

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y  
DE POSGRADO DEL C.C.H.

CLONACION MOLECULAR DE LA H<sup>+</sup>- ATPasa DE  
Kluyveromyces lactis. COMPLEMENTACION DE  
MUTANTES RESISTENTES A BROMURO DE ETIDIO  
CON DEFECTOS EN EL TRANSPORTE DE POTASIO  
Y EN EL BOMBEO DE PROTONES

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A ;  
MANUEL MIRANDA ARANGO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MEXICO, 1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

## I INTRODUCCION

- I.A La clasificación de las levaduras
- I.B La importancia de las levaduras para el hombre
- I.C Las virtudes de las levaduras
- I.D El genoma de las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae*
- I.E El transporte de potasio en las levaduras

## II OBJETIVOS

## III MATERIALES Y METODOS

- III.A Cepas
- III.B Medios de cultivo y reactivos
- III.C Plásmidos
- III.D Obtención de mutantes resistentes a bromuro de etidio y deficientes en el transporte de potasio (mutantes  $K_{dm}^-$ )
- III.E Análisis genético de las mutantes  $K_{dm}^-$
- III.F Medida del transporte de potasio
- III.G Medida de la respiración de las células
- III.H Cinética de transporte en la mutante  $K_{dm}^-$
- III.I Clonación y caracterización del gen que complementa a las mutantes  $K_{dm}^-$
- III.J Preparación de plásmido de levadura
- III.K Transformación de *E. coli*

**III.L Secuencia de DNA del inserto de la clona 3M**

a) preparación de templado pTZ

**III.M Hibridaciones con el banco de genes de *K. lactis***

a) Marcaje del fragmento

b) Preparación de los filtros para hibridización

c) hibridización en formamida con el fragmento  
radioactivo

**IV RESULTADOS**

**IV.A Mutantes resistentes a bromuro de etidio**

**IV.B Análisis cinético de las mutantes**

**IV.C Transformación de la mutante MD3.3-1b**

**IV.D Análisis de la secuencia de DNA de la clona 3M**

**V DISCUSION**

**VI CONCLUSIONES**

**VII PERSPECTIVAS**

**VIII REFERENCIAS**

## ABREVIATURAS

DNA - ácido desoxirribonucleico  
dsDNA- ácido desoxirribonucleico de doble cadena  
ssDNA- ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla  
RNA - ácido ribonucleico  
ADP - difosfato de adenina  
ATP - trifosfato de adenosina  
pb - pares de bases  
Kb - kilopares de bases  
EDTA - ácido etilen diamino tetracético  
SDS - dodecil sulfato de sodio  
Tris - Tris hidroximetil aminometano  
EB - bromuro de etidio  
MES - ácido 2(N-Morfolino) etanosulfónico  
TEA - trietanol amina  
Kdm - mutante deficiente en el transporte de potasio  
AcLi - acetato de litio  
PEG - polietilenglicol  
BSA - albúmina de suero bovino  
LSK - medio sintético bajo en sales  
ARS - secuencia de replicación autónoma  
AMP - ampicilina  
TET - tetraciclina  
IPTG - isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido  
X-gal- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido

## RESUMEN

Las levaduras cuentan con una H<sup>+</sup>-ATPasa, al menos 2 sistemas de transporte de potasio, uno de alta y otro de baja afinidad que funcionan utilizando una diferencia de potencial generado por la H<sup>+</sup>-ATPasa y 2 canales de potasio, uno activado por voltaje y otro activado por fuerzas mecánicas. En *N. crassa* y *E. coli* también se han descrito 2 sistemas de transporte con características similares a los de la levadura. Ambos genes, para el transportador de alta y baja afinidad, TRK1 y TRK2, han sido clonados y secuenciados en *S. cerevisiae* y el gene de la H<sup>+</sup>-ATPasa ha sido clonado y secuenciado en tres hongos, dos plantas y un flagelado.

Peña y colaboradores encontraron que el bromuro de etidio es un inhibidor competitivo de el transporte de potasio y demostraron una correlación entre la resistencia a bromuro de etidio y defectos en el transporte de potasio en una mutante de levadura.

En el trabajo presente se reporta la obtención y caracterización de una mutante en *K. lactis* deficiente en el bombeo de protones, así como la clonación y secuenciación de un fragmento genómico capaz de complementar esta mutación. La mutante fue caracterizada genéticamente indicando que se trata de una mutación recesiva, con un modelo de segregación mendeliano 2:2 y además que la resistencia al bromuro de etidio y la deficiencia en el bombeo de protones siempre van ligadas.

La secuencia del fragmento genómico mostró la presencia de 3 marcos de lectura abierta: el primero codifica para una proteína que tiene similitud con proteínas de unión a DNA, el segundo codifica para la Old Yellow Enzyme; ninguno de estos 2 genes es el responsable de la complementación en la mutante. El tercero son solo 700 pb del extremo 3' del gene que codifica para la H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática y es el responsable de la complementación en esta mutante.

## INTRODUCCION

### I GENERALIDADES SOBRE LAS LEVADURAS

#### LA LA CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS

No es fácil proponer una definición manejable de los organismos que en conjunto se conocen como levaduras; una levadura puede definirse como un hongo unicelular que se reproduce por gemación o por fisión (Kreger Van Rij, 1984). También se define a las levaduras como organismos eucariontes unicelulares, que por su morfología se consideran como un estado en el ciclo de vida de los hongos filamentosos (Rose y cols; 1969). Estas definiciones son puramente morfológicas y se cumplen para la mayoría de las levaduras; pero en la realidad existen varias excepciones; hay especies que tienden a formar micelio, y aún otros géneros que llevan conidias. Phaff y cols. (1978) han revisado la etimología de la levadura y términos equivalentes en otros lenguajes, señalando una relación constante con la fermentación.

El número de especies de levaduras bien definidas alcanza poco más de quinientas, agrupadas en 59 géneros. Además, hay un número de hongos que se presentan con células semejantes a las levaduras como parte de su ciclo de vida, como *Endomyces*, *Geotrichum*, *Mucor* etc. Por otro lado, es común el error, inclusive entre los investigadores, de usar incorrectamente el término levadura como sinónimo de *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque sin duda ésta ha sido la especie mas utilizada en la investigación biológica, hay una rica

variedad de especies adicionales que ya son o esperan ser usadas en la práctica o en la investigación biológica; inclusive, en algunos casos las especies más exóticas pueden ofrecer mayores ventajas para los estudios experimentales (Arnold,1981).

Los criterios usados en la clasificación de las levaduras son de dos tipos: morfológicos y fisiológicos.

Las formas exhibidas por las levaduras son la consecuencia de la naturaleza e individualidad de su envoltura celular. Algunas especies presentan una capa mucilaginosa como su parte más externa, pero es la pared celular la que contribuye, principalmente, a la forma celular. La arquitectura de la pared está determinada por muchos factores fisiológicos y bioquímicos.

Otra característica de la levadura es su reproducción vegetativa; las levaduras pueden dividirse en uno solo o en múltiples polos, en forma bipolar, por fisión o esterigmatelar.

El tamaño de todas las especies de levadura está dentro de los límites de resolución del microscopio de luz, y muchas descripciones se hacen a este nivel. La forma celular es útil como criterio taxonómico, como en el caso de las células de forma piramidal de *Trigonopsis* o las de forma de limón de *Hanseniospora*. También pueden formar micelio como *Endomyces* o pseudomicelio como *Pichia* y *Candida*. En muchos casos es difícil aplicar estos criterios, ya que tanto la medida como la forma pueden estar influenciadas por el medio ambiente, la nutrición o la variación de la ploidía.

En cuanto a la reproducción sexual en las levaduras ascógenas, una de las principales características es la forma de las ascas (cilíndricas, ovales, redondas, reniformes), el número de esporas por asca, el color de las esporas, su modo de germinación y su forma de



liberación. También es de importancia taxonómica reconocer si las esporas se forman en el cultivo a partir de una célula única, caso en el cual la levadura es homotálica; o si se requiere de una mezcla de células de factor opuesto para la esporulación, la levadura es heterotálica. Existen algunas levaduras que son tanto homotálicas como heterotálicas.

Entre otros criterios útiles para la taxonomía de las levaduras están la capacidad y velocidad de fermentar ciertos azúcares como la glucosa, la galactosa, la sacarosa, la maltosa, la lactosa y la rafinosa (Rose y cols; 1969). Indudablemente que estas capacidades dependen de la estructura enzimática de las células, y habrá mucho que hacer todavía en la definición de estos factores respecto a la taxonomía.

Las levaduras son taxonómicamente diversas, e incluyen tres grupos (Tabla I): a) las ascosporógenas, b) las basidiosporógenas y c) las imperfectas. Estas últimas presentan tanto afinidad con los ascomicetos como con los basidiomicetos. El subphylum *Ascomycotina* comprende la clase *Hemiascomycetes* y el orden *Endomycetales* con 2 familias; la *Spermophthoraceae* y la *Saccharomycetaceae*. Esta última agrupa organismos ampliamente estudiados como: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulasporea*, *Zigosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* etc. El subphylum *Deuteromycotina* comprende la clase *Blastomycetes* donde se halla la familia *Cryptococcaceae* de importancia médica por tener especies patógenas como *Candida* y *Cryptococcus*.

El sistema de clasificación mas reciente esta indicado en la tabla I (Kreger Van Rij y cols; 1984):

TABLA I  
CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS

*Ascomycotina*

*Hemiascomycetes*

*Endomycetales*

*Spermophthoraceae: Coccidiscus, Metschnikowia*

*Sacharomycetaceae:*

*Schizosaccharomycetidae:*

*Schizosaccharomyces*

*Nadsonoidae: Lipomyces*

*Saccharomycetidae:*

*Zygosaccharomyces*

*Saccharomyces*

*Torulasporea*

*Pichia*

*Kluyveromyces*

*Basidiomycotina*

*Basidiomycetes*

*Ustilaginales*

*Filobasidiaceae:*

*Filobasidiella*

*Lucosporidium*

*Ustilago*

*Tremellales*

*Tremellaceae:*

*Tremella*

*Deuteromycotina*

*Blastomycetes*

*Blastomycetales*

*Cryptococcaceae:*

*Cryptococcus, Candida*

*Sporobolomycetaceae:*

*Sporobolomyces*

La posición taxonómica de las levaduras de importancia en estudios bioquímicos está

dada hasta el género. Hay géneros de importancia no solo bioquímica sino también médica, como son *Candida* y *Cryptococcus*.(Tomado de Kreger Van Rij, 1984).

Las levaduras de más interés en este trabajo son tres géneros que han sido ampliamente estudiados: *Schizosaccharomyces*, que se divide por fisión, *Saccharomyces* que se divide por gemación multilateral, con ascosporas esféricas u ovales y *Kluyveromyces*, que presenta gemación multilateral y ascosporas elipsoidales, esféricas o reniformes.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* pueden crecer como células haploides, dividiéndose por gemación, o como células diploides, que se originan a partir de 2 células haploides con factor sexual opuesto ( $a$  y  $\alpha$ ) que se conjugan formando un cigoto, que dan lugar a una clona diploide; ésta se puede dividir mitóticamente y posteriormente sufrir un proceso de meiosis para originar una tétrada de ascosporas haploides (Fig 1).

## **IB. LA IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS PARA EL HOMBRE**

Ningún otro grupo de microorganismos ha estado más íntimamente asociado con el hombre como *E. coli* y las levaduras. Sus contribuciones al progreso del hombre se han basado principalmente en la capacidad de algunas para realizar en forma rápida y eficiente la conversión de azúcares en alcohol y bióxido de carbono, proceso que se lleva a cabo mediante la fermentación alcohólica de líquidos azucarados, como los extractos de frutas, granos y leche. Se encontraron una cervecería y una panadería conservados en buen estado en excavaciones en Tebas, que datan de la dinastía XI, en donde se utilizaban. Fue desde estos inicios que se desarrollaron las grandes industrias que ahora conocemos, como la de la cerveza, el vino, el alcohol y la producción en gran escala de levadura de panadería. A

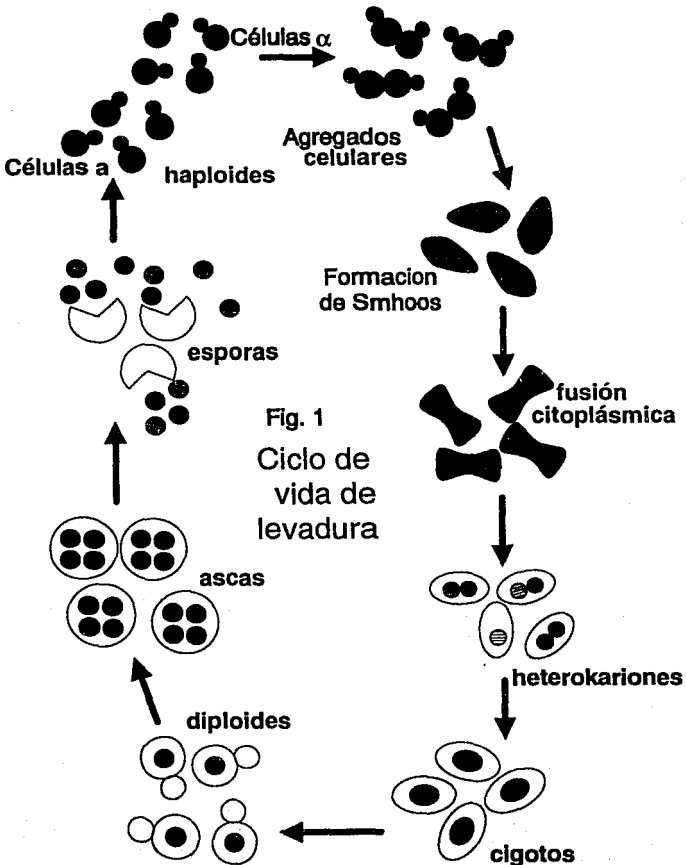


Fig. 1  
Ciclo de vida de levadura

causa de su uso en las industrias cervecera y del pan, se han desarrollado cepas de *S. cerevisiae* que han existido en grandes cantidades por casi todo un siglo.

Otra de las grandes contribuciones de las levaduras al hombre ha sido la elucidación de muchos procesos bioquímicos y metabólicos de la célula, iniciada primero a partir de los experimentos de Pasteur, y luego a los de Buchner durante el siglo pasado.

El holandés Antonie Van Leeuwenhoek es reconocido como el primer hombre que observó levaduras en un nivel microscópico, y en 1680 envió descripciones y dibujos de células de levadura a la Royal Society en Londres. Sin embargo, no fue sino hasta la primera mitad del siglo XIX cuando se avanzó en forma significativa hacia el entendimiento de la biología de la levadura y se inició el estudio de la fisiología y bioquímica de este microorganismo (Rose y cols; 1986).

Algunas levaduras, sin embargo, son dañinas; algunos de los géneros mencionados en la clasificación contienen especies que pueden ser patógenas para el humano. Estas especies no forman un grupo homogéneo ni relacionado naturalmente, sino que están representadas por varios géneros que poseen morfologías y afinidades taxonómicas distintas. Las dos especies clínicamente más importantes son *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. De menos impacto clínico son *Trichosporum cutaneum* y especies del género *Pityrosporum* y *Rodotorula*.

## LC LAS VIRTUDES DE LAS LEVADURAS

El gran esfuerzo realizado en el estudio de numerosos aspectos de *Escherichia coli* es una de las principales causas del avance tan rápido de la biología molecular en los últimos

40 años. Como procarionte, *E. coli* posee una organización estructural fundamentalmente diferente de la de los organismos eucariontes más complejos. Las células eucarionticas al tener núcleo que contiene cromosomas, están de tal forma organizadas, que el proceso fundamental de la transcripción y la traducción se realizan en compartimentos físicamente separados. Este y otros procesos indican que el modelo de expresión es radicalmente diferente entre procariontes y eucariontes. Es en parte por esta razón, que *E. coli* no puede servir como modelo cercano a la organización y funcionamiento de las células superiores. Por tanto, es necesario entender con mayor detalle a uno o más de los organismos eucariontes más simples en un nivel tan detallado como el que se encuentra en *E. coli*.

Los organismos eucarióntes más simples para estudiar, son los microorganismos que crecen y se reproducen a una velocidad alta como bacterias. De éstos, los mejores estudiados hasta ahora son varias especies de levadura. Lo más importante de las levaduras es que tienen solo alrededor de tres y media veces más DNA en su complemento genético haploide que las células de *E. coli*, mientras que *Drosophila* contiene 25 veces más, y los vertebrados superiores contienen 1000 veces más DNA. Por esta y otras razones, la levadura ha sido llamada la *E. coli* de las células eucariónticas. (Watson y cols; 1987)

Las levaduras son reconocidas como microorganismos eucarióntes ideales para los estudios biológicos. Aunque tienen una complejidad genética mayor que la de las bacterias, muestran muchas más ventajas técnicas que permiten un progreso rápido. Algunas de las ventajas que las hacen de interés particular para estudios biológicos incluyen un crecimiento rápido, un modelo de gemación que resulta en células dispersas, la facilidad de aislarlas por filtración o centrifugación a menores velocidades, su resistencia a las contaminaciones, la

facilidad de sembrar y aislar mutantes, el bajo costo de los cultivos y la ventaja económica que ello representa, un sistema genético bien definido y un sistema de transformación altamente versátil.

Las cepas de *S. cerevisiae* y *K. lactis*, a diferencia de la mayoría de los microorganismos, tienen un estado haploide y otro diploide, y en ambos estados son viables con algunos marcadores. El desarrollo de la transformación con DNA ha hecho a la levadura particularmente accesible para clonar genes y algunas técnicas de ingeniería genética. Pueden identificarse genes estructurales por complementación a partir de bancos de genes en plásmidos, y éstos plásmidos pueden ser introducidos en la levadura como moléculas que se replican autónomamente o por integración dentro del genoma. En la levadura puede haber recombinación integrativa por recombinación homóloga de DNA, como sucede con la mayoría de los otros organismos. En la levadura pueden introducirse secuencias clonadas acompañadas de secuencias extrañas sobre plásmidos, y dirigirse hacia localizaciones específicas en el genoma. Además, se han desarrollado técnicas de recombinación homóloga acompañada de altos niveles de conversión para reemplazar directamente secuencias de DNA modificadas genéticamente en localizaciones del cromosoma normal. También los genes silvestres normales sin mutaciones pueden reemplazarse con alelos alterados y alelos interrumpidos. Los fenotipos que se originan después de la interrupción de los genes de la levadura han contribuido a el entendimiento de la función de ciertas proteínas *in vivo*. Los genes pueden reemplazarse directamente con alta eficiencia en la levadura y en otros hongos, pero no con la misma eficiencia en cualquier otro organismo eucariónte.

Otra propiedad importante de las levaduras está ilustrada por el hecho de que se están



introduciendo en ellas genes de mamífero para el análisis sistemático de las funciones de los productos genéticos correspondientes.

También el DNA mitocondrial puede ser alterado ahora en formas definidas por transformación y esto ha permitido un análisis detallado de este organelo. La facilidad con la que el genoma de la levadura puede ser manipulado no tiene realmente precedente en ningún otro eucarionte.

### **LD EL GENOMA DE LAS LEVADURAS *K.lactis* y *S. cerevisiae***

*Kluyveromyces lactis* contiene en su estado haploide 6 cromosomas, los cuales no han sido bien caracterizados ni genética ni físicamente. Los 6 cromosomas varían de 300 Kpb a 3 Mpb, alcanzando una medida de 12 Mpb aproximadamente (Veheston y cols. 1988). Por otro lado, *S. cerevisiae* tiene un grupo haploide de 16 cromosomas bien establecidos, y un único marcador KRB1 que ha sido asignado al cromosoma XVII; aunque no hay evidencia física de este cromosoma. La longitud total del genoma es de 14 Mpb. Otra levadura bien caracterizada es *Schizosaccharomyces pombe*, que muestra 3 cromosomas lineales, y con una medida total de 4, 4.6, y 6.3 Mpb para cada cromosoma (Johnston y cols; 1988).

Una vez aislado un fragmento de DNA para un gen dado, actualmente resulta muy simple asignarlo a un cromosoma específico, usando técnicas de hibridación de DNA-DNA y separando los cromosomas por el método de electroforesis en campo pulsado. Con esta técnica se ha demostrado una variación significativa en la longitud de los cromosomas individuales de una cepa de levadura a otra, lo que se llama polimorfismo en la longitud cromosomal; las bases moleculares de este polimorfismo son desconocidas, pero una

posibilidad es que las secuencias teloméricas encontradas en los extremos de los cromosomas varíen.

En las levaduras también se ha reportado que los cromosomas contienen elementos de DNA móviles, retrotransposones, que además varían en número y posición (Broach y cols; 1990).

Otros ácidos nucleicos que forman parte del genoma de la levadura son el DNA mitocondrial, que codifica para los componentes de la maquinaria traduccional mitocondrial y para aproximadamente el 15% de las proteínas mitocondriales. Entre las moléculas codificadas por el DNA mitocondrial de la levadura se encuentran los RNAs ribosomales, el apocitocromo b, las subunidades 6, 8 y 9 de la ATPasa mitocondrial, y las subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo oxidasa (Gua-Liang-Tiam y cols; 1991). Aunque la función básica de la mitocondria está conservada en casi todos los sistemas eucarióticos, hay una gran diversidad tanto en la estructura del DNA mitocondrial como en el arreglo de los genes dentro de una misma especie, por lo que al igual que con el DNA cromosomal, se presenta polimorfismo (Clark Waker y cols; 1989 y Hasegawa y col; 1991).

Otro de los componentes del genoma son los plásmidos que se presentan en la mayoría de las cepas de levadura, y que funcionan solamente para su propia replicación.

Un plásmido se define como un elemento genético extracromosómico de replicación autónoma (Rieger y cols; 1976). Se caracteriza por poseer una secuencia de iniciación, el origen de replicación (ori en las bacterias, ars en las levaduras), que tiene como función la formación de la horquilla de replicación y que posee además, una secuencia de terminación. En su mayoría, los plásmidos conocidos son moléculas de ácido desoxirribonucleico de doble

cadena, circulares y covalentemente cerrados (cccdsDNA) (Volkert y cols; 1989). Sin embargo, también existen plásmidos lineales (dsDNA) de DNA o dsRNA; estos pueden ser episomales y tener una secuencia ars, o integrativos si carecen de ella. Por su número los hay unicopia o multicopia, y por su localización los hay mitocondriales o citoplásmicos (Esser y cols; 1986).

En los organismos procariontes, los plásmidos pueden conferir ciertas características fenotípicas como son la resistencia a ciertos antibióticos (ampicilina, tetraciclina, oligomicina etc.),

En algunos organismos eucariontes como los hongos, se les han encontrado ciertas características fenotípicas como sucede con el plásmido de envejecimiento de *Podospira anserina*, el factor específico de hospedero de *Fusarium oxysporum*, el factor de envejecimiento de *Neurospora spp*, y el fenotipo rugoso de *Aspergillus spp*. (Esser y cols; 1986).

En las levaduras *S. cerevisiae* y *S. carlsbergensis*, hay un plásmido de DNA de 2  $\mu$ m, y no se ha encontrado relación entre su presencia y alguna característica fenotípica. Este plásmido está presente en la levadura en 50 a 100 copias por célula y se mantiene en una forma estable, lo que lo ha hecho útil como vector de clonación. Se había reportado que este DNA de 2  $\mu$ m era específico del hospedero, y que no podía ser usado en otras especies (Hollenberg, 1982), pero ahora se ha reportado que funciona y es estable en *Torulaspora delbruckii* (Compagno y cols; 1989) y en *Schizosaccharomyces pombe* (Picard y cols; 1990).

Otro plásmido de 1.6  $\mu$ m de dsDNA (4757 pb) ha sido identificado por Chen y col (1986). en una cepa de *Kluyveromyces drosophilum*. Este plásmido circular pKD1 de 1.6  $\mu$ m, se mantiene en forma estable en la célula en 50 a 70 copias. Usando este plásmido, se

han construido vectores con marcadores de selección que se pueden replicar en un número alto de copias en *K. lactis* (Chen y cols; 1986, Bianchi y cols; 1987 Fig 2A). La secuencia de replicación autónoma (ARS) para el pKD1 fue localizada usando cepas del mismo género y aquellas de las cuales se aisló originalmente el plásmido; la secuencia se replica y propaga en cepas de *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *K.drosophilarum*, y también fue comprobado que funciona en *S. cerevisiae*; por tanto, la secuencia que funciona en *Kluyveromyces*, sirve como un ars en *Saccharomyces*, lo que sugiere un alto grado de conservación en el aparato de replicación entre estas levaduras (Volkert y cols; 1989).

Los plásmidos con secuencias de replicación autónoma, que se replican en más de una especie de levadura, son la base para la elaboración de vectores útiles para transferir información genética entre dos o más especies distintas de levadura y en el análisis de los mecanismos de expresión de un gen en 2 contextos genómicos diferentes (Fabiani y cols; 1990, Finchman y cols; 1989).

Ciertas cepas de levadura que fermentan la lactosa como *Kluyveromyces lactis*, muestran un fenotipo "killer" que es conferido por plásmidos lineales de RNA de doble cadena: pGK1 o K1 de 8.9 kb y pGK2, o K2 de 13.4kb. Las células "killer" que llevan el plásmido secretan una proteína de 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) cuyo mecanismo de acción es todavía desconocido. Un análisis densitométrico del DNA "Killer" indicó que existen 50 a 100 copias por célula de este elemento. El plásmido se puede transferir a *S. cerevisiae* por transformación (Gunge y Sakaguchi, 1982) y su mantenimiento en esta especie se demuestra por la producción de la toxina "killer" de *K. lactis*. Existe un gran número de levaduras que son sensibles a el efecto Killer, incluyendo *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *Z. rouxi*, *K. vanudenni*,

*Torulopsis glabrata*, *Candida utilis* y cepas de *K. lactis*.

De una forma similar a los plásmidos bacterianos, los plásmidos eucarióticos son útiles para la construcción de vectores ideales para la transferencia y propagación de material genético en hospederos eucariontes, por lo que se pueden usar para clonación y expresión de genes, con el fin de incrementar la productividad o alterar características de producción en los microorganismos industriales (Esser y cols; 1986). Estos plásmidos ofrecen numerosas perspectivas que pueden ser explotadas.

Los vectores más comúnmente usados para clonación de genes y la elaboración de bancos de genes para la transformación de levaduras se llaman vectores lanzadera y son de 2 tipos: vectores episomales, basados en la secuencia de replicación autónoma de los plásmidos 2  $\mu$ m, 1.6  $\mu$ m, "killer" etc. y vectores centroméricos. Ambos tipos de vectores también llevan un gen cuya presencia puede ser seleccionada en la levadura. También se pueden construir vectores con estas secuencias a partir de plásmidos bacterianos, y por ello pueden ser seleccionados y propagados en *E. coli*; estos plásmidos muestran también un origen de replicación bacteriano (*ori*) y un marcador de selección bacteriano que confiere resistencia a antibióticos o metales (Fig 2A). El marcador de selección en la levadura suele ser alguno de los genes de levadura clonados para el que existen cepas nulas que no revierten, los marcadores más comunes son LEU, HIS, URA, y TRP (Rose y cols; 1991).

Una característica adicional que se presenta en algunos vectores y que soluciona problemas de clonación específica, es la presencia de un gen de tetraciclina adicional. Con este gen, las inserciones pueden ser identificadas por sensibilidad a tetraciclina de las transformantes bacterianas resultantes. Otros vectores incorporan el elemento que

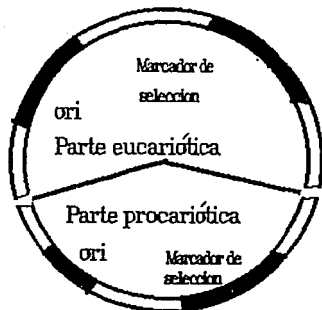


Fig. 2a Esquema de un plásmido lanzadera que se puede replicar en 2 organismos, un procarionte y un eucarionte.

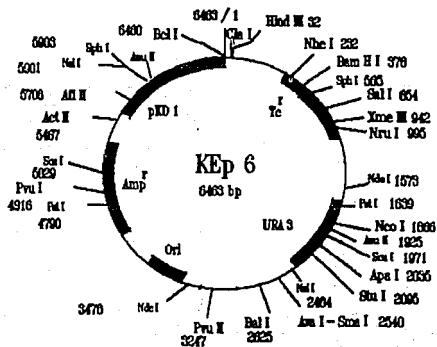


Fig. 2b Mapa de restricción del plásmido KEp6

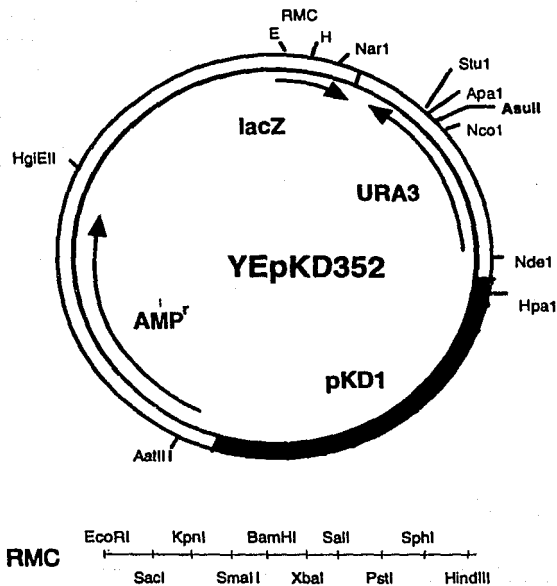


Fig 2C. Mapa de restricción del plásmido YEpkD352. Los sitios únicos están representados por la región múltiple de clonación de pUC18 y por el nombre de la enzima en el mapa. Las secuencias de levadura son el gen URA3 de *S. cerevisiae* y el origen de replicación pKD1 de *K. drosophylarum*. El resto del vector es derivado de pUC18

complementa lacZ y el sitio múltiple de clonación del vector M13, de modo que los plásmidos que contienen insertos pueden ser distinguidos de los vectores sin inserto por un ensayo de color de la colonia, (actividad de  $\beta$ -galactosidasa) azul o blanco, respectivamente (Fig 2C).

Estos vectores híbridos han sido usados extensamente para la clonación de genes responsables de fenotipos específicos en levadura, y han hecho útil el uso de bancos genómicos y de cDNA para aislar genes específicos por complementación en levaduras. Así mismo, se han usado para expresar genes de otros organismos en la levaduras (Gaber y cols; 1992).

En síntesis, la biología molecular de las levaduras se ha desarrollado con gran rapidez, independiente de la importancia intrínseca de estos microorganismos desde el punto de vista industrial, para la producción de vinos, cerveza, pan, alcohol, enzimas, vitaminas y otras sustancias, se ha abierto la posibilidad de utilizarlos en muchísimos procesos biotecnológicos.

Independientemente de ello, éste mismo desarrollo permite utilizar a las levaduras en muchos problemas de investigación básica, pero al mismo tiempo, ampliar las perspectivas del conocimiento de su propia fisiología. Tal es el caso de nuestro trabajo, en el cual decidimos estudiar a fondo el transporte de potasio y de otras sustancias como una línea constante de trabajo.

## **LE EL TRANSPORTE DEL POTASIO EN LAS LEVADURAS**

Todos los organismos requieren potasio para vivir, ya que estos iones tienen diversas funciones, entre las que destacan la regulación de la osmolaridad intracelular, la activación



de las enzimas intracelulares, su participación en el mantenimiento de los potenciales electroquímicos celulares, etc. Estas son algunas de las razones por las cuales el transporte de este catión ha sido objeto de estudios intensos. Las primeras investigaciones encaminadas a dilucidar el mecanismo de transporte en levaduras fueron iniciados por el grupo de Conway, quien demostró la existencia de un acarreador catiónico en la membrana plasmática de las levaduras (Conway y O' Malley, 1946). Posteriormente, este mismo autor propuso la existencia de un mecanismo para el transporte de potasio, que implicaba un acarreador que intercambiaba  $K^+$  por  $H^+$ , y le llevó a proponer que, para obtener la energía necesaria, estaba conectado con los sistemas metabólicos de la célula, pues tanto la salida de  $H^+$  como la entrada de  $K^+$  deberían ocurrir en contra de un gradiente de concentración (Conway y Duggan, 1957). Aunque algunos de estos modelos estaban equivocados, fueron parte de los antecedentes que llevaron a Mitchell posteriormente a proponer la teoría quimiosmótica, con la que explicó que algunos de los sistemas de transporte en los seres vivos se acoplan a los potenciales electroquímicos existentes en las membranas (Mitchell, 1974), y que el responsable de la generación de este gradiente electroquímico de protones es una serie de moléculas llamadas  $H^+$  ATPasas.

En las levaduras, Conway había demostrado la existencia de un sistema de transporte de  $H^+$  ligado al de  $K^+$ , y propuso que estaba movido por el poder reductor de la célula (Conway, 1950). Posteriormente se, encontró que el transporte de  $H^+$  empleaba ATP como fuente directa de energía, por lo que se planteo la existencia de una ATPasa de  $H^+$  (Peña y cols; 1972). En *Neurospora crassa* también se había descrito un mecanismo similar y con requerimientos de  $K^+$  semejantes a los de la levadura (Tatum, 1964). La existencia de esta

ATPasa fue confirmada posteriormente por otros estudios (Peña, 1975), y dio lugar a numerosas investigaciones sobre la fisiología de esta enzima que es una H<sup>+</sup>- ATPasa de membrana plasmática (Serrano y cols; 1985, 1986, 1990; Goffeau y cols; 1986, 1990).

Entre otras características del sistema de transporte de los cationes monovalentes, Armstrong y Rothstein (1964) demostraron mediante estudios cinéticos en *S. cerevisiae*, que el transporte de cationes monovalentes procedía mediante un sistema de translocación con múltiples sitios, y propusieron un sitio para el sustrato y otro sitio modificador (Armstrong y cols; 1964). Posteriormente, Borst-Pauwels demostró la existencia de un sitio de activación (Borst-Pauwels, 1981)

En 1975, Peña y cols estudiaron el efecto del bromuro de etidio (EB) y encontraron que a bajas concentraciones, es un inhibidor competitivo para el transporte de potasio (Peña y cols; 1976, 1979). Posteriormente, se demostró una correlación entre la resistencia a bromuro de etidio (EB) y cambios en el transporte de potasio en mutantes de la levadura *K.lactis* resistentes al EB (Brunner y cols; 1982)

En 1984, Rodríguez Navarro y colaboradores encontraron que, en las células de *S. cerevisiae* cultivadas en ausencia de sodio y amonio, se expresan 2 sistemas de transporte de potasio diferentes: uno de alta afinidad cuando las células se cultivaron a concentraciones de potasio del orden de 5  $\mu$ M. Este sistema muestra una Km de 150  $\mu$ M para el <sup>86</sup>Rb y una V Max de 21 nmol de <sup>86</sup>Rb (min.mg)<sup>-1</sup>, y una Km de 24  $\mu$ M para el <sup>42</sup>K y una V max de 34nmol <sup>42</sup>K (min.mg)<sup>-1</sup>. Se observó también otro sistema de baja afinidad cuando las células se cultivaron con concentraciones altas de potasio (2mM); el sistema muestra una Km de 6mM para el <sup>86</sup>Rb y una Vmax de 6 nmol (min.mg)<sup>-1</sup>, Km de 2mM para el <sup>42</sup>K y una Vmax

de 7 nmol de  $^{42}\text{K}$  (min.mg) $^{-1}$  (Rodríguez Navarro y cols; 1984). Tal descubrimiento llevó a estos mismos autores a proponer la existencia de un sistema de transporte de potasio interconvertible, que puede operar con dos afinidades diferentes o la presencia de 2 sistemas de transporte independientes; uno de alta afinidad y otro de baja afinidad.

El grupo de Rodríguez Navarro obtuvo una mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el transporte de potasio de alta afinidad, lo que demostró la existencia de 2 sistemas de transporte de potasio independientes (Rodríguez Navarro y cols; 1985). Otros estudios en sistemas procariontes y eucariontes han mostrado que el potasio se transporta por sistemas múltiples, funcionalmente independientes, y que tienen afinidades diferentes para el potasio.

En *E. coli*, se presenta un transporte de potasio de baja afinidad que es constitutivo y responsable del transporte de potasio en la mayoría de las condiciones fisiológicas (Rhoads, Waters y Epstein, 1976). La síntesis del transportador de alta afinidad es reprimida y se propone que funciona como un mecanismo para capturar al potasio cuando las concentraciones de este ión son bajas (Laimins y cols; 1978). Las constantes cinéticas que se presentan para el transportador de baja afinidad en *E. coli* son: una  $K_m$  para el  $\text{K}^+$  1.5 mM y una velocidad máxima muy alta. Para el transportador de alta afinidad se presenta una  $K_m$  para el  $\text{K}^+$  de 2 $\mu\text{M}$  (Epstein y Laimins, 1980). En *N. crassa* también se han reportado 2 sistemas de transporte para el  $\text{K}^+$  con requerimientos de potasio parecidos a los de la levadura y *E. coli* (Tatum y Slayman, 1964).

En 1988, se clonó y secuenció el gen que codifica para el acarreador de alta afinidad TRK-1 en *S. cerevisiae*, demostrando la independencia física y funcional del sistema de

transporte de protones y de potasio (Gaber y cols; 1988). Posteriormente, por medio de hibridaciones, utilizando como sonda el gen TRK-1 de *S. cerevisiae*, se identificaron secuencias con similitud en el genoma de la mayoría de las especies de *Saccharomyces*, y se clonó el gen TRK-1 de *S. uvarum* encontrando que confiere un transporte de potasio de alta afinidad en una mutante TRK $\Delta$  de *S. cerevisiae*. Ambos genes tienen secuencias con 86 % de similitud (Gaber y cols; 1991). Nosotros hemos clonado el gen TRK-1 de *K.lactis* por complementación heteróloga en una mutante TRK $\Delta$  de *S. cerevisiae* (No publicado). El gen TRK-1 de *K.lactis*, cuando se expresa en *S. cerevisiae*, le confiere la capacidad de crecer en medios con bajo contenido de potasio (0.5 y 1 mM) y además, estas transformantes muestran transporte de potasio. Este gen está siendo secuenciado actualmente.

En *S. cerevisiae* se ha descrito un solo gen para el sistema de transporte de alta afinidad, a diferencia de *E. coli*, en donde se han descrito 3 genes que forman parte de un operón y que son responsables del transporte de alta afinidad en *E. coli*. Este sistema ha sido descrito como una ATPasa de potasio (Epstein y Laimins, 1980). En *S. cerevisiae* el transporte está acoplado a un gradiente electroquímico de H<sup>+</sup>.

En 1990, Gaber encontró que los defectos en el transporte de potasio en células TRK $\Delta$  pueden suprimirse fenotípicamente por mutaciones extragénicas denominadas Rpd (dependencia reducida de potasio "reduced potassium dependency"). En las mutantes aisladas Rpd, se identificaron mutaciones dominantes y recesivas que permiten el crecimiento de las células TRK $\Delta$  en medios con bajo potasio. Las mutaciones dominantes residen en un único locus, Rpd2, y las mutaciones recesivas están en grupos de complementación no ligados (Rpd1 y Rpd3). Ensayos del transporte de potasio de las

mutantes han demostrado que TRKA Rpd1 y TRKA Rpd3 muestran transporte de potasio neto, que se incrementa significativamente en comparación con la cepa TRKA. Las mutantes exhiben un orden de fenotipos recesivos adicionales, incluyendo hipersensibilidad a cicloheximida, bromuro de etidio y acriflavina, sugiriendo que los productos genéticos de Rpd juegan un papel general en el transporte o en la permeabilidad de la membrana (Gaber *et al.* 1990). Posteriormente, el gen Rpd fue clonado y secuenciado, mostrando homología con los acarreadores de glucosa, lo que sugiere un transporte inespecífico de potasio a través del sistema de transporte de glucosa (Gaber y cols; 1992).

En 1990, Rodríguez Navarro y colaboradores reportaron que el TRK1 es un componente regulador del sistema de transporte de potasio de *S. cerevisiae*, y que se requiere para potenciar la entrada de potasio al disminuir el potasio intracelular o por la disminución del pH interno (Rodríguez Navarro y cols; 1991).

En 1990, Gaber reportó un gen TRK-2, que se requiere para el transporte de potasio de baja afinidad en *S. cerevisiae* (Ko H.C. y cols; 1990) y fue identificado aislando mutantes que requerían 100 mM de potasio para crecer; las mutantes mostraron hipersensibilidad a los medios ácidos (pH bajo) y ésta puede ser suprimida por altas concentraciones de potasio pero no de Na<sup>+</sup>. Así mismo, el gen TRK-1 suprime los defectos en el transporte y la hipersensibilidad al pH. El gen TRK-2 codifica para un transportador de potasio similar a TRK-1, con 12 dominios transmembranales y una región hidrofílica grande entre los dominios M3 y M4.

El descubrimiento de que TRK-1 y TRK-2 codifican para transportadores de potasio homólogos, es estructuralmente redundante, así como son los dos genes, PMA1 y PMA2, que

codifican para dos bombas de protones en *S. cerevisiae* (Shlessor y cols; 1988). Esto haría pensar que el TRK-2 pudiera ser un regulador del sistema de transporte

## II OBJETIVOS

Con base en estos antecedentes y utilizando los resultados obtenidos por Peña y cols (1975); Brunner y cols (1982), sobre la resistencia a bromuro de etidio y defectos en el transporte de potasio, se obtuvieron y caracterizaron mutantes resistentes al bromuro de etidio, y se clonó un gene que participa en la resistencia a bromuro de etidio y que es un componente importante del sistema de transporte en levaduras, el gene de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.

La secuencia del gen es incompleta, por lo que será secuenciado el su totalidad, así como para conocer la estructura primaria de la proteína, y también para hacer comparaciones en cuanto a secuencia y función.

Posteriormente, se podrán estudiar las mutantes en las cuales el bombeo de protones es normal, para definir la mutación y secuenciar el gen responsable, con la posibilidad de que se trate del transportador de potasio de esta levadura, para hacer las comparaciones con los genes hasta ahora descritos.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.A CEPAS

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron las siguientes:

#### III.A CEPAS

Cepa	Genotipo
<i>E. coli</i>	
HB101	hdsS20, recA13, ara14, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-15, mtl-14, supE44
TG-1	supE, hsd 5, thi (lac <sup>-</sup> proAB), F'(traD36, pro AB <sup>+</sup> , lacIq, lacZ M15)
NM522	supE, supF, hsdR, trpR, lacY, recA13, metB, gal
<i>K. lactis</i>	
WM27	Mat $\alpha$ , hisA, EB <sup>S</sup>
WM37	Mat $\alpha$ , hisA, EB <sup>S</sup>
MD2/1	Mat $\alpha$ , uraA, hisA, argA [pKD1, K1K2] K- R-EB <sup>S</sup>
MDGH33	Mat $\alpha$ , uraA, EB <sup>S</sup>
MDGH3.3 1b	Mat $\alpha$ , uraA, hisA, Kdm <sup>-</sup> , EB <sup>R</sup>
CS48-5	Mat $\alpha$ , hisA, trk-1, Kdm <sup>-</sup> , EB <sup>R</sup>
MD33	Mat $\alpha$ , uraA, EB <sup>S</sup>
MD3.31b	Mat $\alpha$ , hisA, uraA, Kdm <sup>-</sup> , EB <sup>R</sup>
M21	Mat $\alpha$ , hisA, EB <sup>R</sup> , Kdm <sup>-</sup>

M25	Mat $\alpha$ , hisA, EB <sup>R</sup> , Kdm <sup>-</sup>
MMA(2)	Mat $\alpha$ , lisA, uraA, hisA, argA, Kdm <sup>-</sup> , EB <sup>R</sup>
MMA(3)	Mat $\alpha$ , lisA, uraA, his, Kdm <sup>-</sup> , EB <sup>R</sup>

La cepa MD2/1 lleva el plásmido pkD1 y fue donada generosamente por el Dr. H. Fukuhara.

La cepa CS48-5 es una mutante que se deriva de la cepa silvestre WM27 y la cepas M21 y M25 son mutantes que se derivan de la cepa WM37.

Las cepas MMA(2) y MMA(3) son mutantes y se derivan de una cruce de las cepas M21 X MD2/1.

### III.B MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

#### 1. MEDIO COMPLETO YPD:

Extracto de levadura	1%
Peptona de gelatina	1%
Dextrosa	2%
Agar	2%

#### 2. MEDIO COMPLETO YPG:

Extracto de levadura	1%
Peptona de gelatina	1%
Glicerol	2%
Agar	2%

YPG EB 10	Bromuro de etidio	10 $\mu$ M
YPG EB 15		15 $\mu$ M
YPG EB 20		20 $\mu$ M



3. MEDIO MINIMO SD:	Base nitrogenada de levadura	0.7%
	Dextrosa	2%
	Agar	2%
4. MEDIO MINIMO CON AMINOACIDOS (SD+a.a)	Base nitrogenada de levadura	0.7%
	Dextrosa	2%
	Agar	1%
	Sulfato de adenina	20 mg/l
	L-arginina	20 mg/l
	L-histidina	20 mg/l
	L-leucina	30 mg/l
	L-lisina	30 mg/l
	L-metionina	20 mg/l
	L-triptofano	20 mg/l
uracilo	20 mg/l	

Para determinar la auxotrofia respecto a un aminoácido, se eliminó dicho aminoácido del medio mínimo

5. MEDIO SINTETICO BAJO EN SALES (LSK-URA)	Agar lavado bajo en Sales	2%
	Dextrosa	2%
	Sulfato de adenina	20 mg/l
	L-histidina HCl	20 mg/l
	L-arginina HCl	20 mg/l
	L-metionina	20 mg/l
	L-tirosina	30 mg/l
	L-leucina	30 mg/l
	L-isoleucina	30 mg/l
	L-lisina HCl	30 mg/l
	L-fenilalanina	50 mg/l
	L-ácido glutámico	100 mg/l
	L-ácido aspártico	100 mg/l
	L-valina	150 mg/l
	L-treonina	200 mg/l
	L-serina	375 mg/l
	Cisteína	60 mg/l
	Alanina	20 mg/l
	Guanina	20 mg/l
	Prolina	120 mg/l
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8 mM	

MgSO <sub>4</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12.5 mM
Vitaminas	1.2 mg/l
Elementos traza 1000X	0.1%

El agar y la glucosa se esterilizaron por separado y se mezclaron con el resto de los componentes a una temperatura de 40° C. Los reactivos y el medio se prepararon con agua desionizada. El potasio fue adicionado a la concentración deseada.

6. MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA (ME)	Extracto de malta	5%
	Agar	3%

#### MEDIOS PARA BACTERIAS (Maniatis et al;1992)

1. MEDIO DE LURIA-BERTANI (LB)	Extracto de levadura	0.5%
	Triptona	1%
	NaCl	1%
	Agar	2%

LB+ampicilina (LBamp)	Ampicilina	60 µg/ml
LB+tetraciclina (LBtet)	Tetraciclina	20 µg/ml

2A. SALES M9 5X	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.4%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5%
	NaCl	0.25%
	NH <sub>4</sub> Cl	0.5%

2B. MEDIO MINIMO M9	Sales M9 5X	200 ml
	MgSO <sub>4</sub> 1 M	2 ml
	CaCl <sub>2</sub> 1 M	0.1 ml
	Glucosa	0.4%
	Agar	2%
	H <sub>2</sub> O. a 1 lt	

### 3. MEDIO 2X-YT

Triptona	1.6%
Extracto de levadura	1%
NaCl	0.5%

## REACTIVOS

### 1. AMORTIGUADOR TRIS-BORATO (TBE)

Trizma base	0.089 M
Acido bórico	0.089 M
EDTA	0.002 M
pH 8	

### 2. AMORTIGUADOR TRIS ACETATOS (TAE)

Trizma base	0.04 M
Acido acético Glacial	0.04 M
EDTA	0.001 M
pH 8.0	

### 3. AMORTIGUADOR TE:

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

### 4. AMORTIGUADOR PBS:

Sacarosa	275 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
pH 7.4	

### 5. AMORTIGUADOR QTP

Tritón X 100	2%
SDS	1%
NaCl	100 mM
Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8	

**6. AMORTIGUADOR TENS**

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM
NaOH	0.1 N
SDS	0.1 N

**7. ISOPROPIL-B-D-GALACTOSIDO (IPTG) 20%**

**8. 5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL-B-D-GALACTOSIDO (x-gal) 20 mg/ml  
EN DIMETILFORMAMIDA**

**9. MEZCLA DE PARAR (FICOL-STOP MIX)**

Ficoll	35.0%
SDS	0.5%
Azul de bromofenol	0.1%
Xilencianol	0.1%

**10. AMORTIGUADOR SSC 20X**

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
pH 7	
H <sub>2</sub> O a 1 l	

**11. DENHARDT 50X**

Ficoll	5.0 g
Polivinilpirrolidona	5.0 g
BSA	5.0 g
H <sub>2</sub> O a 1 l	

**12. SOLUCION DE HIBRIDACION**

Formamida	48%
SSC	1X
Tris HCl pH 7.6	20 mM
Denhardt	1X
Sulfato de Dextran	10%
SDS	0.1%

**13. AMORTIGUADOR DE BAJA ASTRINGENCIA**

SSC	2%
SDS	0.1%

#### 14. AMORTIGUADOR DE ALTA ASTRINGENCIA

SSC	0.2%
SDS	0.1%

#### IILC PLASMIDOS.

El vector híbrido KEp6, donado por el Dr. H. Fukuhara, se caracteriza por llevar el marcador de selección en levaduras URA3 de *S. cerevisiae*, el origen de replicación pKD1 de *K. drosophylarum*, los genes que contienen resistencia a ampicilina y tetraciclina en bacterias y además un origen de replicación bacteriano (Fig.2B).

El vector YEpKD352 fue construido eliminando un fragmento AatII-Hpa1 de YEp352 que contiene la secuencia 2 $\mu$  (Hill y cols; 1986). Se subclonó en este sitio un fragmento AatII-ClaI de 1022 pb que contiene el origen de replicación de *Kluyveromyces*, pKD1. Los extremos ClaI fueron rellenados con nucleótidos usando el fragmento grande de la DNA polimerasa de *E. coli* "Klenow" y ligados con el extremo de Hpa1. El plásmido resultante fue nombrado YEpKD 352 y contiene el gen URA3, el origen pKD1, lacZ con la región múltiple de clonación de PUC18, así como un gen que confiere resistencia a ampicilina. Las ligaciones se realizaron a 16° C, toda la noche, usando ligasa T4 de Boheringer (Fig. 2C).

Las secuencias de los fragmentos de interés se realizaron utilizando el vector pTZ18R que lleva un gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7 seguido del sitio múltiple de clonación de pUC18. Las clonas fueron mantenidas en la cepa TG-1 y NM522.

### **III.D OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A BROMURO DE ETIDIO Y DEFICIENTES EN EL TRANSPORTE DE POTASIO (MUTANTES Kdm-)**

Se seleccionaron mutantes espontaneas resistentes a bromuro de etidio sembrando aproximadamente  $10^8$  células de la cepa WM27 y WM37 en medio de YPG que contenía 20  $\mu\text{M}$  de bromuro de etidio. Cuando las colonias fueron suficientemente grandes (6 a 7 días después de la incubación), las mutantes se seleccionaron y sembraron en YPD. A las mutantes seleccionadas se les probaron marcadores de auxotrofia y crecimiento en YPG + EB a las concentraciones de 10, 15 y 20 $\mu\text{M}$  de EB. También fueron crecidas en medios selectivos de bajo potasio, y a las que no mostraron crecimiento se les hizo el análisis fisiológico (transporte de potasio y respiración), para seleccionar clonas deficientes en el transporte de potasio, las cuales fueron analizadas genéticamente.

### **III.E ANALISIS GENETICO DE LAS MUTANTES Kdm<sup>-</sup>**

Las mutantes que mostraron un fenotipo Kdm<sup>-</sup> se analizaron genéticamente estudiando la segregación de caracteres. Para ello se hicieron cruzas sembrando una asada de células de cada cepa (mutanto y silvestre) con diferente factor de compatibilidad  $\alpha$  y  $a$  en medio de extracto de malta. A las 24 hrs se observaron cigotos y diploides, de los cuales se hizo una suspensión ligera, poniendo a las células en 10 ml de agua destilada estéril y sembrando 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión en medio mínimo. Se incubaron las placas por 48 hrs a 30°C, para aislar colonias individuales.

Después de la incubación, se indujo la esporulación sembrando una clona diploide en el medio de extracto de malta, se incubó por 48 hrs, y se observaron al microscopio la

formación de las tétradas (24 hrs. aprox). Las tétradas se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se digirió la pared del asca añadiendo 200 µl de B-glucuronidasa (2 mg/ml), se dejó a temperatura ambiente hasta encontrar ascas abiertas y se detuvo la reacción bajando la temperatura a 4 °C.

La disección de las tétradas se realizó con un micromanipulador Leitz, y las acosporas individuales se sembraron en YPD; posteriormente se les probó marcadores de auxotrofia, crecimiento en medio selectivo de bajo potasio y resistencia a bromuro de etidio, para el análisis de los caracteres. Se hicieron las siguientes cruzas:

WM37 X MD2/1,

MD 33 X CS48-5,

MD2/1 X M21 y

MD2/1 X M25.

Para verificar el fenotipo de las cepas parentales y segregantes, se les midió el transporte de potasio.

#### **II.F MEDIDA DEL TRANSPORTE DE POTASIO.**

A las mutantes obtonidas y a las segregantes de la crusa MD33 X CS48-5 y MD2/1 X M21 se les hizo un análisis del transporte de potasio. Para ello se inoculó cada mutante, las segregantes y las cepas progenitoras WM27 y WM37 en 200 ml de YPD líquido, y se cultivaron durante 24 hrs, a 30 °C, en un agitador rotatorio a 250 rpm. Después del crecimiento, se colectaron las células por centrifugación a 4300 X g' por 10 min. y se lavaron 2 veces con agua desionizada (ddH<sub>2</sub>O). Las células se resuspendieron en 20 ml de agua

desionizada y se ayunaron con agitación vigorosa por 16 a 18 hrs a 30°C. Después de este tiempo, las células se centrifugaron, se lavaron 2 veces con agua desionizada y se resuspendieron finalmente en una proporción de 0.5 g/ml (Peso húmedo).

Los registros del transporte de potasio se siguieron con un electrodo catiónico conectado a un potenciómetro, un amplificador y un sistema de registro. En la cubeta del electrodo, mantenida a temperatura constante (30°C), se colocaron 9.8 ml de amortiguador (MES-TEA 5 mM, pH 6, glucosa 50 mM) y 200 µl de la suspensión de células (100 mg).

### **III.G MEDIDA DE LA RESPIRACION DE LAS CELULAS.**

La respiración de las células se midió en un oxímetro con un electrodo de Clark conectado a una fuente de poder (Yellow Springs Instruments) y un registrador. La cubeta del electrodo contenía 3.8 ml del mismo amortiguador y 200 µl de la suspensión de células.

### **III.H CINETICA DE TRANSPORTE EN LAS MUTANTES Kdm<sup>-</sup>.**

El estudio de la cinética del transporte se hizo con <sup>86</sup>Rb, ya que el potasio y rubidio se transportan por el mismo sistema (Armstrong y Rothstein, 1964). El transporte de <sup>86</sup>Rb se ensayó en células tratadas como se describió anteriormente, resuspendidas en una relación de 50 mg/ml y mantenidas en hielo hasta el experimento. El transporte se midió incubando por 2 minutos a 30° C, 8 tubos con 5 mg de levadura en 1 ml de amortiguador MES-TEA 5 mM, glucosa 50 mM. En seguida se añadió <sup>86</sup>Rb a cada tubo para obtener concentraciones de rubidio de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM, y se incubaron por otros 2 min a 30° C. De la mezcla de incubación se tomaron 100 µl y se filtró a través de una membrana de



nitrocelulosa con un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar la radioactividad no incorporada, y las membranas fueron lavadas con 10 ml KCl 100 mM para eliminar el  $^{86}\text{Rb}$  unido al exterior de las levaduras. La radioactividad tomada por las células se midió por medio de un contador de centelleo, colocando los filtros con las células lavadas en líquido de centelleo. Los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$  se calcularon por la ecuación de Lineweaver-Burk. Como control positivo se utilizó la cepa silvestre WM27 (Peña y cols; 1975).

### **III CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN QUE COMPLEMENTA A LA MUTANTE $K_{dm}^- EB^R$ .**

En una primera prueba, se buscó la posibilidad de que las mutantes de *K. lactis* resistentes a bromuro de etidio e incapaces de transportar eficientemente el potasio, pudieran complementarse con el gen TRK1 ya descrito, clonado y secuenciado (Gaber y cols; 1988). De la cruce MDGH33 X CS48-5 se seleccionó una espóra con el marcador de auxotrofia *uraA*, y que además fuera mutante deficiente en el transporte de potasio. Esta cepa seleccionada, MD 3.31b de *K. lactis*, se transformó con 1  $\mu\text{g}$  de DNA del vector KEp6 y del KEp6TRK de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*, para ver si el TRK complementaba a la mutación en *K. lactis*. Para la transformación se usó el método de Ito *et al* (1983). haciendo células competentes con acetato de litio y las transformantes se seleccionaron sembrando en medio mínimo SDURA y posteriormente se replicaron en un medio de selección bajo en sales, LSK, con 1 mM de potasio en el medio.

También se transformó a la mutante MD3.31b con un banco de genes de *K. lactis* hecho en el vector KEp6, para identificar al gen que complementa esta mutación. La

transformación de la mutante con el banco de genes se realizó por electroporación, para lo cual se prepararon las células de la siguiente manera:

Cien mililitros del medio de cultivo YPD líquido fueron inoculados con 1 ml de un cultivo de la mutante en fase estacionaria, y se incubó con agitación vigorosa a 30°C hasta obtener lecturas de 80 unidades Klett; posteriormente las células se centrifugaron a 4300 X g' por 10 min y se lavaron 2 veces con PBS a temperatura ambiente (Sacarosa 272 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM a pH 7.4). Luego las células se resuspendieron en PBS en un décimo del volumen del cultivo original.

La transformación se hizo por electroporación, de la manera siguiente: se colocó 0.8 ml de volumen final de la suspensión de células y 1 µg de DNA del banco en celdas de 0.4 cm de un Genepulser de Bio-Rad. Las condiciones de electroporación fueron: Capacitancia de 25 microfaradios y 1.5 Kvolts.

Después del pulso de voltaje, las células se sembraron en medios sin uracilo para seleccionar las transformantes que incorporaron el plásmido. Las colonias que crecieron después de 4 días se replicaron en medios de bajo potasio (LSK1). Las colonias que mostraron crecimiento en LSK1 fueron seleccionadas para medirles transporte de potasio y para crecerlas en presencia de EB 20 µM, y para recuperar el plásmido.

### **III.J PREPARACION DE PLASMIDO DE LEVADURA**

El plásmido se recuperó inoculando 5 ml de medio sin uracilo (medio selectivo para el plásmido) de cada transformante complementada, seguida de una incubación con agitación vigorosa a 30°C, por 16-18 hrs. Las células se centrifugaron a 4300 X g' por 5 min y se

resuspendieron en tubos Eppendorf con el líquido residual; posteriormente se adicionaron 0.2 ml de una mezcla fenol-cloroformo (25:24), 0.3 g de perlas de vidrio lavadas con ácido, y se agitó vigorosamente con vortex a medio poder durante 2 min. Después se centrifugó 5 min en una microfuga y se recuperó la fase acuosa. Se hizo una extracción más con fenol-cloroformo y el DNA se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto; el DNA se resuspendió en 100 µl de TE.

Posteriormente se transformó *E. coli* con 5 µl de la preparación del plásmido de levadura, haciendo células competentes con  $\text{CaCl}_2$  50 mM (Mandel y Higa 1970). Las transformantes bacterianas se seleccionaron en placas de LB con ampicilina 60 µg/ml y se crecieron a 37°C, durante 24 hrs.

Las transformantes bacterianas obtenidas se seleccionaron y se cultivaron en placas de LB con ampicilina para obtener el plásmido. La preparación se realizó tomando una asada de células y resuspendiendo en 300 µl de amortiguador TENS, mezclando en el vortex de 2 a 5 seg. Luego se añadió 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, se mezcló durante 2 a 5 seg y se centrifugó 2 min en una microfuga para eliminar restos celulares y el DNA cromosomal. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se mezcló con 0.9 ml de etanol absoluto preenfriado a -20°C; se centrifugó 2 min en una microfuga. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con etanol al 70%, posteriormente se secó al vacío por 5 a 10 min y se resuspendió en 50 o 100 µl de TE.

Con 1 µg de la preparación de plásmido obtenido de bacterias, se volvió a transformar a la mutante MD3.3 1b para comprobar que se recuperaba el fenotipo de crecimiento en bajo potasio, la sensibilidad a EB y el transporte de potasio. Se seleccionaron las transformantes

siguiendo el protocolo descrito con anterioridad, de entre las clonas que incorporaron el plásmido. De una de ellas se realizó un mapa físico con endonucleasas de restricción para subclonar y secuenciar el gen.

### **III.K TRANSFORMACION DE *E. coli*.**

Se prepararon células competentes de *E. coli*, inoculando 70 ml de medio LB con 50 µl de un cultivo en fase estacionaria e incubando en agitación a 37°C hasta tener una densidad de 55 U Klett. El cultivo se dividió en dos tubos con 35 ml de cultivo y se centrifugó a 4300 X g' durante 10 min. El precipitado celular se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se colocó en hielo por 20 min; después del tiempo de incubación se centrifugaron y resuspendieron en 2.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM a 4 °C. Las células competentes fueron colocadas en hielo hasta su uso.

La transformación se realizó mezclando 200 µl de células competentes con la cantidad deseada de DNA (de 1 a 5 µg), en un tubo Eppendorf, y la mezcla se colocó en hielo por 30 min. Después del tiempo de incubación se colocaron en un baño a 42°C, por 3 min, y luego se añadió 1 ml de LB e incubó en un baño a 37°C por 1 h. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en 200 µl del LB residual. Toda la mezcla se sembró en LB+amp y las placas se incubaron a 37°C durante 24 hrs.

### **III.L SECUENCIA DE DNA DEL INSERTO DE LA CLONA 3M**

Para determinar la secuencia de ambas cadenas del DNA de un fragmento BamH1-BamH1 de 6.6 Kb que complementó a la mutante, se utilizó el método de Sanger (Sanger

y cols; 1977).

Para facilitar la secuenciación, se subclonaron 2 fragmentos BamH1 de 3.5 y 3.1 Kb de la clona 3M en el sitio BamH1 de PTZ 18R en las 2 direcciones y se secuenció por extensión con oligonuclótidos sintéticos.

#### PREPARACION DEL TEMPLADO pTZ

El DNA usado para secuenciación fue de cadena sencilla, y se preparó transformando la cepa de *E. coli* TG-1 con los plásmidos PTZ 18R+BamH1. Las transformantes que llevaban vector e inserto se seleccionaron en LB+ampicilina 60 µg/ml, adicionado con 50 µl de X-gal y 10 µl de IPTG para comprobar la presencia del inserto.

El templado se preparó cultivando una colonia de cada transformante en 2 ml de medio 2X YT, con 150 µg/ml de ampicilina, a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 U klett. Después del tiempo de incubación se añadió 20 µl del fago ayudador M13K07 a cada tubo y se incubó con agitación rotatoria de 300 rpm por 1 hr, a 37° C. Posteriormente, del cultivo infectado se tomaron 400 µl y se inocularon 10 ml de medio 2X YT, con 70 µg/ml de kanamicina. Se mantuvo toda la noche, con una agitación de 300 rpm a 37 °C. El cultivo saturado fue agitado en vortex y se centrifugó a 5900 X g. El sobrenadante se transfirió a un tubo Corex y se añadieron, por cada 10 ml de cultivo, 2 ml de una solución de polietilenglicol al 20%, NaCl 2.5 M; la mezcla se colocó en hielo por 1 h y se centrifugó a 1200 x g durante 20 min. El sobrenadante se eliminó y el fago fue resuspendido en 300 µl de TE e incubado en hielo por 1 h en tubos Eppendorff. Posteriormente se centrifugó 5 min para eliminar el material insoluble, y al sobrenadante se le hicieron extracciones con fenol-

cloroformo hasta eliminar toda la proteína. La fase que contenía el DNA se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto y un décimo de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 a -20 °C por un tiempo de incubación de 1 h, a toda la noche. Posteriormente se centrifugó durante 20 min, en una microfuga en frío; se lavó, secó y resuspendió en 20 µl de agua.

Las reacciones de secuencia fueron realizadas como se describe en el Manual de Sequenase Ver 2.0 (United States Biochemical) usando 2 ng de un oligonucleótido, 1 µg de ssDNA y el isótopo usado fue (<sup>35</sup>S-ATP) obtenido de NEN Research Products. Los oligonucleótidos usados para secuenciación, se sintetizaron en un sintetizador de DNA (Applied Biosystem).

Las muestras fueron sometidas a electroforesis en dos geles: una corrida corta y una corrida larga, para leer inmediatamente después del oligonucleótido y de 150-200 bases después del oligonucleótido, respectivamente. El gel de corrida corta contenía TBE 1X, acrilamida 6%, bisacrilamida 0.3% y urea 48%; el gel de corrida larga contenía acrilamida 6%, bisacrilamida 0.2%, urea 48% en TBE 1X. La corrida corta fue por 2 h, a 1900 volts, hasta que el colorante azul de bromofenol contenido en la mezcla de reacción llegara al final del gel. El gel de corrida larga fue corrido durante 5 h a 1950 volts. Al término de la corrida, los geles fueron secados a 80° C al vacío durante 1 h y expuestos a película de rayos X XAR 5 de 35x43 cm durante 14 a 48 h.

Una vez obtenida la secuencia completa, se analizó con el programa de análisis de secuencias de DNA Eugene, y se determinaron los posibles marcos de lectura abierta y además fueron comparados contra todo el banco de genes, Genbank (Burks y cols; 1992).

### **III.M HIBRIDACIONES CON EL BANCO DE GENES DE *K. lactis*.**

Se prepararon hibridaciones *in vitro* del banco de genes para clonar el gen completo de la H<sup>+</sup>-ATPasa de *K. lactis*, usando como sonda un fragmento Xba I de 627 pb del extremo carboxilo terminal de la H<sup>+</sup>-ATPasa.

Marcaje del fragmento por "Corte y reparo"

El fragmento se marcó de acuerdo con el protocolo de "Nick Translation", de BRL. Se usó 1 µg de DNA, 156 pmolas de (α-<sup>32</sup>P)dCTP con una actividad específica de 800 Ci/mmol, dGTP, dATP y dTTP a 3.12 µM. DNA polimerasa I 0.4 U, DNasaI 40 pg; en un volumen final de 50 µl. La mezcla se incubó a 15°C, por 60 min y luego se añadieron 5 µl de EDTA disodico 300 mM, pH 8.0 para detener la reacción. Los nucleótidos no incorporados fueron separados pasando la mezcla de reacción por una columna de Sephadex G50 equilibrada previamente con Tris HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0

Preparación de los filtros para hibridación

Se hicieron títulos del banco de genes por diluciones seriadas, sembrando en placas de 15 cm de diámetro con LB+amp 60. Se calculó la cantidad apropiada de una suspensión de bacterias para sembrar, de modo que se tuvieran de 1000 a 2000 colonias de bacterias por placa y se represento el genoma de la levadura, al menos una vez. Se sembraron doce placas, incubandose a 37°C toda la noche.

Cuando las colonias crecieron y alcanzaron el tamaño adecuado, se colocó una

membrana de nitrocelulosa de 15 cm HATF de Millipore sobre las colonias, permitiendo que se humedeciera, y después de 10 min se retiraron de las cajas con las colonias unidas a la membrana. Posteriormente se colocaron con las bacterias hacia arriba sobre una hoja de papel 3MM humedecido con NaOH 0.5 M por 15 min. Después se transfirieron a papel 3MM humedecido con Tris HCl 1 M, pH 7.5 por 15 min, para permitir la neutralización, y se transfirieron a otra hoja de papel con Tris HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 1.25 M y se neutralizaron durante 15 min. Finalmente, los filtros fueron transferidos a una hoja de papel 3MM seca y el DNA se fijó inmediatamente por irradiación con luz ultravioleta por 1 minuto.

#### Hibridación en Formamida con el Fragmento Radioactivo

Los filtros se incubaron con 30 ml de la solución de hibridación y se colocaron en una bolsa sellada a 42° C para pre-hibridizar.

Para llevar a cabo la desnaturalización de la sonda radioactiva, esta fue hervida por 10 min con 2 µg de DNA de esperma de salmón y luego se colocó directamente en hielo para desnaturalización y se añadieron 2 ml de la solución de hibridación. La bolsa conteniendo los filtros se retiró de la incubadora y se mezcló con la sonda radioactiva. La bolsa con los filtros se colocó en la incubadora a 42° C y se permitió hibridizar toda la noche.

Los filtros se retiraron de la solución de hibridación y se lavaron tres veces con 500 ml de solución de baja astringencia durante 15 min para eliminar la radioactividad no unida a los filtros. Después se lavaron tres veces en 500 ml de solución de alta astringencia a 65° C por 15 min para eliminar la unión inespecífica del DNA. Posteriormente los filtros se



secaron a temperatura ambiente y se expusieron para autoradiografía usando películas de rayos X XAR 5.

Las colonias positivas se seleccionaron para una segunda hibridación y posteriormente se preparó plásmido para comprobar que llevaran el gen de la H<sup>+</sup>-ATPasa completo.

## IV. RESULTADOS

### IV.A MUTANTES RESISTENTES AL BROMURO DE ETIDIO

Partiendo del trabajo del grupo de Brunner y cols (1982), se decidí obtener mutantes resistentes al bromuro de etidio e incapaces de transportar potasio. Cultivando a las cepas WM27 y WM37 en el medio de YPG con bromuro de etidio (EB) 20  $\mu\text{M}$ , de la primera cepa se aislaron 200 mutantes resistentes a EB 20  $\mu\text{M}$ ; de éstas se seleccionaron sólo 44 para medirles transporte de potasio y crecimiento en medios con 1 mM de  $\text{K}^+$ . Las mutantes mostraron un crecimiento normal, tanto en medio rico de YPD como de YPG, y mostraron un buen crecimiento en YPG con 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  de EB, así como un requerimiento de más de 10 mM de  $\text{K}^+$  en el medio para crecer. A las mutantes seleccionadas se les midió transporte de potasio y 5 de ellas mostraron diferencia en el transporte. Las cepas seleccionadas fueron: CS48-5, M-5, 70, 139 y 145. Las tres últimas mostraron un fenotipo mutante  $\text{Kdm}^-$  (mutante deficiente en el transporte de potasio), sin embargo, revirtieron fácilmente al fenotipo silvestre y eran capaces de transportar el catión. Se tomó únicamente a la mutante CS48-5 para análisis posterior.

A la mutante CS48-5 se le ensayó varias veces el transporte de potasio, sin que mostrara cambios, indicando que la mutación era estable y que exhibía un fenotipo Kdm' en medios de bajo potasio y en registro de transporte de potasio (Fig 3, Fig 4).

De la cepa WM37 se seleccionaron 125 mutantes resistentes a EB, de las cuales, al ser cultivadas en medios con bajo potasio, se seleccionaron 23 mutantes que no crecieron en LSK1 para medirles el transporte de potasio y la resistencia al EB. De las 23 mutantes seleccionadas, las cepas M21, M25 y M27 no transportaron potasio y fueron resistentes a EB 15 y 20  $\mu\text{M}$ . Estas mutantes mostraron ser estables; continuaron siendo resistentes a EB y no transportaron potasio. El estudio del transporte de potasio se hizo con el electrodo catiónico en 2 condiciones: en ausencia de catión añadido al medio, o en presencia de 300  $\mu\text{M}$  del catión. Como puede verse en la Figura 3, en ambas condiciones, las mutantes son incapaces de transportar potasio. Si acaso, en el medio con 300  $\mu\text{M}$  de potasio añadido, la M21 y la CS48-5 fueron capaces de transportar un poco, pero claramente con una velocidad mucho menor que la cepa silvestre, WM27. A estas mutantes se les verificaron los marcadores de auxotrofia y crecimiento en EB 15 y 20  $\mu\text{M}$ , para confirmar los fenotipos esperados de resistencia a EB y falta de crecimiento en LSK1.

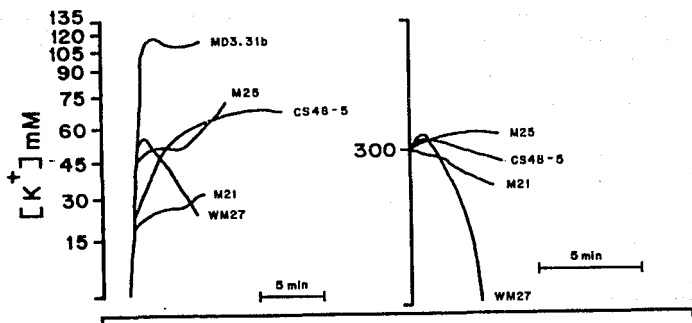


Fig 3. Transporte de potasio en mutantes resistentes a  $20 \mu\text{M}$  de bromuro de etidio. La cepa silvestre WM27 muestra un transporte normal comparado con las mutantes CS48-5 y M21, M25. Los trazos de la izquierda fueron hechos con cero potasio en el medio de incubación y los de la derecha con  $300 \mu\text{M}$  de potasio adicionado al medio de incubación. El medio de incubación fué MES-TEA  $5 \text{ mM}$ , y Glucosa  $50 \text{ mM}$ .

## Transporte de Potasio

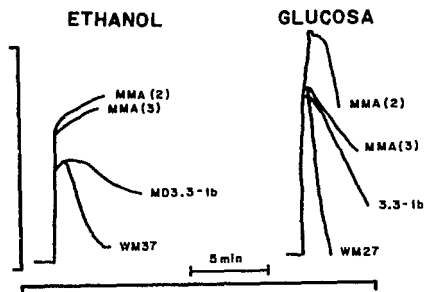


Fig 4. Transporte de potasio en la cepa silvestre WM37 y las recombinantes MD3.3-1b, MMA(2) y MMA(3) medidas con glucosa y etanol como sustrato. Condiciones de incubación: MES-TEA 5mM, glucosa 50mM o etanol 0.1%.

Las mutantes CS48-5, M21 y M25, fueron analizadas genéticamente para comprobar que la mutación era cromosómica y monogénica. Para el análisis de la mutante CS48-5 se realizó una cruce con las cepas MD2/1 Mat $\alpha$  X WM37 Mat  $\alpha$ . De esta cruce se realizó la disección de las tétradas y se aisló una segregante MD33, con la cual se realizó la siguiente cruce: [MD33 Mat  $\alpha$  ura A] X [CS48-5 Mat $\alpha$  lis A Kdm], [M21 Mat  $\alpha$ , hisA] X [MD2/1 Mat $\alpha$ , lis A, arg A, y Ura A] y [M25 Mat  $\alpha$ , hisA] X [MD2/1]. Los diploides heterocigicos (Kdm $^{+}$  EB $^{+}$ /Kdm $^{+}$  EB $^{+}$ ) fueron sembrados en medio de bajo potasio LSK1 y en medios con 15 y 20  $\mu$ M de EB; mostrando un crecimiento similar a los diploides homocigicos (Kdm $^{+}$  EB $^{+}$ /Kdm $^{+}$

EB\*). Además se midió el transporte de potasio de los diploides homocigos y heterocigos; los diploides heterocigos mostraron un curso temporal de transporte de potasio similar a los diploides homocigos, indicando que se trata de una mutación recesiva (Fig 5).

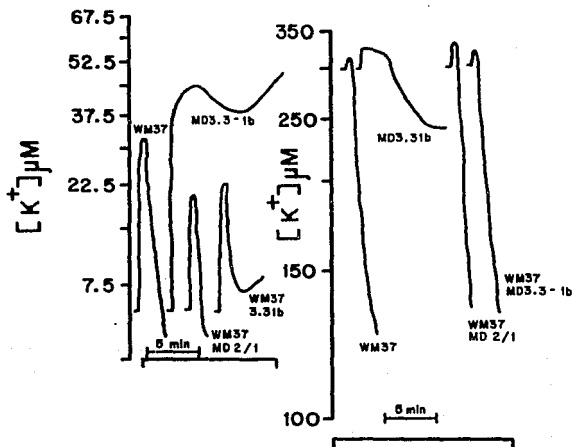


Fig 5. Medida de transporte de potasio en los haploides y diploides homocigos y heterocigos. No se observan cambios en la medida del transporte. Los trazos a la izquierda se realizaron sin potasio y los de la derecha se adicionó 300  $\mu M$  de potasio al medio de incubación.

Los diploides heterocigos MD33 X CS48-5 se sometieron a esporulación y disección de tétradas. Un análisis de auxotrofia y prototrofia, crecimiento en EB 20 y LSK1 de 35 tétradas reveló una segregación típica mendeliana 2:2 para los fenotipos de resistencia a EB y deficiencia en el transporte, indicando que la mutación es nuclear, y además, que la resistencia al EB y la deficiencia en el transporte de potasio están dadas por el mismo gen, aunque existe la posibilidad de que sean dos genes que se segregan ligados con alguna relación física y funcional. El análisis de 15 tétradas de la cruce M21 X MD2/1 dio resultados iguales, confirmando una ligación estrecha.

Se hizo también un registro de transporte de potasio a las segregantes y cepas parentales, comprobando el patrón de segregación 2:2 obtenido en crecimiento en placas, puesto que tuvimos dos segregantes que mostraron transporte de potasio parecido al silvestre y dos segregantes que mostraron dificultad para transportar este catión (parecido a la mutante). En las segregantes que mostraron un fenotipo parecido al silvestre, se observó una salida y posterior incorporación de potasio al interior celular, mientras que en las segregantes, que mostraron dificultad para transportar al potasio, se observó una deficiencia en la reincorporación de este catión (Fig 6). Se seleccionó entonces una recombinante resistente a EB y deficiente en el transporte, MD3.3-1b uraA, lisA para llevar a cabo el análisis cinético y para la transformación. Trazos de transporte de potasio de la recombinante seleccionada indicaron que muestra deficiencia en el transporte de potasio (Fig 7).

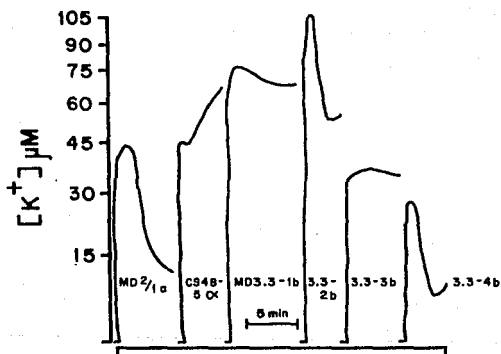


Fig 6. Transporte de potasio en los productos de una tétrada de la cruce [MD2/1] X [CS48-5], dando un patrón de segregación 2:2. Las condiciones de incubación fueron MES-TEA 5mM, pH 6, glucosa 50mM.



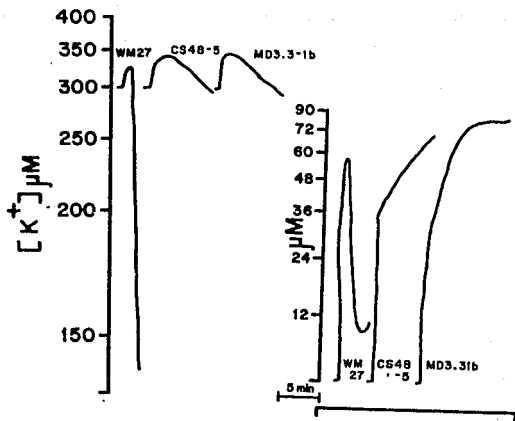


Fig 7. Transporte de potasio en la cepa silvestre WM27 en la mutante CS48-5 y la recombinante seleccionada para transformación MD3.3-1b la cual es resistente al bromuro de etidio y es K<sup>dm</sup>. Las condiciones de incubación son idénticas a los de la Fig 6 pero se añadió potasio 300  $\mu M$  en los trazos de la izquierda.

#### **IV.B ANALISIS CINETICO DE LAS MUTANTES**

Se realizó el análisis cinético de la cepa silvestre WM27, y de la recombinante aislada MD3.31b. Los resultados del transporte con  $^{86}\text{Rb}$  de estas cepas mostraron grandes cambios en las constantes cinéticas en la cepa silvestre comparada con la mutante. La mutante prácticamente no transporta rubidio.

Se determinaron las constantes cinéticas de las cepas para el transporte de  $\text{Rb}^+$ . Como se encontró, hubo cambios significativos en los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$ . En la mutante, la  $K_m$  para el transporte de rubidio fué 20 veces más alta que en la cepa silvestre (de 0.5 mM a 10.4 mM). La  $V_{\text{max}}$  fue 8.3 y 1.46 nmol para el  $^{86}\text{Rb}$  (min.mg.) para la silvestre y la mutante, respectivamente. Estos resultados y los de resistencia a EB, dan evidencia de que el sistema de transporte está alterado.

#### **IV.C TRANSFORMACION DE LA MUTANTE MD3.3-1b**

La transformación de la mutante se realizó por electroporación. Se encontraron adecuados los siguientes parámetros: una capacitancia de 25  $\mu\text{F}$ , 1  $\mu\text{g}$  de DNA y un pulso de 1200 volts. Se obtuvo una eficiencia de 300 a 400 colonias de transformantes por caja, las cuales fueron seleccionadas en medios sin uracilo y posteriormente fueron replicadas en medios con bajo contenido de potasio (1 mM) para ver el crecimiento y la complementación.

Se transformó la cepa MD3.3-1b  $\text{uraA}^-$ ,  $\text{hisA}^-$ ,  $\text{Kdm}^+$ , con el vector de expresión KEp6. Este vector de expresión se caracteriza por tener la capacidad de replicarse en levaduras y

bacterias. El marcador de selección para mantenerlo en las levaduras es el marcador de auxotrofia URA 3 de *S. cerevisiae*, que complementa el *uraA* de *K. lactis*.

Se obtuvieron de 200 a 300 transformantes de la mutante por 1  $\mu$ g de DNA de vector KEp6, las cuales fueron posteriormente cultivadas en medios selectivos de bajo potasio LSK, en donde no mostraron crecimiento, porque el vector únicamente complementa el marcador de auxotrofia y no la mutación del transporte. Esto indicó que contábamos con un buen sistema de transformación para identificar al gen que complementa la mutación en la cepa MD3.3-1b.

También se transformó a la mutante con el gen TRK1 de *S. cerevisiae*, generosamente donado por el Dr. R. Gaber, y no se observó complementación de la mutación en *K. lactis*. Así también, un fragmento genómico de *K. lactis* que complementa la mutación *trk1* de *S. cerevisiae*, no complementa la mutación en *K. lactis*; indicando que la mutación no corresponde al locus TRK-1.

Transformando por electroporación a la mutante de *K. lactis* con el banco de genes, se aislaron 9 clonas independientes que crecieron en los medios de selección para el transporte (LSK1) a partir de 12,000 transformantes aproximadamente. Se aisló el plásmido de las 9 clonas y se transfirió a bacterias. Se volvió a transformar a la mutante con el DNA de cada clona, y observamos que sólo en 8 se recuperaba el fenotipo de crecimiento en bajo potasio (1 mM) y que además, estas transformantes recuperaban su sensibilidad al EB (Fig 9) y eran capaces de transportar potasio comparado con la silvestre (Fig 8).

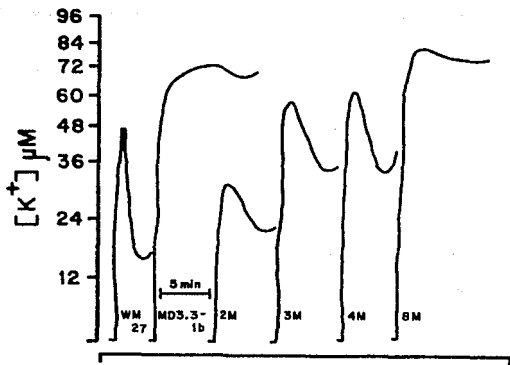


Fig 8. Transporte de potasio de 4 transformantes complementadas con el banco de genes. Las transformantes muestran un fenotipo de transporte similar al de la silvestre WM27, con excepción de la transformante 8M que llevar un inserto más grande que la clona 3M y con el mismo patrón de restricción. Los medios de incubación fueron idénticos a los de las figuras anteriores.

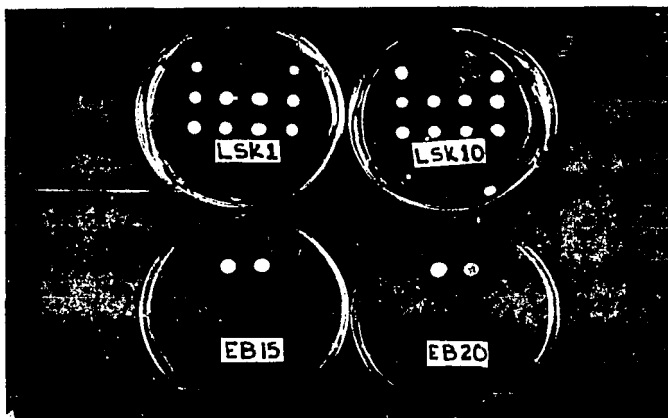


Fig 9. Crecimiento en LSK1 , LSK10 y bromuro de etidio EB15 y EB20. La primera hilera horizontal representa la cepa silvestre WM27, las mutantes CS48-5, MD3.3-1b y la cepa silvestre WM37. Las dos hileras horizontales inferiores representan las transformantes de la MD3.3-1b complementadas con los plásmidos 1M, 2M...8M y se observa que muestran un fenotipo igual que el silvestre de sensibilidad al EB y crecimiento en LSK1.

Un análisis con endonucleasas de restricción de las 8 clonas indicó que eran parecidas

en patrón de restricción, y por medio de una digestión sencilla con Cla I, se observó que 3 de ellas habían sufrido rearrreglos porque perdían sitios de restricción del vector y daban patrones de restricción diferentes entre ellas, al digerir con Cla I y otras enzimas. Las 5 clonas restantes dieron patrones similares con todas las enzimas probadas, y sólo variaron en el tamaño del inserto. De las 5 clonas, se seleccionó la que llevaba el inserto de menor tamaño, 3M, para hacer un mapa físico y subclonar el gen de interés. La clona 3M mostró un inserto de 6.6 Kb aprox, y es el responsable de revertir el fenotipo mutante a un fenotipo silvestre. En la Fig. 10 se muestra el mapa físico del inserto.

#### IV.D ANALISIS DE LA SECUENCIA DE DNA DE LA CLONA 3M

La secuencia de nucleótidos del inserto se determinó por el análisis de la secuencia del fragmento de 6.6 Kb contenido en KEp6. La estrategia para subclonar y secuenciar fue la siguiente: la clona 3M fue digerida con BamH1 y los dos fragmentos obtenidos de 3.5 y 3.1 Kb fueron subclonados en ambas direcciones en el sitio de BamH1 del vector PTZ 18R. La secuencia se realizó por el método de Sanger usando extensión con oligonucleótidos sintéticos. El análisis de la secuencia de ambas cadenas resultó en la identificación de un inserto de 6613 pb con tres marcos de lectura abierta. En una de las cadenas se encontró un marco de lectura abierta (ORF-2) de 1200 pb que codifica para una proteína de 398 aminoácidos que corresponde al gen de la "Old Yellow Enzyme" de Warburg, OYE-K.lactis (Fig 11A). En la cadena opuesta se encontraron dos marcos de lectura abierta: ORF-1 de 1500 pb y que se desconoce para que codifica, y ORF-3, un fragmento de 778 pb que codifica para PMA1, el gene de la H-ATPasa.

MAPA FISICO DEL INSERTO SECUENCIADO (6.6 Kb)  
Y LOCALIZACION DE LOS GENES

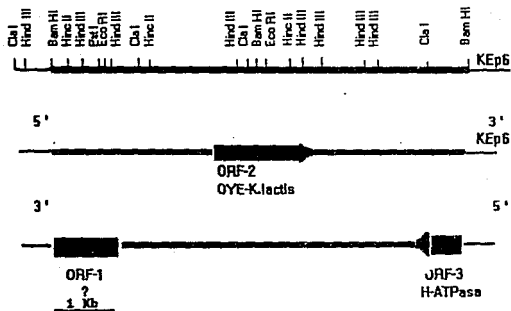


FIG. 40 Mapa de Restriccion del Fragmento Genomico de 6.6 Kb y Localizacion de los Genes: ORF-1 que se desconoce para que Codifica, ORF-2 que codifica para la Old Yellow Enzyme y ORF-3 que codifica para la H-ATPasa de membrana plasmatica. La posicion y direccion de los genes se indica con una flecha grande debajo del mapa de restriccion.

```

81          2801          2821          3501          3521
ATATAAAA GGAGGCCCA ATTGTACCA GAGATGATT TGTCTCATG GGTAAAG
1:  . . . . .

2841          2861          2881
CCA TGTCTCATT GCTCAATTCT CTAATTGTC CTAATTGAC TTAAGAAAAG T
1:  . . . . .

2901          2921          294
ACGCACAT ACAAGTAAA CCAATCAAA TCGCATACC A ATG TCC TTT ATC
1:  . . . . . met ser phe met

2961          2981
AAC TTT GAA CCA AAC CCA TTG GCT GAT ACT GAT ATC TTC AAA CCA
1:  . . . . . asn phe glu pro lys pro leu ala asp thr asp ile phe lys pro

3001          3021
ATC AAG ATT GGT AAC ACT GAA TTG AAG CAC AGG GTT GTC ATC CCT
1:  . . . . . ile lys ile gly asn thr glu leu lys his arg val val met pro

3041          3061
GCA TTG ACA AGA ATC AGA GCG TTG CAT CCA GGC AAC GTC CCA AAC
1:  . . . . . ala leu thr arg met arg ala leu his pro gly asn val pro asn

3081          312
CCT GAC TGG GCT GTT GAA TAT TAC AGA CAA GGT TCC CAA TAT CCA
1:  . . . . . pro asp trp ala val glu tyr tyr arg gln arg ser gln tyr pro

3141          3161
GGT ACT ATG ATT ATC ACT GAA GGT GCT TTC CCA TCA GCT CAG TCA
1:  . . . . . gly thr met ile ile thr glu gly ala phe pro ser ala gln ser

3181          3201
GGT GGT TAC GAT AAC GCA CCA GGT GTT TGG ACC GAA GAA CAA CTG
1:  . . . . . gly gly tyr asp asn ala pro gly val trp ser glu glu gln leu

3221          3241
GCT CAA TGG ACA AAG ATC TTC AAG GCA ATT CAC GAC AAC AAG TCT
1:  . . . . . ala gln trp arg lys ile phe lys ala ile his asp asn lys ser

3261          330
TTT GTT TGG TGA CAA TTG TGG GTT CTA GGT AGA CAA GCT TTT GCT
1:  . . . . . phe val trp val gln leu trp val leu gly arg gln ala phe ala

3321          3341
GAT AAC TTG CCA AGA GAT GGA TTG GGT TAT GAT AGT GCT TCC GAT
1:  . . . . . asp asn leu ala arg asp gly leu arg tyr asp ser ala ser asp

3361          3381
GAA GTC TAC ATG GGT GAA GAT GAA AAG CAA GGT GCC ATC AGA TCT
1:  . . . . . glu val tyr met gly glu asp glu lys glu arg ala ile arg ser

3401          3421
AAC AAC CCT CAG CAT GGT ATC ACC AAG GAT GAA ATT AAG CAG TAT
1:  . . . . . asn asn pro gln his gly ile thr lys asp glu ile lys gln tyr

3441          3461
ATC AAG GAC TAT GGT GAT GCT AAG AAG TGT ATC GAT GCT GGT
1:  . . . . . ile arg asp tyr val asp ala ala lys lys cys ile asp ala gly

```

Fig. 11A. Secuencia de nucleótidos del gene que codifica para OYE1, la Old Yellow Enzyme de *Kluyveromyces lactis*. El marco de lectura abierta consta de 1200 pb y presenta un consenso TATA a -50pb.

Se encontró que ORF-2 tiene el 72.4% de identidad con la "Old Yellow Enzyme", que es una NADPH oxidasa de *S. carlsbergensis* (Fig 11B) descrita originalmente por Otto Warburg (Warburg y Christian, 1933). Esta enzima ha sido descrita por el grupo de



Massey (Kazuyo y cols; 1991) y es codificada por un gene de 1.2 kb cuyo producto es un polipéptido de 400 aminoácidos con un Mr = 45,021 Da. Se ha identificado que el producto del gene OYE tiene actividad de NADPH oxidasa, pero el papel fisiológico de la proteína en la célula se desconoce. El ORF-2 en el fragmento genómico clonado de *K. lactis* fue identificado como OYE únicamente por comparación de la secuencia de aminoácidos en el banco de datos. Ambos genes OYE de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* son parecidos en tamaño y secuencia, y ambas proteínas presentan un sitio de unión a nucleótidos. Ambos genes codifican para proteínas hidrofílicas, como se muestra en el perfil de hidropatía hecho de acuerdo con Kyte y Doolittle (1982) Fig. 11 C. En este caso no se ha evaluado la actividad de la enzima, pero se ha hecho la interrupción del gen, subclonando el gen URA 3 en el sitio de BamH1 en la región que codifica para OYE. Se transformó por electroporación a la cepa silvestre MD2/1 con el fragmento HincII y otro HindIII de OYE con el gen URA 3 interno y no se obtuvieron transformantes viables, lo que indica que una interrupción del gene puede ser letal y por tanto que OYE es esencial para la célula, se sabe que ORF-2 codifica para la Old Yellow Enzyme sólo por la comparación de secuencias.

```

>PIR:A39495 *Old Yellow Enzyme - Yeast (Saccharomyces cerevisiae)
Length = 400
Score = 1558 (758.2 bits), Expect = 1.9e-322, P = 1.9e-322
Ident:100 = 283/394 (71%), Positives = 340/394 (86%)
Query: 5 HPEPKPLADTDFPKPIKIQNTLKHVVVKAFTBBALEHPMVHPGAVVYTHQKQTP 64
      *P P +L+DT+PKPIKIQN EL HR V+P+LTERALHKGH+PH DRGVYVY QR+Q P
Sbjct: 6 DPKFALGDTDFPKPIKIQNELLHVAVI PFLTRALHKGHI PKGDAVYVYTHQKQ P 65
Query: 65 OTMIIITGCAFSPQAGDTYRACVWSEHQLAQMKIKFKAIDHMRSPYVWGLVLRQAF 124
      OTMIIITGCAF S+Q+GDTYRACVWSEHQL+ *H KLF+LII+KSPVWGLVLR+ AF
Sbjct: 66 OTMIIITGCAFISQAGDTYRACVWSEHQLPFTLIFRSLDKKLSYVWGLVLRQAF 125
Query: 125 DNLARDGLAYDGAEDVYVWSEKURALRSGWQKHTLDEIKQTIIDYVVAALKEIDAG 184
      DNLARDGLAYDGAED+V+H ** +A +HSPH++TDEIKQYI++V+AAK+ I AG
Sbjct: 126 DNLARDGLAYDGAEDVYVWSEKURAKAKKQKQWQKSLTDEIKQTIKTYVVAALHIAAG 185
Query: 185 ADGVEIHGANTLLNQFLDPIHNTYDTEYGGIIGKARFLVLEVVDAYVDAGLETRFP 244
      ADGVEIHGANTLLNQFLDP GN EYDTEYGGIIGKARF LEVYDA+V+AG E+ +R
Sbjct: 186 ADGVEIHGANTLLNQFLDPIHNTYDTEYGGIIGKARFLVLEVVDAYVDAGLETRFP 245
Query: 245 SPYGVFVWNSGQEDPYLVAGFATVLAFLKLEKAKGKELAVDLVLEPVYVFPQSPWY 304
      SPYGVF +NSGQ++ +VAG+AVV +ELKLEKAKGKELAV LVENVYV+FP E ED Y
Sbjct: 246 SPYGVFVWNSGQEDPYVAGFATVLAFLKLEKAKGKELAVVLEPVYVFPVLEKQRY 305
Query: 305 KQGTNSPVIISVWNSGVLVWYDIALDPAADTDEKFWLIDTQKAPLWVPLGVSLEKGL 364
      KQGTNSPVIISVWNSGVLVWYDIALDPA+DTDEKFWLIDTQKAPLWVPLGVSLEKGL
Sbjct: 306 KQGTNSPVIISVWNSGVLVWYDIALDPAADTDEKFWLIDTQKAPLWVPLGVSLEKGL 365
Query: 365 PLKRYDRSPFYKGNANOTIDTPYEEAVARTEK 398
      PLR YDR +PY NGA GTIDTPYEEA+ Q K
Sbjct: 366 PLKRYDRSPFYKGNANOTIDTPYEEALAKQEK 399

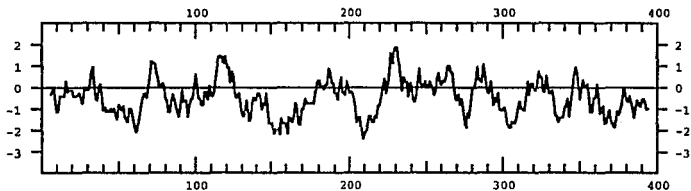
```

Fig 11B. Alineamiento con el banco de datos de la secuencia de aminoácidos de la Old Yellow Enzyme. La secuencia muestra parecido en tamaño y 86% de identidad con la Old Yellow Enzyme de *S. carlsbergensis*. Las letras de enmedio de las 2 secuencias representan aminoácidos idénticos

Un fragmento de HincII-HincII con el gene OYE se subclonó en el sitio BamHI, llenado con nucleótidos para hacer extremos romos, de KEP6 y en el sitio de SmaI de YEpkD 352. Otro fragmento de PstI-DraI con el gene OYE de *K. lactis* también se subclonó en el sitio PstI-SmaI de YEpkD 352 (Fig. 12). Con ambas subclonas se ha transformado a la mutante MD 3.3-1b y no se observó complementación, indicando que OYE no está relacionado con el sistema de transporte de potasio.

oye -sc -> KD Hydrophobicity <1/11>

Protein sequence 399 a.a. msfvkdfkqpqal ... yeealklgwdks



oye-kl -> KD Hydrophobicity <1/11>

Protein sequence 401 a.a. msfmnfepkpla ... tyeeavakgykk

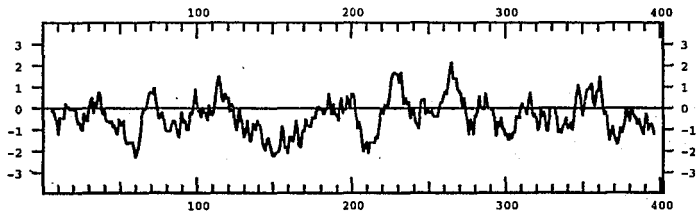


Fig 11.C El perfil de hidropatía de la parte de arriba corresponde al gene OYE de *S. cerevisiae* y el de la parte inferior a *K. lactis*. Ambas proteínas son similares en secuencia de aminoácidos y también tienen un perfil de hidropatía similar.

El marco de lectura abierta ORF-1 en la cadena complementaria fue identificado hasta el momento en 1470 pb, considerando que el gen comienza en metionina, o 1500 pb si comienza con cualquier otro aminoácido; en la secuencia obtenida hasta el momento no se tiene codón de término, por lo que muy seguramente el gene es más grande (Fig 13).

El marco de lectura obtenido se comparó con un primer banco de datos y no se encontraron secuencias con similitud o dominios conservados. En otra búsqueda en el banco de genes más actualizado, se encontró 57.9% de identidad en 107 pb sobrelapadas con el gene DRBP-JK, que codifica para una proteína de unión al DNA implicada en la señal de recombinación en *D. melanogaster*; 58.5% de identidad en 117 pb sobrelapadas con el gene bib, que es un gene neurogénico de *D. melanogaster*. Otros alineamientos mostraron 50% de identidad con 70-110 pb sobrelapadas con proteínas de unión a DNA, como factores de transcripción o proteínas reguladoras. La función de este posible producto genético no es claro, pero no es un gene responsable de complementación en nuestra mutante MD3.3-1b porque no le confiere capacidad de transportar potasio.

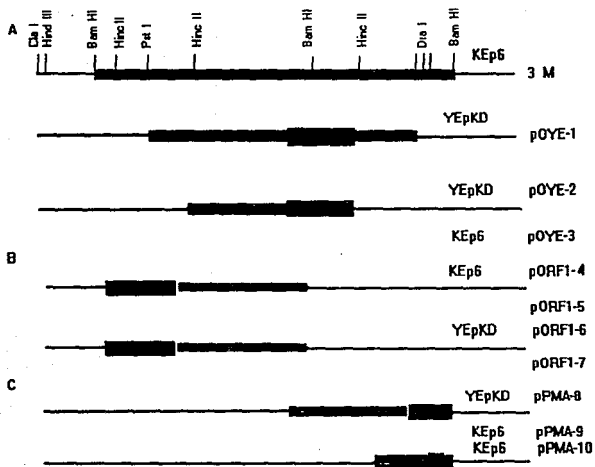


FIG. 1. A) Mapa de Restricción y Subclonas con el Gene de la Old Yellow Enzyme  
 B) Construcciones de ORF-1 en KEp6 y YEpkD  
 C) Diferentes Subclonas con el Fragmento de la H-ATPasa.

1480 1460 1 760 740  
AGGCATTA CTTTAAACC ATG AAT ATT GAC CCA GTT TCT GTT CCA GAA ACC  
11 ..... met san lls asp pro val ser val pro glu thr 11  
440 1420 1400 20 700 680  
ATT AAT GCG GCT TTA GCC CAA TIG CAT TTG GAT GAT GTT GTT GAA  
11 lls san ala ala leu gly qln leu his leu asp asp val val glu  
1380 1360  
AAA CCA AAC TCA AAC TCT AAT ACT CAA CAA CCA GAT CAG GAG ACT  
11 lye pro asn ser asn ser asn thr qln glu pro asp qln glu thr  
1340 1320  
GGA AAC GAT GCC GCG CCA ATA CCA GCC CCA ACT GAA ACA ATT AGT  
11 gly asn asp ala ala pro lle ala ala ala thr glu thr lle ser  
1300 1280  
AAC AAC AGA GGT AAC GGT AAC AAT GCT ACT AGC GCT ACA AAC GGT  
11 asn asn arg gly asn gly asn asn ala thr ser ala thr asn gly  
1260 1240 1220  
GGT ACT ATT CCA CAA CAG TTG CAG CAG CAA GAG TTT TTC ATG GGT  
11 gly thr lls pro qln qln lle qln qln qln glu phe phe met gly  
1200 1180  
GAT TCG TTA GTA CCA GCT CCA TCA GCC CCG GGA CCA CCA CCT ATG  
11 asp ser leu val pro gly pro ser gly pro gly pro ala pro met  
1140 1100  
TTC GCT CCC GAC ATG ATG AAT CCA TTC ATG CCG TAC CAT CCT ATG  
11 phe ala pro his met met san pro phe met pro tyr his pro met  
1120 1100  
ATG CAC ATG CCT CAT TCT GCA TTC TTF CCG GGT CCA CAG GAT CAA  
11 met his met pro his ser gly phe phe pro gly ala qln asp qln  
080 1060 1040  
ATC TTT CCA CCA CCT GAT TCC AGC GCT GCT GTT GAT TTC AAC CTA  
11 met phe pro pro pro asp ser ser ala ala val asp phe san leu  
1020 1000  
AGC TTG TCA CCA AGT GGA GGT AGT GCT GTT CCG GGT GCA GGA AAC  
11 ser leu ser pro ser gly gly ser ala val pro gly ala gly asn  
980 960  
ATG ACC GGA GGT GTT AAT GAT TCT GCC ATC CCA GGT TCT GAC CTG  
11 met thr gly gly val asn asp ser ala lle pro gly ser asp leu  
940 920  
ATG ATG CAT TAT CCC CAA CAG TAT ATG AAC CAT AAT GGG CAA AGG  
11 met met his tyr pro qln qln tyr met san his san gly qln arg  
80 880 860  
CCA ATG TTC TGG ATG AAT CCG GAT TTG AAT TCT AGT GCC ATC GAC  
11 pro met phe trp met asn pro asp leu san ser ser ala lle asp  
840 820  
GAC ACC ACT CCA GGC GAA CAT CCG CAG AAT CAG GAT TCC TTT GTG  
11 asp thr thr ala gly glu asp pro qln asn qln asp ser phe val  
800 780  
CCG CGT GCA TCA TTC ACT TTA GAA TCT TCT GAA CAG GGG AAT GAT  
11 arg gly ala ser phe thr leu glu ser ser glu qln gly asn asp  
760 740  
GCC AAG GTG CCA GGT GCT AAC ACT TCT AGA AGA CAA ACT TTC CAT  
11 ala lys val pro gly ala san thr ser arg arg qln thr phe his  
700 680  
GCA GTG TCA GCT ACT GAC TTT TTG ANC AAT TCT ACT TCC AGT CCC  
660 640  
ACT GAA AGC ACG AGT GCC ACT GGT ACC AAT GCA TCA GCA ACA TCA  
11 thr gly thr thr asp ala thr gly thr asn ala ser ala thr ser  
620 600  
CCC GAA GCT TCT GCC TCG AAA AAA GAG ATC CAG GAT CGT GTT TAT  
11 pro glu act ser ala ser lys lys glu met qln asp arg val tyr  
580 560  
CCT CAA GCT GCT GCT TAC CCT TAC ACC GGT GCA TTG CTG CAA CCA  
11 pro qln ala ala ala tyr pro tyr thr gly ala leu leu qln pro  
520 500  
AAT CCT GTA CTA TCT GGC CAT CCA CTG GGT CAT CAT CCC CAT CCT  
480 460  
ATC GGT TCC CCA TTC CCT GGT TAC GGT TTT AAT CCA GGT TTC TCT  
11 lle gly ser pro phe pro gly thr gly thr phe san thr ala phe ser  
440 420  
CCT GTC CCG GGC CCT ACT AAC AGG TTG AAT CCA GGT TCT CCA GCC  
11 pro val pro gly pro thr san thr lle san ala gly ser pro ala  
400 380  
ATC TCC GCA GAT GGC AAA GAA CCA AAC AGC AGC GGC CAT CCA AGT  
11 lle ser ala asp gly lys glu ala san ser ser gly asp pro ser  
340 320  
GCC CAA TCT AAC CCT CAT GTA CAC TCT GGA ACT AAT TCC CCA GGA  
11 gly qln ser san arg his val his ser gly thr san ser pro gly  
300 280  
TTG AGT CAA CCT GGT AGT CTG CCA ATG TCA GCA CTT AAC CCG TCG  
11 leu ser qln pro gly ser leu pro met ser gly pro asn pro trp  
240 220  
ATG TTT GCT GCT CCT CAC GGT AGT CCT AAC TTC CTG TTT CCA CAC  
11 met phe ala ala pro his gly ser pro san phe leu val pro his  
200 180  
CCT CAT CAT CCG GGT CAC GCA GGC CCT CCA CCT GGC CAT CAA AGA  
11 pro his his pro gly his ala gly pro pro ala gly his qln arg  
140 120  
CCA CAG ACC AAT AAC CCT CAA CAT AGA AAA CGT CAT TTC AAT AAC  
11 pro qln ser san san pro qln his arg lys arg his phe san san  
100 80  
AAT GGT TCT AGT GGT AGC AAT TTC GGA AAT ATG AAA CCT CAT GGT  
11 san gly ser ser arg ser san phe gly san met lys pro his gly  
80 60  
AAA CCT CAA CCG TTT GAA GAT GGT TCT CGT TAT CAA GAT GCT GTA  
11 lys pro qln arg phe glu qln his arg arg tyr qln asp ala val  
40 20  
TTG CAA CAA TCC GTT GGG TCA ATC TAC TCT TTC TGT AAG GAT CC  
11 leu glu qln phe val gly ser lle tyr ser leu cys lys asp ..

Fig 13. Marco de lectura abierta ORF1 identificado en la cadena complementaria, de 1.5 kb. La secuencia no presenta codón de término por lo que se puede continuar y no participa en la complementación de la mutante.

Un fragmento BamH1 de 3.5 Kb con el ORF-1 subclonado en el sitio BamH1 de KEp6 y YE<sub>p</sub>KD en ambas direcciones se usó para transformar a la mutante deficiente en el transporte de potasio MD3.3-1b, y tampoco se observó complementación, indicando que ORF-1 tampoco participa en el sistema de transporte de potasio (Fig 12).

El tercer marco de lectura abierto encontrado en ORF-3 de 778 pb se comparó con el banco de datos y se encontró alta similitud con el gene de la H<sup>+</sup>-ATPasa descrita (Serrano y cols; 1986). El ORF-3 de 778 pb sólo codifica para 256 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la H<sup>+</sup>-ATPasa de *K. lactis*, y este fragmento tuvo similitud de 64.7% en 1325 pb sobrelapadas con el gene PMA1 de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, y una similitud de 63% en 1352 pb sobrelapadas con el gene PMA1 de *S. pombe* (Fig 14 A). En cuanto a la secuencia de aminoácidos de ORF-3, presenta 85.8% de identidad en 254 aminoácidos sobrelapados, indicativo de un alineamiento casi perfecto, y que se trata del gene de la H<sup>+</sup>-ATPasa de *K. lactis* (Fig 14 B).

The best scores are:		infin	infin	opt
YSCFMA1	Yeast PMA1 gene for plasma membrane ATPase.	2266	2266	2312
YSPHMA1	S.pombe H-ATPase gene, complete cds.	1510	896	1567
MSUATPASE	M.crasse plasma membrane ATPase gene, compl	1333	788	1336
MSUATP9N	Neurospora crassa plasma membrane H-ATPase	1326	784	1329
SOYBEPF1	Soybean (G.mari) proline-rich cell wall prot	170	107	119
YSCFDC1	Yeast Pdc1 gene for pyruvate decarboxylase	166	95	135
TOBCH1C1	Nicotiana tabacum gene for endochitinase (E	156	88	95
SOYRPPF1	Glycine max RPPF1 gene for repetitive prot	150	89	146
TOKJMA1	Tomato (L.esculantum) H-ATPase (LJMA1) mAHA	150	201	101
YSPRMA	Yeast genes for 17S, 5.8S, and 25S ribosoma	145	85	93

YSCFMA1	Yeast PMA1 gene for plasma membrane ATPase.	infin=2266	infin=2266	opt=2312	69.7% identity in 1325 nt overl		
hntnc	GGATCCCTCTCGATATTCTTCTTGCCCC	10	20	30			
YSCFMA	TTGCTGTGAAGTCTACTAGTCTGCCAGATCTCTCGATATTCTTCTTGCCCTC	2790	2800	2810	2820	2830	2840
hntnc	CAGGTTTGCCCTATTATGACCGTTTGAAGCCTCTAGACAAATTTTCCACAGATGT	40	50	60	70	80	90
YSCFMA	CTGGTATTCTGCTATTAATGATGCTTTGAAGCCTCTAGACAAATTTTCCACAGATGT	2850	2860	2870	2880	2890	2900
hntnc	ACTTTCAGCTTGTACGATACTCTCTCTGACATTTGGAAATCTTCTTGCCCTATC	100	110	120	130	140	150
YSCFMA	ACTTTCAGCTTGTACGATACTCTCTCTGACATTTGGAAATCTTCTTGCCCTATC	2910	2920	2930	2940	2950	2960
hntnc	GGATTCCTATTTGACAGACTTTGAACTTACGCTTCTCTGCTACTTTTCG	160	170	180	190	200	210
YSCFMA	GGATTCCTATTTGACAGACTTTGAACTTACGCTTCTCTGCTACTTTTCG	2970	2980	2990	3000	3010	3020
hntnc	CGATTCCTATTTGACAGACTTTGAACTTACGCTTCTCTGCTACTTTTCG	220	230	240	250	260	270
YSCFMA	CGATTCCTATTTGACAGACTTTGAACTTACGCTTCTCTGCTACTTTTCG	3030	3040	3050	3060	3070	3080
hntnc	AGTGAACCTTGAGAAAGACTATGGGATATGCTGCTTCTGGGATTAATTTTGGCTATCG	280	290	300	310	320	330
YSCFMA	AATGAACTTGAGAAAGACTATGGGATATGCTGCTTCTGGGATTAATTTTGGCTATCG	3090	3100	3110	3120	3130	3140
hntnc	GTACTTGGATCACTTACGACTATGTTTGGTCAAAAGGTTGGTATTCCAAAACCTCG	340	350	360	370	380	390
YSCFMA	GTCTTGGATCACTTACGACTATGTTTGGTCAAAAGGTTGGTATTCCAAAACCTCG	3150	3160	3170	3180	3190	3200
hntnc	GTTCATGAGAGCTTATTTCTTCCAAATCTCTGACGAAACCTGGTATTTCGA	400	410	420	430	440	450
YSCFMA	GTTCATGAGAGCTTATTTCTTCCAAATCTCTGACGAAACCTGGTATTTCGA	3210	3220	3230	3240	3250	3260
hntnc	TCACCAAGCTCTGGTCCATCTGGTCTTATCCACTCTGGCAATATCTGGTCCG	460	470	480	490	500	510
YSCFMA	TCACCAAGCTCTGGTCCATCTGGTCTTATCCACTCTGGCAATATCTGGTCCG	3270	3280	3290	3300	3310	3320

TTCTTAATGGTGTATATCATGCAACCAATGTTCTGTGTCTGGTCTGCTTCAAAACT	10	20	30	40	50	60	70	80	90
TTCTTCCTCTGTGACATCATGCTACCAATTTACTTCACTTATCGGTTGGTCTGAAAAC	10	20	30	40	50	60	70	80	90
580	590	600	610	620	630				
GGAAAGACA TCGTTAAGCTGTCAGAGCTGGATTTTCTCTTGGTCTGCTTGTGTCA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
GGACTGATATTTACTGCTCTGCTTGTGATCTGTGATATGGGATCTCTGTGTTT	10	20	30	40	50	60	70	80	90
440	450	460	470	480	490				
TTGGTCTGCTTACTACAGATGTTCTGAACTGGAACCTTTGACAGATTTCAGAACGTA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
TTGGTCTTCTTACTACAGAAATGCTACTTGAAGCTTTGACAGATTTCAGAACGTA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
3450	3460	3470	3480	3490	3500				
700	710	720	730	740	750				
AGTTTGAAGAGACA CAGGCATCTGGCAGCTCGCTGAAATTTCTGTGGTCTATGCAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
AGCCAA TGAAGAAAGAACTCTACAGAGTGTGAAAGCTTACGGCTATGCAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
3510	3520	3530	3540	3550	3560				
760	770	780	790	800					
GAGTCTCCACTCAACGAAAGAAAGAACTTATCAAATGTTTCTTAAATAAAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
GAGTCTCTCACTCAACGAAAGAAAGAACTTATCAAATGTTTCTTAAATAAAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
3570	3580	3590	3600	3610					
810	820	830	840	850	860				
TTATCCCACTACATATGAAAGCTTCTATTTCTTAAATGTTTCTTAAATAAAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
TTTCTTCACTTAAATAAAAAGAAAGAACTTATCAAATGTTTCTTAAATAAAA	10	20	30	40	50	60	70	80	90
20	S.pombe H-ATPase gene, complete cds.	infin=896	opt=1567	63.0% identity in 1352 nt					

Fig 14 A. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del tercer marco de lectura abierta ORF-3 con el banco de datos. Los porcentos de similitud más altos fueron obtenidos para el gen PMA1 de la H-ATPasa de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *N. crassa*, y con altos porcentajes de identidad con el extremo carboxilo terminal de dichos genes.





a cabo por recombinación del fragmento de ATPasa con el genoma, resultando en reparación de una probable mutación en la región que comprende el fragmento clonado. No se puede asegurar que la  $H^+$ -ATPasa sea el único responsable de la complementación, ya que solo es el extremo 3' del gene de la ATPasa, y además se han obtenido otras mutantes M21, M25, MMA(2) y MMA(3), resistentes a EB y deficientes en el transporte de potasio, que no muestran dificultad en el bombeo de protones (Fig 16). Sin embargo, este fragmento genómico 3M, también complementa a estas mutantes (Fig. 15).

A las transformantes complementadas se les midió transporte de potasio y bombeo de protones, encontrando que acidifican el medio y que transportan potasio, comprobando que la  $H^+$ -ATPasa es responsable de la complementación en la mutante MD3.3-1b y posiblemente en las mutantes MMA(2) y MMA(3), que muestran curso de bombeo normal pero que no transportan potasio (Fig 15 y 16). Las transformantes fueron probadas en LSK1 y EB15, EB20 encontrando que crecen en medio bajo en potasio y que eran sensibles a bromuro de etidio.

A las mutantes, se les midió transporte de potasio en presencia de bromuro de etidio y se encontró que eran resistentes a EB y por tanto el EB no tenía efecto sobre la salida de potasio. Por otro lado, se encontró que las transformantes eran sensibles a EB al igual que las cepas silvestre y por tanto, este agente causó una salida de potasio ( Fig. 15).

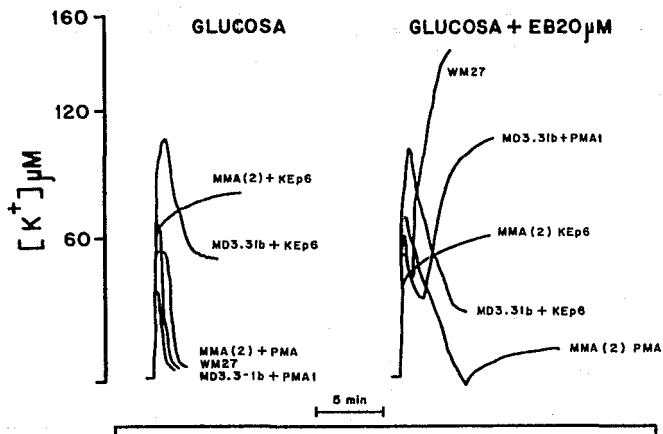


Fig.15 Transporte de potasio en la cepa silvestre WM27 y en las mutantes y transformantes complementadas. El transporte se ensayo en presencia y ausencia de bromuro de etidio. A la izquierda se muestra que las transformantes con vector muestran un fenotipo mutante y las transformantes con PMA1 muestran un fenotipo silvestre. En la derecha se muestra que las mutantes transformadas con KEp6 son resistentes a bromuro de etidio y con PMA1 muestran sensibilidad al colorante, como sucede con la silvestre.

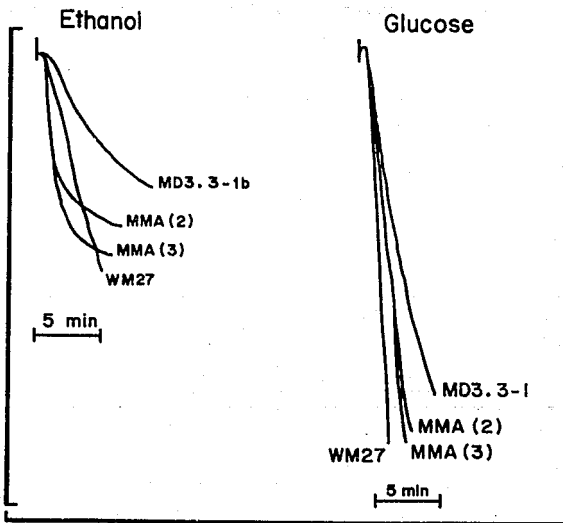


Fig 16. Medida del bombeo de protones en la cepa silvestre WM27 y mutantes resistentes a Bromuro de etidio. La cepa MD3.3-1b muestra deficiencia en el bombeo, comparado con la silvestre, pero las mutantes MMA(2) y (3) parecen tener un bombeo de protones normal. A la derecha, los trazos con glucosa no muestran diferencias significativas en el transporte de  $H^+$ .

En los hongos se han secuenciado tres genes que codifican para la H<sup>+</sup>-ATPasa: en *S. cerevisiae* por el grupo de Serrano (Serrano y cols; 1986); la ATPasa de *Schizosaccharomyces pombe* por el grupo de Goffeau (Ghislain y cols; 1987), y la de *Neurospora crassa*, por el grupo de Slayman (Hugor y cols; 1986). Ahora se reporta la secuencia parcial de *Kluyveromyces lactis*, y estamos localizando en el banco de genes una clona que contenga al gene PMA-1 completo. Para ello se siguieron dos estrategias: la primera consistió en transformar a la mutante con el banco de genes e identificar a las transformantes complementadas que lleven al gene completo. Con este enfoque se aislaron 8 clonas que complementaron y su plásmido se transfirió a bacterias. Las clonas fueron analizadas por mapas de restricción y no se encontraron clonas que fueran más grandes en el gen de la ATPasa. Las clonas compartían el patrón de restricción de la clona 3M o eran más grandes hacia el extremo 3'.

La segunda estrategia consistió en buscar la clona en el banco de genes de bacterias por hibridación, usando una sonda homóloga Xba1-Xba1 de 600 pb del gene de la ATPasa de *K. lactis* llamado PMA1. Se identificaron 12 colonias independientes que dieron señal de hibridación, las cuales fueron aisladas y en 10 de ellas se encontró que contenían los mismos fragmentos previamente identificados y secuenciados, por lo que fueron descartados.

Otra clona 2.2 contenía un fragmento de ATPasa de mayor tamaño que la clona 3M. El inserto encontrado fue subclonado y secuenciado, y resultó ser 394 pb mas grande hacia el extremo 5' de la ATPasa. Otra clona 4.2 resultó ser aun más grande, y está siendo subclonada y secuenciada. Un fragmento de esta clona será usada como sonda para

**hibridación con el banco de genes y localización del gene PMA-1 de *K. lactis* completo.**

## V. DISCUSION

El bromuro de etidio (EB) es una droga que se intercala en el DNA y muestra propiedades interesantes. Su estructura básica, el fenantridio, consta de tres anillos con un nitrógeno cuaternario. Es bien conocido que induce mutaciones mitocondriales y en algunos casos mutaciones nucleares (Celis y cols; 1975). El EB interactúa con el sistema de transporte de cationes e inhibe competitivamente el transporte de potasio a bajas concentraciones (Peña y cols; 1975, Peña y cols; 1979). Hace ya tiempo se demostró que algunas mutantes resistentes a EB eran deficientes en el transporte de cationes, pero no de protones, en comparación con la cepa silvestre, las mutantes mostraron un bombeo de protones normal (Brunner y cols; 1982). En este estudio encontramos también otro tipo de mutantes resistentes al EB, deficientes en el transporte de cationes, pero también deficientes en el bombeo de protones. La clonación del gene en esta mutante por complementación con el banco de genes, resultó ser un fragmento genómico de la  $H^+$ -ATPasa, demostrando que la resistencia a EB y la deficiencia en el transporte de potasio se deben, a una función anormal de ATPasa, y que probablemente la resistencia se debe, ya sea, a que el sistema de transporte por el que entra la droga a la célula requiere del potencial, o porque el EB actúa directamente sobre la  $H^+$ -ATPasa.

Las copas transformantes complementadas con este fragmento genómico recuperan el fenotipo silvestre, en el que se recupera la sensibilidad al EB y el transporte de potasio

normal. Estos resultados no contradicen a los obtenidos por Peña y cols (1975); ni a los de Brunner y cols (1982); ya que ellos obtuvieron mutantes con un bombeo de protones normal, igual a un segundo tipo de mutantes aisladas en este trabajo. Esto puede indicar que la mutación en estas cepas se localiza en un gene diferente.

El segundo tipo de mutantes, obtenidas bajo las mismas condiciones que las mutantes anteriores se caracterizan, por mostrar una deficiencia en el transporte de potasio pero con un bombeo de protones normal, sugiriendo que la resistencia al EB está dada en un gene diferente al de la ATPasa y que son dos tipos de mutantes.

En el presente estudio aislamos algunas de estas mutantes deficientes en el bombeo de protones y otras con un bombeo normal pero con deficiencia en el transporte de potasio. Una tercera clase de mutantes mostró resistencia al EB, pero sin cambios en el sistema de transporte de potasio y de protones; en estas últimas mutantes se ha reportado que transportan a la droga igual que la cepa silvestre (Brunner y cols; 1982), indicando que la resistencia en estas mutantes no está dada por cambios en la permeabilidad de la membrana. Por tanto, estas mutantes pertenecen a un grupo de complementación diferente a las descritas en este trabajo.

Del grupo de mutantes que mostraron cambios en el sistema de transporte de potasio y protones, se obtuvieron cinco, tres de las cuales fueron inestables, porque revirtieron a un fenotipo silvestre de sensibilidad a EB, transporte normal de potasio y de protones. Sin embargo, el análisis de una mutante que mostró cambios estables en el transporte de protones y de potasio, indicó que se trata de una mutación monogénica y con un patrón de segregación típico mendeliano para los fenotipos de resistencia a EB y de deficiencia en el



transporte de cationes, indicando que ambos fenotipos estaban dados por un solo gene o 2 genes ligados. El análisis genético de las mutantes M21 y M25, que muestra un fenotipo de resistencia a EB, deficiencia en el transporte de potasio pero con un bombeo de protones normal, dio el mismo patrón de segregación que el de la mutante CS48-5 que muestra deficiencia en el bombeo, indicando que puede haber una mutación silenciosa en el gene PMA1, o que se trata de otro gene que al igual que PMA1, participa en la resistencia al EB. En ambas mutantes se verificaron otras características de sus fenotipos, midiendo transporte de potasio y bombeo de protones. Se demostró que CS48-5 era deficiente en el bombeo de protones, mientras que no lo eran M21 y M25.

El trabajo siguiente se concentró en la mutante que sí tiene un defecto en el bombeo de protones. A una recombinante MD3.3-1b que se derivó de CS48-5, se le hizo un análisis cinético, y se encontraron cambios en las constantes cinéticas: una Km 20 veces mayor que la de la silvestre, y la Vmax disminuída a la quinta parte. En estas mutantes con cambios en las constantes cinéticas se encontró que tienen alterado el bombeo de protones, y probablemente el potencial transmembranal; esto indicaría que el potencial de la membrana puede modificar no sólo la velocidad real del transporte a una concentración dada de potasio, sino también las propiedades cinéticas de los acarreadores. Ello abre un camino diferente y muy interesante en el estudio del movimiento de iones a través de la membrana y de su regulación. Aunque se podría esperar que un potencial transmembranal disminuyera la velocidad real del transporte, habría que estudiar otras características del fenómeno, y esto ofrece posibilidades de interés.

Una de las posibilidades que se contempló, fue que la mutación estuviera en el gen

TRK1, correspondiente al de *Saccharomyces*. Sin embargo, por transformación con el gene TRK1 de *S. cerevisiae* se comprobó que la mutación no era complementada por el gen TRK1.

Transformando a la mutante con el banco de genes de *K. lactis*, se identificaron clonas que complementaron y que confirieron sensibilidad al EB y transporte de potasio y protones. El análisis de la secuencia de ambas cadenas de una clona mostró tres marcos de lectura abierta. En una cadena, se identificó un marco de lectura ORF2, con una enorme semejanza al de la "Old Yellow Enzyme" de Warburg, y que no participa en la complementación de la mutante. Este gene codifica para una NADPH oxidasa cuyo papel biológico en la célula es todavía desconocido (Kazuyo y cols; 1991). Se trata de una protefna de 400 aminoácidos y altamente hidrofílica. El gene presenta 72.4% de identidad con su contraparte homóloga en *S. carlsbergensis* y una interrupción del gene en *K. lactis* sugiere que se trata de un gene esencial para la célula, pues no se pudieron obtener mutantes viables mediante la interrupción del gene.

En la cadena complementaria se encontraron otros dos marcos de lectura, uno de ellos, ORF1, presenta 1.5 Kb del extremo amino terminal y que tiene similitud con las protefnas de unión a DNA del tipo de los factores de transcripción. Este marco de lectura mostró también no ser responsable de la complementación en la mutante, aunque ésto no descarta que pueda participar en la regulación de la expresión de genes contiguos, pues pudiera codificar para una protefna de unión al DNA, como sucede en *S. cerevisiae* con los genes PDR contiguos a PMA1 (Balzi y cols; 1991).

Nosotros hicimos uso de un fenotipo Kdm' para clonar el PMA1 en *K. lactis*; el

fragmento clonado codifica para la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática, y muestra alta similitud con los genes descritos en otras levaduras, 64.7% de similitud con el gene de *S. cerevisiae* y 63% de identidad con PMA1 de *S. pombe* en la secuencia de nucleótidos. La secuencia de aminoácidos presenta hasta un 85.8% de identidad en 254 aminoácidos sobrelapados del extremo carboxilo. Más recientemente se ha estado secuenciando el gene PMA1 completo y sigue mostrando alto grado de similitud con el gene PMA1 de *S. cerevisiae* (datos no mostrados).

Es interesante que un fragmento de un gene pueda complementar a una mutante, siendo que el banco de genes usados está hecho en un vector episomal; la probable explicación es que a pesar de ser un vector episomal, hay recombinación del inserto clonado con el DNA cromosomal. A este respecto hay trabajos que han reportado que hay recombinación, y que ésta se estimula por electroporación en las levaduras (Higgins y cols; 1991). Estos trabajos apoyan nuestra explicación sobre la complementación de la mutante por el fragmento 3' del gene PMA1.

Sabemos que el gene que complementa a la mutante MD3.3-1b es PMA1, pero no sabemos si este gene también es el responsable del defecto en las mutantes con bombeo normal. Aunque estas últimas mutantes han sido complementadas parcialmente con el fragmento de PMA1 de *K. lactis*, no se puede asegurar que sea éste el gen que restituye el transporte en estas mutantes, ya que pudiera haber un efecto de recombinación y sobreexpresión de PMA1, capaz de producir un fenotipo silvestre, y que esta sobreexpresión obligara al potasio a entrar por otros sistemas de transporte, como sucede en mutantes supresoras del transporte, en las que el potasio entra en forma inespecífica por acarreadores

de azúcares (Gaber y cols; 1992 comunicación personal).

En un trabajo reciente también hemos podido complementar a la mutante que bombea protones y no transporta potasio, pero el plásmido todavía no ha podido ser transferido a bacterias para comprobar si es o no otro gene distinto al PMA1 o TRK1.

Trabajos previos por el grupo de Goffeau y cols. han reportado que ciertas mutaciones que confieren resistencia pleiotrópica o múltiple a drogas presentan modificaciones en la permeabilidad de la membrana (Balzi y cols; 1991; Meyas y cols; 1992). Se han encontrado algunas modificaciones fisiológicas en la actividad de la ATPasa que también se asociaron a mutaciones en PDR-2, que es un gen de resistencia pleiotrópico a drogas (Goffeau y cols; 1991). También se ha reportado una actividad de ATPasa reducida acompañada de una disminución del transporte de aminoácidos y drogas en mutantes resistentes a drogas en *S. pombe* (Johstone y cols; 1983). Estos autores sugieren que el defecto primario en algunas mutantes puede estar en la ATPasa de protones responsable de la formación de la diferencia de potencial que, a la vez mantiene el transporte de diferentes componentes. Hay evidencia de que algunas mutantes afectadas en el gene PMA1 en *S. cerevisiae* y *S. pombe* mostraron resistencia a un amplio espectro de drogas, principalmente guanidinas y otros componentes con carga positiva. En este trabajo reportamos una actividad reducida de la H<sup>+</sup>-ATPasa en *K. lactis* que confiere resistencia a una droga cargada positivamente, el bromuro de etidio, sugiriendo una posible razón de porqué no entra a la célula.

El grupo de Rank aisló otra mutante, seleccionándola como resistente a oligomicina y cloranfenicol, que confiere resistencia a diez drogas adicionales, pero con sensibilidad a EB y acriflavina; se comprobó que esta mutante tiene una barrera de permeabilidad a nivel de

la membrana plasmática, que altera la acumulación intracelular de las drogas (Rank y cols; 1975). Un mecanismo similar puede explicar porqué nuestras mutantes presentan resistencia al EB, no por un cambio en la permeabilidad de la membrana, sino por una disminución del potencial transmembranal dado en gran parte por una actividad baja de la  $H^+$ -ATPasa, necesario para que la droga pase al interior celular. A diferencia de las mutantes de Rank, estas mutantes son resistentes al EB y muestran resistencia cruzada a acriflavina, sugiriendo una mutación diferente, pero ambas con cambios en la permeabilidad de la membrana.

Recientemente se ha aislado otro gene pleiotrópico de resistencia a drogas (Balzi y cols; 1987) y se pudo comprobar que su presencia en la mutante restaura la sensibilidad normal a las drogas. Este gen PDR1 codifica para una proteína de unión a DNA de 121 Kd implicada en la regulación de la transcripción de genes cuyos productos pueden ser componentes de la membrana celular; estos componentes podrían estar involucrados en el transporte de drogas y sustratos fisiológicos.

Como se mencionó en los resultados, ORF1 puede codificar para una proteína de unión a DNA, ya que presenta una similitud del 57.9% con el gen DRBP-JK, que codifica una proteína de unión a DNA, y 50% de identidad con otras proteínas de unión a DNA, entre las cuales se encuentran los factores de transcripción. Aunque ORF1 no es el responsable de la complementación en esta mutante, podría jugar un papel importante como un posible gene que controle la transcripción de PMA1 y otros genes implicados en la resistencia a drogas.

Un dato interesante es que en *S. cerevisiae* los genes de resistencia a drogas que son

factores de transcripción mapean en una región en el cromosoma VII, y entre ellas se encuentra PMA1. En *K. lactis*, PMA1 y ORF1 se encuentran en la misma cadena y adyacentes, pudiendo tal vez formar una región de resistencia a drogas junto con otros genes, como sucede en *S. cerevisiae* (Balzi y cols; 1990).

En las levaduras se ha encontrado una redundancia, ya que hay dos genes PMA1 y PMA2 que codifican para bombas de protones de la membrana plasmática en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Goffeau y cols; 1990). También el descubrimiento de que TRK1 y TRK2 codifican para transportadores homólogos, es otro ejemplo de redundancia en las levaduras (Ko y cols; 1991). La comparación de las secuencias de DNA en ambos genes es del 70%. Al contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae*, en *K. lactis* se ha identificado un solo gene TRK1, y parece no existir TRK2 (Gaber, 1992). Con respecto al gen de la ATPasa, nosotros hemos identificado un gen PMA1 funcional y lo estamos secuenciando; sin embargo, mediante hibridaciones con el banco de genes, se han podido identificar clonas que dan señal positiva con un mapa de restricción diferente, sugiriendo la existencia de un gen PMA1 adicional en *K. lactis*. Estas clonas no han sido analizadas con detalle, pero abren la posibilidad de estudios posteriores, sobre la posible implicación de 2 genes de ATPasa tal como sucede en *S. cerevisiae*, *N. crassa*, y *S. pombe*.

Otro aspecto importante de las mutantes, se refiere a la resistencia al EB. Se ve claramente que el EB no tuvo efecto sobre el transporte de cationes comparado con la cepa silvestre, en la cual el EB inhibe la entrada de cationes y a bajas concentraciones (20  $\mu$ M) se observa un flujo de  $K^+$ . En las mutantes MD3.3-1b y MMA2 no se observó este fenómeno, que se suma a la resistencia. Al ser complementadas con el fragmento de PMA1,

se recuperó un fenotipo silvestre en la mutante que tiene dificultad en el bombeo de protones; un fenotipo silvestre en la mutante MMA2 pero siguen siendo resistentes a EB indicando que probablemente presentan una mutación adicional a la involucrada en la resistencia al EB. Estas últimas mutantes son ahora un tema de estudio que está siendo tratado.

## VI CONCLUSIONES

- En este trabajo se demostró una relación entre la resistencia a EB y cambios en el transporte de potasio y de protones en mutantes de *K. lactis*.
- Hemos clonado y secuenciado un fragmento genómico que complementó a una mutante y hemos demostrado que es el gen de PMA1.
- El gene completo de la ATPasa está siendo secuenciado para corroborar los resultados pero trabajando con un gene completo.
- Al parecer, la resistencia a EB es el resultado de una deficiencia del bombeo de protones, tal como sucede en las mutantes de *S. cerevisiae* que son resistentes a diferentes drogas y muestran una actividad de ATPasa baja.
- El gene PMA de *K. lactis* muestra alta similitud con el gene PMA1 de *S. cerevisiae* y está altamente conservado, con un 85% de similitud con PMA1 de *S. cerevisiae*; a diferencia de *S. pombe*, que muestra solo 70% con su homólogo en *S. cerevisiae*.

## VII PERSPECTIVAS

- Desde 1982 Brunner y cols. describieron otras mutantes resistentes a EB, en las cuales hay una disminución del transporte de potasio, pero un bombeo de protones normal, como sucede en algunas de las mutantes obtenidas en este estudio. Con estas últimas mutantes se abren posibilidades interesantes de estudio que están siendo abordadas.
- La secuencia de este gene será de gran importancia para otros estudios realizados por J. Pardo y cols (comunicación personal), quien ha purificado la ATPasa de *K. lactis* y encontrado actividades hasta de 50  $\mu\text{molas}/\text{min}/\text{mg}$  de protefna. Esto no es posible con *S. cerevisiae*, y por lo tanto, *K. lactis* ofrece preparaciones mas activas y más puras.
- Conociendo la secuencia y teniendo pura la enzima, se puede trabajar con modificadores químicos, marcadores fluorescentes, mutagénesis dirigida, etc.
- Como un trabajo colateral, se tiene localizado el gene TRK1 en *K. lactis*, el cual será secuenciado y se podrá estudiar su papel en la resistencia a EB. También se podrá saber si el gene TRK1 está alterado en las mutantes que no muestran cambios en el transporte de protones y definir su papel, y de ser posible hacer la eliminacion del gene en *K. lactis*.



## VIII REFERENCIAS

- Anderson, A.J; Best, L.A. and R.F. Gaber (1991) Structural and functional conservation between the high affinity transporters of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 99: 39-46
- Armstrong, W and A. Rothstein (1964). Discrimination between alkali metal cations by yeast. I Effects of pH on uptake. *J. Gen. Physiol.* 48: 61-71
- Arnold, N. W. (1981). *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics, and Ultrastructure*. CRC Press. Vol. 1: 1-169.
- Balzi, E. and A. Goffeau. (1991). Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1073: 241-252.
- Balzi, E., Chen, W., Ulaszewski, S., Capiéaux, E. and A. Goffeau. (1987) The Multidrug Resistance Gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262(35): 16871-16879.
- Bianchi, M. M; C. Falcone, C. Xin Jie, M. Weslowski-Louvel, L. Frontrali and H. Fukuhara. (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6  $\mu$ m circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* 12: 185-192.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981) Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 650: 88-1213
- Broach, J. R; W. W. Jones and J. R. Pringle. (1990). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Vols. 1 and 2. Cold Spring Harbor, New York, 1981.
- Brunner, A; N. Carrasco and A. Peña (1982). Correlation between resistance to Ethidium bromide and Changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 217(1): 30-36
- Burks, C; Fischer W; Gilna P; Kelly, M; Kristofferson, D. and J. Lawrence. (1992). *GenBank. Nuc. Acids Res. Supplement.* 20: 2065-2069
- Celis, E; Mas, J. and A. Brunner (1975). Nuclear and cytoplasmic cross-resistance and correlated sensitivity to DNA intercalating drugs in a petite-negative yeast. *Genet. Res. Camb.* 25: 59-69

Chen, X. J; M. Saliola, C. Falcone, M. Bianchi, M. Wesolowski and H. Fukuhara. (1986). Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces drosophilarius*. Nuc. Acids Res. 14: 4471-4481.

Chen, W., Balzi, E., Capieaux, E., Choder, M. and A. Goffeau. (1991). The DNA Sequencing of the 17 kb Hind III Fragment Spanning the LEU1 and ATE1 Loci on Chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae*. Reveals the PDR6 Gene, a New Member of the Genetic Network Controlling Pleiotropic Drug Resistance. Yeast. 7: 287-299.

Clark-Walker, G.D. (1989). In vivo rearrangement of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. (86): 8847-8851.

Compagno, C; B. M. Ranzi and E. Martegani (1989). Yeast 2um vectors replicate and undergo recombination in *Torulopsis delbrueckii*. Molecular Microbiology. 3(8): 1003-1010.

Conway, E.J. and O Malley, E. (1946). The nature of the cation exchange during yeast fermentation with formation of 0.02N H-ion. Biochem J. 40: 59

Conway, E.J, M. Donway (1950) Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. Biochem. J. 47: 377.

Conway, E.J; F. Duggan (1957) A cation carrier in the yeast cell wall. Biochim. Biophys. Acta. 69: 265-274

Epstein, W. (1971) Potassium transport loci in *E. coli* K.112. J. Bacteriol. 108: 639-644.

Epstein, W; V. Whitelaw and J. Hesse. (1978). A K<sup>+</sup> Transport ATPase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253: 6666-6668.

Epstein, W. and L. Laimins. (1980). Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common control by osmotic forces. TIBS. January: 21-23.

Esser, K; U. Kuck, C. Lang-Hinrich, P. Lemke, H. D. Osiewaz, U. Sthal and P. Tudzynski. (1986). Plasmids of Eucariontes. Springer-Verlog. Berlin Heidelberg New York.

Fabiani, L; M. Aragona and L. Frontali. (1990). Isolation and sequence analysis of a *K. lactis* chromosomal DNA element able to autonomously replicate in *S. cerevisiae* and *K. lactis*. Yeast 6: 69-76.

Fincham, J. (1989). Transformation in Fungi. Microbiol. Revs. 53: 148-170.

Gaber, R.F; A. Styles and G. Fink. (1988) TRK1 Encodes a plasma membrane protein required for high-afinity potassium transport in *S. cerevisiae*. Mol. Cell. biology. 8: 2848-2859

Gaber, R.F. (1992). Molecular Genetics of yeast ion transport. *Internatl Rev. Cytol.* 137: 299-353.

Ghislain, M, Sclessor A. and A. Goffeau. (1987) Mutation of a conserved Glycine Residue Modifies the vanadate sensitty of the plasma membrana H<sup>+</sup>ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 262: 17549-17555.

Goffeau, A; Ghislain, M. and S. Ulaszewski. (1986). Isolation and sequencing of the H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Schizosaccharomyces pombe* 13TH Int. Congr. on Yeast Genetics and Molecular Biology.

Goffeau, A; M. Ghislain, C. Navarre, B. Purnelle and P. Supply. (1990). Novel transport ATPases in Yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1018: 200-202.

Gunge, N. and K. Sakaguchi. (1982). Transformation of *S. cerevisiae* with linear DNA plasmids from *K. lactis*. *J. Bacteriol.* 151: 462-464.

Hager, K, Davenport, S.M; Speicher, D. and C. Slayman. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 7693-7697.

Hasegakwa, M. and S. Horai. (1991). Time of the Deepest Root for Polymorphism in Human Mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 32: 37-42.

Haase, E., Servos, J. and M. Brendel. (1992) Isolation and characterization of additional genes influencing resistance to various mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 21: 319-324.

Higgins, R.D. and J.N. Strathern. (1991). Electroporation stimulated Recombination in Yeast. *Yeast* 7: 823-831

Hollenberg, C.P. (1982). Cloning with 2 um DNA vectors and the expression of foreing genes in *Saccharomyces cerevisiae* Springer, Berlin Heidelberg New York.

Ito, H; Y. Fukuda; A. Kimura (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168

Johnstone, J. R; Contopoulou, R. and Robert K. Mortimer. (1988) Kariotyping of yeast of Several Genera by Field Inversion gel electrophoresis. *Yeast* 4: 191-198.

Johstone, P.A. and A. Coddington. (1993) Multiple drug resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Correlation between drug and aminoacid uptake and membrane ATPase activities. *Curr Genet* 7: 299-307.

- Ko, H. C. and R. F. Gaber. (1991). TRK1 and TRK2 Encode Structurally Related K<sup>+</sup> Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4266-4273.
- Kochová-Kratochilová, A. (1990). Yeast and yeast like organism. Vat Publishers, New York N.Y. 517 p.p.
- Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). The Yeast: A taxonomic study. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam. 1082 pp.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. (1982). A simple method of displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Laimins L. A; Rhoads, D; K. Altendorf and W. Epstein. (1978). Identification of the structural proteins of an ATP-deriven potassium transport system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(7): 3216-3219.
- Mandel, M. and A. Higa.(1970). Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infestion. *J. Mol. Biol.* 53: 159-162.
- Meyers, S., Schauer, W., Balzi, E., Wagner, M., A. Goffeau and J. Golin. (1992). Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5. *Curr Genet.* 21: 431-436.
- Mitchell, P.S. (1974) A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. *FEBS LETTERS* 43: 189-194
- Phaff, H.J; Miller, M.W. and Mrak, E.M. (1978). The life of yeast. Harvard University Press, Cambridge
- Peña, A; G. Cinco, A. Gómez, M. Tuena (1972) Effect on the pH on the incubation medium on glycolysis and respiration in *S. cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 143
- Peña, A. (1975) Studies on the mechanism of K<sup>+</sup> transport in yeast. *Arch. Bioch. Biophys.* 167: 397-409
- Peña, A and G. Ramírez (1975) Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. *J. Membrane Biol.* 22: 369-384
- Peña, A; Mora, M.A. and N. Carrasco. (1979). Uptake and Effects of several Cationic Dyes on Yeast. *J. Membrane Biol.* 47: 261-284
- Picard, D; Schena, M. and K. R. Yamamoto. (1990). An inducible expression vector for both fission and budding yeast. *Gene* 86: 257-261.

- Rank, G. H., Robertson, A. and Phillips, K. (1975) Reduced plasma membrane permeability in a multiple cross-resistant strain of *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 122: 359-366.
- Rieger, R. and A. Michaelis. (1976). Glossary of genetics and cytogenetics classical and molecular. 14th Ed. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Rodríguez Navarro, A; J. Ramos, P. Contreras (1985) A potassium transport mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143: 88-93
- Rodríguez Navarro, A; J. Ramos (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159: 940-945
- Rhoads, D. B; L. Laimins and W. Epstein. (1978). Functional Organization of the kdp Genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 135: 445-452.
- Rose, H. A; and J. S. Harrison (1969). The Yeast. Vol 1 Biology of the yeast. Academic Press London. New York 508 pp.
- Rose, M.D. and Broach, J. R. (1991). Cloning Genes by Complementation in Yeast. *Methods in Enzymology* 194: 195-231.
- Rothstein, R. (1991). One-Step Gene Disruption in Yeast. *Methods in Enzymology.* 101: 202-229.
- Saito, E; Fhide, D; Davio, N; Lackridge O. and V. Massey (1991). The Cloning and Expression of a Gene Encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomices carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* 266: 20720-20724.
- Sanger, F; S. Nicklen and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74: 5463-5467
- Sclesser, A; S. Ulaszewski, M. Ghisland and A. Goffeau (1988) A second transport ATPase gene in *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 19480
- Serrano, R. (1985) Plasma membrane ATPase of plants and fungi. CRC Press USA. 174 pp
- Serrano, R; Kielland-Brand (1986) PMA1, The gene for yeast plasma membrane ATPase. 13th. Int. Conf. on yeast genetics and Molecular Biology
- Serrano, R; Kielland-Brand, and G.R. Fink (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na + K), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>++</sup>-ATPases. *Nature.* 319: 689-693
- Serrano, R; and F. Portillo (1990) Catalytic and regulator sites of yeast plasma membrane

**H<sup>+</sup>-ATPase studied by directed mutagenesis. *Biochim. Biophys Acta* 1018: 195-199**

**Sherman, F; G.R. Fink and C. Lawrence (1979) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 73 pp**

**Sherman, F. (1991). *Getting Started with Yeast. Methods in Enzymology* 194: 3-**

**Sor, F. and H. Fukuhara. (1989). *Analysis of Chromosomal DNA Patterns of the Genus Kluyveromyces*. *Yeast*. 5: 1-10.**

**Tatum, E.L; W. Slayman (1964) Potassium transport in *Neurospora*. *Biochim. Biophys Acta* 88: 578-592**

**Tian, G; C. Macadre; A. Kruszewska, B. Szczesniak; A. Ragnini, P. Grisanti; T. Rinaldi; C. Pallechi; L. Frontali; P. Slonimski and J. Lazowska. (1991). *Incipient Mitochondrial Evolution in Yeast*. *J. Mol. Biol.* 218: 735-746.**

**Vidal, M; Buckley, A; Hilger, F. and R. Gaber (1990). *Direct selection for mutants with increased K<sup>+</sup> transport in S. cerevisiae*. *Genetics* 125: 313-320**

**Volkert, F. C, D. W. Wilson and R. Broach. (1989). *Deoxyribonucleic Acid plasmid in Yeast*. *Microrobiological Reviews*. 53(3)299-317.**

**Warburg, O; and Christian, W. (1993) *Biochem. Z.* 266: 377-411**

**Watson, J. D; N. H. Hopkins; J. W. Roberts; J. A. Steitz and L.A. M. Weiner. (1987). *Molecular Biology of the Gene*. Chaps. 18 and 19 Benajamin/Cummings, Menlo Park, California. 888.**