03081
16
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades.
Instituto de Fisiología Celular

ALTERACIONES EN LA ATPasa DE MEMBRANA PLASMATICA AFECTAN EL TRANSPORTE DE POTASIO EN LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*. ESTUDIO DE UNA MUTANTE RESISTENTE A BROMURO DE ETIDIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A

MANUEL MIRANDA ARANGO

INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR MEXICO, 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Antonio Peña Díaz y del Dr. Roberto Coria Ortega, a quienes agradezco la oportunidad y facilidades para realizarlo, asi como la paciencia y apoyo que me otorgaron

Este trabajo tambié se dirigió por el profesor Jorge Ramírez a quien agradezco las sugerencias durante el desarrollo del trabajo.

Agradezco profundamente a los miembros del jurado por sus sugerencias en la revisión de este trabajo:

- Dr. Juan Pablo Pardo
- Dr. Edmundo Chávez Cosío
- Dr. Salvador Uribe Carbajal
- Dr. Luis Servín González
- Dr. Jesús Aguirre Linares
- Dr. Heliodoro Celis Sandoval
- Dr. Roberto Coria Ortega

Agradezco profundamente a mi madre por su apoyo que recibo en todos los momentos, por su ayuda y cariño.

Agradezco a Laura su paciencia, y su gran apoyo que he recibido y espero seguir contando con su compañia y con su cariño. Gracias

Agradezco al Dr. Uribe y a los integrantes de su laboratorio el haberme dado espacio para trabajar.

A todos mis compañeros de trabajo y amigos porque de alguna manera contibuyeron a mi desarrollo profesional

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

I.1 LAS LEVADURAS Y EL HOMBRE
- A. Origen de los hongos
- B. Reproducción vegetativa
  - i) Gemación
  - ii) Fisión
  - iii) Balistosporas
- C. Reproducción sexual
- D. Variaciones en la forma celular
- E. Clasificación general de las levaduras
  - i) Levaduras ascosporógenas
  - ii) Levaduras basidiosporógenas
  - iii) Levaduras imperfectas

I.2 LA ATPasa DE H^+ DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE LOS HONGOS
- A. Antecedentes sobre la ATPasa de membrana plasmática
- B. Secuencias disponibles de genes de la ATPasa
- C. Segmentos tramsmembranales de la ATPasa de H^+ de los hongos
- D. Disección de la estructura-función
  - i) Sistemas de expresión descritos para la ATPasa de H^+
- E. Dominios funcionales de la ATPasa de H^+
  - i) Dominio de fosfatasa
  - ii) Dominio de unión a ATP
  - iii) Dominio de transporte
  - iv) Dominio de fosforilación y transducción
  - v) Dominio inhibitorio
- F. Mutantes resistentes a inhibidores de la ATPasa de la membrana plasmática de la levadura

I.3 EL TRANSPORTE DE POTASIO EN LA LEVADURA

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y METODOS
- A. Cepas
- B. Medios de cultivo y reactivos
- C. Plásmidos
- D. Transporte de potasio
- E. Cinética de transporte de ^{86}Rb
- F. Clonación y caracterización del gen que complementa a la mutante 3.3-1b
- G. Secuenciación del DNA de la clona 3M

H. Hibridación con el banco de genes de *K. lactis*
I. Identificación de la mutación
J. Actividad de ATPasa de membrana plasmática

IV. RESULTADOS
A. Cinética de transporte de rubidio de la mutante 3.3-1b
B. Bombeo de protones
C. Potencial transmembranal y la resistencia a higromicina
D. Complementación de la mutante con un banco de genes
E. Deducción de la estructura primaria de la proteína
F. Comparación con otras ATPasas tipo P
G. Complementación con *PMA1* de *K. lactis* y actividad de ATPasa
H. Identificación de la mutación en la cepa 3.3-1b

V. DISCUSION

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBILOGRAFIA

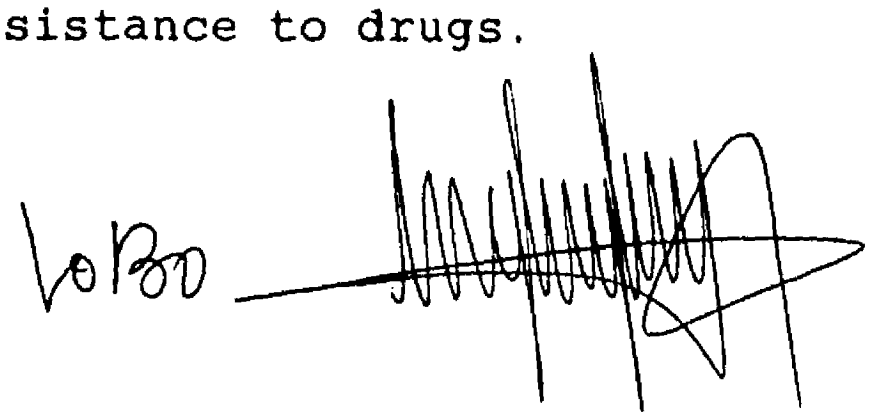
VIII. APENDICE

DOCTORAL DISSERTATION

A *Kluyveromyces lactis* strain resistant to Ethidium Bromide and deficient in potassium uptake was isolated. Studies on the proton-pumping activity of the mutant strain showed that a decreased H^+-ATPase specific activity was responsible for the observed phenotypes. The putative *K. lactis PMA1* gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase was cloned by its ability to relieve the potassium transport defect on this mutant and by reversing its resistance to Ethidium Bromide. Its deduced amino acid sequence, predicts a protein 899 residues long that is structurally co-linear in its full length to H^+-ATPases cloned from different yeasts, except for the presence of a variable N-terminal domain. By polymerase chain reaction mediated-amplification we identified a transition from G to A that rendered the substitution of the fully conserved methionine at position 699 by isoleucine. We attribute to this amino acid change the low capacity of the mutant H^+-ATPase to pump out protons.

Potassium uptake was meassured in the mutante and wild type showing differences in Vmax but not in Km.

Cross-resistance to hygromycine was found in the mutant . Compared to *S. cerevisiae*, *K. lactis* mutant cells resulted to be more sensitive to hygromycine. The membrane potential in the mutant cells is reduced and this causes deficiency in potassium uptake, in addition to resistance to drugs.



RESUMEN

Se purificó una mutante de Kluyveromyces lactis resistente a bromuro de etidio y deficiente en el transporte de potasio. Los estudios sobre la actividad de bombeo de protones de la mutante mostró una actividad específica de ATPasa de membrana plasmática disminuida que era la responsable de los fenotipos observados. El gene PMA1 de K. lactis que codifica para la ATPasa de protones de la membrana plasmática se clonó por su capacidad para complementar un defecto en el transporte de potasio de esta mutante y revertir su resistencia al bromuro de etidio. La secuencia de aminoácidos predice una proteína de 899 residuos que estructuralmente alinea en su totalidad con las ATPasa de H+ clonadas de levaduras, excepto por la presencia de un dominio amino terminal variable. Por amplificación en cadena de la polimerasa, se identificó un cambio de G por A que originó un cambio de una metionina altamente conservada a isoleucina en la posición 669. Se atribuye la baja capacidad de la ATPasa para bombear protones a este cambio.

El transporte de potasio se midió en las cepas mutante y silvestre y mostraron diferencias en la Vmax, pero no en la Km.

Resistencia cruzada a higromicina se encontró en la mutante. Comparado con S. cerevisiae, células mutantes de K. lactis resultaron ser mas sensibles a higromicina. La cepa mutante mostró un potencial de membrana reducido y esta fue la causa de la deficiencia en el transporte de potasio, además de la resistencia a drogas.

I. INTRODUCCION

Las levaduras son hongos microscópicos; su nombre en inglés *Yeast*, así como el holandés *gist* o el griego *zestos*, deriva probablemente de la espuma formada durante la fermentación. En otros lenguajes el nombre deriva de la palabra "levantar" (latín: levare; francés: lever; español: levantar). La fermentación de soluciones azucaradas se conoce desde tiempos antiguos; en la antigua Babilonia, de 6000 a 4000 años antes de Cristo, preparaban una clase de sopa de cereal germinado; con el clima cálido y húmedo, la sopa se llegaba a fermentar en un día y adquiría un sabor placentero y una calidad embriagadora. Este mismo procedimiento se usó para preparar el predecesor de la cerveza (Kokova, 1990).

1.1 LAS LEVADURAS Y EL HOMBRE

Las contribuciones de las levaduras que el hombre ha adquirido para su progreso, se deben principalmente a la capacidad para realizar una rápida y eficiente conversión de distintos azúcares en alcohol y bióxido de carbono, estas características han generado las grandes industrias productoras de la cerveza, el vino, y pan. Es sorprendente que mucho trabajo sobre la bioquímica de las células vivas se realizó en el organismo *Saccharomyces cerevisiae*, los hermanos Buchner en 1897 descubrieron que la fermentación de la sacarosa se podía realizar por un extracto de levaduras libre de células, marcando el nacimiento de la Bioquímica (Rose y Harrison, 1987).

Las levaduras pueden reconocerse como un grupo bien separado y distinto del de los otros hongos, debido a las ventajas de ser unicelulares, una velocidad metabólica mayor que los hongos miceliales, un crecimiento más rápido y, una distribución ecológica más amplia.

I. 1. A. Origen de los hongos.

El origen de los hongos se explica por dos hipótesis. Se acepta que el ancestro de los hongos es un alga fotosintética que perdió su capacidad para sintetizar clorofila y realizar la fotosíntesis. Por ejemplo, se toma algunas veces a *Prototheca* como una mutante nutricional de *Chlorella*. *Prototheca*

se parece a las levaduras de gemación por su nutrición heterotrófica. La segunda hipótesis sugiere que las algas púrpuras son los ancestros de los hongos.

Las levaduras parecen haber aparecido muy temprano en la evolución, como lo indican dos descubrimientos de microfósiles en Groelandia y Suiza; estos microfósiles están embebidos en calcedonia y su edad se estima entre 3400 y 3800 millones de años (Rose y Harrison, 1969).

Los hongos presentan cuatro estados evolutivos: 1)*Phycomycetes*, 2)*Ascomycetes*, 3) *Basidiomycetes* y 4) *Deuteromycetes* que agrupa a especies en las cuales no se ha encontrado ninguna manifestación de sexualidad (hasta que se determina su factor sexual), los cuales puede considerarse como formas imperfectas (anamórficas) de *Ascomycetes* o *Basidiomycetes*. Se encuentran levaduras únicamente en las clases 2,3 y 4.

Las levaduras se pueden definir como hongos unicelulares que se reproducen por gemación o por fisión. Esta definición cubre una amplia variedad de organismos; entre ellos los *Ascomycetes* y los *Basidiomycetes* (Kreger Van Rij, 1984). Al tomar como base este concepto morfológico, las levaduras pueden ser un estado en el ciclo de vida de los hongos hifales (Rose y Harrison, 1987). Arnold (1991) menciona que no es fácil definir a los organismos que colectivamente se conocen como levaduras y las define como organismos unicelulares eucariontes que típicamente se reproducen por gemación o por fisión; esto puede ser correcto para la mayoría de las levaduras pero siempre hay excepciones. Hay especies con una propensión a la formación de micelio y aún otros géneros que forman conidias o esterigmas. Las levaduras, de acuerdo con Van Der Walt, se definen como estados ontogenéticos unicelulares de los *Ascomycetes* y de los *Basidiomycetes* (Van Der Walt, 1987).

Entre los criterios que pueden utilizarse en la clasificación y la descripción estándar, están la reproducción vegetativa y la reproducción sexual entre otros.

I. 1. B. Reproducción Vegetativa.

Hay 3 formas de reproducción vegetativa en las levaduras (Rose y Harrison, 1987):

I. 1. B. i.) Gemación: puede ser de diferentes tipos, monopolar, bipolar, multipolar y esterigmatelar. La forma monopolar se presenta en el género *Pityrosporum*; se presentan gemas superpuestas exclusivamente en un polo, donde queda una cicatríz después de la liberación de la gema; y conforme las gemas se producen en secuencia, la cicatriz se hace más amplia. La gemación bipolar consiste en la producción de gemas en dos polos, ocurre en células ovoidales; esta forma de reproducción sugiere un mecanismo intermedio entre la gemación y la fisión. En la pared celular, la gemación bipolar conduce a la formación de cicatrices características y collares de gemas en ambos polos; esta forma de gemación es característica de la subfamilia *Nadsonioideae* y las especies representativas son *Hanseniospora osmophila y Kloeckera*. En la gemación multipolar, también llamada multilateral, las gemas se forman en sitios diferentes sobre la superficie de la célula parental, esta forma de reproducción vegetativa es común entre las levaduras y la especie mejor estudiada es *S. cerevisiae*, el número de cicatrices en la célula madura corresponde al número de células hijas producidas. La reproducción por esterigmas (gemas envueltas en un saco, la gema se separa de la célula madre por la formación de un septo) está retringida al género *Sterigmatomyces*, el género incluye 6 especies marinas (Rose y Harrison, 1987).

I. 1. B. ii.) Fisión: Esta forma de división se caracteriza por la formación de un septo sin constricción celular; después de que se completa el septo, las células se separan por rompimiento a lo largo del septo, *Schizosaccharomyces y Endomyces* se reproducen únicamente por fisión.

I. 1. B. iii.) Balistosporas:. Se producen balistosporas en forma de riñón o de hoz sobre estructuras cortas parecidas a esterigmas, las balistosporas se liberan al madurar por un método de descarga conocido como mecanismo de excreción por gota de agua. Esta forma de reproducción se encuentra en las levaduras de la familia *Sporobolomycetaceae* que comprende 3 géneros, *Sporobolomyces, Bullera, y Sporodiobolus* (Rose y Harrison, 1987).

I. 1. C. Reproducción sexual

Las principales características de la reproducción sexual en las levaduras ascosporógenas son: el modo de formación de las ascas y la forma de las ascosporas. La forma del asca, el número de esporas por asca, la forma de las ascosporas (redonda, oval, reniforme, cilíndrica o esporas en forma de aguja), el color de las esporas, su posible liberación del asca y su modo de germinación.

Si las esporas se forman en un cultivo a partir de una espora única o de una célula haploide, la levadura es homotálica; si se requiere una mezcla de células de factor sexual opuesto para la esporulación, la levadura es heterotálica. Varias especies son homotálicas y heterotálicas; en estas levaduras el cultivo de una célula haploide forma diploides y esporula. La mayoría de las levaduras basidiosporógenas son heterotálicas, y la forma de levadura es el estado haploide (Rose y Harrison, 1987).

I. 1. D. Variaciones en la forma celular

Las células vegetativas exhiben una variedad de formas; aunque éstas son frecuentemente una característica de las especies, se pueden presentar formas inusuales o aberrantes que son consecuencia de la edad, el estado del medio de cultivo o de ambos. Se puede hacer una distinción primaria entre especies con respecto a su tendencia a formar pseudomicelio o un micelio verdadero. Algunas especies de levadura forman pseudomicelio, en el cual se originan grupos de células en cadena por gemación apical, cuando estas células son elongadas, colectivamente parecen micelio; se presenta pseudomicelio en *Pichia y Candida*. En algunos géneros, se forma un micelio verdadero; por ejemplo, se forman septos sin constricción en *Endomycopsis y Endomyces*. En general, la proporción de formas de levadura y micelio están influenciadas por el medio ambiente (Arnold, 1984).

I. 1. E. Clasificación general de las levaduras

Se han reconocido 3 grupos en las levaduras de acuerdo a la reproducción sexual **i**) las levaduras ascosporógenas; **ii**) las basidiosporógenas; y **iii**) las levaduras imperfectas (Kreger Van Rij,

1984).

i) Levaduras Ascosporógenas.

Las levaduras ascosporógenas pertenecen a la clase *Hemiascomycetes*, los cuales son *Ascomycotina* que carecen de ascocarpos e hifas ascógenas. En la clase de los *Hemiascomycetes*, las levaduras se clasifican en 2 familias, ambas del orden *Endomycetales:* la *Saccharomycetaceae* y la *Spermopthoraceae*, que se diferencian por la forma de las esporas; la *Spermopthoraceae* presenta esporas en forma de aguja y la *Saccharomycetaceae* tiene formas ovoides. La *Saccharomycetaceae* comprende 4 subfamilias (1) *Schizosaccharomycetoideae*, en donde la reproducción vegetativa es exclusivamente por fisión (2) *Saccharomycetoideae*, que incluye 26 géneros con gemación multilateral (3)*Lipomycetoideae,* que se caracteriza por un proceso típico de formación de ascas. Una gema activa producida por una célula parental puede convertirse en un asca; una gema activa y una célula parental que lleva una protuberancia pueden conjugar y originar un asca; finalmente la célula madre después de haber producido un asca a través de una gema activa, puede ella misma convertirse en un asca. Las ascosporas son ovales de color ámbar y las ascas presentan de 2 a 16 esporas. (4) *Nadsonioideae*, se caracteriza porque la gemación es bipolar (Rose y Harrison, 1987).

ii) Levaduras Basidiosporógenas

Estas levaduras se forman durante la fase haploide del ciclo de vida de la mayoría de los *basidiomycetes* heterotálicos. Estas levaduras cuentan con 2 órdenes: (1) Los *Ustilaginales,* que comprende a la familia *Fillobasidiaceae* y levaduras formadoras de teliosporas. (2) Los *Tremellales* que comprende 2 familias, la *Sirobasidiaceae y Tremellaceae* (Kreger van Rij, 1984).

Las levaduras basidiosporógenas incluyen 3 grupos: 1) las que forman teliosporas, 2) las levaduras de los *Fillobasidaceae* y 3) las fases de levadura de los *Tremellales*.

El primer grupo produce teliosporas, las cuales son células de pared gruesa donde se realiza la cariogamia. La germinación de las teliosporas resulta en meiosis y la formación de metabasidios

con basidiosporas (Kreger van Rij, 1984). El ciclo de vida heterotálico comienza con la fusión de células de levadura de factor sexual opuesto y la formación de un micelio dicariótico septado; sobre la hifas se desarrollan esporas de pared gruesa terminales, laterales o intercalares, las teliosporas, donde se realiza la fusión nuclear; al germinar, forman un metabasidio en el cual se realiza la meiosis para originar las basidiosporas. Las basidiosporas se reproducen por gemación y se restablece la fase de levadura haploide. Este grupo incluye 3 géneros, *Sporidiobolus, Rhodosporidium y Leucosporidium* (Rose y Harrison, 1984).

El segundo grupo de levaduras basidiosporógenas son los *Fillobasidiaceae,* se caracterizan por la formación de basidios delgados no septados con basidiosporas terminales sésiles. En su ciclo de vida, las células de factor sexual opuesto se fusionan, desarrollan un micelio dicariótico septado y producen un basidio delgado donde realizan la cariogamia y la meiosis. *Fillobasidium* forma de 4 a 10 basidiosporas sésiles en el ápice del basidio y *Fillobasidiella* forma 4 cadenas largas de basidiosporas por gemación de 4 sitios en el ápice del basidio (Rose y Harrison, 1987).

El tercer grupo son los *Tremellales,* estos carecen de telliosporas y se distingue por tener cuerpos fructíferos con un himenio en el cual se forman los basidios (Kreger Van Rij, 1984).

iii) Levaduras imperfectas.

Este grupo de hongos se denomina imperfectos porque no se conoce su forma de reproducción. Las levaduras pueden ser haploides heterotálicos para las cuales no se ha encontrado ningún factor sexual, o pueden ser levaduras haploides o diploides en donde se desconocen las condiciones para la esporulación (Kreger Van Rij, 1984). Esta división cuenta con levaduras en 2 familias, *Cryptococcaceae y Sporobolomycetaceae:* la primera se caracteriza por tener células hialinas, de color rojo, anaranjado o amarillo debido a la presencia de pigmentos carotenoides, rara vez son de color café o negras. La segunda se caracteriza por formar micelio o psudomicelio y una forma de gemación por fisión o gemación. (Kreger Van Rij, 1984).

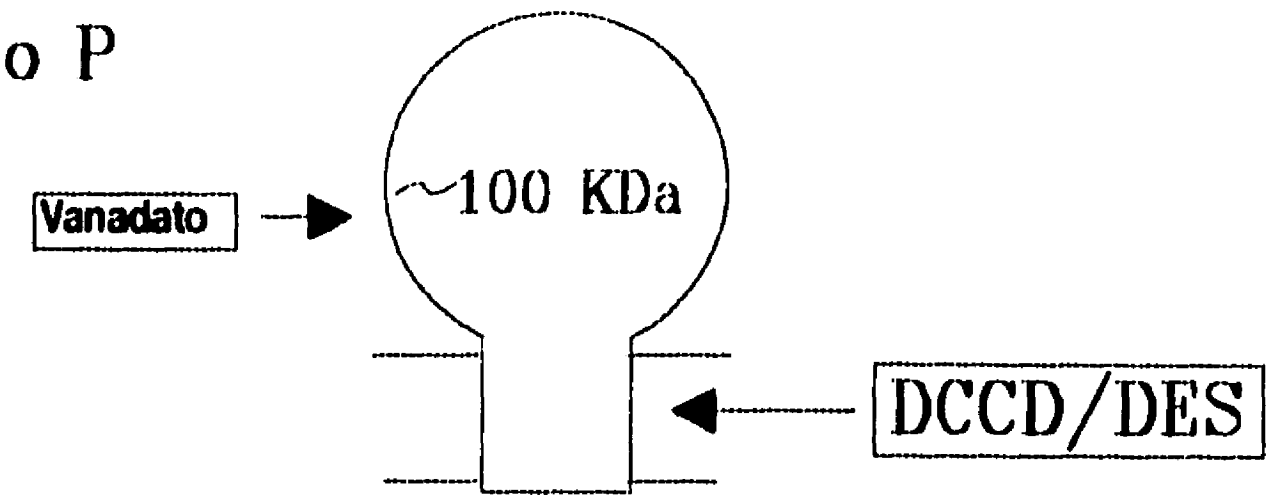
I.2 LA ATPasa de H^+ DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE LOS HONGOS

Los hongos cuentan con una ATP-sintasa-ATPasa mitocondrial (tipo F_0F_1), la cual también se presenta en cloroplastos y eubacterias; además presentan otras dos ATPasas conocidas como Fosfo-ATPasa, o de membrana plasmática (tipo *P*) y una ATPasa vacuolar (tipo *V*). Las ATPasas se distinguen por su composición de subunidades, la presencia o ausencia de un intermediario fosforilado, por la sensibilidad a inhibidores específicos, por la estequiometría ión/ATP y la función fisiológica de sintetizar (*FoF1*) o hidrolizar (P *y V)* ATP. Las ATPasas *FoF1 y V* transportan solamente protones, en tanto que las *P* pueden transportar H^+, Na^+, K^+ o Ca^{++} (Figura 1)(Nelson, 1992).

La membrana plasmática de los hongos contiene una ATPasa tipo P que genera un gradiente electroquímico de H^+. Este gradiente es necesario para el transporte de moléculas hacia dentro y hacia afuera de la célula (Serrano, 1991). La ATPasa de H^+ se parece a las ATPasas animales implicadas en el transporte de iones como el Na^+,K^+ y Ca^{++}, es sensible a concentraciones micromolares de vanadato, tiene una subunidad catalítica de alrrededor de 100 KDa, y forma un intermediario fosfatado durante el ciclo catalítico. El gradiente generado por la ATPasa de H^+ se utiliza para transportar nutrientes por mecanismos de cotransporte con el protón y para los movimientos de sodio y calcio por un antitransporte con el protón. En células altamente activas en transporte, tales como la levadura y las raíces de las plantas hay alrededor de 10^6 moléculas de enzima por célula (alrededor de $10^4/\mu m^2$). El número de recambio está entre 20 y 100 s^{-1}, esto resulta en un flujo de protones de 10^5 a 10^6 $H^+s^{-1}(\mu m^2)^{-1}$(10-100 $pmols^{-1}(cm^2)^{-1}$).

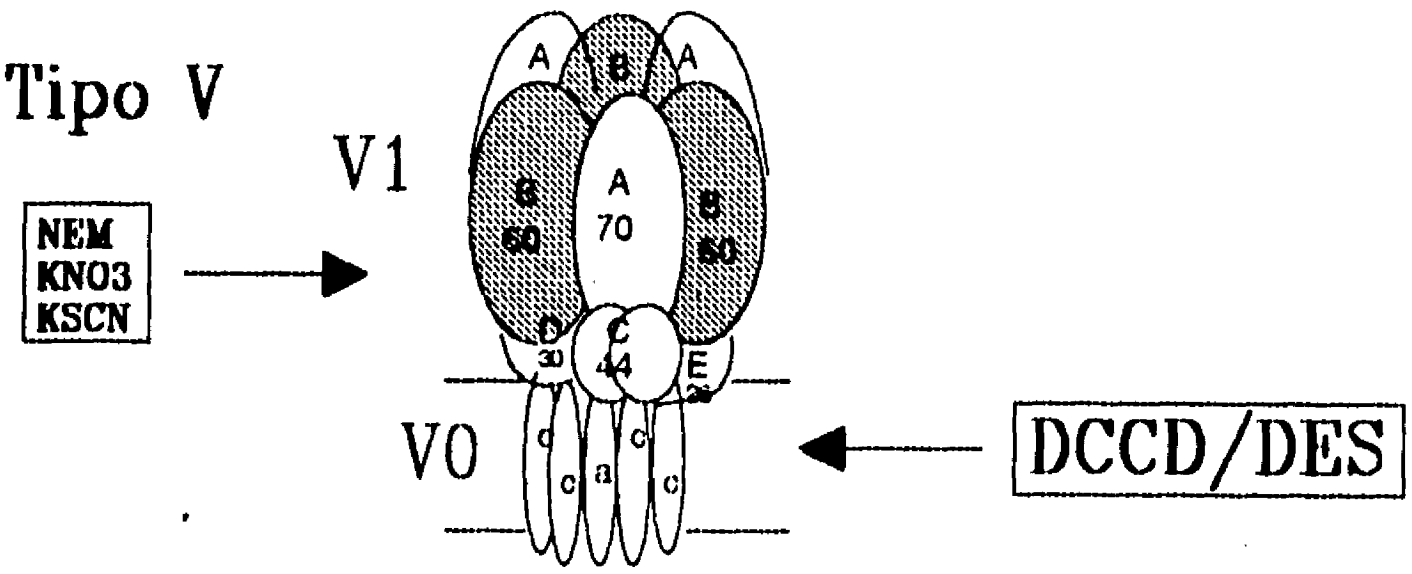
Se ha caracterizado el mecanismo de acción y papel fisiológico de la ATPasa de H^+ con dos enfoques: (1) La modificación química de aminoácidos que sugiere la participación de algunos residuos en el ciclo catalítico, pero la evidencia nunca es definitiva por la falta de especificidad de los reactivos y posibles impedimentos estéricos (Serrano, 1993). (2) El análisis mutacional del gene de la ATPasa

Tipo P



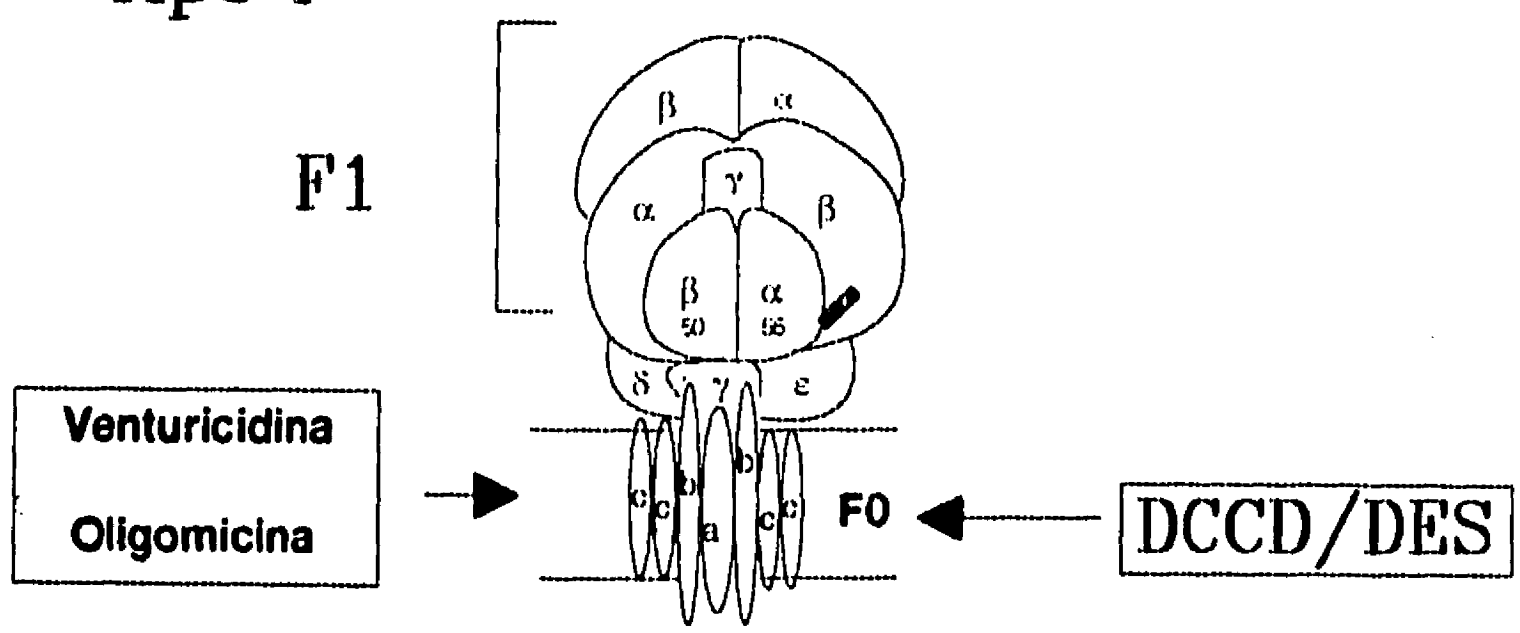
PM= (~100 KDa) Xn

Tipo V



PM ≥400 KDa

Tipo F



PM >450 KDa

Fig. 1 Comparación de los grupos de ATPasas mostrando la composición de subunidades peso molecular, y la acción de algunos inhibidores (DES, dietilestilbestrol; NEM, N-etil maleimida, DCCD diciclohexilcarbodimida). Tomado de Pedersen y Carafoli, 1987; Nelson, 1992

FALLA DE ORIGEN

ha sugerido el papel de algunos residuos de aminoácidos en el bombeo de protones y en la hidrólisis del ATP (Portillo y Serrano, 1988).

I. 2. A. Antecedentes sobre la ATPasa de membrana plasmática

Los primeros estudios encaminados a entender la acidificación extracelular por levaduras se realizaron por Conway y O'Malley (1946) y por Rothstein y Enns (1946). Ellos reportaron que durante la fermentación de la glucosa por *S. cerevisiae*, se acidifica el medio extracelular por mas de 3 unidades de pH. También reportaron que la salida de H^+ estaba acompañada por una entrada de K^+ (Conway y Brady, 1950). Diferentes hipótesis se postularon para explicar esta acidificación. (**1**) Conway y Downey (1950) propusieron que la membrana de la levadura contenía un sistema redox que transportaba H^+ al medio al donar electrones a algún aceptor orgánico, y que dependiendo de las condiciones experimentales, el mismo sistema podía meter K^+ o sacar aniones a través de la membrana plasmática. Esta hipótesis se descartó porque no explicó el acople de energía al transporte, pero después fue de interés por su relación con la teoría quimiosmótica de Mitchell (1961). (**2**) Entre 1960 y 1970, se propuso la existencia de un acarreador catiónico electroneutro que intercambiaba K^+ extracelular por H^+ y Na^+ intracelular (Slayman y Slayman, 1970); esta propuesta no respondió la pregunta de cómo la energía está acoplada al movimiento de iones, ni a la salida de H^+ que se presenta en ausencia de K^+ extracelular. (3) Se detectó una salida electrogénica de H^+ mediante estudios electrofisiológicos en *Neurospora* (Slayman, 1965); se encontró que los potenciales de membrana en *Neurospora* eran de mas de -200 mV y el potencial era sensible a inhibidores metabólicos (CN^-, CO, NaN_3 o al desacoplante DNF), la inhibición con estos compuestos resultó en una despolarización (-30 mV). Esto sugirió la existencia de una bomba electrogénica en la membrana acoplada al metabolismo. Slayman y cols (1973) demostraron posteriormente que los inhibidores metabólicos mencionados también depletaron el ATP celular y concluyeron que la bomba de *Neurospora* requería ATP para funcionar.

Por otro lado, Peña y cols (1972) demostraron en levadura que el ATP disminuyó fuertemente cuando el pH externo se cambió de 4.0 a 7.5, o al añadir KCl 0.1 M al medio a pH bajo. Estos resultados los llevaron a postular que la levadura presenta una bomba de H^+ energizada por ATP e inhibida por altas concentraciones de H^+ en el medio, y que este evento se podía activar por un incremento en el pH externo o por la adición de potasio.

Posteriormente se demostró que en la levadura el transporte de K^+ podía estar ligado indirectamente a la salida de H^+ y que ambos transportes eran sensibles a los desacoplantes (Peña, 1975). En *S. pombe*, Foury y Goffeau (1975) observaron que el Dio-9, un inhibidor conocido de ATPasa, inhibió la salida de H^+ y el transporte de uridina y aminoácidos, aunque la concentración de ATP en la célula permanecía alta. También se demostró que la entrada de 3-O- metilglucosa por el sistema de transporte de alta afinidad presentaba una estequiometría de 1:1 y causaba una despolarización sustancial de la membrana. Estos resultados se interpretaron en términos de cotransportadores dependientes de H^+, energizados por una bomba electrogénica de H^+ primaria que era inhibida por Dio-9 y DCCD.

Los primeros reportes sobre la detección de actividad de ATPasa de la membrana plasmática en las levaduras fueron en 1962 por Bolton y Eddy, quienes postularon que una ATPasa puede estar involucrada en el transporte de glicina y llevaron a cabo estudios de fraccionamiento celular (Goffeau y Slayman, 1981). Así también Schatz (1965) observó actividad de ATPasa insensible a oligomicina en una fracción con una densidad mayor que la de la mitocondria.

I. 2. B. Secuencias disponibles de genes de la ATPasa

La clonación de genes ha requerido de diferentes estrategias que ofrece la biología molecular, entre las cuales están: (1) La hibridación con un gene homólogo previamente clonado (Sambrook y cols., 1989). (2) Hibridación con oligonucleótidos correspondientes a la región codificadora de

secuencias de aminoácidos conocidos. (3) Complementación de mutantes (Rose y Broach, 1992) (4) reacción de anticuerpos contra bibliotecas de expresión (Young y Rose, 1992). (5) amplificación con oligonucleótidos usando la reacción en cadena de la polimerasa (Sharf, 1990).

Hasta el momento se han clonado y secuenciado 8 genes que codifican para ATPasa de H^+ de hongos (Wach y cols, 1992). El primer gene se reportó por el grupo de Serrano y cols (1986) en *S. cerevisiae,* se clonó por medio de una biblioteca de expresión en λgt11. Con anticuerpos policlonales contra la enzima, se identificaron placas líticas positivas que contenían el gene de la ATPasa de H^+ de *S. cerevisiae PMA1*. El marco de lectura abierta de 918 residuos codifica para una proteína de PM. 99,532 Da, semejante al determinado en SDS-PAGE. Posteriormente se determinaron las secuencias de *N. crassa* usando la misma estrategia de anticuerpos contra la ATPasa de *N. crassa* (Hager y cols.,1986; Addison, 1986), la secuencia mostró alto grado de similitud con la de *S. cerevisiae*. Después, se tomó como sonda el gene de *S. cerevisiae* y se hibridó con bibliotecas genómicas, se identificaron los genes de *S. pombe, Z. rouxii y C. albicans* (Ghislain y cols.,1987; Watanabe y cols.,1991; Monk y cols.,1991 respectivamente) los cuales codifican para polipéptidos de ~100 KDa. Por otro lado, se ha clonado y secuenciado el gene de un proteolípido pequeño que está asociado con la ATPasa en *S. cerevisiae* y la eliminación del gene no es esencial para el funcionamiento de la ATPasa, pero se ha propuesto que puede ser una subunidad de esta (Navarre y cols.,1992).

Tomando 17 secuencias de aminoácidos de ATPasas descritas entre 1986 y 1992 provenientes de plantas, hongos y un ciliado, se realizó un alineamiento que dió información importante para decidir cuáles residuos deberían ser mutados. Para alinear las secuencias de plantas con las de hongos, se eliminaron los primeros 31 a 172 residuos amino terminales de algunas especies y los últimos 43 a 104 residuos en el extremo carboxilo terminal en algunas especies; estas regiones NH3 y C00H terminal representan secuencias no conservadas entre plantas y levaduras (Wach y cols.,1992).

I. 2. C. Segmentos transmembranales de la ATPasa de H^+ de los hongos

Para entender el mecanismo del transporte y tranducción de energía por las ATPasas tipo *P*, es necesario desarrollar un modelo claro de la estructura. Hasta la fecha sólo existen cristales bidimensionales de baja resolución para las *P*-ATPasa (Toyoshima y cols,1993; Stokes y cols, 1995), los cuales no son suficientemente buenos para determinar el número exacto y posición de los segmentos transmembranales y el arreglo de las regiónes hidrofílicas.

Las ATPasas tipo *P* son proteínas integrales de membrana que a partir de diferentes análisis de hidropatía, parecen estar embebidas en la bicapa lipídica por 4 segmentos hidrofóbicos hacia la región NH3-terminal (Serrano, 1988; Nakamoto y cols.,1989). Posteriormente presentan porción hidrofílica central que contiene los sitios de unión del ATP y la formación del intermediario fosforilado; esta región está bien conservada a lo largo de la escala filogenética.

En el estudio del extremo carboxilo terminal de la proteína, los análisis de hidropatía son ambiguos y se han predicho de 4 a 6 hélices transmembranales (Serrano, 1988; Nakamoto y cols., 1989; Brandl y cols, 1986). Una aproximación para resolver el problema consistió en la digestión tríptica de moléculas de ATPasa reconstituídas en proteoliposomas y los péptidos que permanecieron asociados con los liposomas se purificaron y secuenciaron, resultando en un modelo de 12 segmentos transmembranales, 6 hacia el amino y 6 hacia el carboxilo (Subrahmanyeswara y cols., 1991). Un análisis similar con el uso de diferentes proteasas resultó en un modelo de 5 segmentos transmembranales (Davis y Hammes, 1989). Los modelos propuestos hasta el momento de 5, 7 y 9 segmentos transmembranales se descartaron, ya que se identificó que los extremos amino y carboxilo están localizados del lado citoplásmico (Mandala y Slayman, 1989; Hennessey y Scarborough, 1990). Hasta el momento se cuenta con 3 modelos de 8, 10 y 12 segmentos transmembranales. Un reporte sobre la topología de una ATPasa tipo *P* de *Salmonella typhimurium* apoya el modelo de 10 segmentos transmembranales; en este estudio se fusionó una secuencia que codifica para 10

amoinoácidos para la cual exiten anticuerpos, en las regiones donde existe confusión y se llegó a predecir un modelo con 10 segmentos transmembranales (Smith y cols.,1993). Otro estudio que apoya el modelo de 10 segmentos es la obtención de cristales bidimensionales de la ATPasa de Ca^{2+}(Stokes y cols; 1995).

I. 2. **D. Disección de la estructura-función**

i) Sistemas de expresión descritos para la ATPasa de H^+

Se han desarrollado diferentes métodos para el estudio de la relación entre la estructura y la función de la ATPasa de H^+. Se pretende identificar residuos de aminoácidos que juegan un papel esencial en la unión e hidrólisis de ATP, el acoplamiento de energía y el transporte.

La mutagénesis dirigida ha sido una herramienta poderosa para realizar el estudio de la relación entre la estructura y la función; en especial en la levadura, donde las técnicas de manipulación genética están bien desarrolladas. El estudio por obtención de mutantes es muy difícil, ya que la ATPasa es esencial para el crecimiento (Serrano y cols., 1986) y en muchos casos las mutaciones son letales y es difícil estudiarlas; es por ello que se han desarrollado diferentes estrategias de expresión de genes para el estudio de la relación estructura y función de la ATPasa.

El primer método de expresión desarrollado en levaduras comprende el reemplazo del promotor constitutivo *PMA1* por un promotor inducible por galactosa *GAL1;* las células resultantes detienen su crecimiento en medio con glucosa (Cid y cols., 1987). El gene mutante a ser estudiado se introduce en un plásmido controlado por su promotor original; en un medio que contiene galactosa, ambos genes se expresan y el crecimiento es soportado por la ATPasa silvestre aún cuando la enzima mutante sea defectuosa, luego la expresión de la enzima silvestre se apaga en un medio que contiene glucosa y se expresa la forma mutante, la proteína es procesada e insertada en la membrana plasmática normalmente. Un gran número de mutantes se han estudiado de esta forma (Portillo y Serrano, 1988; Portillo y Serrano, 1989). Con el uso de este sistema, también se ha expresado la ATPasa de plantas,

pero se encontró que no llega a la membrana plasmática y se acumula en el retículo endoplásmico de la levadura (Villalba y cols.,1992). Así también, se han podido expresar isoformas de ATPasa de *Arabidopsis thaliana* en la levadura, y ésto ha permitido hacer comparaciones de las propiedades funcionales de distintas ATPasas de membrana plasmática (Palmgren y cols.,1994).

El sistema descrito presenta varios inconvenientes: una mezcla de ATPasa mutante y silvestre está presente en la membrana plasmática, sólo se obtiene crecimiento cuando la ATPasa mutante es funcional, y no se pueden obtener vesículas de membrana plasmática selladas para estudios de transporte de protones energizado por ATP.

Otro sistema de expresión, utiliza una cepa SY-4, en la cual el gene *PMA1* cromosómico se encuentra bajo inducción del promotor de galactosa y el gene a estudiar se encuentra bajo inducción de dos promotores de choque por calor. A una temperatura de 23 °C en un medio con galactosa, el crecimiento se basa en el gen cromosómico; en un medio con glucosa a 37 °C se apaga el gene cromosomal, se expresa la ATPasa codificada por el plásmido y se inhibe la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. La ATPasa a ser estudiada se encuentra en vesículas de secreción acumuladas que se dirigen a la membrana plasmática que permiten medir el bombeo de protones con compuestos florescentes (Nakamoto y cols.,1991; Rao y Slayman,1992).

I. 2. E. Dominios funcionales de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática

Los dominios funcionales propuestos para la ATPasa de H^+ de levadura se muestran en la Fig.2 Se han combinado la modificación química, las digestiones proteolíticas, las similitudes entre secuencias y predicciones de estructura para seguir un modelo de trabajo para la estructura y función de la ATPasa de H^+. Básicamente se considera que la enzima contiene 5 dominios funcionales: (1) los segmentos transmembranales y sus extensiones citoplásmicas representan el dominio de transporte de los cationes. (2) las regiones conservadas g,h,,i representan el dominio de unión al ATP

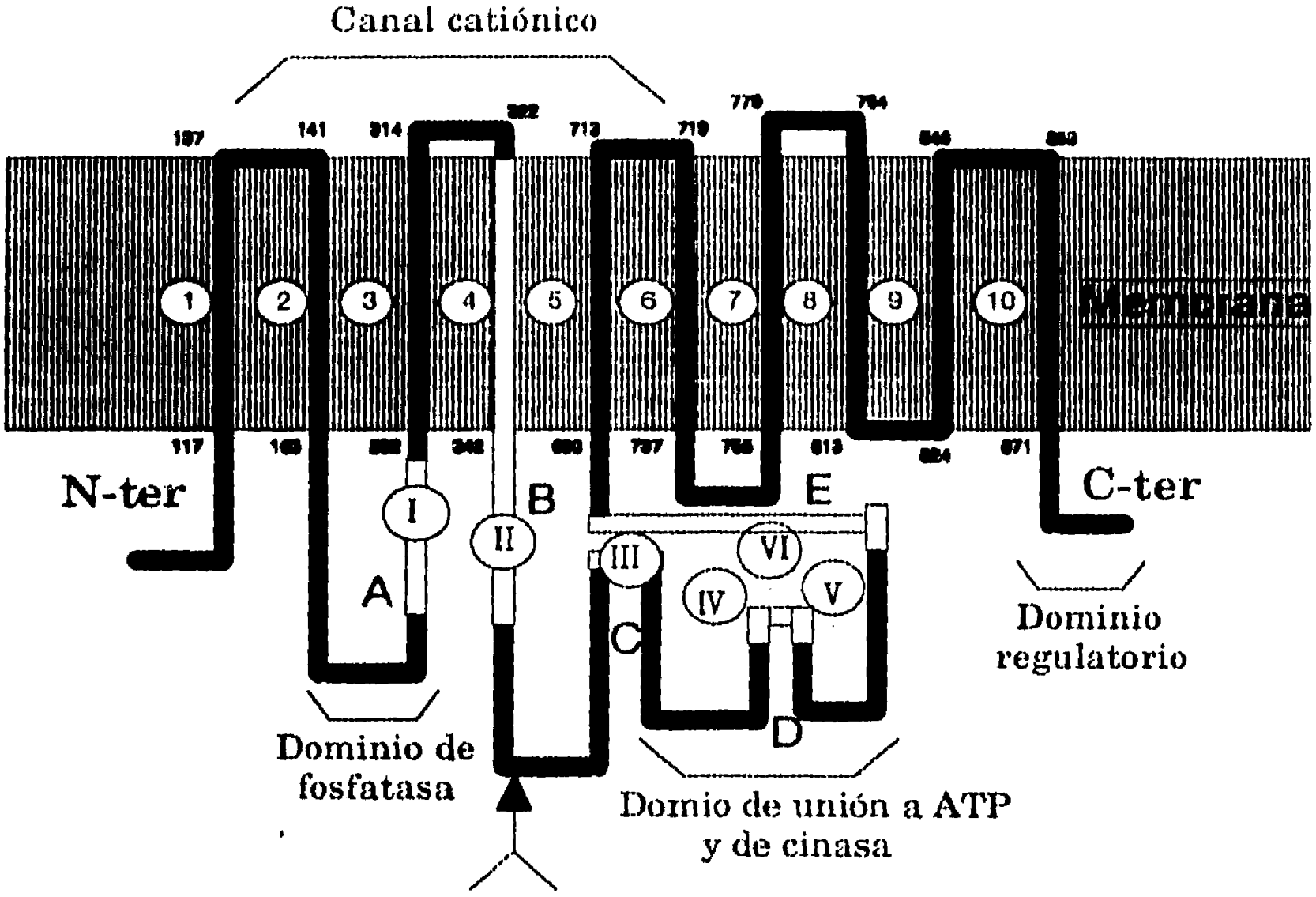


Figura 2. Modelo de la estructura de dominios de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levadura. Las partes claras de la barra corresponden a las regiones más conservadas (A-E) de las P-ATPasas. Se señalan los dominios conservados I a VI. Los probables segmentos transmembranales corresponden a 10 picos de hidrofobicidad. Se propone que las primeras 6 hélices constituyen el canal de protones. La función del dominio N-terminal no se conoce (Tomado de Serrano y Portillo, 1990).

FALLA DE ORIGEN

con actividad de proteína cinasa. (3) la región que contiene el D378, que forma el intermediario forforilado, junto con el cuarto segmento transmembranal conservado en diferentes ATPasas de la familia, constituyen un dominio de transducción que acopla la hidrólisis del ATP con el transporte de cationes. (4) las regiones conservadas b,c y d pudieran formar parte de un dominio de fosfatasa que cataliza la hidrólisis del intermediario fosforilado. Los dominios catalíticos y de transducción deben contener residuos de aminoácidos esenciales para la actividad y muy conservados dentro de la familia de las ATPasas; pero los residuos en el dominio de transporte difieren en las diferentes bombas catiónicas. (5) El quinto dominio es inhibitorio y consta de la parte carboxilo terminal y funciona como regulador de la actividad de la ATPasa.

i) Dominio de Fosfatasa. Las mutantes E233-G y T231-G acumulan el intermediario fosforilado durante la hidrólisis de ATP en estado estacionario y presentan un recambio más lento del intermediario, estos aminoácidos conservados E233 (Portillo y Serrano, 1988) y T231 (Portillo y Serrano, 1989) son un componente de la maquinaria de fosfatasa (Figura 3A). La obtención de una mutante resistente al vanadato apoya estos resultados que proponen un dominio de fosfatasa; en *S. pombe,* la mutación que confiere la resistencia a vanadato es una mutación única de G268-D, y este residuo está altamente conservado. Se sabe que el vanadato se une preferencialmente al estado E_2 de la enzima, que corresponde a la forma que cataliza la hidrólisis del intermediario aspartil-fosfato. La participación de la G268 en la sensibilidad al vanadato es bastante específica, ya que la sensibilidad mostrada por esta mutante no se modifica por otros inhibidores de la ATPasa (Ghislain y cols.,1987).

ii) **Dominio de unión a ATP.** El sitio de unión al ATP parece estar definido por las mutaciones D534-N, D560-N y D638-N, que resultan en especificidad alterada por el nucleótido. Los residuos D560 y D638 participan en la unión porque cambian la afinidad por ATP y están conservados en el sitio de unión de ATP en la fosfofructocinasa.

Este sitio también se ha identificado por la modificación química con análogos del ATP y mutagénesis de los residuos más conservados (GDGXNDXPXLK633-643), que sugieren que este dominio es el sitio de unión al ATP. Este dominio puede incluir 3 secuencias bien conservadas KGAP 474-477, DPPR 534-537 y MXTGD 556-560; las mutaciones D534-R, D560-R y D638-R inhiben la fosforilación y alteran la especificidad por nucleótido de la enzima (Figura 3B). La mutación de A547 localizada entre DPPR y MXTGD afecta la afinidad por ATP (Portillo y Serrano, 1989).

Los resultados que concuerdan con estas conclusiones son la expresión de un péptido de la región hidrofílica central en *E. coli* V341-S660 que tiene la capacidad de unir al TNP-ATP, un análogo de ATP y además ATP compite por el sitio de unión, pero no hay hidrólisis (Capieaux y cols.,1993)

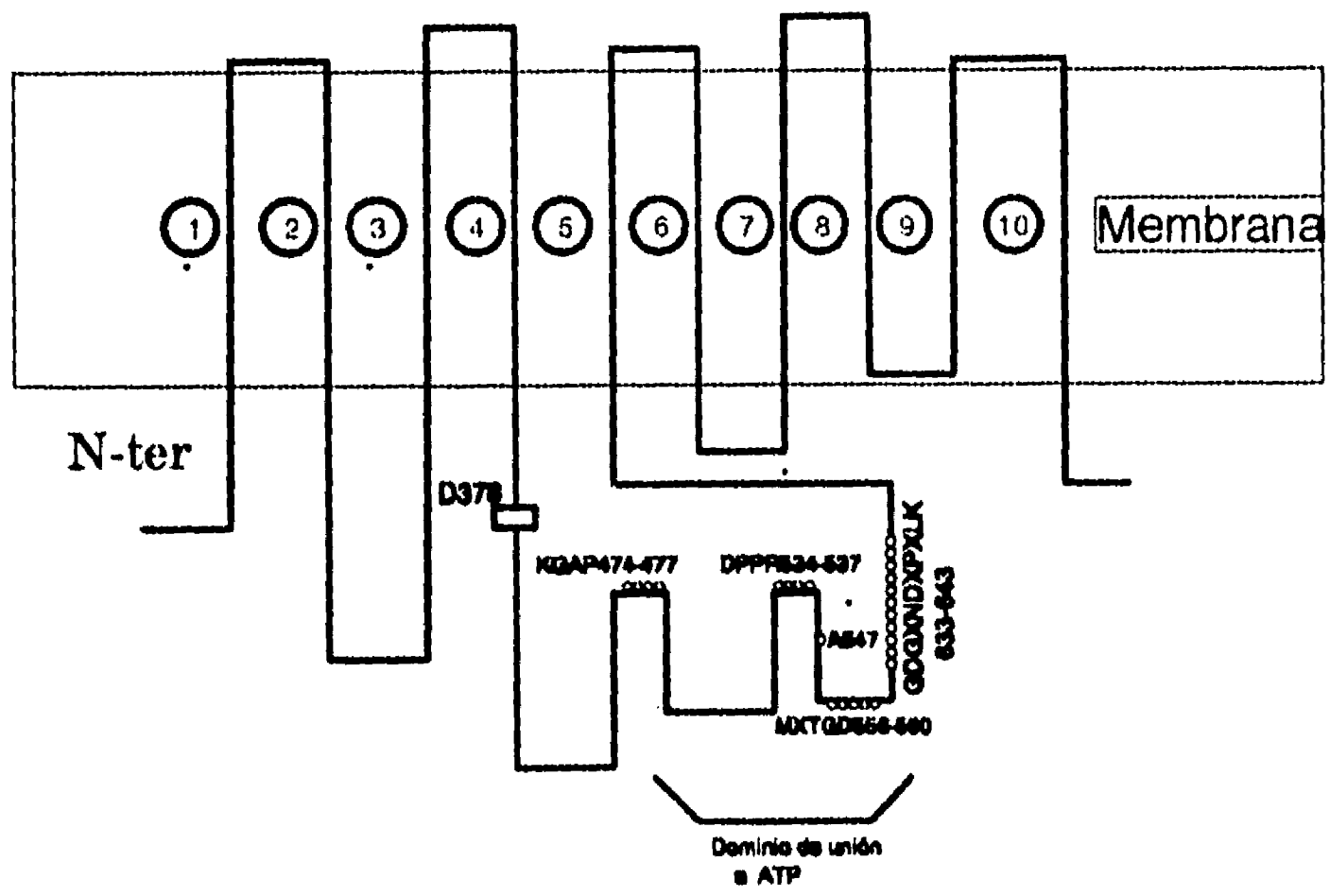


Figura 3B. Regiones que delimitan el dominio de unión a ATP

FALLA DE ORIGEN

iii)Dominio del transporte. Algunas mutaciones en este dominio no apoyan ningún papel crítico para el aminoácido conservado correspondiente. El E129 y la P335 no son importantes porque las mutaciones no tienen efecto en la actividad de la enzima. El E129 ofrece un resultado muy contradictorio, ya que la modificación con DCCD de este residuo sugiere su participación en el transporte de protones (Figura 3C) (Sussman y cols., 1987).

iv) Dominio de fosforilación y transducción La región que comprende el dominio de fosforilación y transducción es crucial para acoplar la energía a través de cambios conformacionales disparados por la fosforilación. La P335 en el cuarto segmento puede ser importante para esos cambios conformacionales (Figura 3C)(Serrano y Portillo, 1990).

Se reportó que el reemplazo del residuo que forma el intermediario fosforilado D378-N, D378-N resultaba en una enzima con actividad normal, pero el bombeo de protones era anormal, llevando a un desacoplamiento entre la hidrólisis de ATP y transporte de protones (Portillo y Serrano, 1988); sin embargo, las mutaciones en el D378 estudiadas con el sistema de expresión descrito por Nakamoto y cols (1991) resultaron ser mutantes no viables. En las mutantes D378N, D378S y D378E, no se detectó ATPasa en las vesículas de secreción; sin embargo se encontró que la proteína se sintetizaba y se acumulaba en el retículo endoplásmico en la ruta a las vesículas de secreción. También se encontró que esas mutaciones se comportaron como letales dominantes, y cuando alguno de los 2 alelos se colocaba sobre control de su propio promotor constitutivo *PMA1* y se introducía en una cepa silvestre, no se recuperó ninguna transformante en el período de tiempo usual, pero unas pocas colonias se desarrollaron muy lentamente y se identificaron como reversas o rearreglos del plásmido. Esta propiedad de reversión puede explicar porqué las mutaciones D378 descritas en un principio mostraron características normales (Rao y cols,1992; Rao y Slayman, 1992). Estas observaciones se han confirmado por transformación de diploides heterocigóticos *PMA1*/*pma1::URA3* con el plásmido que lleva la mutación D378-N, que resultó ser letal dominante y se perdía muy

frecuentemente por conversión génica a la secuencia silvestre, aunque esto no ocurre cuando se trata de mutaciones letales recesivas. La expresión de la proteína letal dominante resulta en una acumulación en el retículo endoplásmico (Harris y cols., 1994)

v) **Dominio inhibitorio**; la ATPasa de levadura se activa *in vivo* por algunas señales mediadas por el metabolismo de la glucosa. La eliminación de los últimos 11 amino ácidos produce una enzima con propiedades cinéticas similares a una ATPasa activada por glucosa (Portillo y cols, 1989); las mutaciones R909 y T912 en esta región son importantes para la regulación, evidenciando un mecanismo de fosforilación. Una doble mutación S911-A, T912-A reducen la actividad de ATPasa por glucosa (Portillo y cols, 1991), debido a estos resultados se propone que los últimos 11 aminoácidos forman parte de un dominio autoinhibitorio que interactúa con el sítio activo y que la fosforilación de este dominio disminuye esta interacción (Figura 3C)(Serrano, 1993).

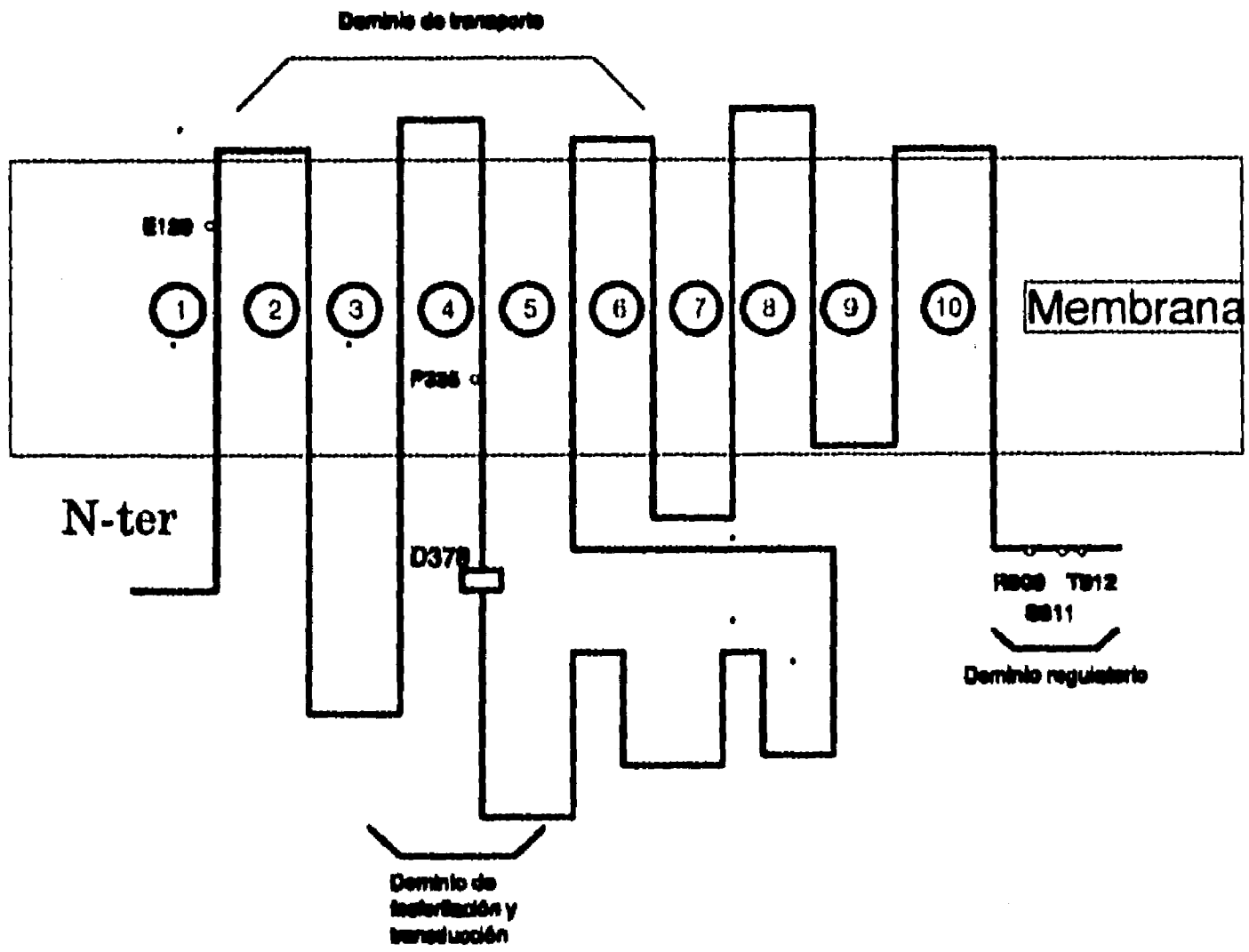


Figura 3C. Aminoácidos que delimitan las regiones de los dominios de transporte (arriba), de transducción (Abajo a la izquierda) y de regulación (derecha)

FALLA DE ORIGEN

I. 2. F. Mutantes resistentes a inhibidores de la ATPasa de la membrana plasmática

Roon y cols (1978) obtuvieron mutantes pleiotrópicas que confieren resistencia a drogas; estas mutantes fueron también obtenidas por Ulaszewski y cols (1983,1986) y por McCusker y cols (1987). El crecimiento de estas mutantes es resistente al Dio-9, protamina, bromuro de etidio, higromicina B y geneticina (G418), en estas mutantes pleiotrópicas se ha encontrado que la mutación mapea en el locus *PMA1*. Todas estas mutaciones causan crecimiento lento y una disminución en el transporte activo de nutrientes; por tanto, se ha sugerido que el transporte de drogas disminuye en las mutantes con actividad disminuída de la ATPasa de la membrana y se ha encontrado que presentan una reducción en el potencial de membrana (Perlin y cols.,1988). Muchas de estas mutantes deficientes en ATPasa también muestran alteraciones en las propiedades cinéticas de la enzima (Ulaszewski y cols.,1983) o en su actividad de transporte (Perlin y cols.,1988).

El incremento de la sensibilidad de las mutantes deficientes en ATPasa a la acidificación del medio, sugiere que la ATPasa es el principal sistema celular para regulación del pH, y que el aumento en la difusión de protones al interior de la célula en medios ácidos puede limitar el crecimiento. La inhibición del transporte activo en esas mutantes también demuestra que la ATPasa es la generadora de la fuerza impulsora para el transporte de nutrientes (Serrano y cols.,1986; Vallejo y Serrano, 1989).

Las mutantes de *S. cerevisiae* resistentes a 10 µg/ml de Dio-9 obtenidas por Ulaszewski y cols (1983) mostraron resistencia a otros dos inhibidores de ATPasa, miconazol y vanadato, pero la actividad se inhibió hasta 70-75% por Dietilestilbestrol. Se obtuvo el mismo tipo de mutantes en *S. pombe* con un fenotipo idéntico a las de *S. cerevisiae*, pero las mutantes de *S. pombe* resistentes a Dio-9, también fueron resistentes a decametilén diguanidina y bromuro de etidio (Ulaszewski y cols., 1986). Al secuenciar cuatro mutantes independientes de *S. cerevisiae* se encontró una sustitución de A608-T (Van Dick y cols.,1990). En este tipo de mutantes se ha demostrado que la resistencia a las

drogas se confiere por una reducción en su transporte (Ulaszewski y cols.,1987)

Otro esquema de selección para aislar mutantes *PMA1* se basó en la resistencia al antibiótico aminoglicósido *higromicina B (higB)*; las mutantes obtenidas mostraron incapacidad de crecer a pH bajo o en presencia de ácidos débiles y mostraron sensibilidad a presión osmótica; este fenotipo se eliminó por la adición de KCl 50 mM (Mckusker y cols.,1987). Las mutantes resistentes a *hig B* presentaron una disminución en el potencial de membrana (Perlin y cols., 1988). Las mutantes se secuenciaron y se encontraron cambios de S368-F (*pma1*-105) y P640-L (*pma1*-147), la cinética de hidrólisis del ATP mostró cambios en la Km y la Vmax, una fuerte dependencia del pH, además de que la hidrólisis fue resistente a inhibición por vanadato (Perlin y cols.,1989). Estos resultados predicen que S368 y P640 influencian la afinidad del sitio de unión de fosfato por su sustrato. En mutantes reversas de *pma1*-105, se identificó un cambio: V289-F, en el probable dominio de fosfatasa; ésto resultó en una enzima sensible a vanadato. Los resultados sugieren que los aminoácidos S368 y V289 están implicados en la unión del Pi. Otras mutantes reversas permitieron indentificar cambios en los segmentos transmembranales 1,3 y 7 dando evidencia de una interacción con la porción hidrofílica que contiene al sitio del ATP de la enzima (Harris y cols.,1991; Monk y cols,1994).

1.3 EL TRANSPORTE DE POTASIO EN LA LEVADURA

El transporte de potasio a través de la membrana plasmática de la levadura de *S. cerevisiae* está mediado por dos acarreadores identificados cinéticamente (Rodríguez Navarro y Ramos, 1984); uno de alta afinidad con una Km de 24 µM y uno de baja afinidad con una Km de 2 mM para el ^{42}K. Los genes que codifican para ambos sistemas, *TRK-1 y TRK2,* se clonaron y secuenciaron (Gaber y cols., 1988; Ko y Gaber, 1991); el fenotipo mostrado por eliminación del gen *TRK-1* es un requerimiento de más de 2 mM de potasio en el medio para crecer, y para Δ*TRK*1, Δ*TRK*2 un requerimiento de más de 50 mM. Aunque se postula la existencia de un tercer sistema para el

transporte de potasio, no se ha identificado. Otro sistema de transporte de potasio en la levadura es el canal de potasio activado por voltaje, la existencia de ese canal se ha demostrado electrofisiológicamente (Gustin y cols., 1986) y recientemente se clonó el gene y se secuenció por Ketchum y cols (1995), este sistema saca potasio de la levadura.

El bromuro de etidio, una molécula con carga positiva, es un mutágeno extracromosomal (Slonimski y cols., 1968); mutantes resistentes a este colorante con resistencia cruzada a octilguanidina y decametilen diguanidina se describieron por Celis y cols. (1975), Peña y Ramírez (1972) describieron que el bromuro de etidio es un inhibidor competitivo del transporte de potasio a bajas concentraciones, y posteriormente se obtuvo una mutante resistente a este colorante que presentó cambios en el transporte de potasio, y resistencia a acriflavina (Brunner y cols., 1982). También se realizó un estudio sobre el efecto de varios colorantes catiónicos sobre el transporte de potasio en la levadura y se encontró que funcionan como inhibidores del transporte y producen una salida de potasio (Peña y cols., 1979). Por otro lado, se ha demostrado que las mutantes Δ*TRK*1 y Δ*TRK*1, Δ*TRK*2 son hipersensibles a bromuro de etidio y acriflavina (Vidal y cols., 1990; Gaber y cols., 1990).

II. OBJETIVOS

Tomando como base los estudios del efecto del bromuro de etidio sobre el transporte de potasio (Peña y cols.,1973, 1975), y sobre la resistencia a bromuro de etidio y cambios en el transporte de potasio (Brunner y cols.,1982); en este trabajo partimos de la hipótesis de que si existe una relación entre el transporte y la resistencia al bromuro de etidio, entonces mutantes resistentes a bromuro de etidio tendrán alterado el transporte de potasio. Partiendo de esta premisa, en este trabajo se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

- Hacer una caracterización de una mutante espontanea resistente a bromuro de etidio de *Kluyveromyces lactis* con cambios en el transporte de potasio.

- La clonación del gene responsable de complementación y su análisis genético (Secuenciación, comparación)

- Hacer un análisis fisiológico de la mutante complementada con el presunto marco de lectura

III. MATERIALES Y METODOS

III.A Cepas

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

III.A CEPAS

Cepa	Genotipo
E. coli	
TG-1	*sup*E, *hsd* 5, *thi* (*lac*'*pro*AB), F'(*tra*D36, *pro* AB$^+$, *lac*1q, *lac*Z M15)
NM522	*sup*E, *sup*F, *hsd*R, *trp*R, *lac*Y, *rec*A13, *met*B, *gal*
K. lactis	
WM27	*Mat*α, *lis*A, EB^S
WM37	*Mat*α, *his*A, EB^S
MD2/1	*Mat*α, *ura*A, *lis*A, *arg*A [pKD1,K1K2] K$^-$ R$^-$ EB^S
3.31b	*Mat* α, *lis*A, *ura*A, Kdm$^-$, EB^R

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

III.B Medios de cultivo

Los medios de cultivo YPD, YPG, medio mímino SD y SG, medio de esporulación y técnicas genéticas estandar para las levaduras se describen en Sherman y cols (1986). El medio con bajo contenido de potasio (LSK 1mM) se preparó como se describe por Ko y Gaber (1990) y los diferentes amortiguadores y medios de cultivo para bacterias se prepararon como se describe por Sambrook y cols. (1989).

III.C Plasmidos.

PLASMIDOS	FUENTE	MARCADORES
KEp6	H. Fukuhara	*Ura* A, Tetraciclina, Ampicilina
pBS $(KS)^+$	Stratagene	Ampicilina, β-galactosidasa
pTZ18R	Pharmacia	Ampicina, β-galactosidasa
KEp6-3M	Este trabajo	*Ura* A, Teraciclina, Ampicilina y *PMA*1
URD	Este trabajo	Ampicilina y *PMA*1

III.D Transporte de potasio.

Se inoculó la mutante (3.3-1b), y las cepas progenitoras (WM27 y WM37) en 200 ml de YPD líquido, y se cultivó durante 24 hrs, a 30 °C, en un agitador rotatorio a 250 rpm. Después del cultivo, las células se colectaron por centrifugación a 4300 g por 10 min, y se lavaron 2 veces con agua desionizada. 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 a 0.5 g (peso húmedo)/ml.

El transporte de potasio se midió con un electrodo catiónico conectado a un potenciómetro, un amplificador y un graficador. En la celda 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 peso húmedo).

III.E Cinética de transporte de ^{86}Rb.

El estudio de la cinética del transporte se realizó con ^{86}Rb, ya que el potasio y el rubidio se transportan por el mismo sistema (Armstrong y Rothstein, 1964). El transporte de ^{86}Rb se ensayó en células resuspendidas a 50 mg (peso húmedo)/ml y mantenidas en hielo hasta el experimento. El transporte se midió incubando 5 mg de levadura en 1 ml de amortiguador MES-TEA 5 mM, glucosa 50 mM durante 2 minutos a 30° C. En seguida se añadió ^{86}Rb/Rb frío para obtener concentraciones de 0, 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 µm para eliminar la radioactividad no incorporada, las membranas se lavaron filtrando 10 ml de KCl 100 mM para eliminar el ^{86}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.

III.F Clonación y caracterización del gene que complementa a la mutante 3.3-1b.

Se transformó a la mutante 3.3-1b con un banco de genes de *K. lactis* hecho en el vector *KEp6*, para identificar al gene 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 g por 10 min y se lavaron

2 veces con PBS (Sacarosa 272 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KH_2PO_4 5 mM a pH 7.4) a temperatura ambiente. Luego las células se resuspendieron en 10 ml de PBS.

La transformación se hizo por electroporación, de la manera siguiente: se colocaron 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 medio 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 (LSK 1mM). Las colonias que mostraron crecimiento en LSK 1mM fueron seleccionadas para medirles transporte de potasio y para cultivarlas en presencia de EB 20 µM, y para recuperar el plásmido.

III.G Secuenciación del DNA de la clona 3M

De una de las transformantes complementadas se determinó la secuencia de ambas cadenas del DNA de un fragmento *Bam*HI-*Bam*HI de 6.6 Kb utilizando el método de Sanger (Sanger y cols., 1977). Para facilitar la secuenciación, se subclonaron 2 fragmentos *Bam*HI de 3.5 y 3.1 Kb de la clona 3M en el sitio *Bam*H1 de *PTZ*18R en las 2 direcciones y se secuenció por extensión con oligonucleótidos sintéticos. Las reacciones de secuencia fueron realizadas como se describe en el Manual de Sequenase Ver 2.0 (United States Biochemical)

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

III.H Hibridación con el banco de genes de *K. lactis*.

Se prepararon hibridaciones *in vitro* del banco de genes para clonar el gene completo de la ATPasa de H^+ de *K. lactis*, usando como sonda un fragmento *Xba*I de 627 pb del extremo carboxilo terminal de la ATPasa. El marcaje del fragmento con ^{32}P se realizó de acuerdo con el protocolo de "Nick Translation" de BRL y los filtros se procesaron e hibridaron como se describe en Sambrook y cols (1989).

III.I Identificación de la mutación

El gene mutante se clonó usando el DNA cromosomal total de la cepa mutante 3.3-1b digerido con *Bam*HI y se amplificó un fragmento de 700 p.b. de la región 3', usando los siguientes oligonucleótidos 5'aattgt**ggatcc**cagaactgaa3' y 5'gttacc**ggatcc**ccatctttgaag3'. Se clonaron y se secuenciaron dos productos independientes de PCR para localizar la mutación

III.J Actividad de ATPasa de membrana plasmática

Se midió actividad de ATPasa en la mutante y silvestre; la mezcla de reacción contenía Na_2ATP 5mM, PIPES 10 mM, azida de potasio 5mM para inhibir la ATPasa mitocondrial, fosfoenolpiruvato 5 mM y piruvato cinasa 5 µl/ml de mezcla de reacción. Se colocaron 0.25 ml de la mezcla de reacción en un tubo de 12.5 ml y se preincubó a 30 °C por 5 min. La reacción se inició con la adición de la ATPasa y se incubó a 30°C durante 10 min; luego se paró la reacción con 100 µl de TCA al 50% y los tubos se colocaron en hielo. El fosfato liberado al medio se midió por el método de Fiske y Subarrow (1925).

IV RESULTADOS

Se seleccionaron 44 mutantes espontaneas resistentes a 25 µM de bromuro de etidio de la cepa WM27 que no crecieron sobre el medio de selección LSK 1mM, cinco mutantes resultaron tener cambios en el transporte de potasio, las cuales se caracterizaron genéticamente (Miranda, 1993). De las mutantes obtenidas se eligió una mutante recombinante 3.31b *ura*A, *lis*A, *ktr*, EB^R para los experimentos de transporte de potasio, bombeo de protones y complementación.

IV.A Cinética de transporte de rubidio en la mutante 3.3-1B

El análisis cinético del transporte de ^{86}Rb para las cepas silvestre y mutante mostró grandes diferencias. La Km para el transporte de rubidio fue 3 veces mayor en la mutante (0.243 mM) que en la cepa silvestre (0.091 mM), mientras que la mutante transportó muy lentamente, con una Vmax (3.3 nmol $min^{-1}mg^{-1}$) cercana a 1/10 de la velocidad correspondiente a la cepa silvestre WM37 (34 nmol $min^{-1}mg^{-1}$). Estos resultados indican que se presentó una alteración mayor en la velocidad de transporte que en la afinidad para el rubidio, lo que sugirió la presencia de un defecto del sistema de transporte de potasio o que podría deberse a un mal funcionamiento en la ATPasa de H^+ (Figura 4). De acuerdo con estos resultados; en medio YPD conteniendo KCl 10 mM, la cepa mutante mostró un tiempo de generación más grande que la cepa silvestre (2.3 y 1.5 horas respectivamente). Como la fuerza impulsora para el transporte de potasio es el gradiente electroquímico generado por la ATPasa de H^+, se midió el transporte de protones.

IV.B Bombeo de protones

El bombeo de protones se midió con un electrodo de pH. Los trazos de las Figura 5 muestran la salida de protones en la cepa mutante y silvestre con glucosa como sustrato. Como se puede apreciar, la cepa mutante 3.31b presentó un defecto en la salida de protones en

comparación con la cepa silvestre, lo que sugirió que el defecto en el transporte de potasio se puede deber a un defecto en la función de la ATPasa y por tanto en la generación del gradiente electroquímico necesario para el transporte. La adición de potasio en el medio de incubación no produjo la estimulación esperada en la acidificación exterior en la mutante, pero sí en la cepa silvestre, de acuerdo con los resultados anteriores (Fig 5).

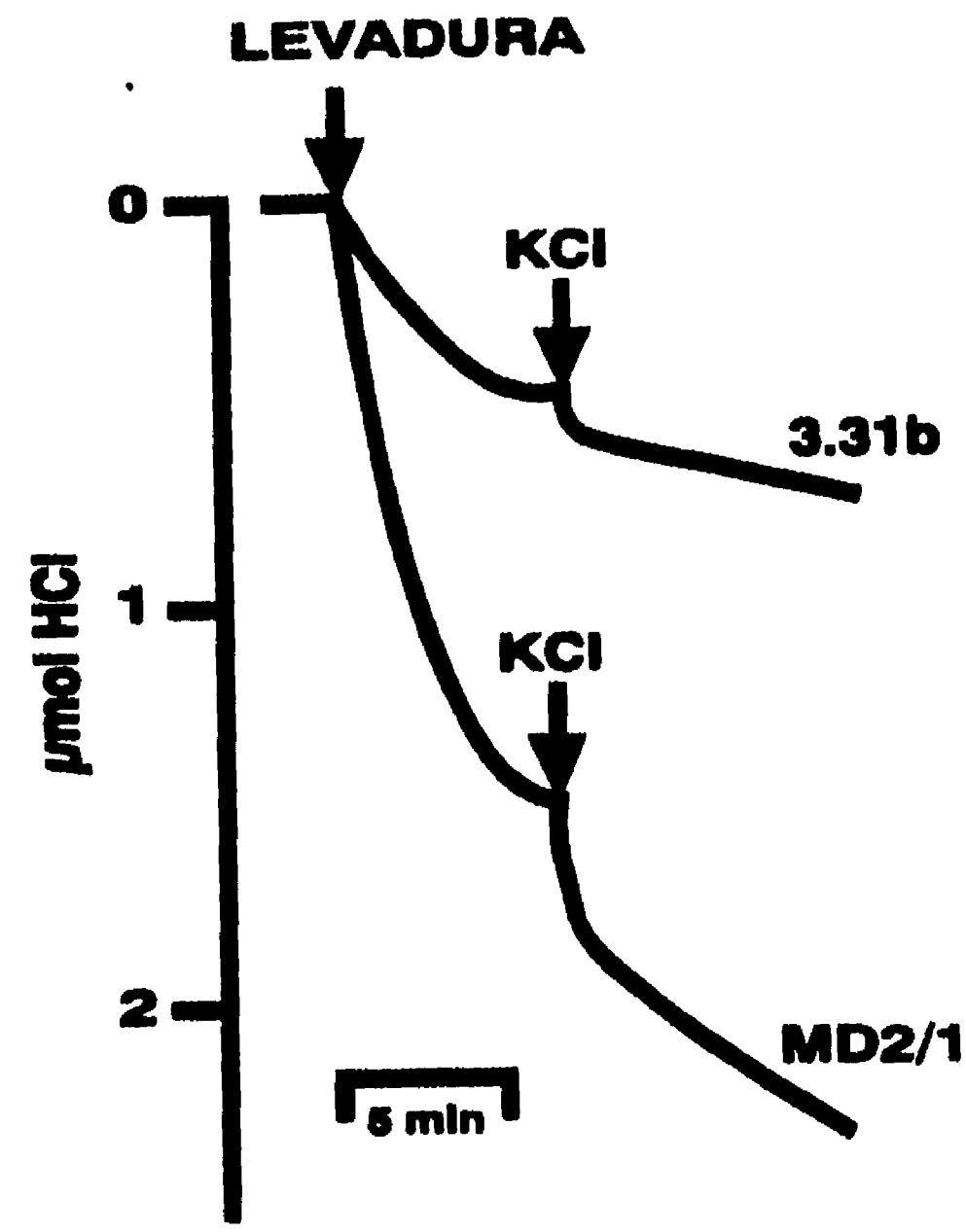


Figura 5. Cambios en el bombeo de protones en la cepa silvestre MD2/1 y de la cepa mutante 3.3-1b medido con un electrodo de pH. Las condiciones de incubación fueron MES-TEA 1 mM (pH 6.0), glucosa 50 mM, 10 µl de H_2O_2 3% y levadura 100 mg (peso húmedo) en un volúmen final de 10 ml. La reacción se inició con la adición de levadura.

IV.C El potencial transmembranal y la resistencia a la hidromicina

Se midió el potencial transmembranal con el indicador fluorescente N,N^3-dipropiltiocarbocianina (Peña y cols., 1984). Cono se indica en la figura 6, la cepa mutante mostró una disminución en la señal florescente, lo que indica la generación del potencial

FALLA DE ORIGEN

transmembrnanal, en comparación con la cepa silvestre en donde se observó un aumento de la señal. En la cepa silvestre, la adición de potasio abatió el potencial generado; mientras que en la cepa mutante, la adición de potasio tuvo menor efecto.

Estos resultados obtenidos en la mutante de una disminución del potencial y un menor efecto del potasio, concuerdan con el hecho de que la mutante creció en medios que contienen 5 µg higromicina A/ml, concentración a la cual la cepa silvestre fue incapaz de crecer. En *S. cerevisiae* se reportaron mutantes con una disminución en el potencial transmembranal y una resistencia de 200 µg de higromicina A/ml. Esta resistencia es más alta que la encontrada en *K. lactis*, pero los resultados fueron cualitativamente similares, un potencial de membrana disminuído y resistencia al antibiótico. La diferencia en la sensibilidad a antibióticos de una levadura a otra se ha documentado por Brunner y cols (1982).

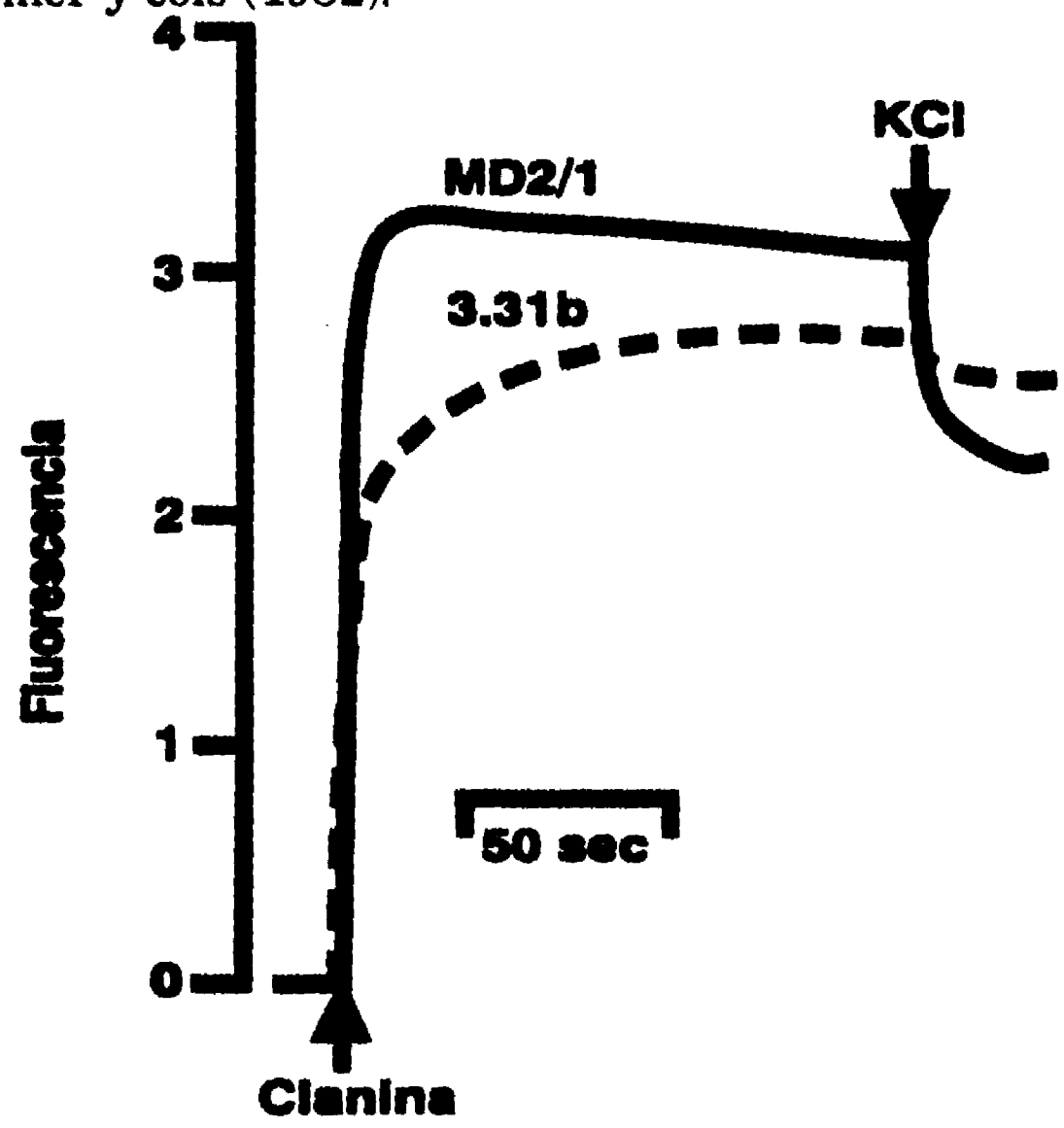


Figura 6. Cambios de fluorescencia del Disc3 de las cepas silvestre MD2/1 y mutante 3.3-1b. Las condiciones de incubación fueron MES-TEA 20 mM (pH 6.0), glucosa 100 mM, CaCl 250 µM; en donde se indica, se adicionó KCl para colapsar el potencial. La reacción se inció con la adición del la cianina (Disc3)

FALLA DE ORIGEN

IV.D Complementación de la mutante con un banco de genes

La transformación de la mutante 3.31b con un banco de genes de *K. lactis* hecho en el vector *KEp6*, se hizo por electroporación, con 1 µg de DNA, y las transformantes se seleccionaron en medio mínimo sin uracilo, y posteriormente se replicaron a un medio con un bajo contenido de potasio (LSK 1mM). Se identificaron seis colonias que mostraron crecimiento en bajo potasio y que además mostraron ser sensibles al bromuro de etidio.

Un análisis mitótico de las 6 clonas independientes mostró una mezcla heterogénea de células; algunas colonias que mostraron un fenotipo mutante y otras se transformaron establemente; se aisló el plásmido de estas clonas y se tranfirió a bacterias. Se volvió a transformar a la mutante con el DNA de cada clona y se observó que en sólo 3 de ellas se recuperó el fenotipo de crecimiento en medios bajos en potasio, así como la sensibilidad a bromuro de etidio 20 µM, y se encontró que eran capaces de transportar potasio. La retransformación de la mutante con los plásmidos resultó de nuevo en una mezcla de transformantes complementadas y no complementadas (Datos no mostrados). Un análisis de restricción de los 6 plásmidos aislados indicó que eran parecidos en el patrón de restricción, pero también se observó que tres de ellos habían sufrido rearreglos y que habían perdido sitios de restricción del vector. Las 3 clonas restantes dieron patrones de restricción similares con las enzimas probadas, y sólo variaron en el tamaño del inserto; de estas clonas se seleccionó la que llevaba el inserto de menor tamaño para hacer un mapa físico y subclonar el gene de interés. La clona seleccionada 3M mostró un inserto de 6.6 kb, que era el responsable de revertir el fenotipo mutante a un fenotipo silvestre. La figura 7 muestra un mapa físico de la clona.

Para determinar la secuencia del inserto completo, el fragmento se digirió con *Bam*H1, para generar 2 fragmentos de tamaño similar (3.5 y 3.1, respectivamente) que fueron subclonados en ambas direcciones en el vector *pTZ*18R digerido con *Bam*H1. La secuencia de ambas clonas mostró

un inserto de 6613 pb con 2 marcos de lectura incompletos en una cadena y un marco de lectura completo en la cadena opuesta (ORF1). El primer marco de lectura completo (ORF1) se comparó contra el banco de datos y se encontró que codifica para la enzima amarilla de Warburg (NADPH oxidasa (Figura 7A), mientras que ORF3 correspondió a un producto no identificado. El marco ORF2 corresponde a un fragmento de 778 pb. que codifica para el extremo carboxilo terminal de *PMA1*, el gene de la ATPasa de H^+. Este ORF2 mostró alta homología con el extremo carboxilo terminal de la ATPasa de membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Serrano y cols, 1986) y de *S. pombe* (Ghislain y cols, 1987).

Una digestión con *Hin*dIII de la clona 3M permitió la construcción de una clona de 778 pb. que contiene el extremo carboxilo de la ATPasa, con ella se transformó a la mutante y se observó complementación del fenotipo mutante. Un estudio de segregación mitótica de las transformantes después de cultivarlas varias generaciones en medio no selectivo (YPD) resultó en 30% de transformantes complementadas establemente. Es importante señalar que un fragmento de 778 pb complementó a la mutante (Dato no mostrado), probablemente por recombinación de este fragmento con el genoma de la levadura; de hecho, se ha demostrado que por alguna razón, la electroporación puede incrementar varias veces la recombinación homóloga en la levadura (Higgins y cols, 1991).

A las transformantes complementadas se les midió transporte de potasio y bombeo de protones, y se encontró un transporte normal para ambos, sugiriendo que el gene de la ATPasa es el responsable de complementación en la mutante.

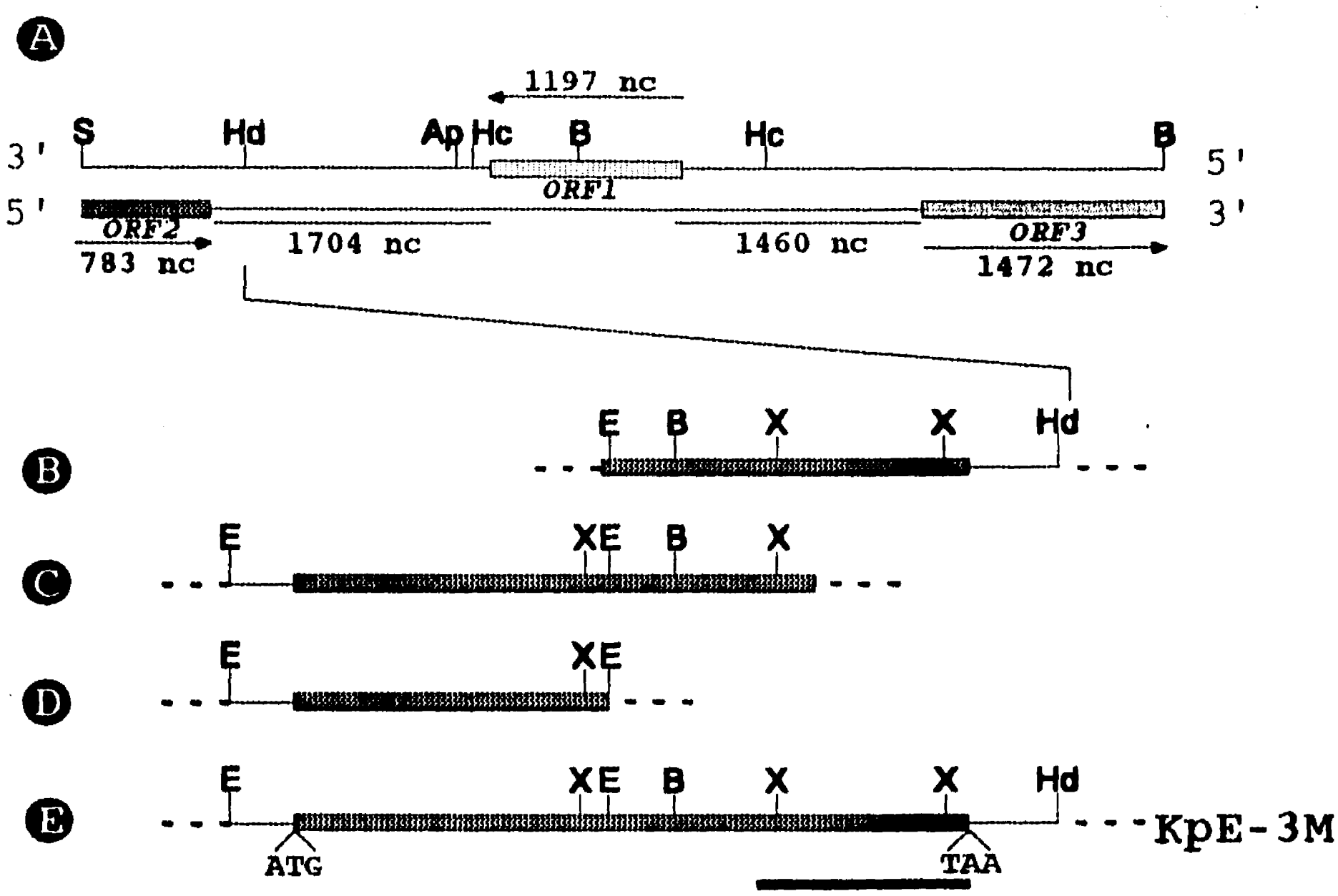


Figura 7. Construcción del plásmido *KpE-3M* con el marco de lectura completo *PMA1*. (A)Mapa físico de la clona de 6.6 kb que muestra los tres presuntos marcos de lectura encontrados. Se indica la longitud de cada marco de lectura y la distancia intergénica, asi como el número de nucleótidos. Las flechas indica la dirección de la transcripción. (B y C) Mapas de las subclonas encontradas por hibridación con la biblioteca genómica. (D) Fragmento mostrado en el panel B y ligado con el fragmento del panel C para originar el plásmido *KpE-3M*. (E) Plásmido *KEp-3M* con el gene *PMA1* completo, se indica el codón de inicio y de término. La línea inferior derecha indica el extremo 3' que complementa a la mutante 3.3-1b. Nc, nucleótido; los principales sitios de restricción son: S, *Sau* 3A; Hd, *Hin*dIII; Ap, ApaI; Hc, *Hin*dII; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; X, *Xba* I.

FALLA DE ORIGEN

IV.E Deducción de la estructura primeria de la proteína

Utilizando como sonda un fragmento *Xba*I-*Xba*I de 700 pb del extremo 3' del gene de la ATPasa de *K.lactis*, se buscó el marco de lectura completo por hibridación con un banco de genes. Mediante esta estrategia, no se identificó ninguna clona con el ORF completo. Una segunda estrategia consistió en identificar un fragmento de DNA cromosomal que tuviera el promotor y el extremo que codifica para la región amino terminal. Se purificaron fragmentos de DNA cromosómico de 6 kb que hibridaron con la sonda y se clonaron en *pTZ*18R. Se hibridaron y se seleccionó una colonia positiva, el DNA de purificado de esta contenía el extremo 5', extendiéndose hasta el sitio interno de *Bam*H1 (Figura 7C)). La digestión de esta última clona con *EcoR*1 permitió la separación de un fragmento de 1.5 kpb que fue ligado con una clona *Eco*R1-*Hind*III que contenía un fragmento de 1.7 kpb en el extremo 3'. El plásmido resultante, *KEp*-3M, contiene el ORF completo, 244 nucleótidos antes del codón de inicio y 341 nucleótidos después del codón de terminación (Figura 7E). La secuencia completa de nucleótidos y de aminoácidos, deducida a partir de esta clona, se muestra en la Figura 8. El presunto marco de lectura abierta de *PMA1* de *K. lactis* comprende 2,700 pb incluyendo el codón de terminación y codifica para una proteína de 899 aminoácidos.

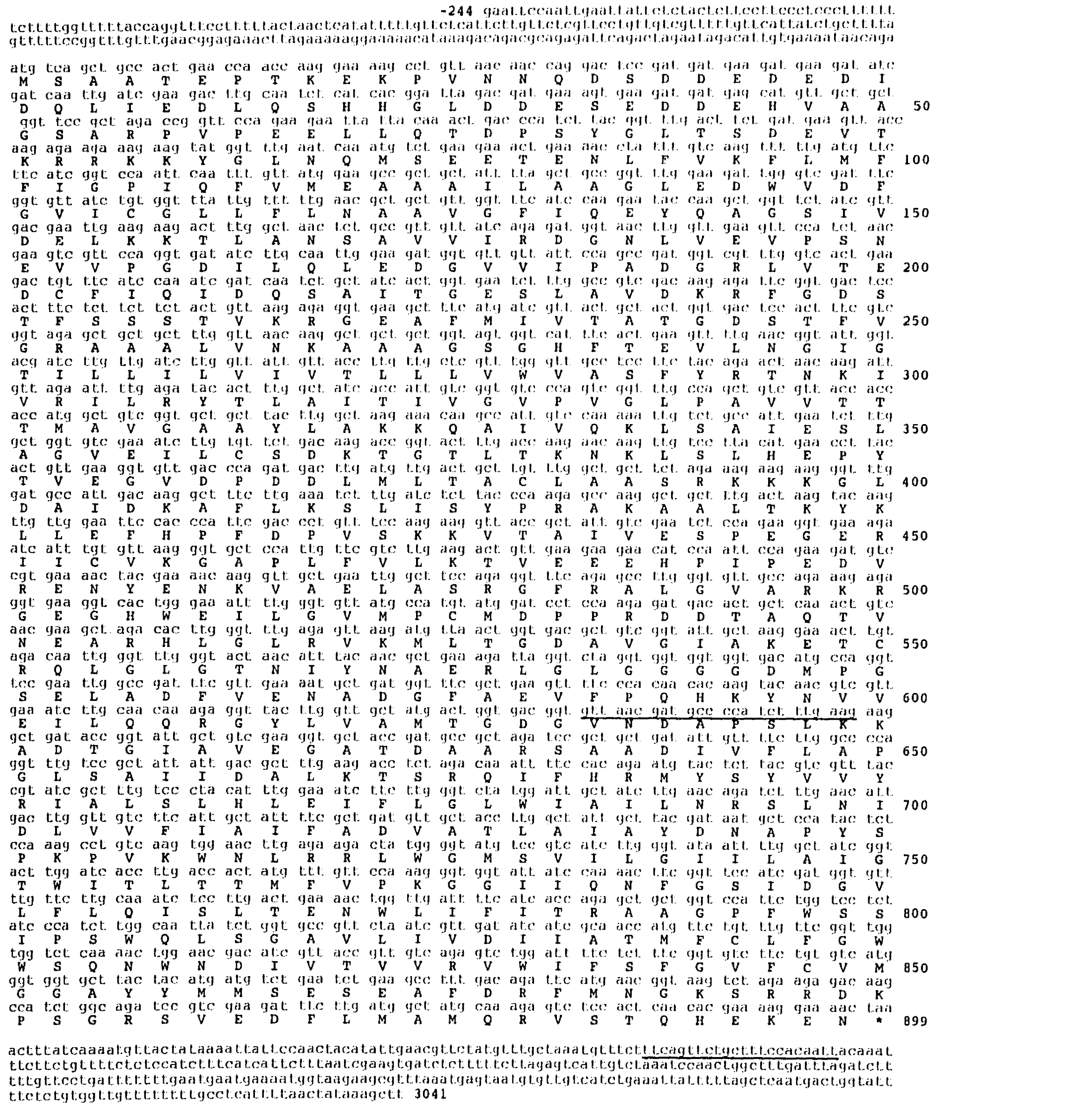


Figura 8. Secuencia de nucleótidos del gene *PMA1* de *K. lactis*. Se muestra la secuencia de aminoácidos en el codigo de una letra, el número y posición se muestra del lado derecho. La región que muestrá las líneas inferiores corresponde a los oligonucleótidos usados para amplificación por PCR.

FALLA DE ORIGEN

IV.F Comparación con otras ATPasas tipo-P

La alineación de la secuencia de aminoácidos del gene de *K. lactis* con las secuencias de cuatro ATPasas de levadura se muestra en la Figura 9; se observó alta conservación de la secuencia de *K. lactis*, con las de esas ATPasas, con una similitud de aproximadamente 93% y una identidad del 85% con las de *C. albicans S. cerevisiae, y Z. rouxii.* La identidad promedio entre las cinco ATPasas fue de alrreddor del 64%. La mayoría de las diferencias están presentes en las porciones amino y carboxilo terminal de las secuencias; ésto sugirió que el procesamiento e integración a la membrana de cada una de estas especies debe ser diferente.

Al alinear la secuencia de aminoácidos de la ATPasa de *K. lactis* con los de otras ATPasas tipo P como la ATPasa de Ca^{++} de la membrana plasmática, la de Na^{+}-K^{+}, la de H^{+}-K^{+} y la ATPasa de H^{+} se encontró una alta conservación en la secuencia que va del presunto cuarto segmento transmembranal hasta el sitio de fosforilación CSDKTGTLT en la porción hidrofílica central (Fig 10). La mayoría de las diferencias se presentan en los segmentos transmembranales, lo que sugiere que en esta región reside la selectividad diferencial para el catión que transporta cada ATPasa (datos no mostrados).

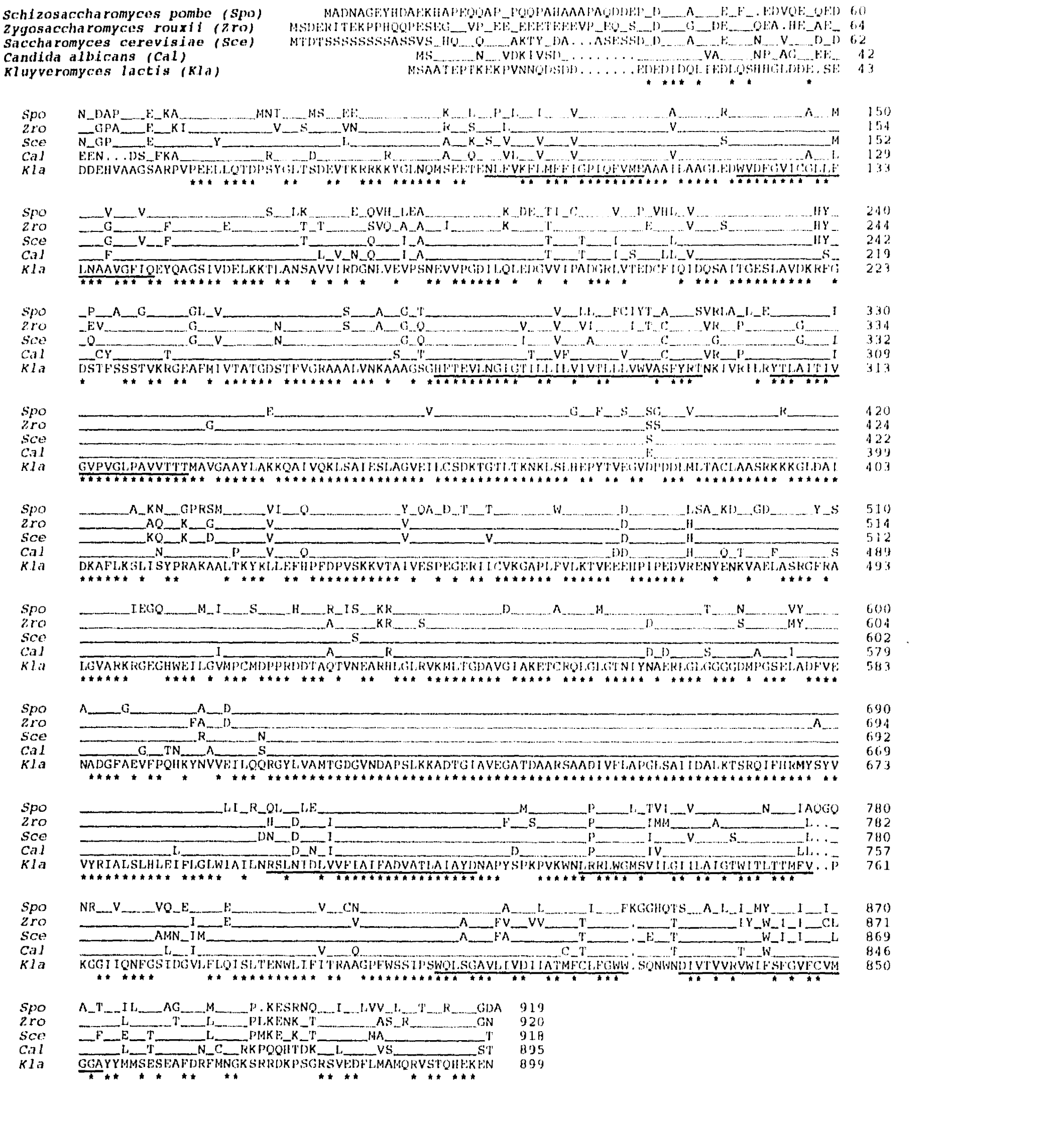


Figura 9. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la TPasa de H^+ *K. lactis* con *PMA1* de *C. albicans, S. cerevisiae, Z. rouxii, y Schizossacharomyces pombe.* La secuencia completa de *PMA1* de *K. lactis* se presentó usando el codigo de una letra. Las líneas y puntos representan identidades y ausencia de aminoácido, respectivamente. Los asteriscos representan residuos conservados en todas las secuencias. Los posibles segmentos transmembranales tomando el modelo de 8 segmentos transmembranales se muestran con lineas. La metionina 669 remplazada por isoleucina en la mutante, se muestra en negrita.

```
KlactisH   VRILRYTLAI TIVGVPV... .GLPAVVTTT MAVGAAYLAK KQAIVQKLSA
 ScerevH   VRILRYTLGI TIIGVPV... .GLPAVVTTT MAVGAAYLAK KQAIVQKLSA
SchpombeH  ARLLEYTLAI TIIGVPV... .GLPAVVTTT MAVGAAYLAE KQAIVQKLSA
 CalbicH   VPILRYTLAI TIIGVPV... .GLPAVVTTT MAVGAAYLAK KQAIVQKLSA
NcrassaH   VQILEFTLAI TIIGVPV... .GLPAVVTTT MAVGAAYLAK KKAIVQKLSA
  ArathH   RDGIDNLLVL LIGGIPI... .AMPTVLSVT MAIGSHRLSQ QGAITKRMTA
 TomateH   RPGIDNLLVL LIGGIPI... .AMPTVLSVT MAIGSHRLAQ QGAITKRMTA
 TabacoH   RPGIDNLLVL LIGGIPI... .AMPTVLSVT MAIGSHRLAQ QGAITKRMTA
   PigHK   VFF....MAI VVAYVPE... .GLLATVTVC LSLTAKRLAS KNCVVKNLEA
 HumanHK   VFF....MAI VVAYVPE... .GLLATVTVC LSLTAKRLAS KNCVVKNLEA
  RatNaK   IFL....IGI IVANVPE... .GLLATVTVC LTLTAKRMAR KNCLVKNLEA
HumanNaK   IFL....IGI IVANVPE... .GLLATVTVC LTLTAKRMAR KNCLVKNLEA
DromeNak   IFL....IGI IVANVPE... .GLLATVTVC LTLTAKRMAS KNCLVKNLEA
HumanMCa   VKFFIIGVTV LVVAVPE... .GLPLAVTIS LAYSVKKMMK DNNLVRHLDA
 HumanCa   IYYFKIAVAL AVAAIPE... .GLPAVITTC LALGTRRMAK KNAIVRSLPS
 RabbitCa  IYYFKIAVAL AVAAIPE... .GLPAVITTC LALGTRRMAK KNAIVRSLPS
   RatCa   IYYFKIAVAL AVAAIPE... .GLPAVITTC LALGTRRMAK KNAIVRSLPS

KlactisH   IESLAGVEIL CSDKTGTLTK NKLSLHEPY.
 ScerevH   IESLAGVEIL CSDKTGTLTK NKLSLHEPY.
SchpombeH  IESLAGVEVL CSDKTGTLTK NKLSLGEPF.
 CalbicH   IESLAGVEIL CSDKTGTLTK NKLSLHEPY.
NcrassaH   IESLAGVEIL CSDKTGTLTK NKLSLHDPY.
  ArathH   IEEMAGMDVL CSDKTGTLTL NKLSVDKNL.
 TomateH   IEEMAGMDVL CSDKTGTLTL NKLTVDKAL.
 TabacoH   IEEMAGMDVL CSDKTGTLTL NKLTVDKNL.
   PigHK   VETLGSTSVI CSDKTGTLTQ NRMTVSHLW.
 HumanHK   VETLGSTSVI CSDKTGTLTQ NRMTVSHLW.
  RatNaK   VETLGSTSTI CSDKTGTLTQ NRMTVAHMW.
HumanNaK   VETLGSTSTI CSDKTGTLTQ NRMTVAHMW.
DromeNak   VETLGSTSTI CSDKTGTLTQ NRMTVAHMW.
HumanMCa   CETMGNATAI CSDKTGTLTM NRMTVVQAY.
 HumanCa   VETLGCTSVI CSDKTGTLTT NQMSVCRMF.
 RabbitCa  VETLGCTSVI CSDKTGTLTT NQMSVCKMF.
   RatCa   VETLGCTSVI CSDKTGTLTT NQMSVCRMF.
```

Figura 10. Alineamiento de diferentes secuencias de P-ATPasas. Las ATPasas de H^+ de levaduras: *K. lactis, S. cerevisiae, S.pombe, C. albicans,* del hongo filamentoso *N. crassa*; de plantas: *A. thaliana*, tomate y tabaco; H^+-K^+ ATPasas de cerdo y humano; Na^+-K^+ ATPasas de rata, humano y *D. melanogaster*; Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática de humano, de retículo sarcoplásmico de humano, conejo y rata. La letra en negrita indica el sitio de fosforilación.

IV. G Complementación con *PMA1* de *K. lactis* y actividad de ATPasa

La transformación de la mutante 3.31b con el plásmido *KEp6* 3M produjo la recuperación total del fenotipo silvestre: crecimiento en medios con bajo contenido de potasio (LSK1mM), sensibilidad a 20 µM de EB (Fig 11), transporte de potasio y bombeo de protones (Figura 12).

La actividad específica de ATPasa sensible al vanadato ensayada en membrana plasmática purificada de la mutante fue de 0.72 ± 0.21 µmol min^{-1} mg^{-1}, mientras que en la cepa silvestre fue de 1.72 ±0.56 µmol min^{-1} mg^{-1}; por otro lado, la cepa mutante transformada con la clona *KEp* 3M aumentó la actividad a niveles comparables con la cepa silvestre 1.42±0.3 µmol min^{-1} mg^{-1}. Estos resultados sugieren una complementación total de la mutante con el gen *PMA1* de *K. lactis*.

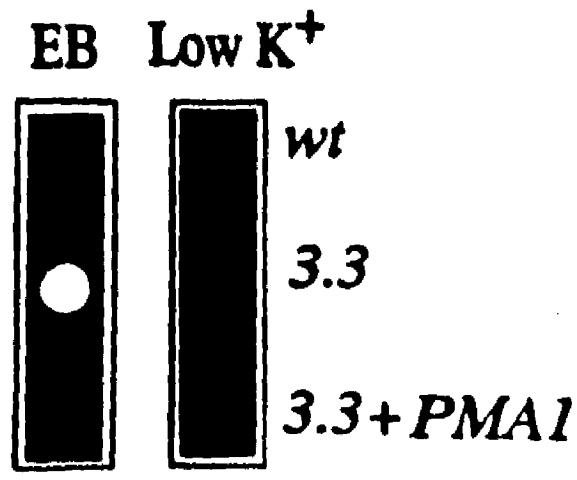


Figura 11. Resistencia a bromuro de etidio 20 µM y crecimiento en medio selectivo LSK1mM. La columna de la izquierda representa el crecimiento sobre medios con bromuro de etidio y la columna de la izquierda el crecimiento en medio con 1 mM de potasio. *Wt*, cepa silvestre MD2/1; 3.3, mutante transformada con el vector *KEp6* y 3.3+*PMA1*, mutante transformada con *PMA1*.

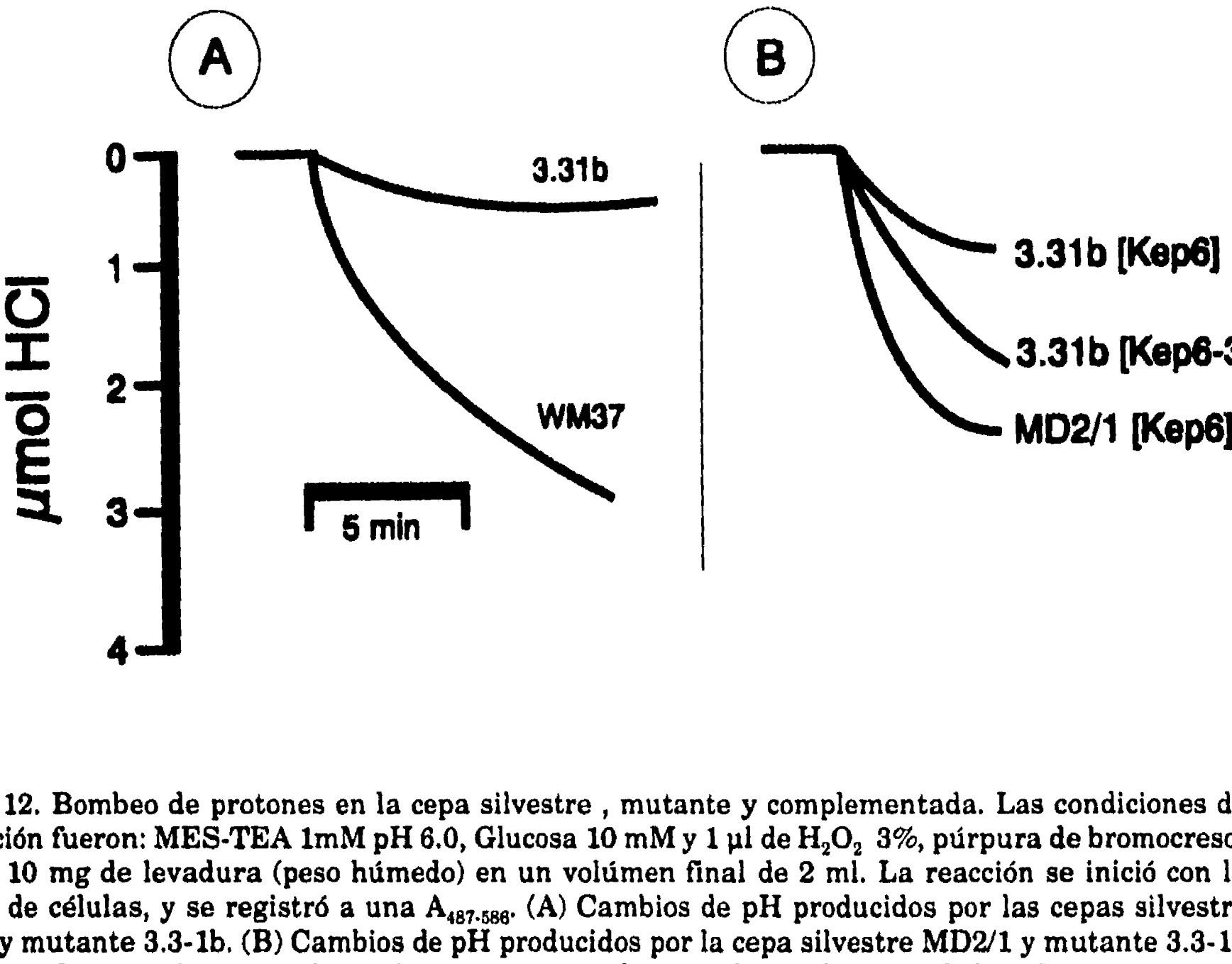


Figura 12. Bombeo de protones en la cepa silvestre , mutante y complementada. Las condiciones de incubación fueron: MES-TEA 1mM pH 6.0, Glucosa 10 mM y 1 µl de H_2O_2 3%, púrpura de bromocresol 8 µg, y 10 mg de levadura (peso húmedo) en un volúmen final de 2 ml. La reacción se inició con la adición de células, y se registró a una $A_{487-586}$. (A) Cambios de pH producidos por las cepas silvestre WM37 y mutante 3.3-1b. (B) Cambios de pH producidos por la cepa silvestre MD2/1 y mutante 3.3-1b transformadas con el vector *KEp6* y la mutante complementada con la clona *KEp6*-3M.

IV.H Identificación de la mutación en la cepa 3.31B

Se diseñaron 2 oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 700 pb que comprendiera el extremo carboxilo de la clona que complementa a la mutante. Este fragmento se amplificó usando DNA genómico de la mutante 3.31b, digerido con *Bam*HI, y usado como molde. La secuencia de dos productos de PCR independientes mostraron un cambio, que es el responsable de la disminución en la actividad de la ATPasa; se encontró un cambio de G por A en la posición 2007, este cambio produjo la sustitución de la metionina 669 por isoleucina; esta metionina se localizada en la segunda porción hidrofílica citoplásmica, cerca del quinto segmento transmembranal, si se toma como base el modelo de 8 o de 10 segmentos transmembranales (Figura 8).

V. DISCUSION

Se ha demostrado que el bromuro de etidio es un inhibidor competitivo del transporte de potasio en la levadura (Peña y Ramírez, 1975), y se han obtenido diferentes mutantes en *K. lactis* que son resistentes al EB (Brunner y cols., 1982). Algunas mutantes que se han reportado y que se analizaron durante este trabajo mostraron una resistencia al bromuro de etidio sin cambios en el transporte de potasio; estas mutantes transportaron al EB al igual que la cepa silvestre. Un segundo tipo de mutantes mostró cambios en el transporte de potasio y resistencia al bromuro de etidio; en estas mutantes se ha demostrado que ambos fenotipos de resistencia al EB y deficiencia en el transporte, segregan juntos y por lo que se supone que se trata del mismo gen. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las mutantes de *K. lactis* resistentes al bromuro de etidio presentaron defectos en el transporte de EB y K^+; una de las mutantes obtenidas presentó defectos en el bombeo de protones (3.31b), un potencial transmembranal disminuido y deficiencia en el transporte de protones. En *S. cerevisiae* se han descrito mutantes de ATPasa con un fenotipo parecido al de la mutante 3.3-1b, en ellas se ha demostrado que el transporte de diferentes drogas requieren del potencial transmembranal (Perlin y cols., 1988) y reportaron que la resistencia a drogas es conferida por una disminución en el potencial, estos antecedentes apoyan los resultados obtenidos para la mutante 3.3-1b, un potencial disminuído, resistencia a EB y deficiencia en el transporte de protones.

Otra mutante aislada en el laboratorio utilizando el mismo esquema de selección mostró una capacidad normal en el bombeo de protones pero una deficiencia en el transporte de potasio (Códiz, manuscrito en preparación). En ambos casos, la mutante 3.3-1b (este trabajo) y la mutante

obtendia por Códiz, se seleccionaron por la resistencia al EB y la ausencia de crecimiento en el medio LSK 1mM, en el cual la cepa silvestre crece normalmente. La obtención de estas mutantes apoyan los resultados de Peña y Ramírez (1972) de una posible interacción del bromuro de etidio con el sistema de transporte de cationes monovalentes.

La actividad de ATPasa de la cepa mutante 3.31b demostró que el defecto en el transporte de K^+ de la mutante se debió a una deficiencia en el bombeo de protones y no en el sistema de transporte de K^+. Los resultados de la cinética de transporte, muestran que la afinidad para el $^{86}Rb^+$ no cambió significativamente, pero sí la velocidad; éste resultado junto con los del bombeo de protones y complementación con *PMA*1 de *K. lactis* indicó que el fenotipo mutante se debía a un defecto en la función de la ATPasa, por lo que no se genera el potencial de membrana necesario para el transporte normal de K^+.

Por otra parte, el potencial transmembranal disminuyó en la mutante, y además la adición de potasio colapsó este pequeño potencial a un grado menor que lo hace la cepa silvestre. Esto concuerda con los resultados obtenidos para el bombeo de protones; en la cepa mutante se estimula el bombeo por la adición de potasio a un menor grado que como ocurre en la cepa silvestre. También se encontró que la mutante presentó una resistencia mayor al antibiótico higromicina, que requiere del potencial transmembranal para ser transportados (Perlin y cols.,1988). Aunque la resistencia a hidromicina no fue cuantitativamente similar a *S. cerevisiae*, los resultados son congruentes con un potencial disminuído, que da como resultado la resistencia al antibiótico (McCusker y cols., 1987).

Las membranas preparadas de la mutante mostraron un nivel reducido de hidrólisis de ATP con respecto al control silvestre. Otros trabajos han demostrado que las mutantes resistentes a un

inhibidor de la ATPasa, el Dio-9 tienen alterada su actividad de ATPasa, y este fenotipo de resistencia se debe a una reducción en la entrada del Dio-9 (Ulaszewski y cols., 1983). Aunque no se probó la resistencia a Dio-9, se han reportado mutantes resistentes a Dio-9 que confieren resistencia cruzada al bromuro de etidio y a la decametilén diguanidina (Ulaszewski y cols., 1986).

Aunque no se encontró ningún fenotipo visible diferente al de la cepa silvestre, la mutante 3.3-1b mostró hipersensibilidad al pH bajo, la cual se pudo enmascarar por la adición de K^+, además de un crecimiento lento con un tiempo de generación mayor con respecto a la cepa silvestre (2.3 y 1.5 respectivamente).

La mutante 3.31b se utilizó para transformar con un banco de genes y las transformantes complementadas se seleccionaron en LSK y por su sensibilidad a EB. La complementación produjo clonas que mostraron diferentes tamaños y la caracterización de una de ellas permitió la clonación de 2 genes, un marco de lectura completo que codifica para la enzima amarilla de Warburg y un marco incompleto que codifica para el extremo COOH-terminal de la ATPasa de H^+ de *K. lactis*. La complementación de la mutante se realizó por electroporación con el extremo 3' de *PMA1* y se encontró una mezcla de fenotipos como son: (i) de las células transformadas, una alta proporción se complementó de forma estable, y (ii) las transformantes resultantes siempre eran una mezcla de células con fenotipos mutante y silvestre, y (iii) no se observó complementación cuando se transformaba con el método de acetato de litio (Ito y cols., 1983) o por el método de placa (Elble y cols., 1992). Estos resultados sugirieron que la complementación de la mutación con esta clona implica un evento de recombinación homóloga. Se ha reportado la estimulación de la recombinación por electroporación (Higgins y cols., 1991), este reporte apoya el resultado obtenido de complementación con un fragmento *Hin*dIII que lleva 778 pb del extremo 3', utilizando la

electroporación como método de transformación.

El gene *PMA*1 de *K. lactis* contiene un marco de lectura abierta de 2700 pb incluyendo el codón de terminación, que codifica para una proteína de 899 residuos con un PM~ 100 KDa aproximadamente. El marco de lectura abierta no contiene intrones, la medida del gene es cercana al peso predicho para la proteína (Guerra y cols., 1995); tampoco se han encontrado intrones en sus contrapartes homólogas de *S. cerevisiae, C. albicans, S. pombe, Z. rouxii,* pero sí en el hongo filamentoso *N. crassa* ((Hager y cols., 1986).

Al igual que se ha demostrado para otros hongos incluyendo *S. cerevisiae* (Serrano y cols., 1986), el gene *PMA1* de *K. lactis* mostró ser esencial, la interrupción del gene no produjo esporas viables.

La comparación de la ATPasa de *K. lactis* con otras ATPasas de levadura mostró una alta homología; como se ha demostrado, la alineación de las secuencias es mejor si se eliminan algunos residuos de las porciones N- y C-terminal de las secuencias (Wach y cols,1992). Al alinear el producto del gene de *K. lactis con los de C. albicans, S. cerevisiae y Z. rouxii;*, se encontró 93% de similitud y 85% de identidad; sin embargo, para *S. pombe* se encontró 85% de similitud y 73% de identidad. La identidad promedio de todas estas secuencias fue de 64%, encontrando las principales regiones de diversidad de aminoácidos en el extremo amino terminal, estas observaciones sugieren diferencias en el procesamiento e inserción en la membrana entre cada especie. Por el contrario, la alta similitud sugiere que ambas enzimas tienen estructuras secundarias muy comparables y que el arreglo tridimensional debe ser muy parecido.

En el alineamiento de la Figura 9 se pueden encontrar diferencias interesantes entre las secuencias en la región N-terminal. En esta parte encontramos ausencia de los primeros 15

residuos de la ATPasa de *K. lactis y C. albicans* comparado con *S. cerevisiae y Z. rouxii;* esta ausencia comprende del aminoácido 2 al 17 y elimina una secuencia rica en serina de *S. cerevisiae.* Un segundo fragmento se presenta después de la secuencia rica en serina, y comprende los residuos 34 al 41 de *S. cerevisiae, Z. rouxii y S. pombe.* Esta parte está ausente también en *K. lactis y C. albicans.* Ambas ausencias corresponden a secuencias que no están bien conservadas entre las ATPasas de H^+, y esto sugiere diferente procesamiento de la proteína e inserción en la membrana, este hecho se puede explicar porqué la secuencia no predice un péptido lider para el procesamiento e inserción en la membrana. En el resto de la secuencia hasta el C-terminal es parecida a las otras ATPasas, con algunas excepciones que la hacen particularmente interesante para estudios de mutagénesis como son: un residuo de Ser174 en lugar de Ala, la cual esta presente en todas las ATPasa descritas, este cambio es interesante ya que introduce un residuo polar en lugar de uno hidrofóbico. Se observaron otras diferencias, en particular la Arg734 es prolina en otros hongos, pero en las plantas es lisina, este cambio es interesante ya que la prolina generalmente se encuntra en regiones que desvían una α-hélice y no arginina como se presenta en *K. lactis.*

En una hibridación utilizando el gen *PMA1* de *K. lactis* contra todo el genoma de la levadura se encontró hibridación en una sola banda que corresponde a *PMA1,* lo que nos llevó a suponer la existencia de un solo gene para la ATPasa de membrana plasmática. La presencia de un gene para *PMA1* se ha descrito en *N. crassa, C. albicans y S. rouxii* (Hager y cols., 1986; Watanabe y cols., 1991; Monk y cols., 1991).

La comparación de algunas de las secuencias de las ATPasas de H^+ con algunas secuencias de Na^+-K^+ ATPasas, Ca^{++}ATPasas, H^+-K^+ATPasas muestra gran homología, a pesar de que tienen

capacidades de transporte y especificidad por catión muy diferentes. La región más conservada corresponde al segmento comprendido desde el final del cuarto segmento transmembranal hasta el sitio de la fosforilación. Esto indica que todas estas ATPasas con intermediario fosforilado evolucionaron del mismo ancestro común, del cual evolucionó la capacidad para transportar diferentes iones como Na^+, K^+ y Ca^{2+} (Serrano, 1993)

Al clonar por PCR y secuenciar el gene de la mutante; se encontró un cambio de una metionina a una isoleucina en la posición 669; esta metionina está altamente conservada en todas las ATPasas descritas y se localiza junto a una arginina conservada que es interesante para mutagénesis (Wach y cols,1992), esta metionina se localiza en el segundo dominio hidrofílico grande y es la responsable de la reducción de la actividad de ATPasa. Esta región de la mutación se localiza dentro de la región de unión a ATP y pudiera participar en la reacción de unión e hidrólisis, pero se necesitan realizar experimentos que apoyen esta suposición.

VI. CONCLUSIONES

1.- En este trabajo se reportó una mutante resistente a bromuro de etidio con cambios en el bombeo de protones y en el transporte de potasio. Se encontró que la mutante presentó un defecto en la función de la ATPasa y por esto se encontró cambios en el transporte de potasio

2.- La mutante estudiada 3.3-1b presentó un potencial transmembranal menor en comparación con la cepa silvestre WM37. La mutante colapsó el potecial por la adición de potasio, a un grado menor que la cepa silvestre.

3.- La mutante mostró un tiempo de generación mayor que la cepa silvestre, que fue también causado por la mutación en la ATPasa.

4.- Se clonó el gene que codifica para la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática y este gene es el reponsable de complementación en la mutante.

5.- Se demostró la presencia de un marco de lectura que codifica para una proteína de 899 residuos de aminoácidos, no se encontró intrones a lo largo de la secuencia, y mostró alta similitud con otros genes de ATPasa de membrana plasmática descritos.

6.- El alineamiento de la proteína mostró 93% de similtud y 85% de identidad con las secuencias de las levaduras C. albicans, s. cerevisiae, y Z. rouxii.

7.- Se sugiere la presencia de un solo gene para *PMA1* de *K. lactis,* lo mismo se ha encontrado en la levadura *C. albicans*

8.- Se clonó el gene de la cepa mutante y se encontró un cambio de una base que lleva a la sustitución de M669A, que se localiza en la segunda porción hidrofílica, cercana al quinto segmento transmembranal. Este cambio es el reponsable de la resistencia al bromuro de etidio y a la higromicina

VII. BIBLIOGRAFIA

Addison, R. (1986) Pimary structure of the *Neurospora* plasma membrane H^+-ATPase deduced from the yeast sequence. J. Biol. Chem. **261**, 14896-14901

Armstrong, A. y A. Rothstein (1964) Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effects of pH on uptake. J. Gen. Physiol. **48**, 61-71

Arnold W.N. (1991) Yeast cell envelopes biochemistry, biophysics, and ultrastructure. Vol.1 CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida. P.P. 125

Brandl, C.J; Green, N.M; Korezac, B. y D.H. MacLennan (1986) Two Ca^{2+} ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. Cell **44**, 597-607

Brunner,A., Carrasco,N. y A. Peña (1982) Correlation between resistance to ethidium bromide and changes in monovalent cation uptake in yeast. Arch. Biochem. Biophys. **217**, 30-36

Burks, C.,Fischer, W., Gilna, p., Kelly,M., Kristofferson,D y J. Lawrence (1992) Genebank. Nuc. Acid. Res. Supplement. **20**, 2065-2069

Capieaux, E., Rapin, C., Thines, D., Dupond, Y. y A. Goffeau (1993) Overexpression in *Escherichia coli* and purification of an ATP-binding peptide from the yeast plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol.Chem. **268**, 21895-21900

Celis, E; Mas, J. y 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

Chang, A. y C.W.Slayman (1990) A structural change in the *Neurospora* plasma membrane H^+-ATPase induced by N-Ethylmaleimide J. Biol. Chem. **265**, 15531-15536

Cid, A., Perona, R. y R. Serrano (1987) Replacement of the promotor of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promotor and its physiological consequences. Curr. Genet **12**, 105-110

Conway, E.J. y T.G. Brady (1950) Biological production of acid and alkali. I. Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. Biochem. J. **47**, 360-369

Conway, E.J. y M.Downey (1950) An outer metabolic region of the yeast cell. Biochem. J. **47**, 347-359

Conway, E.J. y E. O'Malley (1946) The nature of the cation exchanges during yeast fermentation with formation of 0.02N-H^+ ion. Biochem. J. **40**,59-67

Crammer, W.A. y D.F. Knaff (1991) En Energy transduction in biological membranes. Springer-Verlag, Amsterdam pp 579

Davis, C y G. Hammes (1989) Topology of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. J. Biol. Chem. **264**, 370-374

Fiske, C.H . y Y. Subarrow (1925) The colorimetric determinantion of phophorus. J. Biol. Chem. **66**, 375-400

Foury, F. y A. Goffeau (1975) Stimulation of active uptake of nucleosides and aminoacids by cAMP in the yeast

Schizosaccharomyces pombe. J. Biol. Chem. **250**, 2354-2362

Gaber, R.F., Styles, A. y G. Fink (1988) *TRK1* Encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *S. cerevisiae*. Moll. Cell. Biol. **8**, 2848-2859

Gaber, R.F; Kielland-Brand, M. y G.R. Fink (1990) *Hol1* Mutations confer novel ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **10**, 643-652

Ghislain, M., Schesser, A. y A. Goffeau (1987) Mutation of a conserved glycine residue modifies the vadate sensitivity of the plasma membrane H^+-ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. **262**, 17549-17555

Goffeau, A. y C.W. Slayman (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal membrane. Biochim. Biophys. Acta **639**, 197-223

Guerra, G., Uribe, S., y J.P. Pardo (1995). Reactivity of the H^+ATPase from *Kluyveromyces lactis* to sulfhydryls reagents. Archieves of Biochemistry and Biophysics **321**, 101-107

Gustin, M.C; Martinac, B; Saimi, Y; Culbertson, M.R. y C. Kung (1986) Ion channels in yeast. Science **233**, 1195-1197

Hager, K., Mandala,S., Davenport,J., Speicher, D., Benz, E. y C.W. Slayman (1986) Aminoacid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: Deduction from genomic and cDNA sequences. Proc. Nat. Acad. Sci. **83**, 7693-7697

Harris,S.,Perlin,D.,Seto-Young,D. y J. Haber (1991). Evidence for coupling between membrane and cytoplasmic domains of the yeast plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol. Chem. **266**, 24439-24445

Harris, S., Na, S., Zhu, X., Seto-Young, D., Perlin, D., Teem, J. y J. Haber (1994) Dominant lethal mutations in the plasma membranes H^+-ATPase gene of *Saccharomycs cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. sci. **91**, 10531-10535

Hennessey, J. y G. Scarborough (1990) Direct evidence for the cytoplasmic location of the NH2- and COOH- terminal ends of the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol. Chem **265**, 532-537

Higgins, R.D. y J.N. Strathern (1991) Electroporation stimulated recombination in yeast. Yeast **7**, 823-831

Ketchum, K.A; Joiner, W.J; Seller, A.J; Kaczmarck, L.K. y A.N. Goldstein (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. Nature. **376**, 690-695

Klein, P., Kanehisa, M. y C. DeLisi (1985) The detection and classification of membrane-spanning proteins. Biochim. Biophys. Acta. **815**, 468-476

Ko, C.H. y R.F. Gaber (1991) *TRK1* and *TRK2* Encodes structurally related K+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **11**, 4266-4273

Koková-Kratochvílová, A. (1990) Yeast and yeast-like organism. VCH Publishers. New York, N.Y. pp 528

Kreger Van Rij, N.J.W. (1984) The yeast, a taxonomic study. Elsevier Science Publishers, Amsterdan pp 1082

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

Ko, C.H. A.M. Buckley, y R.F. Gaber (1990) *TRK2* is required for low-affinity K^+ transport in Saccharomyces

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cerevisiae. Genetics **125**, 305-312

Mahanty, S., Subrahmanyeswara, U., Nicholas,R. y G. G. Scarborough (1994) High yield expression of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomycs cerevisiae*. J. Biol. Chem. **269**, 17705-17712

Manadi, N.D., Malloy, P.J., Rodríguez-Pombo,P., Krishnan,A.V. y D. Feldman (1994) *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. Proc. Natl. Acad. Sci. **91**, 922-926

Malpartida, F. y R. Serrano (1981) Reconstitution of the proton-translocating adenosine thiphosphatase of yeast plasma membranes. J. Biol. Chem. **256**, 4175-4177

Mandala, S. y C.W.Slayman (1989) The amino and carboxyl termini of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase are cytoplasmically located. J. Biol. Chem. 264, 16276-16281

McCusker,J., Perlin, D. y J. Haber. (187) Pleiotropic Plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. Moll. Cell. Biol. **7**,4082-4088

Miranda, M. (1993) Clonación molecular de la H+-ATPasa de Kluyveromyces lactis. Complementación de mutantes resistentes a bromuro de etidio con defectos en el transporte de potasio y en el bombeo de protones. Tesis de Maestria, U.A.C.P. y P. del CCH. UNAM pp 83

Mitchell (1961) Coupling of phosphorilation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature **191**, 144-148

Monk, B.,Kurtz,M., Marrinan, J. y D. Perlin (1991) Cloning and characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Candida albicans*. J. Bacteriol. **173**, 6826-6836

Monk, B.,Feng,W.,Marshall,C.,Seto-Young,D.,Na,S.,Haber,J. y D. Perlin. (1994) Modeling a conformationally sensitive region of the membrane sector of the fungal plasma membrane proton pump. J. Bioenerget.Biomem. **26**, 101-115

Nakamoto, R., Rao, R.y C. Slayman (1989) Transmembrane segments of the P-type Cation-transporting ATPases. Ann. New York acad. Sci. **574**, 165-179

Nakamoto, R., Rao, R. y C.W. Slayman. (1991) Expression of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase in seccretory vesicles. J. Biol. Chem. **266**, 7940-7949

Navarre, C., Ferroud,C., Ghislain, M. y A. Goffeau (1992) A Proteolipid Associated with the plasma membrane H⁺-ATPase of fungi. Ann. New York Acad. Sci. **671**, 189-193

Navarre, C., Guislain, M., Leterme, S., Ferroud, C., Dufour, J. y A. Goffeau. (1992) Purification and complete sequence of a small proteolipid associated with the plasma membrane H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem **267**, 6425-6428

Nelson, N (1992). Organellar proton-ATPases. Cuur. Opin. Cell Biol. **4**, 654-660

Palmgren,M., Sommarin, R., Serrano, R. y C. Larsson (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the *C*-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. J. Biol. Chem. **266**, 20470-20475

Palmgren,M., and G. Christensen (1994) Funtional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. J. Biol. Chem. **269**, 3027-3033

Pedersen, P. y E. Carafoli (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. TIBS **12**, 146-150

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. y M. Tuena (1969) Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta. **180**,1-8

Peña, A., Cinco, G., Gómez-Puyou, A. y M. Tuena (1972) Effect of the pH on the incubation medium on glycolysis and resoiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. **153**, 413-425

Peña, A. (1973) Studies with guanidines on the mechanism of K^+ transport in yeast. FEBS Lett. **34**, 117-119

Peña, A. (1975) Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Arch. Biochem. Biophys. **167**, 397-409

Peña, A. y 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. y N. Carrasco (1979) Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. J. Membrane Biol. **47**, 261-284

Peña, A., Uribe, S., Pardo, P. y M. Borbolla (1984) The use of a cyanine dye in measuring membrane potential in yeast. Arch. Biochem. Biophys. **231**, 217-225

Perlin,D.,Brown,C. y J. Haber. (1988) membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants. J. Biol. Chem. **263**,18118-18122

Perlin,D., Harris,S.,Seto-Young,D. y J. Haber. (1989) Defective H+-ATPase of Hygromyceine B-resistant *pma1* mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **264**, 21857-21864

Portillo, F. y R. Serrano (1988) Dissection of funtional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. **7**, 1793-1798

Portillo, F. y R. Serrano (1989) Growth control strength and active site of yeast plasma membrane ATPase studied by site-directed mutagenesis. Eur. J. Biochem. **186**, 501-507

Portillo, F., Larrinoa, I. y R. Serrano (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H^+-ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. FEBS Lett. **247**, 381-385

Portillo, F., Eraso, P. y R. Serrano (1991). Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H^+-ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. FEBS Lett. **287**, 71-74

Ramos, J., Haro, R. y A. Rodríguez-Navarro (1990) Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. **1029**, 211-217

Rao,R., Nakamoto,R., Verjovski-Almeida,S. y C. Slayman (1992) Structure and funtion of the yeast plasma membrane H^+-ATPase. Ann. New York Acad. Sci. **671**, 195-203

Rao, R. y C.W. Slayman (1992) Mutagenesis of the yeast plasma membrane H^+-ATPase. A novel expression system. Biophys. J. **62**, 228-237

Rodríguez-Navarro, A. y J. Ramos (1984) Dual system for potassium transport in Saccharomyces cerevisiae. J.

Bacteriol. **159**, 940-945

Roon,.R.,Larimore,F.,Meyer,G. y R.Kreisle. (1978) Characterization of a *Dio-9* resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. **185**,142-150

Rose, A.H. y J.S. Harrison (1969) The yeast. Biology of yeasts. Vol1. 1ª Edn. Academic Press, USA. P.P. 508

Rose,A.H. y J.S Harrison (1987) The yeast. Biology of yeasts Vol. 1. 2ª Edn. Academic Press, USA. pp 423

Rose, M.D. y J.R. Broach (1992) Cloning genes by complementation in yeast. Methods Enzymol. **207**, 195-229

Rothstein, A. y L. Enns (1946) J. Cell. Comp. Physiol. **28**, 231-252

Sambroook, J., Fritsh, E.F. y T. Maniatis (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger, F., Nicklen, S. y A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**, 5463-5467

Schatz, G. (1965) Subcellular particles carrying mitochondrial enzymes in anaerobically grown cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta **96**, 342-345

Serrano, R., Kielland-Brant, M. y G. Fink (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+ + K^+), K^+ and Ca^{2+}-ATPases. Nature **319**, 689-693

Serrano, R. (1988) Structure and funtion of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. Biochim. Biophys. Acta **947**, 1-28

Serrano, R. (1991) Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. In the molecular and cellular physiology of the yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Proton Synthesis and energetics. Cold Spring harbor laboratory press, N.Y. pp 523-585

Serrano, R. y F. Portillo (1990) Catalytic and regulatory sites of yeast plasma membrane H^+-ATPase studied by directed mutagenesis. Biochim. Biophys. Acta **1018**, 195-199

Serrano, R., Montesinos, C., Roldán, M., Garrido, G., Ferguson, C., Leonard, K., Monk, B., Perlin, D. y E. Weiler (1991) Domains of yeast plasma membrane and ATPase-associated grycoprotein. Biochim. Biophys. Acta. **1062**, 157-164

Serrano, R. (1993) Structure, funtion and regulation of plasma membrane H^+-ATPase. FEBS lett. **325**, 108-11

Sharf, S.J. (1990) Cloning with PCR. In PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic press, Inc. San Diego, Cal. P.P 84-91

Sherman, F., G.F. Fink and J. Hicks (1986) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Slayman, C.L. (1965) Electric properties of *Neurospora crassa*. Effects of external cations on the intracellular potential. J. Gen. Physiol. **49**, 69-92

Slayman, C. W. y C.L. Slayman (1970) Potassium transport in *Neurospora*. Evidence for a multisite carrier at high pH. J. Gen. Physiol. **55**, 758-786

Slayman, C.L., Long, W.S. y C.Y. Lu (1973) The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*. J. Membrane Biol **14**, 305-338

Slonimski, P., Perrodin, G. y J. Croft (1968) Ethidium bromide induced mutation of yeast mithocondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". Biochem. Biophys. Res. Comm. **30**, 232-239

Smith, D., Tao, T., y M. Maguire (1993) Membrane topology of a P-type ATPase. The MgtB magnesium transport protein of Salmonella thyphimurium. J. Biol. Chem. 268, 22469-22479

Sor, F. y H. Fukuhara (1989) Analysis of chromosomal DNA pattern of the genus *Kluyveromyces*. Yeast. **5**, 1-10

Subrahmanyeswara Rao, U., Hennessey, J. y G. scarborough (1991) Identification of the membrane-embedded regions of the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol. Chem. **266**, 14740-14746

Supply, P. Wach,A. y A. Goffeau (1993) Enzymatic propeties of the *PMA2* plasma membrane-bound H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **268**, 19753-19759

Sussman, M.R., Strickler, J.E., Hager, K.M. y C.W. Slayman (1987) Location of a Dicyclohexilcarbodimide-reactive Glutamate residue in the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol. Chem. **262**, 4569-4573

Stokes, D., Taylor, W., y M. Green (1994) Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps. FEBS Letters 346, 32-38

Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J. y V. Massey (1993) Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. J. Biol. chem. **268**, 6097-6106

Toyoshima, C., Sasabe, H. y L. Stokes (1993) Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. Nature **362**, 469-471

Ulaszewski,S., Grenson, M. y A. Goffeau (1983) Modified plasma membrane ATPase in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. **130**, 235-239

Ulaszewski,S.,Van Herck,J., Dufour,J., Kulpa,J., Nieuwenhuis,B y A. Goffeau. (1987) A single mutation confers vanadate resistance to the plasma membrane H^+-ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. **262**, 223-228

Ulaszewski,S., Coddington,A. y A. Goffeau (1986). A new mutation for multiple drug resistance and modified plasma membrane ATPase activity in *Schizosaccaromyces pombe*. Curr. Genet. **10**, 359-364

Vallejo, C. and R. Serrano (1989) Physiology of Mutants with reduced expression of plasma membrane H^+-ATPase. Yeast. **5**, 307-319

Van Der Walt (1987) The yeast-A conspectus. In The expanding realm of yeast like Fungi. Elsevier Science Publishers, Amsterdan. pp 19-31

Van Dyck,L., Petretski,J., Wolosker,H., Rodrigues,G., Schlesser,A., Ghislain,M. y A. Goffeau (1990) Molecular and Biochemical characterization of the Dio-9 resistant *pma1-1* mutation of the H^+-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*.

Eur. J. Biochem. **194**, 785-790

Vidal, M; Buckley, A.M; Hilger, M. y R.F. Gaber (1990) Direct selection for mutants with increased K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. **125**, 313-320

Villalba, J., Palmgren,M., Berberián,G., Ferguson, C. y R. Serrano. (1992). Funtional expression of plant plasma membrane H^+-ATPase in yeast endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. **267**, 12341-123491

Wach,A., Schlesser, A y A. Goffeau (1992) An alignment of 17 deduced proteins sequences from plant, fungi, and ciliate H^+-ATPase genes. J. Bioenerg. Biomembr. **24**,309-317

Watanabe, Y., Shiramizu, M. y Y. Tamai (1991) Molecular cloning and sequencing of plasma membrane H^+-ATPase gene from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. J. Biochem. **110**, 237-240

Watanabe, Y., Sanemitsu, Y. y Y. Tamai (1993) Expression of plasma membrane proton-ATPase gene in salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxi* is induced by sodium chloride. FEMS Microbiol. Lett. **114**, 105-108

Wesolowski-Louvel, M. y H. Fukuhara (1995) A map of the *Kluyveromyces lactis* genome. Yeast **11**, 211-218

Young, R. A. y R.W. Davis (1992) Gene isolation with λgt11 system. Methods Enzymol. **207**, 230-239

Zhang, T.G., Fan, J., Ringquist,S., Smith, C.L. y C.R. Cantor (1993) The 0.7 to 3.3 Megabase chromosomes from *Candida, Kluyveromyces* and *Pichia* provide accurate size standards for pulse field gel electrophoresis. Electrophoresis **14**, 290-295

APENDICE

A. Clonación de la enzima amarilla de *K. lactis*

La clona aislada con el fragmento de 6.6 kb que complementó a la mutante 3.31b mostró un ORF2 con 84% de similitud con la enzima amarilla de Warburg, dependiente de NADPH, de *S. cerevisiae*; la posición y el mapa de este gene se describen en la Figura 1. Este ORF2 comprende 1197 pb. y codifica para una proteína de 398 aminoácidos (Figura 2).

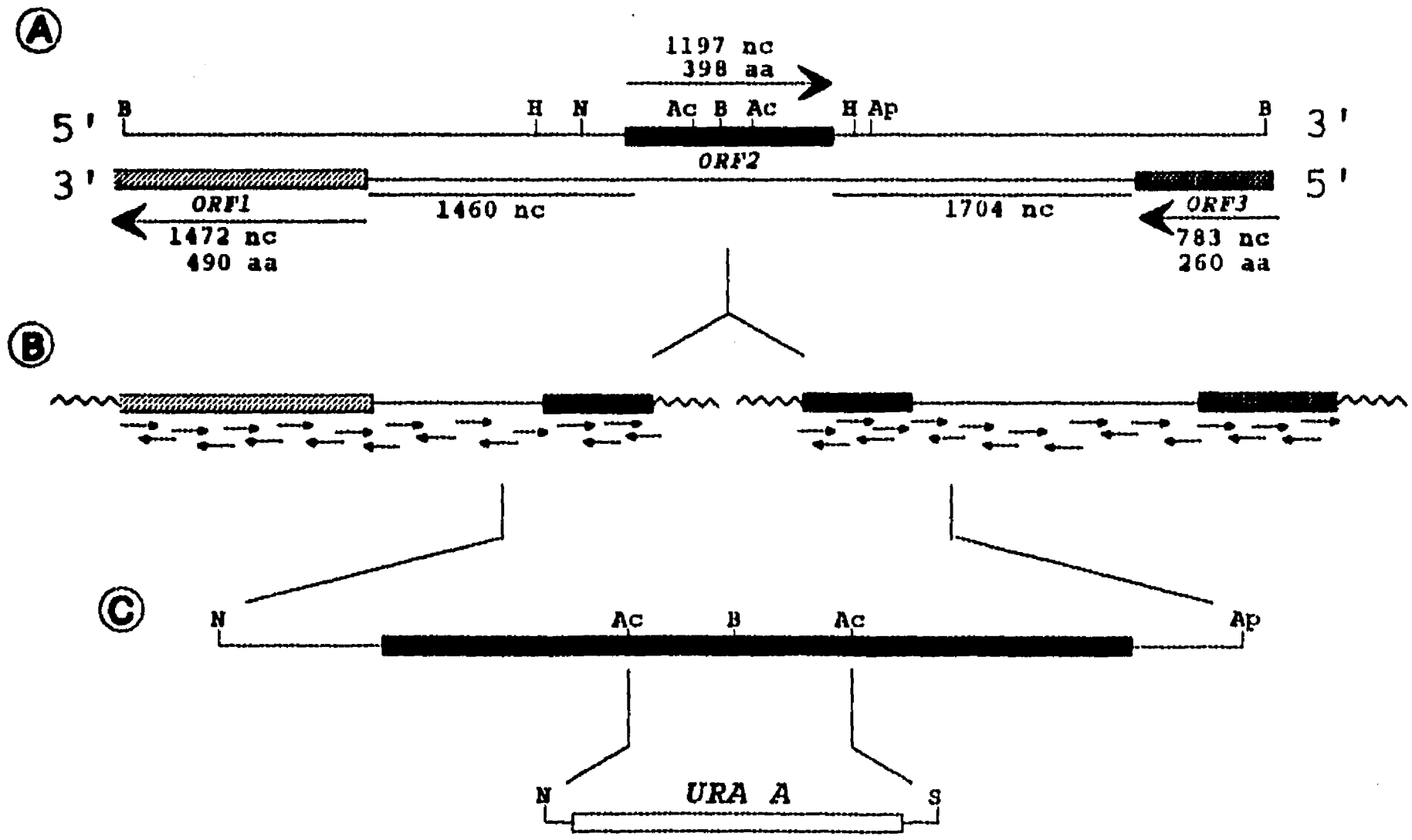


Figura 1. (A) Mapa físico de la clona e 6.6 kb que muestra los 3 marcos de lectura encontrados. Las flechas indican la dirección de la transcripción, también se indican la longitud de cada marco de lectura y las distancias intergénicas, asi como el número de aminoácidos codificado. (B) Subclonas en el plásmido *pTZ 18R* y estrategia de secuenciación. Las flechas indican la dirección y posición de los oligonucleótidos. Ambas cadenas de DNA se secuenciaron completamente por extensión con oligonucleótidos. (C) Construcción de *KYE1* con el gen *UraA* para la interrupción del gene. El fragmento lineal *Nde*I-*Apa*I se usó para transformar levaduras. Se indican los sitios de restricción más relevantes: B, *Bam*HI; H, *Hin*dIII; N, *Nde*I; Ac, *Acc*I; Ap, *Apa*lI.

GGATACTGTGTATTAATAATGGTAATGTCGGTAAAATTGGAAAGGGACTTCG

GGTAAGGATATATAAAAGGAGGCCCCAATTTGTACCAGAGATGGATTTTGTCTCATGGGTAAAGCCATTGTCTCATTGT
CTAATTGTCTAATTGTCCCTTATTTAGCTTAAGAAAAGTACGCACACTAACAAGTAAACCAAATCAAATCGCATACGCA
ATG TCG TTT ATG AAC TTT GAA CCA AAG CCA TTG GCT GAT ACT GAT ATC TTC AAA CCA ATC
Met Ser Phe Met Asn Phe Glu Pro Lys Pro Leu Ala Asp Thr Asp Ile Phe Lys Pro Ile

AAG ATT GGT AAC ACT GAA TTG AAG CAC AGG GTT GTC ATG CCT GCA TTG ACA AGA ATG AGA
Lys Ile Gly Asn Thr Glu Leu Lys His Arg Val Val Met Pro Ala Leu Thr Arg Met Arg

GCG TTG CAT CCA GGC AAC GTT CCA AAC CCT GAC TGG GCT GTT GAA TAT TAC AGA CAA CGT
Ala Leu His Pro Gly Asn Val Pro Asn Pro Asp Trp Ala Val Glu Tyr Tyr Arg Gln Arg

TCC CAA TAT CCA GGT ACT ATG ATT ATC ACT GAA GGT GCT TTC CCA TCA GCT CAG TCA GGT
Ser Gln Tyr Pro Gly Thr Met Ile Ile Thr Glu Gly Ala Phe Pro Ser Ala Gln Ser Gly

GGT TAC GAT AAC GCA CCA GGT GTT TGG AGC GAA GAA CAA CTG GCT CAA TGG AGA AAG ATC
Gly Tyr Asp Asn Ala Pro Gly Val Trp Ser Glu Glu Gln Leu Ala Gln Trp Arg Lys Ile

TTC AAG GCA ATT CAC GAC AAC AAG TCT TTT GTT TGG GTA CAA TTG TGG GTT CTA GGT AGA
Phe Lys Ala Ile His Asp Asn Lys Ser Phe Val Trp Val Gln Leu Trp Val Leu Gly Arg

CAA GCT TTT GCT GAT AAC TTG GCA AGA GAT GGA TTG CGT TAT GAT AGT GCT TCC GAT GAA
Gln Ala Phe Ala Asp Asn Leu Ala Arg Asp Gly Leu Arg Tyr Asp Ser Ala Ser Asp Glu

GTG TAC ATG GGT GAA GAT GAA AAG GAA CGT GCC ATC AGA TCT AAC AAC CCT CAG CAT GGT
Val Tyr Met Gly Glu Asp Glu Lys Glu Arg Ala Ile Arg Ser Asn Asn Pro Gln His Gly

ATC ACC AAG GAT GAA ATT AAG CAG TAT ATC AGG GAC TAT GTT GAT GCT GCT AAG AAG TGT
Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Ile Arg Asp Tyr Val Asp Ala Ala Lys Lys Cys

ATC GAT GCT GGT GCA GAT GGT GTT GAA ATC CAT TCC GCT AAC GGT TAT TTG TTG AAT CAA
Ile Asp Ala Gly Ala Asp Gly Val Glu Ile His Ser Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asn Gln

TTC CTA GAC CCA ATC TCC AAC AAA AGA ACT GAT GAA TAC GGT GGA TCC ATT GAG AAC CGT
Phe Leu Asp Pro Ile Ser Asn Lys Arg Thr Asp Glu Tyr Gly Gly Ser Ile Glu Asn Arg

GCT AGA TTC GTC TTG GAA GTC GTC GAT GCC GTT GTC GAT GCC GTT GGT GCC GAA AGA ACC
Ala Arg Phe Val Leu Glu Val Val Asp Ala Val Val Asp Ala Val Gly Ala Glu Arg Thr

AGT ATC AGA TTC TCA CCA TAC GGT GTA TTT GGT ACC ATG TCA GGT GTT TCA GAC CCT GTC
Ser Ile Arg Phe Ser Pro Tyr Gly Val Phe Gly Thr Met Ser Gly Gly Ser Asp Pro Val

TTG GTG GCT CAA TTC GCC TAT GTA CTT GCT GAA TTG GAA AAG AGG GCA AAG GCT GGT AAG
Leu Val Ala Gln Phe Ala Tyr Val Leu Ala Glu Leu Glu Lys Arg Ala Lys Ala Gly Lys

AGA TTA GCA TAC GTC GAT TTA GTC GAA CCT CGT GTC ACA TCG CCA TTC CAA CCG GAA TTT
Arg Leu Ala Tyr Val Asp Leu Val Glu Pro Arg Val Thr Ser Pro Phe Gln Pro Glu Phe

GAA GGC TGG TAT AAA GGT GGT ACC AAT GAA TTC GTA TAC TCT GTT TGG AAG GGT AAC GTG
Glu Gly Trp Tyr Lys Gly Gly Thr Asn Glu Phe Val Tyr Ser Val Trp Lys Gly Asn Val

CTA AGA GTT GGT AAC TAC GCT TTG GAC CCA GAT GCT GCC ATT ACG GAC TCA AAG AAT CCA
Leu Arg Val Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Pro Asp Ala Ala Ile Thr Asp Ser Lys Asn Pro

AAC ACT TTG ATC GGT TAC GGT AGA GCC TTC ATT GCC AAC CCA GAT CTT GTT GAA CGT CTC
Asn Thr Leu Ile Gly Tyr Gly Arg Ala Phe Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Leu

GAA AAG GGT TTG CCA TTG AAT CAA TAC GAT AGA CCC TCT TTC TAC AAA ATG TCT GCG GAA
Glu Lys Gly Leu Pro Leu Asn Gln Tyr Asp Arg Pro Ser Phe Tyr Lys Met Ser Ala Glu

GGG TAT ATC GAC TAC CCA ACA TAC GAG GAA GCT GTT GCC AAG GGT TAC AAG AAA TAG ACT
Gly Tyr Ile Asp Tyr Pro Thr Tyr Glu Glu Ala Val Ala Lys Gly Tyr Lys Lys ***

GGGACATCTTCAAAGGGGAAGCTCGCAAATTTATGTTAACGACAATATCTATATACATGGAAATTTATGCACAGAAACA
GTACTTATATATACTTACTGATACAAGCTTAAAAGATATAATGGTTTTTTTTCAATGAAACAATATAGAGAAACGAATAA
CAAACAGTTTAAGTGAGAGTGTGCAC

Figura 2. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de la enzima amarilla de *Kluyveromyces lactis*. La secuencia que se muestra corresponde a el fragmento *Nde*I-*Apa*I indicado en la figura anterior

FALLA DE ORIGEN

En una comparación con el banco de datos de este ORF se identificaron secuencias con alta homología, entre ellas están *OYE1* de *S. carlsbergensis* (Saito y cols, 1991) y *OYE2* de *S. cerevisiae* (Stott y cols., 1993); se encontró 71% de identidad entre las secuencias de nucleótidos, además 71% y 85% de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos respectivamente (Figura 3A).

La secuencia deducida de aminoácidos mostró ser 2 aminoácidos más corta que *OYE1* y *OYE2*, un aminoácido ausente en el lado amino terminal y otro en el carboxilo terminal; este gene fue designado *KYE1* (*Kluyveromyces* yellow enzyme). Un alineamiento más detallado de las 3 secuencias de aminoácidos reveló una región entre los residuos 156-235 con una similitud de hasta 92%; una comparación de esta región con el banco de datos mostró 66% de similitud con la NADH oxidasa de *Thermoanaerobium brockii,* 67% de similitud con la deshidrogenasa de trimetilamina de *Methylotrophus methylophilus* y 77% con la proteína de unión a estrógenos de *C. albicans* (Madani y cols., 1994). Una comparación de *KYE1* con la proteína completa de unión a estrógenos de *C. albicans* (*EBP1*) mostró 65% de similitud y 45% de identidad (Figura 3B). Se ha demostrado también que *EBP1* exhibe actividad de oxidoreductasa además de su capacidad para unir estrógenos (Manadi y cols., 1994). Se ha sugerido que esta enzima *OYE1* pudiera participar en el metabolismo de los esteroles (Stott y cols., 1993).

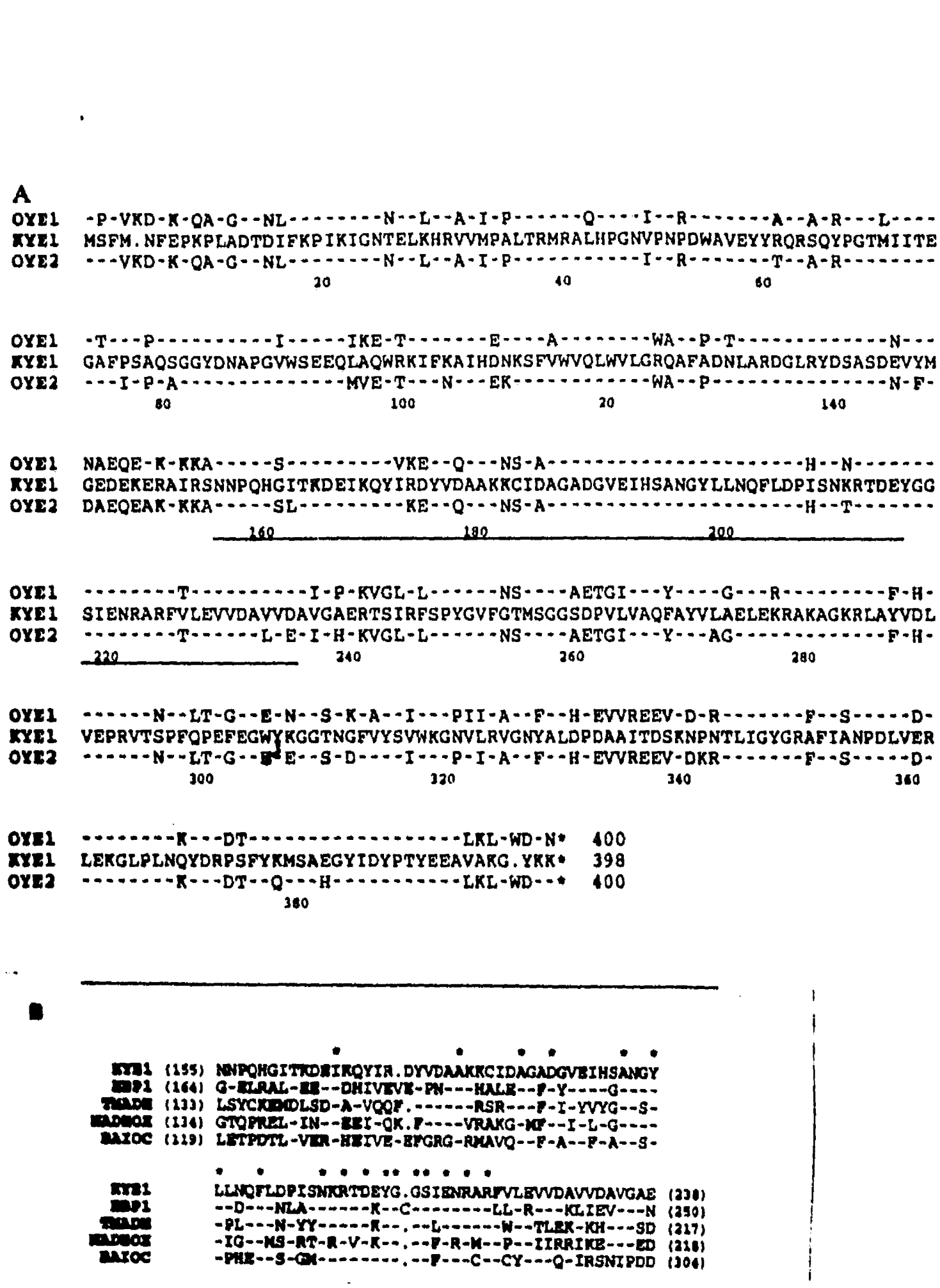


Figura 3. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *KYE*1 de *Kluyveromyces lactis* con la enzima amarilla de *S. carlsbergensis* (*OYE*1) y *S. cerevisiae* (*OYE2*). La secuencia de *K. lactis* se enlista en su longitud total, y se representa en el codigo de una letra. Las lineas y puntos representan identidades y aminoácidos ausentes respectivamente. La región que muestra la similtud más alta se representa con una linea. (B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región de *KYE*1 que muestra alta similitud con otras flavoproteínas. La región de *KYE*1 se comparó con la proteína de unión a estrógenos de *C. albicans* (*EBP1*), la deshidrogenasa de trimetilamina de la bacteria W_3A_1 (TMADH), la NADH oxidasa de *Thermoanaerobium brockii* (NADHOX), y un polipéptido codificado por el gen C del operón inducido por ácido biliar de *Eubacterium sp.* (BAIOC). Los asteriscos representan aminoácidos conservados en todas las proteínas

B. INTERRUPCION DE *KYE1* Y CARACTERIZACION DE LA MUTANTE

La interrupción se realizó cortando el gene *KYE1* con *Acc*I y generando extremos romos con fragmento "Klenow"; en este sitio se introdujo un fragmento *Nde*I-*Sma*I de 0.9 kb que lleva el marcador *UraA*; esta construcción se digirió con *Nde*I-*Apa*I y se obtuvo un fragmento de 1.7 kb que lleva el gene *KYE1* interrumpido con el marcador *UraA*. Este fragmento se purificó y usó para transformar diploides silvestres *uraA/uraA*. Los diploides heterocigóticos *KYE1/kye1::UraA* se esporularon y se disecaron las esporas de las tétradas; las 4 esporas separadas de cada asca fueron viables, indicando que *KYE1* no es esencial para el crecimiento celular. La cepa mutante presentó un tiempo de generación de 3.6 h. en compración con 2.4 para la cepa silvestre.

La actividad de la enzima en la cepa silvestre *KYE1* y mutante Δ*KYE1* se midió en el extracto celular usando citocromo *c* como aceptor de electrones y midiendo la velocidad de reducción en presencia de menadiona y NADPH como donador de electrones (Figura 4). La actividad de NADPH oxidasa en el extracto de la mutante disminuyó aproximadamente a la tercera parte (23 nmol/min/mg) cuando se comparó con la cepa silvestre (92 nmol/min/mg).

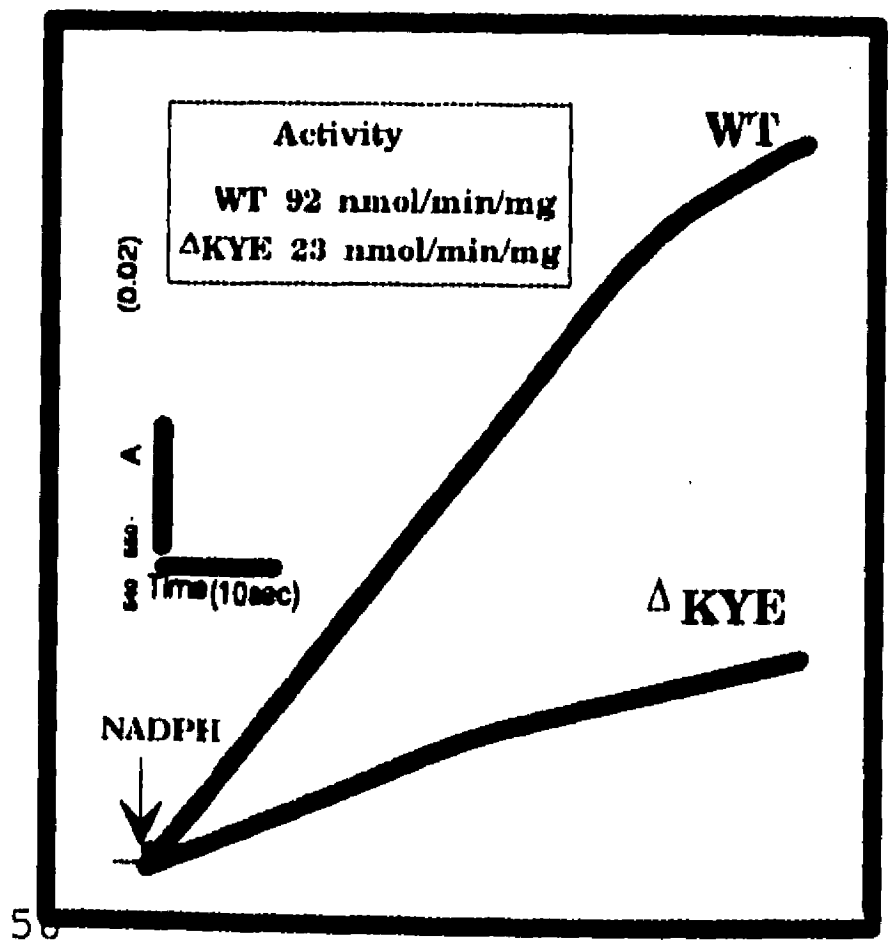


Figura 4. Reducción de citocromo c usando NADPH como donador en la presencia de menadiona, la reacción se realizó utilizando un extracto crudo de la cepa silvestre (*WT*) y mutante interrumpida (Δ*KYE*1). La actividad de la enzima amarilla se muestra en el recuadro interno. Las concentraciones que se usaron fueron: NADPH 40 µM, Citocromo c 20 µM, Menadiona 20 µM, y 1 mg de proteína total en un volúmen final de 2.5 ml de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0.

C. LOCALIZACION CROMOSOMAL DEL GENE *KYE1*

Se prepararon muestras de DNA de la cepa WM37, con modificaciones del método reportado por Sor y Fukuhara (1989); los cromosomas se separaron por electroforesis en campo pulsado (CHEF) y se resolvieron 6 bandas, correspondiendo a los cromosomas de la cepa WM37 y a los reportados previamente para la cepa CBS 2360 (Sor y Fukuhara, 1989). Los cromosomas se transfirieron a una membrana de Nylon, se inmovilizaron e hibridaron con un fragmento *Hin*cII-*Hin*cII que lleva el gene completo de *KYE1*. Se identificó una señal positiva en la banda que corresponde al cromosoma II, de acuerdo a la nomenclatura usada por Wesolowski y Fukuhara (1995). El tamaño de este cromosoma se ha estimado en aproximadamente 1.3 Mpb (Figura 5).

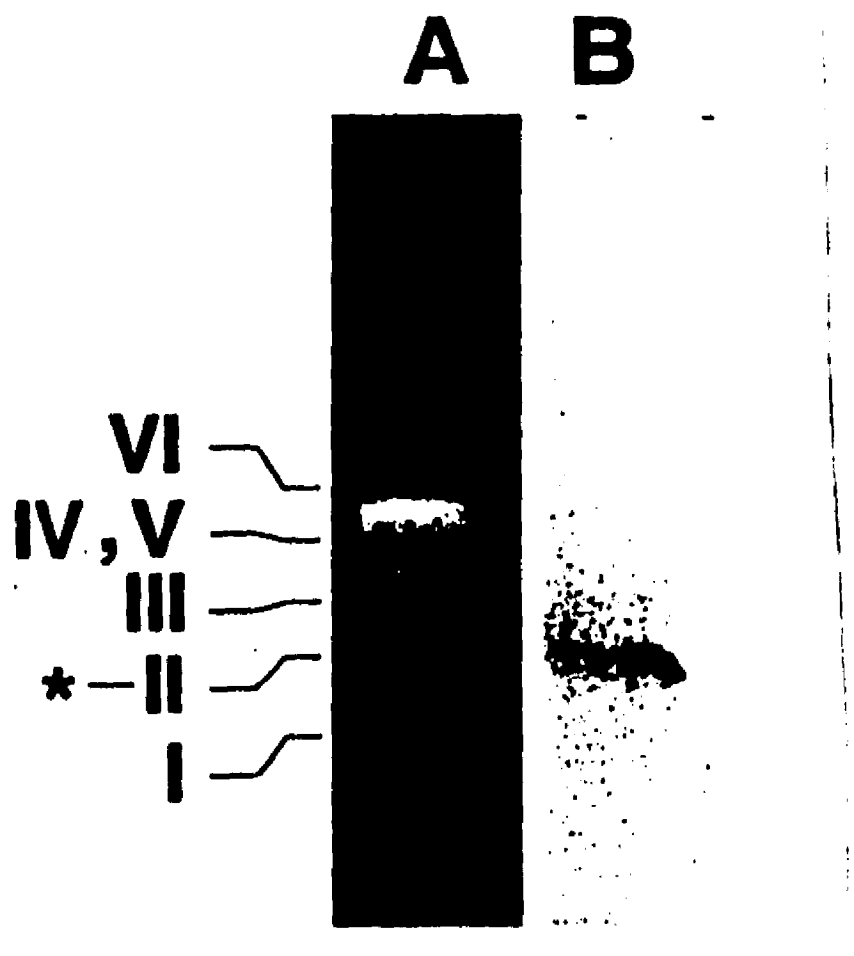


Figura 5. (A) Patrón de cromosomas de la cepa WM37 de K. lactis obtenidos por electroforesis en campo pulsado y teñidos con bromuro de etidio. (B) Autoradiografía de un blot mostrando hibridación con el cromosoma, se utilizó el gene *KYE*1 marcado con ^{32}P.

DISCUSION

La clona de DNA genómico de 6.6 Kb que complementó a la mutante mostró un solo marco de lectura completo que codifica para *KYE1* (Kluyveromyces Yellow Enzyme). La comparación de este producto con la base de datos reveló alta similitud (85% en aminoácidos) con la enzima amarilla de *S. cerevisiae* (*OYE2*) y de *S. carlbergensis* (*OYE1*). Una región de la secuencia (156-235) presentó alta similitud con proteínas como: una NADH oxidasa, una deshidrogenasa de trimetilamina y una proteína de unión a estrógenos de *C. albicans;* esta última proteína exhibe actividad de óxido-reductasa, además de unir estrógenos. Estos datos sugieren que *KYE1 y OYE1* pueden tener un papel importante en las reaciones de transferencia de electrones; por un lado se sabe que *OYE1* interactúa con componentes fenólicos y se ha creído que esta enzima participa en el metabolismo del esterol (Stott y cols., 1993).

La interrupción del gene *KYE1* no fue esencial para el crecimiento, lo cual sugiere la presencia de otras oxidasa dependientes de NADPH, al igual que se presenta en *S. cerevisiae* o que la actividad no es indispensable. La actividad de NADPH oxidasa en la mutante disminuyó a 1/3 con respecto a la silvestre; esta actividad remanente puede indicar también la presencia de otra oxidasa. Esta oxidasa deberá tener una secuencia poco parecida a *KYE1*, ya que ante la hibridación del DNA genómico utilizando como sonda *KYE1,* no se detectaron secuencias que pudieran mostrar hibridación. En conclusión, se ha clonado un gene *KYE1* con actividad de oxidasa, pero el papel fisiológico de esta enzima es aún desconocido y resta hacer un estudio cuidadoso sobre la posible

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 1995, p. 2360–2367
0021-9193/95/$04.00+0
Copyright © 1995, American Society for Microbiology
Vol. 177, No. 9

Molecular Cloning of the Plasma Membrane H^+-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a Single Nucleotide Substitution in the Gene Confers Ethidium Bromide Resistance and Deficiency in K^+ Uptake

MANUEL MIRANDA, JORGE RAMÍREZ, ANTONIO PEÑA, AND ROBERTO CORIA*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

Received 8 December 1994/Accepted 17 February 1995

A *Kluyveromyces lactis* strain resistant to ethidium bromide and deficient in potassium uptake was isolated. Studies on the proton-pumping activity of the mutant strain showed that a decreased H^+-ATPase specific activity was responsible for the observed phenotypes. The putative *K. lactis PMA1* gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase was cloned by its ability to relieve the potassium transport defect of this mutant and by reversing its resistance to ethidium bromide. Its deduced amino acid sequence predicts a protein 899 residues long that is structurally colinear in its full length to H^+-ATPases cloned from different yeasts, except for the presence of a variable N-terminal domain. By PCR-mediated amplification, we identified a transition from G to A that rendered the substitution of the fully conserved methionine at position 699 by isoleucine. We attribute to this amino acid change the low capacity of the mutant H^+-ATPase to pump out protons.

It has been shown that the addition of potassium ions to a yeast cell suspension produces an immediate decrease in the levels of ATP and an increase in ADP and P_i (20). These changes, which can be also produced by an increase of the medium pH (21), were later postulated to be due to an increased activity of a membrane H^+-ATPase which was activated by high pH or also by potassium ions when the medium pH was low. Further studies proved this hypothesis to be true (19) and valid also for many other fungi and other systems (11). Studies of this system allowed for the first time the cloning and sequencing of the gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* (33). This gene was found to be essential for the cell, underscoring its central role in the transport systems in yeast cells. The genes encoding several other ATPases have been sequenced since then, revealing an extensive amino acid conservation and suggesting that they share a common general structure and topology (reviewed in reference 38).

Yeast plasma membrane H^+-ATPases are molecules with M_rs of approximately 100,000 belonging to the extended family of the P-type ATPases that mediate cation transport (reviewed in reference 9). Biochemical and physiological studies of the ATPases from *Schizosaccharomyces pombe* and *S. cerevisiae* have established the electrogenic H^+-pumping capacity of the reconstituted enzymes and the similarity in mechanisms with the mammalian Ca^{2+}- and Na^+/K^+-ATPases (6, 8, 16, 17).

Since this ATPase is responsible for the generation of a membrane electrochemical potential which drives potassium transport in yeast cells, studies to produce yeast mutants deficient in the transport of this ion were initiated several years ago; the first mutants of this kind were obtained from *Kluyveromyces lactis* which were both resistant to ethidium bromide (EB) and deficient in potassium transport (2). Two kinds of mutants can be produced: those with a normal proton-pumping activity and deficient only in potassium transport (29), one of which allowed the cloning and sequencing of the first yeast potassium transporter (10); and those with a decreased proton-pumping activity, presumably responsible for the deficient potassium uptake activity. This paper reports the use of the second kind of mutants to clone and sequence the gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase of *K. lactis*. To obtain mutants, we took advantage of the fact that EB and K^+ seem to be taken up by similar mechanisms requiring a membrane potential difference, generated by the plasma membrane H^+-ATPase, and that they behave as competitors for the same carrier (23).

MATERIALS AND METHODS

Media, strains, and plasmids. YPD and YPG media contained 1% yeast extract, 1% Bacto Peptone, and 2% glucose (YPD) or 2% glycerol (YPG). YPG medium containing 10, 15, or 20 μM EB was used to select for spontaneous EB-resistant mutants. SD medium contained 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco), 2% glucose, and 25 μg of the required amino acids per ml. LSK medium (low-potassium-containing medium) was as described previously (10). LB medium supplemented with ampicillin (50 μg/ml) and/or tetracycline (30 μg/ml) was used to grow recombinant bacteria. *K. lactis* strains used in this study were WM27 (*Mat*α *lisA*), WM37 (*Mat*a *hisA*), and MD2/1 (*Mat*α *uraA lisA argA*) (kindly provided by H. Fukuhara). *Escherichia coli* NM522 (Pharmacia) was used to propagate plasmids and to produce single-stranded DNA for sequencing. Shuttle vector KEp6, obtained from H. Fukuhara, was use to prepare a genomic *K. lactis* DNA library. Phagemid pTZ18R (Pharmacia) was used to subclone DNA fragments for sequencing.

Isolation of spontaneous EB-resistant mutants. Yeast cells (10^8) were spread on YPG medium plates containing 10, 15, and 20 μM EB and incubated at 30°C for 5 to 7 days. Colonies growing in these media were purified on YPD medium and then retested for resistance to the drug.

K^+ uptake assays, Rb^+ transport, H^+-pumping activity. Yeast cells were grown until early stationary phase in YPD medium (or SD medium plus the required amino acids for cells carrying plasmids). Cells were harvested by centrifugation and washed twice with distilled water. The final pellet was suspended in water and aerated for 4 h at 30°C. After aeration, the cells were collected, washed twice, and resuspended in water at a final concentration of 0.5 g of cells per ml. K^+ uptake, Rb^+ transport, and H^+-pumping activity were examined as described previously (24).

PCR amplification. Total DNA from wild-type and mutant strains was used as

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F., Mexico. Phone: (525) 622 56 52. Fax: (525) 622 56 30. Electronic mail address: rcoria@ifcsun1.ifisiol.unam.mx.

FALLA DE ORIGEN

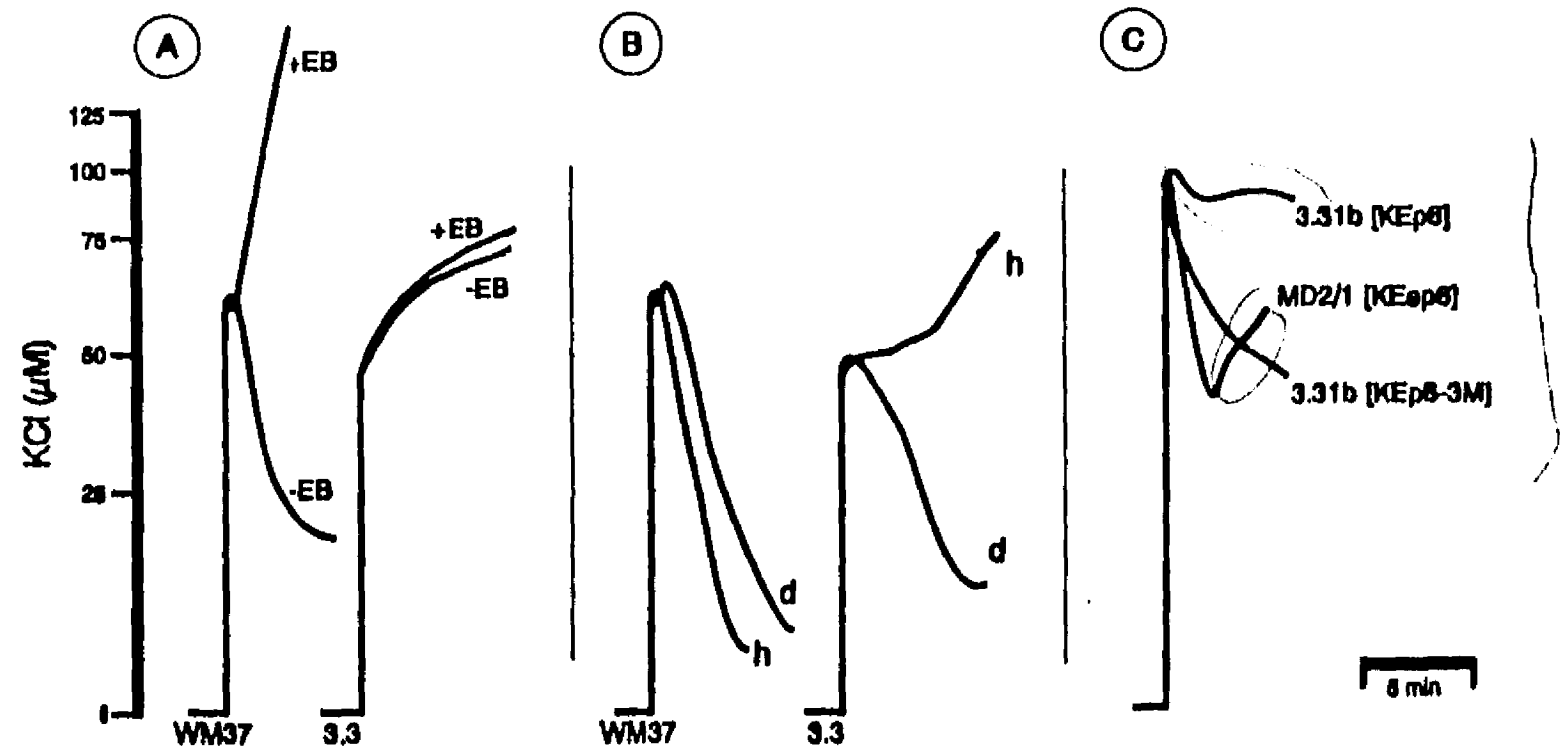


FIG. 1. Movements of potassium in haploids, diploids, and cured strains. Yeast cells were grown in YPD medium as described in Materials and Methods. Incubation was carried out in 4 mM morpholineethanesulfonic acid (MES)-triethanolamine (TEA) buffer (pH 6.0) with 5 mM glucose in a final volume of 10 ml under continuous stirring. Tracings were started by the addition of 50 μl (25 mg [wet weight]) of yeast suspension. (A) K^+ transport in the wild type (WM37) and the *ktr* EB^r mutant (3.3) in the presence or absence of 25 μM EB. (B) K^+ transport in homozygotic (WM37) and heterozygotic (3.3) diploids (d) and their haploid counterparts (h). (C) K^+ transport in the wild type (MD2/1) and the mutant (3.31b segregant) and its complemented version. Cells harboring the indicated plasmids were grown in selective medium.

the template for amplification by PCR using the deoxyoligonucleotides indicated in Fig. 3. Two independent PCR products from each template were blunt-end ligated into *Sma*I-digested phagemid pTZ18R and sequenced fully.

Miscellaneous. Yeast transformation was carried out by electroporation as described previously (1). When indicated, yeast transformation was also done by the alkali cation method (14) or by the plate method (7). Molecular biology procedures were performed as described previously (31). Sequencing was done by primer extension using the dideoxy-chain termination reaction (32). Standard yeast genetics procedures were done as described elsewhere (34). Deoxyoligonucleotides for PCR and sequencing were synthesized in an Applied Biosystems model 381-A DNA synthesizer at the molecular biology facilities of the Instituto de Fisiología Celular.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *K. lactis PMA1* gene has been submitted to GenBank and will appear under accession number L37875.

RESULTS

By growing strains WM27 and WM37 in media containing 20 μM EB, 200 spontaneous resistant mutants were obtained. From these, 44 were selected by their inability to grow in LSK medium supplemented with 1 mM potassium. Mutants showed good growth in YPG medium with 10, 15, and 20 μM EB and a requirement for at least 10 mM K^+.

After these mutants were retested several times in EB and LSK media, five showed a decreased potassium transport ability. One of them, mutant 3.3 (derived from strain WM37), was selected for further study because it maintained the inability to grow in low-potassium medium and, as shown in Fig. 1A, showed a decreased potassium transport capacity (*ktr*) and was resistant to EB.

Mutant 3.3 was genetically analyzed to test whether the mutation was chromosomal and monogenic. Strains MD2/1 (*Matα lisA argA uraA*) and 3.3 (*Mata hisA ktr*) were crossed to obtain the heterozygotic diploid (*ktr* EB^r/*KTR* EB^s), which was compared with a wild-type homozygotic diploid (*KTR* EB^s/*KTR* EB^s).

Heterozygotic diploids showed growth in LSK medium containing 1 mM K^+ similar to that of the homozygotic diploids and were unable to grow in 20 μM EB. Potassium transport was also measured in both homozygotic and heterozygotic diploids (Fig. 1B). The heterozygotic diploid behaves like the homozygotic wild-type diploid with respect to both potassium transport and sensitivity to EB, suggesting that the mutation is recessive.

Diploids from the cross between MD2/1 and 3.3 were made to sporulate. Fifteen tetrads were dissected, and haploid clones were analyzed for auxotrophy markers as well as growth in LSK medium with 1 mM K^+ and in media containing 15 and 20 μM EB. Results indicated a typical 2:2 Mendelian segregation of the *ktr* and EB^r characters, which were always together, indicating a nuclear mutation and also that both phenotypic characters were located in the same locus or very close to one another.

When potassium transport of the parental and segregant strains was tested, the 2:2 segregation was confirmed; two segregants showed normal wild-type transport, and two exhibited a decreased transport similar to that of the mutant. Segregants with a wild-type phenotype showed first an efflux and then an uptake of potassium into the cells. In those segregants with defective potassium transport, a deficiency in the ability to reincorporate the monovalent cation was observed. Recombinant 3.31b (*uraA lisA ktr* EB^r) was selected for kinetic analysis of ^{86}Rb transport and transformation.

The kinetic analysis of ^{86}Rb transport for wild-type strain WM37 and the recombinant isolate 3.31b showed large differences, but the K_m for Rb^+ transport was only approximately threefold higher in the mutant (0.243 mM) than in the wild type (0.091 mM). However, the mutant transported very slowly; its V_{max} (3.3 nmol mg^{-1} min^{-1}) was close to 1/10 that of the wild-type strain, WM37 (34 nmol mg^{-1} min^{-1}). Consistent with these observations, mutant cells showed a longer generation time than wild-type cells in YPD medium containing 10 mM K^+ (2.3 h for mutant cells versus 1.5 h for wild-type cells), confirming a large alteration of the transport capacity for monovalent cations.

Because the membrane electrochemical potential generated by the H^+-ATPase is the force which drives potassium transport in yeast cells, it was important to measure the H^+-pumping activity in the mutant strain and to compare it with that of the wild-type strain. As shown in Fig. 2A, proton expulsion by the mutant cells with glucose as the substrate was markedly reduced, indicating that the observed phenotypes could be due

FALLA DE ORIGEN

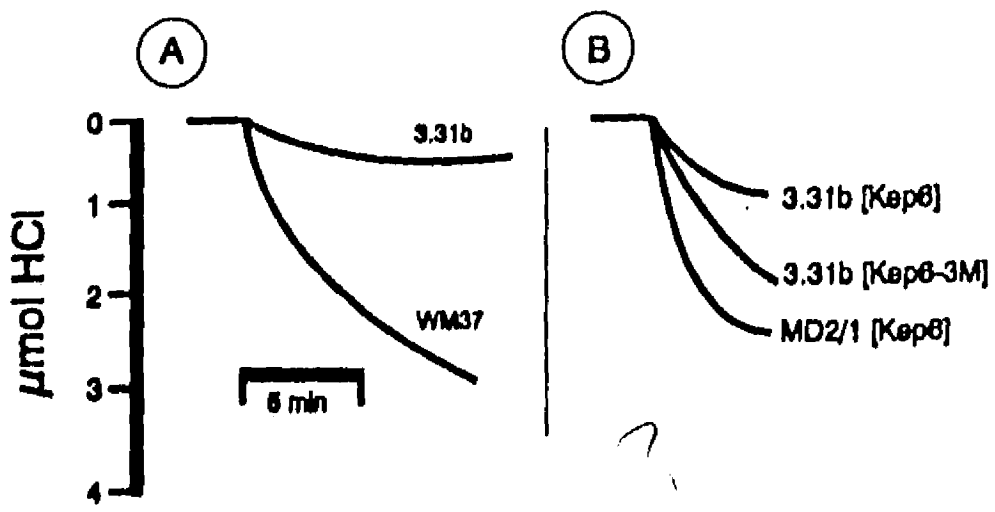


FIG. 2. Proton-pumping activities in wild-type, mutant, and complemented strains. Incubation conditions were as follow: 1 mM MES-TEA buffer (pH 6.0), 10 mM glucose plus 1 μl of 3% hydrogen peroxide, 8 μg of bromocresol purple, and 10 mg (wet weight) of yeast suspension in a final volume of 2 ml. The reaction was started by the addition of cells, and the $A_{587-588}$ was recorded against time. (A) Changes of the pH produced by the wild-type (MD2/1) and mutant (3.31b segregant) cell suspensions grown in YPD medium. (B) Changes of the medium pH produced by the wild type (MD2/1) and the mutant (segregant 3.31b) and its complemented version. Cells carrying the indicated plasmids were grown in selective medium.

to an impairment of the plasma membrane H^+-ATPase. A decrease of the membrane potential caused by external addition of potassium stimulated the ATPase activity of the mutant to a level lower than that of the wild-type cells (not shown). In addition, the mutant showed a lower rate of generation of the membrane potential (not shown), as indicated by the fluorescence of N,N^3-dipropylthiacarbocyanine, a dye that can be used to estimate the membrane potential of yeast cells (22). These results are also consistent with the fact that the mutant could grow in media containing hygromycin at 5 μg/ml, a concentration at which the wild-type strain did not grow (not shown). This is a much higher sensitivity than that reported by Perlin et al. (25, 26) for *S. cerevisiae*, but the results are qualitatively similar (i.e., a decreased membrane potential and an increased resistance to the antibiotic).

Transformation of the 3.31b segregant with a genomic DNA library was achieved by electroporation as reported previously (1). Transformants were selected in medium without uracil and then replicated to medium with a low potassium content. Six independent clones which were able to grow in the low-potassium medium LSK1 were isolated. Mitotic analysis of these six clones showed a heterogeneous mixture of cells, some showing the mutant phenotype and others being stably transformed. The plasmid was isolated from these clones and transferred to bacteria. Retransformation of the mutant with these plasmids resulted again in a mixture of complemented and noncomplemented transformants. Stable transformants grew in LSK medium containing 1 mM K^+ and recovered sensitivity to EB.

The six plasmids isolated were analyzed with a set of restriction enzymes. It was observed that three of them had suffered rearrangements, losing restriction sites of the vector. The three remaining clones gave similar patterns with all enzymes tested. One of these clones, carrying the smaller insert, was selected to make a physical map and to subclone the gene of interest. This clone showed an insert of approximately 6.6 kb (Fig. 3A), which was responsible for the reversion of the mutant to the wild-type phenotype.

The 6.6-kbp fragment was digested with *Bam*HI, which generated two fragments of similar size that were subcloned in both directions into *Bam*HI-digested phagemid pTZ18R. Full sequencing of these clones was done by primer extension. The sequences of both chains showed an insert of 6,613 bp with two incomplete open reading frames (ORFs) in one strand and a complete ORF in the opposite strand (Fig. 3A). This latter ORF (ORF1) was found to encode the NADPH-dependent oxidase old yellow enzyme of Warburg (18, 36), while ORF3 corresponded to an unidentified product. ORF2 showed high similarity to the carboxyl end of the plasma membrane H^+-ATPase from *S. cerevisiae*. Digestion with *Hin*dIII allowed the construction of three different clones in KEp6, each having one

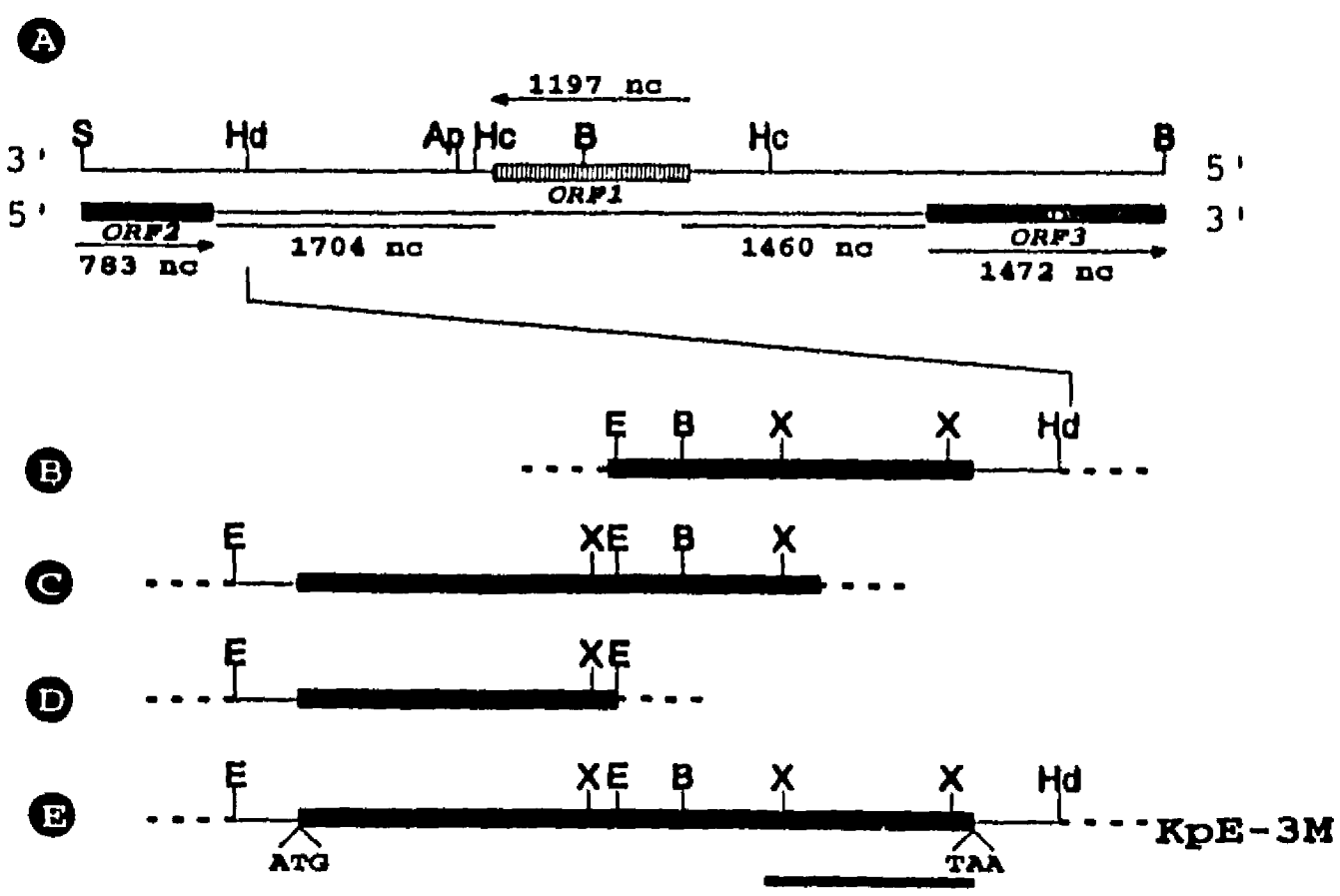


FIG. 3. Construction of plasmid KpE-3M, carrying the full *PMA1* ORF from the 6.6-kb original clone. (A) Physical map of the 6.6-kb clone showing the three ORFs found. Arrows indicate the direction of transcription. The length of each ORF and intergenic distances as well as the number of amino acids encoded are indicated. nc, nucleotides. (B and C) Maps of the subclones found by screening of the genomic library. (D) Fragment ligated into the construct shown in panel B to give rise KpE-3M. (E) Plasmid KEp-3M, carrying the full ATPase gene. Start and stop codons are indicated. The heavy black line indicates the C-end region that complements mutant 3.3. Relevant restriction sites are shown. S, *Sau*3A; Hd, *Hin*dIII; Ap, *Apa*I; Hc, *Hin*dII; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; X, *Xba*I.

FALTA DE ORIGEN

ORF (Fig. 3A). Electroporation of the mutant with these constructs allowed the identification of the portion responsible for the complementation. Only the plasmid carrying the ATPase fragment was able to reverse the mutant phenotype. A detailed study of the mitotic segregation of the transformants after several generations in nonselective medium (YPD) resulted in 30% of stably complemented transformants from which no episomal plasmid was recovered. This finding strongly suggests that a recombination event in the reversion of the mutant phenotype was involved. In fact, it has been showed that electroporation may increase homologous recombination in yeast cells severalfold (13).

Using the carboxyl-end fragment (from the *Bam*HI site to the *Hin*dIII site) of the ATPase gene as a probe, we screened the genomic library, searching for the full-length ORF. No clone with the complete frame was found; instead, we isolated two independent clones, one carrying the 3′ end of the gene from the internal *Eco*RI site (Fig. 3B) and the other carrying the 5′ end extending to the internal *Bam*HI site (Fig. 3C). Digestion of the latter clone with *Eco*RI allowed the separation of a 1.5-kbp fragment (Fig. 3D) that was ligated into a previously constructed clone carrying the 1.7-kbp *Eco*RI-*Hin*dIII 3′ fragment. The resulting plasmid, KpE-3M, contained the full ORF, including 244 nucleotides upstream of the start codon and 341 nucleotides downstream of the stop codon (Fig. 3E). The nucleotide sequence of the complete ORF and its deduced amino acid sequence are shown in Fig. 4. The *K. lactis PMA1* gene comprises 2,700 kbp including the stop codon and encodes a putative protein 899 amino acid residues long. To map the physical position of the gene, we probed chromosomes from strain WM37 separated by contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis with the *Bam*HI-*Hin*dIII fragment labeled with ^{32}P. We obtained a positive signal with chromosome 2 (not shown), confirming our previous observation that the gene encoding the old yellow enzyme (located only 1.7 kbp from *PMA1*) maps in this chromosome (18).

A comparison of the amino acid sequence of *K. lactis* PMA1 with sequences of other yeast H^+-ATPases is shown in Fig. 5. The alignment shows a very high conservation in the sequences between these ATPases and *K. lactis* PMA1, with approximately 93% similarity and 85% identity with those from *Candida albicans*, *S. cerevisiae*, and *Zygosaccharomyces rouxii*. *K. lactis* PMA1 shows 85% similarity and 73% identity with PMA1 from *Schizosaccharomyces pombe*. The overall identity between these proteins is approximately 64%. Most differences are present in the amino termini of these sequences, suggesting differences in the processing and membrane targeting between species. High sequence conservation between H^+-ATPases is present in a wide range of organisms (reviewed in reference 38).

Transformation of the 3.31b mutant with plasmid KEp-3M resulted in the constitutive reestablishment of the wild-type phenotype: growth in LSK medium and sensitivity to 20 μM EB (Fig. 6). Potassium transport and H^+-pumping activity were also reestablished in the transformed strain (Fig. 1C and 2B). The vanadate-sensitive ATPase specific activity in isolated plasmatic membranes from the mutant strain was approximately 42% of the wild-type level (0.72 ± 0.21 μmol mg^{-1} min^{-1} versus 1.72 ± 0.56 μmol mg^{-1} min^{-1}); however transformation of the mutant with plasmid KEp-3M increased the activity to almost wild-type levels (1.42 ± 0.3 μmol mg^{-1} min^{-1}).

To test whether the ATPase is essential for cell growth, chromosomal *PMA1* was transplaced by a DNA fragment containing *PMA1* with the selectable *URA*A marker inserted within the coding region (*Bam*HI site; Fig. 3). A wild-type diploid strain (*uraA*/*uraA*) was transformed to Ura^+ with the *Eco*RI-*Hin*dIII fragment (partially digested at *Eco*RI). The heterozygous *PMA1*/*pma1*::*URA*A diploid was sporulated and dissected to separate the four haploid meiotic spores. Each tetrad gave only two viable spores with the phenotype Ura^-, indicating that cells lacking a functional *PMA1* gene are not viable.

Having the wild-type gene in hand, we constructed two different clones carrying different portions of the gene: one with the carboxyl end found in the original clone (from the *Bam*HI to *Hin*dIII sites; Fig. 3A) and the other carrying the rest of the gene. Electroporation of the mutant with these two plasmids confirmed the above-mentioned observation that the carboxyl end of the gene reverses the phenotype shown by the mutant, indicating that the mutation in the 3.3 strain should be located within this region. On the basis of this result, we designed the oligonucleotides indicated in Fig. 4 (underlined regions) to amplify by PCR this fragment, using genomic DNA from the 3.3 mutant as the template. Sequencing of two independent PCR products allowed the identification of the change responsible for the deficient H^+-ATPase activity. A transition from G to A at position 2007 was found. This change yields the substitution of methionine 669 by isoleucine, which is located between the fourth and fifth hydrophobic regions thought to be membrane integral segments. According to the eight-transmembrane-segments model (27), methionine 669 in the *K. lactis* protein is located within the large cytoplasmic loop near the boundary of the fifth transmembrane segment (Fig. 5).

DISCUSSION

The mutagenic properties of EB and other intercalating drugs have been studied widely, mainly with respect to impairing mitochondrial functions (4, 35). Mutants of *K. lactis* resistant to higher concentrations of EB than wild-type strains have been described (3). These mutants in some cases show defective K^+ transport and have been the basis for hypothesizing that the dye and the cation can be transported by the same system; in fact, EB and K^+ require a membrane potential difference and apparently compete for the same carrier (2, 24). Our observations indicated that a high proportion (10 to 20%) of EB-resistant *K. lactis* mutants could have defects in the transport of both EB and monovalent cations, specially potassium. At least two kinds of resistant mutants can be obtained: those with an altered electrochemical gradient produced by a reduced capacity to pump out protons and those with normal pumping activity but deficient potassium transport due to defects in the high- and/or low-affinity systems (10, 15, 28). In any case, selection of mutants defective in the cation transport system could be achieved by monitoring growth in a medium with a low potassium content (LSK); therefore, the EB-resistant mutant 3.3 was selected by its lack of growth in LSK medium containing 1 mM potassium, in which the wild-type strain grows normally. Analysis of the ATPase activity showed that the defect in potassium transport of the mutant was due to deficient proton-pumping activity. The mutant had reduced capacity to transport the cation and altered kinetic constants. It appears that these alterations result from the decreased ability of the H^+-ATPase to generate a membrane potential; this also produced a lower capacity to transport EB, which appears to be transported by the same mechanism than K^+ or even by the same carrier (23). This finding also is in agreement with the higher resistance of the mutant to hygromycin, which depends on the membrane potential difference for its action, probably through its uptake by the cells (25, 26). EB added at certain concentrations can produce not only an inhibition of potassium

FALLA DE ORIGEN

```
                                                                                                                -244 gaattccaattgaattattctctactcttccttccctccctttttt
tctttggtttttaccaggtttccttttttactaactcatatttttgttctcattcttgttctcgttcctgttgtcgtttttgttcatttatctgctttta
gtttttccggtttgtttgaacggagaaacttagaaaaaggaaaaacataaagacagacgcagagattcagactagaatagacattgtgaaaataacaga

atg tca gct gcc act gaa cca acc aag gaa aag cct gtt aac aac cag gac tcc gat gat gaa gat gaa gat atc
 M  S  A  A  T  E  P  T  K  E  K  P  V  N  N  Q  D  S  D  D  E  D  E  D  I
gat caa ttg atc gaa gac ttg caa tct cat cac gga tta gac gat gaa agt gaa gat gat gag cat gtt gct gct
 D  Q  L  I  E  D  L  Q  S  H  H  G  L  D  D  E  S  E  D  D  E  H  V  A  A   50
ggt tcc gct aga ccg gtt cca gaa gaa tta tta caa act gac cca tct tac ggt ttg act tct gat gaa gtt acc
 G  S  A  R  P  V  P  E  E  L  L  Q  T  D  P  S  Y  G  L  T  S  D  E  V  T
aag aga aga aag aag tat ggt ttg aat caa atg tct gaa gaa act gaa aac cta ttt gtc aag ttt ttg atg ttc
 K  R  R  K  K  Y  G  L  N  Q  M  S  E  E  T  E  N  L  F  V  K  F  L  M  F  100
ttc atc ggt cca att caa ttt gtt atg gaa gcc gct gct att tta gct gcc ggt ttg gaa gat tgg gtc gat ttc
 F  I  G  P  I  Q  F  V  M  E  A  A  A  I  L  A  A  G  L  E  D  W  V  D  F
ggt gtt atc tgt ggt tta ttg ttt ttg aac gct gct gtt ggt ttc atc caa gaa tac caa gct ggt tct atc gtt
 G  V  I  C  G  L  L  F  L  N  A  A  V  G  F  I  Q  E  Y  Q  A  G  S  I  V  150
gac gaa ttg aag aag act ttg gct aac tct gcc gtt gtt atc aga gat ggt aac ttg gtt gaa gtt cca tct aac
 D  E  L  K  K  T  L  A  N  S  A  V  V  I  R  D  G  N  L  V  E  V  P  S  N
gaa gtc gtt cca ggt gat atc ttg caa ttg gaa gat ggt gtt gtt att cca gcc gat ggt cgt ttg gtc act gaa
 E  V  V  P  G  D  I  L  Q  L  E  D  G  V  V  I  P  A  D  G  R  L  V  T  E  200
gac tgt ttc atc caa atc gat caa tct gct atc act ggt gaa tct ttg gcc gtc gac aag aga ttc ggt gac tcc
 D  C  F  I  Q  I  D  Q  S  A  I  T  G  E  S  L  A  V  D  K  R  F  G  D  S
act ttc tct tct tct act gtt aag aga ggt gaa gct ttc atg atc gtt act gct act ggt gac tcc act ttc gtc
 T  F  S  S  S  T  V  K  R  G  E  A  F  M  I  V  T  A  T  G  D  S  T  F  V  250
ggt aga gct gct gct ttg gtt aac aag gct gct gct ggt agt ggt cat ttc act gaa gtt ttg aac ggt att ggt
 G  R  A  A  A  L  V  N  K  A  A  A  G  S  G  H  F  T  E  V  L  N  G  I  G
acg atc ttg ttg atc ttg gtt att gtt acc ttg ttg ctc gtt tgg gtt gcc tcc ttc tnc agn act nac ang att
 T  I  L  L  I  L  V  I  V  T  L  L  L  V  W  V  A  S  F  Y  R  T  N  K  I  300
gtt aga att ttg aga tac act ttg gct atc acc att gtc ggt gtc cca gtc ggt ttg cca gct gtc gtt acc acc
 V  R  I  L  R  Y  T  L  A  I  T  I  V  G  V  P  V  G  L  P  A  V  V  T  T
acc atg gct gtc ggt gct gct tac ttg gct aag aaa caa gcc att gtc caa aaa ttg tct gcc att gaa tct ttg
 T  M  A  V  G  A  A  Y  L  A  K  K  Q  A  I  V  Q  K  L  S  A  I  E  S  L  350
gct ggt gtc gaa atc ttg tgt tct gac aag acc ggt act ttg acc aag aac aag ttg tcc tta cat gaa cct tac
 A  G  V  E  I  L  C  S  D  K  T  G  T  L  T  K  N  K  L  S  L  H  E  P  Y
act gtt gaa ggt gtt gac cca gat gac ttg atg ttg act gct tgt ttg gct gct tct aga aag aag aag ggt ttg
 T  V  E  G  V  D  P  D  D  L  M  L  T  A  C  L  A  A  S  R  K  K  K  G  L  400
gat gcc att gac aag gct ttc ttg aaa tct ttg atc tct tac cca aga gcc aag gct gct ttg act aag tac aag
 D  A  I  D  K  A  F  L  K  S  L  I  S  Y  P  R  A  K  A  A  L  T  K  Y  K
ttg ttg gaa ttc cac cca ttc gac cct gtt tcc aag aag gtt acc gct att gtc gaa tct cca gaa ggt gaa aga
 L  L  E  F  H  P  F  D  P  V  S  K  K  V  T  A  I  V  E  S  P  E  G  E  R  450
atc att tgt gtt aag ggt gct cca ttg ttc gtc ttg aag act gtt gaa gaa gaa cat cca att cca gaa gat gtc
 I  I  C  V  K  G  A  P  L  F  V  L  K  T  V  E  E  E  H  P  I  P  E  D  V
cgt gaa aac tac gaa aac aag gtt gct gaa ttg gct tcc aga ggt ttc aga gcc ttg ggt gtt gcc aga aag aga
 R  E  N  Y  E  N  K  V  A  E  L  A  S  R  G  F  R  A  L  G  V  A  R  K  R  500
ggt gaa ggt cac tgg gaa att ttg ggt gtt atg cca tgt atg gat cct cca aga gat gac act gct caa act gtc
 G  E  G  H  W  E  I  L  G  V  M  P  C  M  D  P  P  R  D  D  T  A  Q  T  V
aac gaa gct aga cac ttg ggt ttg aga gtt aag atg tta act ggt gac gct gtc ggt att gct aag gaa act tgt
 N  E  A  R  H  L  G  L  R  V  K  M  L  T  G  D  A  V  G  I  A  K  E  T  C  550
aga caa ttg ggt ttg ggt act aac att tac aac gct gaa aga tta ggt cta ggt ggt ggt ggt gac atg cca ggt
 R  Q  L  G  L  G  T  N  I  Y  N  A  E  R  L  G  L  G  G  G  G  D  M  P  G
tcc gaa ttg gcc gat ttc gtt gaa aat gct gat ggt ttc gct gaa gtt ttc cca caa cac aag tac aac gtc gtt
 S  E  L  A  D  F  V  E  N  A  D  G  F  A  E  V  F  P  Q  H  K  Y  N  V  V  600
gaa atc ttg caa caa aga ggt tac ttg gtt gct atg act ggt gac ggt gtt aac gat gcc cca tct ttg aag aag
 E  I  L  Q  Q  R  G  Y  L  V  A  M  T  G  D  G  V  N  D  A  P  S  L  K  K
gct gat acc ggt att gct gtc gaa ggt gct acc gat gcc gct aga tcc gct gct gat att gtt ttc ttg gcc cca
 A  D  T  G  I  A  V  E  G  A  T  D  A  A  R  S  A  A  D  I  V  F  L  A  P  650
ggt ttg tcc gct att att gac gct ttg aag acc tct aga caa att ttc cac aga atg tac tct tac gtc gtt tac
 G  L  S  A  I  I  D  A  L  K  T  S  R  Q  I  F  H  R  M  Y  S  Y  V  V  Y
cgt atc gct ttg tcc cta cat ttg gaa atc ttc ttg ggt cta tgg att gct atc ttg aac aga tct ttg aac att
 R  I  A  L  S  L  H  L  E  I  F  L  G  L  W  I  A  I  L  N  R  S  L  N  I  700
gac ttg gtt gtc ttc att gct att ttc gct gat gtt gct acc ttg gct att gct tac gat aat gct cca tac tct
 D  L  V  V  F  I  A  I  F  A  D  V  A  T  L  A  I  A  Y  D  N  A  P  Y  S
cca aag cct gtc aag tgg aac ttg aga aga cta tgg ggt atg tcc gtc atc ttg ggt ata att ttg gct atc ggt
 P  K  P  V  K  W  N  L  R  R  L  W  G  M  S  V  I  L  G  I  I  L  A  I  G  750
act tgg atc acc ttg acc act atg ttt gtt cca aag ggt ggt att atc caa aac ttc ggt tcc atc gat ggt gtt
 T  W  I  T  L  T  T  M  F  V  P  K  G  G  I  I  Q  N  F  G  S  I  D  G  V
ttg ttc ttg caa atc tcc ttg act gaa aac tgg ttg att ttc atc acc aga gct gct ggt cca ttc tgg tcc tct
 L  F  L  Q  I  S  L  T  E  N  W  L  I  F  I  T  R  A  A  G  P  F  W  S  S  800
atc cca tct tgg caa tta tct ggt gcc gtt cta atc gtt gat atc atc gca acc atg ttc tgt ttg ttc ggt tgg
 I  P  S  W  Q  L  S  G  A  V  L  I  V  D  I  I  A  T  M  F  C  L  F  G  W
tgg tct caa aac tgg aac gac atc gtt acc gtt gtc aga gtc tgg att ttc tct ttc ggt gtc ttc tgt gtc atg
 W  S  Q  N  W  N  D  I  V  T  V  V  R  V  W  I  F  S  F  G  V  F  C  V  M  850
ggt ggt gct tac tac atg atg tct gaa tct gaa gcc ttt gac aga ttc atg aac ggt aag tct aga aga gac aag
 G  G  A  Y  Y  M  M  S  E  S  E  A  F  D  R  F  M  N  G  K  S  R  R  D  K
cca tct ggc aga tcc gtc gaa gat ttc ttg atg gct atg caa aga gtc tcc act caa cac gaa aag gaa aac taa
 P  S  G  R  S  V  E  D  F  L  M  A  M  Q  R  V  S  T  Q  H  E  K  E  N  *  899

actttatcaaaatgttactataaaattattccaactacatattgaacgttctatgtttgctaaatgtttctttcagttctgctttccacaattacaaat
ttcttctgttttctctccatctttcatcattctttaatcgaagtgatctcttttttcttagagtcattgtctaaatccaactggctttgatttagatctt
tttgttcctgatttttttgaatgaatgaaaatggtaagaagcgtttaaatgagtaatgtgttgtcatctgaaattatttttagctcaatgactggtatt
ttctctgtggttgtttttttgcctcatttaactataaagctt 3041
```

FIG. 4. Nucleotide sequence of the *K. lactis PMA1* gene. The deduced amino acid sequence is shown in the single-letter code. Underlined regions correspond to the oligonucleotides used for PCR amplification.

FALLA DE ORIGEN

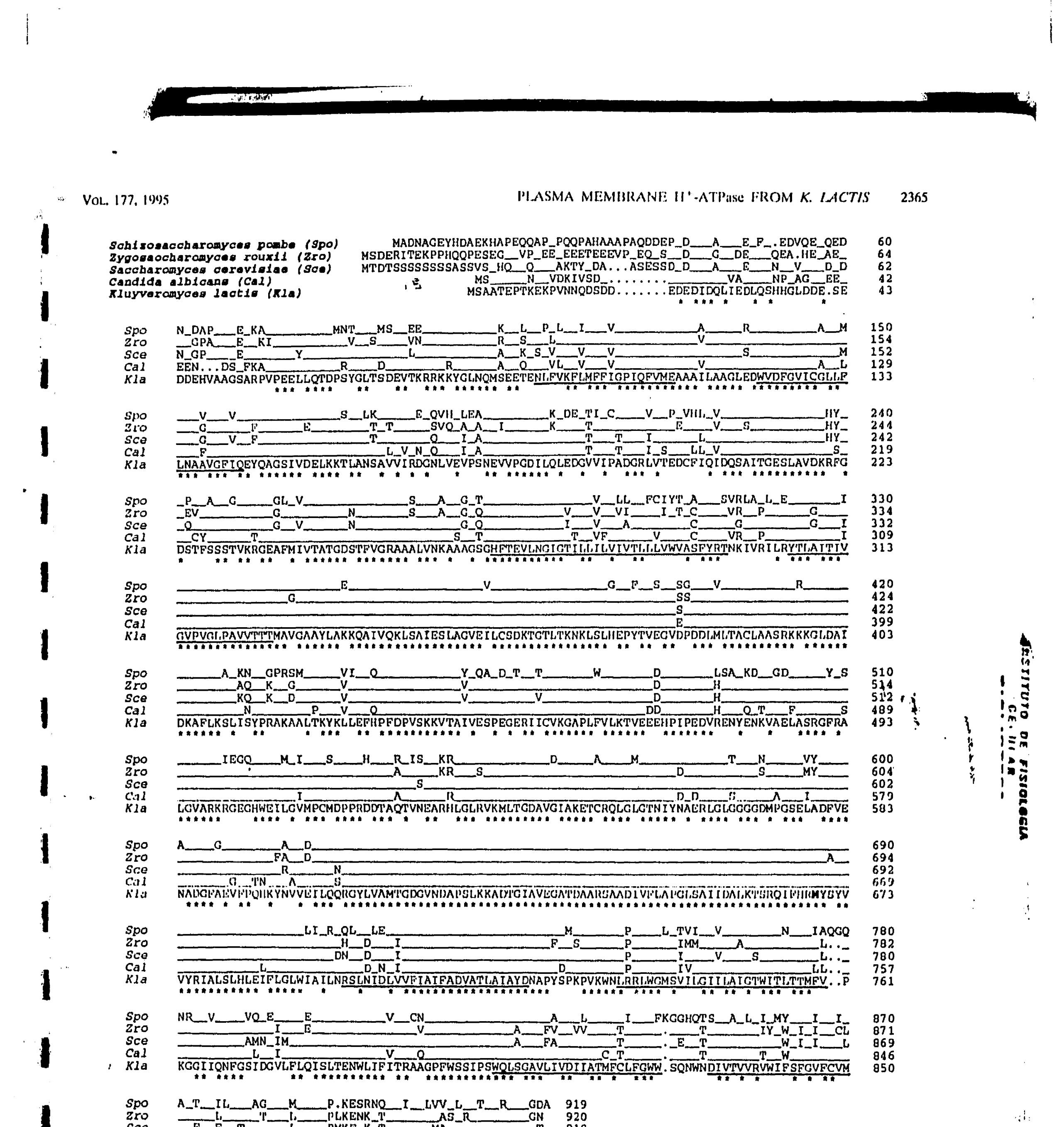


FIG. 5. Amino acid sequence alignments of *K. lactis* H+-ATPase and PMA1 from *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, and *Schizosaccharomyces pombe*. The entire *K. lactis* PMA1 sequence is listed, using the single-letter code. Dashes and periods represent identities and gaps, respectively. Asterisks represent fully conserved residues. Putative membrane integral sequences according to the eight-transmembrane-segments model (27) are underlined. Methionine (99), which is replaced by isoleucine in the 3.3 strain, is in boldface.

transport but also an efflux of the ion that depends on the generation of an adequate membrane potential (2, 23); this efflux was not observed in the mutant.

Complementation of this mutant for both EB resistance and lack of growth in LSK medium allowed us to clone the *PMA1* gene, which encodes the plasma membrane H+-ATPase. In the first instance, complementation of the mutant occurred when cells were electroporated with a clone carrying a fragment

FALLA DE ORIGEN

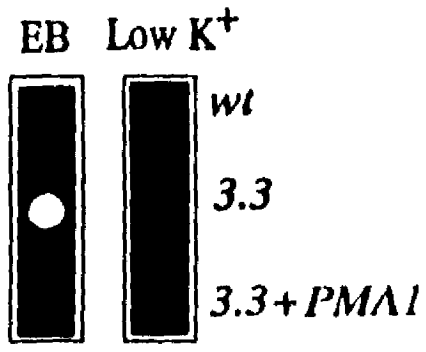


FIG. 6. PMA1-induced reversion of the resistance to EB (20 μM) and lack of growth of the 3.3 mutant in LSK medium containing 1 mM K^+. *wt*, wild type.

containing the carboxyl end of the gene, indicating that a homologous recombination event was involved. Three lines of evidence support this idea; first, from the transformed cells, a high proportion was stably complemented; second, clones were always a mixture of cells showing both the mutant and the cured phenotypes; third, no complementation was observed when cells were transformed by the alkali cation method (14) or the plate method (7), neither of which has been found to be a recombination-promoting procedure. Stimulation of homologous recombination by electroporation has been documented (13).

Screening of the genomic bank by using the carboxyl-end fragment as a probe allowed the identification of two independent clones carrying different segments of the full-length ORF. No clone carrying the complete gene was found, supporting the idea that only a recombination event could account for the complementation of the mutant phenotype. The nucleotide sequence of the gene showed a 2,700-bp ORF, including the stop codon, that encodes a putative protein of 899 amino acid residues. As seen in Fig. 5, the *K. lactis* ATPase aligns very well with other yeast ATPases. The amino acid conservation is even more significant if one excludes some N-terminal and C-terminal residues from these sequences. Close examination of the conserved amino acids in the protein from a variety of species shows that the *K. lactis* PMA1 protein has a serine residue at position 174 instead of alanine, which is present in ATPases not only in fungi but also in plants and ciliates (reviewed in reference 38). Some other deviations from yeast ATPases were noted (positions 189, 280, 426, 734, and 831 in Fig. 5), in particular arginine 734 instead of proline; nevertheless, in plants this position could be occupied by lysine, depending on the exact alignment.

PCR amplification allowed us to identify the change responsible for the low activity of the ATPase. We found a change of the polar methionine for the nonpolar isoleucine at position 669. The methionine residue is conserved not only in the yeast ATPases but also in those of other organisms, including filamentous fungi, plants, and ciliates (38). The methionine is located contiguous to an also fully conserved arginine which has been pinpointed as an interesting target for site-directed mutagenesis (38). The effect of the substitution of methionine 669 agrees very well with changes in activity found by substitutions of amino acid residues in the large cytoplasmic hydrophilic loop (5, 12, 27, 30, 37). However, further biochemical studies of this mutant are needed to determine whether the decrease in activity of the ATPase is due to defective binding of ATP and phosphorylation and/or to what extent, if any, the enzyme conformation is altered.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laura Ongay and Soledad Guevara for technical assistance. We are grateful to Gerardo Coello and Ana María Escalante for having developed the computing facilities at the Instituto de Fisiología Celular.

This work was partially supported by grant 3188-N9307 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and grant IN202193 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

REFERENCES

1. Becker, D. M., and L. Guarente. 1988. High efficiency transformation of yeast by electroporation. Methods Enzymol. 194:182–186.
2. 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. 217:30–36.
3. Brunner, A., J. Mas, E. Cells, and J. R. Mutton. 1973. Cytoplasmic and nuclear inheritance of resistance to alkylguanidines and ethidium bromide in a petite-negative yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53:638–644.
4. Bulber, C. J. 1964. Induction of petite mutations and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 30:1–9.
5. Cid, A., and R. Serrano. 1988. Mutations of the yeast plasma membrane H^+-ATPase which cause thermosensitivity and altered regulation of the enzyme. J. Biol. Chem. 263:14134–14139.
6. Dufour, J. P., and A. Goffeau. 1978. Solubilization by lysolecithin and purification of the plasma membrane ATPase of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. 253:7026–7032.
7. Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. BioTechniques 13:18–20.
8. Foury, F., A. Antory, and A. Goffeau. 1981. Large scale purification and phosphorylation of a detergent-treated adenosine triphosphatase complex from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. 1981. Eur. J. Biochem. 119:395–400.
9. Gaber, R. F. 1992. Molecular genetics of yeast ion transport. Int. Rev. Cytol. 137A:299–353.
10. Gaber, R. F., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1988. *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 8:2848–2859.
11. Goffeau, A., and C. W. Slayman. 1981. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. Biochim. Biophys. Acta 639:197–223.
12. Harris, S. L., D. S. Perlin, D. Seto-Young, J. E. Haber. 1991. Evidence for coupling between membrane and cytoplasmic domains of the yeast plasma membrane H^+-ATPase. J. Biol. Chem. 266:24439–24445.
13. Higgins, D. R., and J. Strathern. 1991. Electroporation-stimulated recombination in yeast. Yeast 7:823–831.
14. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153:163–168.
15. Ko, C. H., A. M. Buckley, and R. F. Gaber. 1990. *TRK2* is required for low affinity K^+ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 125:305–312.
16. Koland, J. G., and G. G. Hammes. 1986. Steady state kinetic studies of purified yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. J. Biol. Chem. 261:5936–5942.
17. Malpartida, F., and R. Serrano. 1980. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent. FEBS Lett. 111:69–72.
18. Miranda, M., J. Ramírez, S. Guevara, L. Ongay-Larios, A. Peña, and R. Coria. Yeast, in press.
19. Peña, A. 1975. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 167:367–380.
20. Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou, and M. Tuena. 1969. Studies on the mechanism of stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 180:1–8.
21. Peña, A., G. Cinco, A. Gómez-Puyou, and M. Tuena. 1972. Effects of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 153:413–425.
22. Peña, A., J. P. Pardo, and J. Ramírez. 1987. Early metabolic effects and mechanism of ammonium transport in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 253: 431–438.
23. Peña, A., and G. Ramírez. 1975. Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. J. Membr. Biol. 22:369–384.
24. Peña, A., and J. Ramírez. 1991. An energy-dependent efflux system for potassium ions in yeast. Biochim. Biophys. Acta 1068:237–244.
25. Perlin, D. S., C. L. Brown, and J. L. Haber. 1988. Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 263:18118–18122.
26. Perlin, D. S., S. L. Harris, D. Seto-Young, and J. E. Haber. 1989. Defective H^+-ATPase of hygromycin B-resistant *pma1* mutants from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 264:21857–21864.
27. Portillo, F., and R. Serrano. 1988. Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. EMBO J. 7:1793–1798.
28. Ramos, J., R. Alijo, R. Haro, and A. Rodriguez-Navarro. 1994. TRK2 is not

FALLA DE ORIGEN

YEAST VOL. 11: 459–465 (1995)

Yeast Sequencing Reports

Nucleotide Sequence and Chromosomal Localization of the Gene Encoding the Old Yellow Enzyme from *Kluyveromyces lactis*

MANUEL MIRANDA, JORGE RAMÍREZ, SOLEDAD GUEVARA, LAURA ONGAY-LARIOS, ANTONIO PEÑA AND ROBERTO CORIA*

Departamento de Microbiologia, Instituto de Fisiologia Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, DF, México

Received 12 September 1994; accepted 6 December 1994

A 6·6 kb genomic DNA fragment from the yeast *Kluyveromyces lactis* was isolated. Sequence analysis of this fragment revealed the presence of two incomplete open reading frames (ORFs) in one strand, one coding for the carboxyl terminus of the plasma membrane H^+-ATPase and the other for the amino terminus of an unidentified product. In the complementary strand, a full-length ORF which encodes for a protein homologous to the yeast NADPH-dependent Old Yellow Enzyme was found. The deduced amino acid sequence of this ORF predicts a protein of 398 residues with 84% similarity in its full length to OYE1 from *Saccharomyces carlsbergensis* and OYE2 from *Saccharomyces cerevisiae*. In addition, an internal region showed considerable similarity to the bile acid-inducible polypeptide from *Eubacterium sp.*, to the NADH oxidase from *Thermoanaerobium brockii*, to the trimethylamino dehydrogenase from bacterium W_3A_1 and to the estrogen-binding protein from *Candida albicans*, suggesting a functional or structural relationship between them. Inactivation of the *KYE1* (*Kluyveromyces* Yellow Enzyme) gene by deletion of 0·6 kb fragment between positions +358 and +936 produced viable cells with a slight increase in their generation time. Haploid cells carrying the disrupted allele showed one-third of the NADPH oxidase activity, compared to wild-type cells. Southern blotting analysis of digested DNA and chromosomes separated by contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis from *K. lactis* indicated that this is a single-copy gene and it is localized on chromosome II, whose molecular size has been estimated to be approximately 1·3 Mb. The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank data base (Accession No. L37452).

KEY WORDS — Old Yellow Enzyme; flavoproteins; *Kluyveromyces lactis*; chromosome mapping

INTRODUCTION

Since its discovery, the Old Yellow Enzyme (OYE) has come to be regarded as one of the typical flavoproteins. This enzyme has been the subject of extensive characterization of ligand–flavin interaction, but its physiological role is still unknown. Saito *et al.* (1991) reported that there are two different genes encoding OYE in brewer's bottom yeast, one of which they isolated and sequenced. Recently, Stott *et al.* (1993) cloned and sequenced a second gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Both open reading frames (ORFs) span 1203 bp including the stop codon and they encode polypeptides of 400 amino-acid residues, exhibiting 89% identity. At least seven isozymes of OYE have been described so far (Stott *et al.*, 1993), each having different N-terminal amino acid sequences.

Although NADPH has come to be accepted as the physiological reductant of the enzyme, the physiological oxidant has still not been identified. Molecular oxygen or cytochrome *c* have been described as electron acceptors of the reaction of

*Corresponding author.

CCC 0749–503X/95/050459–07
© 1995 by John Wiley & Sons Ltd

OYE with NADPH (Massey *et al.*, 1969), and it was found that menadione markedly increases the reduction rate of cytochrome *c* in both aerobic and anaerobic conditions (Yamano *et al.*, 1993). Based on the finding that several α,β-unsaturated carbonyl compounds can act as electron acceptors of the reaction catalysed by OYE, it has been suggested, more recently, that the enzyme may be involved in yeast sterol metabolism (Stott *et al.*, 1993). Studies of homologous enzymes in different organisms would allow us to determine with certainty the physiological role of this protein.

In this work, we have mapped and characterized the gene encoding the OYE from *Klyveromyces lactis*, and compared it with those reported from *S. cerevisiae* and *S. carlsbergensis*, and with some other flavoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and media

Kluyveromyces lactis strains used in this work were MD2/1 (*Mata, lysA, argA, uraA*), KF71-4B (*Mata adeA, uraA*) and WM37 (Mata, *hisA*). *Escherichia coli* strains NM522 and TG-1 were used to propagate the genomic DNA library and recombinant plasmids respectively. The shuttle vector KEp6 (obtained from Dr H. Fukuhara) was used to construct a genomic DNA library from *K. lactis*. Phagemid pTZ18R (available from Pharmacia) was used to subclone DNA fragments for sequencing. YPD medium consisted of 1% yeast extract, 2% Bactopeptone and 2% glucose. SD minimal medium consisted of 0·7% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% glucose. SD medium was supplemented with the required amino acids (50 μg/ml) to select for yeast carrying the desired plasmids. SD supplemented with uracil (50 μg/ml) was used to select for diploids.

Genomic DNA library

Genomic DNA from *K. lactis* strain WM37 was purified in a CsCl–ethidium bromide density gradient. It was partially digested with *Sau*3A and size fractionated in 1% agarose gel. Fragments ranging from 6 to 12 kb were electroeluted from the agarose and ligated into the KEp6 vector previously digested at the single *Bam*HI site. Forty-five hundred clones representing three times the estimated total genome of *K. lactis* were selected on ampicillin plates.

NADPH oxidase activity assay

Enzyme activity was assayed by measuring the rate of cytochrome *c* reduction at 540–550 nm in the presence of menadione using NADPH as reductant (Yamano *et al.*, 1993) in an SLM Aminco DW2000 spectrophotometer. Cells were grown in a rotatory shaker for 20 h at 30°C in YPD medium, harvested and washed once with water; they were suspended in 50 mM-KH_2PO_4, pH 7·0, 1 M-sorbitol, 1 mM-EDTA and 0·001% β-mercaptoethanol, at a density of 0·5 g/ml. Spheroplasts were obtained by adding 1 mg of lyticase per gram of cells and incubating for 1 h at 30°C. Spheroplasts were broken by four 15 s pulses of sonication at 4°C, incubating in ice for 15 s between sonication pulses. The suspension was centrifuged at 40 000 *g* for 1 h at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube and ammonium sulphate was added to 78% saturation. The suspension was kept on ice for 30 min. The protein fraction was recovered by spinning for 1 h at 20 000 *g*. The precipitate was suspended in 0·1 M-Tris–HCl, pH 8·0 and the protein concentration was determined as described by Lowry *et al.* (1951).

Chromosome separation

The yeast DNA samples from strain WM37 were prepared by a procedure modified from Sor and Fukuhara (1989). Cells were grown at 30°C until stationary phase in YPD medium, harvested by centrifugation and washed once with 50 mM-EDTA, pH 8·0. Cells were resuspended at a concentration of 5×10^9 cells/ml in 50 mM-EDTA containing 100 μg/ml of lyticase (Sigma Chemical Co.). One millilitre of the suspension was then mixed with 1·0 ml of 1% low melting agarose, made in 125 mM-EDTA, pH 8·0, and distributed in prechilled 200 μl molds (Bio-Rad). Solid agarose blocks were incubated for 3 h at 37°C in 500 mM-EDTA, 7·5% β-mercaptoethanol, 10 mM-Tris, pH 8·0, transferred to 500 mM-EDTA, 1% Sarkosyl and 0·1 mg/ml proteinase K and incubated for 24 h at 50°C. The blocks were washed twice with 500 mM-EDTA, pH 8·0, and stored at 4°C in the same solution. Chromosomes were separated by contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) electrophoresis using the CHEF-DR II pulsed-field electrophoresis system from Bio-Rad. Pieces of agarose blocks (approximately 4 mm in size) were placed into the slots of a 1% agarose gel (14 × 12·5 cm) prepared in 0·5 × Trizma base, boric acid, EDTA buffer (TBE) and sealed with

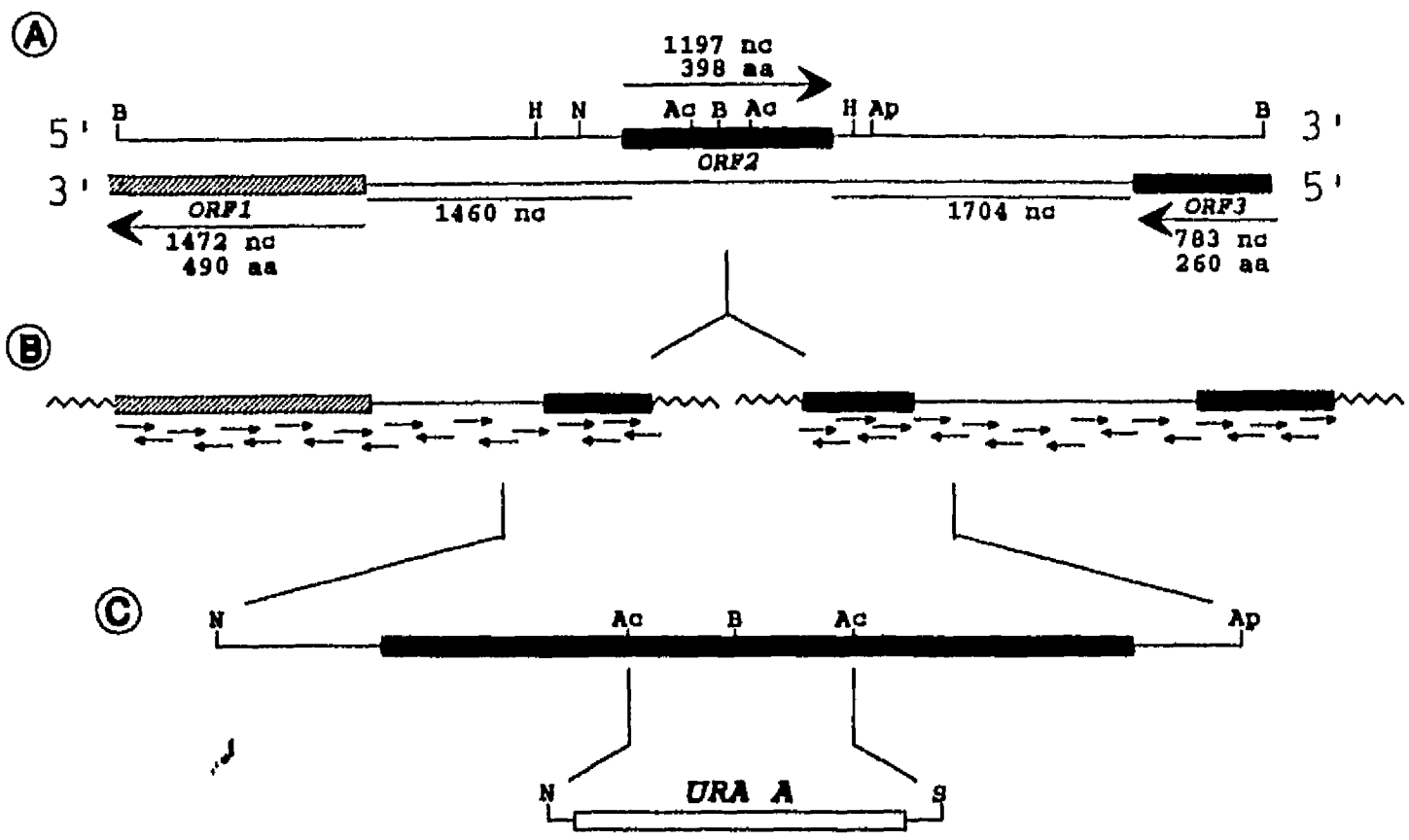


Figure 1. (A) Map of the 6·6 kb clone showing the three ORFs found (boxes). Arrows indicate the direction of transcription. Length of each ORF and intergenic distances are indicated, as well as the number of amino acids encoded. Relevant restriction sites are shown. B (*Bam*HI), H (*HindII*), *N* (*Nde*I), Ac (*Acc*I), Ap (*Apa*I), *S* (*Sma*I). (B) Subclones made in pTZ18R phagemid (zipper line) and sequencing strategy. The 6·6 kb clone was digested with *Bam*HI and fragments ligated into pTZ18R. Both strands of each clone were fully sequenced by primer extension. Arrows indicate position and polarity of primers. (C) Construction of *KYE1* carrying *UraA* for gene disruption. The *UraA* gene was obtained from the original KEp6 as a *Nde*I-*Sma*I fragment, which was blunt-ended in the *Nde*I site and ligated into the 6·6 kb clone previously digested with *Acc*I and blunt-ended. The *Nde*I-*Apa*I linear fragment was used to transform yeast.

1% molten low-gelling agarose. Electrophoresis was carried out in 0·5 × TBE at 100 V with linear variation pulses of 30–300 s for 25 h and 300–1800 s for 50 h. The temperature of the electrophorsis chamber was kept at 12°C. After electrophoresis, gels were stained in ethidium bromide (0·5 μg/ml) for 15 min. When needed, gels were destained in water for 30 min and photographed under short wavelength UV illumination.

Southern blot analysis

The agarose gel containing separated chromosomes was exposed to short wavelength UV for 5 min to break the DNA, which was denatured, neutralized and transferred to nylon membranes (Amersham) as described in Sambrook *et al.* (1989). Chromosome blots were probed with a radiolabelled 2·3 kb *Hin*dII fragment containing the full ORF of KYE1. Southern analysis of chromosomal DNA digested with different restriction endonucleases was carried out using the 578 bp *Acc*I internal fragment (Figure 1) as a probe.

Gene disruption

A 0·9 kb *Nde*I-*Sma*I blunt-ended fragment from KEp6 carrying the *UraA* gene was introduced into the *KYE1* ORF digested with *Acc*I and blunt-ended with Klenow (Figure 1c). A 1·7 kb *Nde*I-*Apa*I fragment carrying the interrupted gene was purified and used to transform a *uraA* auxotrophous diploid. Ura$^+$ transformants were sporulated and segregants analysed for viability and auxotrophy. Disruption of *KYE1* was confirmed by Southern blotting.

Miscellaneous

Standard recombinant DNA techniques were as described in Sambrook *et al.* (1989). Double-strand DNA sequencing was done by primer extension following the strategy shown in Figure 1B, using the Sequenase kit V. 2·0 (United States Biochemical). Yeast transformation was performed by electrophoration using a Bio-Rad gene pulser as described (Becker and Guarente, 1991). Deoxyoligonucleotides for sequencing were

synthesized in an Applied Biosystems DNA synthesizer model 381-A.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of a genomic DNA clone containing a sequence homologous to OYE

A 6·6 kb genomic DNA clone, whose physical map is shown in Figure 1, was isolated from a *K. lactis* genomic DNA bank when it was screened for complementation of a potassium uptake-deficient mutant. Digestion of the clone with *Bam*HI yielded two fragments of 3·3 kb each. These fragments were subcloned separately into the *Bam*HI-digested pTZ18R phagemid and both strands of each clone were sequenced fully by primer extension, following the strategy shown in Figure 1B. The full nucleotide sequence of the reassembled clone was found to encode two incomplete ORFs (ORF 1 and ORF 3) in one orientation and one full-length ORF (ORF 2) in the opposite orientation (Figure 1A). ORF 1 comprises 1472 bp of the 5'-end, which encodes 490 amino acids of the amino-terminus of an unidentified product, while ORF 3 comprises 783 bp of the 3'-end, encoding 260 amino acids of the carboxyl-terminus of the plasma membrane H^+ATPase (the sequence of the full-length ORF and its role in K^+ uptake will be the subject of a future paper). On the other hand, ORF 2 spans 1197 bp, including the stop codon, and encodes for a predicted 398 amino acid protein (Figure 1A).

Figure 2 shows the nucleotide sequence of the region comprised between the *Nde*I and *Apa*II restriction sites (Figure 1) and the deduced amino acid sequence of ORF 2. A computer search in the GenBank and EMBL data bank revealed extensive homology to OYE1 from *S. carlsbergensis* (Saito *et al.*, 1991) and OYE2 from *S. cerevisiae* (Stott *et al.*, 1993), 71% identity at the nucleotide level and 71% identity (85% similarity) at the amino acid level (Figure 3A). This finding prompted us to call this ORF *KYE1* (*Kluyvermyces* Yellow Enzyme). The predicted amino acid sequence of KYE1 shows a protein that is two amino acids shorter than the described OYE1 and OYE2. The missing amino acids are located in regions where the identity is relatively low, one in the amino-terminus (41% in 17 residues) and the other in the carboxyl-terminus (25% in 8 residues).

A more detailed analysis of the alignment of all three amino acid sequences (Figure 3A) revealed a region comprised between positions 156 and 235 (underlined region) where the similarity goes up to 92%. A comparison of this region with sequences in the databases revealed 66% similarity to the NADH oxidase from *Thermoanaerobium brockii* (Liu and Scopes, 1993) and to the polypeptide encoded by the C gene of a bile-acid-inducible operon in *Eubacterium* sp. (Mallone *et al.*, 1990), 67% similarity to the trimethylamine dehydrogenase from *Methylotrophus methylophilus* (Boyd *et al.*, 1992) and 77% similarity to the estrogen-binding protein from *Candida albicans* (Madani *et al.*, 1994). As shown in the alignment of these amino acid sequences (Figure 3B), this region seems to be very well conserved between these enzymes, suggesting that it could be important for their role in electron transfer reactions. Interestingly, a comparison of the amino acid sequence of KYE1 with the estrogen-binding protein from *C. albicans* (EBP1

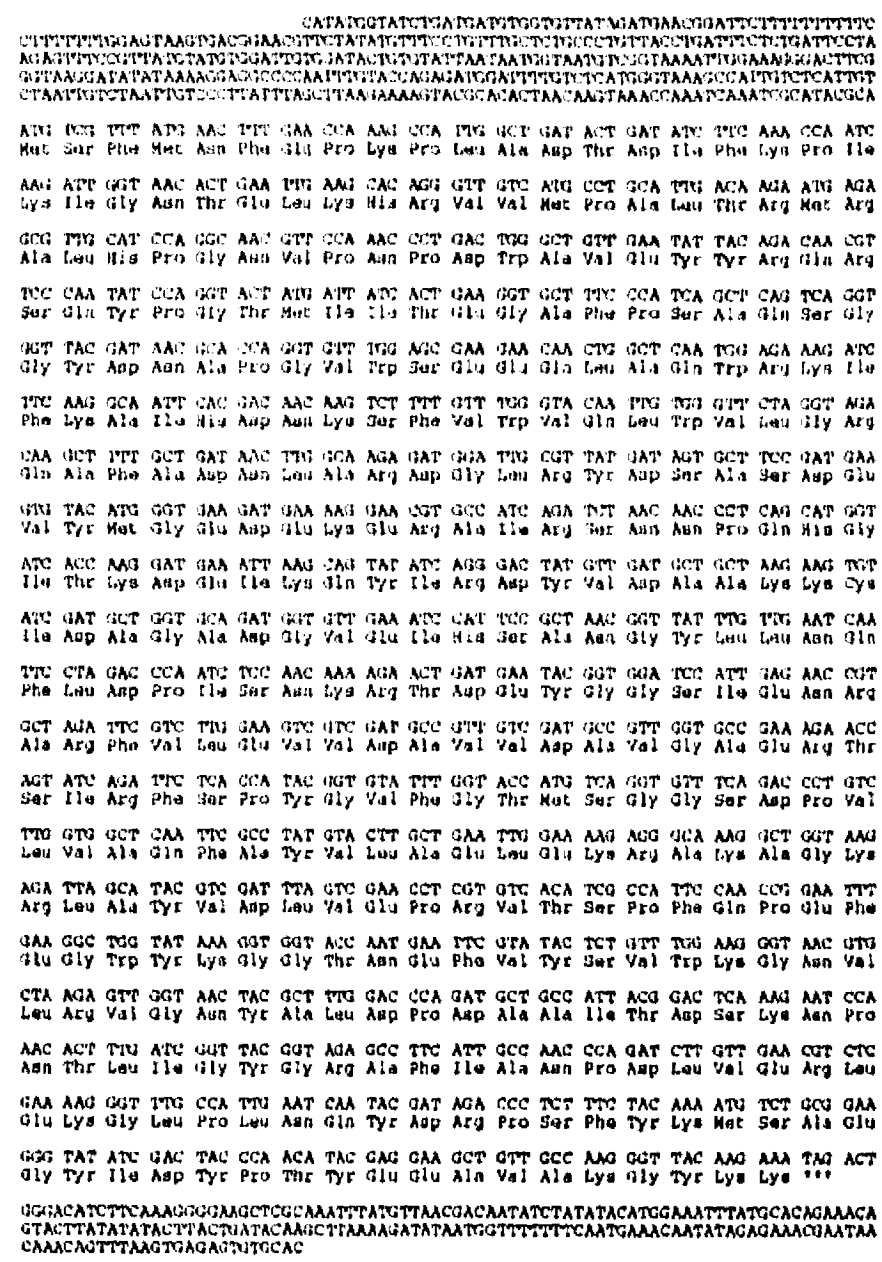


Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Kluyveromyces lactis* Old Yellow Enzyme. The sequence shown corresponds to the fragment *Nde*I-*Apa*I indicated in Figure 1.

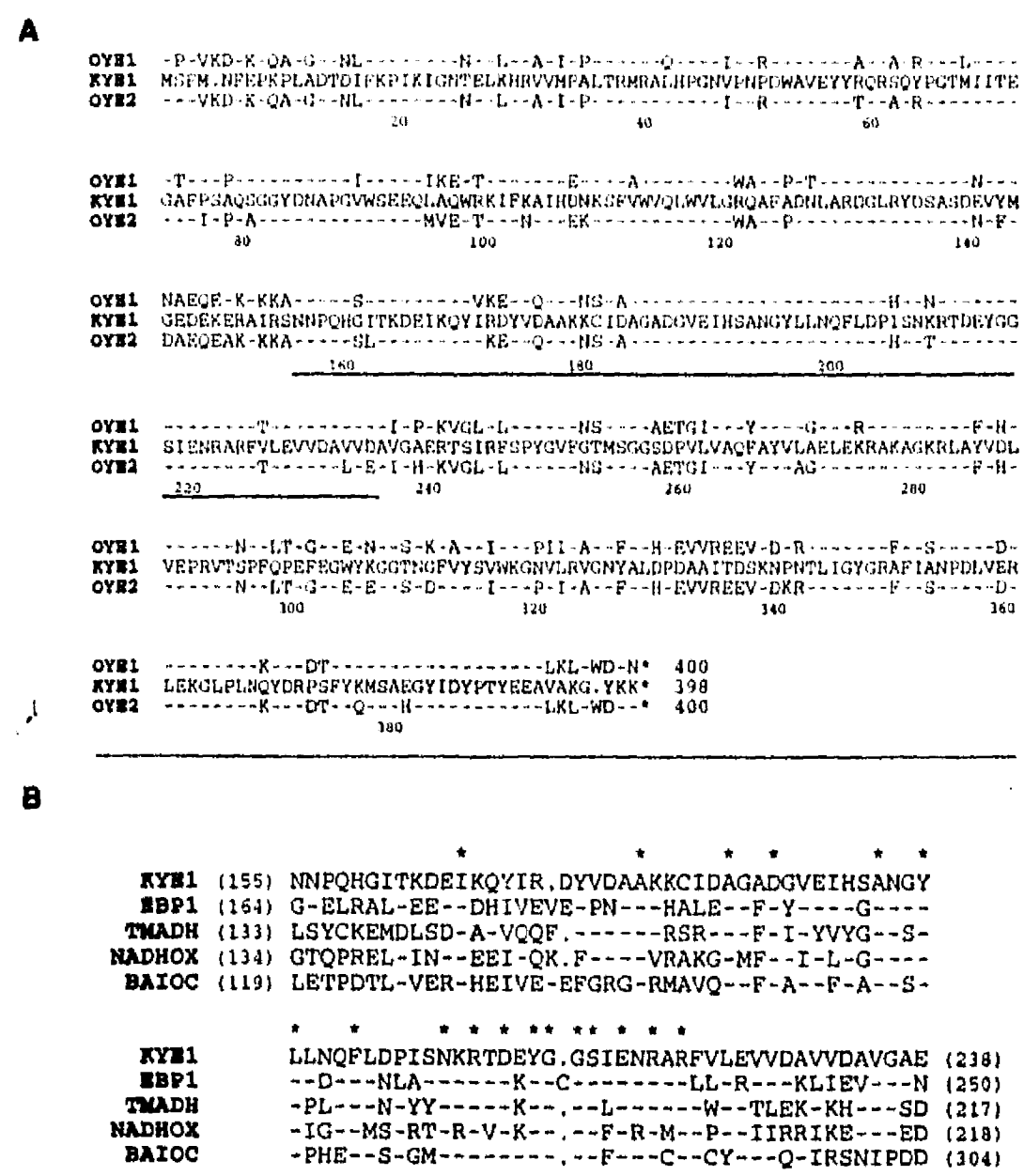


Figure 3. (A) Amino acid sequence alignments of KYE1 from *K. lactis* and Old Yellow Enzyme from *S. carlsbergensis* (OYE1) and *S. cerevisiae* (OYE2). The *K. lactis* sequence is listed in its full length, using the single-letter code. Dashes (-) and periods (.) represent identities and gaps, respectively. Numbering is relative to the KYE1 sequence. The region with highest similarity to other flavoproteins is underlined and is shown in the alignments in (B). (B) Amino acid sequence alignments of the region of KYE1 which shows high similarity to other flavoproteins. The KYE1 region is compared with the *Candida albicans* estrogen-binding protein (EBP1), the trimethylamine dehydrogenase from bacterium W_3A_1 (TMADH), the NADH oxidase from *Thermoanaerobium brockii* (NADHOX), and the polypeptide encoded by the C gene of the bile acid-inducible operon in *Eubacterium* sp. (BAIOC). Dashes (-) and periods (.) represent identities and gaps, respectively. Asterisks (*) show amino acids conserved in all proteins.

in Figure 3B) over their full length (not shown), indicates approximately 65% similarity and 45% identity, depending on the exact alignment. Moreover, it has been shown that EBP1 exhibits oxidoreductase activity besides its capacity to bind estrogens with high affinity (Manadi *et al.*, 1994). This finding strongly supports the idea that these proteins share substrates related structurally or that their oxidoreductase activity is regulated by similar molecules. Indeed, interaction of the OYE with phenolic compounds has been observed (Miura *et al.*, 1986) and it has been hypothesized that this enzyme could participate in sterol metabolism (Stott *et al.*, 1993).

Disruption of KYE1

To test whether *KYE1* is essential for cell growth, chromosomal *KYE1* was transplaced by a DNA fragment containing *KYE1* with the selectable *UraA* marker inserted within the coding region (Figure 1C). A wild-type diploid strain (*uraA/uraA*) was transformed to Ura$^+$ with the

FALLA DE ORIGEN

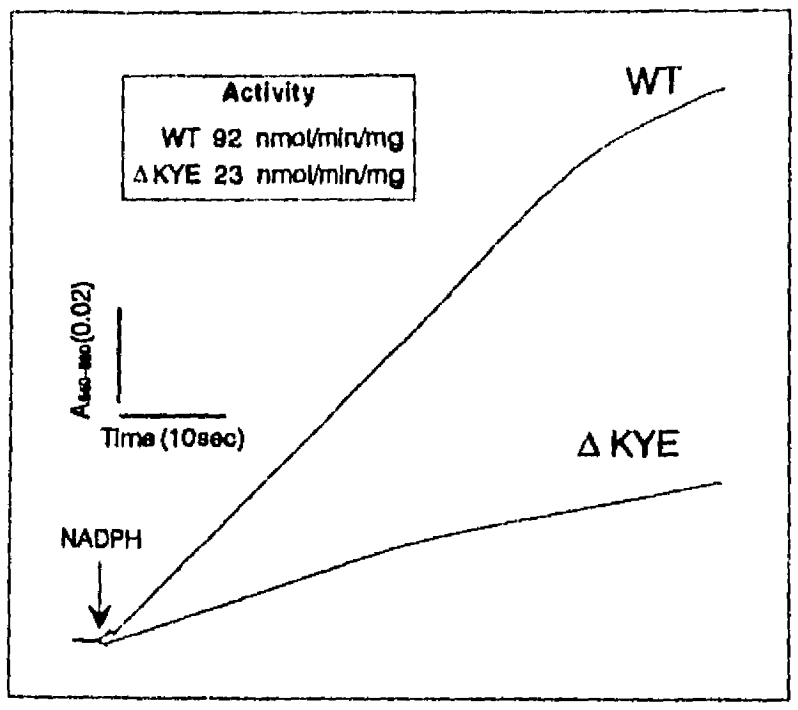


Figure 4. Reduction of cytochrome *c* using NADPH as donor in the presence of menadione in crude extracts of wild type (WT) and disrupted KYE1 (ΔKYE) strains. Acitivity of Old Yellow Enzyme is shown (insert). The concentrations used were 40 μM-NADPH, 20 μM-cytochrome *c*, 20 μM-menadione, and 1·0 mg total protein in a final volume of 2·5 ml of 100 mM-Tris-HCl, pH 8·0.

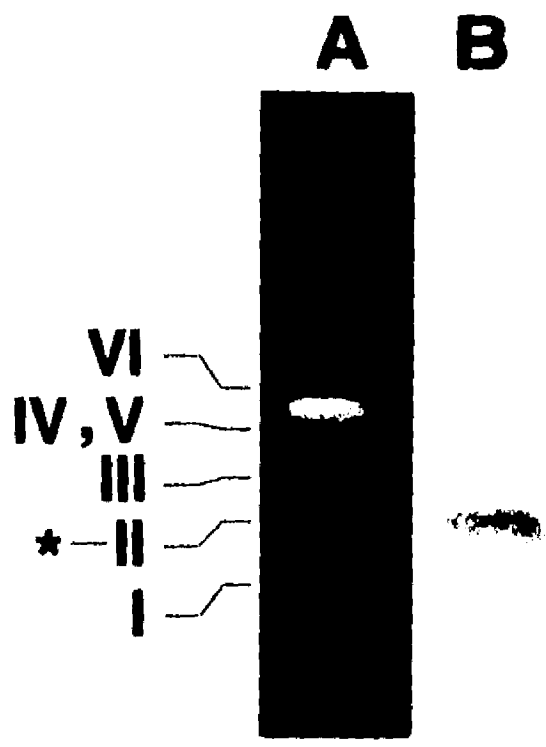


Figure 5. (A) Chromosome pattern of the *K. lactis* strain WM37 separated by contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis and stained with ethidium bromide. (B) Autoradiography of a blot showing hybridization of chromosome II (*) to the ^{32}P-radiolabelled *KYE1* gene.

*Nde*I-*Apa*I fragment. Integration and disruption of *KYE1* was confirmed by Southern blotting analysis (not shown). The heterozygous diploid *KYE1/kye1::UraA* was sporulated and dissected to separate the four haploid meiotic spores. All dissected asci produced four spores able to form colonies (not shown), indicating that *KYE1* is not essential for cell growth. No differences in the cell size and shape were observed; however, there is a slight effect in the cell division time of the cells carrying the null allele. The generation time of wild-type cells in YPD medium is about 2·4 h, while that of the disrupted haploid cells is about 3·6 h. Experiments focussing to measure effects of *KYE1* disruption in the metabolic status of the cell are currently in progress.

NADPH-NADP-dependent activity of KYE1 and ΔKYE1 strains

Whether or not cytochrome *c* is a physiological electron acceptor of the reaction of OYE with NADPH, its reduction rate is an excellent indicator of the activity. Moreover, it has been shown that menadione increases markedly the reduction rate of cytochrome *c* (Yamano *et al.*, 1993); therefore we used this assay to measure the activity of the enzyme in both the wild-type strain and the strain carrying the disrupted allele. Figure 4 shows the reduction of cytochrome *c* in the presence of menadione, using NADPH as the electron donor in cellular extracts. The NADPH oxidase activity in the disrupted cells was decreased to approximately one-third (23 nmol/min per mg of protein) when compared to the activity in the wild-type strain (92 nmol/min per mg of protein), suggesting that this is the primary cause of the increased division time of the mutant cells. This defect was partially cured by overexpression of KYE1 (not shown).

Chromosomal localization of KYE1

Chromosomes from lower eukaryotes can be separated by different methods of pulsed-field gel electrophoresis, known as orthogonal field alteration gel electrophoresis (OFAGE) or CHEF (Carle and Olson, 1984; Chu *et al.*, 1986; Schwartz and Cantor, 1984). With these techniques it has been possible to resolve linear DNA molecules up to at least 6 Mb in size (Cantor *et al.*, 1988). Chromosomes from different strains of *K. lactis* have been successfully separated by OFAGE and CHEF techniques (Sor and Fukuhara, 1989; Zhang *et al.*, 1993), showing molecules ranging from 1 to 3 Mb. Using the CHEF conditions described in Materials and Methods, we resolved six bands corresponding to chromosomes from strain WM37 (NRRL Y-1140) (Figure 5, panel A) that match with those reported from the strain CBS 2360 (Sor and Fukuhara, 1989). These

chromosomes, numbered I to VI, from the smallest to the largest (H. Fukuhara, personal communication), were immobilized on a nylon membrane and hybridized using the *Hin*dII-*Hin*dII fragment (Figure 1) as a probe. We identified a positive signal with the band corresponding to chromosome II (Figure 5, panel B), whose molecular size has been estimated at approximately 1·3 Mb (Zhang *et al.*, 1993). The *KYE1* gene, encoding OYE from *K. lactis*, should be added to the growing list of genes mapped in this yeast. A blot of digested chromosomal DNA with different endonucleases was also hybridized with a radiolabelled *KYE1* probe, showing in all cases hybridization with only one band (not shown). This suggests that *KYE1* could be a single-copy gene in this strain.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Gerardo Coello, Ana María Escalante and their team, who have developed the computing facilities at the Intituto de Fisiología Celular that allowed us to analyse the nucleotide sequence of *KYE1*. We are grateful to Dr H. Fukuhara for his generous gifts and for sharing unpublished observations with us. This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 3188-N9307, and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM grant IN202193.

REFERENCES

Becker, D. M. and Guarente, L. (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. In Guthrie, C. and Fink, G.R. (Eds), *Methods in Enzymology*, vol. 194. Academic Press, New York.

Boyd, G., Mathews, F. S., Packman, L. C. and Scrutton, N. S. (1992). Trimethylamine dehydrogenase of bacterium W_3A_1. Molecular cloning, sequence determination and over-expression of the gene. *FEBS Lett.* **308**, 271–276.

Cantor, C. R., Smith, C. L. and Mathew, M. K. (1988). Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 287–304.

Carle, G. F. and Olson, M. V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **13**, 5647–5664.

Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R. W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science.* **234**, 1582–1585.

Liu, X. L. and Scopes, R. K. (1993). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding NADH oxidase from the extreme anaerobic thermophile *Thermoanaerobium brockii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1172**, 187–190.

Lowry, O., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.

Madani, N. D., Malloy, P. J., Rodriguez-Pombo, P., Krishnan, A. V. and Feldman, D. (1994). *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 922–926.

Mallone, D. H., White, W. B. and Hylemon, P. B. (1990). Cloning and sequencing of a bile acid-inducible operon from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol.* **172**, 7011–7019.

Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G., Engel, P. C., Matthews, R. G., Schuman, M. and Sullivan, P. A. (1969). The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 891–897.

Miura, R., Yamano, T. and Miyake, Y. (1986). The hetergeneity of brewer's yeast Old Yellow Enzyme. *J. Biochem.* **99**, 901–906.

Saito, K., Thiele, D. J., Davio, M., Lockridge. and Massey, V. (1991). The cloning and expression of a gene encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* **266**, 20720–20724.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York.

Schwartz, D. C. and Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis. *Cell.* **37**, 67–75.

Sor, F. and Fukuhara, H. (1989). Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast* **5**, 1–10.

Stott, K., Saito, K., Thiele, D. J. and Massey, V. (1993). Old Yellow Enzyme. The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 6097–6106.

Yamano, T., Kuroda, K., Fujii, S. and Miura, R. (1993). Characterization of the electron acceptors of Old Yellow Enzyme: mechanistic approach to the mode of one electron transfer from the enzyme to menadione or dyestuffs. *J. Biochem.* **114**, 879–884.

Zhang, T. Y., Fan, J., Ringquist, S., Smith, C. L. and Cantor, C. R. (1993). The 0·7 to 3·3 megabase chromosomes from *Candida*, *Kluyveromyces*, and *Pichia* provide accurate size standards for pulse field gel electrophoresis. *Electrophoresis* **14**, 290–295.