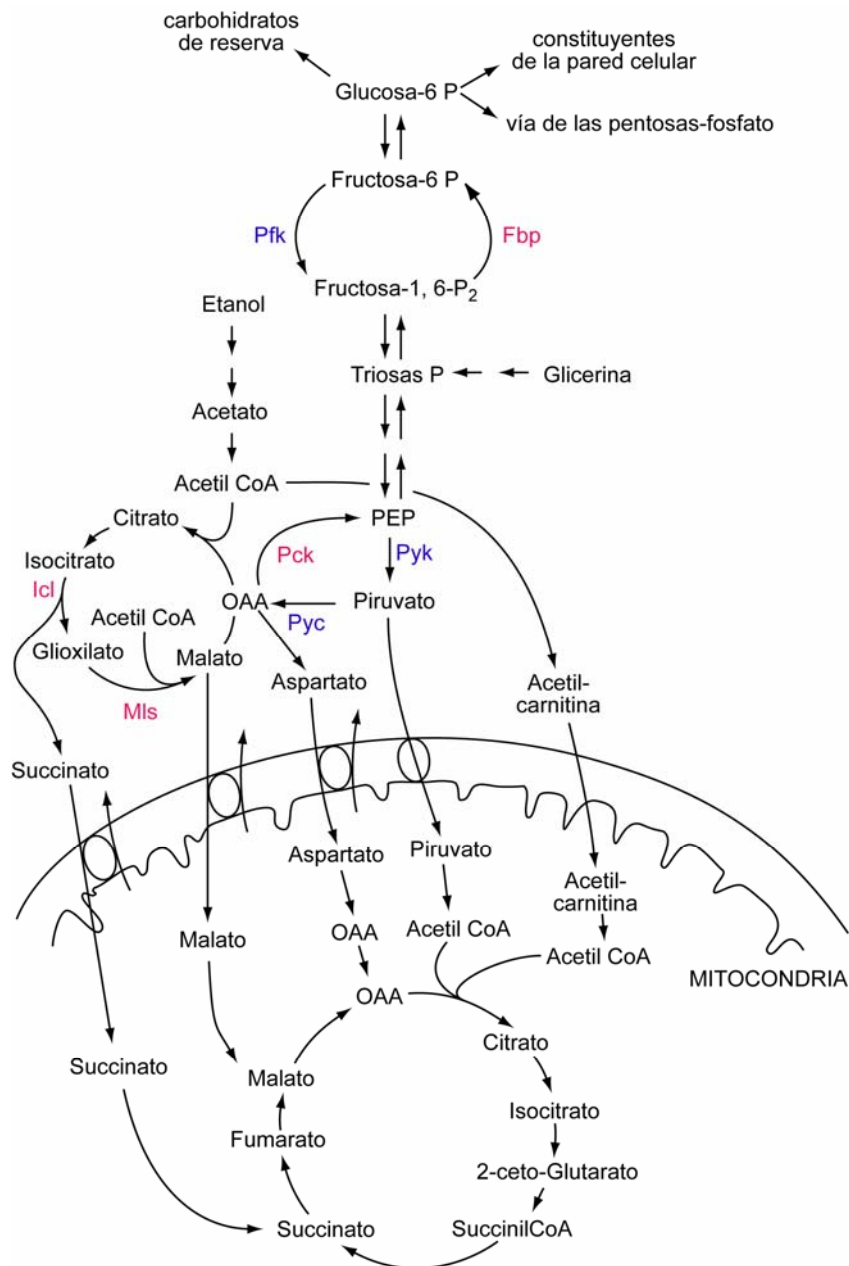


Figura 2. Esquema de la glicólisis y de la gluconeogénesis en levaduras. Las enzimas implicadas en la gluconeogénesis a partir de compuestos de dos y tres carbonos se muestran en color fucsia (Fbp: fructosa-1,6-bisfosfatasa, Pck: fosfoenolpiruvato carboxikinasa, Icl: isocitrato liasa, Mls: malato sintasa). Las enzimas glicolíticas fosfofructokinasa (Pfk) y piruvato kinasa (Pyk), así como la enzima anaplerótica piruvato carboxilasa (Pyc) se muestran en color azul. Se indica la localización mitocondrial del ciclo del ácido cítrico así como la existencia de transportadores para algunos compuestos relacionados con él. OAA = oxalacetato. Adaptada de Gancedo y Gancedo (1997).

Existe poca información acerca de los componentes de la vía glicolítica y su regulación en *Y. lipolytica* como podrá apreciarse en los párrafos siguientes que repasan los datos existentes.

El transporte de glucosa parece estar constituido por un sistema de dos componentes con K_M de 3 y 10 mM respectivamente (Does y Bisson, 1989), sistema que no ha sido caracterizado genéticamente. Una búsqueda de proteínas con estructura similar a la de los transportadores de *S. cerevisiae* no proporciona un gran número de ellas en la base de datos de *Y. lipolytica*.

En cuanto a la fosforilación de la glucosa se han caracterizado dos enzimas, una hexokinasa y una glucokinasa que se encuentran presentes en células crecidas en glucosa (Petit y Gancedo, 1999); sin embargo no se ha estudiado a fondo la regulación de su transcripción por fuentes de carbono. La hexokinasa es fuertemente inhibida por trehalosa-6-fosfato con una K_i de 3 μ M (Blázquez *et al.*, 1993).

La fosfofructokinasa de *Y. lipolytica* presenta unas características reguladoras muy distintas de las de otras enzimas eucarióticas similares, siendo de resaltar la falta de activación por fructosa-2,6-bisfosfato y la escasa sensibilidad a la inhibición por ATP. También es destacable su inhibición por fosfoenolpiruvato (Flores *et al.*, 2005). No existe información sobre la enzimología de la fosfogliceratokinasa aunque se ha aislado el gen que la codifica con vistas a su utilización tecnológica (Le Dall *et al.*, 1996). Curiosamente los autores encontraron que la expresión del gen en lactato era superior a la obtenida en glucosa. Asimismo mostraron que los mutantes requerían prolina. Hasta el momento no se han propuesto explicaciones para estos hallazgos.

La piruvato kinasa muestra, como la fosfofructokinasa, características cinéticas distintas de la enzima de *S. cerevisiae*. Así, la curva de saturación para fosfoenolpiruvato no es sigmoide y la enzima apenas es activada por fructosa-1,6-bisfosfato (Hirai *et al.*, 1975). El gen codificante ha sido clonado y fue uno de los primeros en los que se identificó un intrón en esta levadura (Strick *et al.*, 1992).

La gluconeogénesis es el proceso por el que se sintetizan compuestos glucídicos a partir de precursores no glucídicos como piruvato, lactato, glicerina, ciertos

aminoácidos, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos u otros precursores simples. A partir de la glucosa-6-fosfato formada en la ruta anabólica central, diversas vías biosintéticas dan lugar a la formación de otros monosacáridos como pentosas y derivados, disacáridos como trehalosa, polisacáridos de reserva energética como el glucógeno y componentes de la pared y membrana celulares (Figura 2).

Debido a que la mayor parte de las reacciones catalizadas por las enzimas glicolíticas ocurren muy próximas al equilibrio, con valores de energía libre cercanos a cero, la gluconeogénesis funciona como una glicolisis en reverso excepto en dos pasos que por impedimentos termodinámicos - son reacciones altamente exergónicas, lejos del equilibrio - resultan irreversibles en condiciones fisiológicas. Estas dos reacciones son la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato y la transformación de fosfoenolpiruvato en piruvato, catalizadas en glicolisis por la fosfofructokinasa (Pfk) y por la piruvato kinasa (Pyk) respectivamente. La gluconeogénesis emplea para revertir esos pasos reacciones diferentes, termodinámicamente favorables a la dirección requerida, catalizadas por enzimas gluconeogénicas específicas como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp) y el par piruvato carboxilasa (Pyc) y fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Pck) (Figura 2). Aunque la piruvato carboxilasa es necesaria en gluconeogénesis, no es en sí una enzima específicamente gluconeogénica, ya que también participa en el metabolismo en condiciones de glicolisis en determinadas circunstancias. En microorganismos y plantas, pueden ser necesarias para el funcionamiento de la gluconeogénesis en ciertas condiciones las reacciones catalizadas por las enzimas isocitrato liasa (Icl) y malato sintasa (Mls). Estas dos enzimas participan en el llamado ciclo del glioxilato.

El buen crecimiento de *Y. lipolytica* en substratos no glucídicos, como grasas o alcanos, hace plausible la suposición de que esta levadura posee una elevada capacidad gluconeogénica. A pesar de ello se carece de información sobre las características de las enzimas implicadas en el proceso.

2.- REGULACIÓN DE LAS REACCIONES GLICOLÍTICAS IRREVERSIBLES Y SUS ANTAGÓNICAS GLUCONEOGENICAS EN LEVADURAS.

La existencia de reacciones alternativas catalizadas por enzimas diferentes en ciertas etapas de la glicolisis y de la gluconeogénesis plantea la necesidad de regular la actividad de esas enzimas en función de las condiciones de crecimiento del organismo. Un funcionamiento simultáneo de las correspondientes enzimas produciría ciclos inútiles. Se considera que se produce un ciclo inútil cuando dos reacciones antagónicas funcionan simultáneamente y una de ellas gasta ATP y la contraria hidroliza el éster fosfórico formado.

En organismos superiores pueden darse, en teoría, tres ciclos inútiles como consecuencia del funcionamiento simultáneo de enzimas glicolíticas y gluconeogénicas (Figura 3). En el caso de microorganismos la gluconeogénesis funciona solamente proporcionando glucosa-6-fosfato por lo que sólo se podrían producir dos ciclos inútiles: fosfofructokinasa-fructosa-1,6-bisfosfatasa y piruvato kinasa-(fosfoenolpiruvato carboxikinasa+piruvato carboxilasa).

Dada la importante pérdida energética que supondría para el organismo el funcionamiento de esos ciclos, es de suponer que a lo largo de la evolución hayan aparecido mecanismos para evitarlos, o al menos para disminuir su magnitud. Y eso es lo que sucede: en el caso de las enzimas que participan en las reacciones que podrían dar lugar a ciclos inútiles la cantidad efectiva de proteína activa se encuentra finamente regulada por dos tipos de mecanismos: unos que afectan a la actividad de la proteína existente, regulación alostérica, y otros que afectan a la cantidad de dicha proteína, inactivación y represión catabólicas.

Es de señalar que, a pesar del derroche energético producido por los ciclos inútiles, se pueden obtener levaduras viables con dos ciclos inútiles funcionales (Navas *et al.*, 1993). Sin embargo estas cepas están bastante desfavorecidas en una competición con la cepa silvestre que posee los mecanismos de regulación (Navas y Gancedo, 1996).

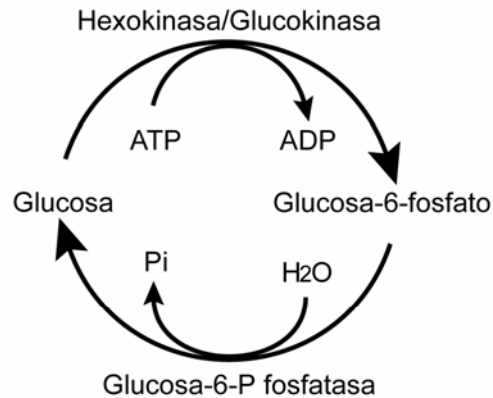
2.1.- Regulación alostérica.

Las enzimas que participan en los pasos enzimáticos susceptibles de generar ciclos inútiles poseen mecanismos alostéricos de control de la actividad, con la posible excepción de la Pck, para la que no se ha descrito hasta el momento ningún mecanismo de este tipo.

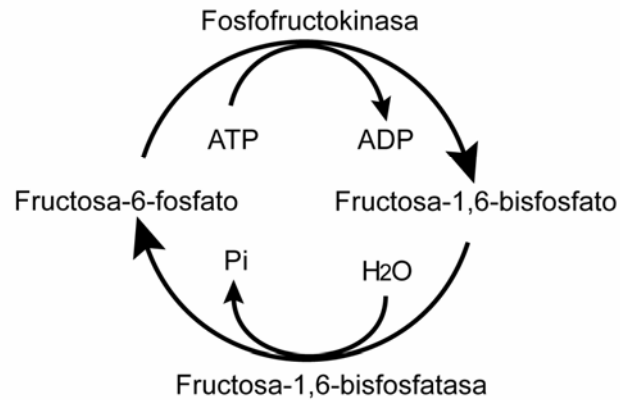
De las dos enzimas glicolíticas, la fosfofructokinasa es un caso singular de múltiple regulación habiendo sido señalada como ejemplo de enzima multimodulada (Sols, 1981). En efecto, su actividad es afectada por más de veinte compuestos, si bien en levadura los efectores más importantes son la fructosa-2,6-bisfosfato, el ATP y el AMP. La fructosa-2,6-bisfosfato es el activador más importante de la Pfk, actuando en el rango micromolar (van Schaftingen *et al.*, 1981). Esta molécula aumenta la afinidad por la fructosa-6-fosfato y elimina la inhibición por ATP (van Schaftingen *et al.*, 1981). El AMP es también un activador (van Schaftingen *et al.*, 1981). En cambio el ATP, que es un sustrato de la enzima, es un potente inhibidor, ligándose a un sitio distinto del centro activo (Viñuela *et al.*, 1963, Laurent *et al.*, 1978). Como mencionamos anteriormente, estos mecanismos de regulación no se encuentran en la enzima de *Y. lipolytica* (Flores *et al.*, 2005).

El mecanismo más importante de control de la piruvato kinasa en *S. cerevisiae* es su activación por fructosa-1,6-bisfosfato (Hess y Haeckel, 1967). Este efector disminuye enormemente la K_M para el fosfoenolpiruvato (de 1.8 mM a 0.09) y en menor medida para el ADP. La fructosa-1,6-bisfosfato cambia la cinética sigmoide para el fosfoenolpiruvato a hiperbólica sin modificar la velocidad máxima que alcanza la enzima. Es de señalar que las enzimas de *C. utilis* (Gancedo *et al.*, 1967) y de *Y. lipolytica* (Hirai *et al.*, 1975) no son controladas por este efector.

CICLO GLUCOSA/GLUCOSA-6-FOSFATO



CICLO FRUCTOSA-6-FOSFATO/FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATO



CICLO PIRUVATO/FOSFOENOLPIRUVATO

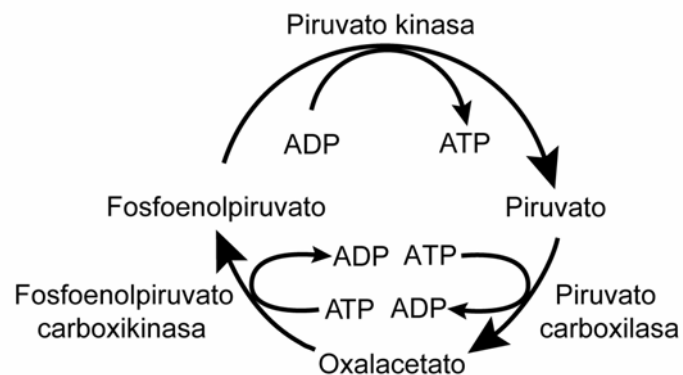


Figura 3. Posibles ciclos inútiles debido al funcionamiento simultáneo de enzimas glicolíticas y gluconeogénicas. El ciclo de la glucosa/glucosa-6-fosfato no tiene lugar en la levadura debido a la carencia de glucosa-6-P fosfatasa. La reacción de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa puede utilizar GTP o ATP; en levadura utiliza exclusivamente ATP.

La enzima gluconeogénica antagónica de la Pfk, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, es afectada en *S. cerevisiae* por efectores que también influyen sobre la Pfk. La fructosa-2,6-bisfosfato es un potente inhibidor de la enzima con una K_i de aproximadamente 5 μM (Gancedo *et al.*, 1982) y el AMP es asimismo un inhibidor con una K_i de 80 μM (Gancedo *et al.*, 1965). Estas dos enzimas se encuentran pues interreguladas por compuestos que activan una de ellas mientras que inhiben la antagónica.

No se han descrito mecanismos de regulación alostérica para las enzimas del ciclo del glioxilato.

2.2.- Inactivación y represión catabólicas.

Superpuestos a la regulación alostérica de las enzimas gluconeogénicas aparecen otros mecanismos reguladores que afectan a la degradación y a la biosíntesis de las mismas: la inactivación catabólica y la represión catabólica respectivamente.

2.2.1.- Inactivación catabólica.

En *S. cerevisiae* la adición de glucosa a un medio de cultivo con fuentes de carbono gluconeogénicas provoca la rápida inactivación de una serie de proteínas implicadas en el metabolismo de las fuentes de carbono no glucídicas, como la fructosa-1,6- bisfosfatasa (Gancedo, 1971), la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Gancedo y Schwerzmann, 1976), la isocitrato liasa (López-Boado *et al.*, 1987) y la málico deshidrogenasa (Neeff *et al.*, 1978). De esta última sólo la isoenzima Mdh2 parece estar sujeta a la inactivación (Minard y McAlister-Henn, 1992).

Para designar este fenómeno se propuso el término *inactivación catabólica* (Holzer, 1976). La inactivación de las proteínas en cuestión se debe a un proceso proteolítico como ha sido demostrado para la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Funayama *et al.*, 1980), la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Muller *et al.*, 1981) y la málico deshidrogenasa (Neeff *et al.*, 1978). El mecanismo que ha sido estudiado con más detalle, aunque todavía no está totalmente aclarado, es el de la inactivación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. La visión actual es la siguiente: la adición de glucosa produce una fosforilación rápida de la enzima que disminuye la actividad de la proteína alrededor de un 50% (Lenz y Holzer, 1980, Mazón *et al.*, 1982). Esta

pérdida de actividad es reversible. Después de la fosforilación se inicia la proteólisis. Ésta puede tener lugar en la vacuola (Hung *et al.*, 2004) o en el proteasoma (Regelmann *et al.*, 2003) dependiendo de las condiciones del cultivo. La vía de señalización del cAMP es necesaria para la degradación vacuolar de Fbp pero no para la degradación en el proteosoma (Hung *et al.*, 2004). No está claro si la degradación de Mdh2 sigue una vía degradativa similar a la de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Minard y McAlister-Henn, 1992, Hung *et al.*, 2004).

Es de señalar que la inactivación catabólica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa no se ha encontrado en *S. pombe* (Vassarotti y Friesen, 1985) y no se ha estudiado en otras levaduras. Asimismo la isocitrato liasa de *K. lactis* no está sometida a inactivación catabólica (López *et al.*, 2004).

2.2.2.- Represión catabólica.

2.2.2.1.- Represión catabólica en *S. cerevisiae*.

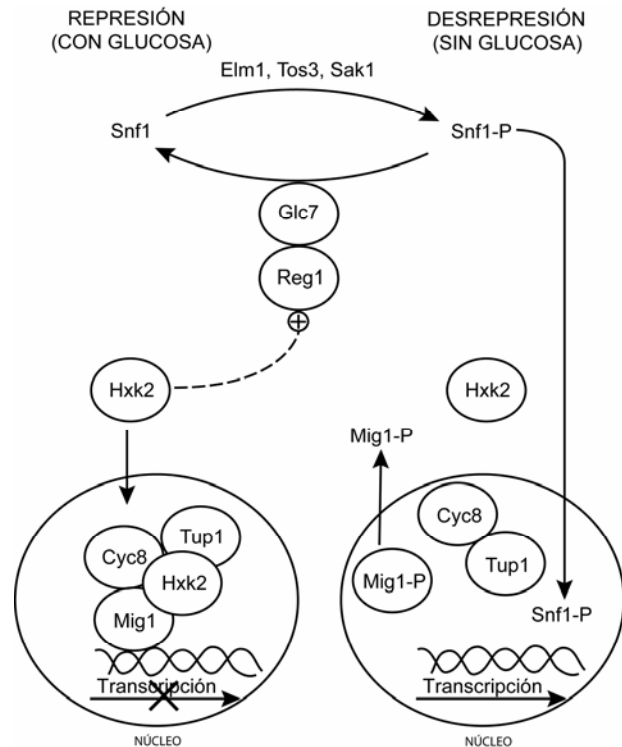
Por represión catabólica se designa el fenómeno de inhibición de la transcripción de una serie de genes cuando la levadura crece en fuentes de carbono glucídicas, principalmente glucosa. Los genes reprimidos codifican enzimas necesarias para el metabolismo de fuentes de carbono alternativas.

En *S. cerevisiae* se han identificado un gran número de genes implicados en este proceso (Gancedo, 1998, Carlson, 1999). A continuación se describen brevemente una serie de elementos que son centrales en la represión de numerosos genes en *S. cerevisiae* (Figura 4).

Una de las proteínas clave es la Ser/Thr proteína kinasa Snf1, que presenta una alta homología con las protein kinasas activadas por AMP de mamíferos (Hardie *et al.*, 1998). Esta proteína puede asociarse a otras proteínas como Snf4, Sip1, Sip2 o Gal83 formando distintos complejos (Celenza y Carlson, 1989, Celenza *et al.*, 1989, Yang *et al.*, 1992, Yang *et al.*, 1994); además puede existir en una forma desfosforilada, en presencia de glucosa- condiciones de represión catabólica- o fosforilada en ausencia del azúcar.

Figura 4.- Esquema simplificado de la represión catabólica en levadura mostrando los elementos centrales del proceso: Snf1, Mig1 y Hxk2. En presencia de glucosa (represión) Snf1 se encuentra en el citoplasma en forma desfosforilada. Mig1 está desfosforilado en el núcleo y unido al DNA de ciertos genes formando complejos represores con las proteínas Cyc8, Tup1 y Hxk2. La Hxk2 favorece la desfosforilación de Snf1 activando el complejo fosfatasa Glc7-Reg1. En ausencia de glucosa (desrepresión) Snf1 se fosforila y pasa al núcleo, donde fosforila a Mig1. Mig1-P no interacciona con Cyc8-Tup1 y sale del núcleo.

Para simplificar no se han representado las proteínas Gal83 y Snf4 que forman un complejo con Snf1. ⊕ activación.



La forma fosforilada se genera por acción de las proteínas quinasas Elm1, Sak1 (Pak1) o Tos3 (Hong *et al.*, 2003, Nath *et al.*, 2003, Sutherland *et al.*, 2003) y como en esta forma fosforila a otras proteínas, se la suele conocer como “forma activa”. En esta forma, el complejo Snf1/Snf4/Gal83 pasa al núcleo, donde podría fosforilar ciertos factores de transcripción como Cat8 y Sip4 y la proteína Mig1. Mig1 es una proteína represora con estructura de dedos de zinc (Lundin *et al.*, 1994) que se une a los promotores de una serie de genes reprimidos por glucosa como *SUC2* (Nehlin y Ronne, 1990), los genes *MAL* (Hu *et al.*, 1995) o el gen *GAL4* (Johnston *et al.*, 1994). Cuando Snf1 fosforila a Mig1 la proteína pierde su capacidad de interaccionar con el DNA y se pueden transcribir los genes reprimidos.

La desfosforilación de Snf1 cuando la glucosa está presente en el medio se lleva a cabo por la proteína fosfatasa Glc7 unida a la proteína reguladora Reg1.

En esta breve visión de algunas proteínas importantes en represión catabólica, es necesario mencionar la hexokinasa II. Esta proteína es la isoenzima que se expresa

durante el crecimiento de la levadura en glucosa y es la que inicia el metabolismo intracelular del azúcar. Las isoenzimas hexokinasa I y la glucokinasa son irrelevantes para el metabolismo de ese azúcar en una cepa silvestre (Herrero *et al.*, 1995). La importancia de la hexokinasa II en represión catabólica radica en que forma parte de la red de señalización implicada en la represión por glucosa de varios genes: algunos genes *HXT* que codifican transportadores de glucosa (Ozcan y Johnston, 1995), *HXK1* y *GLK1* que codifican la hexokinasa I y la glucokinasa respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2001), *SUC2* que codifica la invertasa (Sanz *et al.*, 1996), o los genes *GAL* (Gancedo, 1998).

El papel de la hexokinasa II en la represión de esos genes está aclarándose gracias a los trabajos del grupo de Moreno y Herrero que han mostrado que la Hxk2 puede localizarse en el núcleo en presencia de glucosa donde interacciona con factores transcripcionales como Med8 (de la Cera *et al.*, 2002) o Rgt1 (Palomino *et al.*, 2006). La localización nuclear de la hexokinasa II es dependiente de Mig1 y ambas proteínas generan un complejo represor que actúa sobre genes diana en el núcleo (Ahuatzi *et al.*, 2004).

Debemos hacer notar que la hexokinasa II en su papel de represor transcripcional no participa en la represión catabólica de todos los genes afectados por ésta, p. ej., mutantes *hvk2* presentan una represión normal de los genes *FBP1*, *PCK1*, *ICL1* o *ADH2* (Gancedo, 1998) y casi normal de *GDH2* (Coschigano *et al.*, 1991).

2.2.2.2.- La represión catabólica de los genes codificantes de enzimas gluconeogénicas sigue un esquema común.

Los genes que codifican las enzimas gluconeogénicas en *S. cerevisiae*, *FBP1*, *PCK1*, *ICL1* y *MLS1*, están sometidos a represión catabólica. El mecanismo básico de represión-desrepresión es el mismo para todos ellos y está fundamentado en el juego entre las formas fosforilada y desfosforilada de Snf1 y de Mig1 (Figura 5). En presencia de glucosa Snf1 es desfosforilada por la fosfatasa Glc7 unida a Reg1. Mig1 está también en forma desfosforilada y reprime la transcripción del gen *CAT8* que codifica un activador transcripcional de los genes gluconeogénicos. La consecuente falta de Cat8 trae consigo que otro activador, Sip4, no se sintetice, por tanto los genes gluconeogénicos no se transcriben, están reprimidos (Figura 5).

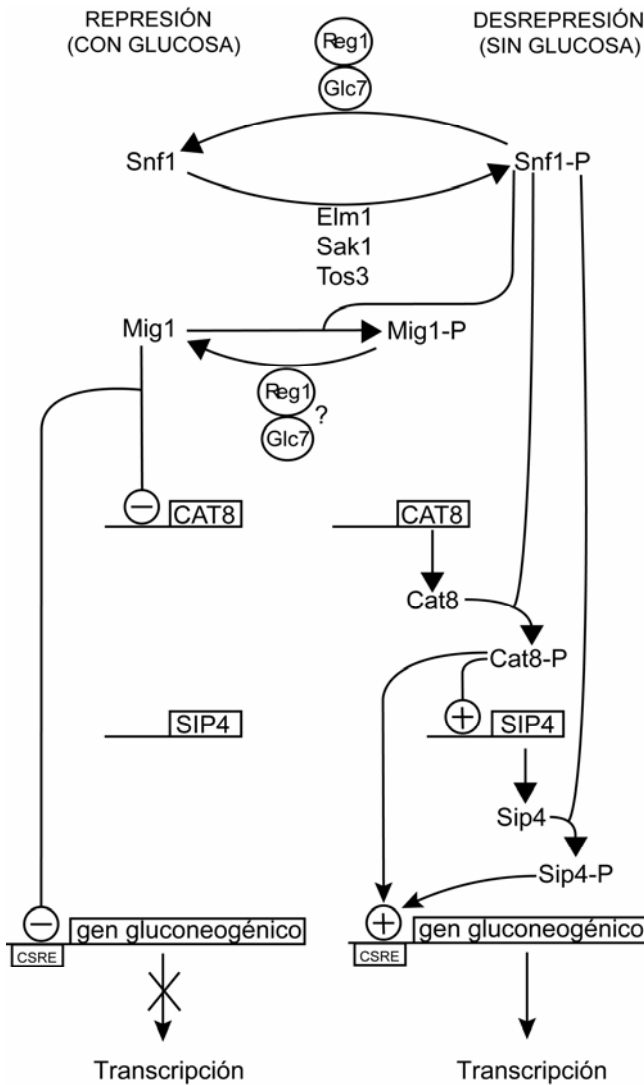


Figura 5. Esquema de la regulación de la transcripción de los genes gluconeogénicos por la fuente de carbono en *S. cerevisiae*. La protein kinase Snf1 está desfosforilada en presencia de glucosa: en estas condiciones Mig1 funciona como represor transcripcional y no se produce el activador Cat8 (represión). En ausencia de glucosa, la fosforilación de Snf1 anula la represión por Mig1 y permite la síntesis de los activadores Cat8 y Sip4. Cat8 y Sip4 son fosforilados por Snf1-P y activan la transcripción de genes que poseen el elemento CSRE en su promotor (desrepresión). Este esquema es aplicable a los genes *FBP1*, *PCK1*, *ICL1* y *MLS1*. ⊖ represión ⊕ activación. Modificado de Schüller (2003).

La ausencia de glucosa provoca la fosforilación de Snf1 y la kinasa activa fosforila a Mig1. Esto provoca la desrepresión de *CAT8* que activa la transcripción de *SIP4*. Las proteínas Cat8 y Sip4 son fosforiladas, por Snf1-P, y activan la transcripción de los genes gluconeogénicos. Parece ser que la contribución de Sip4 a la activación es mucho menos importante que la de Cat8. Ambas actuarían uniéndose a una región del promotor denominada CSRE, *carbon source responsive element*, cuya secuencia consenso es CGGNRNAARGGA (Roth *et al.*, 2004).

En el caso del gen *ICL1* aparece además un mecanismo de inducción por compuestos de 2 carbonos como etanol o acetato (Fernández *et al.*, 1993).

2.2.2.3.- La represión catabólica en levaduras no convencionales.

En contraste con la amplia información sobre los elementos implicados en la represión catabólica de genes en *S. cerevisiae*, el conocimiento sobre este proceso en levaduras no convencionales es sorprendentemente escaso, teniendo en cuenta el interés básico y tecnológico de estos organismos. En alguno de los casos estudiados se encuentran importantes diferencias con *S. cerevisiae* como se menciona a continuación.

En *K. lactis* se han aislado mutantes denominados *fog* (*fermentative and oxidative growth negative*) que no desreprimen los genes que codifican una serie de enzimas. Cuando se aislaron los genes responsables de ese fenotipo se encontró que uno de ellos, *FOG2*, era homólogo a *SNF1*, mientras que el otro, *FOG1*, codificaba una proteína con homología de secuencia con Gal83 que ya hemos mencionado anteriormente (Goffrini *et al.*, 1996). No se han realizado más estudios en profundidad sobre estos genes. En algunas levaduras del género *Candida*, *SNF1* ha resultado ser un gen esencial, aunque tampoco se ha profundizado en el estudio del mismo (Petter *et al.*, 1997, Kanai *et al.*, 1999).

En levaduras no convencionales existen pocos datos sobre el efecto de la hexokinasa en represión catabólica. Mutaciones en el gen *RAG5* que codifica la hexokinasa de *K. lactis* no afectan a la invertasa, pero parecen disminuir la transcripción de *RAG1*, que codifica un transportador de glucosa de baja afinidad (Chen *et al.*, 1992, Prior *et al.*, 1993). Aunque el gen *RAG5* complementa metabólicamente la mutación *hvk2* de *S. cerevisiae*, su expresión no restaura la represión catabólica en esta levadura (Prior *et al.*, 1993).

En *Y. lipolytica* durante un estudio del gen *LIP2*, que codifica una lipasa extracelular, (Fickers *et al.*, 2005b) encontraron que una sobreexpresión del gen *YIHXX1* incrementa la represión de *LIP2*, lo cual les llevó a sugerir un posible papel de YIHxx1 en la represión catabólica (Fickers *et al.*, 2005b). Aunque serán necesarios más estudios para asentar esta conclusión, se puede indicar que la expresión de *YIHXX1* en un mutante *hvk2* de *S. cerevisiae* complementa no sólo la función

metabólica de la enzima, sino también la falta de represión catabólica del gen *SUC2* en el mutante (Petit y Gancedo, 1999).

Cabe señalar que en *K. lactis* *CAT8* es indispensable para la desrepresión de *ICL1* y *MLS1* pero no parece ejercer función sobre la de *FBP1* o *PCK1* (Georis *et al.*, 2000).

Asimismo el fenómeno de inducción por compuestos de 2C del gen *ICL1* mencionado en *S. cerevisiae*, no parece tener un papel importante en el caso del gen correspondiente en *Hansenula polymorpha* (Berardi *et al.*, 2003).

Mención especial merece *Schizosaccharomyces pombe*, en el cual el cAMP tiene un papel central en la represión del gen *fbp1⁺*. Este papel contrasta con uno menos importante en *S. cerevisiae*. Se han aislado en *S. pombe* una serie de mutantes denominados *git* (*glucose insensitive transcription*) en los que el gen *fbp1⁺* no es reprimido por glucosa. El gen responsable en uno de ellos, *git2⁺*, resultó codificar la adenilato ciclasa (Hoffman y Winston, 1991) y se mostró que la adición de cAMP al medio de cultivo restablecía la represión catabólica (Hoffman y Winston, 1991). Es interesante señalar que la vía del cAMP no parece participar en la represión del gen *inv1⁺* que codifica la invertasa (Tanaka *et al.*, 1998).

Dada la falta de información sobre represión catabólica en la mayoría de las levaduras no convencionales nos hemos interesado por el estudio de este fenómeno en *Y. lipolytica*, donde únicamente existe un resultado que establece la represión del gen *ICL1* por glucosa (Barth y Scheuber, 1993) así como datos que apuntan a que la magnitud del proceso parece ser menor que en *S. cerevisiae* (Flores y Gancedo, 2005). Asimismo nos ha impulsado a este estudio el hecho de que el fenotipo de mutantes carentes de piruvato carboxilasa y fosfofructokinasa en esta levadura no es idéntico al de los correspondientes mutantes de *S. cerevisiae* (Flores y Gancedo, 2005, Flores *et al.*, 2005).

En este trabajo hemos iniciado un estudio de la regulación de las enzimas gluconeogénicas en *Y. lipolytica*. Nuestra atención se centró particularmente en la fructosa-1,6-bisfosfatasa debido a las inusuales características observadas en la regulación de la transcripción de su gen codificante.

Los objetivos planteados al comienzo de este trabajo fueron los siguientes:

- 1.- Estudio de la represión catabólica por glucosa de los genes que codifican enzimas gluconeogénicas en la levadura no convencional *Y. lipolytica*.
- 2.- Clonación y estudio del gen codificante de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Y. lipolytica*, enzima terminal de la gluconeogénesis en dicha levadura.
- 3.- Interrupción del gen codificante de la fructosa-1,6-bisfosfatasa en *Y. lipolytica* y estudio del fenotipo de las cepas interrumpidas.
- 4.- Caracterización cinética inicial de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Y. lipolytica*.

1.- MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1.- Cepas de levadura.

Las cepas de levadura usadas en este trabajo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levadura empleadas. En la tabla aparecen, además de las cepas de partida, las que se generaron a lo largo del trabajo cuya obtención se explica de manera detallada en el correspondiente apartado de Resultados.

DENOMINACIÓN	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN o REFERENCIA
<i>Y. lipolytica</i> PO1a	<i>MatA leu2-220 ura3-302</i>	C. Gaillardin, INRA, Grignon, Francia
<i>Y. lipolytica</i> E129	<i>MatA leu2-220 ura3-302 lys11-23 xpr2-232</i>	C. Gaillardin, INRA, Grignon, Francia
<i>Y. lipolytica</i> H222-S4	<i>MatA ura3-302</i>	G. Barth, Universidad de Dresde, Alemania
<i>Y. lipolytica</i> CLIB89 (W29)	<i>MatA</i> (parental de PO1a)	Collection de levures d'interêt biotechnologique (INRA, Grignon, Francia)
<i>Y. lipolytica</i> RJM001	<i>MatA leu2-220 fbp1::URA3</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM002	<i>MatA ura3-302 fbp1::LEU2</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM003	<i>MatA fbp1::URA3</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM004	<i>MatA fbp1::URA3 FBP1</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM005	<i>MatA ura3-302</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM006	<i>Mat A fbp1::URA3 pRJ36</i>	Derivada de PO1a. Este trabajo

DENOMINACIÓN	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN o REFERENCIA
<i>Y. lipolytica</i> RJM007	<i>MatA ura3-302</i> pYIFBP1-lacZ	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>Y. lipolytica</i> RJM008	<i>MatA fbp1::URA3</i> pYIFBP1-lacZ	Derivada de PO1a. Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> CJM197	<i>Mata ade2 leu2 trp1 ura3</i> <i>fbp1::HIS3</i>	(Gamo <i>et al.</i> , 1994)

1.2.- Bacterias.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17 recA1 endA1 gzaA96 thi-1 relA1*]. (Sambrook *et al.*, 1989).
- BL21-CodonPlus(DE3)-RP: *E. coli* B F-*ompT hsdS*(r_B - m_B -) *dcm+* Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU proL Cam*^r] (Stratagene).

1.3.- Genotecas.

La genoteca de DNA genómico de *Y. lipolytica* BQ240 (Nuttley *et al.*, 1993) fue cedida por C. Gaillardin y amplificada por T. Petit y C.L. Flores en el laboratorio de realización de este trabajo.

La genoteca de cDNA de *Y. lipolytica* construida en el plásmido pFL61 fue cedida por Dominique Swennen (INRA, Grignon, Francia).

1.4.- Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen a continuación:

- Anti-YIFbp: anticuerpo policlonal de ratón contra la proteína fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Y. lipolytica* (Este trabajo; ver apartado 10 de Materiales y Métodos).
- Anti-YIGapdh: anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Y. lipolytica* (Cedido por Abdelaziz Soukri y Latifa Fourrat, Universidad Hasan II, Casablanca, Marruecos).

-. Anticuerpos comerciales anti-IgG-HRP de ratón y conejo (Santa Cruz Biotechnology).

2.- MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Las cepas de levadura se cultivaron en medio rico (YP) que contiene 1% extracto de levadura (Pronadisa), 2% peptona (Pronadisa) o en medio mínimo que contiene 0.17% YNB (Difco) y 0.1% glutamato. Las fuentes de carbono empleadas fueron 2% glucosa, 3% glicerina, 3% glicerina + 2% etanol, 2% etanol o 0.4% acetato sódico. En los casos indicados se añadió al medio mínimo casaminoácidos al 0.5% (Difco). Los requerimientos auxotróficos se adicionaron al medio mínimo a una concentración final de 20 µg/ml. A los medios sólidos se les añadió 2% de agar. La temperatura de crecimiento fue 30°C y en el caso de medios líquidos los cultivos se agitaron a 200 r.p.m.

El crecimiento fue seguido midiendo el incremento de la densidad óptica de los cultivos a 660 nm. El número de células/ml se determinó mediante conteo en una cámara cuantaglobulos.

Las cepas de *Escherichia coli* DH5α y BL21-CodonPlus(DE3)-RP se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) tanto sólido como líquido. Los antibióticos se emplearon a una concentración de 50 µg/ml.

3.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

3.1.- Obtención de extractos celulares de levadura.

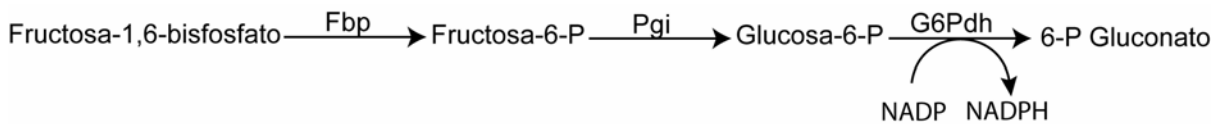
Para llevar a cabo las valoraciones enzimáticas las levaduras fueron recogidas mediante centrifugación a 755 xg y lavadas dos veces con agua desionizada fría. Las células se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización. Los extractos libres de células fueron obtenidos por agitación con bolas de vidrio, en tampón imidazol 20 mM a pH 7 (Blázquez *et al.*, 1993).

3.2.- Ensayos enzimáticos.

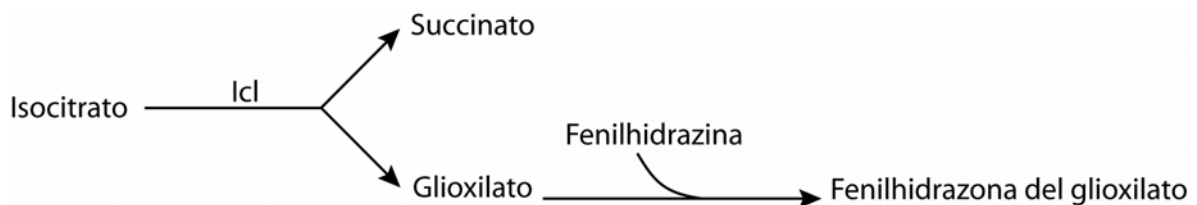
Las actividades enzimáticas fueron medidas espectrofotométricamente en extractos crudos de levadura. En el estudio preliminar de las características cinéticas

enzimáticas de la YIFbp y de la XPasa se emplearon fracciones tratadas con sulfato de protamina al 0.1% y dializadas.

La actividad Fbp se midió espectrofotométricamente a 340 nm utilizando un ensayo acoplado con las enzimas auxiliares fosfoglucoasa isomerasa (Pgi) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6Pdh) (Gancedo y Gancedo, 1971). La mezcla de ensayo contenía imidazol 50 mM pH 7, KCl 0.1 M, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM, NADP 0.2 mM, 0.5 unidades de Pgi, 0.5 unidades de G6Pdh y la preparación enzimática a valorar. Se seguía la reacción hasta la estabilización de la absorbancia; en ese momento se añadía fructosa-1,6-bisfosfato para una concentración final de 0.2 mM y se continuaba la lectura. Las reacciones en la cubeta son las siguientes:

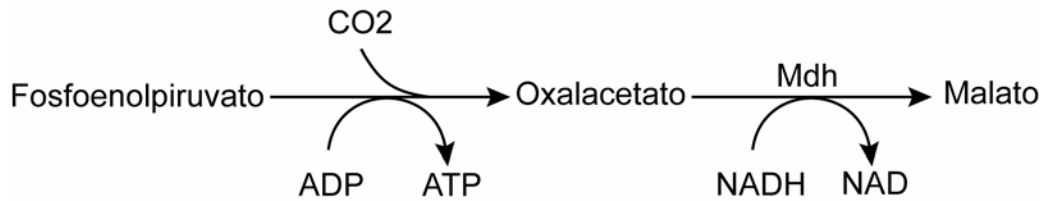


La actividad isocitrato liasa (Icl) se midió espectrofotométricamente a 324 nm (Dixon y Kornberg, 1959). La mezcla del ensayo contenía KH_2PO_4 50 mM pH 7, 0.1 M KCl, 20 mM $MgCl_2$, 6 mM clorhidrato de fenilhidrazina, 5 mM glutatión reducido y la preparación enzimática a valorar. Se mezclaban todos los componentes y una vez que la absorbancia fuese constante se disparaba la reacción con isocitrato para obtener una concentración en la cubeta de 40 mM. En esta reacción se mide el cambio de absorbancia producido por la formación de un compuesto coloreado, la fenilhidrazona del glioxilato. Las reacciones en la cubeta son las siguientes:



La actividad fosfoenolpiruvato carboxikinasa se midió espectrofotométricamente a 340 nm en un ensayo acoplado a la enzima Mdh (Perea y Gancedo, 1982). La

mezcla de ensayo contenía imidazol 50 mM pH 6.6, KHCO_3 20 mM, MnCl_2 2 mM, ADP 0.8 mM, NADH 0.2 mM, KCN 2 mM, málico deshidrogenasa (Mdh) 1 unidad, glutatión reducido 5 mM y la preparación enzimática a valorar. Se mezclaban todos los reactivos y cuando la absorbancia se estabilizaba se añadía fosfoenolpiruvato (PEP) a una concentración final de 2mM. Las reacciones en la cubeta son las siguientes:



La actividad β -galactosidasa (β -D-galactósido galactohidrolasa) se midió según Miller (1972) como se describe en Guarente (1983). Para detectar la actividad β -galactosidasa en colonias de levadura ésta se cultivó a 30°C en placas de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono con 50 mM de tampón fosfato pH 7 y 0.008% de X-gal (a partir de una solución al 2% en N,N-dimetilformamida) hasta que las colonias comenzaron a ser bien visibles. En ese momento se volcó la placa 2 minutos sobre una tapa de vidrio en cuya parte interior se había fijado un papel de filtro empapado en tolueno. Pasado este tiempo se repuso la tapa original y se incubó la placa a 37°C durante 12 horas. Puede dejarse después a 4°C para que se intensifique el color azul.

La cantidad de proteína de los extractos se determinó usando el reactivo comercial BCA (BCA™ protein assay kit, Pierce); como patrón se usó seroalbúmina bovina.

3.3.- Valoración de metabolitos intracelulares.

Se recogieron aproximadamente 200 mg de levadura (peso húmedo) por filtración a través de membranas de nitrocelulosa Millipore AAWPO4700 de 0.8 μm de diámetro de poro, congelando inmediatamente la levadura en nitrógeno líquido (Sáez y Lagunas, 1976). Las pellas congeladas se sumergían 5 minutos en 4 ml de etanol a 85°C con agitación intermitente al vortex durante ese tiempo. Posteriormente se congelaron nuevamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron. El liofilizado se

resuspendió en 1 ml de tampón imidazol 20 mM pH 7 y se centrifugó 10 minutos a 12000 xg en frío (Gamo *et al.*, 1993). En el sobrenadante obtenido se determinaron los metabolitos por métodos enzimáticos (Bergmeyer *et al.*, 1987). Para los cálculos se aceptó que 1 g de levadura (peso húmedo) tiene un volumen intracelular de 0.6 ml (Conway y Downey, 1950).

3.4.- Valoración de fuentes de carbono.

La glucosa y el etanol se valoraron en los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los cultivos empleando el método de la glucosa oxidasa y peroxidasa (Hugget y Nixon, 1957) en el primer caso y el método descrito a continuación (Gancedo, C., datos no publicados) en el segundo. Se midió espectrofotométricamente la velocidad de reacción inicial de la alcohol deshidrogenasa frente a distintas concentraciones de etanol, en el rango de 250 a 750 mM en una mezcla de reacción que contenía 25 mM glicina, 25 mM dicloruro de hidracina, 50mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM NAD, 0.5 mM β-mercaptoetanol y 15 mU de alcohol deshidrogenasa. Con esos resultados se obtuvo una recta patrón de velocidad frente a concentración de etanol. A continuación usando una mezcla idéntica se ensayaron las muestras correspondientes, determinando la concentración de etanol en ellas con la recta patrón.

4.- MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

4.1.- Técnicas de manipulación del DNA.

Las técnicas básicas de manipulación de DNA como ligaciones, digestiones enzimáticas, etc; se llevaron a cabo según protocolos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989).

La obtención de DNA genómico de levadura se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Hoffman y Winston (1987).

La extracción de DNA de geles de agarosa se llevó a cabo usando el kit comercial QIAquick Gel Extration (QIAGEN).

4.2.- Reacciones de PCR.

La amplificación de fragmentos de DNA se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A lo largo del trabajo se utilizaron diversos oligonucleotidos con diferentes objetivos. En la Tabla 2 aparecen reseñados por orden creciente de numeración para facilitar su consulta cuando aparezcan en el texto.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados.

DENOMINACIÓN	SECUENCIA
259	5'-CGATAGCGCTATCGAACGTACC-3'
260	5'-CGCGCCTGCGGGTTGGTCTA-3'
1147	5'-GCGGCCGCATAATGGTACAGTGC-3'
1148	5'-GGATCCTGCAGAATGAACCG-3'
1217	5'-CAGTGACGACTGAGCCACGAATGGG-3'
1218	5'-GCACCCAAACCTGCGAAACATGCG-3'
1371	5'-CAGTGCCGAGGGCCAATTGGT-3'
1372	5'-GAGTCGTACTIONCAAAGGCGGC-3'
1620	5'-GCCATGGTTCGGAACCGTCCG-3'
2039	5'-GGAAGCTTCAATCTCGCCCTTGGAGC-3
4192	5'-GACCTTACCGGAGGCCTTGATGG-3'
4193	5'-CCATGAAGGCCTCCGGTAAGGTC-3'
4194	5'-GCAGGCCTAAGCTGTCCCTGG-3'
4914	5'-TGAACCCGAGTATATCTCAT-3'
4915	5'-CGACACCGAGACCTACTCCG-3'
5933	5'-GATGTCGGGGATATAGGCGCCAGC-3'
6159	5'-CCTGCTCGCTTCGCTACTTGG-3
6442	5'-ACAGATCATCAAGAAAGTAA-3'
8067	5'-TC(CT)GAGGAGCAGGAGGA(CT)-3'
8068	5'-(AG)CC(AG)CC(AG)GCCTGCTCCAT-3'
8257	5'-CACCTACGCGTCCCTCGACCCCG-3'

8258	5'-GTCCAGCGCCTCTATCAAACCTCG-3'
8259	5'-AACGTCAAGAACTACTTCA-3'
8260	5'-AACTTGAGGGCCCTGAAGTAG-3'
8289	5'-AAGACCGGCCGATCTCCCAA-3'
8290	5'-GTAGGCTCGGGCACAGAC-3'
8261	5'-GCGTAAAGGATGGGGAAAGAG -3'
8627	5'-AATGGAAGCCAACCCCGAAGTCC-3'
8628	5'-CTGGTTCTCATTTTCAGAGGGTACT-3
9229	5'-GGCATCACAGACCTGTTATT-3'
9230	5'-CCTTAACGAGGAACAATTGGAGG-3'

4.3.- Transformaciones celulares.

4.3.1.- Transformación de bacterias.

La obtención de bacterias competentes se llevó a cabo según Hanahan (1983).

Para transformar bacterias se empleó el método descrito por Hanahan (1985).

4.3.2.- Transformación de levaduras.

La preparación de células de levadura competentes así como la transformación de las mismas se llevó a cabo en el caso de *S. cerevisiae* según Ito *et al* (1983) y, en el caso de *Y. lipolytica*, usando una modificación del método del acetato de litio descrito por Barth y Gaillardin (1996). Dicha modificación procede del laboratorio de C. Gaillardin (INRA, Grignon, Francia), y se describe a continuación:

4.3.2.1.- Obtención de células competentes de *Y. lipolytica*:

Se refresca la cepa correspondiente en una placa de YPD a partir de una reserva congelada a -70°C y se incuba 20 horas a 28°C. Se inoculan con abundante biomasa 5 ml de YPD a partir de la placa anterior y se incuban a 28°C en agitación a aproximadamente 150 r.p.m. A las 8-9 horas se cuenta el número de células en una cámara cuentaglóbulos y se inoculan dos matraces con 20 ml de YPD de forma que queden aproximadamente a $2,5 \times 10^4$ células/ml y 9×10^4 células/ml respectivamente. Estos cultivos se agitan como el anterior. Al cabo de unas 16

horas de incubación se cuenta nuevamente el número de células; se considera que los cultivos están listos para trabajar con ellos si la densidad celular está entre 9×10^7 y 1×10^8 células/ml. El cultivo se centrifuga 2 minutos a 755xg y se lava el precipitado dos veces con 4 ml de TE. Se resuspende suavemente el precipitado en acetato de litio 0.1M pH 6 para obtener una concentración de 5×10^7 células/ml y se agita a 60 r.p.m. a 28°C durante una hora. Se centrifuga nuevamente 2 minutos a 755xg y el precipitado se resuspende un décimo del volumen anterior empleado de acetato de litio 0.1M pH 6. En este momento las células ya son competentes y pueden ser utilizadas inmediatamente para su transformación. Se pueden conservar congeladas a -70°C añadiendo un volumen de glicerina al 50% y dividiéndose en porciones del volumen deseado (en este caso 200 µl).

4.3.2.2.- Transformación de células competentes de *Y. lipolytica*:

Se prepara en un tubo 5µl de DNA carrier desnaturalizado (5mg/ml, tamaño 250-500 pb) y 250-500 ng del DNA transformante. Las células se pasan a dicho tubo mezclando suavemente con ellas el carrier y el DNA transformante. Se incuba la mezcla 15 minutos a 28°C sin agitación y a continuación se añaden 700 µl de PEG 4000 al 40% en 0.1M de acetato de litio pH 6 mezclando suavemente con la pipeta hasta que la mezcla sea homogénea. A continuación se agita una hora a 250 r.p.m. a 28°C y después se incuba 10 minutos a 39°C (choque térmico). Seguidamente se mezcla con 1,2 ml de 0.1M acetato de litio pH 6. Se plaquean 200 µl y el resto de la mezcla se centrifuga un minuto a 755xg, se elimina la mayor parte del sobrenadante y el resto se extiende en placas que se incuban a 28°C.

Si se parte de porciones de células competentes congeladas, éstas se descongelan 1 minuto a 28°C y se centrifugan 2 minutos a temperatura ambiente a 2000 r.p.m. en una centrifuga Eppendorf de mesa. El precipitado se resuspende en 100 µl de acetato de litio 0.1M pH 6 y se continúa la transformación como se ha descrito anteriormente.

4.4.- Plásmidos.

A lo largo de este trabajo se han construido una serie de plásmidos que se presentan en un listado a continuación descritos de manera breve como referencia rápida de los mismos. Una descripción detallada de los más relevantes se presentará posteriormente en los apartados correspondientes.

- pGEMTeasy (pGEMTe): es un plásmido comercial (Promega) para *E. coli* linearizado con *EcoRV* con extremos protuberantes 3'T que permiten la clonación de productos de PCR obtenidos con la Taq-polimerasa.
- pKS (pBluescript II KS): plásmido comercial (Stratagene) para *E. coli* (Alting-Mees y Short, 1989).
- pGEX4T2: plásmido comercial para *E. coli* (GE Health Care) que permite el clonaje de fragmentos de DNA en fase con la región codificante de la glutation-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*.
- pCL49: plásmido episomal de *Y. lipolytica* que contiene el promotor del gen *YITEF1* y el terminador del gen *YIXPR2* con un sitio de clonaje *NotI* entre ellos y el marcador *URA3* (Flores y Gancedo, 2005).
- pDB20: plásmido multicopia para *S. cerevisiae* que contiene el promotor y el terminador del gen *ScADH1* con sitios de clonaje *NotI* y *HindIII* entre ellos y el marcador *URA3* (Becker *et al.*, 1991).
- Ylp352: plásmido integrativo para *S. cerevisiae* que lleva el marcador *ScURA3* (Hill *et al.*, 1986).
- pICL352AAH5: plásmido integrativo para *S. cerevisiae* derivado de Ylp352 eliminando los sitios de restricción para *HindIII* y *SphI* del poliengarce e introduciendo el promotor y el terminador de *ScADH1* (Gancedo, C y Flores, C.L., sin publicar).
- pINA156: plásmido para *E. coli* que contiene el marcador *YIURA3* (Richard *et al.*, 2001).
- pINA62s: plásmido para *E. coli* que contiene un fragmento de 5200 pb que contiene las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YILEU2* (Gaillardin y Ribet, 1987).

- pRG6: plásmido multicopia para *S. cerevisiae* que contiene el gen *ScFBP1* bajo el control de su propio promotor (de la Guerra *et al.*, 1988).
- pAN10: plásmido multicopia para *S. cerevisiae* que contiene las regiones promotora y terminadora del gen *ScADH1* y un sitio *HindIII* de clonaje entre ellos (Navas *et al.*, 1993).
- pINA354B: plásmido integrativo para *Y. lipolytica* que contiene *LEU2* como marcador y la región codificante del gen *lacZ* de *E. coli* de forma que permite expresar dicho gen bajo el control de promotores de genes de *Y. lipolytica* (Blanchin-Roland *et al.*, 1994).
- pINA444: plásmido episomal para *Y. lipolytica* que contiene el marcador *YIURA3* (Mamoun *et al.*, 1996).
- pINA300'HA y pINA300'cmcy: plásmidos integrativos para *Y. lipolytica* que permiten la fusión de un gen determinado a las secuencias que codifican epítomos de HA (Boisrame *et al.*, 2002) y cmcy (Barnay-Verdier *et al.*, 2004) respectivamente, llevando *URA3* como marcador. Cedidos por A. Boisrame, INRA, Grignon, Francia).
- pRJ7: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un fragmento de 1466 pb del gen *YIICL1* obtenido mediante reacción de PCR empleando DNA genómico de YIPo1a como molde y los oligonucleótidos 8257 y 8258. (Este trabajo).
- pRJ8: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un fragmento de 230 pb del gen *YIPCK1*. El fragmento se obtuvo mediante reacción de PCR empleando DNA genómico de YIPo1a como molde y los oligonucleótidos 8289 y 8290. (Este trabajo).
- pRJ30: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de la región codificante del gen *YIFBP1* obtenida mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de YIPo1a con los oligonucleótidos 8627 y 8628 (Este trabajo).
- pRJ29: plásmido para *E. coli* derivado de pGEX4T2 que contiene la región codificante del gen *YIFBP1* en fase con GST. (Este trabajo).
- pRJ33: plásmido episomal para *Y. lipolytica* derivado de pCL49 que contiene la región codificante del gen *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *YITEF1*.

- pRJ34: plásmido episomal para *S. cerevisiae* derivado del plásmido pDB20 con la región codificante del gen *YIFBP1* bajo el control del promotor de *ScADH1* (Este trabajo).
- pRJ35: plásmido integrativo para *S. cerevisiae* derivado del plásmido pICL352AAH5 con la región codificante del gen *YIFBP1* entre el promotor y el terminador del gen *ScADH1*. (Este trabajo).
- pRJ36: plásmido episomal para *Y. lipolytica* que contiene el marcador *YILEU2* y la región codificante del gen *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *YITEF1*. (Este trabajo).
- pRJ37: plásmido episomal para *Y. lipolytica* que contiene el marcador *YILEU2* y la región codificante del gen *YIFBP1* orientada en dirección opuesta a la del promotor del gen *YITEF1*. (Este trabajo).
- pRJ38A: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un inserto correspondiente a las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1* interrumpida en *Bam*HI con el gen *YIURA3* (Este trabajo).
- pRJ39B: plásmido para *E. coli* portador de una interrupción del gen *YIFBP1* con el gen *YILEU2*. Se encuentra descrito en detalle en el apartado 6. (Este trabajo).
- pRJ40: plásmido episomal para *Y. lipolytica* similar a pCL49 pero con el marcador *YILEU2* (Este trabajo).
- pRJ41: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1*. Se describe en detalle en la sección 7. (Este trabajo).
- pRJ42: plásmido episomal para *Y. lipolytica* derivado de pINA444 con las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1* (Este trabajo).
- pRJ43: plásmido integrativo para *Y. lipolytica* derivado de pINA354B que contiene la región promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1* (Este trabajo).
- pRJ44: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un fragmento de 1300 pb correspondientes a la región promotora de *YIFBP1* obtenido mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de Po1a con los oligonucleótidos 1147 y 1148 que introducen respectivamente las secuencias de corte para las enzimas de restricción *Not*I y *Bam*HI. (Este trabajo).

- pRJ44B: plásmido integrativo para *Y. lipolytica* obtenido por ligación de un fragmento de 1300 pb correspondiente al promotor del gen *YIFBP1* obtenido por digestión de pRJ44 con *NotI* y *BamHI* al fragmento de 7700 pb obtenido por digestión del plásmido pINA354B con las mismas enzimas. (Este trabajo).
- pRJ45: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un fragmento de 999 pb de la región codificante del gen *YIFBP1* al que se le ha introducido un sitio *HindIII* en su extremo 3' y obtenido por reacción de PCR sobre DNA genómico de YIPo1a con los oligonucleótidos 8627 y 2039. (Este trabajo).
- pRJ46: plásmido integrativo para *Y. lipolytica* derivado de pINA300'HA que contiene entre *StuI* y *HindIII* 940 pb de la región codificante del gen *YIFBP1* obtenida por digestión de pRJ45 con *EcoRV* y *HindIII*. (Este trabajo).
- pRJ47: plásmido integrativo para *Y. lipolytica* derivado de pINA300'cmc que contiene entre *StuI* y *HindIII* 940 pb de la región codificante del gen *YIFBP1* obtenida por digestión de pRJ45 con *EcoRV* y *HindIII*. (Este trabajo).
- pRJ50: plásmido para *E. coli* resultante de la inserción en pGEMTe de un fragmento de 3254 pb correspondientes a las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1* obtenidas mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de YIPO1a con los oligonucleótidos 1217 y 1218. (Este trabajo).
- pRJ51: plásmido episomal para *Y. lipolytica* con el marcador *URA3* y con la región codificante del gen *YIFBP1* orientada en dirección opuesta al promotor de *YITEF1* (Este trabajo).

4.5.- Análisis de Southern.

Se digirieron 10 µg de DNA genómico de levadura con las enzimas de restricción indicadas en cada caso. Posteriormente se siguió el procedimiento descrito por Southern (1975).

4.6.- Análisis de northern.

Las muestras de levadura fueron recogidas por filtración rápida, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas hasta su uso a -20°C (Belinchón *et al.*, 2004). El RNA total fue extraído según Chomczynski y Sacchi (1987), usando el reactivo

TRizol LS (Invitrogen), separado mediante electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído al 1.5% y transferido a una membrana Nytran (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania) a la que se fijó por tratamiento en ambas caras en un UV Stratalinker™ 2400 (Stratagene). Las sondas se marcaron con ^{32}P usando Rediprime II Random Prime labeling system (GE Health Care).

La cuantificación de las señales obtenidas se hizo en un Instantimager (Packard).

4.7.- Sondas empleadas.

Las sondas utilizadas en los análisis de northern o Southern se describen a continuación:

- *YIFBP1*: fragmento de 1017 pb obtenido por digestión del plásmido pRJ30 con *NotI*.

- *YIICL1*: fragmento de 1466 pb obtenido por digestión del plásmido pRJ7 con *NotI*.

- *YIPCK1*: fragmento de 230 pb de *YIPCK1* obtenido por digestión del plásmido pRJ8 con *NotI*.

- 18s RNA: Fragmento de 840 pb del gen que codifica el RNA ribosomal 18s de *Y. lipolytica* obtenido mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de la cepa PO1a con los oligonucleótidos 9229 y 9230. Esta sonda se usó como control de carga (Belinchón *et al.*, 2004).

- *YILEU2*: Fragmento de 2100 pb de *YILEU2* obtenido por digestión de pINA62s con *NcoI*.

5.- EXPRESIÓN DE *YIFBP1* EN *S. cerevisiae*.

Para expresar la región codificante del gen *YIFBP1* en *S. cerevisiae* se construyeron dos plásmidos, uno episomal (pRJ34) y otro integrativo (pRJ35). Ambos expresan dicho gen bajo el control del promotor del gen *ADH1* de *S. cerevisiae*.

El plásmido episomal pRJ34 se obtuvo por ligación del fragmento *NotI-NotI* de pRJ30 (1017 pb) con el plásmido pDB20 previamente linearizado con *NotI*. El plásmido pRJ35 se construyó digiriendo pICL352AAH5 con *HindIII* y ligando un

fragmento de 1017 pb correspondiente al gen *YIFBP1* obtenido por digestión de pRJ30 con *NotI* entre las regiones promotora y terminadora del gen *ScADH1*.

La cepa CJM197, mutante *fbp1* de *S. cerevisiae*, se transformó con el plásmido pRJ34 o con el pRJ35, así como con los plásmidos controles pRG6 [plásmido multicopia que reintroduce *ScFBP1* (de la Guerra *et al.*, 1988)] o pAN10 (Navas *et al.*, 1993).

6.- INTERRUPCIÓN DEL GEN *YIFBP1*.

Para interrumpir el gen *YIFBP1* en el genoma de *Y. lipolytica* se construyeron varios casetes de interrupción:

6.1.- Construcciones iniciales (Figura 6): La región codificante del gen *YIFBP1* presenta dos sitios de corte para la enzima de restricción *Bam*HI, situados a 376 y 451 pb respectivamente del ATG inicial. El plásmido pRJ30 (ver apartado 4.5.) que contiene la región codificante del gen, fue digerido con *Bam*HI, y el fragmento de 3957 pb resultante, tras ser romado y desfosforilado, se ligó separadamente a dos fragmentos de DNA: fragmento romado de 1700 pb correspondiente a *YIURA3*, obtenido por digestión con *Sal*I del plásmido pINA156 (ver apartado 4.5), y a un fragmento también romado de 2100 pb correspondiente a *YILEU2*, obtenido por digestión del plásmido pINA62s (ver apartado 4.5) con *Nco*I. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con *Not*I, obteniéndose los casetes de interrupción de 2642 y 3242 pb respectivamente que se utilizaron en la interrupción cromosómica de *YIFBP1*.

6.2.- Desplazamiento de la interrupción hacia 5' (Figura 7): La región codificante de *YIFBP1* presenta un sitio de corte para *Bg*II en la posición 254. El plásmido pRJ30 fue linearizado con *Bg*II y el fragmento de 4032 pb resultante, tras ser romado y desfosforilado, se ligó a un fragmento romado de 1700 pb correspondiente a *YIURA3* obtenido por digestión del plásmido pINA156 con *Sal*I. El plásmido resultante se digirió con *Not*I para obtener el casete de interrupción.

6.3.- Desplazamiento de la interrupción hacia 3' (Figura 8): La región codificante de *YIFBP1* contiene dos sitios de corte para la enzima *Nco*I situados en las posiciones 752 y 860 respectivamente. Para introducir el fragmento de 2100 pb

correspondiente a *YILEU2*, obtenido por digestión del plásmido pINA62s (ver apartado 4.5) con *NcoI* se procedió como sigue. El plásmido pRJ30 fue digerido con *NotI* y el fragmento de 1017 pb resultante fue ligado al plásmido pKS (K-X) (pKS al que se le había quitado los sitios de restricción del poliengarce entre *XbaI* y *KpnI*) digerido con *NotI* y desfosforilado. El plásmido obtenido se digirió con *NcoI* y a él se ligó el fragmento de *YILEU2* mencionado. El plásmido resultante fue digerido con *NotI* para obtener el nuevo casete de interrupción.

6.4.- Ampliación de las zonas de homología flanqueantes: Con el fin de obtener un casete de interrupción con amplias zonas flanqueantes con homología con el gen *YIFBP1* se obtuvo, mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de YIPo1a con los oligonucleótidos 1217 y 1218 (ver Tabla 2), un fragmento de 3254 pb que fue ligado a pGEMTe obteniéndose el plásmido pRJ50.

6.4.1.-Interrupción del gen *YIFBP1* con el gen *YIURA3* (Figura 9): pRJ50 fue digerido con *BamHI* (presente en las posiciones 376 y 451 de la ORF), romado y ligado a un fragmento romado de 1700 pb obtenido por digestión del plásmido pINA156 con *SalI*. Así se obtuvo el plásmido pRJ38A. Para la interrupción se utilizó el fragmento de 5221pb obtenido por digestión de pRJ38A con *NotI*. La cepa obtenida se denominó RJM001.

6.4.2.- Interrupción del gen *YIFBP1* con el gen *YILEU2* (Figura 10): La reacción de PCR sobre DNA genómico de YIPo1a con los oligonucleótidos 1217 y 1620 que contiene un sitio de restricción para *NcoI* (ver Tabla 2), permitió aislar un producto de 1108 pb correspondiente a la región promotora del gen *YIFBP1*. Este fragmento fue ligado a pGEMTe y el plásmido resultante digerido con *NcoI*. El fragmento de 1108 pb obtenido se ligó al fragmento de DNA obtenido por digestión del plásmido pRJ50 con *NcoI*. El plásmido resultante fue digerido con *NotI* y el inserto de 2271 pb obtenido se ligó al plásmido pKS (K-X) linearizado con *NotI*. El plásmido resultante fue digerido con *NcoI* y ligado a un fragmento de 2100 pb correspondiente a *YILEU2* obtenido por digestión del plásmido pINA62s con *NcoI* para dar el plásmido pRJ39B. De la digestión de pRJ39B con *NotI* se obtuvo un fragmento de DNA de 4370 pb que se utilizó para interrumpir el gen *YIFBP1*. La cepa obtenida se denominó RJM002.

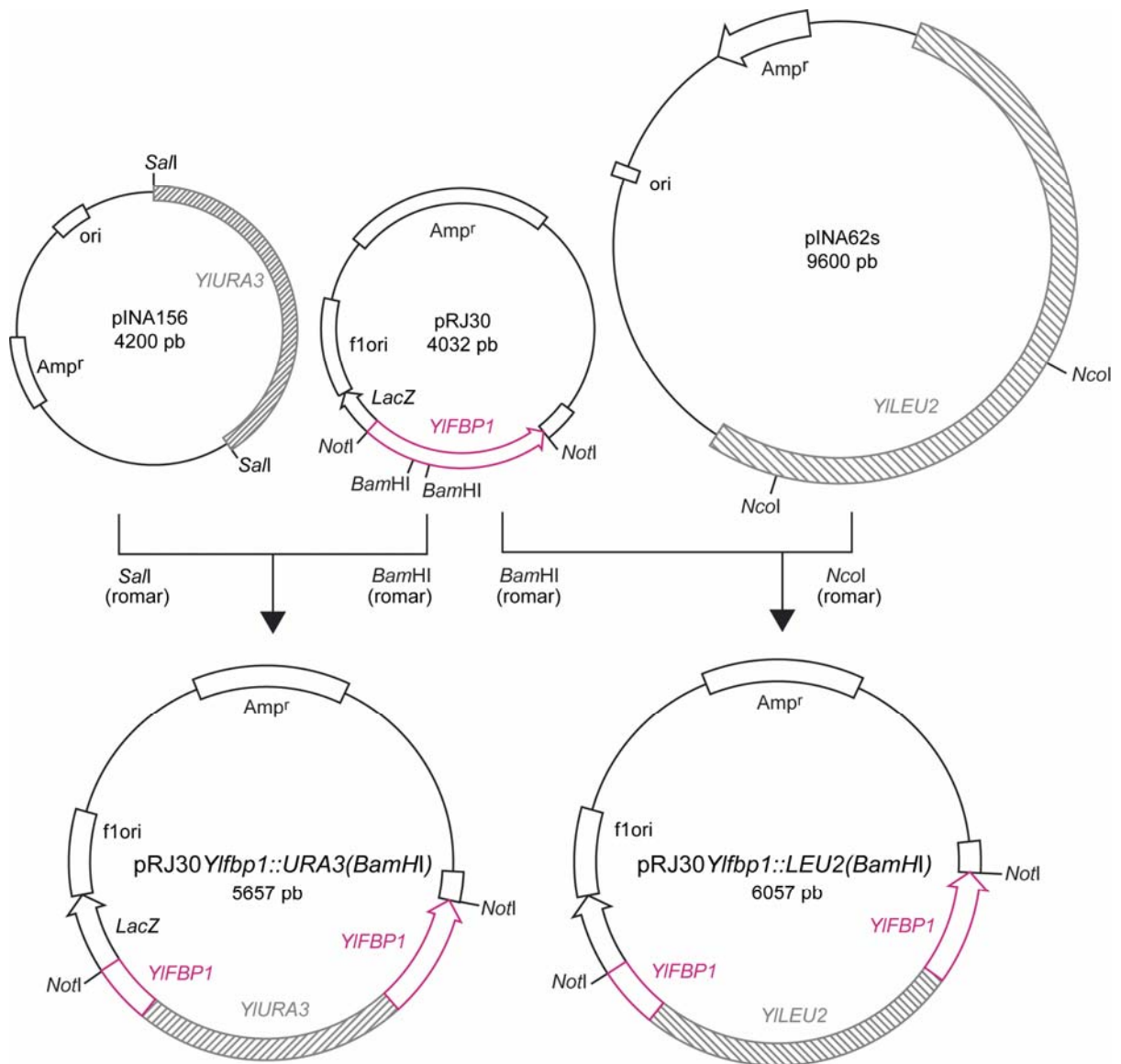


Figura 6. Construcciones iniciales para la interrupción del gen *YIFBP1*. Se construyeron dos casetes de interrupción del gen *YIFBP1* con dos marcadores distintos, cuya obtención se encuentra descrita con detalle en el texto.

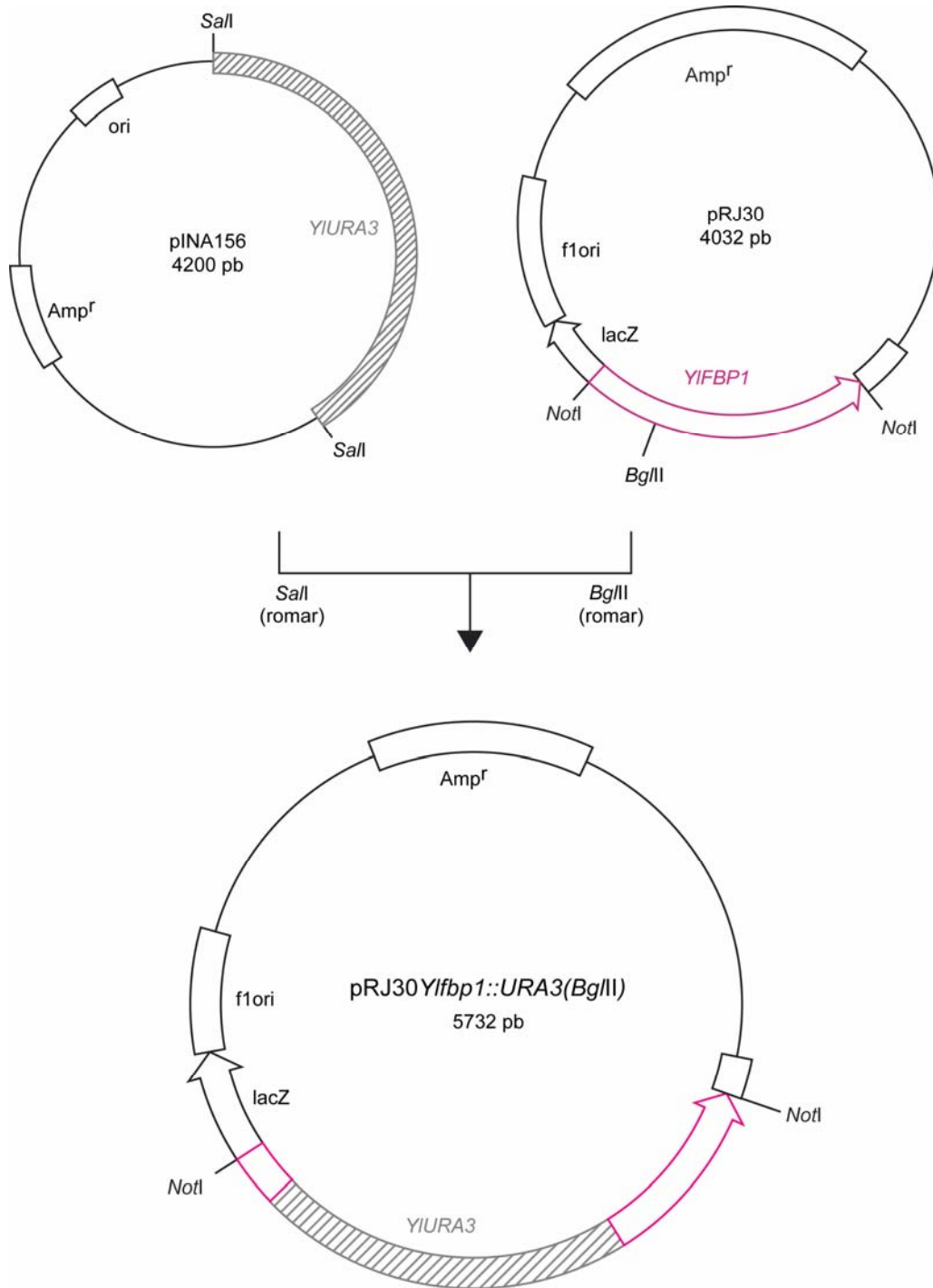


Figura 7. Desplazamiento de la interrupción de YIFBP1 hacia 5´. Casete de interrupción en el que se insertó un fragmento del gen YIURA3 en la posición Bg/II de la región codificante del gen YIFBP1. Ver detalles en el texto.

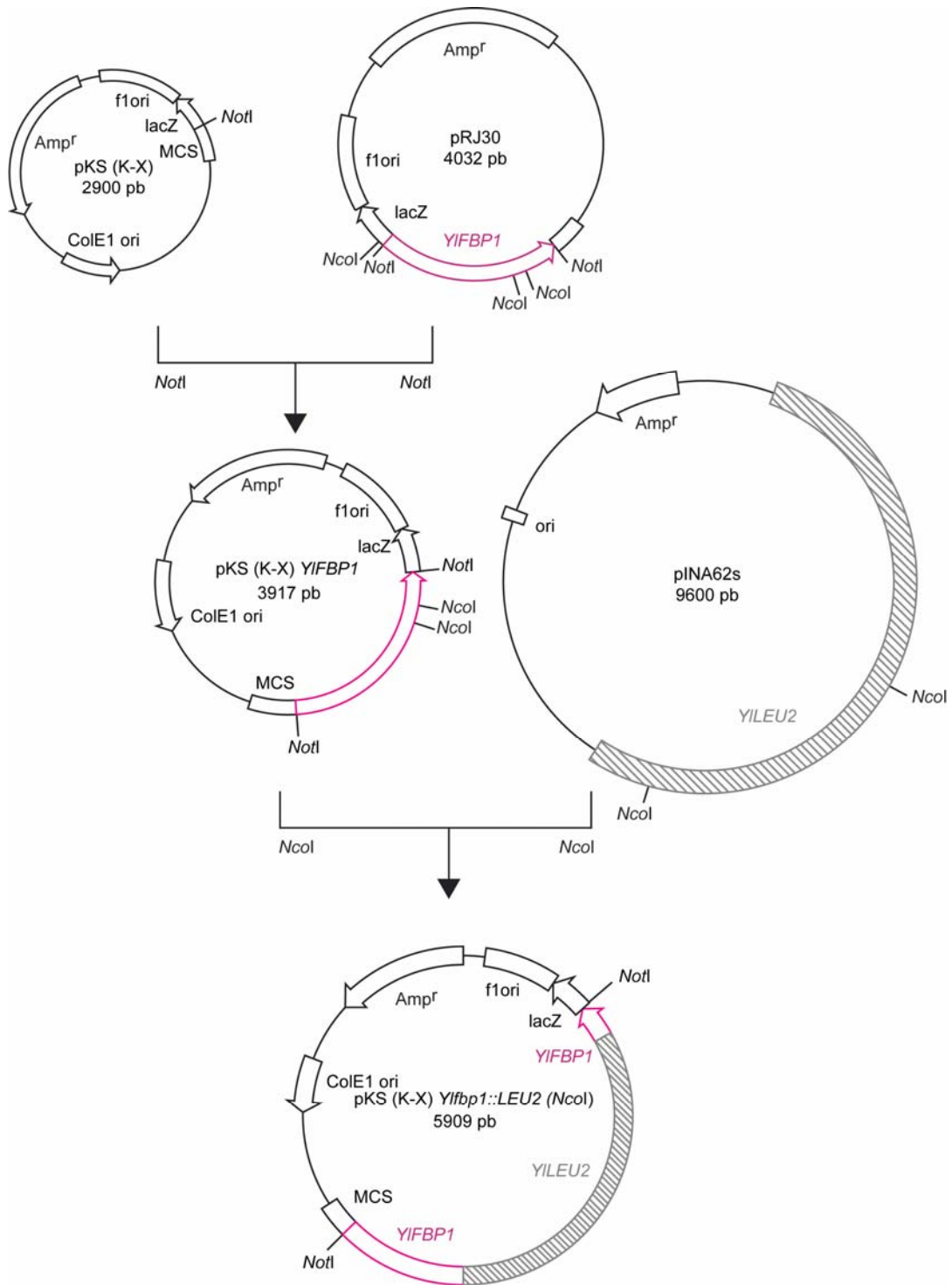


Figura 8. Desplazamiento de la interrupción del gen *YIFBP1* hacia 3'. Este casete de interrupción se obtuvo mediante delección de un fragmento de la región codificante del gen *YIFBP1* comprendida entre dos sitios de restricción para la enzima *NcoI* y sustitución del mismo por un fragmento del gen *YILEU2*. Ver detalles en el texto.

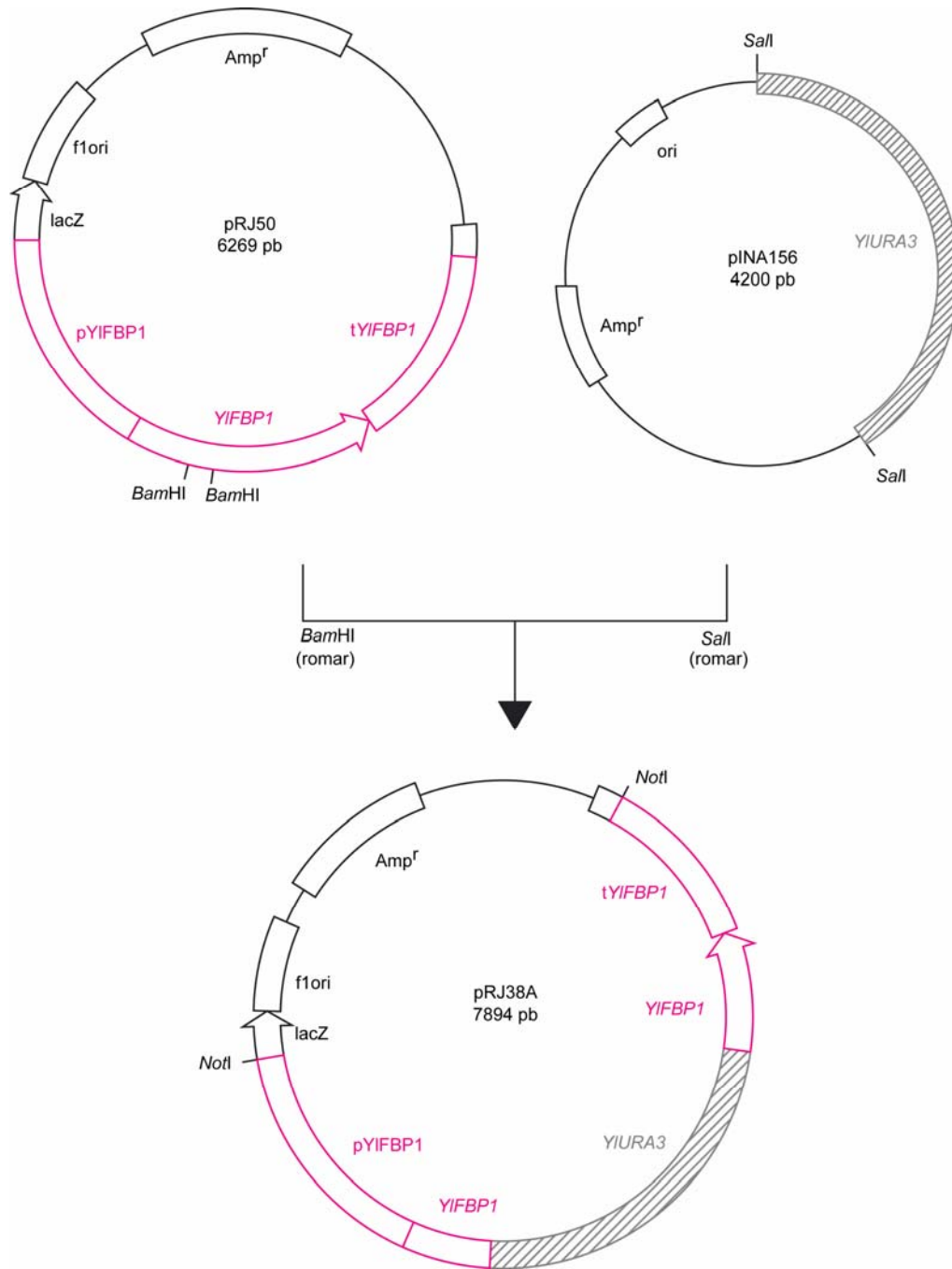


Figura 9. Obtención de un casete de interrupción del gen *YIFBP1* con el gen *YIURA3* con amplias regiones de homología flanqueantes. Se construyó un casete que comprendía las regiones promotoras, codificantes y terminadoras del gen *YIFBP1*. La región codificante se interrumpió por delección de un fragmento comprendido entre dos sitios de corte para la enzima *Bam*HI y sustitución del mismo por el gen *YIURA3*. Ver detalles en el texto.

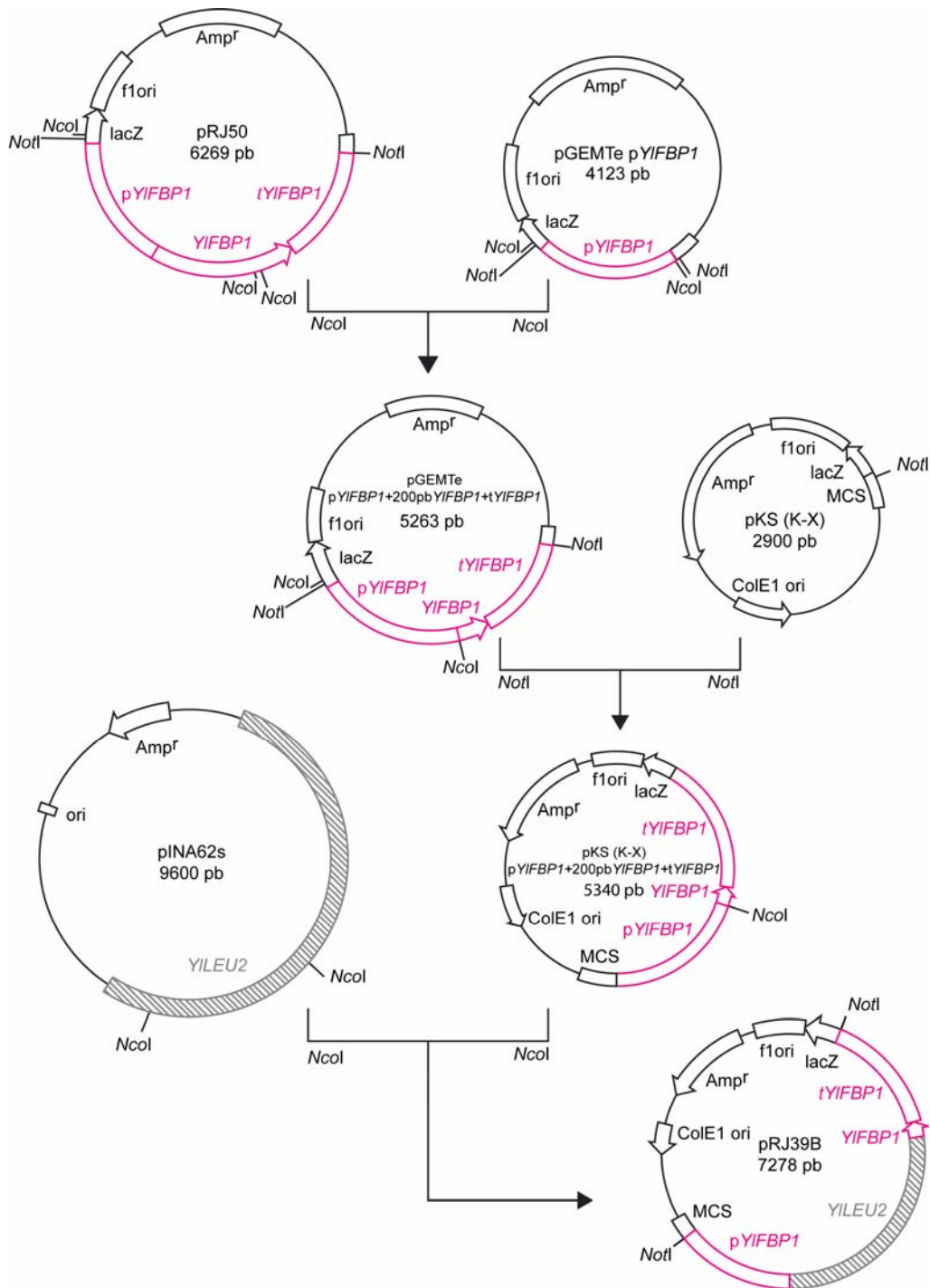


Figura 10. Obtención de un casete de interrupción del gen *YIFBP1* con el gen *YILEU2* con amplias regiones de homología flanqueantes. Se construyó un casete que comprendía las regiones promotora, parte de la codificante y terminadora del gen *YIFBP1*. La región codificante se interrumpió mediante sustitución de la mayor parte de la misma por el gen *YILEU2*. Ver detalles en el texto.

7. REINTRODUCCIÓN DEL GEN *YIFBP1* EN MUTANTES *Yifbp1*.

La reintroducción del gen *YIFBP1* en las distintas cepas mutantes *Yifbp1* se hizo mediante transformación de las mismas con distintos plásmidos que se indican a continuación:

- Mutantes *Yifbp1* interrumpidos con *YILEU2* en fondo Po1a fueron transformados con los plásmidos:

- pRJ33. Plásmido derivado del plásmido pCL49 con la región codificante de *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *YITEF1*. Resultó de la clonación en el sitio *NotI* de pCL49 de un fragmento de 1017 pb de DNA de la región codificante del gen *YIFBP1* obtenido por digestión de pRJ30 con *NotI*.

- pRJ51. Similar al anterior pero con el gen *YIFBP1* en dirección opuesta a la del promotor del gen *YITEF1* presente en el plásmido. Se obtuvo por religación de los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión de pRJ33 con *NotI* seleccionando los que tuvieran dicha orientación. Se empleó como control de la transformación con el mismo DNA pero sin actividad Fbp.

- pCL49. Se empleó como control de plásmido vacío.

- Mutantes *Yifbp1* interrumpidos con *YIURA3* en fondo Po1a fueron transformados con los plásmidos:

- pRJ36. Es similar a pRJ33 excepto por el marcador presente en el plásmido, que en este caso es *YILEU2*. Este vector fue obtenido por ligación de un fragmento de DNA como de 2100 pb, correspondiente al gen *YILEU2*, obtenido por digestión del plásmido pINA62s con *NcoI* a otro fragmento de DNA de 7680 pb obtenido por digestión del plásmido pRJ33 con *SalI*.

- pRJ37. Similar al anterior pero con el gen *YIFBP1* en dirección opuesta a la del promotor del gen *YITEF1* presente en el plásmido. Se obtuvo como pRJ36 seleccionando las construcciones con el inserto en sentido opuesto. Se empleó como control de la transformación con el mismo DNA pero sin actividad Fbp.

- pRJ40. Plásmido similar a los anteriores pero sin inserto. Se obtuvo por religación del fragmento de DNA de 9780 pb obtenido por digestión de pRJ36 con *NotI*.

Asimismo, para ciertos experimentos, se reintrodujo el gen *YIFBP1* bajo el control de su propia región promotora y con su propia región terminadora. Mediante dos reacciones de PCR sobre DNA genómico de la cepa Po1a se obtuvieron dos fragmentos de DNA: uno de 1564 pb obtenido con los oligonucleótidos 1147 y 4192, que contenía la región promotora del gen y parte de su región codificante, y otro de 1694 pb con los oligonucleótidos 4193 y 4194 (este último introduce un sitio de restricción para la enzima *StuI*), que contiene parte de la región codificante y la región terminadora del gen *YIFBP1*. Los oligonucleótidos 4192 y 4193 están diseñados para cubrir la misma secuencia de la región codificante de *YIFBP1* pero en sentidos opuestos, conteniendo un sitio de restricción para la enzima *StuI*. Ambos productos de PCR fueron ligados al plásmido pGEMTe. Una vez comprobada la secuencia de los fragmentos obtenidos se digirieron con *StuI*, obteniéndose un fragmento linearizado de 4579 pb en el primer caso que fue desfosforilado y ligado al fragmento de 1694 pb obtenido en el segundo caso. Al plásmido resultante se le denominó pRJ41. El fragmento de 3258 pb obtenido por digestión de pRJ41 con *NotI* romado se ligó al plásmido centromérico pINA444 digerido con *EcoRI* y romado, para obtener el plásmido pRJ42.

Para integrar la construcción en el genoma de *Y. lipolytica* se digirió el plásmido pINA354B con las enzimas de restricción *Clal* y *NotI*, obteniéndose un fragmento de DNA de 4500 pb que fue romado, desfosforilado y ligado a otro fragmento romado de 3258 pb obtenido por digestión de pRJ41 con *NotI*. El plásmido resultante, denominado pRJ43, fue linearizado con *Apal* y el fragmento de DNA de 7758 pb obtenido fue empleado para transformar la cepa mutante *fbp1::URA3* de *Y. lipolytica*, obteniéndose la cepa RJM004.

8-. OBTENCIÓN DE PROTEÍNA YIFbp.

Para obtener proteína con la que generar anticuerpos anti-YIFbp se utilizó una fusión de la región codificante del gen *YIFBP1* al gen que codifica la glutation-S-transferasa.

Se ligó al plásmido comercial pGEX4T2 (ver listado de plásmidos) linearizado con *EcoRI* la región codificante de *YIFBP1* obtenida por digestión de pRJ30 con *EcoRI*. Al plásmido resultante se le denominó pRJ29.

Se cultivaron células de *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP transformadas con el plásmido pRJ29 en 3 ml de LB con ampicilina y cloranfenicol durante aproximadamente 12 horas en agitación a 37°C. Con este preinóculo se inocularon 100 ml de LB con ampicilina y cloranfenicol que se incubaron de igual modo hasta alcanzar una D.O. a 660 nm de 0.6. A continuación se indujo la expresión de la fusión mediante tratamiento durante 3 horas con 0.5 mM de IPTG con agitación a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 755xg y a 4°C en porciones de 25 ml y fueron lavadas dos veces con PBS frío y centrifugadas nuevamente. Cada una de las porciones resultantes puede ser utilizada inmediatamente o congelada durante varios meses a -70°C.

Cada una de las pellas obtenidas fue resuspendida en 1 ml de PBS e incubada 30 minutos en hielo con 10 mg/ml de lisozima. A continuación se sonicó la suspensión en un MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator siguiendo el siguiente esquema: 10 ciclos de 3 segundos con un minuto de refrigeración entre ellos (amplitud=10-12). El extracto con las proteínas solubles se obtuvo por centrifugación del sonificado 20 minutos a 4°C y 12000 xg. El sobrenadante corresponde a dicha fracción y el precipitado a las proteínas no solubles.

Se comprobó experimentalmente que YIFbp no se encontraba en la fracción soluble, sino que formaba agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión, por lo que se empleó el precipitado obtenido tras la sonicación, ya que en él se encontraba la mayor parte de la proteína de fusión: para ello cada precipitado procedente de 25 ml de cultivo inicial se resuspendió en 1 ml de PBS y fue pasado varias veces por una jeringa de insulina. A continuación se incubó 5 minutos con rotación a 4°C con 1% de Tritón X-100 para posteriormente centrifugarse 20 minutos a 20400xg a 4°C. Con el precipitado se repitió el paso anterior y posteriormente se hizo un último lavado sin Tritón. El precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS. 250 µl de la suspensión se mezclaron con igual volumen de PBS y se

digirieron con 20 U de trombina incubando con rotación lenta a 4°C durante una noche.

Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético frío a una concentración final del 5%. La mezcla se incubó un mínimo de 15 minutos a 4°C y se centrifugó en frío a 13000 r.p.m. en una centrífuga Eppendorf de mesa. El precipitado fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 87.5 µl de agua y 25 µl de tampón Laemmli 5x (0.5 M TrisHCl pH 6.8, 20% glicerol, 10% dodecil sulfato sódico, 0.3% 2-mercaptoetanol). La mezcla se hirvió 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se le añadieron 12.5 µl de ditiotreitól 1M y se dividió en 5 porciones, que se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% con SDS.

9.- TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA.

Los geles de poliacrilamida se tiñeron por incubación durante aproximadamente 12 horas con agitación en una solución que contenía 0.25% de Brilliant Blue R-250 y 50% de metanol. Esta solución debe prepararse en el momento de su uso.

Los geles fueron secados entre dos láminas de papel de celofán previamente humedecidas en agua, en un desecador (Slab Gel Dryer Model SE1160) 2 horas a 70°C para su posterior conservación a temperatura ambiente.

10.- ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE RATONES Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS.

Se emplearon cuatro ratones hembras BALB-C de aproximadamente cinco semanas de edad y 20 gr de peso.

El tratamiento previo de la proteína usada para la inmunización fue el siguiente: la porción de un gel de poliacrilamida previamente deshidratado que contenía aproximadamente 80 µg de la proteína YIFbp teñida fue cortada. A continuación se rehidrató dicha porción en agua mili Q durante una hora. Una vez rehidratada, la banda de poliacrilamida que contiene la proteína fue triturada en un homogeneizador Potter-Elvehjem y resuspendida en 400 µl de agua miliQ estéril. La suspensión grumosa se pasó varias veces por una jeringa con una aguja del calibre G-21. Después se adicionó el mismo volumen del adyuvante de Freund, completo

para usarlo en la primera inmunización e incompleto para las inmunizaciones posteriores, mezclando bien con la suspensión. Se inyectaron intraperitonealmente 200 µl de la mezcla a cada animal.

Se realizaron 4 inmunizaciones con un intervalo de dos semanas entre la primera y la segunda y con un intervalo de una semana entre las siguientes; pasados seis días de la última inmunización se sacrificaron los animales.

La sangre obtenida fue conservada 24 horas a 4°C en tubos de vidrio. A continuación se eliminó el coágulo y se centrifugó el suero 20 minutos a 3000xg a 4°C. El sobrenadante obtenido se diluyó 1/3 en PBS y se mezcló en frío, muy lentamente y con agitación constante con el mismo volumen de sulfato amónico saturado. La mezcla se incubó con agitación 1 hora a 4°C. A continuación se centrifugó 20 minutos en frío a 3020xg. El precipitado fue lavado dos veces con sulfato amónico al 50% y posteriormente resuspendido en el mismo volumen de partida de PBS. A continuación se dializó frente a PBS (con tres cambios de tampón y 45 minutos por cada cambio). El dializado se dividió en porciones que se conservaron congeladas a -20°C.

La titulación del anticuerpo fue seguido mediante análisis de ELISA siguiendo un protocolo estándar.

11.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DE *Y. lipolytica*.

La obtención de núcleos de *Y. lipolytica* se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Rández-Gil *et al* (1998): la levadura fue recogida por centrifugación en fase de crecimiento logarítmica y mediante tratamiento con zymoliasa se obtuvieron protoplastos, que fueron lisados. Los núcleos se separaron sometiendo el lisado a un gradiente de Percoll. En este punto se introdujeron en el protocolo las siguientes modificaciones: la suspensión de núcleos fue centrifugada dos horas a 100000xg para eliminar los restos del Percoll. El sobrenadante obtenido fue incubado una noche a 4°C en tampón de lisis (Rández-Gil *et al.*, 1998); posteriormente se sometió a 5 ciclos de agitación de 30 segundos al vortex con bolas de vidrio y un minuto de incubación en hielo entre cada ciclo. El extracto fue tratado con sulfato de protamina al 0.1% con agitación en hielo durante 30 minutos y centrifugado 15 minutos a

13000 r.p.m. en una centrifuga eppendorf de mesa a 4°C. Finalmente se precipitaron las proteínas del sobrenadante con ácido tricloroacético al 5%, se valoró la cantidad de proteína total obtenida y se resuspendió en tampón Laemmli (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glicerol, 2% dodecil sulfato sódico (SDS), 1% mercaptoetanol y 0.002% azul de bromofenol).

1.- LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS GLUCONEOGENICAS EN *Yarrowia lipolytica* RESPONDEN DE DISTINTA FORMA A LA FUENTE DE CARBONO DEL MEDIO.

Como se ha mencionado en la introducción, *Y. lipolytica* es capaz de crecer en una gran variedad de fuentes de carbono de naturaleza no glucídica lo que hace pensar en la existencia de una activa gluconeogénesis en este microorganismo. Dado que los genes que codifican enzimas gluconeogénicas se encuentran regulados por represión catabólica en otras levaduras (Herrero *et al.*, 1985, Sedivy y Fraenkel, 1985, Valdés-Hevia *et al.*, 1989, Leuker *et al.*, 1997, Eschrich *et al.*, 2002, Berardi *et al.*, 2003, Menéndez *et al.*, 2003, López *et al.*, 2004) pareció lógico utilizar alguno de estos genes y las enzimas por ellos codificadas para estudiar los mecanismos de represión catabólica en *Y. lipolytica*, proceso que parece tener menor magnitud en esta levadura que en la levadura modelo *S. cerevisiae* (Flores y Gancedo, 2005). Para establecer si las enzimas gluconeogénicas estaban sometidas a esta forma de regulación se midieron las actividades enzimáticas de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp) y la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (Pck). Se valoró asimismo la isocitrato liasa (Icl) cuyo gen codificante está sometido a represión catabólica (Barth y Scheuber, 1993) aunque la represión no es total, como ocurre en *S. cerevisiae*. Las medidas se realizaron en tres cepas distintas de *Y. lipolytica* para evitar sacar conclusiones erróneas derivadas de las posibles peculiaridades de una cepa particular. Los resultados se muestran en la Tabla 3; como puede verse, no todas las enzimas estudiadas siguen el mismo patrón de comportamiento. Las actividades específicas de la Pck y la Icl son claramente más bajas en los cultivos crecidos en glucosa que en los crecidos en etanol; si bien se detecta siempre en los cultivos en glucosa una actividad residual a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae* (Flores y Gancedo, 2005). Este resultado indica que los genes que codifican estas enzimas están sometidos también a represión catabólica en *Y. lipolytica*. En cambio la actividad específica de la Fbp no mostró diferencias marcadas entre los cultivos con glucosa o con etanol como fuentes de carbono. Este patrón fue consistente en todas las cepas utilizadas indicando que se trata de un comportamiento genuino.

Por tanto, se puede decir que la presencia de glucosa afecta de distinta manera a las enzimas gluconeogénicas en *Y. lipolytica*.

Tabla 3. Actividad específica (mU/mg proteína) de Fbp, Pck e Icl en tres cepas distintas de *Y. lipolytica* crecidas con glucosa o etanol como fuentes de carbono. Las levaduras fueron cultivadas en medio rico con las fuentes de carbono indicadas y fueron recogidas por centrifugación en la fase exponencial del crecimiento. Las actividades enzimáticas se midieron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados mostrados corresponden a cuatro cultivos independientes con su desviación estándar en el caso de la cepa Po1a, y a un solo cultivo en los otros casos.

		CEPAS					
		Po1a		H222		E129	
Fuente carbono	Enzima	Glucosa	Etanol	Glucosa	Etanol	Glucosa	Etanol
	Fbp	80±8	98±8	91	90	78	90
	Pck	13±6	290±11	31	324	7	109
	Icl	32±5	300±33	28	216	19	64

En los experimentos sucesivos se utilizó la cepa Po1a debido a su relativamente buena eficacia en experimentos de transformación y a su buen crecimiento en medio mínimo.

Con esta cepa se realizaron valoraciones enzimáticas de las enzimas anteriores en otras dos fuentes de carbono gluconeogénicas, glicerina y acetato, utilizando medio mínimo o rico. Como se muestra en la Tabla 4, el patrón de actividades obtenido fue similar al anterior utilizando esas fuentes de carbono en ambos tipos de medios. Este resultado confirma el distinto grado de regulación por glucosa de las enzimas ensayadas.

Es de señalar que de manera consistente los valores de Pck e Icl fueron siempre más elevados en etanol que en acetato, apuntando quizá a la existencia de un mecanismo de inducción por el alcohol, y más elevados en glucosa que en glicerina, especialmente en medio mínimo, indicando una mayor represión por parte del compuesto gluconeogénico sobre estas enzimas.

Tabla 4. Actividad específica (mU/mg proteína) de Fbp, Pck e Icl de la cepa Po1a de *Yarrowia lipolytica* en medios mínimo y rico con distintas fuentes de carbono. Las levaduras fueron cultivadas en medios mínimo o rico con las fuentes de carbono indicadas y fueron recogidas por centrifugación en la fase exponencial del crecimiento. Las actividades enzimáticas se midieron como se describe en Materiales y Métodos. Los valores, seguidos de su desviación estándar, corresponden a cuatro cultivos independientes.

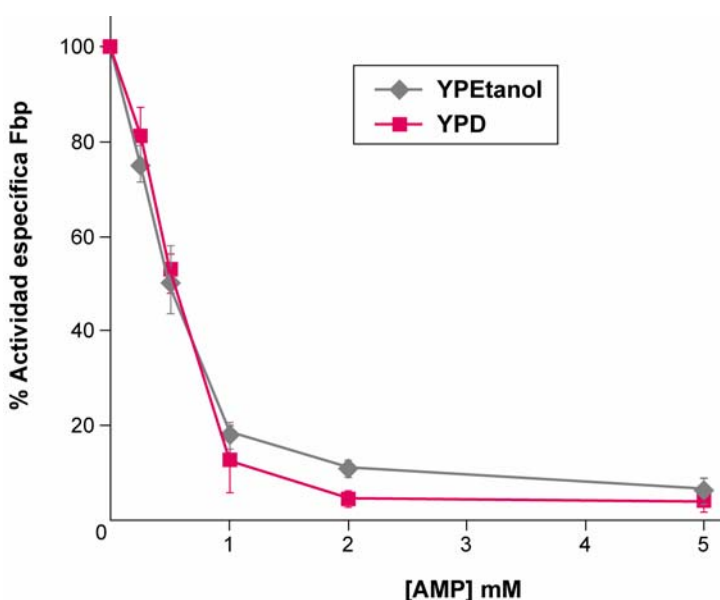
		Fbp	Pck	Icl
MEDIO MÍNIMO	Glucosa	123±12	36±3	73±10
	Etanol	106±16	280±25	438±27
	Glicerina	111±11	20±1	45±10
	Acetato	91±8	164±30	228±32
MEDIO RICO	Glucosa	80±8	13±6	32±5
	Etanol	98±8	290±11	300±33
	Glicerina	115±12	6±2	30±4
	Acetato	99±15	155±20	145±19

La independencia de la actividad Fbp de las fuentes de carbono del medio, en contraste con las reguladas de Pck o Icl puede explicarse de diversas maneras: 1) la actividad Fbp detectada en glucosa se debe a la acción de una fosfatasa inespecífica, 2) existe más de un gen que codifique una proteína con actividad Fbp y éstos están regulados de distinta forma y 3) el gen que codifica la Fbp no está sometido a represión catabólica en *Y. lipolytica*.

Para tener una idea de si la actividad detectada podía ser debida a la acción de una fosfatasa inespecífica se ensayó el efecto sobre la actividad enzimática del AMP, un inhibidor alostérico de numerosas Fbps (Gancedo *et al.*, 1965, Kelley-Loughnane y Kantrowitz, 2001, Rittmann *et al.*, 2003, Zhou y Cheng, 2004). Como se muestra en la Figura 11, se observó una inhibición de la actividad Fbp ensayada a concentraciones de 0.1 mM de AMP, que está en el rango de concentración fisiológica de este compuesto en levadura (Bañuelos *et al.*, 1977). Esta inhibición, que se observó tanto en extractos de *Y. lipolytica* crecida en glucosa como crecida

en fuentes de carbono gluconeogénicas, es comparable en magnitud con la experimentada por la enzima de *S. cerevisiae*, con una K_i de 80 μM (Gancedo *et al.*, 1965). Este resultado indica que la actividad valorada es debida básicamente a una proteína que responde al AMP como una fructosa bisfosfatasa específica.

Figura 11. Efecto del AMP sobre la actividad Fbp de *Y. lipolytica* crecida en condiciones glicolíticas o gluconeogénicas.



La cepa PO1a se cultivó en medio rico con glucosa o etanol como fuentes de carbono y fue recogida por centrifugación en fase exponencial de crecimiento. La actividad Fbp se midió como se describe en Materiales y Métodos en presencia de las concentraciones de AMP indicadas. Los resultados muestran la media de los valores correspondientes a extractos obtenidos de tres cultivos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

2-. AISLAMIENTO DEL GEN *YIFBP1*

Con el objetivo de examinar las otras posibilidades propuestas para explicar el comportamiento singular de YIFbp se decidió aislar su gen codificante. Como en el momento de iniciar este trabajo no estaba disponible la secuencia del genoma de *Y. lipolytica*, para aislar dicho gen se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de zonas homólogas de las secuencias proteicas de Fbps de otras levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia anomala*); dichas zonas elegidas se muestran en la Figura 12. En el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta el sesgo en el uso de codones de *Y. lipolytica* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

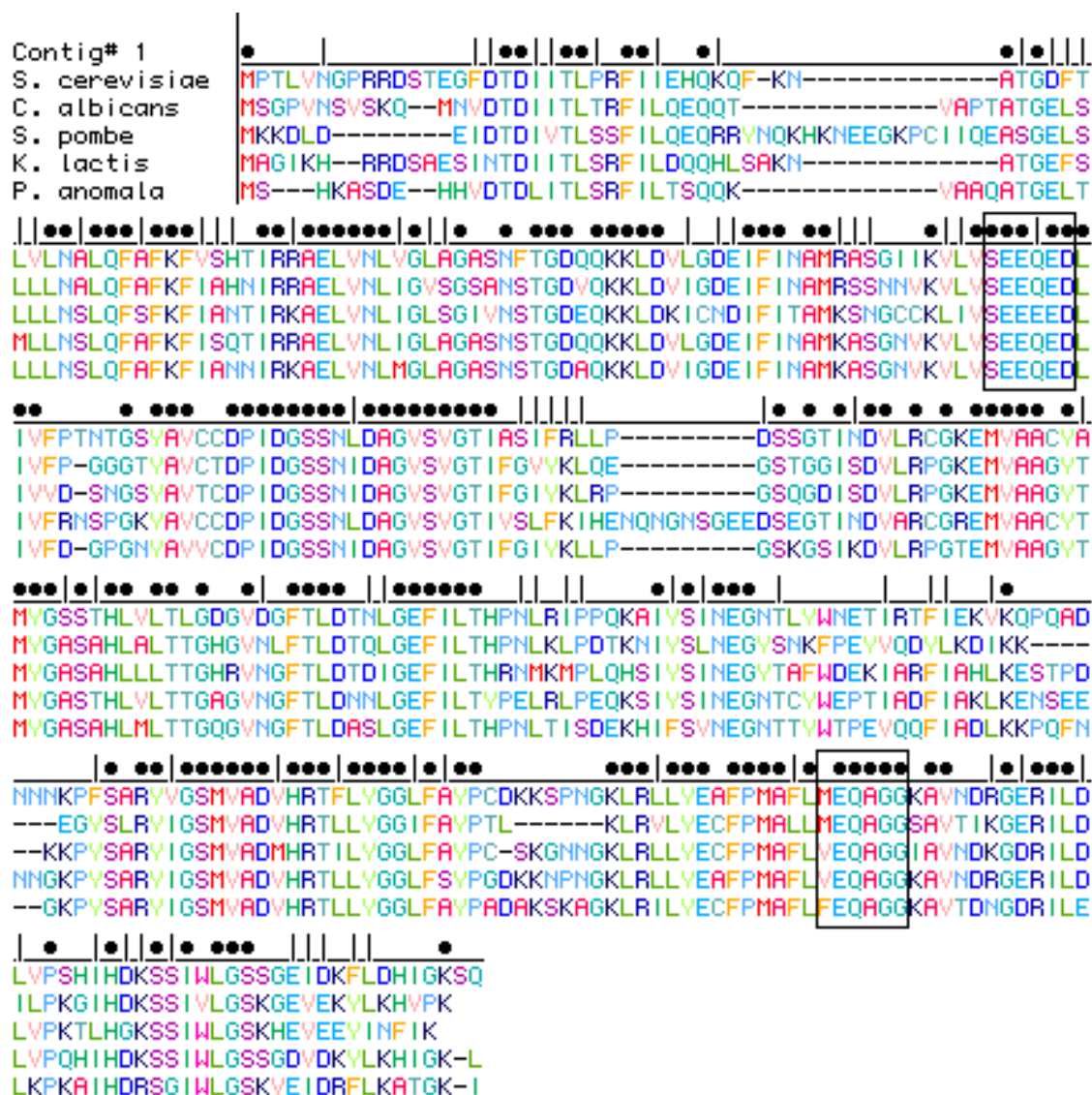


Figura 12. Alineación de las secuencias aminoacídicas de Fbps de distintas especies de levaduras. Se muestran las secuencias de aminoácidos de las Fbps de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia anomala*. Los rectángulos encuadran las zonas de las secuencias a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos degenerados 8067 y 8068 descritos en la Tabla 2 de Materiales y Métodos. Los puntos indican aminoácidos idénticos y las líneas verticales aminoácidos homólogos.

Los oligonucleótidos diseñados fueron el 8067 y el 8068 (ver Tabla 2 de Materiales y Métodos). Con ellos y empleando cDNA de *Y. lipolytica* como molde, se obtuvo mediante reacción de PCR un fragmento de DNA de 560 pb cuya secuencia traducida mostró una elevada homología con la secuencia de *ScFBP1*. A partir de la

secuencia de dicho fragmento se diseñaron nuevos oligonucleótidos en dirección 5' (8260) y 3' (8259) que se utilizaron con los oligonucleótidos 6442 y 8261 respectivamente, situados en ambos extremos del plásmido pFL61 (Minet *et al.*, 1992) en el que estaba construida la genoteca de cDNA de *Y.lipolytica* que sirvió de molde (Figura 13) de una nueva reacción de PCR en la que se obtuvieron un fragmento de 800 pb y otro de 500 pb cuya secuencia presentaba alta homología con *ScFBP1*. Con este material fue posible diseñar los oligonucleótidos 8627 y 8628 con los que se obtuvo mediante una nueva reacción de PCR sobre DNA genómico de *Y.lipolytica* un fragmento de DNA de 1017 pb con una identidad de secuencia nucleotídica del 61% con *ScFBP1* y una homología de secuencia proteica derivada del 65% con ScFbp. Consideramos que este fragmento de DNA podría codificar la Fbp de *Y. lipolytica* y lo denominamos *YIFBP1*. La secuencia correspondiente fue depositada en GenBank y recibió el número de acceso AY324116.

Las regiones promotora y terminadora del gen se obtuvieron como se describe a continuación y se detalla en la Figura 14:

2.1.- Obtención de la región 5' no codificante. Se realizaron dos reacciones de PCR usando como molde la genoteca genómica BQ240 de *Y. lipolytica* (Nuttley *et al.*, 1993) y los pares de oligonucleótidos 6159-8628 y 5993-8628. Fue necesario llevar a cabo esas dos reacciones dado que el fragmento buscado podría encontrarse inserto en el plásmido de la genoteca en cualquiera de las dos orientaciones posibles. El oligonucleótido 8628 se encuentra situado en el extremo 3' de la ORF de *YIFBP1*. De las reacciones mencionadas se obtuvo una serie de fragmentos de DNA. Para identificar el fragmento correcto se realizaron dos nuevas reacciones de PCR anidadas sobre las anteriores. Se usó como DNA molde el conjunto de fragmentos de DNA de cada reacción y los pares de oligonucleótidos 6159-8260 y 5993-8260.

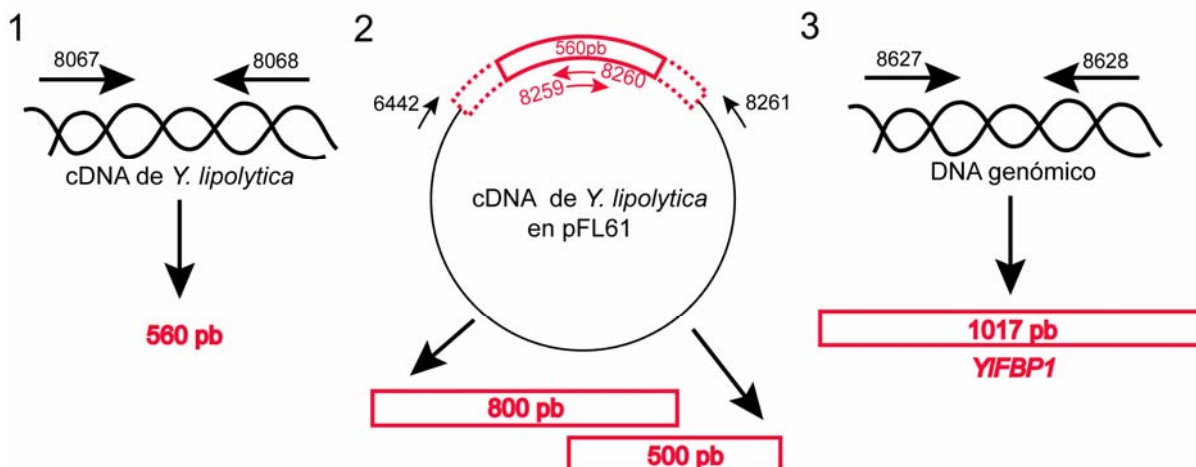


Figura 13. Estrategia seguida para la obtención del gen *YIFBP1*. 1) Mediante reacción de PCR sobre cDNA de *Y. lipolytica* con los oligonucleótidos 8067 y 8068 se obtuvo un fragmento de DNA de 560 pb cuya secuencia presentaba una alta homología con *ScFBP1*. 2) A partir de la secuencia de dicho fragmento se diseñaron los oligonucleótidos 8259 y 8260 en las direcciones indicadas en la figura. Estos oligonucleótidos se emplearon en reacciones de PCR junto con los oligonucleótidos 6442 y 8261, situados en los extremos del sitio de clonación de un plásmido en el que se había generado una genoteca de cDNA de *Y. lipolytica*, y empleando dicha genoteca como molde. Se obtuvieron dos fragmentos de DNA de 800 y 500 pb respectivamente. 3) A partir de la secuencia de estos fragmentos se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos (8627 y 8628) que fueron empleados en una reacción de PCR sobre DNA genómico de la cepa PO1a. Se obtuvo así un fragmento de DNA de 1017 pb que se denominó *YIFBP1*.

El oligonucleótido 8260 está situado 300 pb cadena arriba de 8628. La idea era que si en la primera reacción había un fragmento específico debido al anillamiento de 8628 y uno de los otros oligonucleótidos, debía desaparecer en la segunda reacción apareciendo en su lugar un fragmento de un tamaño 300 pb inferior, mientras que la mayoría de las otras bandas permanecería. La banda que desapareciese sería candidata a representar el fragmento buscado. Corriendo en geles de agarosa en paralelo los productos de cada PCR y los de su anidada correspondiente, encontramos que en la PCR obtenida con el par de oligonucleótidos 6159 y 8628 aparecía una banda de 2500 pb que no estaba en la PCR obtenida con 6159 y 8260, apareciendo en cambio una banda de 2200 pb. El fragmento elegido se clonó en pGEMTe y el plásmido resultante se digirió con *PstI*. Existen dos sitios *PstI* en *YIFBP1*, a 59 y 72 pb cadena abajo del ATG respectivamente y hay otro en

pGEMTe. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 4500 pb de dicha digestión que fue religado, obteniéndose un plásmido que fue secuenciado. La secuencia resultante correspondería a 59 pb de la ORF de *YIFBP1* y a 1500 pb cadena arriba que son la región 5' no codificante del gen.

2.2.- Obtención de la región 3' no codificante. Se realizó de forma similar a la obtención de la región promotora. Mediante reacción de PCR con los oligonucleótidos 5933 (situado en el plásmido que contiene la genoteca BQ240) y 8627, situado en el extremo 5' de la ORF de *YIFBP1*, empleando como molde la genoteca BQ240, se obtuvieron varias bandas. Para encontrar la banda de interés se realizó una segunda reacción de PCR anidada, empleando al producto anterior como molde y los oligonucleótidos 5933 y 8259, diseñado en dirección 3' a 700 pb del ATG de *YIFBP1*. Corriendo en un gel de agarosa ambos productos se observó la desaparición de una banda de 2200 pb en el segundo producto de PCR. El fragmento de DNA correspondiente fue clonado en el vector pGEMTe y secuenciado, correspondiendo a la secuencia de la ORF de *YIFBP1* más 1200 pb de su región 3' no codificante.

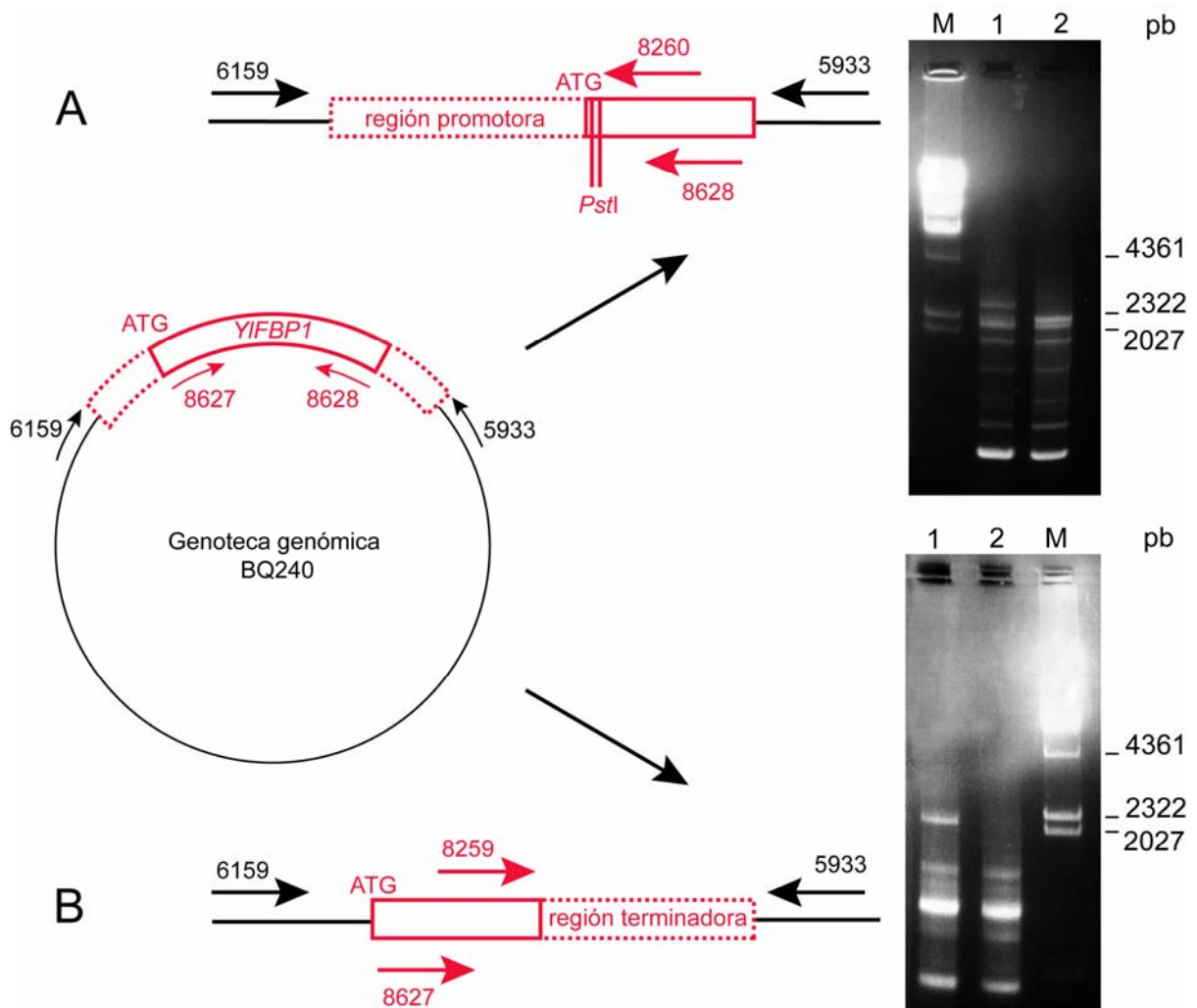


Figura 14. Obtención de las regiones promotora y terminadora del gen *YIFBP1*. A) Obtención de la región promotora. Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR usando los oligonucleótidos 6159-8628 y 5933-8628 empleando como molde una genoteca genómica de *Y. lipolytica*. Posteriormente se realizaron nuevas reacciones de PCR anidadas usando los oligonucleótidos 6159-8260 y 5933-8260 y el DNA de las primeras reacciones. Al correr los productos de las PCRs anidadas en paralelo se observa un fragmento de 2500 pb que aparece en el carril 1 (6159-8628) y desaparece en el 2 (6159-8260) donde es sustituido por uno de 2200 pb. B) Obtención de la región terminadora. Se sigue una estrategia similar a la empleada en la obtención de la región promotora usando en la primera reacción de PCR los oligonucleótidos 5933-8627 y en la PCR anidada los oligonucleótidos 5933-8259. Al correr los productos de las PCRs anidadas en paralelo se observa un fragmento de 2200 pb que aparece en el carril 1 (5933-8627) y desaparece en el 2 (5933-8259). M: marcador.

3.- ANÁLISIS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE *YIFBP1*.

3.1.- REGIÓN CODIFICANTE.

La región codificante del gen *YIFBP1* comprende 1017 pb, que codifican una proteína de 339 aminoácidos cuya masa estimada mediante el programa de ordenador GeneJockey II sería de 36697 Da. Este dato concuerda con los pesos moleculares estimados para las subunidades de otras Fbps, que generalmente oscilan entre valores comprendidos entre 36 y 38 KDa (Rogers, 1988, Zaror, 1993, Tamoi, 1996, de la Rosa, 2000). Normalmente el genoma de *Y. lipolytica* presenta un alto contenido de citosinas y guaninas (Kurtzman, 1983). En el caso de *YIFBP1* la composición monocatenaria de bases es la siguiente: A, 21.6%, T, 18.9%, C, 33.5% y G, 25.8%, donde el porcentaje de C es mayor que el del resto de los nucleótidos.

El uso de codones en la codificación de la proteína YIFbp y la frecuencia relativa de los mismos se presentan en la Tabla 5.

Dicho uso de codones se ajusta bastante bien a la preferencia mostrada por *Y. lipolytica* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Llamen la atención, sin embargo, algunas utilidades algo sesgadas que se señalan a continuación. Para codificar glicina, Gly, los codones igualmente preferidos en *Y. lipolytica* son GGT y GGC; sin embargo en *FBP1* se usa GGC en un 57% de los casos frente a un 17% de GGT. En el caso de serina, Ser, no se usa en ningún caso TCT que es el segundo codon preferido después de TCC y algo similar ocurre con alanina, Ala, donde GCT, también segundo preferido, no se usa. Finalmente, en el caso de valina, Val, el codon GTT que tiene una frecuencia parecida a GTG, se usa en un solo caso de un total de 22; también parece haber un sesgo marcado en el caso de la histidina, His, y cisteína, Cys, pero dada la baja frecuencia de aparición de estos aminoácidos en la proteína que nos ocupa, 4 y 2 respectivamente de un total de 339, es aventurado sacar conclusiones. No se puede presentar en este momento una explicación razonable para este marcado sesgo en la utilización de ciertos codones; sin embargo, este sesgo no aparece reflejado en el Índice de Adaptación de Codones (Codon Adaptation Index: CAI), que en el caso de *YIFBP1* en *Y. lipolytica* es de 0.91 bastante superior al que presenta *ScFBP1* en *S. cerevisiae*, que es de 0.67. Este

índice hace referencia al empleo prioritario de codones que codifiquen tRNAs mayoritarios y es más elevado en el caso de genes con elevada expresión, lo que sugiere que *YIFBP1* está en esta categoría.

Tabla 5. Uso de codones del gen *YIFBP1*. La tabla muestra los aminoácidos de *YIFBP1* y los codones utilizados en la secuencia de *YIFBP1*, el número de veces que se usa cada codon y el porcentaje de uso de cada uno.

aminoácido (total)	codon	cantidad	porcentaje	aminoácido (total)	codon	cantidad	porcentaje	aminoácido (total)	codon	cantidad	porcentaje	aminoácido (total)	codon	cantidad	porcentaje
Ala (23)	GCC	20	86,9	Cys (2)	TGC	2	100	Asp (22)	GAC	17	77,3	Glu (20)	GAG	17	85
	GCA	2	8,7		TGT	0	0		GAT	5	22,7		GAA	3	15
	GCG	1	4,3												
	GCT	0	0												
Phe (14)	TTC	11	78,5	Gly (35)	GGC	20	57,1	His (4)	CAC	4	100	Ile (24)	ATC	15	62,5
	TTT	3	21,5		GGA	9	25,7		CAT	0	0		ATT	9	37,5
			GGT		6	17				ATA	0		0		
			GGG		0	0									
Lys (24)	AAG	23	95,8	Leu (35)	CTG	19	54,2	Met (7)	ATG	7	100	Asn (17)	AAC	17	100
	AAA	1	4,1		CTC	12	34,2						AAT	0	0
					CTT	3	8,6								
					TTG	1	2,9								
					CTA	0	0								
			TTA	0	0										
Pro (13)	CCC	12	92,3	Gln (7)	CAG	7	100	Arg (11)	CGA	10	91	Ser (28)	TCC	23	82,1
	CCT	1	7,6		CAA	0	0		CGG	1	9		TCG	5	17,8
	CCA	0	0				CGC		0	0	TCT		0	0	
	CCG	0	0				CGT		0	0	TCA		0	0	
							AGA		0	0	AGT		0	0	
							AGG	0	0	AGC	0	0			
Thr (15)	ACC	12	80	Val (22)	GTC	12	54,5	Trp (2)	TGG	2	100	Tyr (13)	TAC	13	100
	ACT	2	13,3		GTG	9	40,9						TAT	0	0
	ACG	1	6,7		GTT	1	4,5								
	ACA	0	0		GTA	0	0								

La secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por *YIFBP1* presenta homología importantes con otras Fbps en las regiones de unión a la fructosa-1,6-bisfosfato y a un catión divalente necesario para la actividad. La Tabla 6 muestra esta homología con la enzima de riñón de cerdo, seleccionada para la comparación

por ser aquella sobre la que más información se posee. También en la región de interacción de la proteína con AMP, un inhibidor de un gran número de Fbps, la homología de secuencia entre la enzima de *Y. lipolytica* y la de riñón de cerdo es muy importante, como puede apreciarse en la Tabla 7. Además una zona de YIFbp relacionada con el centro activo, de secuencia GKLRLLYEGFPMA, es muy similar a la de otras Fbps (Figura 15).

No existe, en cambio, similitud alrededor de la región en la que se encuentra la serina 11 en ScFbp; este aminoácido es fosforilado en la etapa inicial reversible de la inactivación catabólica de aquella enzima (Mazón *et al.*, 1982).

Utilizando como patrón la Fbp porcina que ha sido cristalizada (Choe *et al.*, 2000) se han generado posibles estructuras tridimensionales de las subunidades de YIFbp y de ScFbp a través del servidor Swiss Model (Figura 16). La proteína usada como patrón tiene una identidad de secuencia del 50% con YIFbp y del 48% con ScFbp. Como cabría esperar por la elevada homología de secuencias no hay grandes diferencias entre las estructuras de YIFbp y de ScFbp; sin embargo existen algunas diferencias que parecen claras en su estructura secundaria, como son que ScFbp tiene una lámina β menos que YIFbp que comprende los residuos 113 a 115, así como una menor extensión de la lámina β entre las posiciones 104 a 108. La longitud de la α -hélice situada en el extremo aminoterminal también difiere entre ambas proteínas, afectando a 9 residuos en ScFbp y tan solo a 4 en YIFbp. Teniendo en cuenta las limitaciones de la modelización no es posible emitir una hipótesis sobre la posible importancia de estas diferencias en el comportamiento de las proteínas, aunque podrían ser útiles para estudios posteriores.

Tabla 6. Comparación de aminoácidos en la región ligante del azúcar bisfosfato y en el área implicada en el ligamiento del catión divalente en las fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón porcino y de *Y. lipolytica*.

Fbp de riñón porcino	Fbp de <i>Y. lipolytica</i>
Área ligante del azúcar bisfosfato	
Asn 126 (N)	Asn 129 (N)
Asn 213 (N)	Asn 219 (N)
Arg 244 (R)	Arg 247 (R)
Tyr 245 (Y)	Tyr 248 (Y)
Gly 247 (G)	Gly 250 (G)
Ser 248 (S)	Ser 251 (S)
Met 249 (M)	Met 252 (M)
Tyr 265 (M)	Tyr 262 (M)
Lys 270 (K)	Lys 273 (K)
Lys 275 (K)	Lys 276 (K)
Área ligante del catión divalente	
Glu 98 (E)	Glu 103 (E)
Glu 99 (E)	Glu 104 (E)
Asp 119 (D)	Asp 122 (D)
Asp 122 (D)	Asp 125 (D)
Glu 281 (E)	Glu 293 (E)

Los datos de la enzima de riñón porcino están tomados de Zaror *et al* (1993) con la numeración de la entrada PO0636 del NCBI.

Tabla 7. Comparación de residuos aminoacídicos que interaccionan con AMP en la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón porcino y de *Y. lipolytica*.

Residuos en Fbp de riñón porcino	Residuos en Fbp de <i>Y. lipolytica</i>
Val 18 (V)	Ile 18 (I)
Gly 22 (G)	Gln 22 (Q)
Ala 25 (A)	Ala 27 (A)
Gly 27 (G)	?
Thr 28 (T)	Thr 33 (T)
Glu 30 (E)	Asp 35 (D)
Met 31 (M)	Phe 36 (F)
Thr 32 (T)	Thr 37 (T)
Lys 113 (K)	Arg 116 (R)
Arg 141 (R)	Lys 144 (K)
Val 161 (V)	Val 156 (V)
Met 178 (M)	Thr 181 (T)

Los residuos de la enzima porcina se han tomado de Ke *et al* (1991), modificados según la secuencia PO0636 del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Comparando la secuencia con la de otras levaduras se encuentran las siguientes diferencias: V₁₈ es L en *P. anomala*, G₂₂ es Q en *K. lactis*, *C. albicans*, *P. anomala* y M en *S. cerevisiae* y *S. pombe*; E₃₀ es E en *K. lactis*, *C. albicans* y *P. anomala* y D en *S. cerevisiae* y *S. pombe*; M₃₁ es F en *K. Lactis*, *S. cerevisiae* y *S. pombe* y L en *C. albicans* y *P. anomala*; T₃₂ es S en *C. albicans*; R₁₄₁ es K en *K. lactis*, *C. albicans* y *P. anomala* y R en *S. cerevisiae* y *S. pombe*; M₁₇₈ es T en *K. lactis*, *C. albicans* y *P. anomala* y L en *S. cerevisiae* y *S. pombe*

S. cerevisiae GKLRLLYEAFMA
C. albicans LKLRLYECFPMA
S. pombe GKLRLLYECFPMA
K. lactis GKLRLLYEAFMA
P. anomala GKLRILYECFPMA
Y. lipolytica GKLRLLYEGFPMA

Figura 15. Comparación de las secuencias de los centros activos de Fbps de distintas levaduras. La alineación de las secuencias aminoacídicas (Ruiz *et al.*, 2001) correspondientes a los centros activos de distintas Fbps de levadura pone de manifiesto la alta conservación de las mismas. Se muestran las secuencias entre las posiciones 285 y 297 para *S. cerevisiae*, 270 y 282 para *C. albicans*, 277 y 289 para *S. pombe*, 293 y 305 para *K. lactis* y 278 y 290 para *P. anomala*. En la última posición aparece la secuencia que por homología con las anteriores podría corresponder al centro activo de YIFbp (posiciones 277 a 289).

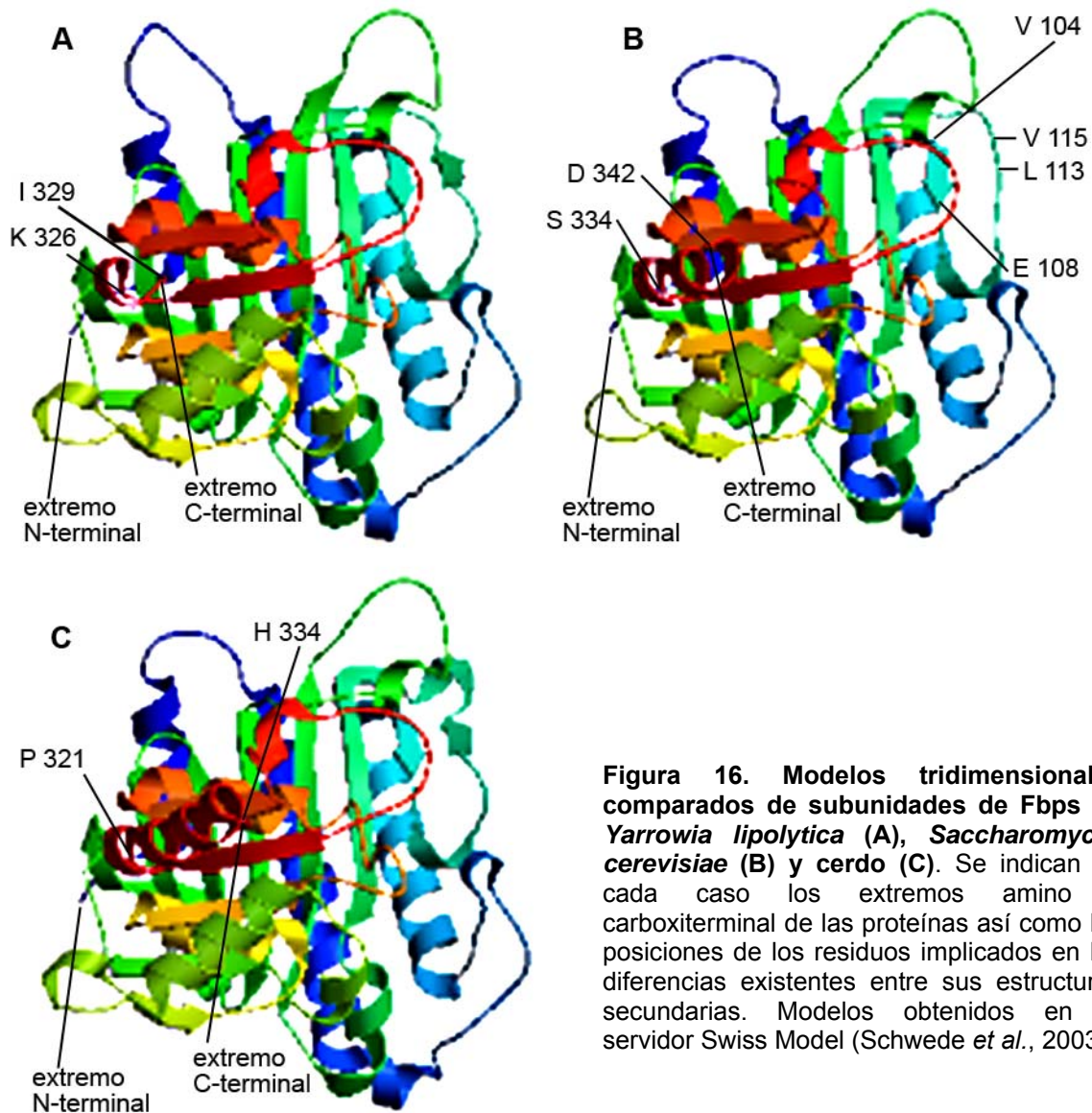


Figura 16. Modelos tridimensionales comparados de subunidades de Fbps de *Yarrowia lipolytica* (A), *Saccharomyces cerevisiae* (B) y cerdo (C). Se indican en cada caso los extremos amino y carboxiterminal de las proteínas así como las posiciones de los residuos implicados en las diferencias existentes entre sus estructuras secundarias. Modelos obtenidos en el servidor Swiss Model (Schwede *et al.*, 2003).

3.2.- REGIÓN 5' NO CODIFICANTE.

Se han descrito secuencias consenso, características del entorno del triplete iniciador en cada levadura; en el caso de *Y. lipolytica* ese entorno es el siguiente A(T/C)AATG(A/G) (Gaillardin y Heslot, 1988) y en el caso del gen *YIFBP1* el entorno observado es ACAATGG, que concuerda perfectamente con el anteriormente

descrito (Figura 17). Existen otras secuencias implicadas en el control de la transcripción, como es el caso de la caja TATA, situada normalmente en levaduras entre las posiciones -30 a -300, considerando la adenina del triplete ATG iniciador como el nucleótido +1 (Breathnach y Chambon, 1981). La secuencia consenso de la caja TATA es la siguiente: 5'-TATA(T/A)(T/A)-3'. En *YIFBP1* la secuencia TATAAA está situada entre las posiciones -202 a -207 por lo que muy posiblemente funciona como caja TATA. Está también descrito que en la región comprendida entre la caja TATA y el triplete iniciador suele existir una región rica en CT y niveles bajos de guanina (Dobson *et al.*, 1982). En la Figura 17 se señalan dos posibles bloques CT. El porcentaje de nucleótidos entre la caja TATA y el triplete ATG iniciador es de 23.4% T, 22.3% A, 16.5 G y 38.3% C, donde se observa que el porcentaje de G es menor que el de los otros tres nucleótidos de acuerdo con la norma general.

En *Y. lipolytica* se ha descrito que el inicio de la transcripción suele coincidir con un par CA situado a 26-30 nucleótidos de la caja TATA (Gaillardin y Heslot, 1988), entre este elemento y el ATG. En el caso del gen que nos ocupa se han encontrado dos regiones de CA candidatas a ser puntos de inicio de la transcripción situadas a 29-34 y a 40-43 nucleótidos respectivamente de la caja TATA.

De todos estos datos se concluye que la región promotora del gen *YIFBP1* conserva las secuencias consenso descritas para otros genes de esta levadura implicadas en transcripción génica.

posibles secuencias de inicio de la transcripción, en azul claro el entorno del triplete iniciador y en rosa la secuencia característica de terminación de la transcripción. Aparecen subrayadas en azul oscuro dos regiones ricas en CT de la región 5' no codificante y en rosa posibles señales de poliadenilación de la región 3' no codificante. En la región codificante se muestra también la secuencia de aminoácidos.

Se investigó si en el promotor de *YIFBP1* o en los de *YIPCK1* e *YIICL1* se encontraban elementos reguladores identificados en genes homólogos en otras levaduras. El elemento CSRE (Carbon Source Response Element), es un elemento activador (UAS, Upstream Activating Sequence) con una secuencia consenso CCGNRNAARGGA (Rogers *et al.*, 1988) necesario para la desrepresión de los genes codificantes de enzimas gluconeogénicas (Niederacher *et al.*, 1992, Scholer y Schüller, 1994, Proft *et al.*, 1995, Caspary *et al.*, 1997). Esa secuencia no solo se encuentra en los promotores de los genes que codifican enzimas gluconeogénicas en *S. cerevisiae*, sino también en *C. albicans* (Eschrich *et al.*, 2002). Esa secuencia no se encontró en el promotor de *YIFBP1*, lo cual apoyaría una transcripción independiente de la fuente de carbono. Pero curiosamente tampoco se encontró esa secuencia en las regiones promotoras de *YIPCK1* e *YIICL1* cuya transcripción parece estar regulada por glucosa (las secuencias promotoras de esos genes están accesibles en <http://cbi.labri.fr/Genolevures>). Hay que señalar que tampoco se encontraron secuencias con homología importante con las que codifican las proteínas activadoras Cat8 o Sip4, que se unen al UAS y son necesarias para la desrepresión en *S. cerevisiae* (Roth *et al.*, 2004).

Sí se encontró en el promotor de *YIFBP1* una secuencia homóloga al UAS1 de *Spf1p1⁺* que es un elemento activador parecido a CRE [cAMP response element (Neely y Hoffman, 2000)]. La secuencia consenso del CRE es C(G/T)ACGTCA, que en el promotor de *YIFBP1* aparece entre las posiciones -435 a -442 cadena arriba del ATG del gen. Sin embargo no se han encontrado secuencias con homología clara con las que codifican las proteínas (Atf1 y Pcr1) que se unen a dicho elemento, por lo que no parece probable que *YIFBP1* tenga una regulación similar a la de su homólogo en *S. pombe*.

En cuanto a la secuencia a la que se liga Mig1, una proteína represora, cuyo motivo consenso de unión al DNA es CCCC(G/A)(G/C) flanqueado por una región rica en AT (Lundin *et al.*, 1994), se detectaron dos zonas homólogas en el promotor de *YIFBP1*, situadas entre las posiciones -161 a -165 y -172 a -176 cadena arriba del ATG respectivamente. Considerando la abundancia de GC en el genoma de *Y. lipolytica*, esa homología podría no ser significativa: su funcionalidad es pues dudosa, teniendo en cuenta la falta de represión por glucosa del gen *YIFBP1* y la ausencia en el genoma de *Y. lipolytica* de algún gen con homología representativa con el gen codificante de Mig1 en *S. cerevisiae*.

Los resultados anteriores indican que los elementos reguladores de la transcripción de los genes codificantes de enzimas gluconeogénicas en *Y. lipolytica* son distintos de los encontrados en otras levaduras.

3.3.- REGIÓN 3' NO CODIFICANTE.

El estudio de la región 3' de distintos genes de *Y. lipolytica* ha permitido establecer una secuencia consenso necesaria como señal de terminación de la transcripción (Gaillardin y Heslot, 1988, Treton *et al.*, 1992). Esta secuencia consiste en un grupo de nucleótidos característico después de la señal de terminación de traducción (STOP): STOP...TAG...TA(T)GT...TTT y ha sido denominado "elemento terminador tripartito" [terminator tripartite element (Treton *et al.*, 1992)]. En la región 3' no codificante de *YIFBP1* se ha encontrado dicha región; después del codon de terminación aparece la siguiente señal, TAG, a 30 nucleótidos. El segundo componente del elemento terminador tripartito aparece a 75 nucleótidos del codon TAG, con la secuencia TATGT. El tercer elemento de la secuencia consenso, TTT, aparece a 81 nucleótidos del final de la ORF. Es de destacar la gran variabilidad de las distancias entre los componentes del elemento terminador tripartito, como puede apreciarse en la Tabla 8.

Además de las secuencias anteriormente descritas, existen en los RNAm señales de poliadenilación. En las regiones 3' no codificantes de las secuencias de DNA de varios genes se ha encontrado dicha secuencia, que es la siguiente: 5'-AATAAA-3' así como en algunos casos secuencias derivadas de ésta, como 5'-AATAA-3' o 5'-

TATAAA-3' (Oliver y Warmington, 1989). En el gen *YIFBP1* no se han encontrado ninguna de las secuencias correspondientes a la señal de poliadenilación descritas anteriormente; la señal más parecida a ellas sería AATA, que aparece en dos ocasiones, a 84 y 96 pb del codon de terminación.

Tabla 8. Comparación de la secuencia del elemento terminador tripartito necesario como señal de terminación de la transcripción en distintos genes de *Y. lipolytica*. Se indican el número de bases comprendidas entre los distintos grupos del elemento.

GEN	CODON STOP	SECUENCIA DEL ELEMENTO TERMINADOR TRIPARTITO
<i>FBP1</i>	TGA	...30...TAG...75...TATGT...1...TTT
<i>PCK1</i>	TAG	...33...TAG...121...TAGT...140...TTT
<i>ICL1</i>	TAA	...10...TAG...230...TAGT...15...TTT
<i>HXK1</i>	TAG	...16...TAG...16...TAGT...35...TTT
<i>PFK1</i>	TAG	...19...TAG...151...TAGT...21...TTT
<i>PGK1</i>	TAA	...60...TAG...29...TAGT...6...TTT
<i>PYC1</i>	TAA	...11...TAG...1...TATGT...7...TTT
<i>MLS2</i>	TAG	...42...TAG...223...TAGT...74...TTT

4.- ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD DE *YIFBP1*.

A pesar de que los análisis informáticos indicaban que el fragmento de DNA clonado codificaba una Fbp, era necesario comprobar su actividad biológica. La comprobación de que *YIFBP1* codifica la Fbp de *Y. lipolytica* se realizó sobreexpresando *YIFBP1* en *Y. lipolytica*.

Para ello se construyó el plásmido pRJ33, en el que el gen está expresado bajo el control del promotor *YITEF1* (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la

Figura 18A, las actividades específicas Fbp obtenidas con dicho plásmido resultaron ser aproximadamente 2.5 veces mayores que en la levadura control transformada con el plásmido control portador del gen *YIFBP1* en dirección opuesta, lo que demuestra que la enzima codificada por la ORF aislada presenta actividad Fbp. Además, esta actividad, al igual que la original, es inhibida por AMP, como se muestra en la Figura 18B, lo cual concuerda con que *YIFBP1* codifique una Fbp.

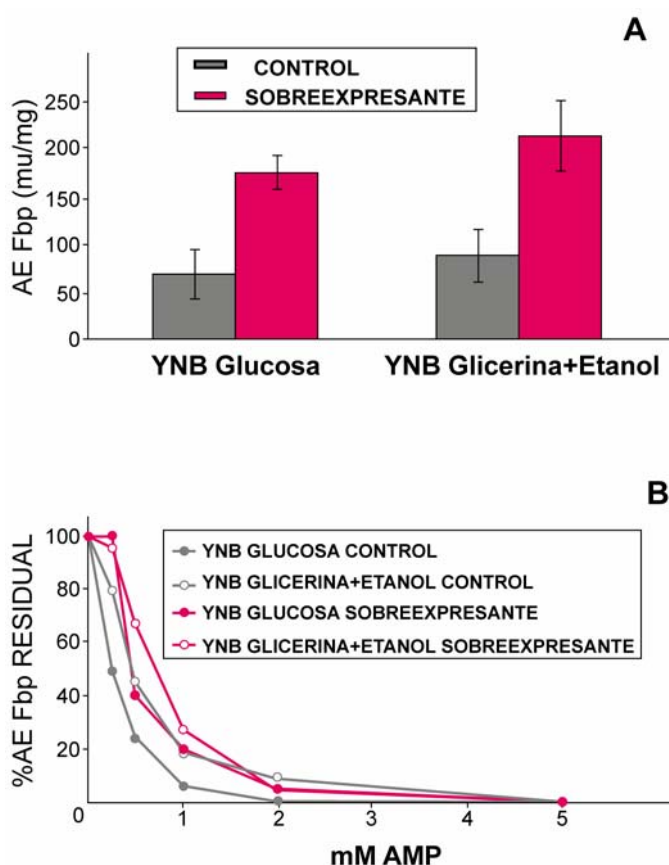


Figura 18. Sobreexpresión de *YIFBP1* en *Y. lipolytica*. La cepa PO1a de *Y. lipolytica* se transformó con el plásmido pRJ33 que porta el gen *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *YITEF1* o con un plásmido control que porta la zona codificante del gen en dirección opuesta. Las levaduras obtenidas se cultivaron en los medios indicados y se recogieron por centrifugación en fase exponencial del crecimiento. A.- Comparación de las actividades Fbp medidas en extractos del transformante control y del sobreexpresante. Los resultados corresponden a tres cultivos independientes con su desviación estándar. B.- Efecto del AMP sobre la actividad Fbp de los extractos anteriores.

También se realizaron experimentos para comprobar si la expresión de *YIFBP1* producía una proteína funcional en *S. cerevisiae*. La expresión del gen *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *ADH1* de *S. cerevisiae* permitió un lento crecimiento

de un mutante *Scfbp1* en fuentes de carbono gluconeogénicas tanto desde un plásmido episomal, pRJ34, como desde uno integrativo, pRJ35 (Figura 19). Todo ello demuestra la funcionalidad Fbp de la enzima codificada por *YIFBP1*. Es de hacer notar que la velocidad de crecimiento de las cepas que expresaban *YIFBP1* desde el plásmido integrativo era más lenta que la de aquellas que lo hacían desde el episomal. Este resultado podría explicarse si la actividad de YIFbp en *S. cerevisiae* fuese muy baja, en cuyo caso se necesitarían muchas más moléculas de la proteína para lograr una actividad apreciable lo que favorecería un ritmo de crecimiento superior en la cepa con el plásmido episomal. Esto es lo que parece suceder, ya que a pesar de la complementación fenotípica no se logró detectar actividad Fbp en extractos de los transformantes de *S. cerevisiae* que expresaban *YIFBP1*, lo cual sugiere que la estabilidad de la proteína de *Y. lipolytica* pudiera ser baja en el entorno celular de *S. cerevisiae*. Además la velocidad de crecimiento en ningún caso llega a igualar a la de la cepa control con el gen de *S. cerevisiae* reintegrado, lo cual se explicaría si la enzima se tradujese con dificultad debido por ejemplo al distinto uso de codones entre ambas levaduras (se ha calculado que el CAI de YIFbp en *S. cerevisiae* es de 0,58 frente a 0.91 en *Y. lipolytica*). Se conocen otros casos en los que la complementación funcional no va acompañada de una detección de actividad enzimática; así el gen *FBP1* de *S. pombe* complementa el crecimiento de un mutante *Scfbp1* en condiciones gluconeogénicas sin que se detecte actividad enzimática aunque sí se detecta RNAm (Vassarotti y Friesen, 1985).

Los experimentos presentados demuestran la funcionalidad Fbp de la enzima codificada por el gen aislado *YIFBP1*.

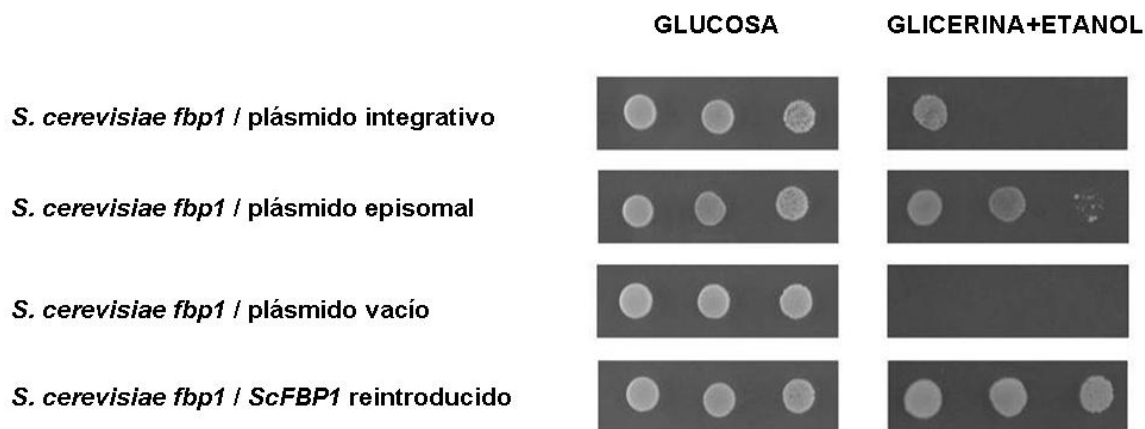


Figura 19. Complementación fenotípica de un mutante *fbp1* de *S. cerevisiae* por el gen *YIFBP1*. El mutante *S. cerevisiae fbp1* CJM197 fue transformado con los plásmidos pRJ35 (integrativo) o pRJ34 (episomal) que llevan el gen *YIFBP1* bajo el control del promotor *ScADH1*. Como control se transformó también con los plásmidos pAN10 (vacío) y pRG6 (*ScFBP1*). Se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 4.8×10^7 células/ml y a partir de ellas se hicieron diluciones seriadas 1/10. Las fotografías se tomaron después de incubar las placas a 30°C durante 2 días en el caso de las placas de glucosa y durante 9 días en el caso de las placas de glicerina+etanol.

5.- ANÁLISIS DE LA POSIBLE EXISTENCIA DE OTRO GEN CODIFICANTE DE UNA Fbp.

Una de las hipótesis para explicar la presencia constitutiva de actividad Fbp en *Y. lipolytica* sería la existencia de otro gen que codificase otra bisfosfatasa y que tuviera una regulación de la expresión distinta de la exhibida por el gen *FBP1* en otras especies de levaduras. Este gen podría presentar una secuencia homóloga a la de los genes que codifican las Fbps usuales o carecer de homología de secuencia nucleotídica con ellos. La primera de las posibilidades resulta poco probable, ya que el empleo de oligonucleótidos degenerados en la obtención del gen debería haber puesto de manifiesto este hecho mediante la obtención de distintos productos en las reacciones de PCR correspondientes a los distintos genes. Sin embargo este resultado no se observó en ningún caso. Posteriormente la secuencia completa del genoma de *Y. lipolytica* estuvo disponible en Internet (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>) y la exploración de las secuencias accesibles en ella

confirmó nuevamente nuestro resultado: no hay secuencias con homología con *YIFBP1*. En cuanto a la posible existencia de otro gen que codifique una Fbp sin homología nucleotídica con *YIFBP1*, los elementos disponibles no permitían en ese momento descartar o apoyar dicha hipótesis.

6.- INTERRUPCIÓN DE *YIFBP1* Y CONSECUENCIAS FENOTÍPICAS.

La interrupción del gen *FBP1* impide el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas en la mayor parte de los microorganismos estudiados (Sedivy y Fraenkel, 1985, de la Guerra *et al.*, 1988, Rittmann *et al.*, 2003). Si la actividad constitutiva que se ha detectado fuese debida a un único gen, puede predecirse que el fenotipo producido por la interrupción debía ser como el encontrado en otros microorganismos. En cambio, si existiese otro gen distinto que codificase otra Fbp u otra enzima con capacidad hidrolítica sobre fructosa-1,6-bisfosfato, el fenotipo podría ser distinto. Para evaluar estas alternativas se procedió a interrumpir el gen *YIFBP1*.

Células competentes de la levadura Po1a fueron transformadas con los casetes mostrados en la Figura 20A y seleccionadas por el marcador correspondiente en placas de medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Los transformantes fueron replicados a placas con etanol como fuente de carbono, sin que ninguno de ellos presentase el fenotipo esperado de falta de crecimiento en este medio (condiciones gluconeogénicas). Un análisis de 20 transformantes, obtenidos con cada uno de los casetes empleados, mediante reacción de PCR con los oligonucleótidos 8627 y 8628 (ver Materiales y Métodos) mostró que los casetes de interrupción no se habían integrado en el sitio cromosómico correcto.

La falta de éxito en la correcta integración de los casetes de interrupción podría deberse a distintas causas:

- 1) las regiones de homología flanqueantes empleadas en los casetes de interrupción tenían una longitud demasiado corta para producir una recombinación homóloga eficaz.
- 2) *YIFBP1* es un gen esencial.

3) la interrupción podría afectar a un gen adyacente esencial que cabalgara sobre la secuencia de *YIFBP1*.

Dado que estaba descrita la obtención de una alta eficiencia de interrupción de genes en *Y. lipolytica* empleando en una de las regiones de homología flanqueantes un fragmento de DNA pequeño (150 pb) si la otra región era de más de 500 pb (Barth y Gaillardin, 1996) se decidió desplazar la localización de la interrupción a lo largo del gen tanto en dirección 5' como 3' construyendo los casetes mostrados en la Figura 20B y descritos con detalle en Materiales y Métodos. Este desplazamiento permitía contemplar también la tercera posibilidad enumerada que venía sugerida por resultados del laboratorio obtenidos durante la interrupción del gen *YITPS1* (Flores, C.L. y Gancedo, C. resultados sin publicar). De nuevo se obtuvieron transformantes que no presentaban el fenotipo esperado y cuyo análisis mediante PCR mostró nuevamente que los casetes de interrupción no se habían integrado en el sitio cromosómico correcto.

A la vista del resultado se decidió aumentar a más de 1500 pb por cada lado la longitud de las zonas flanqueantes del casete homólogas a *YIFBP1*. Para ello se construyeron dos nuevos casetes de interrupción con dos marcadores distintos como se describe en Materiales y Métodos. Con estos nuevos casetes se obtuvieron transformantes que, a diferencia del control, no crecían en etanol al cabo de dos días. Un análisis de estos transformantes mediante reacción de PCR y mediante análisis de Southern mostró la correcta interrupción del gen. Los resultados se muestran en la Figura 21. Estos transformantes se denominaron RJM001 (interrupción con *YIURA3*) y RJM002 (interrupción con *YILEU2*). Este resultado descarta que el gen *YIFBP1* sea un gen esencial y muestra que en *Y. lipolytica*, al menos en este caso, es necesaria una amplia secuencia flanqueante homóloga a la del gen para obtener una integración cromosómica correcta.

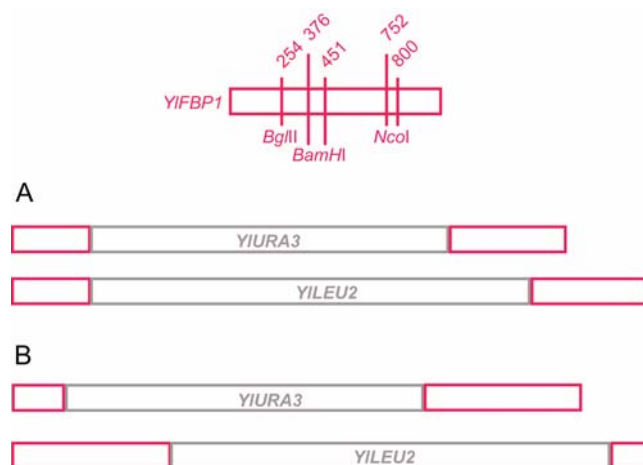


Figura 20. Construcciones utilizadas para interrumpir *YIFBP1*. A) Interrupciones en *BamHI*. Se construyeron dos casetes para la interrupción de *YIFBP1* con dos marcadores distintos: un fragmento de DNA de 1700 pb correspondiente al gen *YIURA3* o uno de 2100 pb correspondiente al gen *YILEU2* fueron ligados como se describe en Materiales y Métodos, al gen *YIFBP1* sustituyendo al fragmento de DNA previamente deletado por digestión con la enzima *BamHI* (en las posiciones 376 y 451 de la ORF del gen *YIFBP1*). B) Desplazamiento de las interrupciones a lo largo de *YIFBP1*. Como se describe en detalle en Materiales y Métodos, la interrupción se desplazó hacia el extremo 5' mediante inserción en el gen de un fragmento de DNA de 1700 pb correspondiente al gen *YIURA3* en la posición 254 tras digestión del gen *YIFBP1* con *BglII*. Asimismo se desplazó la interrupción hacia el extremo 3' mediante delección del fragmento de la ORF de *YIFBP1* comprendido entre dos sitios de corte para la enzima *NcoI* (en las posiciones 752 y 800 de la ORF del gen *YIFBP1*) e inserción en dicho punto de un fragmento de DNA de 2100 pb del gen *YILEU2*.

La reintroducción de *YIFBP1* en un plásmido episomal bajo el control del promotor de *YITEF1* revierte el fenotipo de los mutantes *Yifbp1*, confirmando que la proteína codificada por este gen es la que la levadura utiliza principalmente durante su crecimiento en condiciones gluconeogénicas. Esto descarta que exista otro gen que codifique otra proteína con actividad Fbp específica cuya expresión esté regulada de distinta forma a la esperada.

A pesar de que los mutantes no crecieron a la velocidad de un silvestre en fuentes de carbono gluconeogénicas, se observó al cabo de varios días un crecimiento apreciable (Figura 22). Este crecimiento contrasta con la absoluta ausencia del mismo observada en los mutantes carentes de Fbp en otras levaduras (Sedivy y Fraenkel, 1985, de la Guerra *et al.*, 1988, Rittmann *et al.*, 2003). El lento crecimiento observado en estas condiciones podría deberse a la existencia de una actividad

enzimática capaz de hidrolizar fructosa-1,6-bisfosfato o a la aparición de supresores extragénicos.

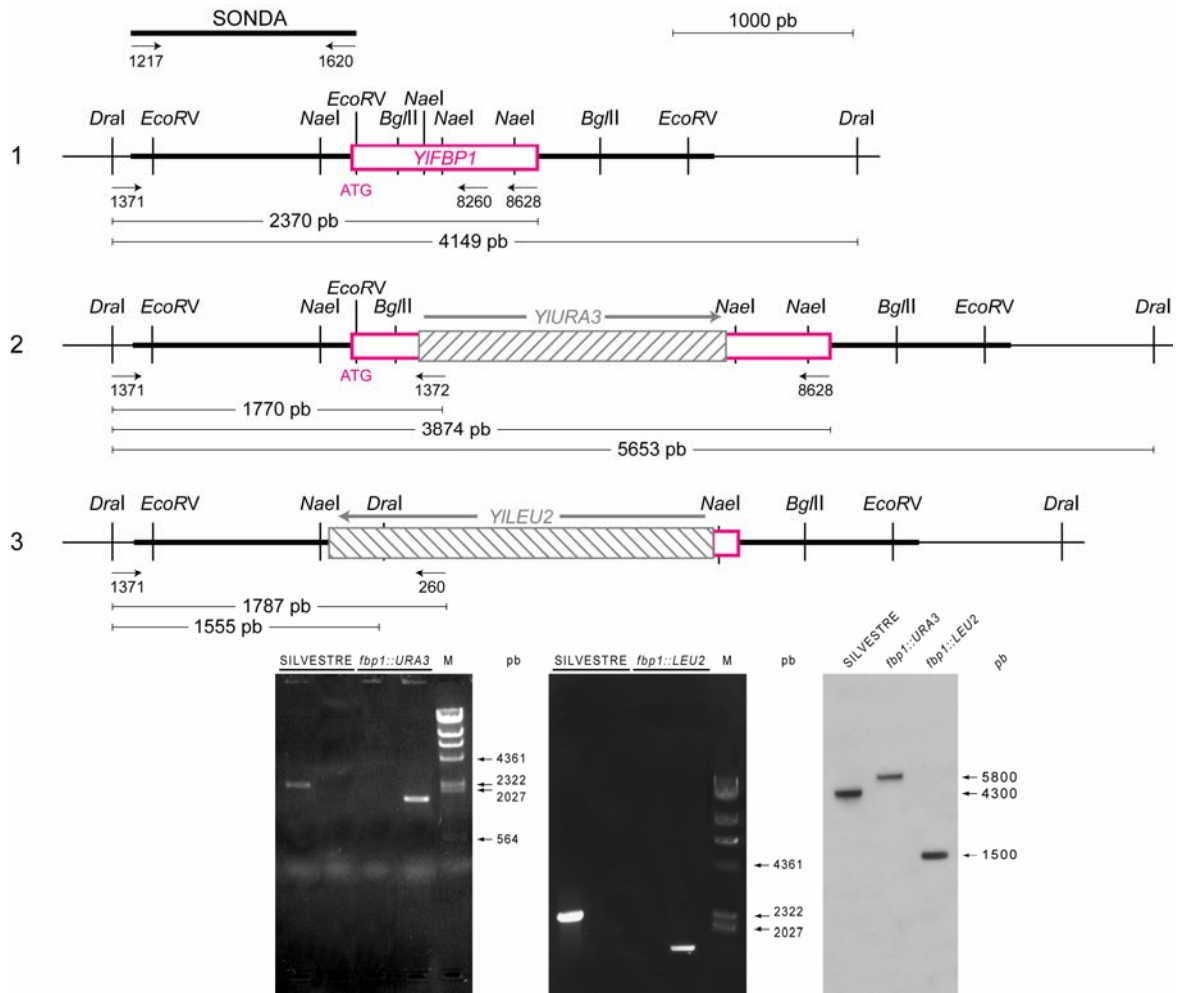


Figura 21. Interrupción de *YIFBP1*. El gen *YIFBP1* fue interrumpido usando los casetes mostrados en los apartados 2 y 3 de la Figura y descritos en Materiales y Métodos. La cepa PO1a fue transformada con dichos casetes, seleccionándose para su estudio los transformantes que a los dos días de incubación crecían en placas con glucosa, pero no en placas con etanol como fuente de carbono. Para comprobar la correcta interrupción cromosómica del gen se hicieron reacciones de PCR con los oligonucleótidos 1371 y 1372 en el caso de del marcador *URA3* y con el 1371 y el 260 en el caso del marcador *LEU2*. En todos los casos se llevó como control una reacción de PCR con los oligonucleótidos 1371 y 8628, que debe resultar positiva exclusivamente si *YIFBP1* no se encuentra interrumpido (primer carril de cada pareja). También se hicieron PCRs control con los distintos pares de oligos utilizando como molde DNA genómico de PO1a, apartado 1. Todas las cepas fueron comprobados por análisis de Southern, digiriendo el DNA genómico con *DraI* e hibridando las muestras con un fragmento de 1200 pb correspondiente a la región promotora de *YIFBP1* obtenido mediante reacción de PCR sobre DNA genómico de Po1a con los oligonucleótidos 1217 y 1620. M = marcador

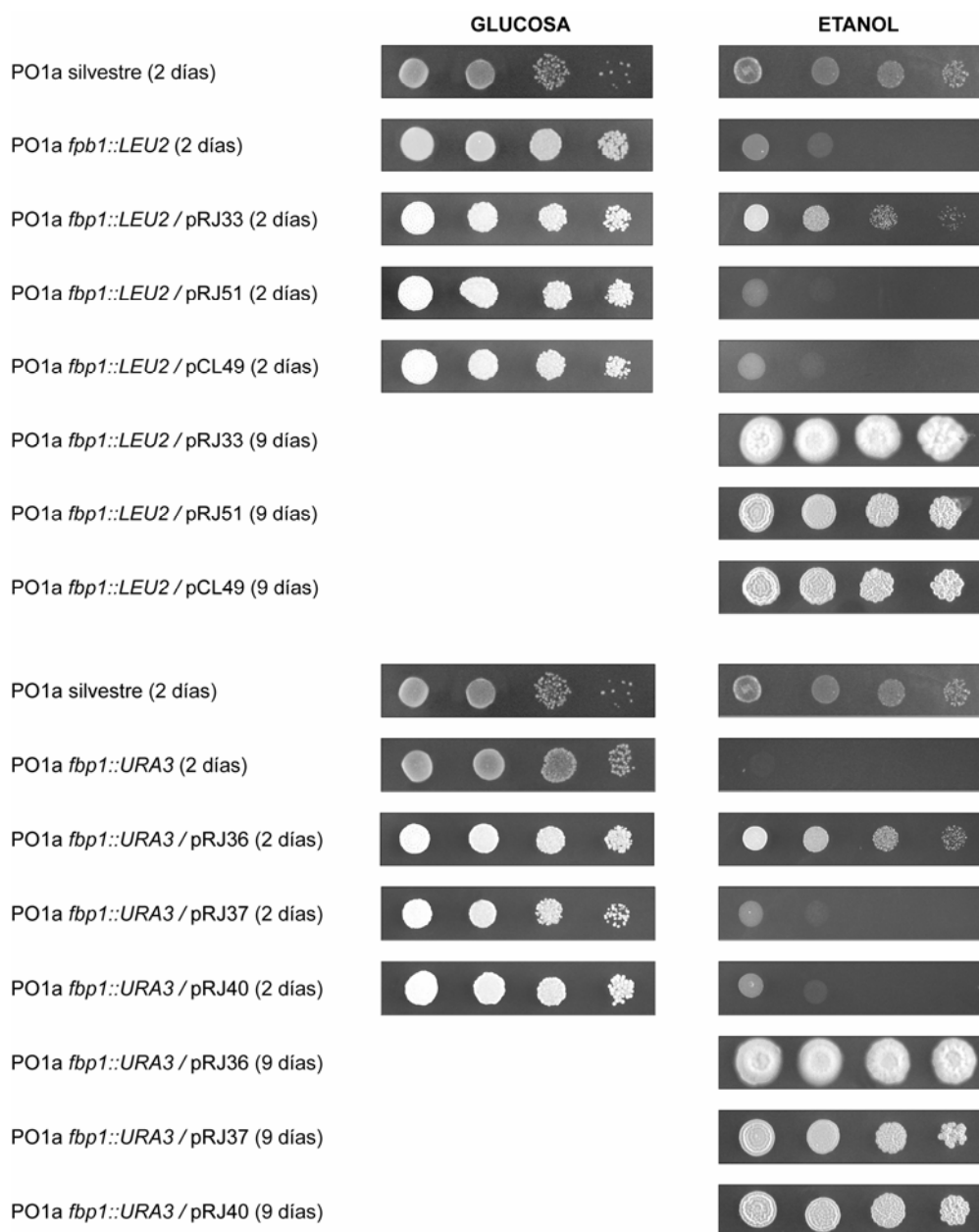


Figura 22. Efecto de la interrupción de *YIFBP1* sobre el crecimiento de *Y. lipolytica* en condiciones glicolíticas y gluconeogénicas. Mutantes *Yifbp1* interrumpidos con *YILEU2* en fondo Po1a fueron transformados con los plásmidos pRJ33 (ver Materiales y Métodos) que reintroduce el gen *YIFBP1*, pRJ51 (inserto en dirección opuesta) y pCL49 (control sin inserto). Mutantes *Yifbp1* interrumpidos con *YIURA3* fueron transformados con los plásmidos pRJ36 que reintroduce el gen *YIFBP1*, con el pRJ37 (inserto en sentido opuesto) y con pRJ40, (sin inserto). Estos transformantes, la cepa silvestre y los mutantes interrumpidos fueron cultivados en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono; se prepararon suspensiones de todas ellas a 2×10^7 células/ml y diluciones seriadas 1/10, 1/100 y 1/1000 a partir de ellas. Estas soluciones fueron goteadas simultáneamente en placas de medio mínimo con glucosa o etanol como fuentes de carbono, fotografiándolas a los tiempos indicados.

Para examinar si el crecimiento se debía a la aparición de supresores extragénicos, se realizó el siguiente experimento: la cepa Po1a silvestre, la mutante *Ylfbp1* y la mutante con el gen *YIFBP1* reintroducido bajo el control del promotor *YITEF1* se cultivaron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y se prepararon suspensiones de cada una de ellas a una concentración celular aproximada de 3×10^3 colonias/ml. De cada una de estas suspensiones se extendieron 100 μ l en placas de medio mínimo con glucosa, glicerina o etanol como fuentes de carbono. Si el crecimiento en fuentes gluconeogénicas se debiese a la aparición de supresores extragénicos habría que esperar que mientras que toda la población creciese en glucosa, sólo algunas colonias lo hiciesen en glicerina y en etanol. Asimismo el número de colonias en estas placas debería presentar una distribución aleatoria. El resultado se muestra en la Figura 23. Como puede verse en ella, en todas las fuentes de carbono el número de colonias contabilizado fue muy similar, lo que descarta la posibilidad de que el crecimiento observado a largo plazo en etanol sea debido a la aparición de supresores extragénicos.

El resultado anterior indica que debe existir una actividad que sustituya, con baja eficiencia, a la función que lleva a cabo normalmente YIFbp.

Cuando se midió la actividad Fbp en extractos de la levadura mutante *Ylfbp1*, usando el método de valoración usual, se detectó una actividad Fbp de aproximadamente 20 mU/mg_{proteína} cuyo valor no variaba en condiciones de crecimiento glicolíticas o gluconeogénicas. Este resultado muestra que aunque la actividad Fbp medida en una cepa silvestre en presencia de glucosa, alrededor de 90 mU/mg_{proteína}, es mayoritariamente debida a la acción de la Fbp específica, existe otra que también actúa sobre fructosa-1,6-bisfosfato. El hallazgo de esa actividad es consistente con la idea de que el crecimiento lento observado en las cepas con el gen *YIFBP1* interrumpido se debe a una fosfatasa con actividad marginal sobre fructosa-1,6-bisfosfato; a la enzima responsable de dicha actividad se la designó como XPasa. En el apartado 6.4. se muestran algunas de sus diferencias cinéticas con la Fbp mayoritaria que sugieren que se trataría de una fosfatasa no específica para fructosa-1,6-bisfosfato.

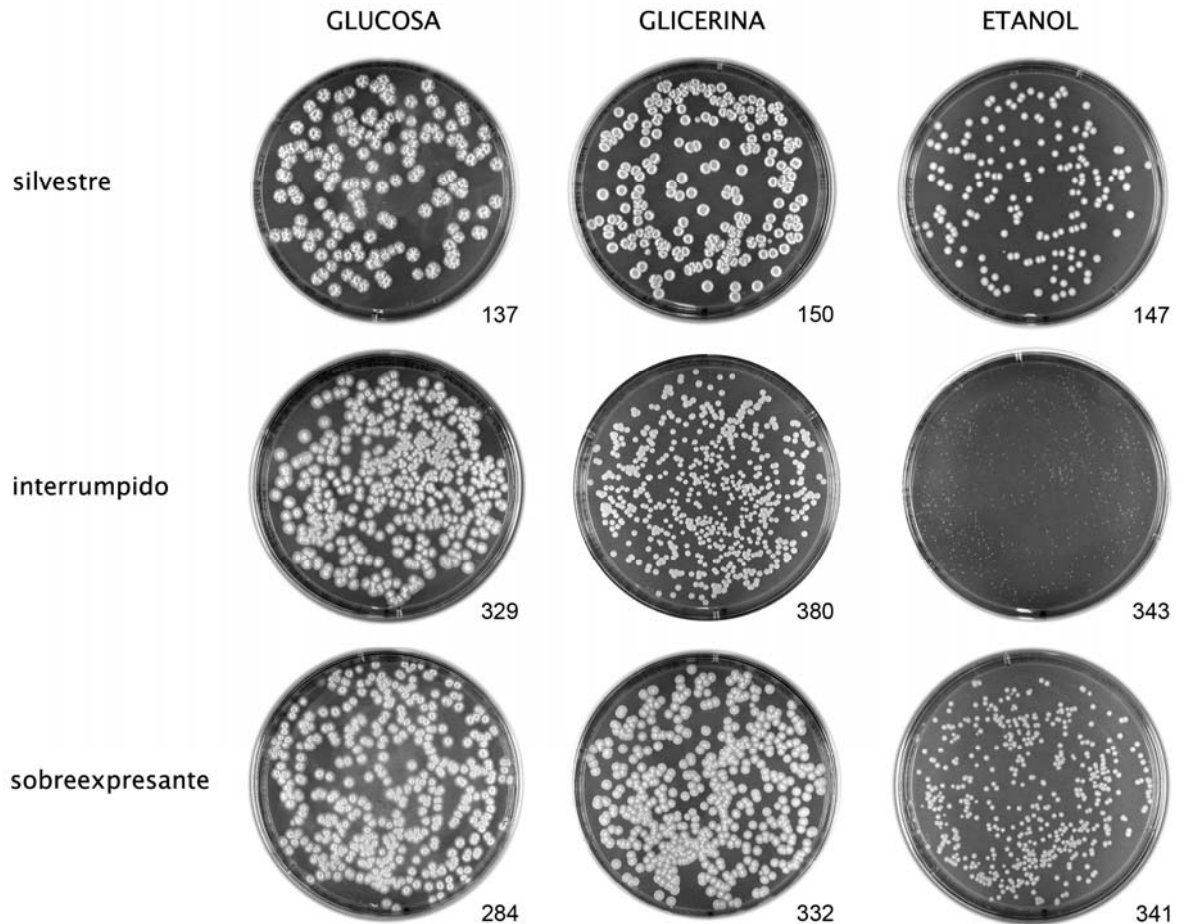


Figura 23. El crecimiento de los mutante *Yfbbp1* en fuentes de carbono gluconeogénicas no se debe a la aparición de supresores extragénicos. Se prepararon suspensiones de la cepa silvestre, de la mutante *Yfbbp1* y de la mutante a la que se le había restituido el gen (sobreexpresándolo bajo el control del promotor de *YITEF1* mediante transformación de la cepa con el plásmido pRJ33) y se extendió el mismo volumen de cada suspensión en placas de medio mínimo con glucosa, glicerina o etanol como fuentes de carbono. El número de colonias de *Yfbbp1* obtenidas en cada placa es muy similar descartando que su crecimiento en condiciones gluconeogénicas sea debido a la aparición de supresores extragénicos. El número de colonias contabilizado en cada placa se incluye en el borde inferior derecho de cada una de ellas.

El pequeño tamaño de las colonias del mutante *Yfbbp1* en etanol se debe a que las placas se fotografiaron a los 4 días de su inoculación.

6.1.- Diferencias morfológicas entre el mutante *Yifbp1* y la cepa silvestre.

Un examen detallado de las colonias del mutante *Yifbp1* a lo largo del lento crecimiento en condiciones gluconeogénicas hizo patente una diferencia morfológica entre las colonias de la cepa silvestre y las de la cepa interrumpida durante el crecimiento en presencia de etanol o glicerina: mientras que las colonias silvestres presentaban un aspecto piloso, las mutantes eran lisas y carentes de filamentos.

Para descartar que las diferencia morfológicas fuesen debidas a alguna mutación aleatoria introducida durante el proceso de transformación para la integración de los casetes de interrupción se observó la morfología de la cepa mutante a la que se le reintrodujo el gen *YIFBP1* bajo el control de su propio promotor o bajo el control del promotor de *YITEF1*. Se prestó particular atención para evitar que las cepas empleadas en el experimento tuviesen auxotrofías diferentes entre sí. Como cepa silvestre de *Y. lipolytica* se empleó CLIB89 (W29), prototrofa parental de la cepa Po1a empleada en este estudio.

Para lograr una cepa prototrofa del mutante *Yifbp1::URA3* se reintrodujo el gen *YILEU2* en dicha cepa usando un fragmento *Sall-NotI* de 5200 pb obtenido de pINA62s. La correcta integración del gen fue comprobada por crecimiento de la cepa en ausencia de leucina en el medio y mediante reacción de PCR (datos no mostrados). Una de las cepas resultantes fue denominada RJM003 y empleada como *Yifbp1* en el estudio.

Para reintroducir *YIFBP1* en el mutante *Yifbp1::URA3* se transformó la cepa con el plásmido pRJ42 que lleva *YILEU2* como marcador y el gen *YIFBP1* bajo el control de su propio promotor y seguido de su región terminadora. Sin embargo al detectar en los transformantes un nivel de actividad Fbp tres veces superior al medido en los silvestres se optó por integrar el gen en el genoma. Esta mayor actividad puede ser debida a que los plásmidos replicativos en *Y. lipolytica* presentan más de una copia por célula y la cepa PO1a empleada, como todas las derivadas de W29, presenta frecuentemente mala segregación de plásmidos, por lo que contiene más plásmidos por célula (Fournier *et al.*, 1991). Células competentes de la cepa mutante *Yifbp1::URA3* fueron transformadas con el plásmido pRJ43 (ver Materiales y

Métodos) linearizado con *Apal*. Éste es un plásmido integrativo que contiene las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1* y que dirige la integración de la construcción a *YILEU2*, regenerando dicho gen. La correcta integración de la construcción fue comprobada en aquellos transformantes que recuperaban un ritmo de crecimiento normal en fuentes de carbono gluconeogénicas en ausencia de leucina en el medio mediante reacción de PCR como se muestra en la Figura 24. La cepa resultante se denominó RJM004.

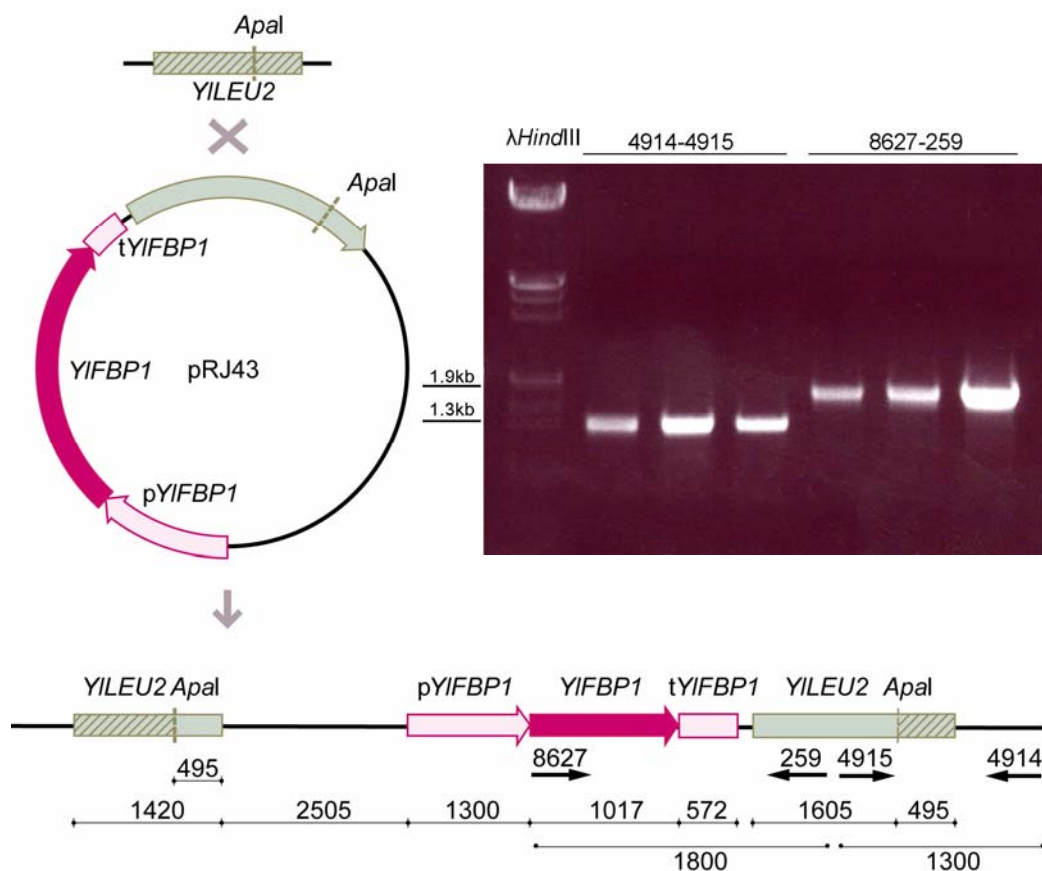


Figura 24. Estrategia para la reintegración del gen *YIFBP1* en una cepa interrumpida *Yifbp1::URA3*. El plásmido integrativo pRJ43 (ver Materiales y Métodos), que contiene las regiones promotora, codificante y terminadora del gen *YIFBP1*, fue linearizado por digestión con *Apal* y empleado así en la transformación de la cepa mutante *Yifbp1::URA3* de *Y. lipolytica*. Se seleccionaron transformantes que habían recuperado un crecimiento normal en fuentes de carbono gluconeogénicas. La correcta integración de la construcción fue comprobada mediante reacción de PCR con dos juegos distintos de oligonucleótidos. La figura muestra un esquema de la integración así como la comprobación de la misma por PCR usando tres transformantes independientes.

Para comprobar si con este método se tenían valores de actividad enzimática similares a los de un silvestre se valoró la actividad Fbp en extractos crudos de esta cepa, obteniéndose valores similares a los de una cepa silvestre, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Actividad enzimática (mU/mg_{proteína}) de enzimas gluconeogénicas en extractos crudos de la cepa mutante *Ylfbp1* a la que se le ha reintroducido el gen *YIFBP1* con sus propias regiones promotora y terminadora (cepa RJM004). Las levaduras de la cepa RJM004 fueron cultivadas en condiciones de crecimiento glicolíticas (YPD) y gluconeogénicas (YPEtanol) y recogidas en la fase exponencial de crecimiento por centrifugación. Se valoraron las actividades enzimáticas de la Fbp, Pck e Icl como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados mostrados corresponden a tres cultivos independientes con su desviación estándar en cada caso. Los valores de la cepa silvestre se han tomado de la Tabla 3.

Medio		<i>Ylfbp1</i>		silvestre	
		YPD	YPEtanol	YPD	YPEtanol
Enzima					
Fbp		106±6	116±2	80±8	98±8
Pck		21±2	325±29	13±6	290±11
Icl		27±2	350±25	32±5	300±33

La cepa sobreexpresante se obtuvo mediante transformación de *Ylfbp1::URA3* con el plásmido pRJ36 (ver Materiales y Métodos) que contiene la región codificante de *YIFBP1* bajo el control del promotor del gen *YITEF1*, obteniéndose la cepa RJM006. Una vez obtenidas las cepas mencionadas se procedió a su comparación morfológica; para ello suspensiones de cada una de las cepas fueron extendidas en placas de medio mínimo con las distintas fuentes de carbono a ensayar: glucosa, etanol, glicerina y acetato. Mientras que en glucosa la apariencia de las colonias era similar en todos los casos, con espículas o vellosidades y de superficie irregular con algunas protuberancias, en etanol y en glicerina se observó una diferencia entre las colonias de la cepa silvestre y las del mutante. Las colonias de la cepa silvestre presentaban un aspecto veloso, espiculado, mientras que las de la mutante lo

presentaban céreo y carente de vellosidades (Figura 25). En el caso del acetato, tanto las colonias de la cepa silvestre como las de la mutante presentaban vellosidades, de lo que se deduce que la falta de las mismas no es un fenotipo asociado al crecimiento en condiciones gluconeogénicas de un mutante *Ylfbp1*. Los resultados indican que la diferencia observada depende de la fuente de carbono usada. No se observaron diferencias en la apariencia de suspensiones o cultivos de las células correspondientes al microscopio.

Es de hacer notar que esta morfología revierte cuando se reintroduce *YIFBP1*, ya sea integrado nuevamente en el genoma y expresándose bajo la acción de su propio promotor o desde un plásmido bajo la acción del promotor de *YITEF1*, lo que demuestra que este fenotipo es realmente debido a la ausencia de *YIFBP1*.

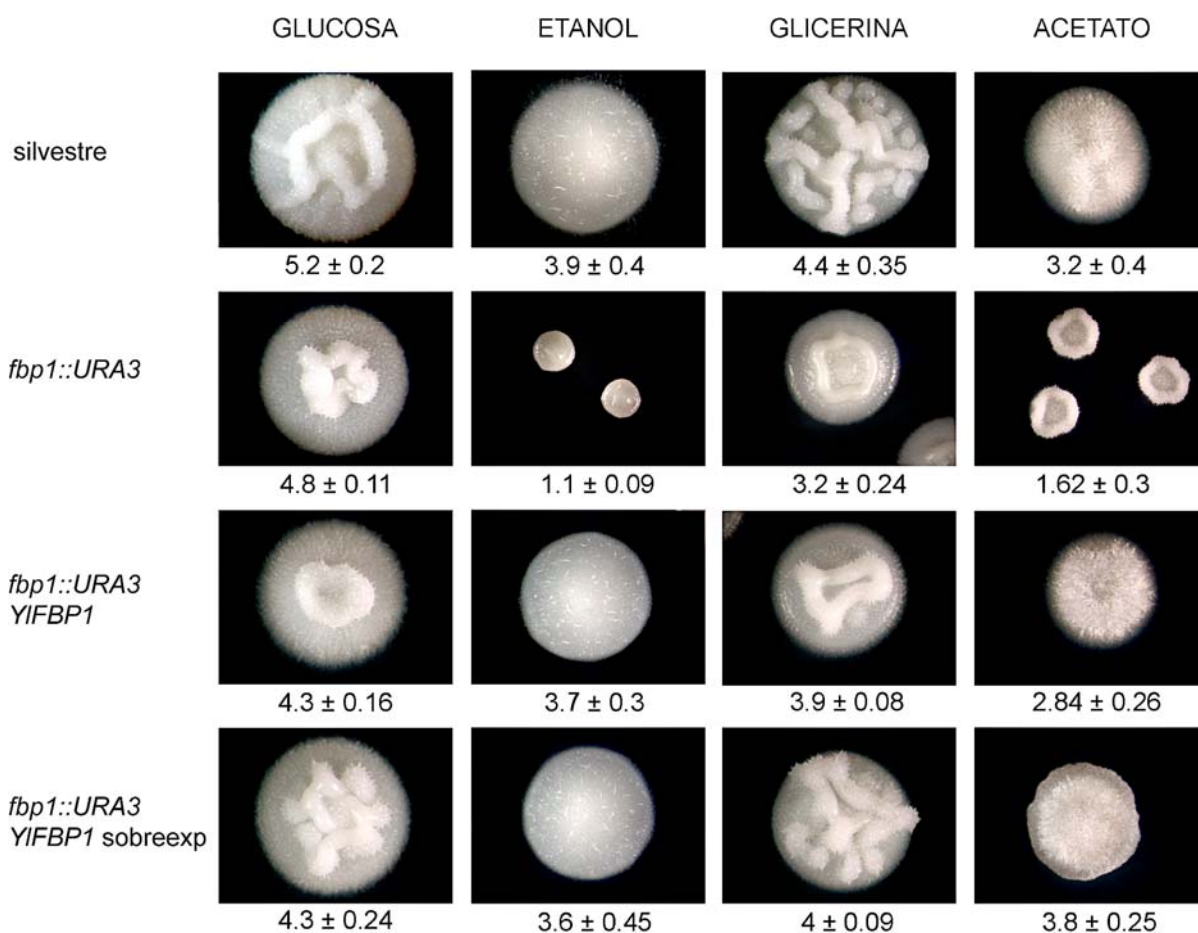


Figura 25. Diferencias morfológicas entre la cepa silvestre y la mutante *Yifbp1*. Levaduras de las cepas silvestre (W29), interrumpida (RJM003), interrumpida con el gen *YIFBP1* reintegrado (RJM004) y sobreexpresante en fondo interrumpido (RJM006) fueron cultivadas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y recogidas durante la fase exponencial del crecimiento. Posteriormente se prepararon diluciones a una concentración de 2000 células/ml. 100 μ l de cada una de ellas se extendieron en placas de medio mínimo con glucosa, etanol, glicerina o acetato como fuentes de carbono y se incubaron a 30°C durante ocho días tras los cuales las imágenes fueron tomadas empleándose un aumento 10x. Debajo de cada imagen aparece el tamaño medio de las colonias en milímetros con su desviación estándar (obtenido de la medición en cada caso de 20 colonias).

6.2.- Efectos de la interrupción de *YIFBP1* sobre la velocidad de crecimiento.

Las observaciones en placas realizadas durante el proceso de selección de los mutantes *Yifbp1* mostraron que el crecimiento de los mismos era más lento que el de un silvestre en fuentes de carbono gluconeogénicas. La cuantificación de ese resultado se realizó midiendo los tiempos de generación en cultivos líquidos de medio mínimo. Los resultados mostrados en la Tabla 10 son consistentes con la observación del tamaño de las colonias en los experimentos mencionados anteriormente. Llama la atención que frente al 54 % de aumento del tiempo de generación observado en acetato y el 47% observado en etanol, en el medio con glicerina sea tan solo de un 15%.

Curiosamente la interrupción del gen *YIFBP1* causó un aumento del tiempo de generación en medio con glucosa de un 13%. Hubiese cabido pensar que si en el silvestre ocurriese un ciclo inútil Pfk-Fbp, la interrupción del gen *YIFBP1* supondría una ventaja para la levadura durante el crecimiento en glucosa, evitando el ciclo inútil y el consecuente gasto de energía metabólica.

El resultado obtenido es el contrario, lo cual podría explicarse si la proteína tuviese otra función distinta de la metabólica. En este caso la predicción hubiese sido que la eliminación del gen podría o tener escaso efecto sobre la velocidad de crecimiento si la función no metabólica fuese secundaria o resultar perjudicial si dicha función fuese importante para el crecimiento en glucosa. El resultado obtenido es consistente con esta hipótesis.

Durante estos experimentos observamos que la cepa mutante tardaba más en empezar a crecer que la cepa silvestre en un medio fresco cuando provenía de un medio en fase estacionaria. En algunos casos esta diferencia fue muy importante, por ejemplo, en etanol esa fase de latencia fue de aproximadamente 20 horas frente a unas 2 horas observadas en el caso del silvestre.

Tabla 10. Tiempos de generación (Tgeneración, minutos) de la cepa silvestre y del mutante *Ylfbp1* en distintas fuentes de carbono. Las levaduras fueron cultivadas en medio mínimo con las fuentes de carbono indicadas e incubadas a 30°C. El tiempo de generación fue seguido midiendo la densidad óptica de los cultivos a 660nm. Cada valor corresponde a la media del tiempo de generación de tres cultivos independientes seguidos de su desviación estándar.

	GLUCOSA		ETANOL		GLICERINA		ACETATO	
	SILVESTRE	<i>Ylfbp1</i>	SILVESTRE	<i>Ylfbp1</i>	SILVESTRE	<i>Ylfbp1</i>	SILVESTRE	<i>Ylfbp1</i>
Tgeneración	94±5	107±8	313±11	460±34	123±3	142±3	190±14	293±9

6.3. Competición entre una cepa silvestre y una cepa mutante *Ylfbp1*.

Aunque la diferencia de un 13% en el tiempo de generación en glucosa entre un silvestre y el mutante *Ylfbp1* puede no parecer muy grande, en un medio competitivo puede ser suficiente para que la cepa silvestre domine un cultivo mixto en un tiempo relativamente corto. Si a esa diferencia se añade una latencia superior del mutante para reiniciar el crecimiento desde un cultivo no exponencial puede predecirse que el mutante está en franca desventaja en una competición con la cepa silvestre. Para someter a prueba esta idea, se realizó un experimento de competición entre ambas cepas.

Diversos resultados han mostrado que los experimentos de competición entre cepas silvestres y mutantes proporcionan una buena medida de la “adecuación” (fitness) de esas cepas en los casos en que la diferencia de tiempos de generación en una determinada condición no es muy grande (Danhash *et al.*, 1991, Baganz *et al.*, 1997). Estos experimentos se hacen en cultivos en “batch” realizando transferencias seriadas a medios frescos para prolongar el periodo de competición (Smith *et al.*, 1995, Navas y Gancedo, 1996, Thatcher *et al.*, 1998) o usando técnicas de cultivos continuos (Baganz *et al.*, 1998). En nuestro caso hemos realizado transferencias seriadas cada 24 horas, en experimentos que se prolongaron 8 días desde el momento del inóculo inicial.

El resultado que se muestra en la Figura 26 confirma la predicción de ventaja de la cepa silvestre sobre la interrumpida: partiendo de una relación de células

silvestres/células *Ylfbp1* de 0.72, se llega al cabo de 8 días a una relación de 19. Este resultado, previsible con los datos del tiempo de generación, sugieren que YIFbp tiene otra función distinta de la metabólica, que aún no siendo indispensable, mejora la “adecuación” de la levadura.

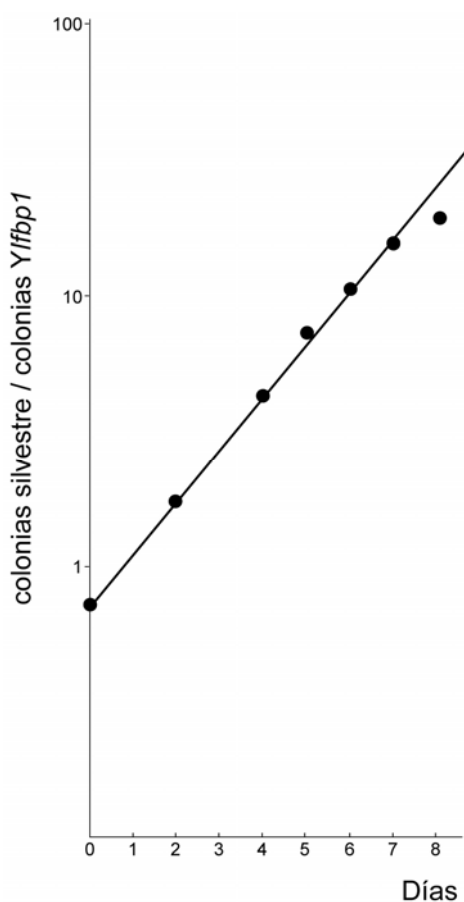


Figura 26. Competición entre una cepa silvestre y una mutante *Ylfbp1* en un cultivo mixto. Una mezcla equilibrada de ambas cepas se empleó para inocular medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Cada 24 horas se realizaron transferencias a medio fresco teniendo especial cuidado en que el cultivo se encontrase siempre en fase exponencial de crecimiento, hasta un total de ocho días. En los días indicados en la gráfica se tomaron muestras de dichos medios con las que se inocularon placas de medio mínimo con glicerina como fuente de carbono. Tras tres días de incubación de las placas a 30°C se llevó a cabo un recuento de las colonias obtenidas de cada cepa, distinguibles a simple vista por su diferencia de diámetro. Asimismo se comprobó mediante reacción de PCR la identidad de una parte estadísticamente significativa de cada tipo de colonia de las placas inoculadas el octavo día. En el gráfico se muestra el logaritmo de la relación entre las colonias silvestres y las mutantes frente a los días transcurridos desde la primera inoculación. La relación colonias silvestre/colonias mutante corresponde a la media del conteo de tres placas.

6.4.- Valoración de metabolitos intracelulares.

Teniendo en cuenta la constitutividad de YIFbp podría esperarse que su eliminación resultase en cambios importantes en las concentraciones intracelulares de

metabolitos situados en la región metabólica de las hexosas fosfato y quizá en la del ATP. Por tanto se procedió a la valoración de una serie de metabolitos creciendo la levadura en medios con distintas fuentes de carbono. La Tabla 11 muestra los valores medidos y su comparación con una cepa silvestre crecida en las mismas condiciones. Como puede verse la concentración de fructosa-1,6-bisfosfato fue siempre mayor en el mutante que en el silvestre en cualquier fuente de carbono, aunque la diferencia fue más marcada en los cultivos con fuentes de carbono gluconeogénicas. El hecho de que también aumente en glucosa puede indicar que la actividad Fbp también es funcional en dichas condiciones. El aumento de ATP en esos cultivos podría indicar la eliminación de un ciclo inútil Pfk-Fbp operativo en la cepa silvestre. El gran aumento en la concentración de fructosa-1,6-bisfosfato en los cultivos del mutante en condiciones gluconeogénicas es consistente con la idea de que YIFbp es la enzima mayoritariamente responsable de la hidrólisis de la fructosa-1,6-bisfosfato. Como consecuencia de la falta de la proteína se produce también una disminución muy marcada en las concentraciones de hexosa monofosfatos en los cultivos correspondientes. Llama la atención la elevada concentración de fructosa-1,6-bisfosfato en los cultivos en glicerina frente a los observados en etanol o acetato; este hecho va acompañado de una mayor concentración de hexosas monofosfato lo que junto con la ventaja de crecimiento en esta fuente de carbono podría indicar que la velocidad de metabolismo de la glicerina es mayor que la de los otros compuestos y que en esas condiciones el aumento de fructosa-1,6-bisfosfato permitiría a la Fbp o a la XPasa proporcionar mayor concentración de hexosas monofosfato. La mayor velocidad de crecimiento en glicerina con respecto a la medida en etanol y acetato podría ser una consecuencia de este perfil metabólico.

Es de resaltar que incluso en fuentes de carbono gluconeogénicas, la concentración de ATP fue siempre algo más elevada en el mutante que en el silvestre.

Tabla 11. Concentraciones intracelulares (mM) de los metabolitos seleccionados en una cepa silvestre (RJM005) de *Y. lipolytica* y en una cepa mutante *Yifbp1::LEU2* (RJM002) en distintas fuentes de carbono. Las cepas RJM005 (silvestre) y RJM002 (*Yifbp1::LEU2*) de *Y. lipolytica* se cultivaron en medio rico con las fuentes de carbono indicadas hasta una DO_{600} entre 0.8 y 1 y se trataron como se describe en Materiales y Métodos. La tabla muestra los valores de la media de 4 cultivos independientes seguida de la desviación estándar

Metabolito	GLUCOSA		ETANOL		GLICERINA		ACETATO	
	silvestre	<i>Yifbp1</i>	silvestre	<i>Yifbp1</i>	silvestre	<i>Yifbp1</i>	silvestre	<i>Yifbp1</i>
Glucosa-6-P	0.47±0.10	0.43±0.10	0.18±0.02	0.04±0.01	0.50±0.10	0.13±0.02	0.17±0.04	0.06±0.01
Fructosa-6-P	0.13±0.03	0.11±0.01	0.04±0.01	≤0.02	0.12±0.05	0.06±0.01	0.04±0.01	≤0.02
Fructosa-1,6-P ₂	0.25±0.03	0.34±0.09	0.03±0.01	0.11±0.02	0.17±0.01	0.65±0.06	0.03±0.01	0.29±0.06
ATP	0.53±0.01	0.69±0.08	0.56±0.06	0.87±0.08	0.50±0.06	0.70±0.10	0.72±0.05	0.64±0.03

6.5. Características cinéticas de YIFbp y de YIXPasa.

Se estudiaron las características cinéticas de la enzima YIFbp, principal responsable del crecimiento de la levadura en condiciones de crecimiento gluconeogénicas, para compararlas con las de la enzima XPasa con actividad Fbp marginal que suponemos permitió el crecimiento de mutantes *Yifbp1* en esas condiciones. Para el estudio de las propiedades cinéticas de YIFbp los extractos procedían de la cepa RJM006 que sobreexpresa el gen *YIFBP1* asegurando así que la mayor parte de la actividad medida fuera debido a YIFbp; los valores obtenidos se consideran pues representativos de YIFbp. En el estudio de las propiedades de XPasa se usó una cepa mutante *Yifbp1*.

La YIFbp mostró una K_M para fructosa-1,6-bisfosfato de 30 μM (Figura 27), un valor aproximadamente 25 veces superior al de la enzima de *S. cerevisiae* (Funayama *et al.*, 1979) y en el rango usual de otras Fbps de distintos orígenes [13 μM en *B. subtilis* (Fujita y Freese, 1979), 3.1 μM en *Malus domestica*- manzana- (Zhou y Cheng, 2004), 130 μM en cerebro de mamífero (Majumder y Eisenberg, 1977)]. La enzima es inhibida por AMP con una K_i de 0.8 mM (Figura 28), propiedad compartida por la mayoría de las Fbps y en un rango comparable (Gancedo *et al.*, 1965, Kelley-Loughnane y Kantrowitz, 2001, Rittmann *et al.*, 2003, Zhou y Cheng, 2004). Asimismo, la fructosa-2,6-bisfosfato, otro inhibidor característico de las Fbps (van Schaftingen y Hers, 1981, Gancedo *et al.*, 1982, Marcus *et al.*, 1984, Hue y Rider, 1987, Okar y Lange, 1999) inhibió, a concentración saturante de sustrato, un 50% de la actividad Fbp a una concentración de 0.18 μM (Figura 28), un valor del mismo orden que el encontrado en otras Fbps (Lederer *et al.*, 1981, Pilkis *et al.*, 1981, Skalecki *et al.*, 1995). Como otras Fbps, la enzima de *Y. lipolytica* requiere un catión divalente mostrando claramente mayor actividad con Mg^{++} que con Mn^{++} . La actividad con este último catión se detecta en una estrecha zona de concentraciones alrededor de 1 mM, mientras que la observada con Mg^{++} permanece elevada entre 3 y 10 mM.

El PEP, que es un inhibidor de la Fbp de *B. subtilis* (Fujita y Freese, 1979), no mostró efecto alguno en la zona fisiológica de concentraciones apareciendo ésta a

concentraciones muy superiores (40 mM de PEP inhibe el 50% de la actividad a concentraciones saturantes de sustrato).

Las características cinéticas de la enzima XPasa son claramente distintas de las de YIFbp. En primer lugar, su afinidad por el sustrato fructosa-1,6-bisfosfato es mucho menor, con una $K_M = 2.3$ mM (Figura 27). Asimismo, aunque el AMP y la fructosa-2,6-bisfosfato inhiben esta enzima, su efecto es mucho menor que en el caso de YIFbp siendo la K_i para el AMP de 3mM (aproximadamente 4 veces superior a la de YIFbp) y produciendo la fructosa-2,6-bisfosfato una inhibición máxima, en condiciones saturantes de sustrato, del 46% a una concentración de 100 μ M (concentración 550 veces mayor que la necesaria para lograr la misma inhibición de YIFbp) (Figura 28). El PEP tiene un mayor efecto inhibitor que el encontrado sobre YIFbp aunque también fuera del rango biológico de concentración de ese compuesto. El PEP inhibe, a concentraciones saturantes de sustrato, el 50% de la actividad XPasa a una concentración de 4 mM (inhibición 10 veces mayor a la observada en el caso de YIFbp).

Llama la atención la distinta sensibilidad al Li^+ de ambas enzimas: mientras que una concentración de 1 mM inhibe, en presencia de un exceso de sustrato, el 50% de la actividad de YIFbp, se necesita una concentración 25 veces superior para lograr el mismo efecto sobre XPasa. Ambas enzimas son igualmente sensibles a inhibición por Na^+ , siendo la concentración necesaria de NaCl para inhibir un 50% de las actividades YIFbp e YIXPasa, en condiciones saturantes de sustrato, en torno a 80 mM.

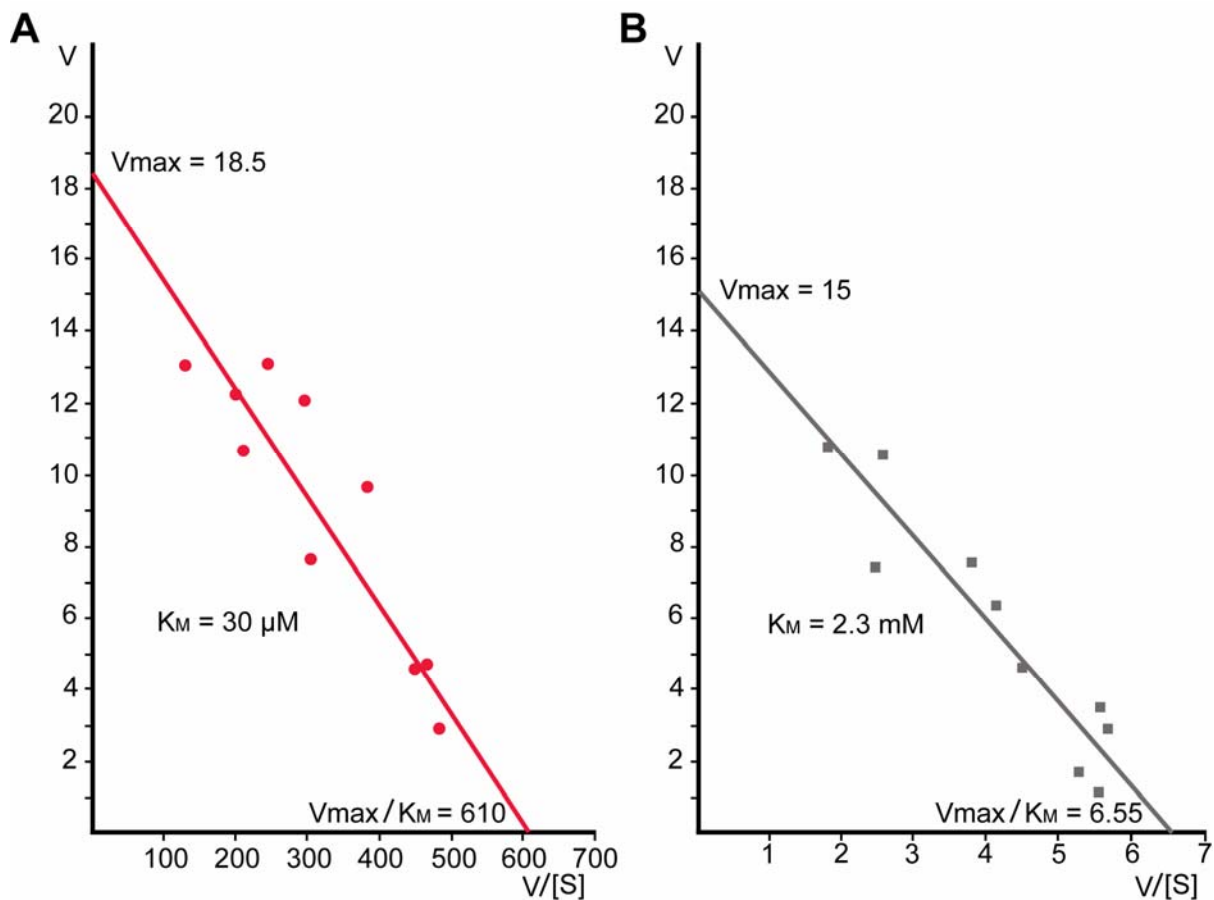


Figura 27. Determinación de la K_M de YIFbp e YIXPasa para fructosa-1,6-bisfosfato. El cálculo de la K_M de ambas enzimas para el sustrato fructosa-1,6-bisfosfato se llevó a cabo mediante la representación de Eadie-Hofstee A) Determinación de K_M de YIFbp y B) Determinación de K_M de XPasa. V (mmol min⁻¹) y $V/[S]$ (min⁻¹).

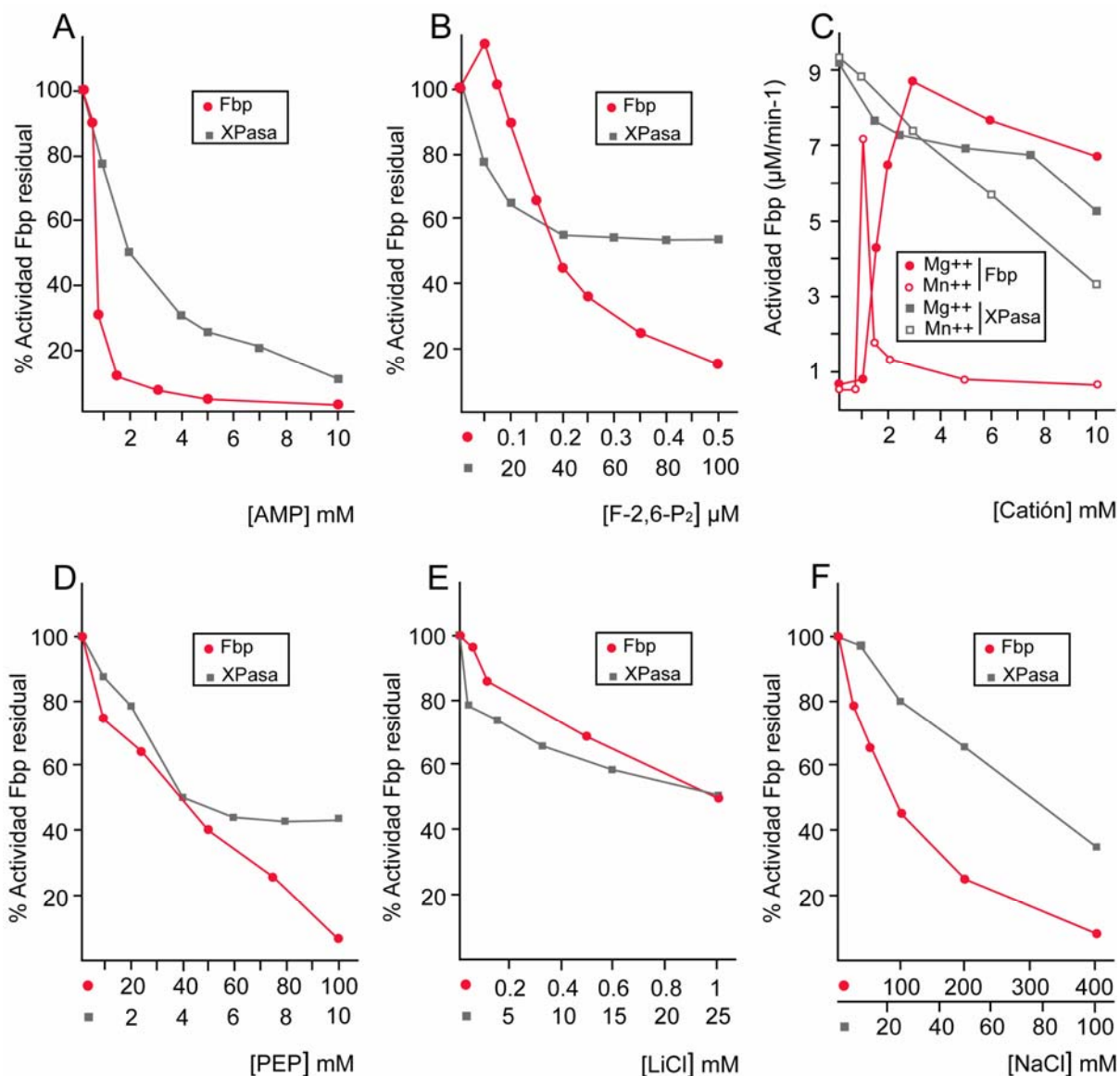


Figura 28. Comparación de algunas características cinéticas de YIFbp e YIXPasa. A) Efecto inhibidor del AMP sobre la actividad de YIFbp (fucsia) y de YIXPasa (gris). B) Efecto inhibidor de la Fructosa-2,6-bisfosfato sobre la actividad de YIFbp (fucsia) y de YIXPasa (gris). C) Actividad de YIFbp (fucsia) o YIXPasa (gris) en presencia de los cationes divalentes Mg⁺⁺ (símbolos llenos) o Mn⁺⁺ (símbolos vacíos). D) Efecto inhibidor del PEP sobre la actividad de YIFbp (fucsia) y de YIXPasa (gris). E) Efecto inhibidor del Li⁺ (LiCl) sobre la actividad de YIFbp (fucsia) y de YIXPasa (gris). F) Efecto inhibidor del Na⁺ (NaCl) sobre la actividad de YIFbp (fucsia) y de YIXPasa (gris).

7. EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS GLUCONEOGÉNICAS.

Los resultados anteriores muestran que la actividad total Fbp medida en un extracto de *Y. lipolytica* es la suma de dos componentes: uno mayoritario debido a YIFbp y otro menor debido a XPasa. Dado que el valor de este último permanece constante en distintas fuentes de carbono (ver apartado 6), la manera más sencilla de explicar los valores constantes de actividad Fbp es pensar que el gen *YIFBP1* no está sometido a represión por glucosa. En este caso cabría esperar que los niveles del RNAm correspondiente no variasen sensiblemente durante el crecimiento en distintas fuentes de carbono. Para analizar esta hipótesis y comparar el comportamiento del gen *YIFBP1* con el de los genes *YIPCK1* e *YIICL1* que codifican enzimas cuyos niveles descienden en presencia de glucosa, se realizó un análisis de northern de los RNAm correspondientes a estos genes.

Las muestras para el análisis de northern se tomaron de cultivos en medio mínimo y en medio rico con distintas fuentes de carbono y en dos momentos diferentes: uno en la fase exponencial y otro en la fase de desaceleración del crecimiento que precede a la fase estacionaria. Las densidades ópticas correspondientes a cada fase eran respectivamente 0.8-1 y 1.9-2.2 a 660 nm. En los casos de los cultivos en glucosa y etanol se valoró la concentración de ambos en el momento de la cosecha, siendo dicha concentración del orden del 90% de la inicial.

Como puede verse en la Figura 29, en la fase exponencial del crecimiento el nivel de RNAm correspondiente a *YIFBP1* en medio mínimo es similar en todas las fuentes de carbono utilizadas. En el caso del medio rico se observa algo similar aunque parece existir un ligero aumento en etanol y aún más ligero en acetato. En esta fase de crecimiento en todos los casos los niveles de RNAm correspondientes a *YIPCK1* son elevados en los cultivos procedentes de etanol y acetato y muy bajos en los de glucosa y glicerina. Un perfil similar se encontró en el caso del RNAm correspondiente a *YIICL1*. En estos dos casos los niveles de los RNAm concuerdan con el perfil de actividades enzimáticas ya expuesto mostrando un patrón de represión similar al encontrado en otras levaduras (Valdés-Hevia *et al.*, 1989, Scholer y Schüller, 1993, Leuker *et al.*, 1997, Menéndez *et al.*, 2003, López *et al.*,

2004), si bien hay que mencionar que el RNAm de *YIICL1* en medio mínimo etanol es algo menor que en presencia de acetato, lo cual difiere de las actividades enzimáticas de *YIICL1* en ambos medios. Con todo lo dicho anteriormente parece claro que *YIFBP1* tiene un comportamiento distinto y que no está sometido a represión catabólica.

En los cultivos en fase de desaceleración se observó una disminución de los niveles de RNAm correspondientes a *YIFBP1*, *YIPCK1* e *YIICL1*, excepto para el primero en medio rico con glicerina y para el último en medio mínimo con acetato, casos en los que se mantienen los niveles. En el caso del RNAm correspondiente a *YIFBP1* esta disminución parece más importante en los cultivos en etanol y acetato, siendo menor en glucosa y aún menor (medio mínimo) o inexistente (medio rico) en glicerina.

El hecho de que los niveles de actividad enzimática permanezcan constantes en esa fase a pesar de la caída del RNAm podría explicarse si en el tiempo transcurrido entre las dos tomas de muestra la estabilidad de la proteína no se altera, mientras que la estabilidad de los mensajeros correspondientes se ve disminuída sobre todo en etanol y acetato. Por otra parte no se puede descartar que en estas condiciones se produzcan cambios en la velocidad de traducción de los mensajeros en cuestión.

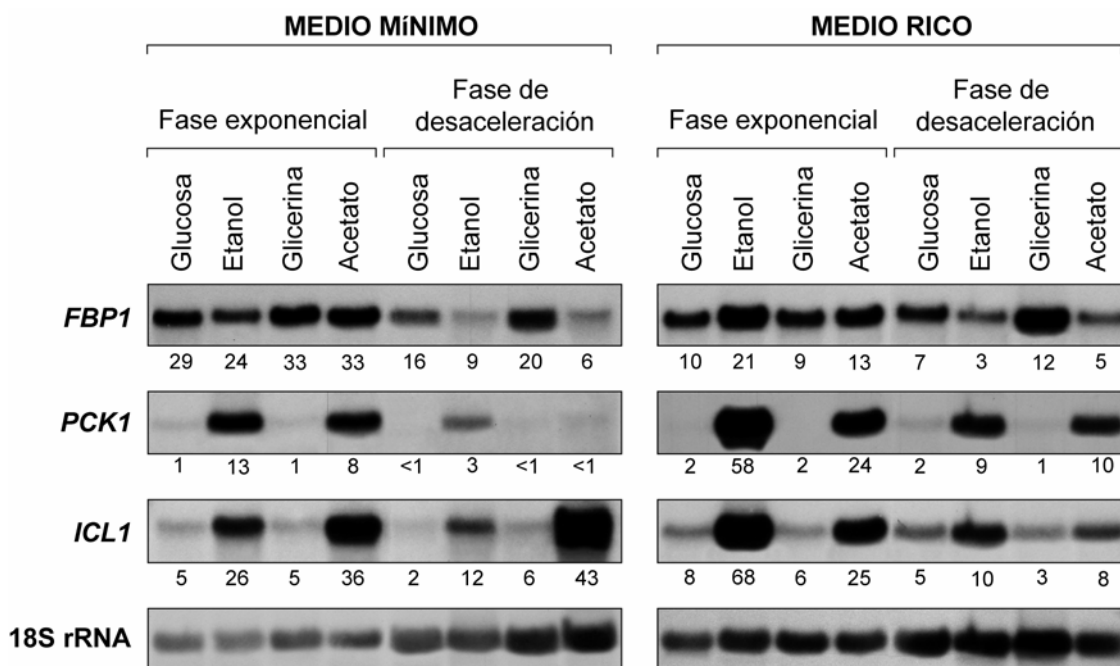


Figura 29. Análisis de la expresión de los genes *YIFBP1*, *YIPCK1* e *YIICL1*. Las levaduras se cultivaron en los medios indicados (como se describe en Materiales y Métodos) y fueron recogidas por filtración en dos fases distintas del crecimiento: fase de crecimiento exponencial y fase de desaceleración. Las muestras fueron hibridadas con sondas para *YIFBP1*, *YIPCK1* e *YIICL1* y para 18s RNA como control de carga. Bajo las bandas obtenidas se muestran los valores numéricos de las intensidades de las señales obtenidas (CPM/mm²) normalizados frente a la señal obtenida del control de carga.

8. EXPRESIÓN DE FUSIONES p*YIFBP1-lacZ*.

Para estudiar la expresión del gen *YIFBP1* de una forma que eliminase la posible influencia de la estabilidad del RNAm sobre el resultado, se cuantificó la actividad β -galactosidasa producida por una fusión del promotor del gen *YIFBP1* al gen *lacZ* de *E. coli*. Esta fusión se obtuvo insertando un fragmento de 1300 pb *NotI-BamHI* del plásmido pRJ44 (ver Materiales y Métodos) correspondiente al promotor de *YIFBP1* en el plásmido pINA354B (ver Materiales y Métodos) digerido con las mismas enzimas. El plásmido integrativo resultante, pRJ44B, se linealizó con *Apal* y se usó para dirigir la integración al locus *LEU2* (Figura 30). Los transformantes se seleccionaron por color en placas con X-Gal (ver Materiales y Métodos) y la localización de la integración se comprobó mediante análisis de Southern (Figura 30).

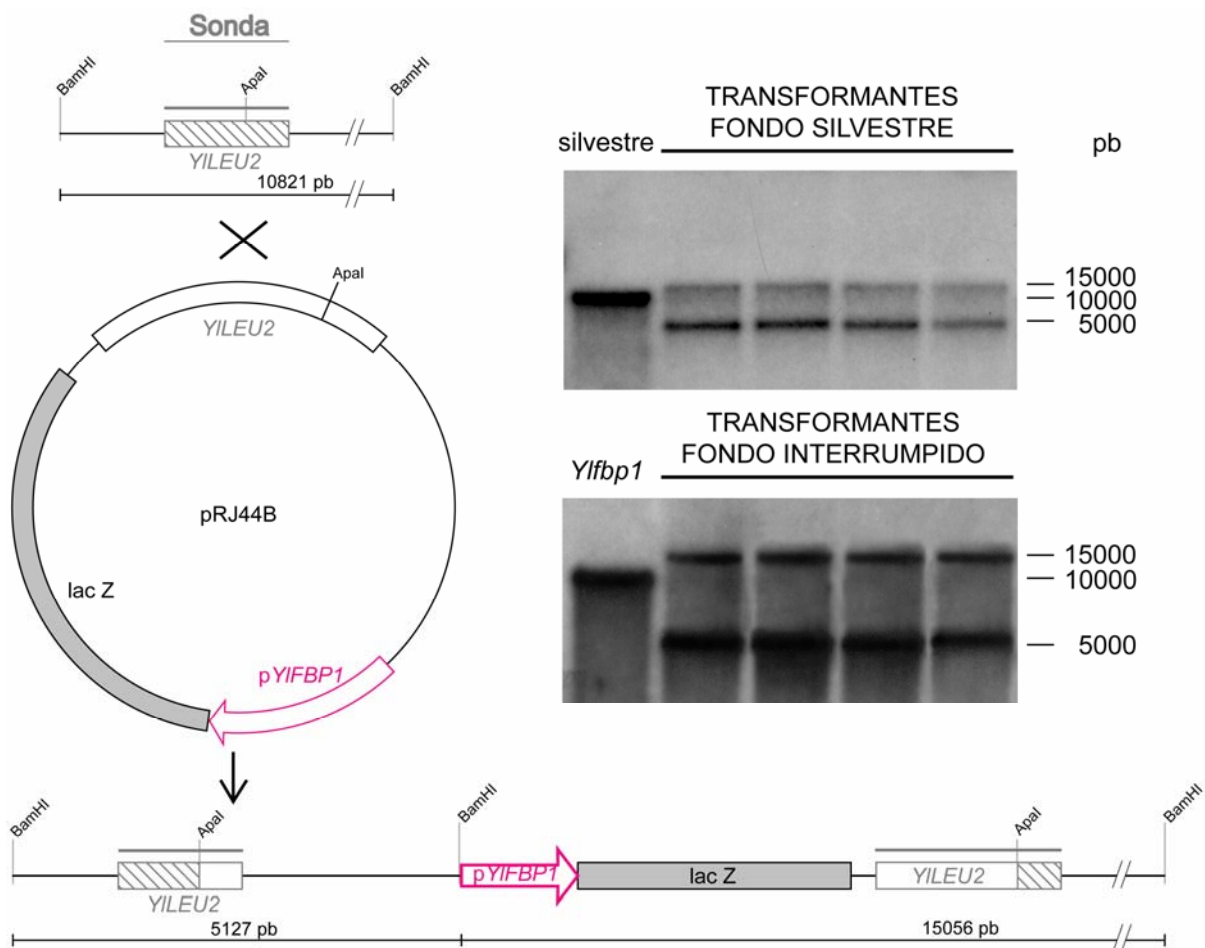


Figura 30. Integración de la fusión promotor *YIFBP1-lacZ* en el locus *LEU2* de *Y. lipolytica*. Células de *Y. lipolytica* silvestres para *YIFBP1* e interrumpidas *Ylfbp1* fueron transformadas con el plásmido integrativo *pRJ44B* linearizado con *Apal*, que dirige la integración de la fusión al locus *YILEU2*. La correcta integración fue comprobada mediante análisis de Southern empleando el fragmento de DNA correspondiente al gen *YILEU2* como sonda. Se muestran cuatro transformantes independientes de cada tipo de cepa receptora.

Las cepas obtenidas se cultivaron en medios mínimo y rico con distintas fuentes de carbono (glucosa, etanol, glicerina y acetato). En los extractos correspondientes se valoró actividad β -galactosidasa (Tabla 12). Como puede observarse, los niveles de dicha actividad, tanto en medio mínimo como en rico, son más elevados en etanol y en acetato que en glucosa y en glicerina. Una comparación de esos niveles con los de RNAm en las mismas condiciones, fase exponencial, muestra una aparente falta de concordancia (Figura 30). En efecto, en medio mínimo el patrón del RNAm, así

como el de la actividad enzimática, no mostraban importantes diferencias entre las distintas fuentes de carbono. En medio rico, el nivel de RNAm, pero no el de actividad, era algo más elevado en etanol y quizás muy levemente en acetato que en las demás fuentes de carbono. Una explicación para estas diferencias tiene que tener en cuenta la diferente estabilidad de los mensajeros correspondientes a *YIFBP1* y a *lacZ*, así como una posible influencia de las fuentes de carbono sobre la estabilidad del primero. También es necesario tener presente que el nivel estacionario de un mensajero, que es lo que se detecta en un análisis de northern, es un balance entre las velocidades de síntesis y de degradación del RNA correspondiente.

Los resultados obtenidos en medio mínimo sugieren que en etanol y en acetato se sintetizaría más RNAm de *YIFBP1*, pero que sería más inestable que en los otros medios. Eso explicaría el mayor nivel de β -galactosidasa en las primeras fuentes de carbono y la concordancia entre los niveles de RNAm y de actividad YIFbp.

Un resultado llamativo es el de la mayor actividad de β -galactosidasa en medio mínimo que en medio rico independientemente de la fuente de carbono usada. Este resultado sugiere que la fuente de nitrógeno ejerce un cierto control sobre la transcripción de *YIFBP1*. Aunque la diferencia es pequeña, también se observó algo parecido al valorar las actividades Fbp, Pck e Icl en algunos medios (Tabla 4).

Cuando los ensayos de actividad β -galactosidasa se realizaron en un mutante con el gen *YIFBP1* deleciónado, se vio que sus valores aumentaban, dependiendo de las fuentes de carbono, entre dos y cinco veces con respecto a los medidos en las mismas condiciones en la cepa silvestre (Tabla 12). Este resultado sugiere que la proteína Fbp participa de alguna manera en el control de su propia síntesis.

Tabla 12. Actividad β -galactosidasa (mU/mg_{proteína}) en cepas silvestres e *Ylfbp1* transformadas con la fusión del promotor del gen *YIFBP1* al gen *lacZ* de *E. coli* (cepas RJM007 y RJM008 respectivamente) en distintas fuentes de carbono. Las levaduras fueron cultivadas en los medios indicados en la tabla y recogidas en fase exponencial de crecimiento. Los valores corresponden a la media de cuatro cultivos independientes seguidos de su desviación estándar.

CEPAS	MEDIO MÍNIMO				MEDIO RICO			
	Glucosa	Etanol	Glicerina	Acetato	Glucosa	Etanol	Glicerina	Acetato
RJM007 (fondo silvestre)	36±5	83±6	47±4	70±5	14±4	36±3	12±1	23±5
RJM008 (fondo <i>Ylfbp1</i>)	97±13	297±15	94±15	372±30	33±2	182±6	23±5	189±10

9. NIVELES DE PROTEÍNA YIFbp

La discordancia observada en algunas condiciones entre la variación del nivel de RNAm y la constancia de la actividad enzimática Fbp podría tener una explicación si la estabilidad de la proteína y con ello la cantidad de la misma, fuese diferente en los distintos medios o si existiesen formas de YIFbp sin actividad enzimática. Para analizar esta posibilidad se evaluaron los niveles de proteína YIFbp en distintas fuentes de carbono. Con este fin se realizaron fusiones del gen *YIFBP1* con secuencias codificantes del epítipo HA o de c-myc (cedidos por A. Boisramé). Las construcciones correspondientes se integraron en el genoma de *Y. lipolytica* y se intentó detectar la proteína de fusión en un análisis de western usando anticuerpos comerciales contra HA o c-myc respectivamente. Aunque las proteínas se observaron sin problema, comprobamos que las fusiones carecían de actividad Fbp, por lo cual consideramos que no eran adecuadas para nuestro objetivo. Por tanto se procedió a la obtención de anticuerpos específicos contra YIFbp. Para ello se sobreexpresó en *E. coli* una fusión de *YIFBP1* a GST (glutathion S-transferasa de *Schistosoma japonicum*); de la proteína de fusión resultante se puede obtener Fbp por digestión con trombina. Para construir dicha fusión se ligó el DNA correspondiente a la región codificante del gen *YIFBP1* al plásmido comercial

pGEX4T2 obteniéndose el plásmido pRJ29 (ver Materiales y Métodos) con el que se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP. Se empleó esta cepa para solucionar el problema que supone la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* cuando el uso de codones en el organismo de origen difiere significativamente del de la célula hospedadora (se calculó que el CAI de YIFbp en *E. coli* era tan sólo de 0.2931, lo que indica hasta qué punto el uso de codones difiere entre ambos organismos). La cepa BL21-CodonPlus(DE3)-RP contiene copias extra de genes que codifican tRNAs poco usados normalmente por ella y que pueden resultar limitantes en la expresión de las proteínas heterólogas. En este caso, la cepa RP está diseñada para favorecer la expresión de proteínas procedentes de organismos con genomas ricos en CG, como es el caso de *Y. lipolytica*.

La proteína de fusión resultó encontrarse mayoritariamente formando cuerpos de inclusión en la fracción insoluble que precipita tras la centrifugación de los extractos bacterianos sonicados. De los precipitados se recuperó la proteína por el tratamiento descrito en Materiales y Métodos y se sometió a digestión por trombina en las condiciones mencionadas en dicha sección. Posteriormente los productos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. En estos geles aparecía una banda de proteína de 37 KDa de masa molecular cuyo análisis por MALDI -TOF mostró una secuencia como la esperada para YIFbp. Esa banda se utilizó para la inmunización de ratones como se describe en Materiales y Métodos. El anticuerpo obtenido resultó muy específico frente a YIFbp, no detectándose señales adicionales en extractos totales de *Y. lipolytica*.

A continuación se analizaron, mediante análisis de western, los niveles de proteína Fbp presentes en los mismos medios y las mismas condiciones de crecimiento que se habían empleado en el análisis de northern. Los resultados se muestran en la Figura 31; la cantidad de Fbp total es muy similar en todas las fuentes de carbono, tanto en medio rico como en medio mínimo, independientemente de la fase de crecimiento en que se recoja la muestra, lo cual coincide con los resultados de actividad enzimática. Este resultado es consistente con la hipótesis emitida de que

la falta de paralelismo observada en algunas condiciones entre la cantidad de proteína y el RNAm se debería a una inestabilidad del RNAm correspondiente.

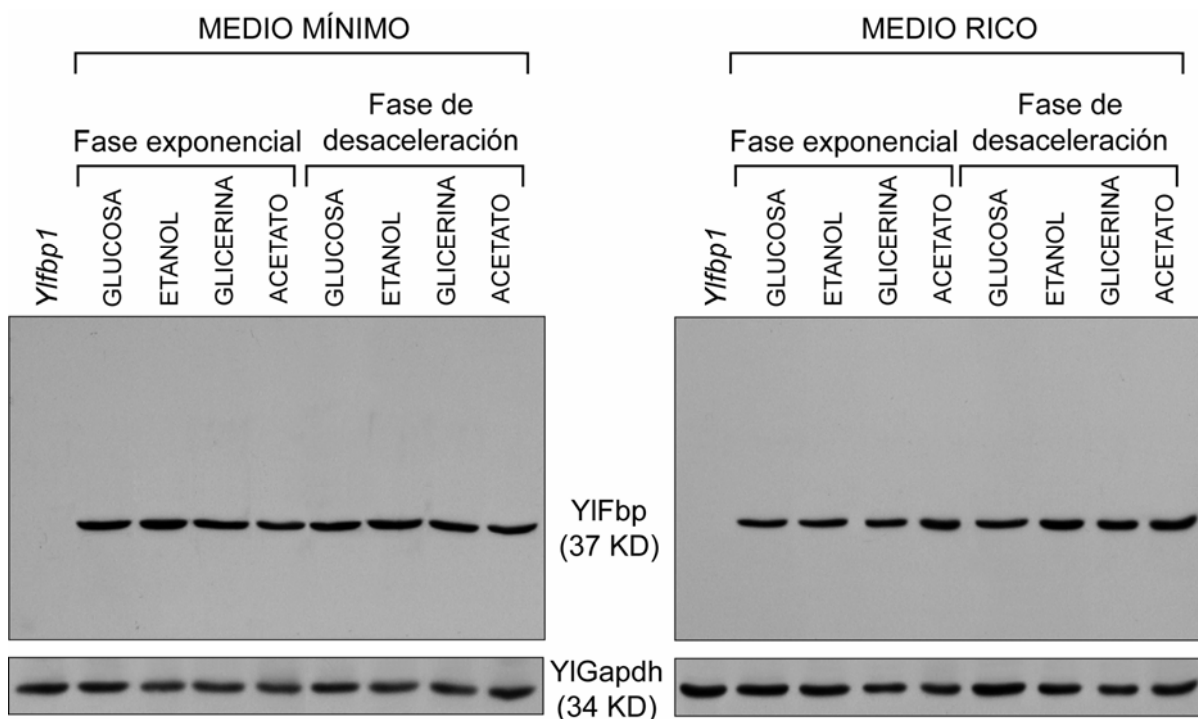


Figura 31. Inmunodetección de YIFbp en extractos totales de *Y. lipolytica*. Extractos crudos de la cepa silvestre (RJM005) crecida en medios mínimo o rico con las fuentes de carbono indicadas y recogidas en las fases de crecimiento indicadas fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS, transferidas a membranas de nitrocelulosa e hibridadas con anti-YIFbp y con anti-YIGapdh como control de carga. Como control de especificidad del anticuerpo anti-YIFbp se llevaron en paralelo muestras de extractos crudos de la cepa mutante *Yifbp1* (RJM002) crecida en glucosa.

10. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE YIFbp

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión del gen *lacZ* bajo la acción del promotor del gen *YIFBP1* mostraron una mayor expresión en la cepa mutante que en la silvestre, sugiriendo que la proteína YIFbp regularía su propia síntesis. Una posibilidad para ello sería que la proteína formara parte de un complejo que regule la transcripción del gen *YIFBP1*, lo que requeriría que la proteína se localizase en el núcleo. Otra posibilidad sería que actuase a nivel de la maquinaria de

traducción o de síntesis de proteínas. Para analizar la primera de las posibilidades enunciadas se estudió la presencia de YIFbp en el núcleo, para lo cual se obtuvieron preparaciones nucleares de *Y. lipolytica* y se analizó la distribución subcelular de YIFbp usando el anticuerpo descrito anteriormente. Como puede verse en la Figura 32 se detectó claramente reacción con este anticuerpo en la fracción nuclear. Un control de contaminación citosólica usando un anticuerpo anti-YIGapdh no detectó esta proteína en la misma fracción. La falta de marcadores nucleares accesibles en esta levadura impidió realizar un control adicional que mostrase inequívocamente la naturaleza de la fracción nuclear.

El resultado obtenido es compatible con la idea de que YIFbp actúe controlando la transcripción de su gen codificante.

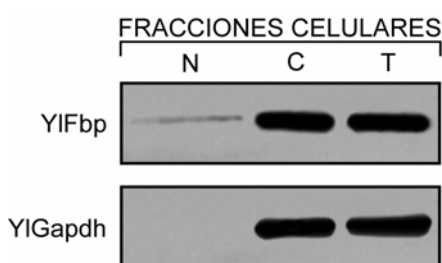


Figura 32. Localización de YIFbp. Levaduras de la cepa PO1a de *Y. lipolytica* fueron cultivadas en YPEtanol y recogidas por centrifugación durante la fase exponencial del crecimiento para su posterior procesamiento y separación de las distintas fracciones subcelulares como se describe en Materiales y Métodos. Los extractos de las distintas fracciones celulares obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa; ésta fue hibridada con anti-YIFbp y con anti-YIGapdh para descartar contaminaciones de la fracción nuclear con la fracción citoplasmática. N = nuclear, C = citoplasmática y T = total.

La capacidad observada en la levadura no convencional *Yarrowia lipolytica* de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono no glucídicas centró la atención inicial de este estudio sobre la gluconeogénesis en este microorganismo. El trabajo se continuó abordando el estudio detallado del gen *YIFBP1* que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa llevando a cabo su clonación, su interrupción y el estudio de las consecuencias de la misma, así como el análisis de su expresión en relación con distintas fuentes de carbono para finalizar con estudios sobre la localización subcelular de la enzima mencionada.

Los resultados obtenidos en el estudio de las actividades enzimáticas de tres enzimas gluconeogénicas, Fbp, Pck e Icl, pusieron de manifiesto una diferencia notable en el comportamiento de dichas enzimas en esta levadura: mientras que las actividades específicas de YIPck e YIIcl son claramente más bajas en condiciones de crecimiento glicolíticas que gluconeogénicas, indicando una represión por glucosa, YIFbp presenta una actividad constitutiva, independiente de la fuente de carbono que sustente el crecimiento. Este resultado muestra dos aspectos interesantes: por una parte hace patente que los niveles de las actividades enzimáticas que participan en la gluconeogénesis no varían en bloque en presencia de una fuente de carbono gluconeogénica como suele suceder en otras levaduras (Gancedo, 1998, Carlson, 1999) y por otra muestra que la regulación de los niveles de Fbp en *Y. lipolytica* contrasta con la de otras levaduras en las que no se detecta actividad Fbp durante el crecimiento en glucosa (Gancedo, 1971, Toyoda y Sy, 1984, Vassarotti y Friesen, 1985, Hofmann y Polnisch, 1991, Zaror *et al.*, 1993). Aunque los niveles de esta enzima en levaduras con un metabolismo oxidativo, y *Y. lipolytica* lo es, no bajan tanto en presencia de glucosa como en levaduras con metabolismo no oxidativo (Gancedo y Gancedo, 1971) no se había descrito en levaduras un comportamiento como el observado. Es de señalar que se ha descrito la existencia de Fbps con actividad constitutiva en algunas bacterias como es el caso de *Corynebacterium glutamicum* (Rittmann *et al.*, 2003) y de algunas especies de *Bacillus*, como *B. licheniformis* (Opheim y Bernlohr, 1975) y *B. subtilis* (Fujita *et al.*, 1998). El comportamiento inusual de YIFbp centró nuestra atención en el estudio de esta enzima y de su gen codificante.

La actividad YIFbp medida en extractos muestra características cinéticas similares a las de otras Fbps: presenta un valor de K_M de 30 μM para su sustrato fructosa-1,6-bisfosfato, semejante a los valores de K_M de las Fbps de otros microorganismos (Fujita y Freese, 1979, Funayama *et al.*, 1979, Kelley-Loughnane *et al.*, 2002, Rittmann *et al.*, 2003). Es inhibida por AMP con una K_i de 0.8 mM, valor superior a la de otros organismos, aunque en el mismo orden de magnitud (Gancedo *et al.*, 1965, Opheim y Bernlohr, 1975, Zaror *et al.*, 1993, Kelley-Loughnane y Kantrowitz, 2001), por fructosa-2,6-bisfosfato que inhibe el 50% de la actividad detectada a una concentración de 0.18 μM en condiciones saturantes de sustrato; este dato también es comparable con el descrito para otras Fbps (Pilkis *et al.*, 1981, van Schaftingen y Hers, 1981, Gancedo *et al.*, 1982, Toyoda y Sy, 1984, Kelley-Loughnane *et al.*, 2002, Zhou y Cheng, 2004). El PEP, que inhibe a la Fbp de *B. subtilis*, una enzima que se expresa de forma constitutiva (Fujita y Freese, 1979), no parece tener efecto in vivo en *Y. lipolytica* ya que la inhibición del 50% de la actividad en condiciones saturantes de sustrato se produce a una concentración de 40 mM, 150 veces por encima de la fisiológica (Flores *et al.*, 2005). Parece pues que los controladores de la actividad de YIFbp son los clásicos, AMP y fructosa-2,6-bisfosfato. Además su actividad depende de cationes divalentes, mostrando preferencia por el Mg^{++} frente al Mn^{++} , al igual que ocurre en otros organismos (Fujita y Freese, 1979, Funayama *et al.*, 1979, Kelley-Loughnane *et al.*, 2002).

Basándose en las secuencias de Fbps de varias especies de levadura se clonó un fragmento de DNA de 1017 pb cuya traducción originaría una proteína de 339 aminoácidos con homología de secuencia con la de varias Fbps descritas en otros organismos. La demostración de que el DNA clonado codifica la Fbp de *Y. lipolytica* se apoya en varios resultados: a) cuando se sobreexpresa *YIFBP1* en *Y. lipolytica* la actividad Fbp aumenta 2.5 veces, b) la interrupción cromosómica de esa secuencia provoca una disminución de la actividad Fbp medida en extractos de más de un 80% y causa un enlentecimiento del crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas y c) su expresión en un mutante *fbp1* de *S. cerevisiae* complementa el fenotipo de falta de crecimiento en condiciones gluconeogénicas. Es de señalar que a pesar esa complementación no se detectó actividad Fbp en

extractos de esas cepas; un caso similar es el de la complementación de un mutante *Scfbp1* por el gen *fbp1+* de *S. pombe*, en el que la complementación fenotípica va acompañada de síntesis de RNAm pero no se detecta actividad enzimática (Vassarotti y Friesen, 1985). También está descrito que el gen *CaFBP1* de *C. albicans* no complementa el fenotipo de ausencia de crecimiento de mutantes *Scfbp1* en condiciones gluconeogénicas, a pesar de que también se detecta el RNAm correspondiente (de la Rosa *et al.*, 2000). En este último caso se postula que la falta de actividad podría ser debida a las diferencias en el uso de ciertos codones en *C. albicans* que resultarían en la modificación de residuos importantes para la actividad, si bien los autores también señalan que el gen clonado podría tratarse de un alelo no funcional. En el caso de la complementación por *YIFBP1* también se ha observado que existe síntesis del RNAm correspondiente (datos no mostrados), lo que unido a la comparación de los valores del CAI de *YIFBP1* y de *ScFBP1* en *S. cerevisiae*, que son muy similares (0.58 y 0.67 respectivamente), hace suponer que la síntesis de las proteínas por ellos codificadas sería similar, por lo que la falta de detección de la actividad se explicaría si existiese una degradación importante de la proteína de *Y. lipolytica* en *S. cerevisiae* o si ésta fuese poco activa por algún cambio post-transcripcional.

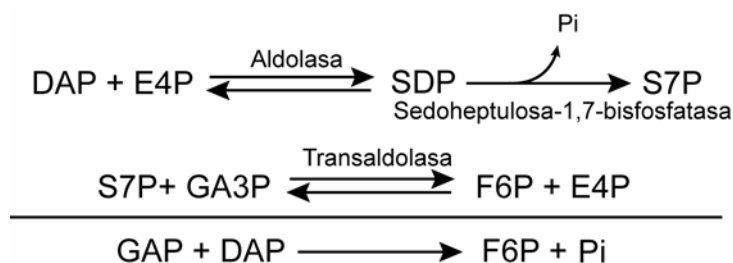
En contra de lo esperado, la interrupción del gen *YIFBP1* no trajo aparejada la incapacidad de crecer en fuentes de carbono gluconeogénicas como suele ocurrir con la interrupción de genes homólogos en la mayoría de los microorganismos (Sedivy y Fraenkel, 1985, de la Guerra *et al.*, 1988). La interrupción del gen *YIFBP1* provocó un gran retraso en el crecimiento del mutante en etanol y, en menor medida, en glicerina y acetato; de hecho si la observación del crecimiento en estas fuentes de carbono se hubiese restringido a los dos días posteriores a la inoculación hubiese podido sacarse la conclusión errónea de que el crecimiento en ellas era negativo. De nuevo, el fenotipo encontrado en la interrupción de *YIFBP1* recuerda al observado en la bacteria *B. subtilis*: mutantes *fbp1* de este organismo son capaces de crecer en ciertas fuentes de carbono gluconeogénicas, aunque el origen de esta capacidad no ha sido encontrado (Fujita y Freese, 1981).

Llama la atención la marcada diferencia entre la velocidad de crecimiento del mutante *Ylfbp1* en glicerina o en etanol. La lentísima velocidad en etanol podría relacionarse con algún problema en las etapas iniciales de su metabolismo, o con el hecho de que este compuesto, aunque metabolizable, produce también reacciones de estrés en levaduras (Plesset *et al.*, 1982, Zeuthen *et al.*, 1988, Sajbidor y Grego, 1992, Sakaki *et al.*, 2001). Este efecto parece ocurrir también en *Y. lipolytica*, ya que se aprecia un efecto negativo del alcohol sobre el crecimiento de una cepa silvestre. Curiosamente en el promotor de *YIFBP1* se han encontrado dos posibles elementos de respuesta a estrés [Stress Responsive Elements, STRE, CCCCT (Kobayashi y McEntee, 1993)] que podrían sugerir que el gen es sensible a este fenómeno. La mayor velocidad de crecimiento en glicerina de la cepa silvestre y la mutante *Ylfbp1* podría corresponderse también con un mayor flujo gluconeogénico en esta fuente de carbono, como muestra la mayor concentración de fructosa-1,6-bisfosfato medida en ella respecto de la detectada en etanol. Con los resultados disponibles no se puede dar una explicación definitiva a ese resultado.

Una cuestión importante es la de explicar la capacidad de crecimiento de mutantes carentes de Fbp en fuentes de carbono gluconeogénicas: en el caso de los mutantes de *B. subtilis* no se ha propuesto una vía que posibilite ese crecimiento.

Se conoce la existencia, en procariotas y plantas superiores, de fosfofructoquinasas dependientes de pirofosfato capaces de actuar en sentido reverso al habitual (Wu *et al.*, 1983); está descrito que la fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato de *Propionibacterium freudenreichii* es capaz de complementar el defecto de crecimiento de un mutante *fbp1* de *E. coli* (Kemp y Tripathi, 1993). Sin embargo no hay evidencia de la existencia de ese tipo de enzimas en levaduras y en *Y. lipolytica* la única Pfk presente es ATP-dependiente (Flores *et al.*, 2005) no pudiendo actuar en sentido reverso en condiciones fisiológicas.

En el caso de *Y. lipolytica* una posible explicación sería que la fructosa-6-fosfato necesaria para el crecimiento de los mutantes *Ylfbp1* en fuentes de carbono no glucídicas se obtuviese gracias a la acción conjunta de la aldolasa, la sedoheptulosa bisfosfatasa y la transaldolasa según el esquema siguiente (Höfer *et al.*, 1970):



(DAP: dihidroxiacetona fosfato, E4P: eritrosa-4-fosfato, S7P: sedoheptulosa-7-fosfato, GA3P: gliceraldehído-3-fosfato, F6P: fructosa-6-fosfato, Pi: fosfato inorgánico).

La viabilidad fisiológica de este conjunto de reacciones está por demostrar, aunque todas las actividades necesarias se han encontrado en levaduras (Horecker y Smyrniotis, 1955, Richards y Rutter, 1961, Pontremoli y Traniello, 1975).

Los resultados obtenidos hacen probablemente innecesario postular el funcionamiento de las reacciones indicadas en el esquema anterior. En extractos del mutante se ha detectado una actividad que ensayada a 0.2 mM de fructosa-1,6-bisfosfato, concentración usual en el ensayo de Fbp, es capaz de hidrolizar dicho sustrato y representa un 15-20% de la actividad Fbp total medida en una cepa silvestre, aunque se desconoce si esta actividad es efectiva en presencia de la actividad Fbp principal. La actividad de esta enzima es independiente de la fuente de carbono presente en el medio y sus características cinéticas difieren de las de YIFbp; presenta una menor afinidad por el sustrato fructosa-1,6-bisfosfato, menor sensibilidad a la inhibición por AMP y fructosa-2,6-bisfosfato, inhibidores alostéricos usuales de Fbps específicas, tiene mayor sensibilidad a la inhibición por PEP y menor a la inhibición por Li^+ . Asimismo tiene un comportamiento diferente frente a los cationes divalentes Mg^{++} y Mn^{++} . Estas diferencias y el hecho de que la exploración de las secuencias del genoma de *Y. lipolytica* (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>) muestre que, aparte de *YIFBP1*, no hay secuencias con homología representativa con las Fbps usuales, hacen suponer que el crecimiento de los mutantes se debe a la actividad de una enzima con efecto marginal sobre fructosa-1,6-bisfosfato.

Se conocen casos en los que la acción de fosfatasa inespecíficas enmascara al menos parcialmente los efectos de una mutación que causa la pérdida de función de una fosfatasa específica. Por ejemplo, algunos alelos mutantes del gen *HIS2* de *S. cerevisiae*, que codifican una histidinol fosfatasa, son capaces de crecer en un medio sin histidina. Ese crecimiento parece deberse a la acción de una fosfatasa inespecífica que hidrolizaría el histidinol fosfato con menor eficacia que la histidinol fosfatasa (Jones y Fink, 1982). No existen hasta el momento datos sobre la naturaleza de la fosfatasa que permite el crecimiento de los mutantes *Ylfbp1* en fuentes de carbono gluconeogénicas. Una posible candidata sería la inositol monofosfatasa, enzima considerada responsable de la actividad Fbp de algunas archeobacterias (Stec *et al.*, 2000); sin embargo se ha comprobado que en *Thermococcus kodakaraensis* la expresión de la inositol monofosfatasa no revierte el fenotipo de un mutante *fbp1* (Sato *et al.*, 2004). A pesar de ello se exploró dicha posibilidad en el presente estudio: el análisis de la secuencia del genoma de *Y. lipolytica* mostró la existencia de una ORF (YALI OD04378g) con alta homología con los genes que codifican la inositol monofosfatasa en otras levaduras. Se intentó la interrupción de dicha ORF en un mutante *Ylfbp1* pero no se lograron obtener mutantes doblemente interrumpidos. De momento queda pues sin resolver la naturaleza de la actividad fosfatásica encontrada en *Y. lipolytica* que permite el crecimiento del mutante *Ylfbp1* en fuentes de carbono gluconeogénicas.

Los resultados del análisis de la transcripción de los genes que codifican las tres enzimas gluconeogénicas mencionadas muestran que *YIFBP1* es el único de ellos que no se encuentra sometido a represión catabólica: tanto en medio mínimo como en medio rico existe expresión de *YIFBP1* en presencia de glucosa, mientras que *YIPCK1* e *YIICL1* no se expresan en esas condiciones, resultado consistente con los valores de actividad enzimática de las enzimas codificadas por ellos. El efecto de la represión catabólica sobre *YIICL1* ya estaba descrito anteriormente (Barth y Scheuber, 1993), aunque se desconocía la magnitud del mismo.

La presencia en glucosa del RNAm correspondiente al gen *YIFBP1* está descrita para otras levaduras, en las que aunque existe represión catabólica del gen que codifica la Fbp, ésta podría ser menos marcada que en la levadura modelo *S.*

cerevisiae: en *C. albicans* existen datos contradictorios: algunos autores han descrito que el nivel de RNAm correspondiente a *CaFBP1* en medios con etanol es entre tres y cuatro veces superior al de medios con glucosa, lo cual concuerda con los valores de actividad Fbp medidos en dichos medios e indicaría una represión por glucosa menos severa en el caso de *C. albicans* (de la Rosa *et al.*, 2000); sin embargo, otros autores presentan datos que indican una fuerte represión por glucosa, llegando a no detectarse actividad Fbp en presencia del azúcar (Eschrich *et al.*, 2002). Es importante señalar que los primeros autores advierten que el gen clonado podría tratarse de un alelo no funcional, mientras que los segundos han aislado el gen *FBP1* por complementación fenotípica de un mutante *fbp1*, demostrando así la funcionalidad Fbp de la enzima codificada por dicho gen. También hay datos contradictorios en el caso del gen de *Kluyveromyces lactis*: mientras que algunos sostienen que los niveles de RNA mensajero para *KIFBP1* disminuyen únicamente de 2 a 4 veces en presencia de glucosa (Zaror *et al.*, 1993), otros describen una represión mucho mayor en condiciones glicolíticas de crecimiento, similar a la detectada en la levadura modelo *S. cerevisiae* (Georis *et al.*, 2000).

Los niveles de RNAm de *YIFBP1* en fases tempranas de crecimiento son muy similares en las distintas fuentes de carbono, dato compatible con los niveles constitutivos de la proteína y de la actividad enzimática. El análisis de northern mostró también una caída de los mensajeros correspondientes a los genes *YIFBP1* e *YIPCK1* en la fase de desaceleración del crecimiento. Esa caída también se observó en el caso del mensajero correspondiente a *YIICL1* aunque no fue tan acusada en todas las situaciones como la observada en los casos anteriormente mencionados. Esa disminución de los niveles de los RNAm no fue acompañada de una disminución paralela de la actividad enzimática. No es inmediato determinar la causa de la variación de los niveles de RNAm en las dos etapas del crecimiento aunque podría deberse a efectos del estrés producido por escasez de algún nutriente; además la caída de los RNAm es más evidente en presencia de etanol o de acetato, compuestos que por diversas causas producen reacciones de estrés en las células que pueden derivar en una menor síntesis o una mayor degradación de

los RNAm de distintos genes (Takayama y Kjelleberg, 2000). El mantenimiento de la actividad enzimática podría deberse a que la estabilidad de la proteína no se vería afectada en esas condiciones.

El análisis de la actividad β -galactosidasa mostró un aumento de unas dos veces en las muestras procedentes de etanol y acetato con respecto a las cultivadas en glucosa o glicerina. Este resultado podría deberse a una inducción por estos compuestos, más evidente en el caso del etanol. Está descrito el efecto inductor del etanol sobre la expresión del gen *ScICL1* (Scholer y Schüller, 1993) y del acetato sobre el gen *YIICL1* (Barth y Scheuber, 1993).

La aparente contradicción entre los resultados obtenidos mediante análisis de northern y mediante valoración de la actividad β -galactosidasa puede deberse a que los dos métodos no miden lo mismo, aunque suelen aceptarse como equivalentes. El análisis de northern proporciona una medida del nivel estacionario del RNAm en cuestión, es decir, la resultante del balance de síntesis y degradación del mismo en cada situación considerada. Comoquiera el sistema que regula la degradación del RNAm correspondiente al gen *lacZ* es distinto del que regula el gen sometido a estudio, por lo que podría haber diferencias entre el resultado del northern y de la actividad β -galactosidasa. Basándonos en esto proponemos que la estabilidad del RNAm correspondiente a *YIFBP1* es menor durante el crecimiento en etanol y acetato que durante el crecimiento en glucosa y glicerina, mientras que la estabilidad de la proteína sería similar en todos los casos.

Hay que señalar que a pesar de que los genes *YIPCK1* e *YIICL1* son reprimidos por glucosa no se encuentran en sus promotores las secuencias consenso responsables de la regulación de la expresión de estos genes en otras levaduras. Sus regiones promotoras carecen de las secuencias consenso a las que se unen las proteínas activadoras Cat8 y Sip4 en otros organismos, así como de la secuencia reconocida por la proteína represora Mig1. Asimismo llama la atención la ausencia en el genoma de *Y. lipolytica* de secuencias que codifiquen proteínas con homología de secuencia con las proteínas reguladoras anteriormente mencionadas. Todo ello parece indicar que, en el caso de los genes que sí están sometidos a represión catabólica en *Y. lipolytica*, este mecanismo regulador podría tener lugar

por vías distintas de las conocidas en otras levaduras. Algo similar se observa en la regulación del gen *FBP1* de *K. lactis*, que esta sometido a represión por glucosa pero carece en su región promotora de las secuencias consenso del CSRE presentes en el promotor de su homólogo en *S. cerevisiae*, aunque es este caso, al contrario que en *Y. lipolytica*, la cascada de señalización implicada parece estar conservada (Georis *et al.*, 2000).

La falta de represión catabólica de *YIFBP1* plantea el problema de cómo se evita durante el crecimiento en glucosa el posible ciclo inútil provocado por el funcionamiento simultáneo de la enzima glicolítica Pfk y su antagónica gluconeogénica Fbp. En algunas bacterias falta la regulación transcripcional por glucosa del gen que codifica la Fbp, como en el caso de *Bacillus licheniformis* (Opheim y Bernlohr, 1975), *B. subtilis* (Fujita *et al.*, 1998) y *Corynebacterium glutamicum* (Rittmann *et al.*, 2003). En los dos primeros casos se postula que la célula no regularía la actividad Fbp por alteración de la cantidad de enzima, sino mediante modulación de la actividad de la misma: se ha propuesto que la regulación por efectores alostéricos sería suficiente para evitar, al menos parcialmente, los ciclos inútiles. En *Bacillus*, la relación entre el efecto inhibitor del AMP y el activador del fosfoenolpiruvato (PEP) serviría para minimizar el gasto inútil de energía: en condiciones de crecimiento glicolíticas la concentración de PEP (1-2 mM) es mucho mayor que la de AMP (250 μ M) permitiendo la activación de la Fbp en su casi totalidad, mientras que en células creciendo en presencia de glucosa, la concentración celular de PEP desciende hasta 400 μ M reduciéndose drásticamente la actividad Fbp, lo que evitaría, al menos parcialmente, el consumo de ATP. Sin embargo, en nuestra opinión, los parámetros cinéticos publicados no explican adecuadamente la regulación, ya que la concentración intracelular *in vivo* del AMP apenas varía entre condiciones de crecimiento glicolíticas y gluconeogénicas y que la K_i de la Fbp de *Bacillus* para el AMP presenta un valor muy bajo (5 μ M).

En cuanto a *C. glutamicum* no se ha descrito cómo el organismo es capaz de evitar el ciclo inútil entre la Pfk y la Fbp durante el crecimiento en glucosa, aunque éste no parece producirse o si lo hace, no parece tener efecto sobre el crecimiento ya que la sobreexpresión del gen que codifica la proteína Fbp en este organismo no dificulta

el crecimiento en condiciones glicolíticas (Rittmann *et al.*, 2003). Además, en este caso no cabría recurrir a una explicación por los mismos efectores alostéricos que en el caso anterior, ya que el PEP es un inhibidor de la actividad Fbp en *Corynebacterium*.

Algo similar ocurre en *Y. lipolytica*, donde no se ha estudiado si durante el crecimiento en glucosa se producen o no ciclos inútiles pero igualmente, de tener lugar, no parecerían tener un efecto notable sobre el crecimiento: la sobreexpresión del gen *YIFBP1* no dificulta el crecimiento en presencia de glucosa y su interrupción no favorece el crecimiento en dicha fuente de carbono. A este respecto cabe mencionar que células de *S. cerevisiae* son viables cuando se crean artificialmente ciclos inútiles en esta etapa presentando únicamente una pequeña desventaja de crecimiento frente a levaduras con los mecanismos de regulación intactos. Además el ciclo entre fructosa-6-fosfato y fructosa-1,6-bisfosfato en estos casos no supera el 2% *in vivo* en presencia de glucosa posiblemente debido a una fuerte inhibición por fructosa-2,6-bisfosfato (Navas *et al.*, 1993). En el caso de *Y. lipolytica* no se tienen datos sobre la concentración intracelular de este compuesto, aunque la existencia de dos ORFs en su genoma, YALI0E17633g y YALI0F27885g, que codifican proteínas similares a la fosfofructosa-2-kinasa y a la fructosa-2,6-bisfosfatasa de *S. cerevisiae* respectivamente, que son las enzimas responsables del metabolismo de este compuesto, indican su presencia en esta levadura (Flores *et al.*, 2005).

En cuanto al PEP, considerado como el regulador alostérico clave de la Fbp de *Bacillus*, en el caso de *Y. lipolytica* no se ha detectado efecto fisiológicamente significativo de dicho metabolito sobre la actividad de la Fbp, lo que descarta una regulación alostérica por dicho efector en esta levadura.

Una pregunta interesante es el por qué de las diferencias en la respuesta a represión catabólica de los genes que codifican enzimas gluconeogénicas. Una posibilidad es que YIFbp tenga un papel adicional diferente de su función puramente metabólica. Se han descrito numerosos casos de enzimas metabólicas que ejercen otras funciones, por ejemplo, la Pfk de *Dictyostelium discoideum* es un inhibidor de la polimerización de tubulina (Orosz *et al.*, 1999), la subunidad α de la Pfk de *Pichia pastoris* es necesaria para la microautofagia inducida por glucosa (Yuan *et al.*,

1997), una forma inactiva de la fosfoglucoisomerasa estimula el crecimiento en tejidos neuronales (Mizrachi, 1989). El hecho de que el mutante *Ylfbp1* presente una morfología en presencia de etanol y glicerina distinta de la de una cepa silvestre puede ser indicativo de su implicación en otros procesos distintos del metabólico; este aspecto diferente recuerda al fenotipo de no filamentación descrito para mutantes *Ylhoy1* crecidos en medio sólido, si bien estos mutantes presentaban también una morfología diferencial en medio líquido (Torres-Guzmán y Domínguez, 1997) que no se ha observado en mutantes *Ylfbp1*. Un fenómeno parecido se ha descrito para mutantes *cph1/cph1* en *C. albicans*, que son incapaces de formar hifas en medio sólido pero sí lo hacen en medio líquido (Liu *et al.*, 1994). Este fenotipo podría ser indicativo de una posible función de YIFbp en la transición levadura-hifa, de su implicación en la formación de pared u otro proceso que pudiera afectar directamente a dicha transición, como la regulación de otros genes implicados en dichos eventos. Tampoco se pueden descartar efectos debidos al cambio en el perfil metabólico de los mutantes en los medios indicados.

También se han descrito funciones adicionales a las comúnmente conocidas para ciertas enzimas citoplasmáticas tras su translocación al núcleo, como el importante papel que algunas de ellas juegan en la transcripción de genes, como es el caso de la hexokinasa II de *S. cerevisiae* (Moreno y Herrero, 2002) o en la estabilización nuclear y reparación y síntesis de DNA, como son los casos de la lactato deshidrogenasa y de la 3-fosfoglicerato kinasa de mamífero (Popanda *et al.*, 1998) y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de mamífero (Sirover, 2005). El hallazgo de una fracción de YIFbp en el núcleo sugiere una función no metabólica para esa proteína. Los resultados obtenidos en los experimentos de valoración de la actividad β -galactosidasa por expresión del gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del promotor de *YIFBP1* en un fondo silvestre para *YIFBP1* y en un mutante *Ylfbp1* ponen de manifiesto un incremento de los valores medidos en ausencia de actividad Fbp, siendo consistentes con una posible autorregulación de la propia proteína que inhibiría la expresión del gen *YIFBP1*.

En mamíferos se ha descrito una distribución citosólica y nuclear para Fbp cuya relación varía en función del estado metabólico de la célula (Yáñez *et al.*, 2003,

Yáñez *et al.*, 2004). Se ha propuesto que estos cambios de localización subcelular podrían servir para evitar ciclos inútiles al separar esta proteína del compartimento celular en el que se encuentre su sustrato (de la Iglesia *et al.*, 1999). Dada la pequeña cantidad de YIFbp detectada en el núcleo, no parece que ésta sea la función de la localización nuclear de YIFbp.

Los resultados presentados en este trabajo, junto a los de otros autores en otras levaduras no convencionales (Duntze *et al.*, 1967, Breunig *et al.*, 2000, Georis *et al.*, 2000), muestran las diferencias entre ellas y la levadura modelo *S. cerevisiae* y subrayan la necesidad de los estudios fisiológicos, junto a las nuevas herramientas genómicas, para el conocimiento y una utilización racional de estos organismos en posibles aplicaciones biotecnológicas.

Las conclusiones que se derivan de este trabajo son las siguientes:

- 1.- En *Yarrowia lipolytica* la represión catabólica afecta de manera distinta a los diversos genes codificantes de enzimas gluconeogénicas.
- 2.- El gen *YIFBP1* que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa en *Y. lipolytica* no está sometido a represión catabólica y la actividad YIFbp es constitutiva en las distintas fuentes de carbono.
- 3.- Los genes *YIPCK1* e *YIICL1*, que codifican las enzimas gluconeogénicas fosfoenolpiruvato carboxikinasa e isocitrato liasa respectivamente, están sometidos a represión catabólica, aunque ésta no es total como sucede en *S. cerevisiae* y parece tener lugar a través de elementos reguladores de la transcripción distintos a los de la levadura modelo.
- 4.-Las características cinéticas de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de *Y. lipolytica* son similares a las de las Fbps de otros organismos.
- 5.- Una fracción de la fructosa-1,6-bisfosfatasa presenta una localización nuclear.
- 6.- La interrupción del gen *YIFBP1* no bloquea totalmente el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. Existe una fosfatasa, probablemente inespecífica, cuya actividad permite sortear la carencia de la fructosa-1,6-bisfosfatasa genuína.

- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T. y Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* **279**: 14440-14446
- Almeida, M. J. y Pais, C. (1996). Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4401-4404
- Alting-Mees, M. A. y Short, J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9494
- Baganz, F., Hayes, A., Farquhar, R., Butler, P. R., Gardner, D. C. y Oliver, S. G. (1998). Quantitative analysis of yeast gene function using competition experiments in continuous culture. *Yeast.* **14**: 1417-1427
- Baganz, F., Hayes, A., Marren, D., Gardner, D. C. y Oliver, S. G. (1997). Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **13**: 1563-1573
- Bañuelos, M., Gancedo, C. y Gancedo, J. M. (1977). Activation by phosphate of yeast phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **252**: 6394-6398
- Barnay-Verdier, S., Boisrame, A. y Beckerich, J. M. (2004). Identification and characterization of two alpha-1,6-mannosyltransferases, Anl1p and Och1p, in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology.* **150**: 2185-2195
- Barth, G. y Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In Non-conventional yeasts in biotechnology. A Handbook. (Wolf, K. Ed.). pp. 313-388. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Barth, G. y Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19** (4): 219-237
- Barth, G. y Scheuber, T. (1993). Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 422-430
- Becker, D. M., Fikes, J. D. y Guarente, L. (1991). A cDNA encoding a human CCAAT-binding protein cloned by functional complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 1968-1972
- Belinchón, M. M., Flores, C. L. y Gancedo, J. M. (2004). Sampling *Saccharomyces cerevisiae* cells by rapid filtration improves the yield of mRNAs. *FEMS Yeast Res.* **4**: 751-756
- Berardi, E., Gambini, A. y Bellu, A. R. (2003). *ALG2*, the *Hansenula polymorpha* isocitrate lyase gene. *Yeast.* **20**: 803-811
- Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. y Grassi, M. (1987). In Methods of enzymatic analysis. (Bergmeyer, H. U. Ed.). 3rd ed, vols VI y VII. Verlag Chemie. Weinheim. Alemania.
- Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. R. y Gaillardin, C. (1994). Two upstream activation sequences control the expression of the *XPR2* gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol.* **14**: 327-338
- Blázquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C. y Gancedo, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* **329**: 51-54
- Boisrame, A., Chasles, M., Babour, A., Beckerich, J. M. y Gaillardin, C. (2002). Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell. Sci.* **115**: 4947-4956
- Breathnach, R. y Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 349-383

- Breunig, K. y Steensma, Y. (2003).** *Kluyvomyces lactis*: genetics, physiology and applications. In Topics in Current Genetics. (de Winde, J. M. Ed.). Vol 2. pp.171-205. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (Alemania).
- Breunig, K. D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M. M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I. I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J. J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H. Y., Wesolowski-Louvel, M. y Zeeman, A. M. (2000).** Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 771-780
- Buchner, E. (1897).** Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gessellschaft.* **30**: 117-124
- Carlson, M. (1999).** Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 202-207
- Carreira, A., Ferreira, L. M. y Loureiro, V. (2001).** Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3463-3468
- Casaregola, S., Neuveglise, C., Lepingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P. y Gaillardin, C. (2000).** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Lett.* **487**: 95-100
- Caspary, F., Hartig, A. y Schuller, H. J. (1997).** Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene *MLS1*. *Mol. Gen. Genet.* **255**: 619-627
- Celenza, J. L. y Carlson, M. (1989).** Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5034-5044
- Celenza, J. L., Eng, F. J. y Carlson, M. (1989).** Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5045-5054
- Cereghino, J. y Cregg, J. (2000).** Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 45-66
- Cervantes-Chávez, J. A. y Ruiz-Herrera, J. (2006).** *STE11* disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 801-815
- Conway, E. J. y Downey, M. (1950).** pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* **47**: 355-360
- Coschigano, P. W., Miller, S. M. y Magasanik, B. (1991).** Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4455-4465
- Chen, X. J., Wesolowski-Louvel, M. y Fukuhara, H. (1992).** Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 97-105
- Choe, J. Y., Fromm, H. J. y Honzatko, R. B. (2000).** Crystal structures of fructose 1,6-bisphosphatase: mechanism of catalysis and allosteric inhibition revealed in product complexes. *Biochemistry.* **39**: 8565-8574
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-choloform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Danhash, N., Gardner, D. C. y Oliver, S. G. (1991).** Heritable damage to yeast caused by transformation. *Biotechnology (N Y).* **9**: 179-182

- de la Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero, F., Chaves, R. S. y 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 Guerra, R., Valdés-Hevia, M. D. y Gancedo, J. M. (1988).** Regulation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase in strains containing multicopy plasmids coding for this enzyme. *FEBS Lett.* **242**: 149-152
- de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J. J. y Ferrer, J. C. (1999).** Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett.* **456**: 332-338
- de la Rosa, J. M., Ruiz, T. y Rodríguez, L. (2000).** Cloning and characterization of a *Candida albicans* gene homologous to fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Curr. Microbiol.* **41**: 384-387
- Dixon, G. H. y Kornberg, H. L. (1959).** Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.* **72**: 3P
- Dobson, M. J., Tuite, M. F., Roberts, N. A., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M., Perkins, R. E., Conroy, S. C. y Fothergill, L. A. (1982).** Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **10**: 2625-2637
- Does, A. L. y Bisson, L. F. (1989).** Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. *J. Bacteriol.* **171**: 1303-1308
- Domínguez, A., Fermiñán, E. y Gaillardin, C. (2000).** *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. In Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts. Contrib. Microbiol. (Ernst, J. F. y Schmidt, A. Ed.). Vol 5. pp.151-172. Karger, suiza.
- Duntze, W., Atzpodien, W. y Holzer, H. (1967).** Glucose-dependent enzyme activities in different yeast species. *Arch. Mikrobiol.* **58**: 296-301
- Eschrich, D., Kötter, P. y Entian, K. D. (2002).** Gluconeogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **2**: 315-325
- Fernández, E., Fernández, M., Moreno, F. y Rodicio, R. (1993).** Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 238-242
- Ferreira, A. D. y Viljoen, B. C. (2003).** Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **86**: 131-140
- Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S. y Nicaud, J. M. (2005a).** Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica* and its potential applications. *FEMS Yeast Res.* **5**: 527-543
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Destain, J. y Thonart, P. (2005b).** Involvement of hexokinase Hxk1 in glucose catabolite repression of *LIP2* encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **50**: 133-137
- Flores, C. L. y Gancedo, C. (2005).** *Yarrowia lipolytica* mutants devoid of pyruvate carboxylase activity show an unusual growth phenotype. *Eukaryot Cell.* **4**: 356-364
- Flores, C. L., Martínez-Costa, O. H., Sánchez, V., Gancedo, C. y Aragón, J. J. (2005).** The dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* possesses an atypical phosphofructokinase: characterization of the enzyme and its encoding gene. *Microbiology.* **151**: 1465-1474

- Fournier, P., Guyaneux, L., Chasles, M. y Gaillardin, C. (1991).** Scarcity of *ars* sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. **7**: 25-36
- Fujita, Y. y Freese, E. (1979).** Purification and properties of fructose-1,6-bisphosphatase of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **254**: 5340-5349
- Fujita, Y. y Freese, E. (1981).** Isolation and properties of a *Bacillus subtilis* mutant unable to produce fructose-bisphosphatase. *J. Bacteriol.* **145**: 760-767
- Fujita, Y., Yoshida, K., Miwa, Y., Yanai, N., Nagakawa, E. y Kasahara, Y. (1998).** Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1, 6-bisphosphatase gene (*fbp*). *J. Bacteriol.* **180**: 4309-4313
- Funayama, S., Gancedo, J. M. y Gancedo, C. (1980).** Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur. J. Biochem.* **109**: 61-66
- Funayama, S., Molano, J. y Gancedo, C. (1979).** Purification and properties of a D-fructose 1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **197**: 170-177
- Gaillardin, C. y Heslot, H. (1988).** Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Basic Microbiology*. **29**: 43-57
- Gaillardin, C. y Ribet, A. M. (1987).** *LEU2* directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genet.* **11**: 369-375
- Gamo, F. J., Navas, M. A., Blázquez, M. A., Gancedo, C. y Gancedo, J. M. (1994).** Catabolite inactivation of heterologous fructose-1,6-bisphosphatases and fructose-1,6-bisphosphatase-beta-galactosidase fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **222**: 879-884
- Gamo, F. J., Portillo, F. y Gancedo, C. (1993).** Characterization of mutations that overcome the toxic effect of glucose on phosphoglucose isomerase less strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 233-237
- Gancedo, C. (1971).** Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J. Bacteriol.* **107**: 401-405
- Gancedo, C., Salas, M. L., Giner, A. y Sols, A. (1965).** Reciprocal effects of carbon sources on the levels of an AMP-sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**: 15-20
- Gancedo, C. y Schwerzmann, K. (1976).** Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **109**: 221-225
- Gancedo, J. M. (1998).** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361
- Gancedo, J. M. y Gancedo, C. (1971).** Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeasts. *Arch. Mikrobiol.* **76**: 132-138
- Gancedo, J. M. y Gancedo, C. (1997).** Gluconeogenesis and catabolite inactivation. In *Yeast sugar metabolism*. (Zimmermann, F. K. y Entian, K. D. Ed.). pp.359-378. Technomic Publishing Co. Pennsylvania, USA.
- Gancedo, J. M., Gancedo, C. y Sols, A. (1967).** Regulation of the concentration or activity of pyruvate kinase in yeasts and its relationship to gluconeogenesis. *Biochem. J.* **102**: 23C-25C
- Gancedo, J. M., Mazón, M. J. y Gancedo, C. (1982).** Kinetic differences between two interconvertible forms of fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**: 478-482

- Georis, I., Krijger, J. J., Breunig, K. D. y Vandenhoute, J. (2000).** Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of *PCK1* and *FBP1* genes in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* **264**: 193-203
- Godjevargova, T., Aleksieva, Z., Ivanova, D. y Shivarova, N. (1998).** Biodegradation of phenol by *Trichosporon cutaneum* cells covalently bound to polyamide granules. *Process Biochemistry.* **33**: 831-835
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S. G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science.* **274**: 563-567
- Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P. P. y Ferrero, I. (1996).** *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**: 316-326
- Guarente, L. (1983).** Yeast promoters and lacZ fusion designed to study expression of cloned genes in yeast. In *Methods in Enzymology*. (Wu, R., Grossman, L. y Moldave, K. Ed.). Vol 101. pp. 181-191. Academic Press. Londres.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. In *DNA cloning*. (Glover, D. M. Ed.). pp. 109-135. IRL Press, Oxford, England.
- Hardie, D. G., Carling, D. y Carlson, M. (1998).** The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 821-855
- Heitman, J., Filler, S., Edwards, J. y Michell, A. (2006).** Molecular principles of fungal pathogenesis. ASM Press. Washington DC. USA
- Herrero, P., Fernández, R. y Moreno, F. (1985).** Differential sensitivities to glucose and galactose repression of gluconeogenic and respiratory enzymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**: 216-219
- Herrero, P., Galíndez, J., Ruiz, N., Martínez-Campa, C. y Moreno, F. (1995).** Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast.* **11**: 137-144
- Hess, B. y Haeckel, R. (1967).** Interaction between potassium-, ammonium- and fructose-1,6-diphosphate activation of yeast pyruvate kinase. *Nature.* **214**: 848-849
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. y Tzagoloff, A. (1986).** Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast.* **2**: 163-167
- Hirai, M., Tanaka, A. y Fukui, S. (1975).** Difference in pyruvate kinase regulation among three groups of yeasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **391**: 282-291
- Höfer, M., Betz, A. y Becker, J. U. (1970).** Metabolism of the obligatory aerobic yeast *Rhodotorula gracilis*. Changes in metabolite concentrations following D-glucose and D-xylose addition to the cell suspension. *Arch. Mikrobiol.* **71**: 99-110
- Hoffman, C. S. y Winston, F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* **57**: 267-272

- Hoffman, C. S. y Winston, F. (1991).** Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev.* **5**: 561-571
- Hofmann, K. H. y Polnisch, E. (1991).** Catabolite inactivation, cyclic AMP and protein phosphorylation in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **60**: 49-54
- Holzer, H. (1976).** Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **1**: 178-181
- Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D. y Carlson, M. (2003).** Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 8839-8843
- Horecker, B. L. y Smyrniotis, P. Z. (1955).** Purification and properties of yeast transaldolase. *J. Biol. Chem.* **212**: 811-825
- Hu, Z., Nehlin, J. O., Ronne, H. y Michels, C. A. (1995).** MIG1-dependent and MIG1-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **28**: 258-266
- Hue, L. y Rider, M. H. (1987).** Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**: 313-324
- Hugget, A. S. C. y Nixon, D. A. (1957).** Glucose oxidase method for measurement of glucose. *Biochem. J.* **6**: 12-19
- Hung, G. C., Brown, C. R., Wolfe, A. B., Liu, J. y Chiang, H. L. (2004).** Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J. Biol. Chem.* **279**: 49138-49150
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168
- Johnston, M., Flick, J. S. y Pexton, T. (1994).** Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3834-3841
- Jones, E. W. y Fink, G. R. (1982).** Amino acid and nucleotide biosynthesis. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression.* (Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J. R. Ed.). pp. 181-299. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- Kanai, T., Ogawa, K., Ueda, M. y Tanaka, A. (1999).** Expression of the *SNF1* gene from *Candida tropicalis* is required for growth on various carbon sources, including glucose. *Arch. Microbiol.* **172**: 256-263
- Ke, H. M., Liang, J. Y., Zhang, Y. P. y Lipscomb, W. N. (1991).** Conformational transition of fructose-1,6-bisphosphatase: structure comparison between the AMP complex (T form) and the fructose 6-phosphate complex (R form). *Biochemistry.* **30**: 4412-4420
- Kelley-Loughnane, N., Biolsi, S. A., Gibson, K. M., Lu, G., Hehir, M. J., Phelan, P. y Kantrowitz, E. R. (2002).** Purification, kinetic studies, and homology model of *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1594**: 6-16
- Kelley-Loughnane, N. y Kantrowitz, E. R. (2001).** AMP inhibition of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1548**: 66-71
- Kemp, R. G. y Tripathi, R. L. (1993).** Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose 1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 5723-5724

- Kobayashi, N. y McEntee, K. (1993).** Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 248-256
- Kurtzman, C. P., Phaff, H. J. y Meyer, S. A. (1983).** Nucleic acid relatedness among yeasts. In *Yeast Genetics-Fundamental and Applied Aspects.* (Spencer, J. F. T., Spencer, D. M. y Smith, A. R. W. Ed.). pp. 139-166. Springer-Verlag, New York.
- Laurent, M., Chaffotte, A. F., Tenu, J. P., Roucous, C. y Seydoux, F. J. (1978).** Binding of nucleotides AMP and ATP to yeast phosphofructokinase:evidence for distinct catalytic and regulatory subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 646-652
- Le Dall, M., Nicaud, J., Treton, B. Y. y Gaillardin, C. M. (1996).** The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowia lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. *Curr. Genet.* **29**: 446-456
- Lederer, B., Vissers, S., Van Schaftingen, E. y Hers, H. G. (1981).** Fructose 2,6-bisphosphate in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**: 1281-1287
- Lenz, A. G. y Holzer, H. (1980).** Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose. *FEBS Lett.* **109**: 271-274
- Leuker, C. E., Sonneborn, A., Delbruck, S. y Ernst, J. F. (1997).** Sequence and promoter regulation of the *PCK1* gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Gene.* **192**: 235-240
- Liu, H., Kohler, J. y Fink, G. R. (1994).** Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog. *Science.* **266**: 1723-1726
- López-Boado, Y. S., Herrero, P., Gascón, S. y Moreno, F. (1987).** Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **147**: 231-234
- López, M. L., Redruello, B., Valdés, E., Moreno, F., Heinisch, J. J. y Rodicio, R. (2004).** Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucose repression but not to catabolite inactivation. *Curr. Genet.* **44**: 305-316
- Lundin, M., Nehlin, J. O. y 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
- Madzak, C., Gaillardin, C. y Beckerich, J. M. (2004).** Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.* **109**: 63-81
- Majumder, A. L. y Eisenberg, F., Jr. (1977).** Unequivocal demonstration of fructose-1,6-bisphosphatase in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**: 3222-3225
- Mamoun, C. B., Beckerich, J. M. y Gaillardin, C. (1996).** The *TSR1* gene of *Yarrowia lipolytica* is involved in the signal recognition particle-dependent translocation pathway of secretory proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 23895-23901
- Marcus, F., Edelstein, I. y Rittenhouse, J. (1984).** Inhibition of *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 1103-1108
- Mazón, M. J., Gancedo, J. M. y Gancedo, C. (1982).** Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **257**: 1128-1130

- Menéndez, J., Valdés, I. y Cabrera, N. (2003).** The *ICL1* gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*. **20**: 1097-1108
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. (Miller, J. H. Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Minard, K. I. y McAlister-Henn, L. (1992).** Glucose-induced degradation of the *MDH2* isozyme of malate dehydrogenase in yeast. *J. Biol. Chem.* **267**: 17458-17464
- Minet, M., Dufour, M. E. y Lacroute, F. (1992).** Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* **2**: 417-422
- Mizrachi, Y. (1989).** Neurotrophic activity of monomeric glucophosphoisomerase was blocked by human immunodeficiency virus (HIV-1) and peptides from HIV-1 envelope glycoprotein. *J. Neurosci. Res.* **23**: 217-224
- Moreno, F. y Herrero, P. (2002).** The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 83-90
- Muller, M., Muller, H. y Holzer, H. (1981).** Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**: 723-727
- Nath, N., McCartney, R. R. y Schmidt, M. C. (2003).** Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 3909-3917
- Navas, M. A., Cerdán, S. y Gancedo, J. M. (1993).** Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**: 1290-1294
- Navas, M. A. y Gancedo, J. M. (1996).** The regulatory characteristics of yeast fructose-1,6-bisphosphatase confer only a small selective advantage. *J. Bacteriol.* **178**: 1809-1812
- Neeff, J., Hagele, E., Nauhaus, J., Heer, U. y Mecke, D. (1978).** Evidence for catabolite degradation in the glucose-dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **87**: 489-495
- Neely, L. A. y Hoffman, C. S. (2000).** Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 6426-6434
- Nehlin, J. O. y Ronne, H. (1990).** Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**: 2891-2898
- Niederacher, D., Schuller, H. J., Grzesitza, D., Gutlich, H., Hauser, H. P., Wagner, T. y Entian, K. D. (1992).** Identification of UAS elements and binding proteins necessary for derepression of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphatase. *Curr. Genet.* **22**: 363-370
- Nuttley, W. M., Brade, A. M., Gaillardin, C., Eitzen, G. A., Glover, J. R., Aitchison, J. D. y Rachubinski, R. A. (1993).** Rapid identification and characterization of peroxisomal assembly mutants in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. **9**: 507-517
- Okar, D. A. y Lange, A. J. (1999).** Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors*. **10**: 1-14

- Oliver, S. G. y Warmington, J. R. (1989).** Transcription. In *The yeasts*. (Rose, H. A. y Harrison, J. R. Ed.). Vol 3. pp. 117-152. Academic Pres. London.
- Opheim, D. J. y Bernlohr, R. W. (1975).** Purification and regulation of fructose-1,6-bisphosphatase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* **250**: 3024-3033
- Orosz, F., Santamaría, B., Ovadi, J. y Aragón, J. J. (1999).** Phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum* is a potent inhibitor of tubulin polymerization. *Biochemistry.* **38**: 1857-1865
- Ozcan, S. y 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
- Palomino, A., Herrero, P. y Moreno, F. (2006).** Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1427-1438
- Pasteur, L. (1876).** Etudes sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la rendre inaltérable, avec une théorie nouvelle de la fermentation. Gauthier-Villars. Paris (Francia)
- Perea, J. y Gancedo, C. (1982).** Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch. Microbiol.* **132**: 141-143
- Petit, T. y Gancedo, C. (1999).** Molecular cloning and characterization of the gene *HXK1* encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast.* **15**: 1573-1584
- Petter, R., Chang, Y. C. y Kwon-Chung, K. J. (1997).** A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* *SNF1* appears to be essential for the viability of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **65**: 4909-4917
- Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J. y Claus, T. (1981).** Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **256**: 3619-3622
- Plesset, J., Palm, C. y McLaughlin, C. S. (1982).** Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**: 1340-1345
- Pontremoli, S. y Traniello, S. (1975).** Fructose-1, 6-diphosphatase and sedoheptulose-1, 7-diphosphatase from *Candida utilis*. *Methods Enzymol.* **42**: 347-353
- Popanda, O., Fox, G. y Thielmann, H. W. (1998).** Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1397**: 102-117
- Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, X. J. y 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
- Proft, M., Grzesitza, D. y Entian, K. D. (1995).** Identification and characterization of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *PCK1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 367-373
- Rández-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J. A. y Moreno, F. (1998).** Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **425**: 475-478
- Regelmann, J., Schule, T., Josupeit, F. S., Horak, J., Rose, M., Entian, K. D., Thumm, M. y Wolf, D. H. (2003).** Catabolite degradation of fructose-1,6-

bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel *GID* genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 1652-1663

Richard, M., Quijano, R. R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F. y Gaillardin, C. (2001). Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **183**: 3098-3107

Richards, O. C. y Rutter, W. J. (1961). Preparation and properties of yeast aldolase. *J. Biol.Chem.* **236**: 3177-3184

Rittmann, D., Schaffer, S., Wendisch, V. F. y Sahm, H. (2003). Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Arch. Microbiol.* **180**: 285-292

Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P. y 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

Rogers, D. T., Hiller, E., Mitsock, L. y Orr, E. (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Sequence, protein homology, and expression during growth on glucose. *J. Biol. Chem.* **263**: 6051-6057

Ronai, Z. (1993). Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int. J. Biochem.* **25**: 1073-1076

Roostita, R. y Fleet, G. H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **28**: 393-404

Roth, S., Kumme, J. y Schuller, H. J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **45**: 121-128

Ruiz-Herrera, J. y Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol.* **178**: 477-483

Ruiz, T., Sánchez, M., De la Rosa, J. M., Rodríguez, L. y Domínguez, A. (2001). The sequence of a 15 769 bp segment of *Pichia anomala* identifies the *SEC61* and *FBP1* genes and five new open reading frames. *Yeast.* **18**: 1187-1195

Sáez, M. J. y Lagunas, R. (1976). Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol. Cell. Biochem.* **13**: 73-78

Sajbidor, J. y Grego, J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 13-16

Sakaki, T., Zahringer, U., Warnecke, D. C., Fahl, A., Knogge, W. y Heinz, E. (2001). Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast.* **18**: 679-695

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Santos, V. L., Heilbuth, N. M. y Linardi, V. R. (2001). Degradation of phenol by *Trichosporon* sp. LE3 cells immobilized in alginate. *J. Basic. Microbiol.* **41**: 171-178

- Sanz, P., Nieto, A. y Prieto, J. A. (1996).** Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements. *J. Bacteriol.* **178**: 4721-4723
- Sato, T., Imanaka, H., Rashid, N., Fukui, T., Atomi, H. y Imanaka, T. (2004).** Genetic evidence identifying the true gluconeogenic fructose-1,6-bisphosphatase in *Thermococcus kodakaraensis* and other hyperthermophiles. *J. Bacteriol.* **186**: 5799-5807
- Scholer, A. y Schüller, H. J. (1993).** Structure and regulation of the isocitrate lyase gene *ICL1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **23**: 375-381
- Scholer, A. y Schüller, H. J. (1994).** A carbon source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene *ICL1* is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3613-3622
- Schüller, H. J. (2003).** Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**: 139-160
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M. C. (2003).** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3381-3385
- Sedivy, J. M. y Fraenkel, D. G. (1985).** Fructose bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, disruption and regulation of the *FBP1* structural gene. *J. Mol. Biol.* **186**: 307-319
- Sirover, M. A. (2005).** New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* **95**: 45-52
- Skalecki, K., Mularczyk, W. y Dzugaj, A. (1995).** Kinetic properties of D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase isolated from human muscle. *Biochem. J.* **310 (Pt 3)**: 1029-1035
- Smith, V., Botstein, D. y Brown, P. O. (1995).** Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**: 6479-6483
- Sols, A. (1981).** Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Top. Cell. Regul.* **19**: 77-101
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stec, B., Yang, H., Johnson, K. A., Chen, L. y Roberts, M. F. (2000).** MJ0109 is an enzyme that is both an inositol monophosphatase and the 'missing' archaeal fructose-1,6-bisphosphatase. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1046-1050
- Strick, C. A., James, L. C., O'Donnell, M. M., Gollaher, M. G. y Franke, A. E. (1992).** The isolation and characterization of the pyruvate kinase-encoding gene from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Gene.* **118**: 65-72
- Sutherland, C. M., Hawley, S. A., McCartney, R. R., Leech, A., Stark, M. J., Schmidt, M. C. y Hardie, D. G. (2003).** Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr. Biol.* **13**: 1299-1305
- Takayama, K. y Kjelleberg, S. (2000).** The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ. Microbiol.* **2**: 355-365
- Tamoi, M., Ishikawa, T., Takeda, T. y Shigeoka, S. (1996).** Molecular characterization and resistance to hydrogen peroxide of two fructose-1,6-bisphosphatases from *Synechococcus PCC 7942*. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**: 27-36

- Tanaka, N., Ohuchi, N., Mukai, Y., Osaka, Y., Ohtani, Y., Tabuchi, M., Bhuiyan, M. S., Fukui, H., Harashima, S. y Takegawa, K. (1998).** Isolation and characterization of an invertase and its repressor genes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**: 246-253
- Tashima, Y., Mizunuma, H. y Hasegawa, M. (1979).** Purification and properties of mouse liver fructose 1,6-bisphosphatase. *J. Biochem (Tokyo)*. **86**: 1089-1099
- Thatcher, J. W., Shaw, J. M. y Dickinson, W. J. (1998).** Marginal fitness contributions of nonessential genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 253-257
- Torres-Guzmán, J. C. y Domínguez, A. (1997).** *HOY1*, a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6283-6293
- Toyoda, Y. y Sy, J. (1984).** Purification and phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Biol. Chem.* **259**: 8718-8723
- Treton, B. Y., Dall, M. T. L. y Gaillardin, C. (1992).** Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase mutation by a genomic sequence from the yeast *Yarrowia lipolytica* identifies a new phosphatase. *Curr. Genet.* **22**: 345-355
- Tsugawa, R., Nakase, T., Kobayashi, T., Yamashita, K. y Okumura, S. (1969).** Fermentation of n-paraffins by yeast. Part. I. Fermentative production of ketoglutaric acid by *Candida lipolytica*. *Agricult. Biol. Chem.* **33**: 929-938
- Valdés-Hevia, M. D., de la Guerra, R. y Gancedo, C. (1989).** Isolation and characterization of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **258**: 313-316
- van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J., Renniers, T. C., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A. J., Bishop, R. J., Schultz, K., Moyer, D. y et al. (1990).** *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N.Y.)*. **8**: 135-139
- van Dijken, J. P., Otto, R. y Harder, W. (1976).** Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. Physiological responses due to the involvement of methanol oxidase as a key enzyme in methanol metabolism. *Arch. Microbiol.* **111**: 137-144
- van Schaftingen, E. y Hers, H. G. (1981).** Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **78**: 2861-2863
- van Schaftingen, E., Jett, M., Hue, L. y Hers, H. G. (1981).** Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* **78**: 3483-3486
- Vassarotti, A. y Friesen, J. D. (1985).** Isolation of the fructose-1,6-bisphosphatase gene of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Evidence for transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **260**: 6348-6353
- Viñuela, E., Salas, M. L. y Sols, A. (1963).** End-product inhibition of yeast phosphofructokinase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**:
- Wolf, K. (1996).** Non-conventional yeast in biotechnology. A handbook. (Wolf, K. Ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wolf, K., Breunig, K. y Barth, G. (2003).** Non-conventional yeasts in genetics, biochemistry and biotechnology. (Wolf, K., Breunig, K. y Barth, G. Ed.). Springer Verlag, Berlin (Alemania).

- Wu, M. X., Smyth, D. A. y Black, C. C. (1983).** Fructose 2,6-Bisphosphate and the Regulation of Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase Activity in Germinating Pea Seeds. *Plant Physiol.* **73**: 188-191
- Yáñez, A. J., Bertinat, R., Concha, I. y Slebe, J. C. (2003).** Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver. *FEBS Lett.* **550**: 35-40
- Yáñez, A. J., García-Rocha, M., Bertinat, R., Droppelmann, C., Concha, I., Guinovart, J. J. y Slebe, J. C. (2004).** Subcellular localization of liver FBPase is modulated by metabolic conditions. *FEBS Lett.* **577**: 154-158
- Yang, X., Hubbard, E. J. y Carlson, M. (1992).** A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science.* **257**: 680-682
- Yang, X., Jiang, R. y Carlson, M. (1994).** A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* **13**: 5878-5886
- Yuan, W., Tuttle, D. L., Shi, Y. J., Ralph, G. S. y Dunn, W. A., Jr. (1997).** Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase. *J. Cell Sci.* **110**: 1935-1945
- Zaror, I., Marcus, F., Moyer, D. L., Tung, J. y Shuster, J. R. (1993).** Fructose-1,6-bisphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* **212**: 193-199
- Zeuthen, M. L., Dabrowa, N., Aniebo, C. M. y Howard, D. H. (1988).** Ethanol tolerance and the induction of stress proteins by ethanol in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1375-1384
- Zhou, R. y Cheng, L. (2004).** Biochemical characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from apple (*Malus domestica*) leaves. *Plant Cell Physiol.* **45**: 879-886