

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES FACULTAT DE MEDICINA UNIVERSITAT DE LLEIDA

Rcs1 COMO FACTOR TRANSCRIPCIONAL IMPLICADO EN LA ASIMILACIÓN DE HIERRO Y EL METABOLISMO RESPIRATORIO EN Saccharomyces cerevisiae

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGIA PRESENTADA POR

Celia Casas Herranz

UNIVERSITAT DE LLEIDA Biblioteca

1600116230

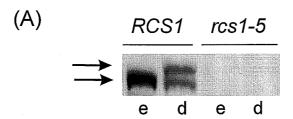
396

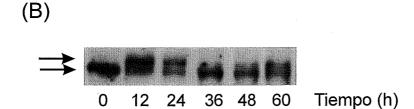
Estudios de Northern revelaron que los niveles de mRNA para RCS1 permanecían prácticamente invariables en los diferentes estadios de la curva poblacional, utilizando los niveles de mRNA para la actina como control (dato no mostrado). De igual modo sucedía con los niveles de proteína, aunque en este caso pudo detectarse también una banda de menor movilidad (100 Kda) que aparecía coincidiendo con la entrada en fase diaúxica y se mantenía durante estadios posteriores (Fig. 12a).

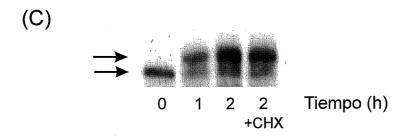
A continuación se estudió si esta misma modificación aparecía cuando las células se transferían de un medio con glucosa a un medio con etanol más glicerol. Los resultados mostraron que la banda de menor movilidad aparecía durante la transición y desaparecía cuando las células reemprendían el crecimiento utilizando el etanol/glicerol como fuente de carbono (Fig. 12b).

La misma modificación pudo observarse cuando a células creciendo exponencialmente en medio YPD se les extraía la glucosa del medio. Dicha modificación seguía produciéndose si al mismo tiempo que se eliminaba la glucosa se añadía cicloheximida al medio, indicativo de una modificación postraduccional (Fig. 12c).

Dado que la modificación por fosforilación constituye un mecanismo muy general y extendido de regulación de la actividad de numerosas proteínas y teniendo en cuenta el cambio de movilidad observado, se analizó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina si la banda de 100 kDa. correspondía a una forma modificada de Rcs1 por fosforilación. Para ello, se obtuvieron extractos de células de la cepa salvaje procedentes de un cultivo en YPD en el que se había inducido la aparición de la forma fosforilada por eliminación de la glucosa, a partir de los cuales se immunoprecipitó Rcs1. El material immunoprecipitado se trató con fosfatasa alcalina sola o junto con una mezcla de inhibidores de la misma (véase apartado 13.5 de Materiales y Métodos), analizándose las mezclas de reacción mediante Western blot (Fig. 12d). La banda de menor movilidad desaparecía durante el tratamiento con fosfatasa alcalina en ausencia de inhibidores, pero no en presencia de éstos, lo que demostraba que se trataba de una forma modificada de Rcs1 por fosforilación.







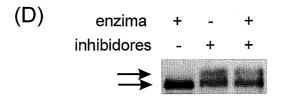


Figura 12. Análisis mediante Western de la proteína Rcs1 en diferentes condiciones de crecimiento de la cepa *RCS1* (CML128). Las flechas inferior y superior corresponden a la forma hipo e hiperfosforilada de Rcs1 respectivamente. (A) Células creciendo exponencialmente (e) o en el periodo post-diáuxico (d). (B) Células creciendo exponencialmente en SD-glucosa y transferidas a tiempo 0 a SD-etanol/glicerol. (C) Células creciendo exponencialmente en medio YPD y transferidas a tiempo 0 a medio YP. Se muestra también el patrón correspondiente a células transferidas a YP y mantenidas durante 2 h en presencia de 10 μg/ml de cicloheximida (+CHX). (D) Proteína Rcs1 inmunoprecipitada y tratada con fosfatasa alcalina de intestino de ternera y con una mezcla de inhibidores de esta enzima.

3.4. Fosforilación de Rcs1 en condiciones que inducen la parada del crecimiento celular en G1

La fosforilación de Rcs1 en las condiciones anteriormente descritas parece ser concomitante con un cambio en el estado nutricional de las células, que comporta al mismo tiempo una detención transitoria (en el caso del shift diaúxico o de la transición a etanol) o permanente (en el caso de la eliminación de la fuente de carbono) de su crecimiento. Se analizó a continuación si la detención específica del ciclo celular en la fase G1 del mismo provocaba también la modificación de la proteína. Se utilizaron para ello dos mutantes termosensibles en los genes *CDC28* y *CDC25*, los cuales al ser transferidos a la temperatura restrictiva (37° C) detienen su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular (Koch y Nasmyth, 1994). Un cultivo control (cepa salvaje para ambos genes) se sometió también al mismo cambio térmico que los mutantes *cdc28* y *cdc25*. Los resultados mostraron que Rcs1 se fosforila en ambos mutantes a la temperatura restrictiva y que este hecho no era mera consecuencia del cambio de temperatura (Fig. 13a). En contraposición a lo anterior, la parada transitoria en G1 inducida por factor α no indujo la modificación de la proteína.

3.5. Fosforilación de Rcs1 en mutantes deficientes en diferentes proteínaquinasas

La fosforilación de Rcs1 a lo largo del ciclo poblacional coincide con la entrada en fase diaúxica, que a nivel metabólico representa una fase de transición de un metabolismo fermentativo a otro respiratorio. Coincidiendo con esta fase, la actividad de ciertas proteína quinasas disminuye, en tanto que la de otras aumenta (Werner-Washburne et al., 1993). Entre las primeras se encontraría la proteína quinasa A dependiente de cAMP y entre las que se activan cabría citar Snf1 y Yak1 entre otras.

El papel de la proteína quinasa A dependiente de cAMP así como el de la quinasa Snf1 han sido comentados en apartados previos de este trabajo. Los resultados expuestos hasta aquí no sugieren una implicación de las mismas en la fosforilación de Rcs1. No obstante, se descartó definitivamente esta posibilidad mediante análisis de Western-blot e inmunodetección de la proteína a partir de extractos de células procedentes de cultivos de las cepas que se indican a continuación, en los que se había inducido la fosforilación de Rcs1 por eliminación de la glucosa. Las cepas utilizadas fueron R146.11A, portadora de una mutación bcy, que comporta niveles constitutivos altos de proteína quinasa A en la célula (Toda et al.,

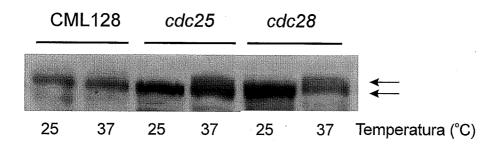
1987), y MB12, que mantiene funcional unicamente la subunidad Tpk3 de la proteína quinasa A y por tanto niveles bajos de dicha actividad en la célula (Mazón *et al.*, 1993). Como controles, se emplearon las cepas R146.11D y W303-1A, respectivamente isogénicas a las anteriores excepto para los genes descritos. En el caso del gen *SNF1*, se utilizó el mutante PEY101, portador de una interrupción del gen en el fondo W303-1A. La fosforilación de Rcs1 se produjo en los mutantes *bcy1*, *tpk1 tpk2* y *snf1*, siguiendo en todos los casos el mismo patrón que en las respectivas cepas salvajes, hecho que nos permitió descartar el papel de las respectivas proteína quinasas en la fosforilación de Rcs1 (dato no mostrado).

El producto del gen YAK1 (Garrett et al., 1991) es una proteína quinasa que podría actuar sobre los mismos sustratos que la proteína quinasa A pero con un efecto antagónico. La actividad de ésta última es alta en células creciendo activamente (fase exponencial) y decrece en situaciones de parada del crecimiento, que son justamente las condiciones que inducen la actividad quinasa de Yak1. Estas últimas condiciones [deficiencia de nitrógeno, mutantes cdc28 o ras (ts) a la temperatura restrictiva, parada por factor α (Garrett et al., 1991)] son las mismas (a excepción de la última) que inducen la fosforilación de Rcs1, por lo que también analizamos la fosforilación de Rcs1 en un mutante yak1. Se utilizó para ello la cepa AHY1 y su parental SGP4. Los resultados mostraron una cierta fosforilación de la proteína Rcs1 ya en la muestra inicial (células creciendo en glucosa) de la cepa parental portadora de una mutación ras1, no modificándose este patrón de fosforilación en la cepa AHY1 que lleva además una mutación yak1. Estos resultados (Fig. 13) nos permitieron concluir que Yak1 tampoco era la quinasa responsable de la fosforilación de Rcs1. Sin embargo, la hiperfosforilación observada a t=0 en el mutante ras1 permite sugerir la posibilidad de que este gen pudiese estar implicado a través de una vía independiente de la proteína quinasa A dependiente de cAMP.

4. ESTUDIO DE POSIBLES INTERACCIONES DE Ros1 CON OTRAS PROTEINAS

La mayoría de procesos biológicos (transcripción, replicación del DNA, transmisión de señales o crecimiento celular) son llevados a cabo por complejos protéicos e implican, por tanto, interacciones entre proteínas. Las proteínas específicamente requeridas para una función pueden identificarse mediante métodos genéticos tradicionales y estudios bioquímicos; sin embargo, tales estudios no permiten determinar qué otra proteína o proteínas interaccionan con la que es objeto

(a)



(b)

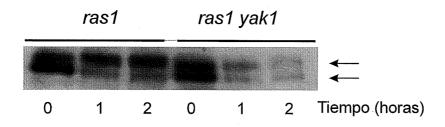


Figura 13. (A) Análisis por Western de la proteína Rcs1 en las cepas CML128 (salvaje), A5 (cdc25) y CDC28-13 (cdc28) creciendo exponencialmente en medio YPD a 25°C o después de 2 horas a 37°C. (B) Análisis por Western de Rcs1 en las cepas SGP4 (ras1) y AHY1 (ras1 yak1) en medio YPD (tiempo 0) y después de 2 horas de ser transferidas a medio YP. Las flechas indican las formas hiper e hipofosforilada de Rcs1.

de estudio. Con el fín de identificar otros elementos del complejo del cual Rcs1 pudiese formar parte en la célula, se utilizó el sistema del doble híbrido ideado por Fields y Song (1989) con la modificación introducida por Durfee et al. (1993), que al aplicar una doble selección confiere mayor sensibilidad al sistema y rebaja el número de falsos positivos.

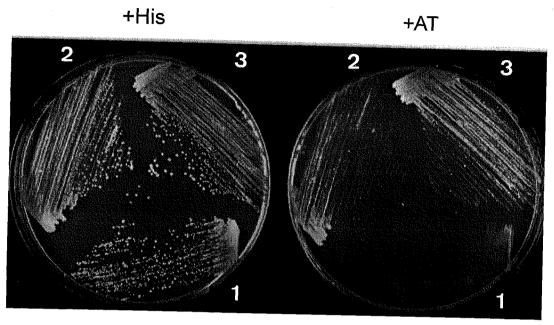
La cepa Y153 (ver Tabla 1) lleva integrados en su genoma dos genes reporteros ($GAL1_p$ -lacZ y $GAL1_p$ -HIS3) cuya expresión depende de Gal4. El interés de utilizar el gen HIS3 reside en que la célula requiere muy poca cantidad del correspondiente enzima [imidazol glicerol fosfato (IGP) deshidratasa] para ser prototrofa para histidina y por lo tanto, la utilización de este gen como reportero permite detectar interacciones débiles. En la construcción que se utilizó en este trabajo, el promotor del gen HIS3 se había sustituido por el promotor de GAL1, quedando así bajo control de la proteína Gal4. No obstante, esta construcción mantiene una expresión residual, suficiente para permitir el crecimiento sin necesidad de añadir histidina al medio. Este problema se resolvía añadiendo al medio 3-AT, un inhibidor químico de la IGP deshidratasa que restaura el carácter auxotrófico para la histidina de la cepa hospedadora (Durfee et al., 1993)

En nuestro trabajo, la cepa Y153 se transformó alternativamente con el plásmido pCM86 (que expresa la proteína de fusión Gal4_{bd}-Rcs1) y con pGBT9 como control. Los transformantes se plaquearon en medio SD con los suplementos correspondientes y en presencia o no de 3-AT (25mM). Los resultados se muestran en la Fig. 14. Sorprendentemente, los transformantes portadores de pCM86 eran capaces de crecer en presencia de 3-AT, en tanto que los portadores del plásmido control no lo hacían. Cuando se realizó un test cromogénico sobre papel (Ausubel *et al.*, 1989), los transformantes portadores de pCM86 dieron coloración azul, indicativo de que la proteína hibrida Gal4_{bd}-Rcs1 tambien era capaz de activar el sistema reportero *GAL1_p*-lacZ (datos no mostrados en detalle).

Los resultados anteriores permitían concluir que Rcs1 tiene capacidad de transactivar los dos sistemas reporteros utilizados y que, por tanto, es un activador transcripcional. Este resultado, aunque por sí mismo resultó muy interesante, constituía un problema a la hora de buscar proteínas que interaccionasen con Rcs1 usando los sistemas reporteros anteriores. No obstante, células de Y153 conteniendo el plásmido pCM86 se transformaron con 150 µg de DNA de una genoteca de S. cerevisiae en pGAD424 (ver apartado 3.1 de Materiales y Métodos) y la mezcla de transformación se plaqueó en medio SD con los suplementos correspondientes y en

presencia de 3-AT. Se obtuvieron del orden de 1.4x10⁶ cotransformantes, la mayoría en forma de colonias muy pequeñas, de entre las cuales se escogieron 117 clones que daban lugar a colonias de mayor tamaño. La cepa Y153 transformada con pCM86 en paralelo permitía comparar el tamaño que alcanzaban las colonias conteniendo únicamente este plásmido. Los 117 clones escogidos se recomprobaron mediante el test cromogénico para la β-galactosidasa sobre papel (Ausubel et al., 1989) y se seleccionaron 27 que dieron una coloración azul más intensa que el control portador de pCM86. A continuación, el DNA plasmídico extraído de estos clones se utilizó para electroporar E. coli MC1061. A partir de los correspondientes transformantes, los plásmidos derivados de pGAD424 se diferenciaron de pCM86 mediante digestión con la enzima BamHI, y se utilizaron para retransformar células de Y153 conteniendo o no pCM86. A partir de esta recomprobación, se seleccionaron sólo aquellos clones que daban positivo el test cromogénico únicamente en presencia de pCM86, con actividad β-galactosidasa superior (del orden del doble, dato no mostrado) a la que confería pCM86 por sí solo. Así, se selecionaron un total de cuatro clones que también mejoraban el crecimiento de la cepa cotransformada sobre placas de medio mínimo conteniendo 3-AT (Fig. 14).

El oligonucleótido 5'- GATGTATATAACTATCTAT -3' se utilizó como cebador para secuenciar la zona del inserto de DNA próxima al dominio GAL4_{ad} en los respectivos plásmidos. En tres de los cuatro plásmidos no funcionaron las reacciones de secuenciación, posiblemente porque habían perdido la zona del cebador que quedaba dentro del dominio de activación de Gal4, por lo que se descartaron. Del cuarto, al que se denominó pCM81, se leyeron del orden de 200 nucleótidos, que al ser analizados en el banco de datos EMBL, resultaron corresponder a la secuencia del gen PIM40 previamente descrito (Smith et al., 1992). El producto de este gen es una fosfomanosa isomerasa, enzima implicada en la ruta que lleva a la síntesis de GDP-Man y Dol-P-Man, dos compuestos necesarios para la glicosilación de numerosas proteínas, tanto de secreción como estructurales de membrana o de pared. La función descrita en la literatura para la proteína Pim40 no parecía tener a priori ninguna relación con la función de Rcs1 que se estaba intentando caracterizar en este trabajo por lo que interpretamos que muy probablemente se trataba de una interacción fortuita. Ello hizo que no se recomprobase dicha interacción mediante otras técnicas (coimmunoprecipitación, cromatografía de afinidad) que siempre deben utilizarse para reconfirmar los resultados obtenidos por el sistema del doble híbrido.



1: pGBT + pGAD424 2: pCM86 + pGAD424 3: pCM86 + pCM81

Figura 14. Crecimiento de la cepa Y153 cotransformada con los plásmidos indicados en cada caso sobre placas de medio SD-glucosa conteniendo histidina (+His) o 3-aminotriazol 25 mM (+AT), después de 72 horas de incubación a 30°C.

Tabla 2. Actividad transcripcional *in vivo* de las proteínas híbridas Gal4_{bd}-Rcs1 and Gal4_{bd}-VP16 sobre el sistema reportero *GAL1-lacZ*

Actividad β-galactosidasa en células transformadas con

iempo después del cambio nutricional (horas)	pGBT9	pCM86	pCM110
0	<0,1	1,0	7,9
24	<0,1	3,2	5,3
48	0,2	26,8	11,0
72	0,4	76,9	76,2

Células transformadas con pGBT9 (control), pCM86 (Gal 4 bd fusionado a Rcs1) o pCM110 (Gal 4 bd fusionado a VP16) fueron crecidas exponencialmente en medio SD-glucosa hasta una concentración de $5x10^6$ células por ml y a continuación se filtraron, lavaron y resuspendieron en medio SD-etanol/glicerol (tiempo 0). Se determinó la actividad enzimática (unidades Miller) en células permeabilizadas a diferentes tiempos después del cambio nutricional. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

debería restringirse (para una optimización de éste) a la región UAS reconocida por Gal4, debiéndose eliminar la región URS reconocida por Mig1 existente entre la UAS anterior y la caja TATA (Flick y Johnston, 1990) para que el sistema reportero se viese libre de la represión que ejerce la glucosa vía URS. En tercer lugar, dado que el gen RCS1 parecía estar implicado en la utilización del etanol, a posteriori quedaba claro que habría sido más conveniente utilizar otro sistema reportero, por ejemplo el basado en regiones promotoras reconocibles por la proteína LexA (Estojak et al., 1995) insensible a glucosa.

6. PAPEL DE RCS1 EN LA ASIMILACION DE HIERRO POR S.cerevisiae

Durante el curso de este estudio se publicó un trabajo (Yamaguchi-Iwai et al.,1995) describiendo la clonación y caracterización del gen AFT1 de S. cerevisiae mediante una estrategia diseñada para buscar genes implicados en el metabolismo del hierro. En el mismo se demostraba que dicho gen es necesario para la expresión de los genes FRE1, FRE2 y FET3 en un medio deficiente en hierro (ver Introducción). La secuencia de AFT1 resultó idéntica, con algunas diferencias puntuales (probablemente debido a polimorfismos), a la de RCS1. Asimismo, los datos de mapeo de ambos genes y de las zonas adyacentes también eran idénticos, por lo que se podía concluir con toda seguridad que se trataba del mismo gen.

6.1. Supresión del fenotipo de los mutantes *rcs1-5* por adición de hierro al medio de cultivo

Tal como se ha descrito anteriormente (Fig. 9), la cinética de crecimiento de una cepa (CML126) portadora de la delección *rcs1-5* en medio SD-glucosa es más lenta que la de la cepa salvaje (CML128) y el número final de células que alcanza un cultivo de la cepa mutante es menor que en el caso de la cepa salvaje. Con el fín de averiguar si estas diferencias desaparecían cuando el mutante se crecía sobre el mismo medio suplementado con hierro, se prepararon seis cultivos en paralelo de ambas cepas en medio SD-glucosa con cantidades crecientes de Fe₂SO₄ y de ferrocina [agente quelante del Fe(II)] en las siguientes proporciones mM Fe/mM Fz: 0/0, 0.04/0.1, 0.1/0.25, 0.4/1, 1/2.5, 1.5/3.75. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo tanto el número de células como la DO₆₀₀ (cultivos control) o DO₇₀₀ (cultivos conteniendo Fe/Fz) al cabo de 48 h. Los resultados (Fig. 15a) indicaron que la proporción 0.4/1 de Fe/Fz restauraba en el mutante los niveles de

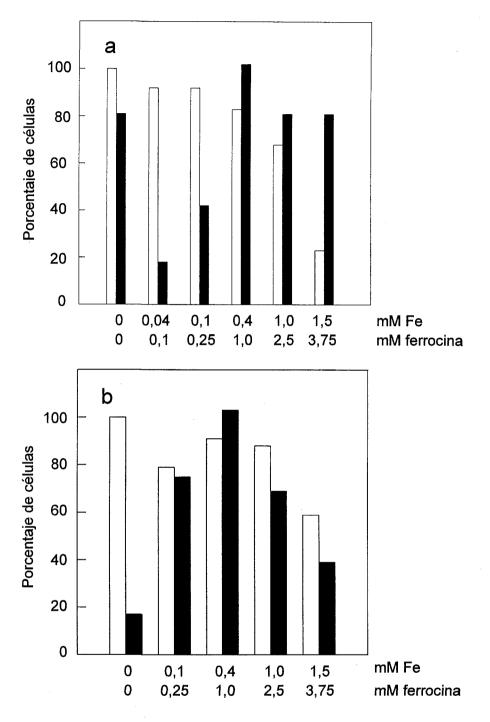


Figura 15. Efecto del hierro sobre células de la cepa salvaje *RCS1* (CML128) (barras blancas) y del mutante *rcs1-5* (CML126) (barras negras). Células creciendo exponencialmente en medio SD-glucosa se resuspendieron a una concentración de 10⁶ células por ml en el mismo medio (panel A) o en medio SD-etanol/glicerol (panel B) adicionados con las concentraciones indicadas de hierro (en forma de sulfato ferroso) y de ferrocina. A las 48 horas de incubación en estas condiciones se midió la concentración de células. Las barras indican el porcentaje de concentración celular alcanzado en cada condición relativo a la concentración en el cultivo de la cepa salvaje sin adición de hierro ni ferrocina.

crecimiento de la cepa salvaje y que concentraciones superiores a aquellas resultaban más tóxicas para la cepa salvaje que para el mutante, de lo que se deducía que éste debía ser deficitario en la captación de hierro. Estos resultados coincidían con los obtenidos por Yamaguchi-lway et al (1995) para AFT1, lo que confirmaba definitivamente que se trataba del mismo gen. Se comprobó además que la adición de ferrocina (1mM) al medio de cultivo inducía la expresión de FRE1 y FRE2 en el caso de la cepa salvaje pero no en el mutante rcs1-5 (Fig. 16a). Los resultados también demostraron que ambos genes tienen cinéticas de inducción diferentes, precediendo la de FRE1 a la de FRE2. Este hecho concuerda con los resultados de Georgatsou y Alexandraki (1994), según los cuales la actividad reductasa férrica dependiente de Fre1 se manifiesta antes que la dependiente de Fre2 en células deficitarias en hierro.

Para comprobar si la adición de hierro suprimía también el crecimiento deficiente del mutante en etanol/glicerol, células de la cepa salvaje y de la cepa mutante creciendo exponencialmente en glucosa se transfirieron a un medio con etanol/glicerol tal como se ha descrito en apartados anteriores. De cada uno de los cultivos se hicieron seis alícuotas a las que se añadieron las mismas cantidades de hierro/ferrocina descritas en el experimento previo y el crecimiento se determinó midiendo la concentración de células al cabo de 48 h como en el caso anterior. Los resultados se indican en la Fig. 15b. También en este caso el fenotipo de las células rcs1-5 quedaba suprimido por la adición de Fe/Fz.

Finalmente, quisimos comprobar si la incapacidad de una cepa carente de Rcs1 para recuperarse después de un proceso de transformación era debida a la deficiencia de hierro. Para ello, las cepas salvaje y mutante rcs1-5 se transformaron con el plásmido YEp13 siguiendo el protocolo de Gietz et al., (1992) y los transformantes se plaquearon sobre medio SD-glucosa con los aa correspondientes en presencia de diferentes concentraciones de hierro. Los resultados (Tabla 3) nos permitieron constatar que mediante este método, que se diferencia del empleado anteriormente (Hill et al., 1991) básicamente en que acorta el tiempo de exposición de las células al acetato de litio, la eficiencia de transformación mejoraba (2-3 veces respecto al método anterior) en la cepa salvaje (2-3 x 10⁴ transformantes/μg) y que se obtenían transformantes con la cepa mutante, aunque con una eficiencia menor (aproximadamente la mitad respecto a la de la cepa salvaje). La adición de Fe/Fz a las concentraciones 0.1/0.25, 0.4/1 y 1.0/2.5 mM al medio de cultivo mejoró la eficiencia de transformación de ambas cepas. Lo anterior nos permitió concluir, que el método de transformación de Gietz et al., (1992) debe suponer una menor pérdida de hierro por parte de la célula permitiendo que el mutante rcs1-5 se recupere mejor y que, la

Tabla 3. Eficiencia de transformación del plásmido YEp13 sobre las cepas CML128 (*RCS1*) y CML126 (*rcs1-*Δ5) en función de la concentración de hierro en el medio de selección

Transformantes/µg DNA

e/Fz (mM)	CML128	CML126
0/0	21280	14560
0.1/0.25	68800	36560
0.4/1.0	31600	27560
1.0/2.5	3960	6480

Las placas de selección (SD-glucosa más los aa correspondientes) contenían las cantidades de hierro y ferrocina indicadas. Para transformar las respectivas cepas se empleó el método de Gietz et al. (1992).

adición de hierro incrementaba el número de transformantes obtenidos llegando a igualar el mutante la eficiencia del salvaje a concentraciones superiores (0.4/1.0) de Fe/Fz.

6.2. Expresión de *FRE1* y *FRE2* en una transición de glucosa a etanol/glicerol

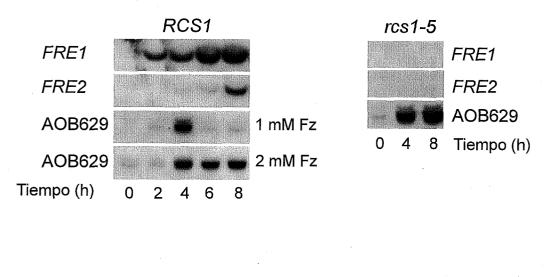
Se ha descrito (Lesuisse *et al.*, 1987) que el crecimiento en una fuente de carbono no fermentable incrementa la entrada de hierro en la célula, posiblemente porque se requiere más hierro en forma de hemo para metabolizar estos nutrientes. Esta observación, que concordaría con nuestros resultados expuestos en el apartado anterior sugería la posibilidad de que en la transición de condiciones fermentables a respirables las células necesitasen inducir la expresión de los genes *FRE1* y *FRE2*. Dado que esta inducción es dependiente del gen *AFT1/RCS1* (Yamaguchi-lwai *et al.*, 1995, y resultados de nuestro laboratorio), se explicaría el fenotipo del mutante *rcs1-5* en presencia de etanol/glicerol como únicas fuentes de carbono.

La comprobación de esta hipótesis se llevó a cabo mediante Northern a partir de muestras de células de la cepa salvaje transferidas de un medio con glucosa a un medio con etanol/glicerol. Los resultados (Fig. 16b), en contra de lo esperado, no mostraron inducción ni de *FRE1* ni de *FRE2* en ninguno de los tiempos estudiados. En cambio, cuando este experimento se repitió añadiendo ferrocina al cultivo en el momento de la transición, se observó inducción de ambos genes a las 24 h (Fig. 16b), coincidiendo con el momento en que las células reirician el crecimiento.

Los resultados anteriores nos permitieron concluir que el mayor aporte de hierro requerido por las células cuando crecen en un medio respirable no tiene lugar mediante el sistema de alta afinidad en el que están implicados los productos de los genes *FRE1* y *FRE2* sino mediante algún otro mecanismo diferente que también sería dependiente de *RCS1*. Alternativamente, la presencia de Rcs1 en la cepa salvaje podría comportar la existencia de niveles basales de actividad ferro-reductasa y de entrada de hierro suficientes para el crecimiento en este medio.

Paralelamente a la realización de este trabajo, nuestro grupo participó en la secuenciación de aproximadamente 70 Kpb de la región proximal al telómero izquierdo del cromosoma XV de S. cerevisiae, dentro del Proyecto de Secuenciación del Genoma de Levadura financiado por la Unión Europea. En el transcurso de este

(a)



(b)

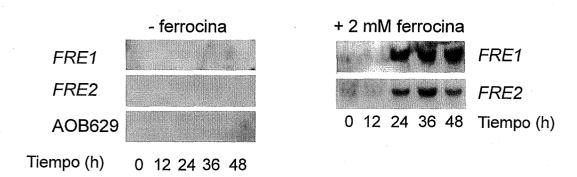


Figura 16. Análisis mediante Northern de los mRNAs de *FRE1*, *FRE2* y AOB629. (a) Células de la cepa salvaje *RCS1* y mutante *rcs1-5* creciendo en medio SD-glucosa fueron privadas de hierro mediante adición de ferrocina (Fz) a tiempo 0, tomándose muestras para el análisis a los tiempos subsiguientes indicados. La ferrocina se añadió a concentración 1 mM para la cepa salvaje (excepto para AOB629, cuya expresión también se analizó a concentración 2 mM de ferrocina) y a 2 mM para la cepa mutante. (b) Células de la cepa salvaje *RCS1* creciendo en medio SD-glucosa se transfirieron a SD-etanol/glicerol a tiempo 0 y al mismo tiempo parte de los cultivos fueron tratados con ferrocina a 2 mM. A los tiempos indicados, se tomaron muestras para el análisis por Northern. Todas las muestras tenían cantidades equivalentes de RNA.

Fre1	RAPEKSDKKTVVSQPL.MANETAYH.YYYEENIG.IHLNLMRSQWCAWGLVF.
Fre2	KGSANLTYPVEMDTQLRKAYYHALHG.FYANLDVGNIYG.GIIC.
AOB629	MIEERDLVLSNGIHCIADIHSELYARLKKESQAATPWVYQ
Fre1	FWVAVLTAATILNILKRVFGKNIMANSVKKSLIYPSV.
Fre2	AYFVAIMAFAGVLHCMNYTPFKTVLLKQKLVGYVRGYLTLPTIG
AOB629	KQYGKFVTYFVAVIIFLSLIKKLAFMYYDSSEEFLPEKKNSPTTPSVFLARIM
Fre1	YKDYNERTFY.LWKRLPFN.FTTRGKGLVVLIFVIL.TILSLSFGHNIK
Fre2	SKHASDFSYFRIFTGYLPTRLEGIIILGYLVLHTVF.LAYGY
AOB629	TKLVAFNRYICYRKFPTLIFSYLGIPTSVGTFLVVMATTLYTLLYCF
Fre1	LPHPYDRPRWRRSMA.FVSRRADLMAIALFPVVYLFGIRNNPF.IP
Fre2	EYDPENIIFKSRRVQ.VARYVADRSGVLAFAHFPLIVLFAGRNN.F.LE
AOB629	VPHPFYRPCAGFGSPPLSVRAGIMAISLVPFVFSLSGKINVIG
Fre1	.ITGLSFSTFNFYHKWSAYVCFMLAVVHSIVMTASGVKRGVFQSLVRKF
Fre2	YISGVKYTSFIMFHKWLGRMMFLDAMIHGSAYTSYTVANKTWATSKNRL
AOB629	WLVGLSYEKINIYHQWASILCLFFSWVHVIPFLRQARHEGGYERMHQRWKASD
Fre1	YFRWGIV.ATILMSIIIFQSEKVFRNRGYEIFLLIHKAMNIMFIIAMYYHCHT
Fre2	YWQFGVA.ALCLAGTMVFFSFAVFRKYFYEAFLFLHIVLGAMFFYACWEHVVS
AOB629	MWRSGVPPILFLNL.LWLSSLPIARRHFYEIFLQLHWILAVGFYISLFYHVYP
Fre1	.LGWMGWIWSMAGILCFDRFCRIVRIIMNGGLKTATLSTTDDSN
Fre2	.LSGIEWIYTAIAIWIVDRIIRIIKASYFGFPKASLQLIGDD
AOB629	ELNSHMYLVATIVVWFAQLFYRLAVKGYLRPGR.SFMASTIANVSIVGEGCVE
Fre1	VIKISVKKPKFFKYQV.GAFAYMYFLSPKSAWFYSFQSHPFTVLSERHRD
Fre2	LIRLTVKKPARPWRAKPGQYVFVSFLHPLYFWQSHPFTVLDSV
AOB629	LIVKDVEMAYSPGQHIFVRTIDKGIISNHPFSIFPSA
Fre1	PNNPDQLT.MYVKANKGITRVLLSKVLSAPNHTVDCKIFLEGPYGVTVPHI
Fre2	SKN.GELV.IILKEKKGVTR.LVKKY.VCRNGGKT.SMRLAIEGPYGSSSP.V
AOB629	KYPGGIKMLIRAQKGFSKRLYESNDDMKKILIDGPYGGIERDI
Fre1	AKLKR n lvgvaa g l g vaaiy p hfvecl.r l pstdq l q.h k fy w i v ndls
Fre2	nnyn. nv l l ltg g t g lpg p iah.ai.k l g kt saaagkqs.v kl via v rgfd
AOB629	RSFT. nv ylics g s g istcl p flqkygpi l h kt n l evit l D w v v rhre
Fre1	HLKWFENELQW.LKEKSCEVSVIYTGS.SVE.DTNS.
Fre2	VLEAYKPELMCLENLNVQLHIYNTMEVP.SLT.PSDSL
AOB629	DISWIRDEMCTLSNNLRQLFLDGKIVVRIYVCSDSTVPGIIKTFPQTIDTASD
Fre1	D.ESTKGFDDKE.ESEITVECLNKRPDLKEL
Fre2	D.ISQQDEKA.DEKGTVVATTLEKSANPLGFDGVV.FHCGRPNVKEL
AOB629	QSDLAKREKDTEFGQDDTESNSTFDKSNNEYKGLITIIPSKPDLNQVINDY
Fre1	VRSEIKLSELENNNITFYSCGPATFNDDFRNAVVQGIDSSLKIDV
Fre2	LHEAAELSGSLSVVCCGPPIFVDKVRNETAKIVLDKSAK.AI
AOB629	QIGFRNCFICSGSDSLRYTVGNSVAVYRPRFFLTKMSKSAIYTA
Fre1	E.LEEESFTW
Fre2	EYFEEYQCW
AOB629	RVLATSRKQMASTM

Figura 17 (página anterior). Alineamiento de las proteínas codificadas por los genes *FRE1* y *FRE2* y la pauta de lectura abierta AOB629 de *S. cerevisiae*. Las secuencias correspondientes a *FRE1* y *FRE2* comienzan en los aa 106 y 130 respectivamente, mientras que se muestra la secuencia completa de AOB629. Los residuos presentes en al menos dos de las proteínas están remarcados. Las regiones probablemente implicadas en la unión a flavina adenina dinuecleótido y a NADPH (Dancis *et al.*, 1992) se señalan mediante líneas de trazo contínuo y discontínuo respectivamente.

trabajo se secuenció una pauta de lectura abierta denominada AOB629 (Casamayor et al., 1995) que presentó homologías significativas con FRE1 y FRE2 (Fig. 17). A la vista de nuestros resultados previos, nos interesó estudiar si la expresión de AOB629 estaba regulada por hierro, en caso afirmativo analizar si dicha expresión era dependiente o no de RCS1, y por último estudiar su posible inducción en presencia de etanol/glicerol como únicas fuentes de carbono. Respecto del primer punto, la adición de ferrocina 1mM a sendos cultivos de la cepa salvaje y la cepa mutante en SDglucosa indujo transitoriamente la expresión de AOB629 (Fig. 16a), en tanto que cantidades superiores del quelante (2mM) mantuvieron constantes los niveles de expresión (Fig. 16a). Así pues, la expresión de AOB629 respondía a los niveles de hierro presentes en el medio, pero a diferencia de FRE1 y FRE2 no era dependiente de RCS1 (Fig. 16a). Cuando se analizó su expresión en una transición a etanol/glicerol, tampoco mostró inducción, se hubiese (Fig. 16b) o no (datos no mostrados) añadido ferrocina al cultivo en el momento de la transición. Unicamente se observó inducción de la expresión de AOB629 cuando se añadió ferrocina (2mM) a un cultivo de células transferidas 48 h antes a SD-etanol/glicerol, esto es, cuando ya habían reemprendido el crecimiento (datos no mostrados). Estos resultados sugerían que AOB629 podría estar implicado en la asimilación del hierro, formando parte de un sistema no dependiente de Rcs1 que se induciría posiblemente cuando el hierro está presente en el medio a concentraciones todavía más bajas de las requeridas para inducir la expresión de FRE1 y FRE2.

Puesto que los experimentos hechos con sistemas reporteros demostraban que Rcs1 es un activador transcripcional (véase apartado 5 de esta misma Sección), se comprobó a continuación si la falta de hierro provocada por la adición de ferrocina al medio inducía la capacidad activadora de Rcs1 sobre el sistema reportero *GAL1*_p-lacZ. Los resultados (Tabla 4) demostraron que no era así ni sobre células creciendo en medio SD-glucosa ni sobre células preincubadas durante 42 horas en medio SD-etanol/glicerol. En estas últimas condiciones, la evolución de la capacidad transactivadora sobre el sistema reportero en el curso del experimento es semejante a la del activador viral VP16, por lo que el aumento de actividad de la proteína híbrida Gal4_{bd}-Rcs1 no puede explicarse en base a la carencia de hierro (dicho aumento sería consecuencia de la desrepresión del promotor *GAL1* al eliminar la glucosa, véase apartado 5).

Tabla 4. Actividad transcripcional *in vivo* de la proteína híbrida Gal4_{bd}-Rcs1 sobre un sistema reportero *GAL1-lacZ* en condiciones de carencia de hierro

Actividad β-galactosidasa en células transformadas con

Tiempo de carencia de hierro (horas)	pGBT9		pCM86		pCM110	
	Glucosa	Etanol/ glicerol	Glucosa	Etanol/ glicerol	Glucosa	Etanol/ glicerol
0	<0,1	<0,1	1,2	14,0	11,1	7,2
4	<0,1	0,1	8,0	18,1 (14,6)	8,0	16,4 (11,4)
8	<0,1	0,2	0,9	20,0 (17,8)	11,2	26,5 (26,6)

Células transformadas con pGBT9 (control), pCM86 (Gal 4 bd-Rcs1) or pCM110 (Gal 4 bd-VP16) creciendo exponencialmente en medio SD-glucosa o SD-etanol/glicerol a una concentración de 5x10 6 células por ml fueron privadas de hierro mediante adición de ferrocina a 1 mM (tiempo 0). A los tiempos indicados se midió la actividad β -galactosidasa. Las células en medio SD-etanol/glicerol habían sido transferidas a este medio desde SD-glucosa 42 horas antes. Los números entre paréntesis indican la actividad enzimática en células creciendo paralelamente en medio SD-etanol/glicerol en presencia de hierro

6.3. Papel de la fosforilación de Rcs1 en la inducción de FRE1 v FRE2

Con la finalidad de estudiar si la fosforilación de Rcs1 era necesaria para la inducción de FRE1 y FRE2, se partió de un cultivo de la cepa salvaie en SD-glucosa en fase exponencial al que se añadió ferrocina (1mM). Estudios previos mostraron que en estas condiciones las células eran capaces de soportar el mismo ritmo de crecimiento que el correspondiente control sin ferrocina durante casi cinco generaciones, transcurridas las cuales el efecto de la ferrocina provocaba una detención del crecimiento del cultivo. En este experimento, era importante no superponer el efecto de la eliminación del hierro con la parada transitoria del crecimiento del cultivo durante el shift diaúxico, que como se ha descrito anteriormente provoca la fosforilación de Rcs1. Para ello, el cultivo se mantenía en condiciones exponenciales durante todo el intervalo del experimento, mediante diluciones sucesivas en el mismo medio, y se tomaron muestras a intervalos durante 10 h de tratamiento con el quelante. Los resultados (Fig. 18) mostraron que la expresión de FRE1 y FRE2 se inducía con anterioridad a la aparición de la forma fosforilada de Rcs1, dato que nos permitía constatar que esta modificación no era requerida para la función de Rcs1 hasta aquí descrita como elemento activador de la entrada de hierro.

6.4. Inducción de *FRE1* en una cepa portadora de una delección parcial del gen *RCS1*

Dado que se disponía de una cepa portadora de una delección parcial *rcs1-1* (ver apartado 2.1 de Resultados) que produce una proteína truncada en el aminoácido 440, se estudió si la ausencia de la región carboxi-terminal rica en glutaminas, que podía contituir un posible dominio transactivador, era importante para el papel de Rcs1 en la inducción de de los genes *FRE* como respuesta a la carencia de hierro. Para ello, cultivos exponenciales en SD-glucosa de la cepa mutante CML12, portadora de dicha delección y de su correspondiente control, la cepa salvaje OL1, se trataron con ferrocina (1mM) durante 6 h, al cabo de las cuales se recogieron muestras para determinar por Northern la expresión de *FRE1*. Los resultados manifestaron el mismo patrón de inducción en ambas cepas (datos no mostrados), hecho que permitió concluir que la ausencia de este posible dominio transactivador no afectaba al papel de Rcs1 en la respuesta al hierro.

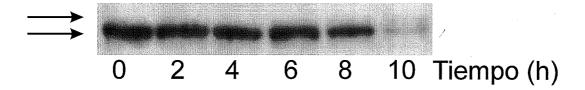


Figura 18. Análisis mediante Western de Rcs1 en células de la cepa salvaje *RCS1* creciendo en medio SD-glucosa y privadas a tiempo 0 de hierro mediante adición de ferrocina a 1 mM. Después de 4 horas en estas condiciones, las células se diluían 1:4 en medio fresco con ferrocina con el fin de mantenerlas dividiéndose exponencialmente. Las flechas inferior y superior corresponden respectivamente a la forma hipo e hiperfosforilada de Rcs1.

7. EFECTO DE LA SOBREEXPRESION DE RCS1

El estudio del papel de un gen en la célula puede basarse en el análisis de los correspondientes mutantes pero también en el efecto que comporta para la célula la sobreexpresión del mismo. Los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de genes pueden ayudar también a comprender posibles actuaciones simultáneas de un producto génico sobre diversos procesos celulares (Ramer et al., 1992; Espinet et al., 1995). En consecuencia, y ante la posibilidad de que la fosforilación de Rcs1 estuviese relacionada con alguna otra función de esta proteína en la célula, se estudió el fenotipo causado por la sobreexpresión de RCS1. Para ello, la cepa CML72 se transformó por un lado con el plásmido pCM49, que lleva dicho gen bajo control del promotor GAL1, y por otro con el vector YCpGAL como control. La sobreexpresión se indujo añadiendo galactosa a sendos cultivos exponenciales en SD-rafinosa, tomándose muestras a sucesivos tiempos. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo tanto la DO₆₀₀ como el número de células. Asimismo, se contabilizó el porcentaje de células gemadas y se analizaron los niveles de mRNA de *RCS1* y de síntesis de la proteína. Los resultados mostraron una inducción rápida del gen que alcanzó niveles máximos al cabo de tan sólo una hora, manteniéndose en tiempos posteriores (Fig. 19d). En cuanto a la proteína los niveles máximos se observaron a partir de las 4 h (Fig. 19d). A nivel fenotípico, la sobreexpresión de RCS1 provocó una detención de la división celular coincidiendo con el tiempo al cual las células contenían niveles máximos de Rcs1 (4 h), seguida de un incremento del tamaño de las células (Fig. 19a). La medición del porcentaje de células gemadas (Fig. 19b) y el análisis mediante FACS (Fig. 19c) permitieron constatar que la parada del crecimiento se producía en forma de células no gemadas con un contenido N de DNA, todo ello indicativo de una parada en la fase G1 del ciclo celular.

Los resultados anteriores llevaron a pensar que si la parada del crecimiento era consecuencia de la toxicidad por una entrada masiva de hierro a la célula causada por la sobreproducción de Rcs1, el efecto de la sobreexpresión podría suprimirse añadiendo ferrocina al cultivo en el momento de la inducción por galactosa. Para estudiar esta posibilidad, se repitió el experimento anterior y en el momento de la inducción se hicieron seis alícuotas de cada uno de los cultivos a las que se adicionaron cantidades crecientes de ferrocina desde 0 a 3 mM. Los resultados (Fig.20) mostraron que el hecho de disminuir la cantidad de hierro en el medio de cultivo disponible para la célula no suprimía la parada inducida por sobreexpresión de *RCS1*.

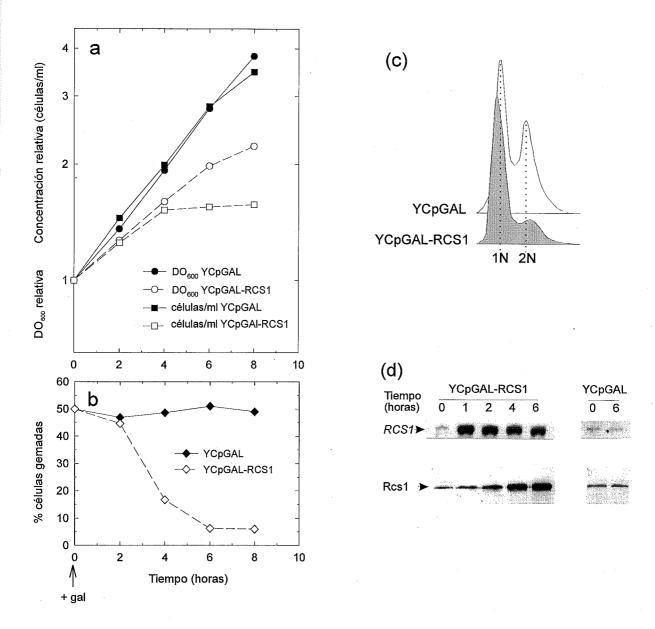


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de *RCS1* sobre el crecimiento celular. Células de la cepa CML72 transformadas con YCpGAL o con pCM49 (YCpGAL-RCS1) crecieron exponencialmente en medio líquido SD-rafinosa. A tiempo O, se añadió galactosa al 2% (concentración final) a ambos cultivos y se siguó la densidad óptica a 600 nm y la concentración celular a diferentes tiempos (panel A). En paralelo, se determinó el porcentaje de células gemadas mediante observación microscópica de al menos 200 células por muestra (panel B). Después de 24 horas en presencia de galactosa, se tomaron muestras de la cepa CML72 transformada con YCpGAL (diluída a diferentes tiempos para mantener las células creciendo exponencialmente) o con YCpGAL-RCS1 y se determinó el contenido de DNA por citometría de flujo (panel C). El panel D muestra los niveles de mRNA de *RCS1* en ambos cultivos a diferentes tiempos después de la adición de galactosa, así como la cantidad de proteína Rcs1 determinada mediante Western. Se corrieron cantidades equivalentes de RNA o proteína por muestra.

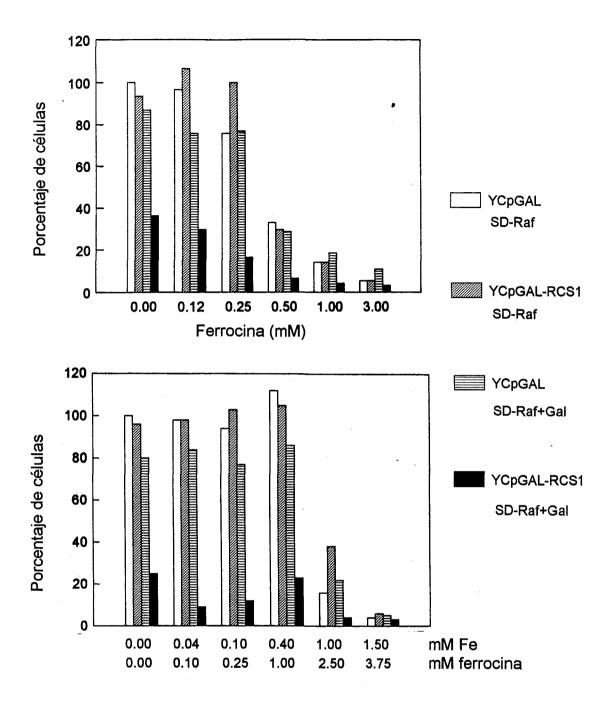


Figura 20. Efecto del hierro sobre células sobreexpresando *RCS1*. (Panel superior) Células de la cepa CML72 transformadas con YCpGAL o con pCM49 (YCpGAL-RCS1) crecieron exponencialmente en medio SD-rafinosa y a continuación se resuspendieron (a 10⁶ células por ml) en medio SD con rafinosa sola (SD-Raf) o en medio SD con rafinosa más galactosa (SD-Raf+Gal), los cuales contenían además las cantidades indicadas de ferrocina. Al cabo de 24 horas a 30°C se midió el número de células. El histograma representa la concentración celular relativa respecto de la alcanzada por el cultivo de las células transformadas con YCpGAL en medio SD-Raf. (Panel inferior) Igual que en el anterior excepto que se añadía simultaneamente hierro (en forma de sulfato ferroso) y ferrocina a las concentraciones indicadas.

Cabía también la posibilidad de que la abundancia de proteína Rcs1 en la célula pudiese titular algun componente necesario para la formación de un complejo implicado en la asimilación de hierro, con lo cual la detención del crecimiento que provoca la sobreexpresión de *RCS1* se produciría no por un exceso sino por un defecto de hierro. En tal caso, dicho efecto sería suprimible añadiendo hierro al medio. El experimento anterior se repitió pero añadiendo en este caso cantidades crecientes de hierro/ferrocina en el momento de la inducción. Los resultados mostraron (Fig. 20) que tampoco la adición de hierro suprimía el efecto de la superexpresión de *RCS1*. Por el contrario, el hierro añadido incrementaba el efecto inhibitorio de la sobreexpresión de *RCS1* a concentraciones que por otro lado aún no resultaban tóxicas para células con niveles de expresión normales de *RCS1*.

8. ESTUDIOS DE RETARDAMIENTO EN GEL

Los estudios descritos en apartados previos revelan que *RCS1* es necesario para que se induzca la expresión de *FRE1* y *FRE2* en un medio deficitario en hierro, y también que la proteína Rcs1 transactiva un gen reportero cuando se le confiere capacidad de unión a su promotor. Por otro lado, resultados de Dancis *et al.*, (1992) delimitaban con bastante precisión una zona del promotor de *FRE1* responsable de su regulación por hierro. Ello hizo que centrásemos nuestro interés en estudiar la posible participación de Rcs1 en el complejo responsable de inducir la expresión de *FRE1*. Para ello recurrimos a la técnica de ensayos de retardamiento en gel.

Se utilizó un fragmento de DNA presente en el promotor de *FRE1* entre las posiciones -359 a -173 que contiene un sitio de unión a Rap1 (Nieuwint *et al.*, 1989) y dos secuencias repetidas de 12 pb que constituyen elementos de respuesta al hierro (Dancis *et al.*, 1992). El proceso de obtención y marcaje de dicho fragmento se describe en el apartado 10 de Materiales y Métodos. Los extractos protéicos se obtuvieron a partir de cultivos exponenciales tanto de la cepa salvaje como de la cepa mutante *rcs1-5*, tratados o no, previamente a los ensayos de retardamiento, con ferrocina durante 8 h. Este es un tiempo suficiente para inducir la expresión de *FRE1* (Fig. 16a). Los extractos de la cepa salvaje se analizaron mediante Western e immunodetección. Cabe resaltar que la cantidad de Rcs1 presente en los extractos obtenidos a partir de células tratadas con ferrocina fue siempre menor que en los extractos procedentes de células no tratadas, hecho éste indicativo de que en presencia de ferrocina se producía algún cambio en la proteína o en su

compartimentalización celular que hacía más difícil su solubilización por el método empleado para obtener dichos extractos. Cuando la sonda se incubó con extractos procedentes de la cepa salvaje, se detectaron dos bandas de retardamiento que eran específicas puesto que desaparecían al competir con sonda no marcada. Estas mismas bandas aparecían cuando se utilizaron extractos de la cepa salvaje privada de hierro o de la cepa mutante sin privar, pero en cambio desaparecían cuando los extractos procedían de un cultivo del mutante *rcs1-5* que se había tratado con ferrocina (Fig. 21). Cabe señalar que en el caso de la cepa salvaje la banda de menor movilidad era más intensa si no se habían tratado las células con ferrocina. Por otro lado, la adición de anticuerpo anti-Rcs1 a la mezcla de reacción no alteró la movilidad de estas bandas (dato no mostrado). Asímismo, la adición de proteína Rcs1 immunoprecipitada a los ensayos con extractos del mutante *rcs1-5* no restauró el patrón de movilidad característico de la cepa salvaje (dato no mostrado).

Los resultados anteriores nos permitieron concluir que la proteína Rcs1 es necesaria para la activación y estabilidad del complejo de retardamiento en células tratadas con ferrocina y por tanto deficitarias en hierro y que probablemente Rcs1 no forma parte del complejo aunque tampoco se puede descartar su implicación. Para explicar el hecho de que los complejos de retardamiento que se observan en células salvajes privadas o no de hierro y en el mutante crecido en presencia de hierro sean idénticos se debería aceptar que en la activación del complejo interviene una modificación tipo fosforilación o bien la presencia o no de hierro acomplejado, que no es perceptible en las condiciones utilizadas y que sería dependiente de Rcs1 (Fig. 22b). Alternativamente, en ausencia de hierro, Rcs1 podría sustituir algún elemento del complejo, activándolo, sin que ello supusiese cambios en la movilidad del mismo (Fig. 22a).

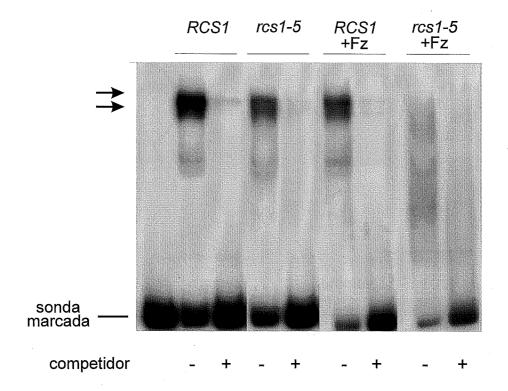


Figura 21. Ensayos de retardamiento en gel con extractos de células de las cepas salvaje *RCS1* y mutante *rcs1-5* y un fragmento de 187 pb del promotor de *FRE1* utilizado como sonda. Las células crecieron exponencialmente en medio SD-glucosa, incubándose parte de los cultivos con ferrocina (+Fz) durante 8 horas antes de la preparación de los extractos. Para cada extracto se llevaron a cabo dos ensayos en paralelo, uno con sonda marcada radiactivamente y otro que contenía adicionalmente un exceso molar de 50 veces de sonda no marcada. El contenido de las reacciones se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y autoradiografía. La primera calle de la izquierda corresponde a sonda marcada sola. Las flechas indican las dos bandas específicas de retardamiento más intensas.

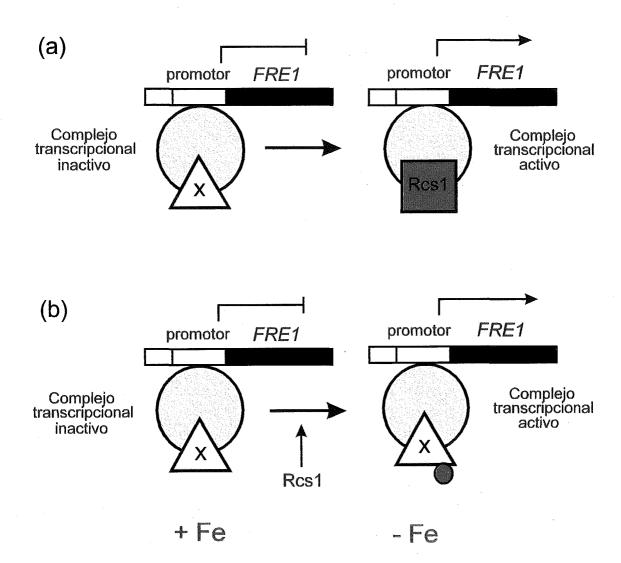


Figura 22. Posibles modelos sobre el papel de la proteína Rcs1 en el complejo activador de la transcripción del gen FRE1. (a) En ausencia de hierro, un componente X no identificado del complejo transcripcional sería sustituído por Rcs1, con la consiguiente estabilización y activación del complejo en estas condiciones. (b) Rcs1 actuaría en ausencia de hierro modificando un componente X del complejo transcripcional, lo que estabilizaría y activaría este complejo. La actuación de Rcs1 sería indirecta, por ejemplo induciendo la expresión de una proteína (¿con actividad quinasa?) que sería la que directamente modificaría el complejo.

DISCUSION

La entrada de hierro en la célula asociada a la acción de ferro-reductasas de membrana es un mecanismo generalizado entre las distintas especies de levaduras (Lesuisse et al., 1995). En S. cerevisiae constituye un mecanismo de alta afinidad que actúa cuando el hierro está presente en el medio a bajas concentraciones, mientras que a concentraciones más altas del metal un mecanismo de baja afinidad, no tan bien caracterizado como el anterior, sería el responsable de la asimilación del hierro (Dancis et al., 1992; Eide et al., 1993; Dix et al., 1994). El gen AFT1 de S. cerevisiae regula la expresión de FRE1 y FRE2, que codifican para las ferro-reductasas, así como la de FET3, cuyo producto es necesario para la incorporación del hierro al citoplasma celular (Dancis et al., 1992; Askwith et al., 1994; Georgatsou y Alexandraki, 1994; Yamaguchi-lwai et al., 1995). Así pues, AFT1 participaría en la inducción del sistema de alta afinidad a concentraciones bajas de hierro en el medio (Yamaguchi-lwai et al., 1995).

En este trabajo se confirma que RCS1 y AFT1 son el mismo gen y se demuestra, mediante el uso de dos sistemas reporteros (GAL1_p-HIS3 y GAL1_p-lacZ), que el producto de este gen, la proteína Rcs1, tiene una capacidad transactivadora comparable a la del factor transcripcional VP16 del virus del herpex simple en levaduras. Por otro lado, se demuestra la necesidad de Rcs1 tanto para la asimilación de hierro en condiciones de bajos niveles de este metal como para el crecimiento sobre fuentes de carbono respirables como el etanol o glicerol. El hecho de que la capacidad transactivadora de la proteína de fusión Gal4_{bd}-Rcs1 sobre el sistema reportero GAL1_n-lacZ no muestre inducción en las condiciones en que Rcs1 es requerido por la célula (es decir, cuando las células se transfieren de un medio con glucosa a un medio con etanol/glicerol o cuando se privan de hierro) puede ser debido a que la proteína híbrida Gal4_{bd}-Rcs1 no reproduzca exactamente las propiedades del producto Rcs1 original, o a que la regulación de la actividad transcripcional de Rcs1 requiera otros elementos que sean incapaces de interaccionar con la proteína híbrida. Por otro lado, nuestros estudios de retardamiento en gel indican que Rcs1 es necesaria para la estabilidad del complejo que reconoce el promotor de FRE1 unicamente en condiciones de carencia de hierro. Las bandas de retardamiento observadas cuando se utilizan en los ensayos extractos procedentes de células salvajes privadas o no de hierro o del mutante sin privar son similares, lo que nos lleva a sugerir que la activación de estos complejos en ausencia de hierro debe implicar cambios que no son detectables en las condiciones utilizadas, tales como la fosforilación o la presencia o no de hierro acomplejado. En este sentido es remarcable la presencia a lo largo de Rcs1 de varios dominios potenciales H-XXX-H o H-X-H de unión a metales (Higaki et al., 1992; Regan, 1995). Otra posibilidad sería que algún

elemento del complejo sea sustituído por Rcs1 en condiciones de privación de hierro sin que ello suponga cambios en la movilidad del complejo. El hecho de que con anticuerpos anti-Rcs1 no se consiga variar la movilidad del complejo no permite descartar la presencia de Rcs1 en el mismo; simplemente podría suceder que formando parte del complejo no fuese accesible a los citados anticuerpos. Asimismo, la no restauración del complejo al añadir proteína Rcs1 en los ensayos con extractos procedentes de la cepa mutante tampoco permite descartar totalmente la presencia de Rcs1 en dicho complejo. En cualquier caso, Rcs1 sería responsable de la modificación que activa el complejo en condiciones de carencia de hierro, bien sustituyendo algún elemento del mismo con la consiguiente estabilización del mismo (Fig. 23a), o bien introduciendo una modificación que comportaría la estabilización y activación del complejo en esas condiciones (Fig. 23b). Aunque Rcs1 es también necesaria para la expresión de FRE2 y FET3, el promotor de estos genes no contiene una secuencia responsable de la regulación por hierro similar a la encontrada en FRE1 (Georgatsou y Alexandraki, 1994; Askwith et al., 1994), lo que demuestra que el mecanismo de regulación de los genes necesarios para la entrada de hierro a través del sistema de alta afinidad debe ser complejo. Además, el gen AOB629 (Casamayor et al., 1995), que también se induce como respuesta a la carencia de hierro, lo hace por una vía independiente a Rcs1, indicando también la existencia de mecanismos adicionales de inducción por carencia de hierro independientes de los descritos hasta el momento.

Los mutantes *rcs1-5*, aunque crecen bien en medio SD-glucosa, lo hacen a una velocidad inferior a la de la cepa salvaje, siendo este fenotipo suprimible por hierro. Ello indica que Rcs1 contribuye a la entrada de hierro en estas condiciones, ya sea manteniendo unos niveles basales de actividad ferro-reductasa y de entrada de hierro que resultan suficientes en este medio o bien induciendo la expresión de algún nuevo elemento implicado en la asimilación de hierro, o simplemente participando también en la entrada de hierro a través del sistema de baja afinidad. Indirectamente, la ausencia de Rcs1 podría afectar a la regulación positiva ejercida por el hierro sobre la glucolisis a nivel de las enzimas triosa fosfato isomerasa (codificada por el gen *TPl1*) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (producto del gen *THD3*) (Krieger y Ernst, 1994). Dicha regulación se ejerce postrancripcionalmente. En condiciones de carencia de hierro disminuye considerablemente la vida media de los mRNAs para estas enzimas y consecuentemente los niveles de las mismas, produciéndose una disminución del flujo glucolítico. La ausencia de esta regulación positiva en la cepa carente de Rcs1 podría explicar su crecimiento más lento en glucosa.

Las diferencias entre las cepas RCS1 y rcs1-5 se acentúan durante la fase postdiaúxica, cuando las células crecen a expensas del etanol producido durante la fermentación de la glucosa en la fase de crecimiento exponencial (Werner-Washburne et al., 1993). Ello concuerda con el hecho de que la cepa mutante no crece cuando se la transfiere de un medio SD-glucosa a un medio SD-etanol/glicerol sin variar los niveles de hierro, fenotipo que de nuevo se suprime adicionando hierro al medio de cultivo. Las células incorporan más hierro cuando crecen en presencia de una fuente de carbono no fermentable (Lesuisse et al., 1987), por lo que cabría esperar que en estas condiciones la ausencia de crecimiento del mutante se debiese a su incapacidad de inducir el sistema de alta afinidad para la entrada de hierro. Sin embargo, la cepa salvaje no induce la expresión de los genes FRE cuando se la transfiere de un medio con glucosa a otro con etanol/glicerol, lo que indica que la ausencia de expresión de FRE1 y FRE2 no es la causa que incapacita a la cepa mutante para utilizar fuentes de carbono respirables. A la vista de estos resultados, se podrían sugerir como posibles causas de este fenotipo la ausencia de niveles basales de actividad ferro-reductasa y de entrada de hierro en el mutante, en tanto que, en la cepa salvaje, en presencia de Rcs1, dichos niveles serían suficientes para el crecimiento en fuentes de carbono respirables. Si fuese así, significaría que el sistema de baja afinidad, por sí solo, es insuficiente para suplementar a la célula niveles suficientes de hierro para el crecimiento respiratorio, o bien que dicho sistema de baja afinidad depende también en cierta medida de Rcs1. Alternativamente, la entrada de hierro en presencia de etanol/glicerol podría depender de otros elementos genéticos no descritos cuya expresión estuviese regulada por Rcs1. En este sentido, el producto del gen AOB629 podía haber sido un candidato a priori, pero ni se induce en etanol/glicerol ni su expresión depende de Rcs1, lo que descarta su implicación.

El gen *MAC1* implicado en la asimilación del cobre regula la expresión de *FRE1* como respuesta a dicho metal pero también como respuesta al hierro, lo que explicaría que casi todos los fenotipos observados en los mutantes *mac1* sean suprimibles tanto por cobre como por hierro (Jungmann *et al.*, 1993). Al igual que los mutantes *rcs1-5*, los mutantes *mac1* tampoco inducen la expresión de *FRE1* en condiciones de carencia de hierro (Hassett y Kosman, 1995), ni crecen en fuentes de carbono respirables. Este paralelismo entre el cobre y el hierro sugiere la posibilidad de que *MAC1* y *RCS1* sean elementos de la misma vía. Sin embargo, mientras que la incapacidad de los mutantes *rcs1-5* para crecer en etanol/glicerol es suprimible por hierro, en el caso de los mutantes *mac1* dicho fenotipo es unicamente suprimible por cobre pero no por hierro. Asimismo, los mutantes *mac1* son sensibles al H₂O₂, al no poder inducir el gen *CTT1* (la otra diana conocida de *MAC1*) (Jungmann *et al.*, 1993);

en cambio, los mutantes rcs1-5 crecen perfectamente en medio YPD con H_2O_2 0,5 mM (datos no mostrados en detalle). De estos resultados podemos inferir que RCS1 y MAC1 aunque actúen sobre la misma diana (FRE1), deben hacerlo por vías diferentes.

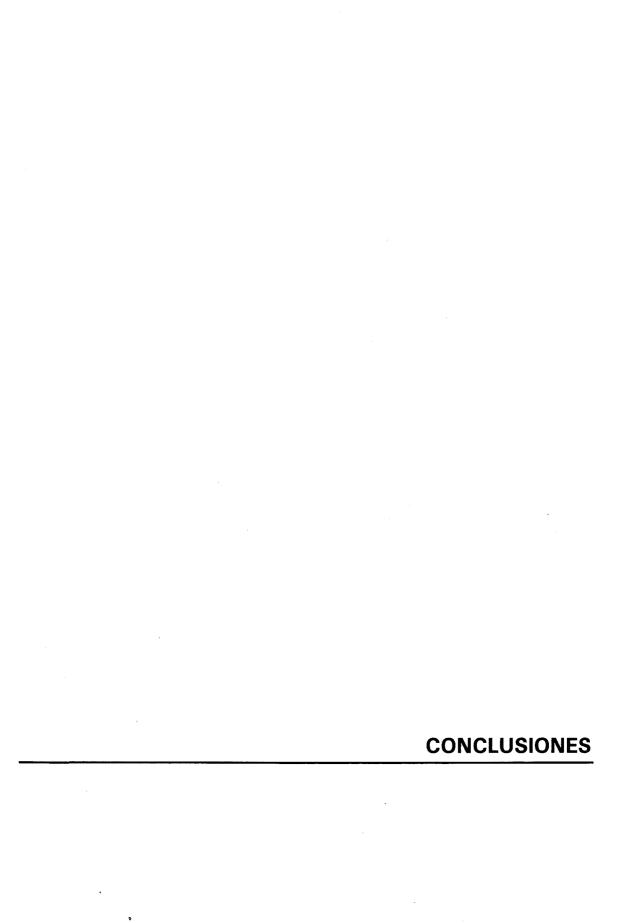
La posibilidad de que exista una regulación de los genes implicados en la asimilación del hierro por la fuente de carbono tampoco es descartable. El aislamiento del gen FUP1 (Eide y Guarente, 1992) a partir de su capacidad de mejorar el crecimiento de una cepa en un medio deficitario en hierro cuando se halla en múltiples copias relacionó este gen con la asimilación del hierro. Dicho gen no resulta necesario para la incorporación de hierro cuando las células crecen en glucosa, pero parece tener un papel importante cuando las células crecen utilizando la rafinosa como fuente de carbono (el mutante fup1 muestra niveles de incorporación de hierro del orden del 50% de los de la cepa salvaje cuando crece en rafir.osa). El hecho de que este mismo gen se hubiese aislado previamente como supresor en multicopia de un mutante $snf1_{ts}$ incapaz de expresar SUC2 (Estruch y Carlson, 1990) indicaría que muy probablemnte la expresión de *FUP1* esté regulada por la proteína Snf1, que tal como se indica en la Introducción de este trabajo es necesaria para la desrepresión por glucosa. Lo anterior permitiría sugerir que la utilización de una fuente de carbono y la entrada de hierro podrían ser procesos coregulados y que genes como FUP1/MSN1 o RCS1 podrían estar implicados en la relación entre ambos procesos.

La sobreexpresión de *RCS1* comporta una detención homogénea del crecimiento celular en la fase G1. Este efecto no parece ser debido a toxicidad por entrada masiva de hierro, ni tampoco a un bloqueo en la entrada del mismo, ya que no es suprimible ni por ferrocina ni por hierro. Dada la implicación de *FRE1* en la reducción y entrada del cobre cabría la posibilidad de que la parada observada se debiese a toxicidad por este metal. Finalmente, Rcs1 podría estar implicada en otras funciones celulares diferentes a su papel descrito en la asimilación del hierro y en este sentido el uso de la genética de dominancia (Espinet et al., 1995; Ramer et al., 1992) podría dar luz al respecto.

La fosforilación de Rcs1 en condiciones que comportan una detención transitoria o permanente del crecimiento celular (eliminación de la fuente de carbono, transición de un metabolismo fermentativo a respiratorio, detención del ciclo celular en G1 en mutantes *cdc*) es independiente de las proteína-quinasas producto de los genes *SNF1*, *TPK1*, 2 y 3, o *YAK1*. Cabe destacar que la parada transitoria en G1 causada por factor alfa (que es reversible y no comporta detención del crecimiento)

constituye la única condición (de todas las estudiadas) que no induce la fosforilación de Rcs1. Durante una transición a medio con etanol/glicerol (en la cual hay una parada transitoria del crecimiento en la que Rcs1 aparece temporalmente hiperfosforilada), la expresión de FRE1 y FRE2 se induce en respuesta a la carencia de hierro solamente cuando el crecimiento se ha reanudado y la proteína Rcs1 está de nuevo hipofosforilada. Además, en un experimento independiente en el que células creciendo exponencialmente en glucosa se privan de hierro se sugiere que es la forma no fosforilada la responsable de la inducción de los genes FRE. Según todo lo anterior, la fosforilación podría suponer un mecanismo de inactivación de la proteína en condiciones de detención del crecimiento celular. Rcs1 podría ser una proteína mediadora de la inducción de la asimilación de hierro sólo en aquellas condiciones en que las células son capaces de crecer una vez se han adaptado a la fuente de carbono disponible. La adaptación a la fuente de carbono sería metabólicamente dominante sobre otras señales nutricionales, en este caso los niveles de hierro. Resulta bastante lógico que la célula no incorpore un elemento que puede resultarle tóxico en condiciones en que no le es necesario porque no está creciendo.

Trabajos de Lesuisse et al., (1991) con diferentes mutantes de la vía Ras asignan un papel esencial al cAMP como inductor de la actividad ferro-reductasa y proponen la mediación en este efecto de una fosforilación llevada a cabo por la proteína quinasa A dependiente de cAMP. Por todo lo expuesto anteriormente parece claro que además de deficiencia de hierro la célula necesita un factor indicativo de que crece activamente para inducir la entrada del hierro. Dicho factor podría ser el cAMP, ya que cuando un mutante $cdc25_{ts}$ privado de hierro se pasa a la temperatura restrictiva los niveles de actividad ferro-reductasa caen drástica y rápidamente, efecto que se suprime si al mismo tiempo que se hace el cambio de temperatura se suministra cAMP a las células (Lesuisse et al., 1991). El hecho de que el descenso de actividad coincida con la fosforilación de Rcs1 lleva immediatamente a ligar ambos resultados y a plantear la posibilidad de un bloqueo de la fosforilación de Rcs1 por parte de la proteina quinasa A dependiente de cAMP. En dicho sentido, nuestros resultados con una cepa portadora de una mutación bcy1 que comporta niveles altos de actividad para esta quinasa (en la cual la fosforilación de Rcs1 no se diferencia de la observada en la cepa salvaje) descartan esa posibilidad. Estos mismos resultados permiten sugerir que si la modificación de Rcs1 estuviese bajo control del gen RAS1 (como parece indicar la fosforilación de Rcs1 observada en este mutante cuando crece exponencialmente en glucosa) dicho control debería ejercerse por una vía independiente de Tpk. Así pues, en la señalización de crecimiento activo sobre la actividad de las ferro-reductasas podría intervenir el cAMP afectando el estado de fosforilación de Rcs1. Esta situación podría guardar similitud con lo observado en procariotas, donde la expresión de los genes regulados por hierro está mediada por la proteína Fur, que actua como represor de la expresión de los mismos cuando está unida a hierro. Los niveles de proteína Fur se mantienen aproximadamente constantes, siendo la presencia o ausencia de hierro lo que determina su efecto represor. El promotor del gen *fur* tiene una secuencia de reconocimiento por la proteína CAP responsable de activar la expresión de este gen cuando se agota la glucosa del medio y los niveles de cAMP se incrementan (de Lorenzo *et al.*, 1988). En estas condiciones se induce la expresión de *fur*, los niveles de proteína Fur aumentan y se reprime la expresión de los genes implicados en la toma de hierro. Resultados *in vitro* apoyan la idea de que cuando los niveles de Fur se incrementan, ésta es capaz de unirse a los respectivos promotores incluso en presencia de hierro. Así pues, también en *E. coli* la expresión de los genes necesarios para la asimilación de hierro se supedita o se correlaciona con el estado metabólico de las células (de Lorenzo *et al.*, 1988), tal como se propone en este trabajo que sucedería en levaduras.



A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha completado la secuencia del gen *RCS1* de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya pauta de lectura abierta contiene 2070 nucleótidos y codifica para una proteína marcadamente básica de 77.4 Kda.
- 2) El mutante carente por completo del gen *RCS1* no presenta alterado el tamaño celular, ni tiene afectadas su capacidad de esporulación y de germinación de las esporas, fenotipos estos últimos descritos previamente para los mutantes portadores de una delección parcial *rcs1-1*. En cambio, presenta un crecimiento más lento que la correspondiente cepa salvaje cuando crece en un medio con glucosa como fuente de carbono y no crece sobre fuentes de carbono no fermentables.
- 3) La inducción de los genes necesarios para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, tales como *ADH2* o *ICL1*, no se ve afectada en las células carentes de *RCS1*.
- 4) El gen *RCS1* es necesario para la asimilación del hierro por *Saccharomyces*. *cerevisiae*, siendo requerido para inducir la expresión de los genes implicados en el sistema de alta afinidad de transporte de hierro. De acuerdo con ello, la incapacidad de la cepa carente de *RCS1* para crecer sobre fuentes de carbono respirables es suprimible por hierro, lo mismo que su crecimiento más lento sobre fuentes fermentables de carbono.
- 5) La baja transformabilidad de los mutantes carentes de *RCS1* puede suprimirse disminuyendo el tiempo de exposición de las células al acetato de litio y/o añadiendo hierro al medio de selección de los transformantes. Se ha comprobado que la adición de Fe también mejora la eficiencia de transformación de la cepa salvaje, resultado a considerar en aquellas situaciones en que se deseen eficiencias de transformación especialmente altas.
- 6) La sobreexpresión de *RCS1* provoca una detención del crecimiento en la fase G1 del ciclo celular, efecto no suprimible por privación o adición de hierro, por lo que es posible que *RCS1* tenga otras funciones biológicas en *Saccharomyces cerevisiae*.
- 7) La proteína Rcs1 es un factor transcripcional. Fusionada al dominio de unión a DNA de la proteína Gal4 muestra la misma capacidad transactivadora sobre los sistemas

reporteros *GAL1-lacZ* y *GAL1-HIS3* que el factor transcripcional VP16 del virus del herpes simple en esas mismas condiciones.

- 8) Los sistemas reporteros utilizados (*GAL1-lacZ* y *GAL1-HIS3*) diseñados para el estudio de interacciones entre proteínas mediante el sistema del doble híbrido deberían optimizarse eliminando la secuencia responsable de la represión por glucosa que opera sobre los mismos. Dicha secuencia debe corresponder a un sitio de reconocimiento por Mig1 existente entre la región UAS y la caja TATA del promotor *GAL1*.
- 9) Los experimentos *in vitro* con el promotor de *FRE1* han demostrado que la proteína Rcs1 es necesaria para que se forme el complejo responsable de la inducción de *FRE1* en condiciones de privación de hierro, aunque Rcs1 podría no formar parte de dicho complejo.
- 10) El gen *RCS1* puede desempeñar un papel adicional al ya citado, puesto que en condiciones en que el sistema de alta afinidad para la asimilación de hierro no está inducido (crecimiento exponencial en medio SD-glucosa), la ausencia de *RCS1* también afecta al crecimiento celular.
- 11) La proteína Rcs1 se modifica por fosforilación en condiciones de detención transitoria o permanente del crecimiento celular. Nuestros resultados muestran que dicha fosforilación es independiente de las proteína-quinasas producto de los genes SNF1, y YAK1, asicomo de la proteína quinasa A dependiente de cAMP, aunque sugieren la posibilidad de que elementos anteriores de la vía Ras puedan estar implicados.
- 12) Durante transiciones de crecimiento por cambio de fuente de carbono, la privación de hierro solamente induce la expresión de *FRE1* y *FRE2* cuando Rcs1 está en su forma hipofosforilada, lo que sugiere que la fosforilación de Rcs1 podría constituir un mecanismo para inactivar su capacidad transactivadora.

BIBLIOGRAFIA

- **Abrams, E., L. Neigeborn y M. Carlson** (1986). Molecular analysis of *SNF2* and *SNF5* genes required for expression of glucose-repressible genes in *S. cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 6:3643-3651.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Andrews, B.J. y I. Herskowitz (1989). The yeast *SWI4* protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependent transcription. Nature 342:830-833.
- Askwith, C., D. Eide, A. Van Ho, P.S. Bernard, L. Li, S. Davis-Kaplan, D.M. Sipe y J. Kaplan (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicooper oxidase required for ferrous iron uptake. Cell 76:403-410.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl (1989). Current Protocols in Molecular Biology. Wiley-Interscience, Nueva York.
- Bagg, A. y J.B. Neilands (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. Microbiol. Rev. 51:509-518.
- Bailey, R.B. y A. Woodword (1984). Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 193:507-512.
- Baker, E.N., S.V. Rumball y B.F. Anderson (1987). Transferrins: insights into structure and function from studies on lactoferrin. Trends Biochem. 12:350-353.
- Barral, Y., S. Jentsch y C. Mann (1995). G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. Genes Dev. 9:399-409.
- **Bartel, P.L., C.T. Chien, R. Sternglans y S. Fields** (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *En* D.A. Hartley (ed.), Cellular Interactions in Development: a Practical Approach, pp. 153-179. Oxford University Press, Oxford.
- Berben, G., J.Dumont, V. Gilliquer, P.A. Bolle y F. Hilger (1991). The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 7:475-477.
- Berger, S.L., W.D. Cress, A. Cress, S.J. Triezenberg y L. Guarente (1990). Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. Cell 61:1199-1208.
- Beullens, M., K. Mbonyi, L. Geerts, D. Gladines, K. Detremerie, A.W.H. Jans and J.M. Thevelein (1988). Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolisis-and glucose repression-mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 172:227-231.
- **Breeden, L. y K. Nasmyth** (1987). Similarity between cell cycle genes of budding and fission yeast and the *notch* gene of *Drosophila*. Nature 329:651-654.
- **Broach, J.R.** (1991). *RAS* genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. Trends Genet. 7:28-33.
- Broach, J.R., J.N. Strathern y J.B. Hicks (1979). Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *can1* gene. Gene 8: 121-133.
- Byrne, S.M. y C.S. Hoffman (1993). Six *git* genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J. Cell Sci. 105:1095-1100.

- Cairns, B.R., Y.J. Kim, M.H. Sayre, B.C. Laurent y R.D. Kornberg (1994). A multisubunit complex containing the *SWI/ADR6*, *SWI2/SNF2*, *SWI3*, *SNF5*, and *SNF6* gene products isolated from yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1950-1954.
- Carlson, M., B.C. Osmond, L. Neigeborn y D. Botstein (1984). A supressor of snf1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. Genetics 107:19-32.
- Casamayor, A., M. Aldea, C. Casas, E. Herrero, F.J. Gamo, M.J. Lafuente, C. Gancedo y J. Ariño (1995). DNA sequence analysis of a 13 kbp fragment of the left arm of yeast chromosome XV containing seven new open reading frames. Yeast 11:1281-1288.
- Casey, J.L., M.W. Hentze, D.M. Koeller, S.W. Caughman, T.A. Rouault, R.D. Klausner y J.B. Harford (1988). Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. Science 240:924-928.
- **Celenza, J.L. y M. Carlson** (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. Science 233:1175-1180.
- **Celenza, J.L. y M. Carlson** (1989). Molecular analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. Mol. Cell. Biol. 9:5034-5044.
- **Celenza, J.L., F.J. Eng y M. Carlson** (1989). Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF4 protein kinase. Mol. Cell. Biol. 9:5045-5054.
- Cheng, C., N. Kacherovsky, K.M. Dombek, S. Camier, S.K. Thukral, E. Rhim y E.T. Young (1994). Identification of potential target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. Mol. Cell. Biol. 14:3842-3852.
- Cherry, J.R., T.r. Johnson, C. Dollard, J.R. Shuster y C.L. Denis (1989). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. Cell 56:409-419.
- Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz y S. Fields (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-9582.
- Côté, J., J. Quinn, J.L. Workman y C.L. Peterson (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. Science 265:53-60.
- **Crichton, R.R.** (1991). Inorganic biochemistry of iron metabolism. Ellis Horwood Ltd., Chichester, Inglaterra.
- Dancis, A., R.D. Klausner, A.G. Hinnebusch y J.G. Barriocanal (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:2294-2301.
- Dancis, A., D.G. Roman, G.J. Anderson, A.G.Hinnebusch y R.D. Klausner (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3869-3873.
- Dancis, A., D.S. Yuan, D. Haile, C. Askwith, D. Eide, C. Moehle, J. Kaplan y R.D. Klausner (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for cooper in iron transport. Cell 76:393-402.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, F. Giovannini y J.B. Neilands (1988). Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 173:537-546.

- **Denis, C.L., M. Ciriacy y E. T. Young** (1981). A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 148:355-368.
- **De Silva, D.M., C.C. Askwith, D. Eide y J. Kaplan** (1995). The *FET3* gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. J. Biol. Chem. 270:1098-1101.
- Dix, D.R., J.T. Bridgham, M.A. Broderius, C.A. Byersdorfer y D.J. Eide (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 269:26092-26099.
- **Dombek, K.M., S. Camier y E.T. Young** (1993). *ADH2* expression is repressed by REG independently of mutations that alter the phosphorylation of the yeast transcription factor ADR1. Mol. Cell. Biol. 13:4391-4399.
- **Dumortier, F., J.C. Argüelles y J.M. Thevelein** (1995). Constitutive glucose-induced activation of the Ras-cAMP pathway and aberrant stationary-phase entry on a glucose-containing medium in the *Saccharomyces cerevisiae* glucose-repression mutant *hex2*. Microbiology 141:1559-1566.
- Durfee, T., K. Becherer, P.L. Chen, S.H. Yeh, Y. Yang, A.E. Kilburn, W.H. Lee y S.J. Elledge (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. Genes Dev. 7:555-569.
- **Eide, D. y L. Guarente** (1992). Increased dosage of a transcriptional activator gene enhances iron-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 138:347-354.
- **Eide, D., S. Davis-Kaplan, I. Jordan, D. Sipe y J. Kaplan** (1992). Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the ferrireductase and Fe(II) transporter are regulated independently. J. Biol. Chem. 267:20774-20781.
- **Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank y G.A. Müller** (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity that ³²P-based hybridizations. Anal. Biochem. 210:235-244.
- Entian, K.D. (1980). Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. Mol. Gen. Genet. 178:633-637.
- **Entian, K.D.** (1986). Glucose repression: a complex regulation system in yeast. Microbiol. Sci. 3:366-371.
- Entian, K.D. y J.A. Barnett (1992). Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. Trends Biochem. Sci. 17:506-510.
- Entian, K.D. y K.U. Froehlich (1984). Saccharomyces cerevisiae mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. J. Bacteriol. 158:29-35.
- Entian, K.D. y F.K. Zimmermann (1980). Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 177:345-350.
- Entian, K.D., E. Kopetzki, K.U. Froehlich y D. Mecke (1984). Cloning of hexokinase isoenzyme PI from *Saccharomyces cerevisiae*. PI transformants confirm the unique role of hexokinase isoenzyme PII for glucose repression in yeasts. Mol. Gen. Genet. 198:50-54.
- Espinet, C., M.A. de la Torre, M. Aldea y E. Herrero (1995). An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. Yeast 11:25-32.

Estojak, J., R. Brent y E.A. Golemis (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. Mol. Cell. Biol. 15:5820-5829.

Estruch, F. y M. Carlson (1990a). Increased dosage of the *MSN1* gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the SNF1 protein kinase. Nucleic Acids Res. 18:6959-6964.

Estruch, F. y M. Carlson (1990b). SNF6 encodes a nuclear protein that is required for expression of many genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 10:2544-2553.

Fernández, E., M. Fernández, F. Moreno y R. Rodicio (1993). Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 333:238-242.

Fernández, E., F. Moreno y R. Rodicio (1992). The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 204;983-990.

Fields, S. y O.K. Song (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature 340:245-246.

Flanagan, P.M., R.J. Kelleher III, M.H. Sayre, H. Tschochner y R.D. Kornberg (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro*. Nature 350:436-438.

Flick, J.S. y M. Johnston (1990). Two systems of glucose repression of the *GAL1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:4757-4769.

Gancedo, J.M. (1992). Carbon catabolite repression in yeast. Eur. J. Biochem. 206:297-313.

Gancedo, J.M. y C. Gancedo (1986). Catabolite repression mutants of yeast. FEMS Microbiol. Lett. 32:179-187.

Garrett, S., M.M. Menold y J.R. Broach (1991). The Saccharomyces cerevisiae YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. Mol. Cell. Biol. 11:4045-4052.

Georgatsou, E. y D. Alexandraki (1994). Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 14:3065-3073.

Gietz, R.D. y A. Sugino (1988). New yeast-Escherichia coli shutle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. Gene 74:527-534.

Gietz, D., A. S. St. Jean, R.A. Woods y R.H. Schiestl (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 20:1425.

Gollwitz, D. y J. Suves (1980). Complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2545-2550.

Gossen M. y H. Bujard (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551.

Griggs, D.W. y M. Johnston (1991). Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8597-8601.

Guarente, L. (1983). Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to stuy expression of cloned genes in yeast. Methods Enzymol. 101:181-191.

- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli. En D.M.* Glover (ed.), DNA Cloning: a Practical Approach (vol. 1), pp.109-135. IRL Press, Oxford.
- Harlow, E. y D. Lane (1988). Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- Hassett, R. y D.J. Kosman (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 270:128-134.
- **Hedges, D., M. Proft y K.D. Entian** (1995). *CAT8*, a new zinc cluster encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 15:1915-1922.
- **Henikoff, S.** (1987). Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequencing analysis. Methods Enzymol. 155:156-165.
- Herrero, P., R. Fernández y F. Moreno (1989). The hexokinase isoenzyme PII of Saccharomyces cerevisiae is a protein kinase. J. Gen. Microbiol. 135:1209-1216.
- Herrero, P., J. Galindez, N. Ruiz, C. Martínez-Campa y F. Moreno (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. Yeast 11:137-144.
- **Higaki, J.N., R.J. Fletterick y C.S. Craik** (1992). Engineered metalloregulation in enzymes. Trends Biochem. 17:100-104.
- Hill, J., K.A.lan G. Donald y D. E. Griffiths (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleid Acids Res. 19: 5791.
- **Johnston, M.** (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 51:458-476.
- Johnston, M. y M. Carlson (1992). Regulation of carbon and phosphate utilization. *En* E.W. Jones, J.R. Pringle y J.R. Broach (eds.), The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces (vol. 2), pp. 193-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- **Johnston, M., J.S. Flick y T. Pexton** (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of the *GAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 14:3834-3841.
- Jungmann, J., H.R. Reins, J. Lee, A. Romeo, R. Hassett, D. Kosman y S. Jentsch (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. EMBO J. 12:5051-5056.
- Klausner, R.D. y A. Dancis (1994). A genetic approach to elucidating eukaryotic iron metabolism. FEBS Lett. 355:109-113.
- Klausner, R.D., T.A. Rouault y J.B. Hartford (1993). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. Cell 19:28.
- Koch, C. y K. Nasmyth (1994). Cell cycle regulated transcription in yeast. Curr. Opin. Cell. Biol. 6:451-459.
- Krieger, K. y J.F. Ernst (1994). Iron regulation of triosephosphate isomerase transcript stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 140:1079-1084.
- **Kuchin, S., P. Yeghiayan y M. Carlson** (1995). Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4006-4010.

- Kusters, J.G., E.J. Jager y B.A.M. van der Zeijst (1989). Inprovement of the cloning linker of the bacterial expression vector pEX. Nucleic Acids Res. 17:8007.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- **Lee, K.D. y D.E. Lewin** (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. Mol. Cell. Biol. 12:172-182.
- **Lesuisse, E. and P. Labbe** (1989). Reductive and non reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 135:257-263.
- **Lesuisse, E., M. Casteras-Simon y P. Labbe** (1995). Ferrireductase activity in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: colorimetric assays on agar plates. Annal. Biochem. 226:375-377.
- **Lesuisse, E., B. Horion, P. Labbe y F. Hilger** (1991). The plasma membrane ferrireductase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is partially controlled by cyclic AMP. Biochem. J. 280:545-548.
- **Lesuisse**, E., F. Raguzzi y R.R. Crichton (1987). Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of a reduction step. J. Gen. Microbiol. 133:3229-3236.
- **Litwin, C.M.** y **S.B. Calderwood** (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. Clin. Microbiol. Rev. 6:137-149.
- **Lohr, D., P. Venkov y J. Zlatanova** (1995). Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. FASEB J. 9:777-787.
- Lovley, D.R., M.J. Baedecker, D.J. Lonergan, I.M. Cozzarelli, E.J.P. Phillips y D.I. Siegel (1989). Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. Nature 339:297-299.
- Lundin, M., J.O. Nehlin y H. Ronne (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. Mol. Cell. Biol. 14:1979-1985.
- Ma, H., L. M. Bloom, C.T. Walsh y D. Botstein (1989). The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 9:5643-5649.
- Makowski, G.S. y M.L. Ramsby (1993). pH modification to enhance the molecular sieving properties of sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 212:283-285.
- Mazón, M.J., M.M. Behrens, E. Morgado y F. Portillo (1993). Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to poor expression of the *TPK*3 gene. Eur. J. Biochem. 213:501-506.
- Mazón, M.J., J.M. Gancedo y C. Gancedo (1982). Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *In vivo* phosphorylation of the enzyme. J. Biol. Chem. 257:1128-1130.
- Mercado, J.J. y J.M. Gancedo (1992). Regulatory regions in the yeast *FBP1* and *PCK1* genes, FEBS Lett. 311:110-114.
- Mercado, J.J., O. Vincent y J.M. Gancedo (1991). Regions in the promoter of the yeast *FBP1* gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene *MIG1*. FEBS Lett. 291:97-100.

Müllner, E.W., B. Neupert y L.C. Kühn (1989). A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. Cell 58:373-382.

Nasmyth, K. y L. Dirick (1991). The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. Cell 66:995-1013.

Nehlin, J.O. y H. Ronne (1990). Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumor finger proteins. EMBO J. 9:2891-2898.

Nehlin, J.O., M. Carlberg y H. Ronne (1991). Control of the yeast *GAL* genes by MIG1 repressor:a transcriptional cascade in the glucose response. EMBO J. 10:3373-3377.

Neigeborn, L. y M. Carlson (1984). Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 108:845-858.

Neigeborn, L., K. Rubin y M. Carlson (1986). Supressors of *snf2* mutations restore invertase derepression and cause temperature-sensitive lethality in yeast. Genetics 112:741-753.

Neilands, J.B. (1990). Molecular biology and regulation of iron acquisition by *Escherichia coli* K-12. *En* B.H. Iglewski y V.L. Clark (eds.), Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, pp. 205-223. Academic Press, San Diego, USA.

Niederacher, D. y K.D. Entian (1991). Characterization of Hex2 protein, a negative regulatory element necessary for glucose repression in yeast. Eur. J. Biochem. 200:311-319.

Nieuwint, R.T.M., W.H. Mager, K.C.T. Maurer y R.J. Planta (1989). Mutational analysis of the upstream activation site of yeast ribosomal genes. Curr. Genet. 15:247-251.

Nocero, M., T. Isshiki, M. Yamamoto y C. Hoffman (1994). Glucose repression of *fbp1* transcription in *Schizosaccharomyces pombe* is partially regulated by adenylate cyclase activation by a G protein α subunit encoded by *gpa2* (*git8*). Genetics 138:39-45.

Ordiz, I., P. Herrero, R. Rodicio y F. Moreno (1995). Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by an internal decapeptide sequence. FEBS Lett. 367:219-222.

Orkin, S.H. (1989). Molecular genetics of chronic granulomatous disease. Annu. Rev. Immunol. 7:277-307.

Payne, S.M. y K.M. Lawlor (1990). Molecular studies on iron acquisition by non-Escherichia coli species. En B.H. Iglewski y V.L. Clark (eds.), Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, pp. 225-248. Academic Press, San Diego, USA.

Portillo, F. y M.J. Mazón (1986). The *Saccharomyces cerevisiae* start mutant carrying the *cdc25* mutation is defective in activation of plasma membrane ATPases by glucose. J. Bacteriol, 168:1254-1257.

Pringle, J.R., A.E.M. Adams, D.G. Drubin y B.K. Haarer (1991). Immunofluorescence methods for yeast. Methods Enzymol. 194:565-602.

Printen, J.A. y G.F. Sprague Jr. (1994). Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. Genetics 138:609-619.

Proft, M., D. Grzesitza y K.D. Entian (1995a). Identification and characterization of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *PCK1* of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 246:367-373.

Proft, M., P. Kötter, D. Hedges, N. Bojunga y K.D. Entian (1995b). *CAT5*, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 24:6116-6126.

Ramer, S.W., S.J. Elledge y R.W. Davis (1992). Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11589-11593.

Regan, L. (1995). Protein design: novel metal-binding sites. Trends Biochem. 20:280-285.

Rittenhouse, J., P.B. Harrsch, J.N. Kim y F. Marcus (1986). Amino acid sequence of the phosphorylation site of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. J. Biol. Chem. 261:3939-

Roman, D.G., A. Dancis, G.J. Anderson y R.D. Klausner (1993). The fission yeast ferric reductase gene frp^+ is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. Mol. Cell. Biol. 13:4392-4350.

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. Trends Genet. 11:12-17.

Rose, M., W. Albig y K.D. Entian (1991). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinase PI and hexokinase PII. Eur. J. Biochem. 199:511-518.

Rose, M., K.D. Entian, L. Hofmann y R.F. Vogel (1988). Irreversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphatase independent of protein phosphorylation at Ser11. FEBS Lett. 241:55-59.

Rose, M.D., F. Winston y P. Hieter (1990). Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

Rosenkrantz, M., C.S. Kell, E.A. Pennell y L.J. Devenish (1994). The HAP2,3,4 transcriptional activator is required for derepression of the yeast citrate synthase gene, *CIT1*. Mol. Microbiol. 13:119-131.

Rothstein, R. (1983). One-step gene disruption in yeast. Methods Enzymol. 101:202-211.

Russell, D.W., M. Smith, V.M. Williamson y E.T. Young (1983). Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. J. Biol. Chem. 258:26674-2682.

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd. ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

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

Schüller, H.J. y K.D. Entian (1988). Molecular characterization of yeast regulatory gene *CAT*3 necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. Gene 67:247-257.

Shore, D. y K. Nasmyth (1987). Purification and cloning of a DNA-binding protein that binds to both silencer and activator elements. Cell 51:721-732.

Smith, D.J., A. Proudfoot, L. Friedli, L.S. Klig, G. Paravicini y M. A. Payton (1992). *PMI40*, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. Mol. Cell. Biol. 12:2924-2930.

Thevelein, J.M. (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. Mol. Microbiol. 5:1301-1307.

Thevelein, J.M. (1994). Signal transduction in yeast. Yeast 10:1753-1790.

Thompson-Jaeger, S., J. François, J.P. Gaughran y K. Tatchell (1991). Deletion of *SNF1* affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. Genetics 129:697-706.

Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, J.D. Scott, B. McMullen, M. Hurwitz, E.G. Krebs y M. Wigler (1987a). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. biol. 7:1371-1377.

Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller y M. Wigler (1987b). Three different genes in S. cerevisiae encode the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Cell 50:277-287.

Tortora, P., N. Burlini, F. Leoni y A. Guerritore (1983). Dependence on cyclic AMP of glucose-induced inactivation of yeast gluconeogenic enzymes. FEBS Lett. 155:39-44.

Treitel, M.A. y M. Carlson (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3132-3136.

Trumbly, R.J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 6:15-21.

Tzamarias, D. y K. Struhl (1994). Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. Nature 369:758-760.

Vallier, L.G. y M. Carlson (1994). Synergistic effect from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 137:49-54.

van Aelst, L., S. Hohmann, B. Bulaya, W. de Koning, L. Sierkstra, M.J. Neves, K. Luyten, R. Alijo, J. Ramos, P. Coccetti, E. Martegani, N.M. de Magalläes-Rocha, R.L. Brandão, P. van Dijck, M. Vanhalewyn, P. Dumez, A.W.H. Jans y J.M. Thevelein (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol.Microbiol. 8:927-943.

von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem. 133:17-21.

Weinberg, E.D. (1995). Acquisition of iron and other nutrients in vivo. *En* J.A. Roth et al. (eds.), Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 2nd ed., pp. 79-93. American Society for Microbiology, Washington, USA.

Werner-Washburne, M., E. Braun, G.C. Johnston y R.A. Singer (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 57:383-401.

Williamson, V.M., D. Cox, E.T. Young, D.W. Russell y M. Smith (1983). Characterization of transposable element-associated mutations that alter yeast alcohol dehydrogenase II expression. Mol. Cell. Biol. 3:20-31.

Wills, C. (1990). Regulation of sugar and ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25:245-280.

Winkelmann, G., D. van der Helm y J.B. Neilands (eds) (1987). Iron transport in microbes, plants and animals. VCH Verlagsgesellschaft, Nueva York, USA.

Winston, F. y M. Carlson (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. Trends Genet. 8:387-391.

Yamaguchi-lwai, Y., A. Dancis y R.D. Klausner (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 14:1231-1239.

Yang, X., R. Jiang y M. Carlson (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. EMBO J. 13:5878-5886.

Yoshinaga, S.K., C.L. Peterson, I. Herskowitz y K. Yamamoto (1992). Roles of SWi1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. Science 258:1598-1604.

Zhang, Y.Z., J.J. Naleway, K.D. Larison, Z. Huang y R.P. Haugland (1991). Detecting *lacZ* gene expression in living cells with new lipophilic, fluorogenic β -galactosidase substrates. FASEB J. 5:3108-3113.

Zimmermann, F.K. (1977). Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. Mol. Gen. Genet. 154:75-82.

Zueco, **J.** y **A.** Boyd (1992). A set of protein A fusion vectors for use in combination with pEX vectors in the production and affinity purification of specific antibodies. Gene 121:181-182.