



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**“Aislamiento y caracterización inicial de proteínas nucleares
que reconocen elementos discretos en el promotor del gen
Cs-mnp2B de *Ceriporiopsis subvermispora*”**

Memoria para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

Michel Roberto Agredo Salazar

**Director de Memoria
Dr. Rafael Vicuña Errázuriz
Laboratorio de Bioquímica
Dpto. de Genética Molecular y Microbiología
Fac. de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile**

**Profesor Patrocinante
Dr. Sergio Lobos Camus
Laboratorio de Bioquímica General
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile**

Diciembre 2006

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
SISTEMA LIGNINOLITICO DE <i>PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM</i>	2
SISTEMA LIGNINOLITICO DE <i>CERIPORIOPSIS SUBVERMISPOA</i>	3
ANTECEDENTES	4
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y METODOS	10
1-MATERIALES	10
1.1-MATERIALES BIOLÓGICOS	10
1.2-REACTIVOS Y MATERIALES GENERALES.....	10
1.3-VECTORES.	11
1.4-PARTIDORES PARA PCR.....	11
2- MÉTODOS	11
2.1 CONDICIONES DE CULTIVO PARA <i>CERIPORIOPSIS SUBVERMISPOA</i>	11
2.2- CULTIVO ESTACIONARIO.....	12
2.3- CULTIVO CON AGITACIÓN.	12
2.4-OBTENCIÓN DE SONDAS MEDIANTE PCR.	12
2.5-ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....	13
2.6 MARCACIÓN DE PARTIDORES	13
2.7 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES DE <i>C. SUBVERMISPOA</i>	13
2.8 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.	14
2.9 ENSAYOS DE UNIÓN.	14
2.9.1- CONDICIONES DE UNIÓN Y COMPETENCIA.....	14
2.10 GELES DE RETARDO (EMSA).....	15
2.11 RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE.....	15
2.12 PROGRAMAS COMPUTACIONALES.....	15
RESULTADOS	16
DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA UNIÓN DE PROTEÍNA NUCLEARES DE <i>C. SUBVERMISPOA</i> A LA SONDA B1A.....	16

RECUPERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO ENRIQUECIDO EN PROTEÍNAS NUCLEARES DE <i>C. SUBVERMISPO</i> QUE FORMAN UN COMPLEJO ESPECÍFICO CON LA SONDA $\beta 1A$	19
ESTUDIO <i>IN-SILICO</i> DEL FRAGMENTO $\beta 1A$	22
DISCUSIÓN	25
ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS SITIOS DE UNIÓN HIPOTÉTICOS A FACTORES TRANSCRIPCIONALES ENCONTRADOS EN EL FRAGMENTO EN ESTUDIO	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1

Partidores para PCR 12

Tabla 2

Programa de PCR 14

Figura N° 1

Esquema de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales en los promotores de los genes *Cs-mnp1*, *Cs-mnp2b*, *Cs-mnp3* y *Cs-lcs*. 5

Figura N° 2

Secuencia parcial de la región promotora del gen *Cs-mnp2B*. 7

Figura N° 3

Autorradiografía de un ensayo de footprinting químico de la sonda $\beta 1$. 8

Figura N° 4

Diseño de la sonda $\beta 1A$. 17

Figura N° 5

Ensayos de competencia para verificar la especificidad de unión entre las proteínas presentes en el extracto nuclear y el fragmento $\beta 1A$. 18

Figura N° 6

Esquema de recuperación de proteínas del complejo con DNA de geles de retardo preparativos 20

Figura N° 7.

Resolución mediante SDS-PAGE de las proteínas que forman parte del complejo con el fragmento $\beta 1A$. 21

Figura N° 8

Distribución de las regiones estudiadas en la zona promotora del gen *Cs-mnp2B*. 23

Figura N° 9

Ubicación de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales presentes en el fragmento $\beta 1A$. 24

ABREVIATURAS

aa:	Aminoácido.
ADR1	“ <i>Alcohol deshydrogenase regulator 1</i> ”. Regulador de la alcohol deshidrogenasa 1.
AFT1:	“ <i>Activator of ferrous transporter 1</i> ”. Activador del transporte de hierro 1.
ATS1:	“ <i>Alpha tubulin suppressor</i> ”. Supresor de la alfa-tubulina.
BPS:	Batofenantrolina disulfonato.
CBRC:	“ <i>Computational Biology Research Center</i> ”. Centro de investigaciones bioinformáticas.
cDNA:	DNA complementario al RNA.
cpm:	Cuentas por minuto.
DNA:	“ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ”. Ácido desoxirribonucleico.
DTT:	Ditiotreitol.
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético.
EMSA:	“ <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> ”. Ensayo de cambio de movilidad electroforetica.
Hsf1:	“ <i>Heat shock transcription factor 1</i> ”. Factor transcripcional de shock térmico 1.
Lcs	Lacasa.
Lip	Lignina peroxidasa.
MnP	Manganeso peroxidasa.
MRE	“ <i>Metal response element</i> ”. Elemento de respuesta a metales.
mRNA	“ <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> ”. RNA mensajero.
MXR1	“ <i>methanol expression regulator 1</i> ”. Regulador 1 de la expresión en metanol.
PAGE:	“ <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> ”. Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb:	Pares de bases.

PCR:	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”. Reacción en cadena de la polimerasa.
pI	Punto isoeléctrico
PMSF:	“ <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i> ”. Fenilmetanosulfonil fluoruro
ppm	Partes por millón
RNA:	“ <i>Ribonucleic acid</i> ”. Ácido ribonucleico.
rpm:	Revoluciones por minuto.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio.
SRY	“ <i>Sex-Determining Region on the Y Chromosome</i> ”. Región determinadora del sexo en el cromosoma Y.
Stuap:	“ <i>Aspergillus nidulans Stunted protein</i> ”. Proteína atrofiadora en <i>Aspergillus nidulans</i> .
Taq:	“ <i>Thermus aquaticus DNA- polymerase</i> ”. DNA-polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i> .
TBE:	Amortiguador Tris/ácido bórico, EDTA.
TE:	Amortiguador Tris-HCl/EDTA.
TESS:	“ <i>Transcription Element Search Software</i> ”. Software de búsqueda de elementos de la transcripción.
Tris:	tris-(hidroximetil)- aminometano.
Ttk69	Tramtrack 69.
UV:	Luz ultravioleta.

RESUMEN

“Aislamiento y caracterización inicial de proteínas nucleares que reconocen elementos discretos en el promotor del gen *Cs-mnp2B* de *Ceriporiopsis subvermispota*”

El basidiomicete de pudrición blanca *Ceriporiopsis subvermispota* es un hongo capaz de degradar la lignina de la madera mediante una serie de enzimas secretadas al medio extracelular. Este sistema ligninolítico está compuesto por las enzimas lacasa (Lcs) y manganeso peroxidasa (MnP) cuyos genes codificantes y sus secuencias regulatorias han sido clonados y secuenciados por nuestro grupo.

Tomando en cuenta que la regulación de la expresión de un gen depende de diferentes elementos contenidos en su región promotora, esta actúa como módulo central de procesamiento de diversas señales. Con el objetivo de conocer más sobre el sistema regulatorio de estas enzimas, específicamente de la isoenzima MnP2B, nos propusimos estudiar los posibles factores transcripcionales que se unen al promotor del gen *Cs-mnp2B*; Para esto se dividió la región promotora en cuatro fragmentos, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, los cuales fueron utilizados para ensayos de retardo (EMSA) con extractos de proteínas nucleares preparados a partir de micelio del hongo, para demostrar la formación de complejo proteína-DNA. Posteriormente se realizaron ensayos de competencia que comprobaron la especificidad de la unión a estas sondas. Al analizar mediante footprinting los distintos fragmentos, la sonda $\beta 1$ mostró los resultados más claros, encontrándose una región protegida de 48 pb. Para analizar este sitio de unión, se diseñó un nuevo partidor que permitió la amplificación de un fragmento de 74 pb, que forma parte de $\beta 1$ y que contenía dicha secuencia. Esta sonda se denominó $\beta 1A$ y fue analizada con más detalle. Este pequeño fragmento del promotor fue utilizado como sonda en ensayos de EMSA, los que mostraron la unión específica de a lo menos una proteína. Para caracterizar las proteínas unidas a la sonda $\beta 1A$, el complejo proteína-DNA fue purificado desde el gel de retardo y posteriormente fue resuelto en un gel SDS-PAGE. El resultado de este ensayo mostró la existencia de una proteína mayoritaria en este complejo con una masa molecular entre 60 y 70 kDa.

Finalmente se estudió la secuencia que mostró protección en el ensayo de huella digital o “footprinting”, con los programas computacionales CBRC y TESS, los que predicen cajas de unión putativas a factores transcripcionales. El análisis conjunto de ambos programas mostró la

probable unión de seis proteínas, ADR1, GCN4, Hsf1, SRY, Stuap y Ttk69, de las cuales al menos tres podrían estar directamente relacionadas con la regulación del gen *Cs-mnp2B*.

ABSTRACT

“Isolation and initial characterization of nuclear proteins that recognize discrete elements in the promoter of the *Cs-mnp2B* gene of *Ceriporiopsis subvermispora*”

The white-rot basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora* is able to degrade lignin from wood through an array of extracellular secreted enzymes, its ligninolytic system composed by laccase (Lcs) and manganese peroxidase enzymes. Their coding sequences and regulatory regions have been cloned and sequenced by our group.

Taking into account that the regulation of the expression of a particular gene depends on different elements contained in its promoter region, we decided to explore the possible transcription factors that may interact with the promoter region of the *Cs-mnp2B* gene. Since promoter regions act as key elements that process a broad type of signals, the aim of this work was to study to some extent the regulatory mechanisms of the genes encoding for these enzymes. For this purpose, the *Cs-mnp2B* promoter region was divided into four different fragments named $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ and $\beta 2$. To demonstrate a protein-DNA interaction, all these fragments were incubated with protein nuclear extracts prepared from fungal mycelia and used as DNA probes for electromobility-shift assays (EMSA). Using all the aforementioned probes, the protein-DNA interaction specificity was studied by competition analysis. By means of footprinting, a 48bp protected region was only clearly identified when using the $\beta 1$ probe. To analyze this binding region, a new primer was designed to allow the amplification of a 74bp fragment that it is part of the $\beta 1$ probe and that also contains the mentioned sequence. This new probe was named b1A and it was further analyzed. When used as a probe, EMSA showed a specific interaction with at least one nuclear protein. The observed protein-DNA complex was gel-purified and subsequently loaded onto a SDS-PAGE to characterize the proteins present in the complex. The existence of a major protein with a molecular mass between 60 and 70 KDa was observed within the protein-DNA complex.

Finally, the footprinting-protected sequence was further analyzed using the CBRC and TESS computational software, which predicts transcriptional factors putative binding regions.

According to both analyses, six proteins named ADR1, GCN4, Hsf1, SRY, Stuap and Ttk69 showed to be the most probable binding candidates. Among these proteins, only three may be directly involved in the regulation of the *Cs-mnp2B* gene.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años los estudios utilizando hongos han ayudado a un mejor entendimiento de los procesos celulares básicos y moleculares. Estos organismos son un modelo relativamente sencillo de estudiar, debido a que su crecimiento y división pueden ser controlados eficientemente y efectivamente ajustando las condiciones medio-ambientales de su cultivo.

La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) es el organismo más utilizado en investigación, por ejemplo estudios de interés médico que se han realizado en levadura han contribuido enormemente en el conocimiento de la regulación de la división celular en eucariontes, incluyendo las alteraciones relacionadas con el cáncer (Mager y cols., 2005). En el área de investigación farmacéutica también han sido de gran relevancia sus estudios, siendo muy utilizada como modelo para medir los efectos de distintas drogas externas en los niveles transcripcionales de diversas enzimas (Mager y cols., 2005).

Del mismo modo la utilización de los hongos en biotecnología presenta innumerables proyecciones en las más diversas áreas de la industria y de la investigación. Por ejemplo, los hongos ligninolíticos han mostrado gran capacidad para absorber y acumular metales pesados, lo que los hace muy apropiados para una posible aplicación biotecnológica en el tratamiento de aguas o riles (Baldrian, 2003). Además, sus características ligninolíticas le confieren cualidades que los hacen muy interesantes para la industria papelera y de celulosa en general.

Este último punto es de gran interés para nuestro laboratorio, dado que las investigaciones relacionadas con el proceso de ligninólisis han sido el pilar del trabajo realizado durante los últimos años.

En la naturaleza existen dos clases de hongos capaces de degradar la madera, que son los hongos de pudrición parda que degradan principalmente la celulosa dejando intacta la lignina (<http://www.forestalia.com>), y los de pudrición blanca que degradan la lignina y en forma menos eficiente a la celulosa y hemicelulosa (Eriksson y cols., 1997). Nuestro laboratorio se ha abocado al estudio de los hongos de pudrición blanca, donde destacan *Phanerochaete chrysosporium* y *Ceriporiopsis subvermispora* por su alta eficiencia y selectividad en la degradación de la lignina. Ambos hongos han sido durante mucho tiempo los modelos de estudio en diversos laboratorios y

también nuestro grupo de trabajo. En el caso particular de esta tesis se utilizó *Ceriporiopsis subvermispora*.

P. chrysosporium es un hongo basidiomicete perteneciente a la familia *Corticaceae*. En el año 2004 se logró completar la secuencia de su genoma (<http://www.jgi.doe.gov>), lo que permitirá grandes avances en el conocimiento de la bioquímica y genética, tanto de este hongo, como de otros relacionados.

C. subvermispora es un hongo basidiomicete dicarionte de pudrición blanca, que muestra alta selectividad para degradar lignina cuando crece sobre madera (Otjen y cols., 1987).

Para llevar a cabo la degradación de la lignina los distintos hongos ligninolíticos poseen una batería de enzimas con distintas funciones. Las enzimas más ampliamente distribuidas son la Lignina peroxidasa (Lip), Manganese peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lcs) (Lobos y cols., 1994, Lundell, y cols., 1994, Eggert y cols., 1997).

Sistema ligninolítico de *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium secreta las enzimas Lip (lignina peroxidasa) y MnP (manganese peroxidasa) (Gold y cols., 1993). Lip se caracteriza por hidrolizar enlaces α , β en los grupos diarilpropano de la lignina y ha sido caracterizada estructuralmente como un dímero asimétrico con 2 iones calcio y una glucosamina por monómero unido a Asn²⁵⁷ (Poulus y cols., 1993) con una alta homología a la citocromo c peroxidasa (Poulus y cols., 1993).

MnP es una peroxidasa dependiente de manganese (Kuwahara y cols., 1984), cuyo análisis estructural en *P. chrysosporium*, mostró que al igual que Lip, es una glicoproteína que posee dos dominios con un grupo heme ferroso pentacoordinado entre ellos (Mino y cols., 1998) y dos iones calcio estructurales (Sundaramoorthy y cols., 1994). Su masa molecular es de aproximadamente de 46000Da (Mino y cols., 1998), su cDNA es de 1314 nucleótidos. La masa molecular deducida es de 37.439 Da, que corresponde a un 81% de la obtenida experimentalmente, siendo la diferencia atribuida glicosilaciones (Pribnow y cols., 1989).

El sitio de unión al peróxido está compuesto por His⁴⁶ y Arg⁴², mientras que el sitio de unión a MnII se encuentra constituido por Asp¹⁷⁹, Glu³⁵ y Glu³⁹ en conjunto con un propionato del grupo heme (Sundaramoorthy y cols., 1994, Kuster-van Someten y cols., 1995).

La principal función de esta enzima es oxidar MnII a MnIII. Este último complejado con lactato, oxalato u otro ácido α -hidroxilo actúa como intermediario en la oxidación, desmetilación, y descarboxilación de diversos compuestos orgánicos que se encuentran presente en la lignina (Glenn y cols., 1986; Aitken y cols., 1990). En este sistema el manganeso no sólo es el sustrato de la enzima, si no que también ejerce un papel regulatorio en sus niveles de RNA y proteicos. Estos antecedentes sugieren que MnP juega un rol muy significativo en la despolimerización de la lignina (Wariishi y cols., 1991).

Del punto de vista funcional es importante señalar que el cadmio es un inhibidor competitivo reversible del manganeso en la MnP. El estudio cinético sugiere que el Cd^{+2} compite por el sitio de unión del Mn^{+2} impidiendo la oxidación de éste, pero no impide la oxidación del sustrato como el fenol, debido a que no hay contacto con su sitio de unión (Yungs y cols., 2000, Sundaramoorthy y cols., 2005;).

Sistema ligninolítico de *Ceriporiopsis subvermispora*

El sistema ligninolítico de *Ceriporiopsis subvermispora* está compuesto por dos enzimas: Manganeso peroxidasa (MnP) y una fenol oxidasa llamada lacasa (Rüttimann y cols., 1992). LiP no ha sido detectada en cultivos de este hongo en distintas condiciones (Rüttimann y cols., 1992).

MnP de *C. subvermispora* muestra una masa molecular de 52,5 kDa en cultivo líquido y valores entre 52,5 y 62,5 kDa para cultivos de madera (Lobos y cols., 1994). Estas enzimas son secretadas al medio externo como familias de isoenzimas con perfiles isoelectroforéticos que varían de acuerdo a la composición del medio (Lobos y cols., 1994), Se postula que tanto lacasa como MnP no sólo son secretados en metabolismo secundario, si no que también durante el crecimiento (Rüttiman-Johnson y cols., 1993). MnP muestra siete isoenzimas con pI entre 4,1 y 4,6 en cultivo líquido y 4 isoenzimas con pI entre 4,4 y 3,53 en cultivos con madera. La lacasa presenta 4 isoenzimas con pI entre 3,45 y 3,65 en cultivo líquido (Lobos y cols., 1994).

La lacasa poseen 4 átomos de cobre por molécula, las dos principales isoenzimas poseen masas molecular del orden de 71 y 68 kDa (Fukushima y cols., 1995) postulándose que sólo existe un gen que la codifica (Larrondo y cols., 2003). El gen *lcs* posee 2215 pares de base que

codifican para una proteína de 499 aminoácidos, cuya secuencia muestra una homología de entre 63 y 68% de identidad con lacasas de otros basidiomicetes (Karahanian y cols., 1998).

Se sabe que las isoenzimas de MnP difieren en su especificidad por sustrato y en el requerimiento de Mn(II) para su actividad óptima (Urzúa y cols., 1995), siendo la misma MnP quien genera el peróxido extracelular mediante la oxidación de oxalato y glioxilato, los que son secretados al medio extracelular por el hongo *C. subvermispora* (Urzúa y cols., 1998). Estos quelantes aceleran la reacción, lo que facilita la interacción del MnII con la enzima y estabiliza el MnIII en solución (Urzúa y cols., 1995)

Antecedentes

Hasta la fecha nuestro laboratorio ha aislado y secuenciado 4 genes que codifican para MnP denominados *Cs-mnp1*, *Cs-mnp2A*, *Css-mnp2B* y *Cs-mnp3* (Lobos y cols., 1998; Tello y cols., 2000). Los cuatro genes tienen secuencias intrónicas cortas con tamaños en el rango de 53 a 67 pb y sus límites de splicing exón/intrón se ajustan al consenso GT-AG (Padgett y cols., 1989).

Las regiones río arriba de los genes *Cs-mnps* contienen cajas TATA, sitios AP1 y AP2, sitios de probable regulación mediante metales (MRE), cajas de respuesta a cAMP (CRE), a elementos xenobióticos (XRE) y a estrés térmico (HSE), entre otros elementos que se muestran en la **figura 1** (Pelma y cols., 1982, Lee y cols., 1987; Fujisawa-Sehara y cols., 1987; Faisst y cols., 1992; Andrisani, 1999;). El estudio de la regulación transcripcional de los genes *mnp1*, *mnp2* y *mnp3* de *P. chrysosporium* mostró que son regulados diferencialmente, variando su respuesta a la concentración de manganeso y nitrógeno en el medio y shock térmico entre otras variables (Li, y cols., 1995, Gettemy y cols., 1998). Además se ha mencionado que el manganeso juega un rol post-transcripcional, sin que exista una correlación entre los niveles de mRNA y la actividad de la enzima sobre la MnP, tanto en *P. chrysosporium* como en *C. subvermispora* (Li y cols., 1995, Manubens y cols., 2003). En el caso de *C. subvermispora* la regulación transcripcional de *Cs-mnp2A* y *Cs-mnp2B* es activada por manganeso, lo que no ocurre durante la transcripción del gen *Cs-mnp3* (Tello, 2000). Hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual el manganeso regula la transcripción de estos genes, sin embargo se ha propuesto que en el basidiomicete *P. chrysosporium* estos putativos elementos MREs encontrados en los promotores de los genes *mnp* de dicho hongo podrían tener un rol en este proceso (Gettemy y

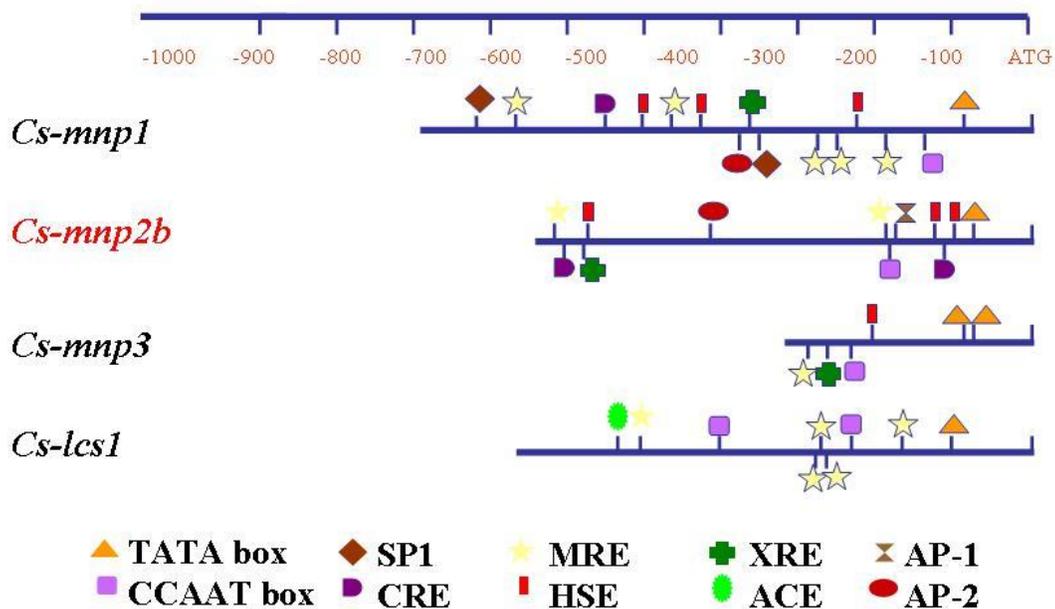


Figura N° 1 Esquema de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales en los promotores de los genes *Cs-mnp1*, *Cs-mnp2b*, *Cs-mnp3* y *Cs-lcs1*. Se indican cajas TATA, sitios AP1 y AP2, sitios de probable regulación mediante metales (MRE), cajas de respuesta a cAMP (CRE), a elementos xenobióticos (XRE) y a estrés térmico (HSE), entre otros (Tello y cols.,2000).

cols., 1998). Además es conocido que los MREs están involucrados en la regulación de la expresión de los genes de metalotioneína mediante varios metales en células animales, tales como zinc, cobre y cadmio, aunque estos elementos no responden a manganeso (Thiele, 1992).

Los genes *Cs-mnp2A* y *Cs-mnp2B* (GenBank accession nos. AF161078 y AF161584, respectivamente) corresponden a variantes alélicas, como se demostró mediante amplificación por PCR y secuenciación de los genes de cepas homocarióticas del hongo regeneradas a partir de protoplastos, identificándose una diferencia de sólo cinco aminoácidos (Tello y cols., 2000). El promotor del gen *Cs-mnp2B* fue obtenido mediante PCR inverso, lográndose amplificar un fragmento de 3,5 kpb (Tello, 2000). En la actualidad se cuenta con la secuencia completa de esta región de aproximadamente 2,7 kpb que corresponden a la región promotora. Esta región regulatoria disponible del gen *Cs-mnp2B* fue analizada utilizando el servidor MatInspector V2.2 (Quandt y cols., 1995), lo que evidenció que además de los elementos ubicuos a promotores eucarióticos, existen algunas cajas interesantes de estudiar, tales como quince elementos STUAP (regulación del desarrollo en *Aspergillus*), ocho elementos CREB, dos cajas MAT1MC (diferenciación celular en levadura, interacción con factor Ste 11), dos AHR/ARNT (heterodímeros, receptor de Arohidrocarburos), dos cajas NF-1, cuatro GATA, cuatro NIT (activador de genes regulados por nitrógeno). Muchos de estos elementos se encuentran en los primeros 600 pares de bases. Todas estas secuencias presentan una homología mayor a un 90% con relación a las secuencias de consenso previamente informadas (Castro, 2003).

En un trabajo realizado en nuestro laboratorio se hicieron ensayos en geles de retardo con cuatro sondas (140 a 160 pbs), denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$, que corresponden a los primeros 600 pbs del promotor (**figura 2**). Estas sondas fueron ensayadas con extractos nucleares obtenidos de micelio cultivado en presencia de una alta concentración de manganeso en el medio (0,2 mM), con la finalidad de observar el efecto de este metal en la formación de complejo DNA-proteína (Polanco, 2005). Los resultados de estos ensayos sugieren que existirían zonas que son reconocidas específicamente por proteínas presentes en un extracto nuclear crudo. Además se ha observado que la formación de complejos depende del tiempo de cultivo en que es cosechado el micelio a partir del cual se preparan los extractos nucleares. Se determinó que los cultivos de diez días presentan una mayor proporción de proteínas que reconocen a los elementos regulatorios de esa región del promotor del gen *Cs-mnp2B* (Castro, 2003).

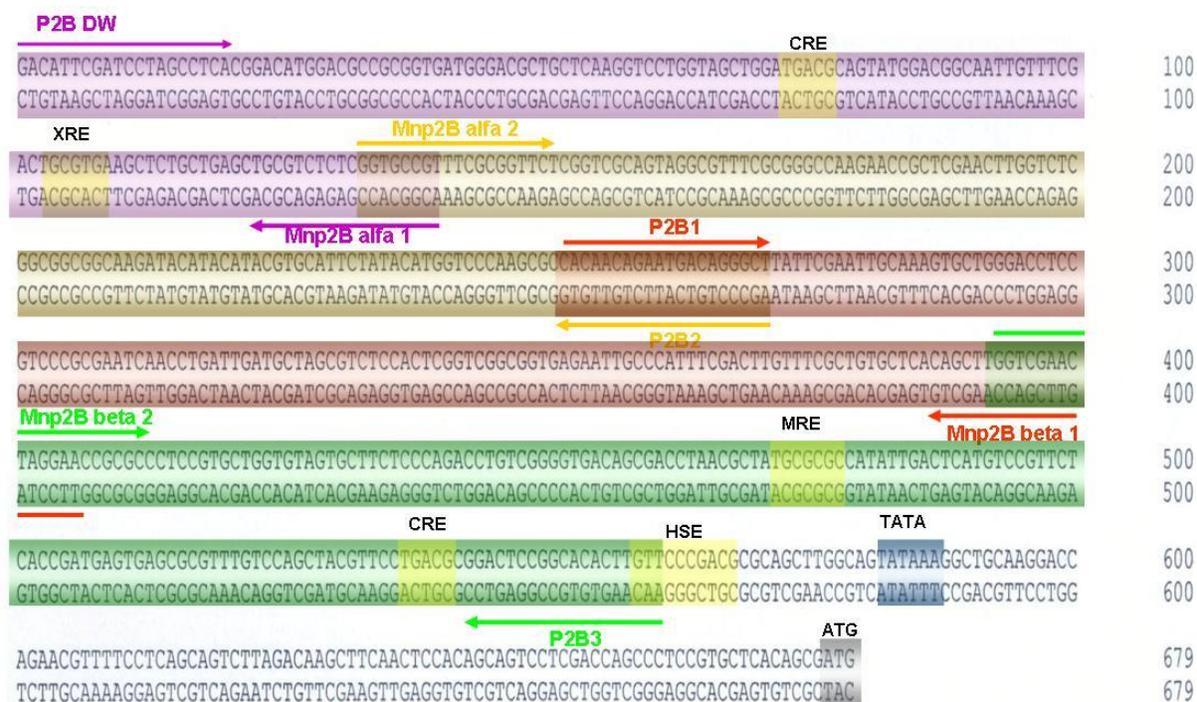


FIGURA N° 2.- Secuencia parcial de la región promotora del gen *Cs-mnp2B*. El esquema muestra el promotor del gen *Cs-mnp2B*. La secuencia de las cuatro sondas, α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , se indica en color morado, naranja, rojo y verde respectivamente. Las flechas de colores indican la ubicación y orientación de las parejas de partidores que dan origen a los distintos fragmentos. En amarillo se muestra la secuencia de los elementos más destacados, tales como MRE, CRE y XRE, entre otros.

La ausencia de elementos que sugieran una regulación por metales, a excepción de un único sitio MRE ubicado en el fragmento $\beta 2$ del promotor de gen *Cs-mnp2b*, llevó a analizar esta región sin un trasfondo funcional determinado *a priori*.

Los ensayos de competencia realizados con las sondas $\alpha 1$ y $\beta 1$ no fueron tan robustos y reproducibles y claros como para $\alpha 2$ y $\beta 2$. A pesar de esto, para acotar la zona de unión a las distintas sondas se realizaron ensayos de footprinting. Los ensayos que mostraron un mejor resultado fueron los efectuados con la sonda $\beta 1$, en la cual se observa una zona protegida de aproximadamente 50 pb (Castro, 2003).

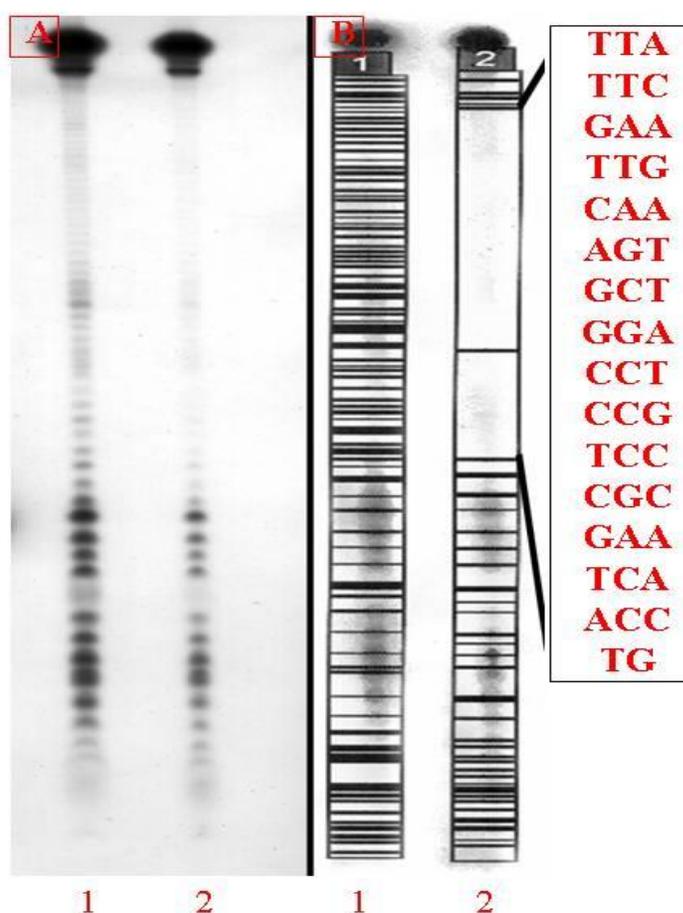


FIGURA N° 3.- Autorradiografía de un ensayo de footprinting químico de la sonda $\beta 1$. A, fragmentos generados por el tratamiento con footprinting químico en ausencia de extracto nuclear (carril 1), incubación de la sonda en presencia de extracto nuclear preparado a partir de micelio cosechado al décimo día de cultivo (carril 2). B, análisis de la secuencia protegida mediante el programa 'gelworks'. Al costado derecho, en rojo, la secuencia de la región de la sonda $\beta 1$ que presenta protección, aproximadamente 50 pbs. Las barras flanquean la región que presenta protección (Castro, 2003).

HIPOTESIS

“La región río arriba del gen *Cs-mnp2B* posee elementos de DNA funcionales que son reconocidos específicamente por proteínas nucleares en respuesta a manganeso”

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar proteínas que reconocen elementos específicos en el promotor del gen *Cs-mnp2B* de *C. subvermispora* en respuesta a Manganeso

Objetivos Específicos

- Determinar la formación de uno o más complejos proteína-DNA.
- Comprobar la especificidad de la interacción entre la(s) proteína(s) y el fragmento de DNA.
- Estimar el peso molecular de la proteína mas abundante mediante SDS-PAGE.

MATERIALES Y METODOS

1-Materiales

1.1-Materiales biológicos

Se adquirió *Ceriporiopsis subvermispora* FP-105752 del Center of Mycology Research (Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, EE.UU.) Esta fue mantenida a 4°C en placas agar papa-dextrosa (39 g/L).

Las cepas de *E. coli* DH5 α F' y *E. coli* LE292 fueron adquiridas de GIBCO BRL Life Technologies (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.).

1.2-Reactivos y materiales generales

Los reactivos para los medios de cultivo como triptona, extracto de levadura y agar papa-dextrosa fueron adquiridos de Difco (Detroit, Michigan, EE.UU.)

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.): Ampicilina, EDTA, acrilamida, N,N'-metilen-bisacrilamida, ácido disulfónico batofenantrolina (BPS), aceite mineral.

Etanol, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, cloruro de sodio y otras sales de grado analítico se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

De Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) se adquirió ácido bórico.

Los siguientes reactivos grado biología molecular se adquirieron en GIBCO BRL (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.): agarosa, urea, trizma base, SDS y fenol.

Los filtros de concentración de proteína Microcon, fueron adquiridos de MILLIPORE, (Bedford, Maryland, EE.UU.)

Los nucleótidos radioactivos α -³²P-ATP y γ -³²P-ATP se adquirieron en Dupont NEN (Boston, Mississippi, EE.UU.)

1.3-Vectores.

El fragmento del promotor de *Cs-mnp2B* fue clonado en el vector pBluescript® II KS(+) (Stratagene Cloning Systems, Los Angeles, California, EE.UU.).

1.4-Partidores para PCR

Los partidores para la obtención de la sonda utilizada en los ensayos de unión (EMSA) fueron sintetizados por la compañía Life Technologies Inc. (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). (Tabla 1).

Tabla 1. Partidores.

Partidor	Secuencia
BETA 1A	CATCAATCAGGTTGATTGCG
P2B1	CACAACAGAATGACAGGGCT

2- Métodos

2.1 Condiciones de cultivo para *Ceriporiopsis subvermispora*

C. subvermispora no produce basidiosporas bajo condiciones de laboratorio, por lo que se utilizó micelio molido como inóculo. Para la propagación del hongo se realizaron cultivos estacionarios en matraces de 500 mL con 25 mL de medio líquido que contenían 15 mM de KH_2PO_4 , 4mM de MgSO_4 , 1 mM de CaCl_2 , 55 mM de glucosa, 10 mM de ácido transaconítico (TAA) pH 4,5 como amortiguador, 3 μM de tiamina-HCl, 1 mL/L de solución de trazas y 10 mM de tartrato de amonio. La solución de trazas contenía: 80mM de ácido nitroacético, 4 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mM de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mM de $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mM de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$, 1,6 mM de H_3BO_3 , 0,4 mM de $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 120 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 170 mM de NaCl, 7 mM de CaCl_2 y 30 mM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Después de cultivar el hongo durante 15 días a 30 °C sin agitación, el micelio fue molido y homogeneizado en botellas de 125 mL que contenían 15 g de esferas de vidrio estériles de 5 mm de diámetro. Se utilizaron alícuotas de micelio molido para cuantificar el peso seco de micelio presente en el inóculo. A partir de este micelio se inocularon medios de cultivo líquido

salino en matraces de 125 mL que contenía 100 mL de medio de igual composición a los estacionarios, a excepción de la concentración de Mn^{2+} (1 ppm u 11 ppm de $MnSO_4$) y de la adición de TWEEN 20 (0,1% concentración final) los cultivos se incubaron con una agitación de 180 rpm.

2.2- Cultivo estacionario.

Se inocularon 90 mg de micelio (peso seco) molido en 30 mL de medio de cultivo, en un matraz de 500 mL y se incubó en estufa a 28°C durante aproximadamente 15 días.

2.3- Cultivo con agitación.

Se utilizaron 45 mg de micelio (peso seco) obtenido a partir de cultivo estacionario como inóculo en 100 mL de medio de cultivo, a los que se le aplicó una agitación orbital constante de 180 rpm a 28°C. La cosecha de estos cultivos se realizó el día diez después de la inoculación.

2.4-Obtención de sondas mediante PCR.

Las sondas utilizadas en los ensayos de unión se obtuvieron mediante PCR, con los partidores antes señalados (tabla 1), a partir de un plasmidio recombinante que posee el promotor del gen de la enzima Manganese Peroxidasa 2B.

Tabla 2 Programa PCR: La tabla muestra el programa PCR utilizado para amplificar el fragmento $\beta 1A$, el que consta de un ciclo inicial a 97 °C por 35 segundos para activar la enzima y disociar la doble hebra de DNA, 45 segundos a 52°C para lograr la unión de los partidores y 1 minuto a 72°C para producir la polimerización de la hebra en formación, posteriormente, 30 ciclos constituidos por un paso inicial a 94 °C por 40 segundos para disociar la doble hebra de DNA, 30 segundos a 52°C para lograr la unión de los partidores y 25 segundos a 72°C para la elongación, a continuación se mantiene a 72°C por 2 minutos para optimizar la elongación y por ultimo se somete por tiempo indefinido a 4°C para la conservación de DNA.

T°	Tiempo	Ciclos
97	35''	1
52	45''	1
72	1'	1
94	40''	30
52	30''	30
72	25''	30
72	2'	1
4	Infinito	

2.5-Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El fragmento de DNA obtenido a partir de la PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %, usando como solución de corrida el tampón TBE 0,5X. Para la visualización de DNA se utilizó una solución de bromuro de etidio (aproximadamente 1 µg/mL). Se determinó la concentración de DNA en un espectrofotómetro midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm.

2.6 Marcación de partidores

En un tubo de 0,6 mL se mezclaron los siguientes reactivos: 25 pmoles de partidador, 3 µL de γ -³²P-ATP, 1 µL de solución tampón para la polinucleótido quinasa de T₄ 10X, 5 U de polinucleótido quinasa T₄ y agua para completar 7 µL. La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 minutos y luego la enzima fue inactivada mediante calor a 55°C durante 10 minutos.

2.7 Preparación de extractos nucleares de *C. subvermispora*.

Se pesaron entre 2 a 3 g de micelio de *C. subvermispora* cosechado a partir de cultivos con agitación, los que se resuspendieron en 15 mL de tampón de homogeneización que contenía PIPES/KOH 10 mM pH 6,9, CaCl₂ 5 mM, MgSO₄ 5 mM y sacarosa 0,5 M. La muestra se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se molió hasta convertirla en un polvo fino. Luego se descongeló rápidamente, se colocó en un baño a 70 °C y se le agregaron 5 mL adicionales de

tampón de homogeneización. La solución se dejó en hielo durante 5 minutos para su homogeneización y posteriormente se agregaron 50 mL del mismo tampón. Esta mezcla fue centrifugada a 6.000 x g durante 20 minutos y la pella se resuspendió en 30 mL de tampón de homogeneización. Luego se centrifugó a 100 x g durante 1 minuto descartándose la pella. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 6.000 x g durante 20 minutos y luego la pella se suspendió en 1 mL de tampón de lisis nuclear que contiene HEPES/KOH 15 mM pH 7,5, KCl 110 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM y PMSF 0,8 mM.

La precipitación de proteínas nucleares se realizó agregando un décimo de volumen de NH₄SO₄ 4 M, agitando durante 30 minutos, para luego centrifugar a 15000 x g durante 20 minutos y recuperar el sobrenadante. A este sobrenadante se le agregaron 0,3 g de NH₄ SO₄ por cada mL de solución, se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 22.500 x g durante 30 minutos. La pella se resuspendió en 130 µL de tampón de extracto nuclear, que contiene HEPES/KOH 25 mM pH 7,5, KCl 40 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,8 mM y glicerol 20%. El extracto fue sometido a diálisis durante 16 horas en un volumen de 2 L de tampón de extracto nuclear.

2.8 Cuantificación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas en los extractos nucleares mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) de acuerdo a las condiciones del fabricante (Bio-Rad Protein Assay) y utilizando un espectrofotómetro Shimadzu para cuantificar.

2.9 Ensayos de Unión.

2.9.1- Condiciones de Unión y Competencia.

Los ensayos de unión se realizaron en un medio que contenía HEPES/KOH 30 mM (pH 7,5) ZnSO₄ 0,1 mM, poli dIdC 1x10³ mg/mL, CuSO₄, 0,13 mM, DTT 5 mM, polietilenglicol 4000 2,7 %, KCl 40 mM, glicerol 12 %, EDTA 1,3 mM y pBluescript 13 µg/mL. Para cada ensayo se utilizaron 10 µg de proteínas nucleares y aproximadamente 12 ηg de sonda marcada (10000 cpm).

La mezcla se incubó durante 30 minutos sobre hielo, y en el caso de ensayos de competencia se preincubó con sonda fría durante 10 minutos.

2.10 Geles de retardo (EMSA).

Los experimentos de retardo se realizaron en geles de poliacrilamida no desnaturalantes (acrilamida:bisacrilamida (28:2) al 6%, con TBE 0,25X como tampón de corrida. Las condiciones de corrida fueron de 40 volt constante durante aproximadamente 14 horas.

2.11 Recuperación de Proteínas para SDS-PAGE.

La recuperación de la(s) proteína(s) presentes en el complejo DNA-proteína se realizó mediante la exposición del gel húmedo en la membrana del phosphor image durante 15 minutos, la cual fue analizada por el instrumento phosphorImager y la impresión de este resultado fue utilizado como plantilla para recuperar la banda correspondiente al complejo. Se recortó la banda de interés y las proteínas fueron eluidas del gel agregando 500 μ L de tampón de corrida de proteínas 1X sin glicina. La solución con el gel se mantuvo en agitación durante toda la noche a 37°C, la cual posteriormente fue concentrada en filtros de concentración de proteínas. La solución concentrada fue cargada en un gel desnaturalante de poliacrilamida al 12% con tampón de corrida 1X, constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %. Las condiciones de corrida fueron a 70 volts constante durante aproximadamente 4 horas.

2.12 Programas computacionales.

La determinación de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales se efectuó utilizando los programas CBRC (Computacional Biology Research Center) y TESS (Transcription Element Search Software), de acceso gratuito en Internet, (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>), respectivamente.

La manipulación de secuencias se realizó usando el programa especializado DNA Star.

El procesamiento de imágenes se llevó a cabo utilizando el programa gráfico Adobe Photoshop 6.0. Adobe System Incorporated. EE.UU..

RESULTADOS

El resultado del footprinting realizado a la sonda $\beta 1$ mostró una protección de aproximadamente 50 pares de bases (Castro, 2003), con el fin de acotar esta región a un fragmento más pequeño, se diseñó el partidor $\beta 1A$, el cual junto al partidor P2B1 da origen a un fragmento de 74 pb denominado también $\beta 1A$ (figura N° 4).

Determinación de la especificidad de la unión de proteína nucleares de *C. subvermispora* a la sonda $\beta 1A$.

Para demostrar que la formación de complejos observada anteriormente en este laboratorio correspondía a una unión específica de proteínas presentes en los extractos nucleares de *C. subvermispora*, se llevaron a cabo ensayos de EMSA con sondas competidoras para la unión. En la **Figura N° 5** se observan los complejos formados por el fragmento $\beta 1A$ marcado radiactivamente y extractos enriquecidos en proteínas nucleares provenientes de cultivos estándar del hongo. En el carril 1 se observa la sonda libre, es decir la resolución del fragmento marcado radioactivamente $\beta 1A$. El resultado de la incubación de esta sonda con extracto nuclear proveniente de cultivo estándar de *C. subvermispora* cosechados el día 10 se observa en el carril 2. Para la competencia inespecífica (carriles 6, 7 y 8) se utilizó una sonda de 200 pb, que corresponde a una región del plasmidio pBluescript KSII. Además se utilizó un fragmento de 71 pb denominado LMRE, proveniente del promotor de gen *Cs-lcs* (carriles 9 y 10), para disponer un competidor con un tamaño similar al fragmento en estudio.

La competencia específica fue realizada preincubando con la sonda fría, es decir el mismo fragmento $\beta 1A$ pero sin marcar radioactivamente, en los mismos medios de incubación donde se llevaron a cabo los ensayos de unión (carriles 3, 4, y 5). La **Figura N°5** muestra una clara disminución de la formación del complejo en esta última condición, a diferencia de lo mostrado en la competencia inespecífica. Estos antecedentes indican que las proteínas que forman el complejo con DNA reconocen secuencias específicas en la sonda $\beta 1A$ correspondiente a un fragmento del promotor del gen *Cs-mnp2B* de *C. subvermispora*.

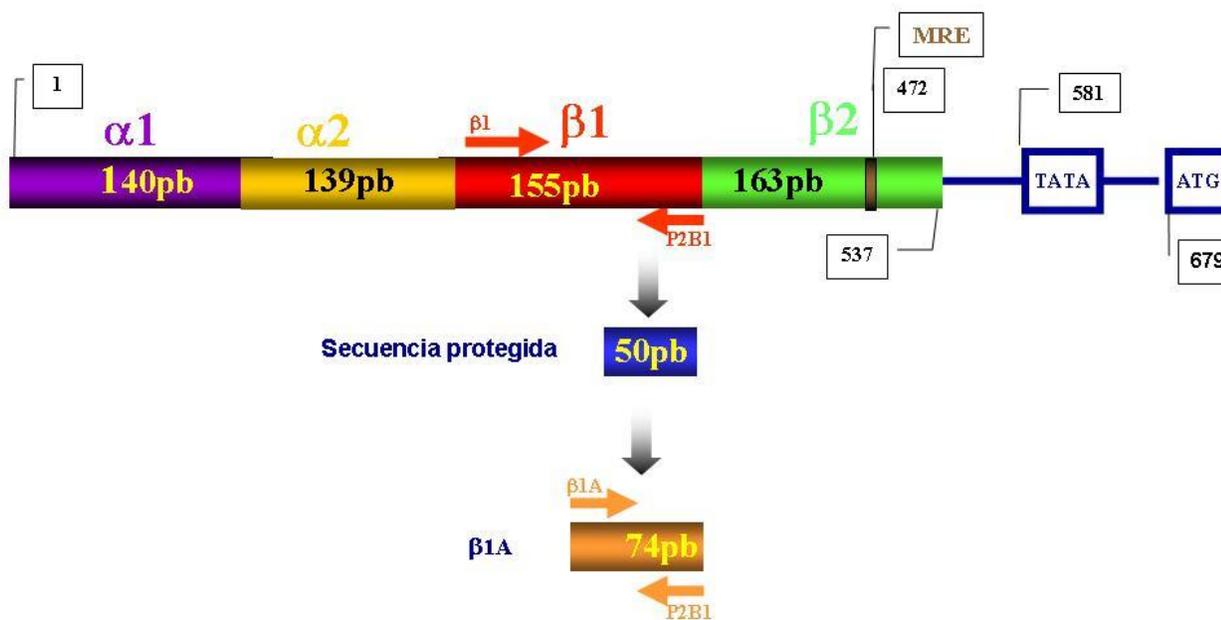


FIGURA N° 4 Diseño de la sonda $\beta 1A$. La figura corresponde a una representación esquemática de las sondas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, la región protegida en el ensayo de footprinting y la sonda $\beta 1A$, indicando su nombre y tamaño respectivo en pares de bases (pb). Las cajas TATA y el ATG inicial se indican en recuadros. La región café destaca al elemento MRE.

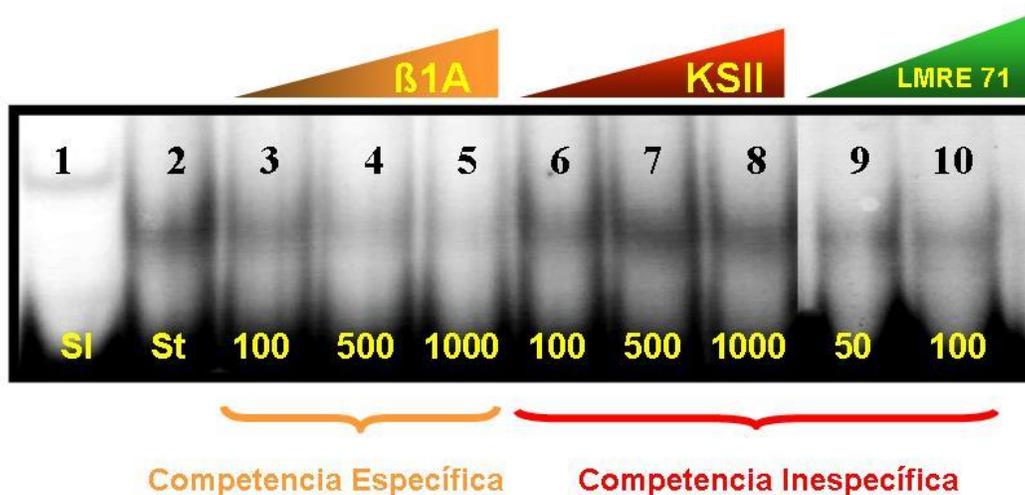


Figura N° 5. Ensayos de competencia para verificar la especificidad de unión entre las proteínas presentes en el extracto nuclear y el fragmento $\beta 1A$: 1, sonda libre, 2, retardo con extracto nuclear estándar, 3, 4, y 5, retardos con extractos nucleares estándar agregando cantidades crecientes de competidor específico, 100, 500 y 1000 veces (la cantidad de DNA utilizada en la sonda libre) respectivamente, 6, 7 y 8, retardos con extractos nucleares estándar agregando cantidades crecientes de competidor inespecífico $KSII$, 100, 500 y 1000 veces respectivamente. Los carriles 9 y 10 muestran la competencia realizada con el fragmento $LMRE 71$ en cantidades crecientes entre 50 y 100 veces.

Recuperación y caracterización de las proteínas del extracto enriquecido en proteínas nucleares de *C. subvermispora* que forman un complejo específico con la sonda β 1A.

Con la intención de aislar y a su vez determinar el peso molecular de la o las proteínas nucleares que están formando el complejo específico con el fragmento β 1A marcado radiactivamente, nuestro grupo de trabajo diseñó e implementó una estrategia experimental que consiste en realizar numerosos ensayos EMSA utilizando el fragmento β 1A y el extracto nuclear. Una vez determinada la zona de migración del gel donde se encuentra el complejo se procedió a cortar del gel esta zona de interés. Además se tomaron muestras de regiones del gel superiores a la ubicación del complejo radioactivo. Las proteínas fueron removidas con un tampón de elución, concentradas mediante filtros concentradores de proteínas y posteriormente resueltas mediante el análisis en SDS-PAGE al 12% como se menciona en la sección de “Materiales y Métodos”. El diseño experimental se muestra esquemáticamente en la **Figura N° 6**.

Posteriormente las soluciones concentradas resultantes del procedimiento anterior, tanto desde el fragmento del gel que contenía el complejo como de los fragmentos superiores fueron resueltas mediante el análisis de SDS-PAGE al 12%. En la resolución de las 3 soluciones se observan patrones relativamente similares, destacándose que en el eluido correspondiente a la zona del gel donde se detectó el complejo proteína DNA mostró la aparición de una gran cantidad de proteínas, observándose una proteína mayoritaria de entre 60 y 70 KDa, como muestra la **figura N° 7**.

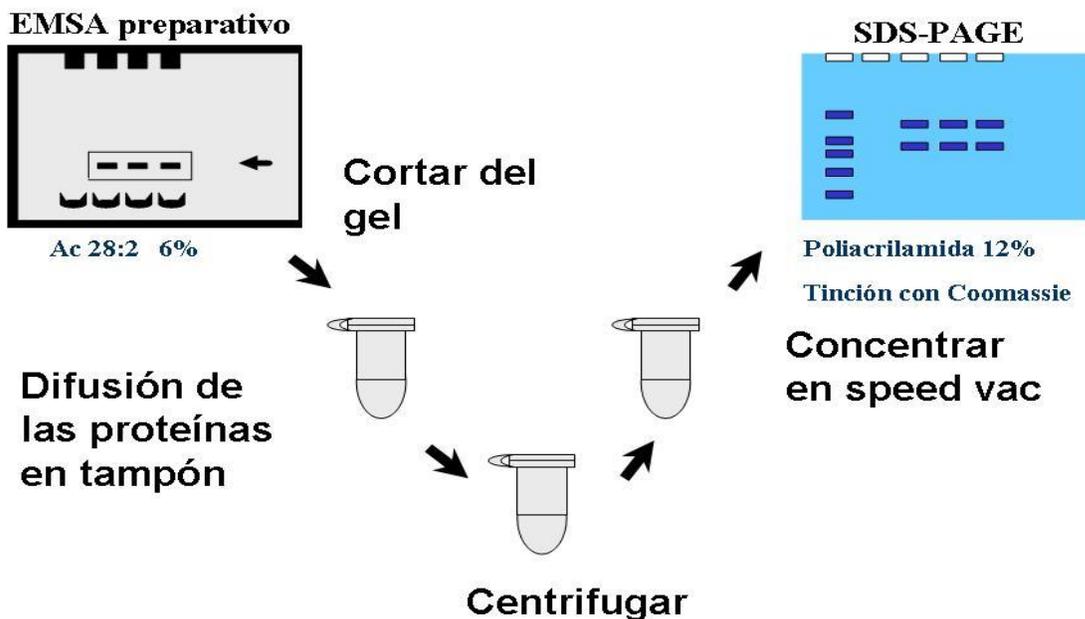


Figura N° 6. Esquema de recuperación de proteínas desde geles de retardo preparativos: En la figura se observa un esquema de la metodología que se utilizó para recuperar las proteínas presentes en el extracto enriquecido en proteínas nucleares, provenientes de cultivos estándar de *C. subvermispora* y que forman el complejo con la sonda radioactiva. La banda se cortó del gel del ensayo de los retardo. Posteriormente el fragmento de gel que contenía el complejo fue incubado en un tampón de elución durante aproximadamente 15 horas. Posteriormente eliminaron los restos de gel y se procedió a concentrar mediante filtros de concentración de proteína durante aproximadamente 2 horas 30 minutos. La solución concentrada se analizó mediante SDS-PAGE al 12%.

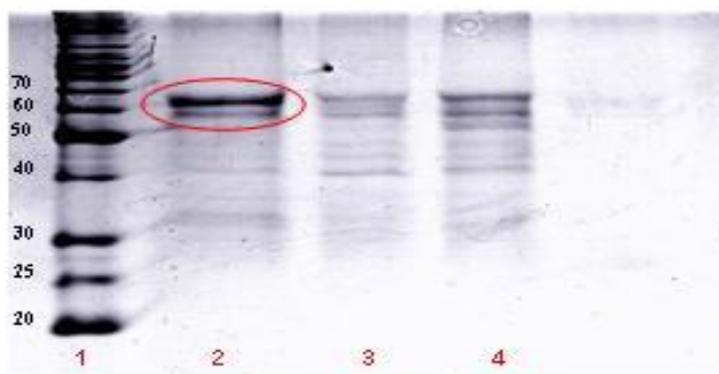


Figura N° 7. Resolución mediante SDS-PAGE de las proteínas que forman parte del complejo con el fragmento β 1A: Se observa la fotografía del un gel SDS-PAGE. En el carril N° 1 se muestra un estándar de peso molecular, en el carril N° 2 se observa la resolución de una solución de recuperación de proteínas que forman complejo con el fragmento β 1A, obtenida del trozo de gel donde se observa la formación de complejo, el carril N° 3 y N° 4 se observa la misma resolución, pero de trozos obtenidos de sectores superiores a la formación de este complejo.

Estudio *in-silico* del fragmento β 1A

Con la certeza de que existen proteínas capaces de unirse específicamente al fragmento de DNA denominada β 1A, procedimos a estudiar la secuencia de este fragmento mediante los software CBRC (Computational Biology Research Center)

(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y TESS (Transcription Element Search Software)(<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>), los que predicen los posibles sitios de unión a factores transcripcionales descritos previamente. Para lograr tener resultados mas certeros, se decidió acotar la zona de estudio únicamente a la región contenida en el fragmento β 1A que mostró protección en el ensayo de footprinting realizado al fragmento β 1A (**figura N°8**).

El resultado entregado por el software CBRC mostró que existen al menos cinco sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales en la zona protegida. El programa TESS arrojó un mayor número de posibilidades, sin embargo en su mayoría no resultó de interés para este estudio debido a que los posibles factores transcripcionales predichos por este programa se encontraban en modelos de estudios muy distintos al nuestro, tales como *Homo sapiens* (Hombre), *Mus musculus* (Ratón común), *Gallus gallus* (Pollo), *Zea mays* (Maíz), etc.

Finalmente se decidió continuar el análisis con los resultados en que coincidieron tanto TESS como CBRC en la región que mostró protección para el ensayo footprinting. De esta forma se acotó a los factores transcripcionales SRY, ADR1, HSF y TtK69. Además se incluyeron los factores transcripcionales GCN4, el que solo fue encontrado por el programa TESS y el factor STUAP el que sólo fue señalado por CBRC los que resultaron de interés debido a que habían sido descritos previamente en hongos. El resultado de este análisis se esquematiza en la **figura N° 9**.

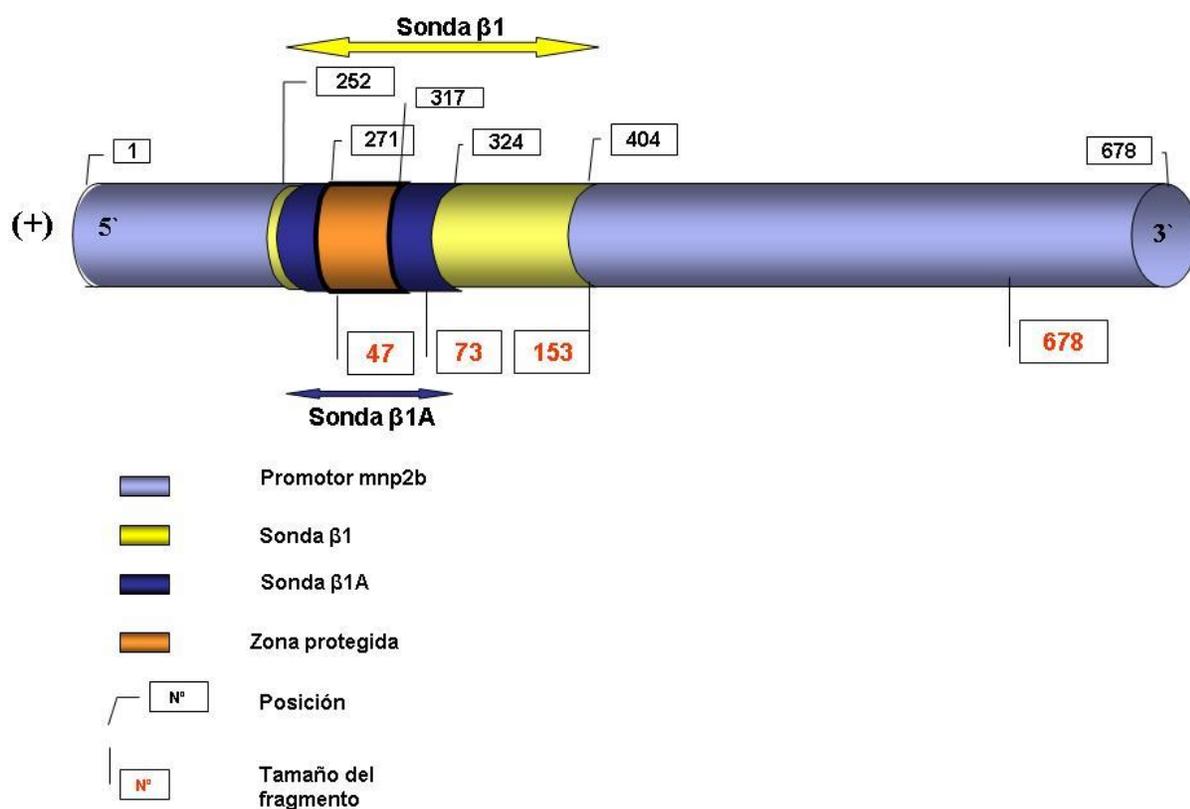


Figura N° 8 Distribución de las regiones estudiadas en la zona promotora del gen *mnp2B*. La figura muestra un esquema de los fragmentos analizados en región promotora en estudio. En celeste se observa la región secuenciada del promotor del gen *mnp2b*, en amarillo el fragmento de 153pb denominado $\beta 1$, en azul se observa la región de 74 pb denominada $\beta 1A$ y en naranja la región que mostró protección en el footprinting realizado con el fragmento $\beta 1$.

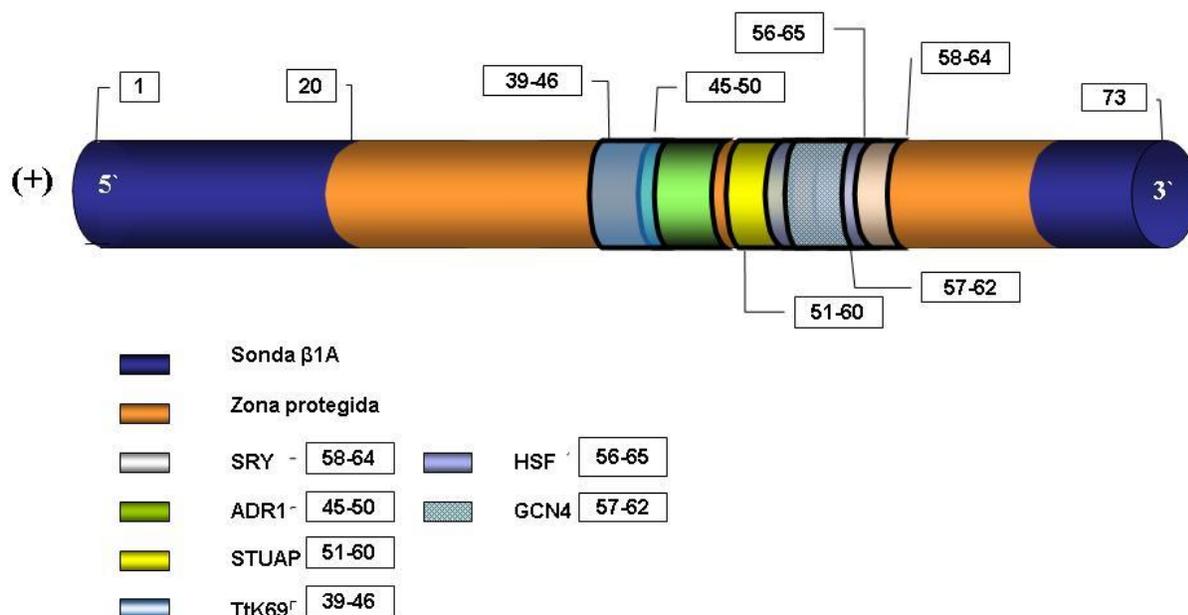


Figura N° 9 Ubicación de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales presentes en el fragmento β1A. La figura muestra la distribución de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales obtenidos con los programas CBRC y TESS. Los recuadros muestran la ubicación de los elementos en la sonda β1A, en azul se observa el fragmento β1A, en naranja el fragmento protegido observado en el footprinting, en verde el sitio de unión al factor ADR1, en amarillo el sitio de unión al factor STUAP, en blanco el sitio de unión al factor SRY, en celeste el sitio de unión al factor TEK69, en morado el sitio de unión al factor HSF y achurado GCN4.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis fue lograr caracterizar al menos una proteína que se una a una región previamente determinada del promotor del gen *Cs-mnp2B* y de esta forma aportar nueva información con respecto a la regulación de los genes ligninolíticos de *C. subvermispora*. En este contexto logramos demostrar que existe al menos una proteína que se une específicamente a un fragmento de la zona promotora de dicho gen. Mediante ensayos EMSA competitivos logramos determinar que esta unión es específica. Por medio de una estrategia diseñada en nuestro laboratorio se logró aislar y determinar la masa molecular de esta proteína. Mediante un ensayo de footprinting se había logrado identificar una secuencia que presenta protección en este ensayo, lo que da cuenta de una posible interacción entre un factor transcripcional y nuestro fragmento de DNA en estudio.

El análisis *in-silico* de esta región protegida mostró la presencia de varias secuencias de unión putativas a distintos factores transcripcionales. Con el fin de obtener una amplia gama de proteínas candidatas se decidió no acotar la búsqueda a factores transcripcionales de hongo, tomándose como criterio las putativas cajas de unión que predijeron ambos programas utilizados, TESS y CBRC, y de esta forma evaluar si existe alguna homología con la regulación en *Ceriporiopsis subvermispora*.

Con este tipo de análisis encontramos seis probables proteínas que podrían interactuar con nuestro fragmento en estudio, que son ADR1, GCN4, Hsf1, SRY, Stuap y Ttk69.

Al analizar el resultado del gel SDS-PAGE, este mostró que existen una proteína que se encuentra en una mayor proporción en el complejo formado por nuestro fragmento de DNA y el extracto enriquecido en proteínas nucleares de *C. subvermispora*. Esta proteína mayoritaria presenta un tamaño molecular de aproximadamente 70 kDa. Cuando analizamos las masas moleculares de los factores transcripcionales entregados por ambos programas computacionales, encontramos que de Stuap se desconoce el tamaño molecular. En el caso de SRY se sabe que su masa molecular es de tan sólo 27 kDa, sin embargo es conocido que el sitio de unión a SRY es reconocido por una gran cantidad de factores transcripcionales en *H. sapiens* con pesos moleculares diversos (Harley y cols., 2003). Otra proteína con una masa molecular bastante inferior a la encontrada por nosotros es GCN4 que tiene una masa de 31,31 kDa, en

Saccharomyces cerevisiae. (acceso a GENE BANK: P03069, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=121066>). Para el caso de ADR1 encontramos que su masa molecular descrita en levadura está muy por encima de la proteína encontrada por nosotros, la que resulta ser de 150 kDa (Taylor y cols., 1990). Uno de los factores transcripcionales con una masa molecular más cercana a la encontrada por nosotros es Hsf1, la que es de 93,3 kDa en levadura (acceso a GENE BANK P10961, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=1322586>). Por último, la proteína más parecida a la nuestra es Ttk69, un factor descrito en *Drosophila* cuyo peso molecular se encuentra entre 69 y 88 kDa (Read y cols., 1992).

Análisis funcional de los sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales encontrados en el fragmento en estudio.

En una siguiente etapa nos propusimos relacionar la función de estos factores transcripcionales, según está descrita en la especie de origen con una posible función en la regulación de los genes involucrados en el proceso de ligninólisis, se hace difícil en algunos casos encontrar una homología en la regulación génica de nuestro modelo de estudio. Sin embargo en algunos casos esta relación no resulta evidente como se ilustra en los casos siguientes por ejemplo la proteína Ttk69 es un factor transcripcional de *Drosophila* con una masa molecular entre 69 y 88 kDa (Read y cols., 1992) que juega un rol importante durante el desarrollo. Este factor actúa como represor de varios genes durante el desarrollo, proponiéndose que contribuye al establecimiento del engranaje de la distribución exacta de su expresión cigótica (Pagans y cols., 2004).

Otro factor que no guarda relación clara con nuestro modelo de estudio es SRY, el que se une a una la secuencia A/TAACAAT/A (Harley y cols., 2003). SRY ha sido descrito como un factor transcripcional que regula la diferenciación sexual en humanos (Salehi y cols., 2006), el gen que codifica para este factor se encuentra en el cromosoma Y (Ostret, 2001), sin embargo todavía no está claro cómo lleva a la diferenciación sexual (Mizuno y cols., 2005). Sin embargo, se ha demostrado que este factor posee una gran similitud estructural y reconocería una secuencia de DNA muy similar con un factor transcripcional de levadura conocido como ROX1 que actuaría reprimiendo los genes involucrados en la hipoxia (Deckert y cols., 1999).

Otro factor transcripcional que se encuentra en levadura, un organismo más parecido a nuestro modelo de estudio, es la proteína GCN4, la que se une a las secuencias promotoras que presentan varias copias de la caja 5`TGACTC3` (Arndt y cols., 1986). El papel que desempeña la proteína GCN4 en este organismo es incrementar la transcripción de los genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de aminoácidos en levadura, en condiciones de carencia de éstos y/o glucosa (Hinnebusch, 2005) La relación entre la función de GCN4 de levadura y la proteína de *Cs-mnp2B* no es evidente.

Al analizar otras proteínas, en cambio encontramos tres candidatos que si podrían tener un rol importante en la regulación del gen *Cs-mnp2b*, como son los factores HSF1, Stuap y ADR1 cuya función se discute a continuación: La proteína codificada por el gen *Hsf1* es un factor transcripcional ampliamente distribuido en la naturaleza. Diversos estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* han demostrado que esta proteína se activa al hiperfosforilarse en condiciones de estrés térmico u oxidativo (Yamamoto y cols., 2006). Además se ha observado que puede regular genes en respuesta a la falta de glucosa en el medio (Hahn y cols., 2004) y participa en el control de genes involucrados en la destoxificación y almacenamiento de azúcares (Yamamoto y cols., 2005) y en maduración, generación de energía, metabolismo de carbohidratos y organización de la pared celular (Yamamoto y cols., 2006). En *P. chrysosporium* los genes de las distintas manganeso peroxidasas también son regulados, entre otras condiciones ambientales, por shock térmico y estrés oxidativo (Gettemy y cols., 1997, Bruce y cols., 1994), identificándose en sus regiones promotoras putativas cajas de unión a HSF (Brown 1993), Estas mismas cajas de unión a HSF se han encontrado en los promotores de los genes *Cs-mnp2* y *Cs-mnp3* (Tello, 2000).

Otro factor transcripcional muy interesante es StuAp o Stunted protein, que reconoce la secuencia $^{A/T}CGCG^T/AN^A/C$ (Dutton y cols., 1997). Esta proteína ha sido descrita en *Aspergillus nidulans* como miembro de una familia de factores transcripcionales que regulan el desarrollo del hongo y la progresión del ciclo celular. Stuap es requerido para un correcto patrón de formación celular durante la reproducción asexual y para el inicio del ciclo reproductivo de *Aspergillus nidulans*, teniendo una función independiente en ambos ciclos reproductivos (Wu y cols., 1997, Dutton y cols., 1997). Se postula que Stuap bloquearía la expresión de un represor del ciclo celular (Wu y cols., 1997). Se observó que en mutantes *stuA* se exhibía una marcada hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno y que estas mutantes poseen bajos niveles del gen

CAT1 que codifica para la catalasa A. Además en *Aspergillus fumigatus* se encontró una putativa calatalasa-peroxidasa con sitio de unión a Stuap con un análisis de microarray (Sheppard y cols., 2005). Este último dato nos permite postular que el factor Stuap posiblemente actúa como regulador de nuestro gen en estudio, especialmente considerando que un análisis con el programa MatInspector de una zona mayor de promotor del gen *Cs-mnp2B*, demostró la presencia de al menos 16 posibles sitios de unión a stuap (Castro, 2003).

Finalmente el factor transcripcional ADR1, que ha sido descrito en levadura, es por lejos el más estudiado de los tres factores candidatos encontrados en este estudio. Es sabido que esta proteína posee una gran plasticidad de unión a DNA (o disminuida discriminación) lo que le permite controlar una gran cantidad de genes (Schaufler y cols., 2003). Sumado a esto se ha observado que su secuencia de unión a DNA es TTGG^A/GGA, la que se encuentra presente en los promotores de numeroso genes (Cheng y cols., 1994), lográndose demostrar que presenta interacción con promotores de al menos 50 genes (Gunji y cols., 2004). Este factor transcripcional a su vez es regulado a nivel post-traducciona l pues es inactivado por fosforilación en presencia de glucosa (Taylor y cols., 1990), sin que disminuya la cantidad de proteína en la célula (Sloan y cols., 1999).

La principal función conocida de ADR1 es regular genes que no se expresan cuando se encuentra glucosa en el medio (Sloan y cols., 1999). En esta contexto sabemos que puede interactuar de manera sinérgica con otros factores transcripcionales (Donoviel y cols., 1995), siendo el caso más conocido la coregulación con el factor Cat8 de al menos 14 genes (Tachibana y cols., 2005), incluyendo los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo del alcohol. Dentro de este grupo la regulación más caracterizada es la ejercida sobre el gen *ADH2* que codifica para la enzima alcohol deshidrogenada II (Walter y cols., 2001). Otro ejemplo de coregulación entre ADR1 y otro factor transcripcional es la que se observa en la activación de genes involucrados en la degradación de ácidos grasos, como *CTA1* que codifica para la catalasa A (Simon y cols., 1991), que es llevada a cabo por ADR1 y Pip2P-Oaf1p (Rottensteiner y cols., 2003). Esta misma regulación se observa sobre otras enzimas que participan en el metabolismo de lípidos. Se ha descrito que ADR1 controla la transcripción de dos genes, *POX1* que codifica para la enzima acyl-CoA oxidasa, crítica en la degradación de ácidos grasos y *PEX11* que codifica para una peroxina fundamental para la proliferación peroxisomal (Gurvitz y cols., 2001). Además se ha demostrado que ADR1 controlaría la

regulación de genes que participan en el metabolismo de glicerol, lactato y formato (Young y cols., 2003).

Por otra parte, se ha observado que ADR1 estaría involucrado en la comunicación intracelular entre la mitocondria y el núcleo (Young y cols., 2003) y además controlaría el tamaño celular mediante la regulación del gen *ATSI* (Taylor y cols., 2005, Kirkpatrick y cols., 1994). En resumen, los genes regulados por ADR1 se pueden clasificar en 4 categorías: los involucrados en la utilización de carbono no fermentables, los que participan en el metabolismo de carbohidratos, los involucrados en el metabolismo de nitrógeno y síntesis proteica y los relacionados en la regulación del ciclo y diferenciación celular (Cheng y cols., 1994)

Recientemente se ha demostrando también la existencia de factores transcripcionales con funciones homólogas a ADR1 en hongos (Lin-Cereghino y cols., 2006). En este contexto es interesante destacar que se ha descrito un factor transcripcional denominado Mxr1 en *P. pastori*, el que es necesario para la activación de muchos genes involucrados en la respuesta a metanol. Además este factor poseería una secuencia muy similar a ADR1 (Lin-Cereghino y cols., 2006).

Es posible elucubrar que un factor similar a ADR1 participara en el control del gen *Cs-mnp2B*, pues se ha observado que en *P. chrysosporium* la expresión de los distintos genes que codifican para manganeso peroxidasa es regulada por la disponibilidad de nutrientes de nitrógeno y de carbono (Pribnow y cols., 1989, Pease y cols., 1989), De hecho, las isoenzimas de *mnp* son reguladas diferencialmente en condiciones de baja concentración de ambos tipos de nutrientes (Pease y cols., 1992), y mas aún, en nuestro laboratorio se ha observado que estas enzimas también se expresan en la etapa de crecimiento en *C. subvermispora* (Ruttiman y cols., 1993)

Los antecedentes antes señalados nos muestran lo mucho que queda por hacer y el gran potencial que aun existe en el estudio de esta región promotora, lo que plante un gran desafío para nuestro grupo de trabajo.

CONCLUSIONES

1. Existe al menos una proteína en extractos enriquecidos en proteínas nucleares de *Ceriporiopsis subvermispora*, cultivados en presencia de 0,2 mM de Mn^{+2} , que se une al fragmento de DNA denominado $\beta 1A$ de la región promotora del gen *Cs-mnp2B* de *C. subvermispora*.
2. La unión entre la(s) proteína(s) y la sonda de DNA $\beta 1A$ es específica.
3. El complejo proteico que se une al fragmento $\beta 1A$ está formado por al menos 6 proteínas.
4. La proteína más abundante del complejo posee una masa molecular cercana a los 70 kDa.
5. El fragmento de DNA $\beta 1A$ analizado mediante programas computacionales presenta al menos tres sitios de unión hipotéticos a factores transcripcionales que podrían relacionarse con la regulación génica de *Cs-mnp2B*.
6. De acuerdo al análisis bioinformático de los sitios de unión de factores transcripcionales y considerando el tamaño de la proteína prioritaria del complejo que se une a $\beta 1A$, se postula que la regulación del gen *Cs- mnp2b* posiblemente esté relacionada con la disponibilidad de nutrientes en el medio.

BIBLIOGRAFÍA.

- ◆ **AITKEN, M., Irvine, R., (1990).** Characterization of Reactions Catalyzed by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* Arc. Biochem. Biophys. 276: 405-414.
- ◆ **ANDRISANI, O. M. (1999).** CREB-mediated transcriptional control, Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr. 9. 19-32.
- ◆ **ARNDT, K., Fink, G. (1986).** GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5`TGACTC3` sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:8516-8520.
- ◆ **BALDRIAN, P. (2003).** Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Microb. Technol. 32:78-91.
- ◆ **BRADFORD, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- ◆ **BROWN, J., Li, D., Alic, M., Gold, M. (1993).** Heat shock induction of manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*. App. Env. Microbiol. 59(12):4295-4299.
- ◆ **CASTRO, A. (2000).** Estudio *in vitro* e *in silico* de la región promotora del gen *Cs-mnp2B*, que codifica para manganeso peroxidasa 2B del basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora*. Memoria para optar al título de Bioquímico, U. de Chile.
- ◆ **CHENG, C., Kacherovsky, N., Dombek, K., Camier. S., Thukral, S., Rhin, E., Young, E. (1994).** Identification of potencial target genes for Adr1p through characterization of essential nucleotides in UAS1. Mol. Cel. Biol. 14(6):3842-3852.

- ◆ **DECKERT, J., Khalaf, R., Hwang, S., Zitomer, R. (1999).** Characterization of the DNA binding and bending HMG domain of the yeast hypoxic repressor Rox1. Nucl. Acids. Res. 27(17): 3518-3526.
- ◆ **DONOVIEL, M., Kacherovsky, N., Young, E. (1995).** Synergistic activation of ADH2 expression is sensitive to upstream activation sequence 2 (UAS2) orientation, copy number, and UAS1-UAS2 helical phasing. Mol. Cell. Biol. :3442-3439.
- ◆ **DUTTON, J., Johns, S., Miller, B. (1997).** Stuap is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. EMBO 16(18):5710-5721.
- ◆ **EGGERT, C., Temp, U., Eriksson, K. (1997).** Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Lett. 407. 89-92.
- ◆ **ERIKSSON. (1997).** Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Vol. 57. 1997. Springer. Berlin.
- ◆ **FAISST, S., Meyer, S. (1992).** Compilation of vertebrate-encoded transcription factors, Nucl. Acids Res. 20. 3-26.
- ◆ **FUJISAWA-SEHARA, A., Sogawa, K., Yamane, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1987).** Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug metabolizing cytochrome *P-450c* gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. Nucl. Acids Res. 15. 4179-4191.
- ◆ **FUKUSHIMA, Y., Kirk, T. (1995).** Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispota* lignin-degrading system. Appl. Environ. Microbiol. Mar. 1995, p 872-876.
- ◆ **GETTEMY, J., Li, D., Alic, M., Gold, M. (1997).** Truncated-gene reporter system for studying the regulation of manganese peroxidase expression. Curr Genet, 31:519-524.
- ◆ **GETTEMY, J., Ma, B., Alic, M., Gold, M. (1998).** Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. Appl. Environ. Microbiol. 64 (2): 569-574.

- ◆ **GLENN, J., Akileswaran, L., Gold, M. (1986).** Mn(II) Oxidation is the principal function of the extracellular Mn-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 251: 688-696.
- ◆ **GODFREY, B., Akileswaran., L., Gold, M. (1994).** A reporter gene construct for studying the regulation of manganese peroxidase gene expression. Appl. Env. Microbiol. 60 (4):1353-1358.
- ◆ **GOLD, M., Alic, M. (1993).** Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* . Microbiol. Rev. 57:605-622.
- ◆ **GUNJI, W., Kai, T., Takahashi, Y., Maki, Y., Kurihara, W., Utsugi, T., Fujimori, F., Murakami, Y. (2004).** Global analysis of the regulatory network structure of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA Res. 11: 163-177.
- ◆ **GURVITZ, A., Hiltunen, J., Erdmann, R, Hamilton, B., Harting, A., Ruis, H., Rottersteiner, H. (2001).** *Saccharomyces cerevisiae* Adr1 governs fatty acid β -oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. J. Biol. Chem. 276 (34): 31825-31830.
- ◆ **HAHN, J., Hu, Z., Thiele, D., Iyer, V.(2004).** Genome-wide analysis of the biology of stress response through heat shock transcription factor. Mol. Cel. Biol. 24 (12): 5249-5256
- ◆ **HARLEY, V. Clarkson. M., Argentaro, A. (2003).** The Molecular Action and Regulation of the Testis-Determining Factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG) Box 9] Endocr Rev. 24 (4):466-487
- ◆ **HINNEBUSCH, A. (2005).** Translational Regulation of *GCN4* and the General Amino Acid Control of Yeast. Annu. Rev. Microbiol. 59: 407-450.
- ◆ **KARAHANIAN, E., Corsini, G., Lobos, S., Vicuña, R. (1998).** Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Biochim. Biophys. Acta. 1443. 65-74.

- ◆ **KIRKPATRICK, D., Solomon, F. (1994).** Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene *RCC1* suppresses the class of α -tubulin mutation that arrest with excess microtubules. Genetics 137: 381-392.

- ◆ **KUSTER-VAN SOMEREN, M., Kishi, K., Lundell, T., Gold, M. (1995).** The manganese binding site of manganese peroxidase: Characterization of an Asp 179Asn site-directed mutant protein. Biochem. 34: 10620-10627.

- ◆ **KUWAHARA, M., Glenn, J., Morgan, M., Gold, M. (1984).** Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS. 169(2): 247-250.

- ◆ **LARRONDO, L., Avila, M., Salas, L., Cullen, D., Vicuña, R. (2003).** Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper- activated apoprotein and complex isoform patterns. Microbiol. 149: 1177-1182.

- ◆ **LEE, W., Mitchell, P., Tjian. (1987).** Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA inducible enhancer elements, Cell 49. 741-752.

- ◆ **LI, D., Alic, M., Brown, J., Gold, M. (1995).** Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 61 (1): 341-345.

- ◆ **LIN-CEREGHINO, G., Godfrey, L., De la Cruz, B., Johnson, S., Khuongsathiene S., Tolstorukov, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S., Cregg, J. (2006).** Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. Mol. Cel. Biol. 26(3): 883-897.

- ◆ **LOBOS, S., Larraín, J., Salas, L., Cullen, D., Vicuña, R. (1994).** Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Microbiology 140: 2691-2698.
- ◆ **LOBOS, S., Larrondo, L., Salas, L., Karahanian, E., Vicuña, R. (1998).** Cloning and molecular analysis of a cDNA and the *Cs-mnp1* gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Gene 206: 185-193.
- ◆ **LUNDELL, T., Hatakka, A.(1994).** Participation of Mn(II) in the catalysis of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase from *Phlebia radiata*. FEBS Lett. 348: 291-296.
- ◆ **MAGER, W., Winderickx, J. (2005).** Yeast as a model for medical and medicinal research. Trends Pharmacol Sci. 26(5): 265-273.
- ◆ **MANUBENS, A., Avila, M., Canessa, P., Vicuña, R. (2003).** Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MNP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. Curr. Genet. 43: 433-438.
- ◆ **MINO, Y., Wariishi, H., Blackburn, N., Loehr, T., Gold, M. (1998).** Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 263(15): 7029-7036.
- ◆ **MIZUNO, K., Kojima, Y., Tozawa, K., Sasaki, S., Hayashi, Y., Kohri, K. (2005).** Molecular evaluation of the SRY gene for gonads of patients with mixed gonadal dysgenesis. Int. J. Urol. 12:673-676.
- ◆ **OSTRET, H. (2001).** Identifying genes for male sex determination in humans. J. Exp. Zoo. 290:567-573.

- ◆ **OTJEN, L., Blanchette, R., Effland, M, Leatham, G. (1987).** Assessment of 30 white-rot basidiomycetes for selective lignin degradation. Holzforschung 41. 343-349.

- ◆ **PADGETT, R. A., Konarska, M. M., Grabowski, P. J., Hardy, S. F., Sharp, P. A. (1989).** Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. Science 225: 898-903.

- ◆ **PAGANS, S., Piñeyro, D., Kosoy, A. Bernués, J., Azorín, F. (2004).** Repression by TTK69 of GAGA-mediated activation occurs in the absence of TTK69 binding to DNA and solely requires the contribution of the POZ/BTB domain of TTK69. J. Biol. Chem. 279(11):9725-9732.

- ◆ **PEASE, E., Andrawis, A., Tien, M. (1989).** Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264(23):13531-13535.

- ◆ **PEASE, E., Tien, M. (1992).** Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bact. 174(11):3532-3540.

- ◆ **PELHAM, H. R. B. (1982).** A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila Hsp70* heat-shock gene. Cell 30. 517-528.

- ◆ **POLANCO, R. (2005).** Identificación y caracterización de proteínas que reconocen las secuencias promotoras de genes ligninolíticos del basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispota*. Tesis para optar al grado de doctor en bioquímica. U de Chile.

- ◆ **POULUS, T., Edwards, S., Wariishi, H., Gold, M. (1993).** Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. J. Biol. Chem. 268(6): 4429-4440.

- ◆ **PRIBNOW, D., Mayfield, M., Nipper, V., Brown, J., Gold, M. (1989).** Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264(9):5036-5040.

- ◆ **QUANDT, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995).** MatInd and MatInspector – New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acid Res. 23: 4878-4884.

- ◆ **READ, D., Manley, J. (1992).** Alternative spliced transcripts of the *Drosophila* tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. EMBO 11(3): 1035-1044.

- ◆ **ROTTENSTEINER, H., Wabneggers, L., Erdmann, R., Hamilton, B., Ruis, H., Harting, A., Gurvitz, A. (2003).** *Saccharomyces cerevisiae* PIP2 mediating oleic acid induction and peroxisome proliferation is regulated by adr1 and Pip2p-Oaf1p. J. Biol. Chem. 278(3): 27605-27611.

- ◆ **RÜTTIMAN-JOHNSON, C., Salas, L., Vicuña, R., Kirk, T., (1993).** Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (3): 1792-1797.

- ◆ **RÜTTIMANN, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D., Vicuña, R. (1992).** Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycete *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnol. Appl. Biochem. 16. 64-76.

- ◆ **SALEHI, B., Scarciolla, O, Vanni, G, Nardone, A., Frajese, G, Novelli, G., Stuppia, L. (2006).** Identification of a novel mutation in the SRY gene in a 46, XY female patient. Eur. J. Med. Genet. April 17: 1-5.

- ◆ **SCHAUFLER, L., Klevit, R. (2003).** Mechanism of DNA binding by the ADR1 zinc finger transcription factor as determined by SPR. J. Mol. Biol. 329: 931-939.

- ◆ **SHEPPARD, D., Doedt, T., Chiang, L., Kim, H., Chen, D., Nierman, W., Filler, S. (2005).** The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete

transcriptional program during the acquisition of developmental competence. Mol. Biol. Cell. 16:5866-5879.

- ◆ **SIMON, M., Adam, G., Rapatz, W., Spevak, W., Ruis H. (1991).** The *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. Mol. Cel. Biol. 11(2):699-704.
- ◆ **SLOAN, J., Dombek, K., Young, E. (1999).** Post-transcriptional regulation of Adr1 is mediated by its DNA binding domain. J. Biol. Chem. 274(53): 37575-37582.
- ◆ **SUNDARAMOORTHY, M., Kishi, K., Gold, M., Poulus, T. (1994).** The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. J. Biol. Chem. 269(52): 32759-32767.
- ◆ **SUNDARAMOORTHY, M., Yungs, H, Gold, M., Poulus, T. (2005).** High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. Biochem. 44: 6463-6470.
- ◆ **TACHIBANA, C., Yoo, J., Tagne, J., Kacherovsky N. Lee, T., Young, E. (2005).** Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by ADR1 and Cat8. Mol. Cel. Biol. 25 (6): 2138-3146.
- ◆ **TAYLOR, R., Kebaara, B., Nazareus, T., Jones, A., Yamaka, R., Uhrenholdt, R., Wendler, J., Atkin, A. (2005).** Gene set coregulated by the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay pathway. Euk. Cel. 4 (12): 2066-2077.
- ◆ **TAYLOR, W., Young, E. (1990).** cAMP-dependent phosphorylation and inactivation of yeast transcription factor ADR1 does not affect DNA binding. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 4098-4102.
- ◆ **TELLO, M. (2000).** Caracterización de tres nuevos genes de manganeso peroxidasa del basidiomicete ligninolítico *Ceriporiopsis subvermispora*: Estudio de sus estructuras y expresión génica. Memoria p ara optar al titulo de Bioquímico. U. de Chile.

- ◆ **TELLO, M., Corsini, G., Larrondo, L., Salas, L., Lobos, S., Vicuña, R. (2000).** Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Biochim. Biophys. Acta. 1490. 137-144.
- ◆ **TELLO, M., Seelenfreund, D., Lobos, S., Gaskell, J., Cullen, D., Vicuña, R. (2001).** Isolation and characterization of homokaryotic strains from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. FEMS Microbiology Letters 199.91-96.
- ◆ **THIELE, D. J. (1992).** Metal-regulated transcription in eukaryotes. Nucleic Acids Res. 20. 1183-1191.
- ◆ **URZÚA, U., Larrondo, L., Lobos, S., Larraín, J., Vicuña, R. (1995).** Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. FEBS Lett. 371. 132-136.
- ◆ **WALTHER, K., Scüller, H. (2001).** Adr1 and Cat8 synergistically activate the glucose-regulated alcohol dehydrogenase gene ADN2 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 147:2037-2044.
- ◆ **WARIISHI, H., Valli, K., Gold, M. (1991).** *In-vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Com. 176: 269-275.
- ◆ **WU, J., Miller, B. (1997).** *Aspergillus* Asexual Reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. Mol. Cel. Biol. 6191-6201.
- ◆ **YAMAMOTO, A., Sarai, H. (2006).** The DNA-binding of yeast Hsf1 both DNA-binding and transcriptional activities. Biochem. Biophys. Res. Comp. 346:1324-1329.
- ◆ **YAMAMOTO, A., Mizukami, Y., Sakurai, H. (2005).** Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* J. Biol. Chem. 280(12):11911-11919.
- ◆ **YOUNG, E., Dombek, K., Tachibana, C., Ideker, T. (2003).** Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factor Adr1 and Cat8. J. Biol. Chem. 278(28): 26146-26158.

- ◆ **YUNGS, H., Sundaramoorthy, M., Gold, M. (2000).** Effects of cadmium on manganese peroxidase. Competitive inhibition of Mn^{II} oxidation and thermal stabilization of the enzyme. Eur. J. Biochem. 267: 1761-1769.

Páginas consultadas

- ◆ http://www.jgi.doe.gov/News/news_5_2_04.html.
- ◆ <http://www.forestalia.com>
- ◆ <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
- ◆ <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>
- ◆ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=121066>
- ◆ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=1322586>