



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización molecular del gen *YIGcn5* que
codifica una acetiltransferasa de histonas del
hongo *Yarrowia lipolytica***

Tesis que presenta

Ana Erika Ochoa Alfaro

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en

Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2006.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización molecular del gen *Gcn5* que codifica una acetiltransferasa de histonas del hongo *Yarrowia lipolytica***" presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Erika Ochoa Alfaro** y aprobada el **12 de Enero de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Gerardo R. Arguello Astorga
(Asesor de la tesis)

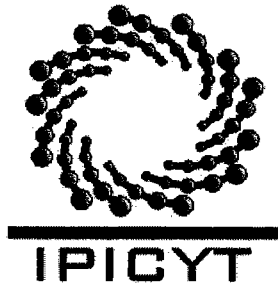
Dr. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Hongos de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 185810) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 021 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de enero del año 2006, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Erika Ochoa Alfaro

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización molecular del gen YIGcn5 que codifica una acetiltransferasa de histonas del hongo Yarrowia lipolytica

que se desarrolló bajo la dirección de


Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes enero de 2006.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

DEDICATORIAS

A DIOS:

Por brindarme la oportunidad de disfrutar cada momento que he vivido y permitirme terminar otras de mi metas como profesionista.

A mis padres:

Martha Evangelina Alfaro de Ochoa

Manuel Antonio Ochoa Cordero

Por su amor, comprensión y apoyo incondicional constante que me han dando para seguir adelante en la vida.

A mis hermanos:

Manuel Antonio

Martha Lizbeth

Por el apoyo incondicional y por todos aquellos momentos que hemos compartido.

A mi novio:

Noé Gamaliel

Por su apoyo incondicional en todo momento y por todo el tiempo que hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y compartir sus enseñanzas y experiencias sobre el tema y por su colaboración y asesoramiento que favorecieron para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr José Ruiz Herrera

Por haberme permitido hacer una corta estancia en su laboratorio en el CIVESTAV-Irapuato, y por su colaboración y aportaciones en el trabajo de tesis.

Al Dr. Gerardo Argüello Astorga y al Dr. Sergio Casas Flores

Por su colaboración, aportaciones y tiempo empleado por la revisión de tesis.

Al Dr. Antonio Cervantes.

Por su ayuda durante mi estancia en el CIVESTAV –Unidad Irapuato.

Alicia, Azucena, Claudia, Eloisa, Juanita, Lorena, Margarita y Yadira por su gran apoyo moral e intelectual y por su gran amistad en todo momento.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad de realizar mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

INDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	
Créditos institucionales	
Acta de Examen	
Dedicatorias	
Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Material y Métodos	
2.1. Cepas y plásmidos, medios de cultivos	4
2.2. Transformación genética.	4
2.3. Transición dimórfica	4
2.4. Técnicas de Biología Molecular	
2.4.1 Amplificación por PCR de un fragmento de 300pb utilizando oligonucleótidos degenerados	5
2.4.2 Construcción de la minigenoteca	5
2.4.3 Interrupción del gen <i>YIGcn5</i> y obtención de mutantes nulas.	6
2.4.4 Aislamiento de RNA y realización de RT-PCR del gen <i>Gcn5</i> de <i>Y.lipolytica</i> .	7
2.4.5 Identificación del extremo 3' UTR mediante la técnica del RACE (Rapid Amplication cDNA ends).	7
2.4.6 Identificación del extremo 5' UTR mediante la técnica del RACE (Rapid Amplication cDNA ends).	8
2.5 Análisis fenotípico de las mutantes	
2.5.1 Crecimiento de las mutantes	9
2.6 Análisis de secuencias	9
3. Resultados	
3.1 Aislamiento del gen <i>YIGcn5</i> .	10
3.2 Obtención de mutantes ($\Delta gcn5$) por reemplazo del gen.	13
3.3 Determinación del fenotipo de las mutantes $\Delta gcn5$.	13
3.4 Análisis del dimorfismo de las mutantes $\Delta gcn5$	14
4. Discusión	15
5. Bibliografía	18
6. Anexos	23

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN *YIGcn5* QUE CODIFICA UNA ACETILTRANSFERASA DE HISTONAS DEL HONGO *Yarrowia lipolytica*

RESUMEN

Es característico de los organismos eucariotes que el DNA nuclear se encuentre asociado con histonas y otras proteínas cromosomales formando complejos nucleoprotéicos que se denominan genéricamente como “cromatina”. Se sabe que las modificaciones postraduccionales sobre las histonas, que afectan la estructura de la cromatina son importantes en la expresión diferencial de genes. Dentro de dichas modificaciones se pueden citar a la N-acetilación, la cual ocurre en los residuos de lisina de los extremos N-terminales de las histonas. La acetilación de las histonas del nucleosoma da origen a un descompactamiento de la cromatina, lo cual da acceso a toda la maquinaria transcripcional basal y por consiguiente permite la expresión de genes.

Yarrowia lipolytica es un hongo dimórfico no patógeno que pertenece a la familia de los ascomicetos, que se ha utilizado tanto como modelo de estudio en la investigación básica, como microorganismo productor de proteínas recombinantes en la biotecnología moderna.

En el presente estudio caracterizamos molecularmente al gen *YIGcn5* que codifica a una acetiltransferasa de histonas en *Yarrowia lipolytica*. El gen *YIGcn5* de *Y.lipolytica* fue aislado y clonado por González-Prieto (2003). La secuenciación de la clona reveló un marco de lectura de 1395pb que codifica una proteína de 465 aminoácidos con un peso molecular de 54.1 KDa y un punto isoeléctrico de 4.72.

Durante el análisis de la secuencia de aminoácidos se identificaron los dominios que confieren la actividad de histona acetiltransferasa ya caracterizados en GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se realizó un experimento RACE-3´ (Rapid Amplification of cDNA Ends) para identificar el sitio de poliadenilación del mensajero. Se obtuvieron mutantes nulas ($\Delta gcn5$) mediante la técnica de inserción/escisión. Estas mutantes presentaron una reducción del 55% aproximadamente de su crecimiento en medio mínimo la cual fue reestablecida al adicionar al medio histidina, triptofano o treonina.

Estos resultados sugieren que el gen *YIGcn5* de *Y. lipolytica* está involucrado en el crecimiento y el desarrollo de esta levadura.

PALABRAS CLAVE: acetilación de las histonas, *gcn5*, HAT, *Yarrowia lipolytica*

ABSTRACT

In eukaryotes, nuclear DNA is associated with proteins named histones and other non-histones proteins conforming a complex known as chromatin. Posttranslational modifications of histones affect the structure and organization chromatin, such modifications generate in differential expression of genes. The most studied modification is the acetylation, that change in lysine residues on the amino-terminal tails. The acetylation of histones alter the structure of chromatin, allowing the access to the basal transcriptional machinery facilitating the expression of genes.

Yarrowia lipolytica is an ascomycete no-pathogenic fungus used model of study in basic research and also a recombinant protein-producing microorganism in the biotechnology.

In the current study we have characterized the *YIGcn5* gene of this fungus, which encodes an histone acetyltransferase. Aminoacid sequence analysis showed an histone acetyltransferase domain, whose characterization has been done in the GCN5 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. The RACE 3' (Rapid Amplication of cDNA3 Ends) was performed in order to identify the polyadenilation site in *YIGcn5* transcript. The Pop in Pop out technique, was used for partial replacement of the *YIGcn5* wild type gene. Null mutants showed a growth reduction of 55% approximately in minimum medium (MM, it was reestablished at normal levels when added histidine, tryptophane and threonine in MM medium. These results suggest that the *Yarrowia lipolytica YIGcn5* gene could be involved in growth and the development in this organism.

PALABRAS CLAVE: histone acetyltransferase, *YIGcn5*, *Yarrowia lipolytica*

1. INTRODUCCION

La regulación de la expresión génica a nivel transcripcional es la base central de muchos procesos biológicos, tales como el crecimiento y el desarrollo, los balances metabólicos y fisiológicos y las respuestas al medio ambiente (Vlachonasios *et al.*, 2003). En organismos eucariotes, la modificación en la estructura de la cromatina juega un papel importante en la regulación de la expresión génica (Narlikar *et al.*, 2002). El DNA en organismos eucariotes, se encuentra compactado por medio del plegamiento en los nucleosomas, que son un complejo del DNA con proteínas nucleares específicas denominadas histonas.

Los nucleosomas se encuentran en forma de octámeros que contienen dos moléculas de cada una de las siguientes histonas: H2A, H2B, H3 y H4, mientras que el DNA se encuentra enrollado alrededor del octámero (Fig. 1).

Los cambios en la cromatina están correlacionados con las modificaciones covalentes ocurridas en los extremos N-terminal de las histonas (Berger, 1999) como son la metilación, la fosforilación, la acetilación (Wolfe y Pruss, 1996; Grant *et al.*, 1999) y la ADP-ribosilación (Grant *et al.*, 1997).

La modificación de las histonas más estudiada es la acetilación, que se lleva acabo mediante las acetiltransferasas (HAT) (Sterner y Berger, 2000), las cuales al acetilar los residuos de lisina de los extremos de esas proteínas neutralizan las cargas positivas de dicho aminoácido y por consiguiente reduce la afinidad de las proteínas por el DNA (Struhl, 1998; Grant *et al.*, 1999) y esto conlleva al acceso de factores de transcripción a las cadenas de DNA, y por consiguiente facilita el proceso transcripcional (Wolfe y Pruss, 1996).

El proceso de transcripción y su regulación implica la participación de un gran número de moléculas, que incluyen aquellas presentes en los nucleosomas, polimerasas, factores generales de transcripción y factores específicos de la regulación transcripcional. Recientemente, se ha encontrado que algunos co-activadores y co-represores transcripcionales funcionan modificando enzimáticamente

a las histonas, lo que resulta en un rearrreglo de los nucleosomas que determina el acceso de los factores transcripcionales a las regiones promotoras. Los nucleosomas son capaces de reprimir la transcripción a través de tres mecanismos: 1) bloqueando los sitios de unión al DNA de los activadores, represores, RNA polimerasa, etc; 2) las cadenas de nucleosomas pueden formar estructuras muy compactas (superestructura), reprimiendo la transcripción de dominios cromosomales completos, y 3) en la heterocromatina, la interacción de los nucleosomas con otras proteínas cromosomales puede reprimir la transcripción de manera hereditaria (Browell *et al.*, 1996 ; Tauton *et al.*, 1996; 1998; Kornberg, 1999)

La enzima HAT de levadura (GCN5), se encuentra formando parte de al menos dos complejos multiprotéicos denominados ADA (Adapter proteins) y SAGA (Spt-Ada-Gcn5- Acetyltransferase), que son capaces de acetilar las histonas H3 y H2B en los nucleosomas (Grant *et al.*, 1997; Eberharter *et al.*, 1999). El gen *Gcn5* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica un adaptador (co-activador) transcripcional que es requerido para la transcripción de varios genes (Georgakopoulos y Thireos, 1992; Brandl *et al.*, 1996). La proteína GCN5 de *S. cerevisiae* está involucrada en la inducción de la expresión de los genes de la biosíntesis de algunos aminoácidos (Georgakopoulos y Thireos, 1992), por lo que la pérdida del gen *Gcn5* produce una disminución en el crecimiento en condiciones de limitación de aminoácidos. Los análisis de microarreglos mostraron que la expresión de aproximadamente el 5% de los genes de *S. cerevisiae* depende de GCN5 durante el crecimiento en medio rico (Holstege *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000), sin embargo otros genes podrían depender de GCN5 para su expresión bajo otras condiciones específicas, por ejemplo, en condiciones de estrés.

Varios componentes del complejo SAGA, incluyendo a las proteínas GCN5 y ADA2, no son esenciales para la *S. cerevisiae* (Roberts y Winston, 1997). Sin embargo, las mutantes nulas *Ada2* y *Gcn5* de levadura crecen lentamente en medio mínimo y son sensibles a cambios de temperatura (Berger *et al.*, 1992; Marcus *et al.*, 1994). En ratones, las mutaciones nulas homocigotas *Gcn5* presentan un fenotipo letal en el estado embrionario (Xu *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2000). En *Arabidopsis thaliana*, las mutantes Δ *ada2b* y Δ *gcn5* mostraron efectos pleiotrópicos durante el desarrollo y crecimiento de la planta como son: enanismo, desarrollo degenerativo de

la raíz, pétalos y estambres cortos (Vlachonasios *et al.*, 2003). En *Ustilago maydis*, las mutantes nulas $\Delta Umgcn5$, crecen en forma micelial sin importar las condiciones del medio y del pH (González-Prieto, 2003).

Para ampliar el conocimiento del papel de GCN5 en la activación de la transcripción, nosotros hemos analizado al gen homólogo de *Yarrowia lipolytica*. En este trabajo obtuvimos mutantes nulas ($\Delta gcn5$) mediante la técnica de inserción/excisión (*Pop- in Pop- out*). Dichas mutantes presentaron una reducción en su crecimiento en medio mínimo en comparación con el medio rico, la cual fue reestablecida al adicionar al medio histidina, triptofano o treonina. Estos resultados sugieren que el gen *Gcn5* de *Y. lipolytica* está involucrado en el crecimiento y desarrollo de esta levadura.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Cepas y plásmidos, medios de cultivos.

Las cepas de *Yarrowia lipolytica*, usadas en este trabajo fueron: P01a (*Mat A, Leu2-270, ura3-302,*) que fue obtenida por C. Gaillardin (INRA, París-Grignon, Francia) y las cepas EOA75 y EOA76 (*Mat A, Leu2-270, ura3-302, Δgcn5*), obtenidas en este trabajo. Las cepas fueron crecidas en medio YEPD que contiene 1% extracto de levadura sin aminoácidos, 1% peptona y 1% de glucosa, o en medio mínimo que contiene 0.67% de base nitrogenada de levadura (Invitrogen y DIFCO) y 1% de glucosa, suplementado con leucina 2mM y/o uracilo 0.2 mM.

Los plásmidos utilizados fueron: el pDANI-2, que contiene el gen *YIGcn5* con una eliminación de la parte central del ORF (*HpaI-SpeI*) que comprende 652 pb y el gen *YIUra3* en el sitio *Sall* que comprende 1.7 kb.

Las cepas de *Escherichia coli* que se usaron para la transformación y amplificación del DNA recombinante fueron la Top F'10 y la DH5α crecidas en medio LB líquido.

2.2. Transformación genética.

La transformación genética de *Y. lipolytica* con plásmidos integrativos, se realizó utilizando células intactas tratadas con acetato de litio por la técnica por Xuan *et al.* (1988).

2.3. Transición dimórfica

La transición dimórfica tanto de la cepa parental P01a como de las mutantes EOA75 y EOA76 se logró mediante el método descrito por Rodríguez y Domínguez, (1984) y Guevara-Olvera *et al.*, (1993), usando la *N*-acetilglucosamina (GlcNac) como fuente de carbono a un pH 6 (regulador de citratos), que induce el crecimiento micelial, en tanto que un medio sin regulador de pH, las células crecen en forma de levadura, al acidificarse el medio.

2.4. Técnicas de Biología Molecular

Para la extracción del DNA genómico se usó el método modificado de Hoffman y Wriston (1987). Las digestiones y ligaciones realizadas al DNA se llevaron de acuerdo a las recomendaciones de las casas comerciales (Invitrogen y New England Biolabs).

2.4.1 Amplificación por PCR de un fragmento de 300 pb utilizando oligonucleótidos degenerados

Para aislar el gen *Ylgcn5*, lo cual se logró en colaboración con el Dr. Juan Manuel González Prieto de la Unidad Irapuato del CINVESTAV del IPN, primero, se obtuvo un fragmento del gen *Gcn5*, mediante amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados en regiones conservadas de las enzimas acetiltransferasas de diversos organismos, los cuales fueron el 5'-caryticciaaratgcciaargartaya-3'(sentido) y el 5'-ytcyttigtraaiccytgytтыttraa-3'(antisentido). Las condiciones fueron: 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s y una extensión final de 72°C 8 min. Dicho fragmento se utilizó como sonda para el escrutinio de una minigenoteca.

2.4.2 Construcción de la minigenoteca

Para la construcción de la minigenoteca se realizó un análisis de restricción del DNA genómico del hongo con diversas enzimas. Se seleccionaron los fragmentos obtenidos por digestión con la enzima *Pst*I, porque solo produjo una banda de hibridación con la sonda radioactiva obtenida por PCR, de un tamaño de 4.6 Kb. Por su tamaño se dedujo que era factible que un fragmento de ese tamaño contuviese completo el gen *YIGcn5*. Por ello se clonaron dichos fragmentos en el vector pCRII (invitrogen). Las clonas positivas se identificaron por hibridación en colonia con el fragmento radioactivo obtenido por PCR. Para ello, las transformantes de *E. coli* se cultivaron en placas de LB con ampicilina y se hicieron réplicas en membranas de nylon. Las colonias se lisaron con SDS al 7% y 2X SSC durante 10 min y se realizó la fijación del DNA a las membranas utilizando un entrecruzador de luz ultravioleta. Por último se lavaron éstas con una solución 6x SSC para eliminar los restos celulares y se procedió a la hibridación según las especificaciones del sistema Redriprime kit (Amersham). Las transformantes positivas se seleccionaron y se cultivaron

separadamente. A partir de una de ellas se realizó la secuenciación total del inserto de interés presente en el vector pDANICO, donde se localizaron dos marcos de lectura que codifican para helicasa y la acetiltransferasa (GCN5).

2.4.3 Interrupción del gen *YIGcn5* y obtención de mutantes nulas.

Para reemplazar el gen silvestre *YIGcn5* de la cepa *Y. lipolytica* P01a (Δ *ura-3*) se utilizó el método de integración y escisión descrito por Boeke *et al.*, (1987). Se utilizó el plásmido pDANI-2 el cual proviene del pDANI pero con los siguientes cambios: se le eliminó el fragmento *HpaI/Spel* de 652 bp del ORF, que corresponde al dominio HAT del gen y se subclonó en el único sitio *Sall* del plásmido el gen *YIUra-3* como marcador de selección. Este plásmido pDANI-2 se linearizó digiriendo con *NheI* y se integró al genoma de *Y. lipolytica* por recombinación homóloga (pop in), transformando por el método de acetato de litio (Xuan *et al.*, 1988). Esta integración crea una duplicación que contiene la copia silvestre y la copia mutante del gen *YIGcn5*, flanqueada por las secuencias del plásmido. La segunda etapa es la escisión (pop out) del plásmido que contiene los genes *YIUra-3* y *YIGcn5* silvestre. La selección de las mutantes *ura-3* se realizó por medio de su resistencia al ácido fluoroorotico (5-FOA). Para confirmar la mutación se realizaron dos análisis por medio de PCR, usando dos oligonucleótidos diseñados al inicio y final del ORF, 5BAMYIGCN5: 5'-cgggatccaacgatggattcgga-3' y 3BAMYIGCN5: 5'-gcggtacctgtgcgcattactc-3'. Las condiciones fueron 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 90 s y una extensión final de 72°C 8 min. En el segundo análisis, las condiciones fueron: 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 45 s, 66°C 45 s, 72°C 2 min y una extensión final de 72°C 8 min, usando el mismo oligonucleótido al inicio del ORF (5BAMYIGCN5) y un nuevo oligonucleótido 3ACETTER que fue diseñado en la región del terminador de dicho gen: 5'-gcggtacccaagcagtggtgattg-3'.

2.4.4 Aislamiento de RNA y obtención de RT-PCR del gen *YIGcn5* de *Y. lipolytica*.

Se extrajo RNA total de la cepa P01a y la mutante EOA75 crecidas en medio rico mediante el método de Trizol descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El RNA fue tratado con Dnasa I (*Invitrogen*), para eliminar el DNA residual. Se realizó la síntesis de cDNA con el kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR

(Invitrogen). Cada mezcla de reacción contenía 3 µg de RNA total, 0.5 mM de mezcla de dNTP, 0.5 µg oligo-dT, buffer RT 10x, 25 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U inhibidor RnaseOUT™ y 50 U de SuperScript™. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 42°C por 2 min, 42°C por 50 min, 70°C por 15 min, y a 37°C por 20 min con Rnasa H para eliminar el RNA molde del híbrido cDNA:RNA. Se procesó también un control de cada muestra sin transcriptasa reversa para verificar que el producto de amplificación fue resultado del cDNA obtenido y no por contaminación de DNA genómico. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA por RT-PCR del gen *YIGcn5* fueron: 5BAMYIGCN5 5'-cgggatccaacgatggattcgga-3' (sentido) y 3BAMYIGCN5 5'-gcggtaccctgtcgccattactc-3' (antisentido). Las reacciones para el PCR fueron de un volumen de 50µl, que contenía: 1ul de la reacción de RT, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 mM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 30 s, 64°C 30 s, 72°C 90 s y una extensión final de 72°C 8 min.

2.4.5. Identificación del extremo 3'UTR mediante la técnica del RACE (Rapid Amplification cDNA Ends).

Se realizó el RACE 3' utilizando el kit 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA End (Invitrogen). Cada mezcla de reacción contenía 5 µg de RNA total, 10 mM de mezcla de dNTP, 0.2 µM oligo-dT AP (adaptador), buffer RT 10x, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 40 U inhibidor RnaseOUT™ y 50 U de SuperScript™. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 42°C 52 min, 70°C 15 min y a 37°C 20 min con Rnasa H para eliminar el RNA molde del híbrido cDNA:RNA. Los oligonucleótidos utilizados para la obtención del RACE 3' fueron: AVAP 5'-ggccacgcgtcgactagtagtac-3' (antisentido) el cual es un oligonucleótido que anida en el oligodT modificado, que se utiliza para la amplificación del cDNA y RACE3 5'-ctgtcagagttgcagaaccacg-3' (sentido), el cual se diseñó en el ORF del *YIGcn5*. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 s, 64°C 30 s, 72°C 90 s y una extensión final de 72°C 8 min. Para confirmar el RACE 3' se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: RACE3 5'-ctgtcagagttgcagaaccacg-3' y 3BAMYIGCN5 5'-gcggtaccctgtcgccattactc-3', el cual se diseñó al final del ORF. Las condiciones de la

reacción de PCR fueron las siguientes: 94°C 5 min, 30 ciclos de 94° 30 s, 64°C 30 s, 72°C 1 min y una extensión final de 72°C 8 min. Las reacciones para el PCR fueron como se describe en el apartado anterior.

2.4.6 Identificación del extremo 5'UTR mediante la técnica del RACE (Rapid Amplification cDNA Ends).

Se realizó el RACE 5' con el kit BD SMARTTMRACE cDNA Amplification (Clontech). Cada mezcla de reacción (10µL) contenía 5 µg de RNA total, 12 µM de oligo 5-RACE CDS (oligo dT modificado), 12 µM de oligo BD SMART II A (Switching Mechanism At 5'end of RNA Transcript), 1 mM de cada dNTP, 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 37.5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM DTT y 100 U de Transcriptasa Reversa (BD PowerScriptTM). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 70 °C 2 min, 42°C 90 min. El cDNA se diluye con 80µL de buffer 10mM tricina-KOH con 1 mM EDTA y se deja incubando a 72°C 7 min. Para obtener el RACE 5' por PCR se realiza un Master Mix que contiene agua grado PCR, mezcla de 200 µM dNTP, 40 mM tricina-KOH (pH 8.7), 15 mM KOAc, 3.5 mM Mg(OAc)₂, 3.75 ug/ml BSA, 0.005% Tween 20, 50x mezcla de Polimerasa Advantage BD, 1ul de cDNA, 0.2 µM de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos utilizados fueron: UPM (oligonucleótido universal), 5'-ctaatacgtactactatagggc-3', el cual reconoce la secuencia del oligo SMART y el oligonucleótido 3BAMYIGCN5 5'-gcggtaccctgtcgccattactc- 3', el cual se diseñó al final del ORF del YIGcn5. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 5 ciclos: 94°C 30 s, 72°C 3 min; 5 ciclos: 94°C 30 s, 70°C 30 s, 72°C 3 min; 30 ciclos: 94°C 30 s, 68°C 30 s, 72°C 3 min. Para el PCR anidado fueron de un volumen de 50 µl, que contenía: 1 µl de la reacción de RT, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Los oligonucleótidos utilizados fueron: NUP5 (Nested Universal Primer) 5'-aagcagtggatcaacgcagagt-3', RACE5 5'-cacaccatcaaagttgaagctgg-3', el cual se diseñó en el ORF y 5GCN5YIDREC 5'-tccgaatccatcggtgctcgtg-3', el cual se diseñó al inicio del ORF. Las condiciones fueron: 94°C 1 min, 30 ciclos de 94°C 30s, 65°C 30 s, 72°C 1 min y 72°C 8 min. Para confirmar el RACE 5' se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: RACE5 5'-cacaccatcaaagttgaagctgg-3' y el 5BAMYIGCN5 5'-cgggatccaacgatggattcgga-3', el cual se diseñó al inicio del ORF del YIGcn5.

2.5 Análisis fenotípico de las mutantes

2.5.1 Crecimiento de las mutantes.

La cepa parental (P01a) y la cepa mutante EOA75 se hicieron crecer en medio rico líquido y se dejaron en incubación a 28°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos por un período de 24 h (0, 6, 9, 12, 15, 17, 19, 21, 24 h). De estos cultivos se inocularon en medio mínimo (MM) líquido 3 veces para agotar nutrientes que requieren las células (c/ 24 h). Por último se incubaron en MM sin aminoácidos, con cada uno de los aminoácidos y con una mezcla de los tres aminoácidos (0.3mM histidina; 0.4mM triptofano; 1.5mM treonina a 28°C y se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 6, 9, 12, 15, 17, 19, 21, 24 h). Durante cada traspaso de medio de cultivo, ambas cepas se inocularon a una O.D de 0.05 a 600 nm.

2.6 Análisis de secuencias.

Para obtener alineamientos y árboles filogenéticos utilizamos los programas MegAlign (Dnastar, Madison Wisconsin) y Clustal (Higgins y Sharp, 1988). Las secuencias descritas que utilizamos para las comparaciones se obtuvieron del EMBL GenBank.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento del gen *YIGcn5*

Para aislar el gen *YIGcn5*, lo cual se logró en colaboración con el Dr. Juan Manuel González Prieto de la Unidad Irapuato del CINVESTAV del IPN, se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados en base a las zonas conservadas que comprenden los motivos C y A de las HATs de varios organismos (ver Materiales y Métodos). Estos oligonucleótidos se utilizaron en reacciones de (PCR) para amplificar un fragmento utilizando como molde DNA genómico de *Y. lipolytica*. De esta reacción de amplificación se obtuvo un fragmento inicial de 300 pb. La comparación de la secuencia de este fragmento mostró una alta homología con los genes que codifican HATs de origen fúngico (datos no mostrados). Este fragmento del gen, que se denominó *Gcn5*, se utilizó como sonda para realizar un escrutinio de una minigenoteca construida a partir DNA genómico de *Y. lipolytica* digeridos con *Pst1* (ver Materiales y Métodos). Se identificaron 6 clonas positivas, que hibridaron con el fragmento de este gen. A partir de una de ellas se realizó la secuenciación total del inserto de interés presente en el vector pDANICO (ver Materiales y Métodos). La secuencia de la clona mostró dos marcos de lectura abiertos (ORF), el primero de 1347pb que codifica una proteína de 448 aminoácidos, con homología con las RNA helicasas (dato no mostrado), el segundo ORF se subclonó al eliminar el fragmento *SacI* de 1.85 kb y se religó el resto del vector para dar lugar al pDANI, el cual contiene un ORF de 1395 pb (Fig. 2A), que codifica una proteína de 465 aminoácidos, la cual corresponde a la proteína GCN5 (Fig. 2B) con un peso molecular de 54.1 KDa y un punto isoeléctrico de 4.72. El porcentaje de nucleótidos del marco de lectura abierto es de A : (30.18 %), T: (20.36 %), C: (20.72 %) y G: (28.75 %). La región codificante de los genes de *Y. lipolytica* se caracteriza por una elevada proporción de citosina (C), como por ejemplo el gen LEU2 y XPR2 (Davidow *et al.*, 1987 A,B). Sin embargo en el gen *YIGcn5* la adenina es la base más abundante en el marco de lectura abierto y la proporción de A+T es de 50.4%.

La técnica RACE 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends) fue utilizada para conocer el sitio de poliadenilación, el cual mostró ser el residuo C localizado a +60 bases río abajo del posible sitio de terminación de la traducción (Fig. 2A). Una

secuencia consenso de poliadenilación (2141-2150 pb; TAGTGATATT) fue identificada a -23 pb río arriba del sitio de poliadenilación. Acorde con otros genes de *Y. lipolytica* (Pérez-Campo *et al.*, 1996), *YIGcn5* revela el motivo común de terminación transcripcional TAA...TAGT ó TATGT...TT. Por otro lado se realizó un experimento RACE 5' para conocer el sitio de inicio de la transcripción (+1). Después de secuenciar el producto de PCR obtenido del RACE 5', se localizó el posible sitio de inicio a +365 pb río abajo del ATG. Lo anterior sugiere que la extensión de la primera cadena (cDNA) no se completó y el cDNA no se obtuvo hasta el final. Para avalar esta hipótesis se realizó un RT-PCR (Fig 6C) con oligonucleótidos diseñados en el posible sitio de inicio y final de la traducción (Fig 2A) donde se obtuvo la banda del tamaño esperado (1400pb), lo cual indica que el inicio de la transcripción obtenido por RACE5' no es el correcto.

En diversos genes se ha observado que el codón de inicio de traducción en eucariotes es rodeado por bases púricas principalmente A en la posición -3 + 4, que son importantes para la unión del ribosoma al RNAm. (Kozak, 1983). Dicha característica se observa en la secuencia del gen *YIGcn5*.

Utilizando el programa Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), el cual localiza posibles promotores mínimos y el posible sitio de inicio de la transcripción (+1). Se encontró una posible caja TATA (TATATAATATA, 244-254pb) a -140 pb del sitio de inicio de la traducción. El programa estima que el tsp sería en la base T, localizada a -92pb del sitio de inicio de la traducción, a +36pb de la caja TATA. Adicionalmente, por medio del programa TRANSFAC (http://motif.genome.jp/motif-bin/Srch_Motif_Lib), el cual localiza posibles secuencias específicas que corresponden a determinados factores de transcripción, se analizó la región 5' del gen *YIGcn5*, utilizando como parámetro de homología un índice de 0.95. Se encontraron varias secuencias que hipotéticamente unen diversos factores de transcripción, entre ellas las secuencias consenso TATCTC, (Fu y Marzluf,1990), que reconoce el factor de transcripción NIT2, el cual regula la expresión de varios genes del metabolismo de nitrógeno bajo condiciones de limitación de fuentes nitrogenadas, y que se localizó a -119pb del inicio de la traducción (Fig. 2C). EL motivo CATCGCGTGT, que une al factor de transcripción

StuAp (Dutton *et al.*, 1997), el cual regula principalmente genes involucrados en el desarrollo, se localizó -114 pb del inicio de la traducción. Se encontraron varios motivos que unen al factor de choque térmico (HSF): El motivo AGAAA (Fernández *et al.*, 1994) se localizó a -246 pb y -200 pb, y el motivo GGAAA a -25 pb del inicio de la traducción. Por último el motivo TCCCCA, que une a la proteína reguladora ADR1 (Cheng *et al.*, 1994) se encontró a -175pb del codón de inicio de la traducción (Fig. 2C).

El alineamiento de la secuencia de la proteína *YIGcn5* hipotética, con otras acetiltransferasas, mostró un 67% de similitud con la proteína GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae*, 64.7% con la de *Candida glabrata*, 49.8% con la de *Ustilago maydis*, 49.6% con la de *Schizosaccharomyces pombe*, 65.7% con la de *Kluyveromyces lactis*, 33.4% con la *Mus musculus*. y 33.6% con la *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana* (Fig 3). Los dominios que se han caracterizado en GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae* son los que pertenecen a la familia GNAT, los cuales son las llamadas cajas A, B, C y D que confieren la actividad de histona acetiltransferasa (HAT) (Browell *et al.*, 1996; Candau *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1998; Sterner y Berger, 2000). Las cajas A y B corresponde al sitio de unión del sustrato donador del grupo acetilo, que es la acetil coenzima A, y cuya secuencia es: FAEIVFCAISSTEQVRGYGAHLMNHLKD y FLTYADNYAIGYFKKQGFSKEITLD, respectivamente. La caja C corresponde al centro catalítico en común que tienen las acetiltransferasas de tipo A y B, cuya secuencia es: LKNIFQKQLPKMPREYIARLVYDRSHVSMA. La caja D corresponde al sitio de interacción con la proteína ADA2, cuya secuencia es: GYIKDYEGGTLMQCSMLPRIRYL. La región del bromodominio tiene la secuencia:SAWPFAQAVNRDEVDPDYEEVIKEPMDLSTMEQRLEADSYKTMEEFVYDARLVFNCRAYNNETYY (Fig. 4) (Haynes *et al.*, 1992; Brownell *et al.*, 1996).

3.2 Obtención de mutantes ($\Delta gcn5$) por reemplazo del gen.

El gen *YIGcn5* fue interrumpido utilizando el método de "inserción- escisión" descrito en la sección de Materiales y Métodos. Para ello se utilizó el plásmido pDANI-2 linearizado por digestión con *NheI*. Un esquema del método se muestra en las Figuras 5A y 5B. Por medio de un análisis de hibridación tipo Southern blot se

seleccionaron las transformantes que tenían integrada la copia mutada del gen *YIGcn5* vecina al alelo silvestre de acuerdo al tamaño esperado y se corroboró por PCR, lo cual corresponde al primer paso de integración ("*pop in*", datos no mostrados). Posteriormente una de las cepas transformadas que poseían ambas copias del gen (transformante No. 7), se sembró en medio mínimo con 5-FOA. Las clonas que crecieron en este medio se sometieron a un análisis de PCR y RT-PCR (ver Materiales y Métodos), para identificar aquellas que habían perdido el alelo silvestre (Figs. 6A , 6B y 6C). Se seleccionaron dos mutantes denominadas EOA75 y EOA76.

3.3 Determinación del fenotipo de las mutantes $\Delta gcn5$

El crecimiento de la cepa mutante EOA75 y la cepa parental P01a se analizó en medio rico líquido. La mutante EOA75 mostró una tasa de crecimiento similar a la cepa parental (Fig. 7A). Sin embargo, cuando ambas mutantes se transfirieron del medio rico a un medio mínimo, satisfaciendo las auxotrofias con uracilo y leucina, las mutantes mostraron una disminución del 55% en su tasa de crecimiento en comparación con la cepa parental (Fig. 7B). En estudios sobre GCN5 en *S. cerevisiae* se ha descrito que está involucrado en la activación del factor de transcripción GCN4, el cual interviene en la regulación de las vías de biosíntesis de aminoácidos, cuando las levaduras se encuentran en un estado de carencia de aminoácidos (Georgapoulos y Thireos, 1992).

Se utilizó la cepa mutante EOA75 y la cepa parental P01a para estudiar su crecimiento en medio mínimo pero ahora adicionándole los siguientes aminoácidos: histidina (0.3 mM) triptofano (0.4 mM) treonina (1.5 mM). Se observó la recuperación del crecimiento de la mutante al adicionar aminoácidos, mostrando que el triptofano es el aminoácido que mejor restablece el crecimiento de la mutante nula $\Delta gcn5$ en *Y. lipolytica* con un 69.1% de recuperación del crecimiento con respecto a la cepa en medio mínimo sin este aminoácido. En el caso de la treonina e histidina se tiene un 36.15% y un 47%, respectivamente de recuperación del crecimiento con respecto al crecimiento de la misma en un medio mínimo sin la presencia de aminoácidos (Fig. 8A). Posteriormente se realizó un experimento en medio mínimo con los 3

aminoácidos (histidina, treonina y triptofano), en el cual la mutante presentó un crecimiento semejante al de la cepa parental obteniendo un 90.58% de recuperación en crecimiento (Fig. 8B). Como se mencionó anteriormente, las mutantes *gcn5-1* de *S. cerevisiae* presentan un crecimiento pobre en condiciones de limitación de histidina, triptofano, treonina, valina e isoleucina (Georgapoulos y Thireos, 1992). Esto concuerda con lo observado en *Y. lipolytica* con los aminoácidos histidina, triptofano y treonina.

3.4 Análisis del dimorfismo de la mutante $\Delta gcn5$ de *Y. lipolytica*

En nuestro grupo de trabajo recientemente se obtuvo una mutante del gen *Gcn5* en *Ustilago maydis*, y se observó que se encontraba afectada en la transición levadura-micelio (dimorfismo), por lo cual se decidió analizar el fenotipo del dimorfismo en la mutante $\Delta gcn5$ de *Y. lipolytica*. Para esto se realizó la transición dimórfica bajo diferentes condiciones que favorecen a la miceliación en dicho hongo, como es el pH neutro y la presencia de citrato (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002). Se observó que la mutante EOA75 presentó crecimiento micelial parcial en medio mínimo a pH 3 (Fig. 9C), mientras que la cepa parental P01a crecía únicamente en forma de levadura a ese pH (Fig. 9A). A pH 6 ambas cepas crecieron como micelio (Figs. 9B y D). Se realizó la transición dimórfica de la mutante agregándole ciertos aminoácidos (histidina, treonina y triptofano) en el medio mínimo en pH 3 y 6. Se observó que la mutante (Figs. 9G y H). presentó el mismo comportamiento que la cepa parental P01a.(Figs. 9E y F).

4. DISCUSION

En los organismos eucariotes, la expresión génica está fuertemente influenciada por el empaquetamiento del DNA dentro de la cromatina por medio de proteínas que se unen al material genético (Grant y Berger, 1999), además de modular otros procesos nucleares como la replicación, la recombinación y la reparación del DNA (Narlikar et al., 2002; Bannister y Miska, 2000). Existen mecanismos como la acetilación de histonas y de factores de transcripción, que es proceso dinámico que regula el reordenamiento de la cromatina, sobre todo en las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (Bannister y Miska, 2000) y en la deposición de las histonas durante el ensamblaje del nucleosoma (Grant y Berger, 1999) mediante la intervención de las enzimas acetiltransferasas. En el presente estudio hemos caracterizado una mutante nula $\Delta gcn5$ de *Yarrowia lipolytica* con la finalidad de analizar el papel de este gen en la activación de la transcripción.

El aislamiento y la caracterización del gen *YIGcn5* reveló una gran similitud de la proteína codificada con sus homólogos de otros hongos, además de otras características importantes. El gen presenta una posible caja TATATAATATA, en relación con los datos ya reportados para promotores eucarióticos y en particular de levaduras (TATAAA) (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4C1.htm>). La región no traducible 3' (UTR 3') con un tamaño de 60 pb, presentó el consenso común de terminación transcripcional reportado para esta levadura (Pérez-Campo, 1996). En esta secuencia (UTR 3') se identificó una posible secuencia consenso de la señal de poliadenilación, a -23 pb del sitio de adición del poli(A).

Utilizando el programa TRANSFAC (http://motif.genome.jp/motif-bin/Srch_Motif_Lib), el cual localiza posibles secuencias específicas de unión para determinados factores de transcripción, se analizó la región 5' del gen *YIGcn5*. Entre los motivos identificados, resalta el sitio de unión para el factor de transcripción NIT2, el cual regula la expresión de varios genes del metabolismo de nitrógeno bajo condiciones de limitación fuentes nitrogenadas (Fu y Marzluf, 1990). Se ha descrito que GCN5 está involucrada en la inducción de la expresión de los genes de la biosíntesis de ciertos aminoácidos en *S. cerevisiae* (Georgakapolous y Thireos, 1992),

por lo que la pérdida de GCN5 produce un crecimiento pobre en condiciones de limitación de aminoácidos. Por lo anterior es posible que la secuencia encontrada en el promotor hipotético de *YIGcn5* que une al factor NIT2 sea funcional. Análisis por delección del promotor y de “*foot printing*” ayudarán a determinar la funcionalidad de las secuencias consenso de NIT2 para el gen *YIGcn5*.

Se ha reportado que la proteína GCN5 de *S. cerevisiae* de 440 aminoácidos contiene un dominio catalítico (HAT) que se localiza entre la región de 170-253 aminoácidos. El dominio HAT está compuesto por cuatro motivos específicos altamente conservados en la familia GCN5 de acetiltransferasas (Browell *et al*, 1996; Candau *et al.*, 1997). En estudios de la mutante *gcn5-1* de *S. cerevisiae*, se determinó que se requiere del dominio catalítico (HAT) de dicho gen junto con el dominio de interacción con ADA2 (aminoácidos 253-350) para llevar a cabo la activación transcripcional y el crecimiento adecuado de *S. cerevisiae* (Candau *et al*, 1997).

Para obtener la mutante nula de *Y. lipolytica*, la estrategia para su interrupción fue basada en la técnica descrita por Boeke (1987), denominada inserción-escisión (*pop-in pop-out*). Se eliminó gran parte del marco de lectura abierto, incluyendo todo el dominio HAT. Con este método se obtuvieron dos mutantes, denominadas EOA75 y EOA76, las cuales se confirmaron por PCR. La mutante presentó un fenotipo similar a la cepa parental P01a cuando crecieron en medio rico líquido. En cambio cuando la mutante se transfirió de medio rico a medio mínimo, la mutante mostró una disminución del 55% en su tasa de crecimiento en comparación con la cepa parental. Este fenotipo de disminución del crecimiento de las cepas, se asemeja al de las mutantes *gcn5-1* de *S. cerevisiae* en medio mínimo con condiciones limitantes de aminoácidos (Georgakopoulos y Thireos, 1992). En cambio, cuando se le adicionó histidina, treonina, triptofano (por separado o juntos) a la cepa EOA75 en medio mínimo, mostró una recuperación en su crecimiento. Lo anterior sugiere que el gen *YIGcn5* está involucrado en la regulación de la biosíntesis de aminoácidos en *Y. lipolytica*. De acuerdo a nuestros resultados, se ha reportado que en la mutante *gcn5-1* de *S. cerevisiae*, la expresión del gen *His3* no se activa complementamente en condiciones limitantes de histidina en comparación a la cepa silvestre, donde el transcrito se induce en esta condición. *His3* codifica para la enzima imidazolglicerol

deshidrogenasa, la cual interviene en el tercer paso de la ruta de la biosíntesis de histidina (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

5. BIBLIOGRAFIA

Bannister AJ, Miska EA. (2000) Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci.* 57, 1184.

Berger S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., Triezenberg, S.J. and Guarente, L. (1992) Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell.* 70, 251-265.

Berger, S.L. (1999). Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 336-341.

Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. and Fink, G.R. (1987). 5-Fluororotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Meth. Enzymol.* 154, 164-174.

Brandl, C.J., Martens, J.A., Margaliot, A., Stenning, D., Furlanetto, A.M., Saleh, A., Hamilton, K.S. and Genereaux, J (1996). Structure/Function Properties of the Yeast Dual Regulator Protein NGG1 That Are Required for Glucose Repression. *J.Biol.Chem.* 271, 9298-9306.

Browell, J.E., Zhou, J., Rnalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell.* 84, 843-851.

Candau, R., Zhou, J., Allis, C.D. and Berger, S.L. (1997) Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function *in vivo*. *EMBO. J.* 16, 555-565.

Cheng, C., Kacherovsky, N., Dombek K.M., Camier, S., Thurkal, S.K., Rhim, E. and Young E. T. (1994). Identification of potential target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. *Mol. Cell.Biol.* 14, 3842-3852.

Chomczynski and Sacchi (1987) Step method of RNA isolation by acid guanidinium iso thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159

Davidow, L.S., Kaczmarek, F.S., DeZeeuw, J.R., Conlon, W., Lauth, M.R., Perira, D.A. and Franke, A.E. (1987) The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Curr.Genet.* 11, 377-383.

Dutton, J.R., Johns, S. and Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence- specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 16, 5710-5721.

Eberharter, A., Sterner, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., III, Berger, S.L., and Workman, J.L. (1999) The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6621–6631.

Fernández, M. Xiao, H. and Lis, J.T (1994) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharo,yces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* 22: 167-173.

Fu, Y.H. (1990) Nit-2 the Major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 87, 5331-5335.

Georgakopoulos, T. and Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* 11, 4145-4152.

Grant, P.A. and Berger, S.L. (1999) Histone acetyltransferases complexes. *Cell & Dev. Biol.* 10, 169-177.

Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R, Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal

histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Dev.* 11, 1640-1650.

Guevara-Olvera, L. Calvo-Mendez, C. and Ruiz-Herrera, J. (1993) The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J.Gen.Microbiol.* 139, 485-493.

González-Prieto, J.M., (2003) Análisis de algunos genes involucrados en la remodelación de la estructura de la cromatina en hongos dimórficos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I:P:N- Unidad Irapuato.

Higgins D.G. y Sharp P.M (1988) Clustal: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.

Haynes, S., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J. and Dawid, I. (1992) The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 20, 2603.

Hoffman, C.S. and Wriston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57, 267-272.

Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S., and Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717–728.

Kornberg, R.D. (1999) Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol.* 9, 46-49.

Kozak, M. (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes and organelles. *Microbiol Rev.* 47, 1-45.

Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E.A. and Allis. C.D. (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes & Dev.* 12, 627-639.

Lee, T. I., Causton, H.C., Holstege, F.C., Shen, W. C., Hannet, N., Jennings, E.G., Wisnton, F., Green, M. R. and Young, R. A. (2000) Redundant roles for the TFIIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature.* 405, 701-704.

Marcus, G.A., Silverman, N., Berger, S.L., Horiuchi, J. and Guarente, L. (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO. J.* 13, 4807-4815.

Narlikar, G.J., Hua-Ying Fan and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell.* 108, 475-487.

Pérez-Campo, F.M, Nicaud, J.M., Gaillardin, C and Domínguez, A. (1996) Cloning and sequencing of the *LYS1* gene encoding homocitrate synthase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast.* 12, 1459-1469.

Roberts, S.M., and Winston, F. (1997) Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* 147, 451–465.

Rodriguez, C. and Dominguez, A. (1984) The growth and characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Can. J. Microbiol.* 30, 605-612.

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

Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64, 435-459.

Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Dev.* 12, 599-606.

Tauton, J., Hassing, C.A. and Schreiber, S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcription regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.

Vlachonasios, K.E., Thomashow, M.F. and Triezenberg, S.J. (2003) Disruption Mutations of *ADA2b* and *GCN5* Transcriptional Adaptor Genes Dramatically Affect Arabidopsis Growth, Development, and Gene Expression. *The Plant Cell.* 15, 626-638.

Wolfe, A.P. and Pruss, D. (1996) Targeting Chromatin Disruption: Transcription Regulators that Acetylate Histones. *Cell.* 84, 817-819.

Xu, W., Edmondson, D.G., Evrard, Y.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Roth, S.Y. (2000) Loss of *Gcn512* leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat. Genet.* 26, 229–232.

Xuan, J.W., Fournier, P. and Gaillardin, C. (1988) Cloning of the *LYS5* gene encoding sacharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration. *Curr. Genet.* 14, 15-21

Yamauchi, T., Yamauchi, J., Kuwata, T., Tamura, T., Yamashita, T., Bae, N., Westphal, H., Ozato, K., and Nakatani, Y. (2000) Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11303–11306.

6 ANEXOS

Leyendas de figuras

Fig. 1. Estructura del nucleosoma que está compuesto por aproximadamente 146pb de DNA y un octámero de histonas

Fig. 2. A) Identificación del marco de lectura abierto, inicio y final de la traducción, sitio de adición de poli(A) y la señal de poli(A) del gen *YIGcn5* de *Yarrowia lipolytica*. B) Secuencia de aminoácidos de la proteína GCN5 de *Y. lipolytica*. C) Análisis *in silico* de posibles secuencias específicas de unión a diversos factores en la región 5'UTR del gen *YIGcn5* de *Y.lipolytica*.

Fig. 3. Arbol filogenético de las proteínas GCN5 de varios hongos y otros organismos: Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Cg, *Candida glabrata*; Um, *Ustilago maydis*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Kl, *Kluyveromyces lactis*, Yl, *Yarrowia lipolytica*,.Hs, *Homo sapiens*, Mm, *Mus musculus* y At *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 4. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas GCN5 de diversos hongos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica* (se usaron las mismas abreviaturas de la Fig. 3) Se muestran las cajas conservadas del sitio catalítico (A,B,C,D) y el sitio del bromodominio.

Fig. 5. Estrategia para la obtención de las mutantes $\Delta gcn5$ de *Yarrowia lipolytica*. A) Integración simple (Pop in). B) Recombinación y pérdida (Pop out).

Fig. 6 Identificación de las mutantes $\Delta gcn5$ de *Y. lipolytica* mediante PCR. A) carril 1 marcador de peso molecular; carril 2, P01a *ura3+*(Pop in); carriles 3-4, P01a *ura3-* (Pop out); carril 5, P01a parental. Los oligonucleótidos 5' y 3' utilizados fueron diseñados al inicio y al final del marco de lectura abierto (ORF). B) carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, P01a parental; carril 3, P01a *Ura3+* (Pop in); carril 4-6, P01a *ura3-* (Pop out). Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5' diseñado al inicio del ORF y 3'

diseñado a 400 pb río arriba del codón de término de la traducción. C) RT-PCR de la mutante EOA75 y la parental P01a. Los oligonucleótidos 5' y 3' utilizados fueron diseñados al inicio y al final del (ORF).

Fig. 7 A) Curva de crecimiento de la cepa parental P01a y mutante EOA75 de *Yarrowia lipolytica*. Ambas cepas se inocularon (O.D 0.05) a 600nm en medio rico a 28°C. B) Curva de crecimiento de la cepa P01a parental y la mutante EOA75 de *Y. lipolytica*. Ambas cepas se incubaron a 28°C en medio YPD por un período de 24 h. Posteriormente se transfiere por 3 ciclos a MM (c/24 h). Por último se incuban en MM (OD 0.05) a 600nm

Fig. 8 A) Comparación del crecimiento de la cepa parental y de la mutante EOA75 de *Y. lipolytica* en medio mínimo conteniendo diferentes aminoácidos (0.3mM Histidina (His); 1.5mM Treonina (Treo); 0.4mM Triptofano (Trip) y sin aminoácidos. B) Comparación del crecimiento de la cepa parental y de la mutante EOA75 de *Y. lipolytica* en medio mínimo conteniendo aminoácidos (0.3mM Histidina (His);1.5mM Treonina (Treo); 0.4mM Triptofano (Trip); con los tres aminoácidos y sin aminoácidos.

Fig. 9. Fenotipo de dimorfismo de la mutante EOA75 (C) y de la cepa parental (A) en medio mínimo con glucosa a pH3, y en medio mínimo con N-acetilglucosamina a pH 6 (B, D) sin la presencia de aminoácidos. Fenotipo de la mutante EAO75 (G) y parental P01a (E) en medio mínimo con glucosa a pH3 y en medio mínimo con N-acetilglucosamina a pH6 (F y H respectivamente), ambos con la presencia de aminoácidos (0.3mM Histidina; 0.4mM Triptofano y 1.5mM Treonina) a las 22 h.

Figura 1

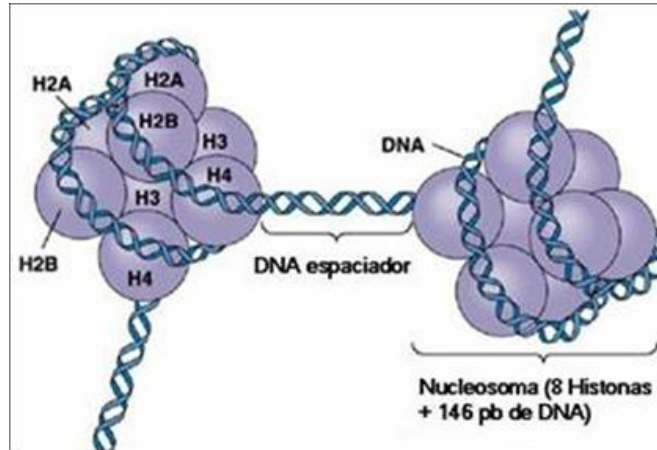


Figura 2

A)

```

GAGCTCGCTTGAGGACTTGAACGAGGCGTACTACACCCCAAGGAGTTGTGAAGCGAGAGGAGCCCAAGAATCCATGCATTGTTCC
CAAGTGGAGGAGGACCTTATATCACCCCTGTTGAACATATACGAATCCGCGTGTACACCAAACTGAAACACACGAGATGGTTTGTGAGCAT
TTTCTCAACTACCAAAATGATCAGGATGGCTACAACATTCGCCACGAGCTAGCTTCTGTTATTGGTGTGGAGCCGTAACGCCGATAAAGAT
GAGCAGATGACCGGTTGCTTGGAGATCGTGAAGAGGTATTTGACGAGTAACAATAAATTTAATGTATTATTGACACTACATATGTGCT
TAGGACTATTGACTACAAGTATTTACTCTACTGTACAGTATCGGATATGGTCAAGATCGCTTGTGCTGTGAGCTTACATAAGCAATAAAC
AGAAAAATGCACATGAATACTTAGAGCCGATGGTATTGAAAGCCAAGAGAAATGGCATTCTTAGTAATAGAGTCCCAAAGCATTTAACCACT
TGCTTACCTCATCTATAATAATAAATAGCCACCTATCTCATCGCGTGTTTCTTAGAATTCGACTGGGTGAAGTGAACAAGTTCCGAAATAT
GTGCAATATGTAAGTTGGTAACAACACCTTGATTGAAAAAGGACGACACAGGAGCAACGAGCAACGAGCAACGAGCAACGAGCAACGAGCA
ctccgggtccgaaagcgaagtcgagcgtgcgagatccgaaacgaaccaagattgaagatgaggtttccaggagaacggcatagacgatgaggatgaggagggaagagggaag
ctaaggacgaaggggatgaagacgacgaagaaaaaggagagcagcagaggagcagatgaagaaaaaaggcggaggatggagaaggagagggaaggaagcgaagaggagga
tgaggagaagaagcgaagggaggaggaagtagctaccagctcaacttgatggttggaaatacaagtaacaagagcgaccagcagtgattgaggagcgtgaaggaaagattgaatt
tcgtgtgtcaacaacgataacctcaaggaaaacctcatgatcctgacaggtctcaagaacatttccagaacagctgccaaaaatgcctcgagagtacattgccgactagtgtacgacag
aagtcattgtcaatggcagttgtgaaagcctctcacgggtggtcggaggaaattacattcggcgtgataccggaaagtttctgaaatcgtcttctgtccatcagtagtacagagcagg
tccgaggatcggagcgcacttgatgaaccattgaaggactcgttaaggctacatcgctgtgatcttctgacatacgcgataactatgccattggatactcaaaaagcagggttct
ccaaggagatccctcgacagatcgggtggtgagatgggatacaaggattacgagggaggtactctcatgctgctccatgctccacgaatcagatacctgacgtcaacaagattctct
gctcagaagcactgattcaagaagatccgggcatctcaagagtcattgtgcaaaagcctcgaccacttctgattcgaccagccagtgagccatgacgatccggggc
ttgaaggagctggatggacacctgagatggacgagttggtagacgacaaagcaggtcctcatttgcagtcagcagcagtgctgagagttgcagaaccagctctgcttggcc
gtttgccaggctgtaaccgagacgaggtgccgactactgaggtcattaaggagccatggatcctcaacgatggagcaacgctcgaagctgactcttaaacgacctgaggaggt
ttgtgatgacgctgggtgttcaataactgtcgtctcaacaacgagacgacgactactataagaatgccaacaagctagagaagttcatggtggccaaaatcaagagatccctga
gtactctcatttgggtgagtaTGGCGACAGGGATGCACGTAATTTTATGTACAAATAGTGTATTAAATGAATGCGATGCAATTTATTTA
GATCAATATACTAATATCTTGACGGAAGTACACAGGTTGGTCATCCATTTATACTGTAAGTACACAATTCACGTATATCTAAACTTCAATTGCA
ATATCGTTACACCTGCTCCTCATCGCAACCTCGGAATCGAGCTTAGCAACAACACTGACCATCTTATCATCGTGTAAATCTTGAATCCCTC
AGACTTAGTCACGCTGGAAGCTGGACGTTCTTGCTATCGAGCTTCTCCTCCATAACCTGCTTGAGAATCTTGAGAACAAGGACCTCGCCCT
CCTCGAGAGTCATGTCCTTGTGGTATTCTGTTCTGAAGCTCGGCTGAGCACCCTCGCTACCACTGCCAATAGCCTTGGCCTGTATCTGTAG
AAGGTTCTGATGGCTCAGCATGGTAGAGCTGGGCTCCATGGTCATCATATCCAGCAATGAGAAAGAGCGACACCGAAAGGACGAGAC
ATGATTCGCTCCTACCCTCAGCACCTCACCGAATCGCAGAGCAAAATCACACACTGCTTGGGTCACCGTCTCAACGTTTATGGGCTCATC
ATAGTATAGGTCATGTTGGACAGACTCCACTCGCGGTGGTCAATCATGTTCCGGCA
    
```

■ Inicio de la traducción ■ Final de la traducción ■ Sitio de adición de poli(A)
■ ORF (marco de lectura abierto) ■ Señal de poli (A)

Figura 2

B)

MSDTESVKRRKSSGSESESSVRDPKRTKIEDEDFQENGIDDEDEEEEEEEAKDEGEDDEEEKGE
DDEEDDEEKEGEDGEGEEDEEEDEEEKREEEEKYVTSFNFDGVEYKYKERPAVIEEREGKIEFRV
VNNDNSKENLMILTGLKNIFQKQLPKMPREYIARLVYDRSHVSMVVRKPLTVVGGITFRPFDRKF
AEIVFCAISSTEQVRGYGAHLMNHLKDYVKATSPVMYFLTYADNYAIGYFKKQGFSSKEISLDRSVWM
GYIKDYEGGTLMQCSMLPRIRYLDVNIKILLQKALIHKKIRAIKSHVVRKGLDHFDRDSTTPVDPMTIP
GLKEAGWTPEMDELARRPKRGPFAVMQHVLSLQNHASAWPFAQAVNRDEVDPDYEEVIKEPMD
LSTMEQRLEADS YKTMEEFVYDARLVFNCRAYNNETTTYKNANKLEKFMVAKIKEIPEYSHLVE

C)

CAACTATAAATTTTAATGTATTTATTGACACTACATATGTGCTTAGGACTATTGTACTACAAGTA
TTTACTCTACTTGTACAGTATCGGATATGGTCAAGATCGCTTGTTGCTGTGAGCTTACATAAGC
AAATAAACagaaaATGCACATGAATACTTAGAGCCGATGGTATTGAAAGCCAAGagaaaTGGCA
TTCTTAGTAATAGAGtcccaAAGCATTTTAACACCTGCTTACCTCATCtatataatataAATAGCC
ACCtatctcatcgcgtgtTCTTTAGAATTCGACTGGGTGAAGTGAACAAGGTTCCGAAATATGTGCA
ATATGTAAGTTGGTAACAACACCTTGATTggaaaaAAGGACGACACGAGCCAACGATG







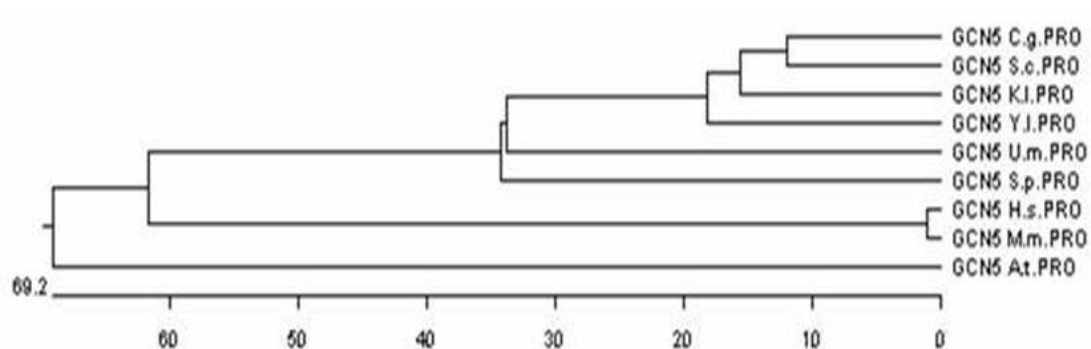
-  Caja TATA
-  Inicio de Transcripción
-  HSE (elemento de choque térmico)
-  ADR1 (Proteina alcohol deshidrogenasa)
-  NIT2
-  StuAp (factor de transcripción)

Figura 3

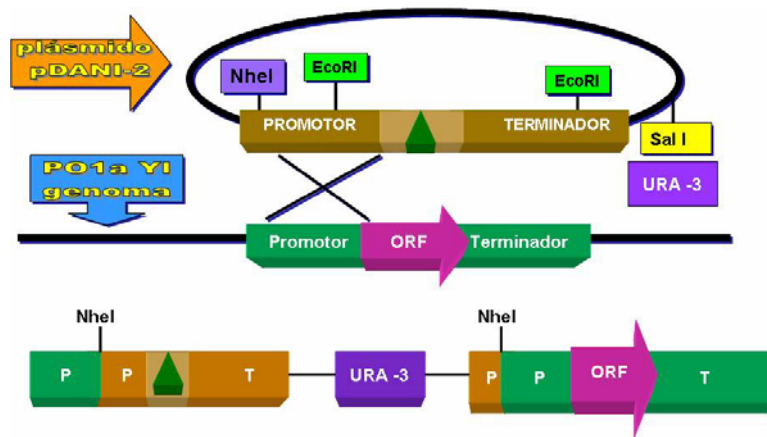


	% homología de la proteína GCN5 de <i>Y. lipolytica</i> con otros hongos
<i>S. cerevisiae</i> (Sc)	67
<i>C. glabrata</i> (Cg)	64.7
<i>U. maydis</i> (Um)	49.8
<i>S. pombe</i> (Sp)	49.6
<i>K. lactis</i> (Kl)	65.7

	% homología de la proteína GCN5 de <i>Y. lipolytica</i> con otros organismos
<i>H. sapiens</i> (H.s)	33.6
<i>M. musculus</i> (Mm)	33.4
<i>A. thaliana</i> (At)	33.6

Figura 5

A)



B)

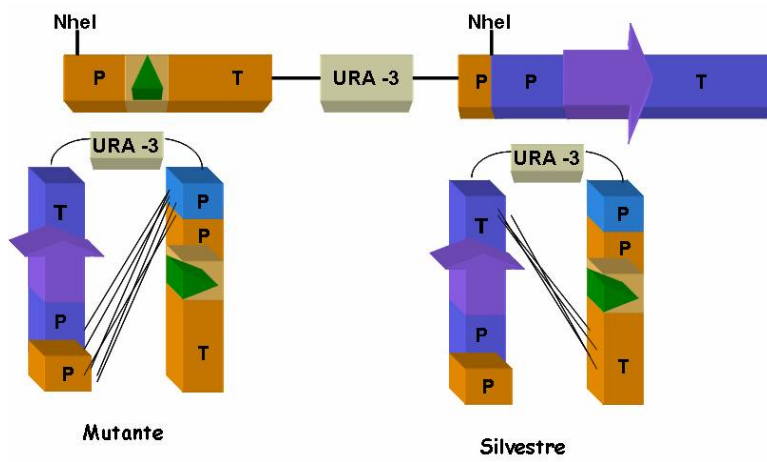
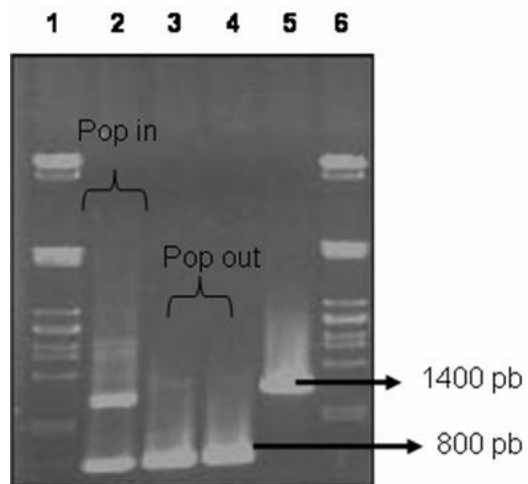
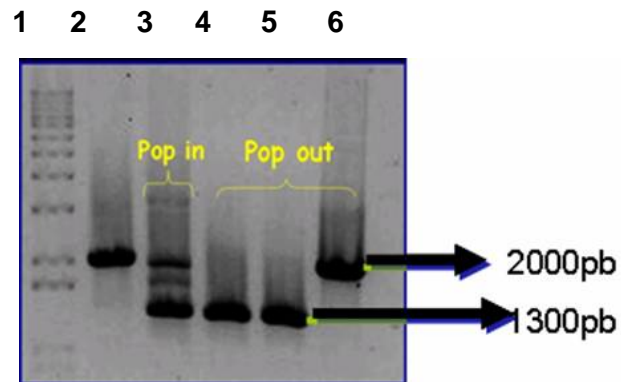


Figura 6

A)



B)



C)

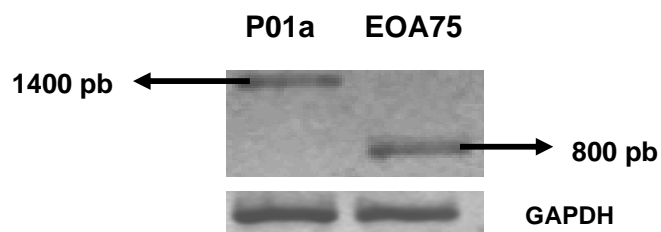
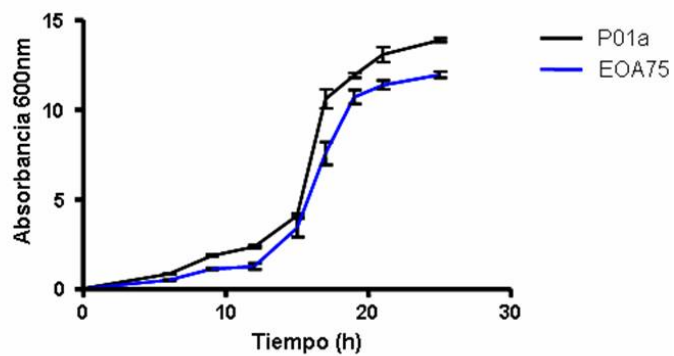


Figura 7

A)



B)

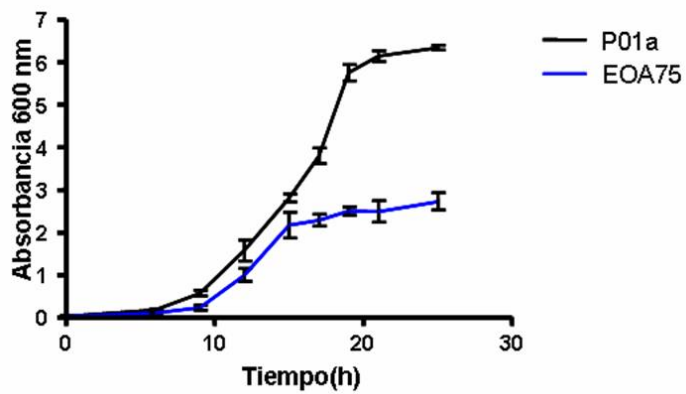
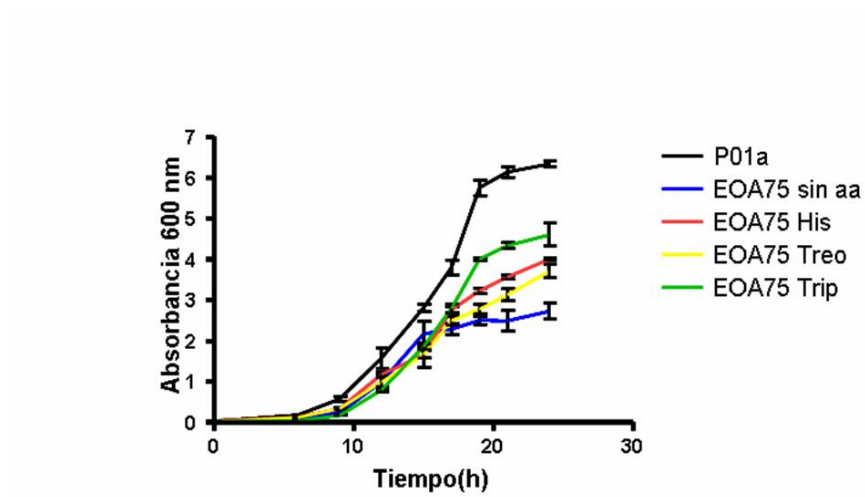


Figura 8

A)



B)

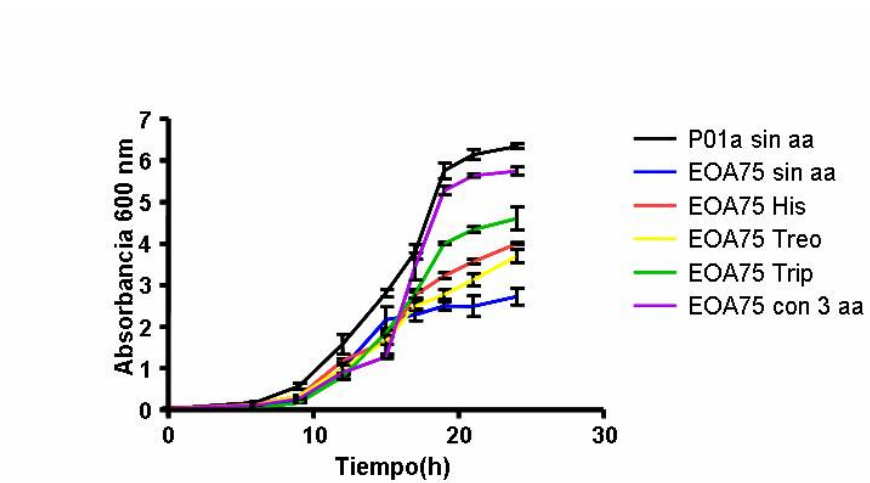


Figura 9

