
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Gcn4p
SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *DAL5* EN
Saccharomyces cerevisiae.**

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

HÉCTOR EDUARDO SOSA MARÍN

Las Agujas, Zapopan, Jal., Marzo de 2003.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. HÉCTOR EDUARDO SOSA MARÍN
P R E S E N T E .**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción Tesis con el título "**Determinación de la función de Gcn4p sobre la expresión del Gen DAL5 en Saccharomyces cerevisiae**", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ** y como Asesor el/la **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA** y **DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal., 26 de febrero del 2003

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

- c.c.p. **DRA. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ**.- Director del Trabajo.
- c.c.p. **DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA**.- Asesor del Trabajo.
- c.c.p. **DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ**.- Asesor del Trabajo.
- c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

Forma C

**C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

P R E S E N T E.

Por medio de la presente; nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis

Que realizó el Pasante de Biología **HECTOR EDUARDO SOSA MARIN** con el título: **“DETERMINACION DE LA FUNCION DE Gcn4p SOBRE LA EXPRESION DEL GEN DAL5 EN Saccharomyces cerevisiae”**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.



A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., 3 de Marzo de 2003

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

El Director
Dra. LINA RAQUEL
RIEGO RUIZ

El Asesor
Dra. ALMA VILLALOBOS
ARAMBULA

El Asesor
Dra. ALICIA
GONZALEZ MANJARREZ

SINODALES

- 1.- ANNE SANTERRE LUCAS
- 2.- PATRICIA CASTRO FELIX
- 3.- ARMANDO ARIAS GARCIA
- S.- JOSEFINA CASAS SOLIS

FIRMA

A. Santerre 03/03/03
Patricia Castro 03/03/03
Josefina Casas 28/02/03
03/03/03

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio a cargo de la Dra. Alicia González Manjarrez y bajo la dirección de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz (Iriego@ifisiol.unam.mx).

Se contó con la ayuda técnica de la QFB Cristina Aranda Fraustro durante el trabajo experimental. La Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular sintetizó los oligonucleótidos utilizados para el trabajo experimental y colaboró con el equipo para el análisis de datos.

La Dra. Gloria Soberon y el Dr. Jordi Folch hicieron importantes observaciones y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Antes que a ninguna otra persona quiero agradecer a mi papá, gracias a ti hoy tengo el privilegio de contar con una profesión, el arma que me permitirá luchar por alcanzar mis más altos sueños.

A mi mamá quien me enseñó, mediante su ejemplo, cuales son los dones que engrandecen al ser humano y por transmitirme a través del corazón la esencia de lo que soy.

A mi tía Blanca quien respalda cada una de mis metas y por ser parte medular de mi familia.

A mi hermano Rolando mi mejor ejemplo a seguir y por quien conozco el poder de la sencillez y la nobleza.

A mi hermana Vero quien representa fuerza y valentía en mi vida y quien despierta al niño y la felicidad que llevo dentro.

A esta mi familia la cual ha probado amarme y apoyarme incondicionalmente, y la cual es mi mayor orgullo y bendición.

A la familia Sosa Sáenz y Pardiñaz Marín, a mi hada madrina y consejera Lupita Putnam, a Emanuel y a mis tías Nena y Amparo que amplían el cariño en el que me apoyo.

A mis amigas del alma: Miroslava, Verónica Lomelí, Verónica Peña y Miriam por transformar mi vida completamente con su afecto.

A los cheleros: Cuauhtemoc, Sigi, Mónica y Leny por compartir emociones tanto tristes como alegres y por romper el paradigma de que en esta vida los verdaderos amigos son contados.

A cada uno de mis sinodales quienes con sus observaciones tan atinadas ayudaron a mejorar el presente trabajo.

A Alma Villalobos por confiar en mi y obsequiarme el boleto a mi mejor oportunidad académica.

Las personas que la conocen reconocen la inteligencia, tenacidad e ingenio de Alicia González; sin embargo, yo tengo la dicha de gozar de sus virtudes más sobresalientes las cuales se encuentran en su corazón. Por ello y por muchas cosas mas, hoy y siempre sentiré una gratitud y cariño infinito hacia ti.

Un muy especial agradecimiento a la Dra. Lina por ser un rescate eficaz ante las múltiples dudas compartiendo su tiempo, paciencia y conocimientos de manera generosa.

A Cristina Aranda y Lourdes por ser mis guías en el laboratorio y dotarme de las herramientas para poder realizar esta mi primera investigación científica.

A Cecilia, Amaranta, Carlos, Miriam, Héctor, Alexander, Cristina Martínez, Claudia, Víctor, Soledad Guevara, Guillermo y Alejandra por su alegría y bromas en el laboratorio, por los gratos momentos compartidos, por recibirme con los brazos abiertos y ofrecerme lo mejor de cada uno de ustedes, haciéndome sonreír y aprender cada día.

Pero sobre todas las cosas, gracias a quien me obsequia la vida y la llena de felicidad al rodearme de todos estos seres queridos; a ti mi mejor amigo Dios por darme la dicha de descubrir y penetrar a los más íntimos e intangibles secretos de la maravillosa vida.

*Cuando alguien no marca el paso, lo que ocurre,
es que escucha un tambor distinto.
H.D. Thoreau.*

A las personas que más amo:

Alvaro, Mary, Blanca,

Rolando y Vero.

RESUMEN

Cuando se cultiva a *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de fuentes nitrogenadas de alta calidad, la represión catabólica nitrogenada (NCR) evita la expresión de genes implicados en la asimilación de fuentes secundarias de nitrógeno, como *DAL5*.

Estos genes son inducidos por Gln3p y/o Gat1p que a su vez se encuentran regulados negativamente por fosforilación y la presencia de Ure2p. Sin embargo, la expresión de varios genes sensibles a la NCR continúa reprimida aún en ausencia de Ure2p, lo que lleva a proponer la existencia de al menos otro elemento que antagonice al efecto de Gln3p.

En medio rico mas rapamicina el factor transcripcional Gcn4p es capaz de regular junto con Gln3p la expresión de *DAL5*. Este trabajo demuestra que en fuentes ricas de nitrógeno, la ausencia de Gcn4p activa a varios genes sensibles a NCR, indicando que Gcn4p contrarresta el efecto de Gln3p. Estos resultados incorporando a Gcn4p como un componente fundamental dentro de la NCR. Se presenta un modelo que integra el papel de Gcn4p con los conocimientos previos sobre NCR.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Biología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
1.1. El genoma.	2
1.2. <i>S. cerevisiae</i> , un organismo modelo.	2
2. El estudio fisiológico de la asimilación de nutrientes.	3
2.1. Asimilación de nitrógeno.	4
2.2. La levadura y la regulación de la utilización de nitrógeno.	5
2.3. Dinámica de los circuitos regulatorios en la vía del nitrógeno.	5
2.4. Utilización de fuentes orgánicas de nitrógeno.	6
3. Regulación génica.	7
3.1. Control Transcripcional en <i>S. cerevisiae</i> .	7
3.2. La regulación transcripcional mediada por nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i> .	8
4. La cascada TOR y el efecto de la rapamicina.	10
5. La proteína Dal5p.	12
6. Control General de la Biosíntesis de Aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i> .	13
III. PLANTEAMIENTO	15
IV. HIPOTESIS	15
V. OBJETIVOS	15
VI. MATERIALES Y METODOS	16

1. Estrategia experimental.	16
2. Material biológico	17
3. Medios de crecimiento.	19
4. Condiciones de cultivo.	20
5. Construcción de la fusión del promotor <i>DAL5</i> con el gen <i>lacZ</i> .	21
6. Mutación sitio dirigida de la caja GCN4.	22
7. Electroporación.	23
8. Obtención de plásmidos	24
9. Transformación de levadura.	25
10. Selección de cepas que integraron el plásmido.	25
11. Obtención de cepas mutantes en el gen <i>URE2</i> .	26
12. Obtención de DNA genómico.	27
13. Comprobación de la mutación mediante productos de PCR.	28
14. Rompimiento celular para la obtención de extracto proteico.	29
15. Actividad de β -galactosidasa.	30
16. Determinación del contenido proteico de los extractos celulares.	31
17. Ensayo tipo Northern blot	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. Identificación de elementos en <i>cis</i> que fueran reconocidos por Gcn4p.	40
2. Funcionalidad de la caja GCN4 presente en el promotor de <i>DAL5</i> .	40
3. El papel de Gcn4p en la expresión de los genes <i>URE2</i> y <i>GLN3</i> .	44
4. Efecto de los principales reguladores de <i>DAL5</i> en medio rico.	45
5. Efecto de distintas fuentes de nitrógeno en la regulación de <i>DAL5</i> .	48

5.1. Las fuentes represoras.	49
5.2. Amonio.	51
5.3. Prolina.	53
6. Consideraciones acerca del papel de Gcn4p en la regulación de los genes del catabolismo nitrogenado.	54
7. Efecto de la privación de aminoácidos en la inducción de <i>DAL5</i> dependiente de Gcn4p.	56
VIII. MODELOS	59
IX. CONCLUSIONES	62
X. PERSPECTIVAS	63
XI. REFERENCIAS	64
XII. INDICE DE FIGURAS	71
XIII. ABREVIATURAS	72
XIV. GENES Y OTRAS ANOTACIONES	73
XV. APÉNDICE	74

I. INTRODUCCIÓN.

El estudio de la regulación del metabolismo nitrogenado se ha favorecido por la accesibilidad para el análisis molecular y por la manipulación experimental sencilla de *Saccharomyces cerevisiae*.

Por lo anterior es posible saber que el mecanismo de represión catabólica nitrogenada, presente en esta levadura, trabaja a través de pasos específicos de la siguiente manera: una fuente rica de nitrógeno mantiene la función de la vía TOR la cual fosforila a Ure2p que a su vez retiene a Gln3p y Gat1p en el citoplasma. Con estos activadores fuera de núcleo, las cajas GATA no pueden ser reconocidas y por lo cual los genes del catabolismo nitrogenado no inducen su expresión.

La rapamicina contrarresta la función de la vía TOR, ocasionando que numerosos genes se expresen, entre los que se encuentran muchos de los genes sensibles a la represión catabólica nitrogenada y 71 de los genes blanco de Gcn4p. Gcn4p es un regulador maestro de la expresión génica, tanto de manera positiva como negativa (Beck y Hall, 1999; Natarajan *et al.*, 2001).

Ahora se conoce que la presencia de Gcn4p es necesaria para lograr la inducción total de los genes catabólicos: *DAL5*, *DAL1* y *HIS3* en medio rico con rapamicina, los dos primeros genes se encuentran regulados también por Gln3p (Valenzuela *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren que el incremento en la transcripción de otros genes implicados en la utilización de nitrógeno en presencia de rapamicina pudiera atribuirse a la acción combinada de Gln3p y Gcn4p. Para el entendimiento de tal efecto es esencial estudiar a estos factores transcripcionales en distintas fuentes de nitrógeno. El presente trabajo pretende determinar el papel que desempeña Gcn4p dentro del metabolismo nitrogenado.

II. ANTECEDENTES.

1. Biología de *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae es un hongo ascomiceto ubicado taxonómicamente en la familia de los Saccharomycetaceae, los cuales se caracterizan por tener esporas redondas dentro de un asca. Esto implica que pueden reproducirse sexualmente, pero además, este organismo unicelular puede reproducirse asexualmente por un patrón de gemación que resulta en células dispersas (Magasanik, 1992).

En cuanto a su metabolismo es un microorganismo anaerobio facultativo; es decir, capaz de crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. En este último caso, el ácido pirúvico es degradado hasta bióxido de carbono y etanol. Este proceso, llamado fermentación alcohólica, ha sido aprovechado por el ser humano desde tiempos muy remotos para la producción de alcohol industrial, en vinicultura y en la fabricación de cerveza y pan (Magasanik, 1992).

1.1. El genoma.

Una levadura en su estado haploide contiene 16 cromosomas, en los cuales se encuentran compactados aproximadamente 6,000 genes. La presencia de intrones en el genoma es escasa así como los fragmentos de DNA espaciador. Este arreglo del material genético permitió, en 1996, obtener el primer genoma eucarionte totalmente secuenciado. Desde entonces se ha facilitado y acelerado el estudio de su material genético (Sherman, 1991).

1.2. *S. cerevisiae*, un organismo modelo.

Este eucarionte primitivo se asemeja a los eucariontes superiores por presentar los principales organelos subcelulares, una gran cantidad de procesos metabólicos comunes, así como proteínas con homología funcional y estructural. Por lo cual, resulta un organismo interesante para abordar problemas específicos relacionados con la biología a nivel molecular, la genética y los fenómenos fisiológicos de los eucariontes.

Su manipulación experimental resulta sencilla, lo cual se debe en gran parte a características intrínsecas tales como: tamaño pequeño, inocuidad, fases haploides y diploides estables, heterotalismo (MATa y MAT α), producción por meiosis de 4 esporas en un saco, ciclo de vida y tiempo de duplicación corto. Por otro lado y a diferencia de la mayoría de los organismos, la levadura es capaz de crecer en medios sintéticos líquidos y sólidos, presenta una conversión génica frecuente así como una tasa elevada de recombinación homóloga (Sherman, 1991).

Finalmente, la accesibilidad para el análisis molecular mediante técnicas de DNA recombinante, el aislamiento rápido y específico de genes y mutantes, la clonación de genes mediante vectores específicos y la transformación por métodos sencillos, incluso directamente mediante oligonucleótidos sintéticos, ha permitido obtener gran cantidad de información acerca de la biología de esta levadura a nivel molecular (Sherman, 1991). Por todo lo anterior, gran parte del conocimiento actual sobre las células eucariotas se debe a la investigación básica en esta levadura.

2. El estudio fisiológico de la asimilación de nutrientes.

Las propiedades de un microorganismo son determinadas por su genoma, el cual le permite existir como unidad funcional y ajustar su metabolismo ante la disponibilidad de nutrientes y cambios en su microambiente que modifican la composición química y las características de la célula.

La limitación nutricional es el estímulo ambiental que genera mayores cambios en la estructura y función de un organismo unicelular; por ello, para comprender el comportamiento de un microorganismo en la naturaleza es indispensable estudiar su respuesta a la disponibilidad y a los tipos de sustratos alimenticios en donde crece. Esta respuesta se refiere a su capacidad de crecer y producir material celular lo más rápido posible ante un sustrato limitante. Esto puede conseguirse de tres formas: 1) acelerando la incorporación del sustrato limitante, lo cual se logra incrementando la síntesis de los sistemas de transportes existentes en la membrana plasmática, modificando su estructura terciaria, o induciendo la síntesis de otros sistemas de transporte con mayor afinidad por el

sustrato limitante. 2) Acelerando la incorporación del sustrato a alguna ruta metabólica, lo cual se consigue, incrementando la síntesis de las enzimas involucradas en su transformación inicial o induciendo la actividad de rutas metabólicas alternas de mayor afinidad. 3) Rearreglando la composición química de las estructuras celulares (Tyler, 1978).

2.1. Asimilación de nitrógeno.

El nitrógeno es un constituyente esencial en las moléculas necesarias para la vida de todos los organismos; por ello, todos los seres vivos presentan mecanismos para llevar a cabo el metabolismo nitrogenado. Este metabolismo implica a todas las reacciones químicas y los cambios físicos relacionados con los componentes nitrogenados, incluyendo la interconversión de materia orgánica nitrogenada, la fijación de nitrógeno, nitrificación, desnitrificación, asimilación y degradación de la reducción de nitratos.

El nitrógeno molecular es la única reserva de nitrógeno accesible y se encuentra en gran cantidad en la biosfera; sin embargo, para que este pueda ser asimilado, se necesita que sea reducido a amonio. Los únicos seres vivos capaces de llevar a cabo esta reacción son los que pertenecen a los grupos Eubacteria y Archaea, por el proceso denominado fijación de nitrógeno. El resto de los organismos, los cuales no pueden fijar el nitrógeno atmosférico, incorporan el nitrógeno en forma combinada y para utilizarlo requieren de: a) vías de asimilación que permitan el aprovechamiento de los compuestos nitrogenados disponibles y b) vías biosintéticas para la producción de las moléculas nitrogenadas requeridas por la célula. Los pasos específicos en estas vías varían con el organismo y dependen de las fuentes de nitrógeno. Sin embargo, en todas las células el glutámico y la glutamina son los principales donadores de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, aminoazúcares, vitaminas, purinas y pirimidinas, compuestos que a su vez participan en la síntesis de macromoléculas (Tyler, 1978; Magasanik, 1992). En la levadura, cerca del 88% del nitrógeno celular se deriva del grupo amino del glutámico y un 12% del grupo amido de la glutamina (Miller y Standman, 1972).

2.2. La levadura y la regulación de la utilización de nitrógeno.

El crecimiento y la reproducción de los microorganismos, pueden depender de su capacidad para introducir y aprovechar las moléculas nitrogenadas. *S. cerevisiae* en su estado silvestre abunda en frutas maceradas, vegetales en descomposición, remolacha de azúcar y malta. En la mayoría de estos ambientes, la levadura obtiene el nitrógeno de un amplio espectro de compuestos nitrogenados; sin embargo, no todos le permiten la misma velocidad de crecimiento. Si bien este organismo es capaz de aprovechar el nitrógeno de diferentes compuestos, transporta, acumula y utiliza preferentemente aquellas fuentes de nitrógeno primarias. Esto es una manifestación del uso selectivo de fuentes de nitrógeno de alta calidad (Cooper y Sumrada, 1983).

Los atributos de una buena fuente de nitrógeno son: a) transportarse rápidamente al interior celular, b) degradarse en pocos pasos a ácido glutámico y/o amonio y c) no presentar efectos tóxicos sobre la célula (Cooper, 1982). Para *S. cerevisiae* la asparagina, la glutamina, el ácido glutámico y en una menor medida el amonio, son las mejores fuentes de nitrógeno y por lo tanto la célula crece en ellos con facilidad. Entre los metabolitos considerados como fuentes de nitrógeno secundarias se encuentran las amidas, las purinas, las proteínas y algunos aminoácidos. Para incorporar y degradar esta variedad de compuestos nitrogenados no preferentes, la célula utiliza diversas permeasas y vías de degradación (Large, 1986).

2.3. Dinámica de los circuitos regulatorios en el metabolismo de nitrógeno.

Cuando las fuentes de nitrógeno preferentes se encuentran en bajas concentraciones o ausentes en el medio de crecimiento, la levadura utiliza alguna fuente de nitrógeno secundaria iniciando una alta síntesis *de novo* o activando nuevas permeasas y enzimas catabólicas que le permitan aprovecharla. Los genes, estructurales y regulatorios, de las diversas enzimas que participan en la utilización de los compuestos nitrogenados, integran el refinado circuito catabólico nitrogenado, que previene o reduce la síntesis innecesaria de estos productos.

La producción de las proteínas necesarias para la asimilación de fuentes secundarias de nitrógeno solamente ocurre en la presencia de dos señales

positivas distintas: una de carácter global y una específica. La necesidad de estos dos pasos permite la expresión exclusiva de enzimas de una vía catabólica particular de entre muchas candidatas posibles dentro del circuito catabólico nitrogenado (Marzluf, 1997).

La señal global, ante la ausencia de fuentes primarias de nitrógeno, inactiva la represión catabólica nitrogenada. Este mecanismo previene la expresión transcripcional de los genes biosintéticos que se requieren independientemente de la fuente de nitrógeno y de los genes del catabolismo nitrogenado (Blinder y Magasanik, 1995; Cooper, 1982; Cooper y Sumrada, 1983, Courchesne y Magasanik, 1988). Por su parte la señal específica (requerida en la mayoría de los casos), informa de la presencia del intermediario o sustrato, con lo cual se inducen genes específicos para cada vía metabólica.

2.4. Utilización de fuentes orgánicas de nitrógeno.

Los compuestos orgánicos nitrogenados que adquiere la célula tienen tres usos posibles: a) la incorporación sin ninguna modificación en los constituyentes celulares; por ejemplo, introduciendo directamente algunos aminoácidos en las proteínas, b) la degradación para liberar el nitrógeno y con él sintetizar otros compuestos nitrogenados celulares y c) la utilización del carbono que contienen estos compuestos con propósitos biosintéticos o energéticos.

La levadura puede crecer en presencia de cualquiera de los aminoácidos ya que todos son capaces de funcionar como única fuente de nitrógeno y de ser degradados hasta amonio. En este proceso participan diversas enzimas catabólicas, que están sujetas a la represión catabólica nitrogenada. El tiempo de duplicación de la levadura cultivada en algún aminoácido como única fuente de nitrógeno, es característico para cada uno de ellos, llamándose buenas fuentes de nitrógeno a aquellos aminoácidos en los cuales el tiempo de duplicación es similar al encontrado en amonio, como en el caso de la glutamina y la asparagina. Las fuentes de nitrógeno pobres ocasionan un retardo considerable en la duplicación de las células, entre estas fuentes se encuentran los siguientes aminoácidos: arginina, gama-aminobutírico (GABA), prolina, alantoína y ornitina (Cooper, 1982).

3. Regulación génica.

La expresión génica es el proceso por el cual la información contenida en los genes es convertida a proteínas; este proceso determina las propiedades de un organismo. Sin embargo, no todos los genes se expresan continuamente y esto se debe a la acción diferencial de varios mecanismos, que en su conjunto reciben el nombre de regulación génica.

Para sobrevivir, adaptarse, obtener los nutrientes indispensables y crecer en un amplio espectro de circunstancias, todos los seres vivos deben de controlar finamente los procesos celulares durante su ciclo de vida. Las células logran esto respondiendo a señales específicas externas u originadas dentro de la misma célula, que modulan la actividad o la expresión de los factores transcripcionales. Esto a su vez, finaliza en una rápida reprogramación dada por la activación o represión de la expresión genética, principalmente a nivel de la transcripción (Cooper, 1998). Por todo lo anterior, resulta esencial el entender como se transmite la señal para que un gen se transcriba en un determinado momento del ciclo celular y el determinar bajo qué circunstancias y mecanismos ocurre este control.

3.1. Control transcripcional en *S. cerevisiae*.

En eucariontes existe un complejo protéico específico que da inicio a la transcripción de genes para la síntesis de RNA mensajero. El ensamblaje de este complejo comienza cuando una proteína reconoce y se une a una secuencia específica en los promotores, denominada caja TATA, cuya secuencia consenso es 5'-TATAAA-3'. En los promotores de *S. cerevisiae*, esta caja se puede localizar en la región comprendida entre los nucleótidos -40 y -120 río arriba respecto al sitio de inicio de la transcripción (Harbury y Struhl, 1989).

Existen también proteínas (elementos *trans*), que se unen a secuencias específicas en el DNA (elementos en *cis*), las cuales activan o reprimen la transcripción en respuesta a señales reguladoras. Las proteínas reguladoras pueden unirse al DNA mediante distintos dominios de unión como los motivos: hélice-vuelta-hélice, dedo de zinc y cremallera de leucinas.

En *S. cerevisiae* los reguladores de la transcripción se unen a elementos específicos en los promotores llamados secuencias de activación río arriba (UASs) o de represión (URSs) que pueden estar a gran distancia del inicio de la transcripción. Se cree que los reguladores transcripcionales actúan tanto en el reclutamiento de la enzima que reconoce a la caja TATA, así como de otras proteínas necesarias en la maquinaria transcripcional (Stargell y Strul, 1996). Así, la estimulación transcripcional requiere de la expresión y función de un activador y de la presencia de al menos un elemento UAS eficiente en los promotores de sus genes blanco. Existen otros elementos, denominados coactivadores, que no se unen al DNA pero que facilitan la unión de los activadores al mismo.

Se ha demostrado, que algunas enzimas presentes en *S. cerevisiae*, solamente son sintetizadas en presencia de sustratos específicos. Este fenómeno se conoce como inducción. La inducción puede deberse a la activación de un precursor inactivo o a la síntesis *de novo* de la proteína en cuestión (Magasanik, 1992).

La inhibición específica de la síntesis de una enzima se conoce como represión. Cuando la síntesis de una enzima se reprime, el RNA mensajero que la codifica se deja de sintetizar y se degrada rápidamente; por lo tanto, la síntesis de esta proteína se detiene (Marzluf, 1997).

3.2. La regulación transcripcional mediada por nitrógeno en *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae, como muchos otros microorganismos eucariotes y procariotes, es capaz de ajustar su composición enzimática de acuerdo a la calidad de sus fuentes nitrogenadas.

En todas las células eucariotes, desde la levadura hasta el ser humano, se encuentran conservados los factores GATA, los cuales llevan a cabo funciones relacionadas. *S. cerevisiae* presenta cuatro factores transcripcionales homólogos de la familia GATA directamente relacionados con la expresión de los genes del catabolismo nitrogenado. Dos de ellos Gln3p y Gat1p actúan sobre la expresión génica de manera positiva (Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1996; Minehart y Magasanik, 1991; Stanbrough y Magasanik, 1996), mientras que Dal80p y Deh1p actúan como represores (Cunningham y Cooper, 1991;

Daugherty, 1992; Daugherty *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1994). Los cuatro factores se unen por motivos de dedos de zinc a la secuencia consenso [5'-GAT(T/A)A-3'] o caja GATA. La presencia de sólo una de estas cajas resulta esencial pero no suficiente para la regulación por NCR (Cooper *et al.*, 1989).

Gln3p es el regulador general de la asimilación del nitrógeno y es altamente específico en la unión a la caja GATA. La proteína consta de 730 aminoácidos, su actividad es inversamente proporcional a las concentraciones intracitoplásmicas de glutamina, las cuales son altas en células crecidas en un medio con glutamina, bajas con amonio y aún mas bajas en uno que contiene glutamato. Gln3p activa la expresión de muchos genes cuyos productos son responsables de la utilización de diversas fuentes de nitrógeno, incluido *GAP1*, el gen estructural para la permeasa general de aminoácidos (Hinnebusch, 1992). Este transportador presenta una baja afinidad y una alta capacidad para introducir en la célula a los aminoácidos, los cuales son capaces de inducir a las enzimas requeridas para su propia degradación y con ello su utilización como fuentes de nitrógeno, de esta manera Gap1p es responsable en gran medida de regular a la vía de nitrógeno.

Gat1p consta de 510 aminoácidos y es el segundo activador del catabolismo nitrogenado. Su expresión es sensible a NCR, parcialmente dependiente de Gln3p y regulada por Dal80p. Gat1p se inactiva al elevar los niveles intracelulares de glutamato (Coffman *et al.*, 1996).

Las concentraciones nucleares de Gat1p y Gln3p dependen no sólo de su síntesis, sino también de su translocación al núcleo. La expresión independiente del inductor específico, de los genes del catabolismo nitrogenado, se debe completamente a estos dos activadores aunque su acción relativa varía dependiendo del gen que se encuentre regulado (Coffman *et al.*, 1996).

Dal80p es una proteína relativamente pequeña de 269 aminoácidos que presenta un motivo de dedos de zinc y uno de cremallera de leucinas, con el cual dimeriza para reconocer a dos elementos GATA separados por 15 a 35 pb (Cunningham y Cooper, 1991; 1993). Sus genes blanco, dependen de la presencia de un inductor específico y aumentan su transcripción de 10 a 20 veces cuando se elimina al represor Dal80p.

Si bien es cierto, que tanto Gln3p como Dal80p reconocen a las cajas GATA, estos compiten por la unión a los elementos en *cis* y existe un solapamiento funcional significativo, no todos los genes que requieren de Gln3p para expresarse son sensibles a Dal80p y lo mismo es verdad en el caso inverso. Por ejemplo, la expresión de los genes *DAL5* y *GLN1* es altamente dependiente de Gln3p pero responde muy levemente a la regulación por Dal80p. Esta aparente paradoja tiene su explicación en la necesidad que presenta Dal80p de una orientación y espaciamiento específico entre sus dos secuencias blanco lo cual hace más estricta su unión al DNA (Svetlov y Cooper, 1998).

El segundo represor, Deh1p, al igual que Dal80p, presenta un dedo de zinc, una cremallera de leucinas y la capacidad de formar dímeros. Además, ambos represores carecen de la región ácida presente en Gln3p y Gat1p, la cual es crítica para la activación transcripcional. Sin embargo, la secuencia de 551 aminoácidos de Deh1p es dos veces más grande en comparación con la de Dal80p. Aunque Deh1p es un factor recientemente reportado y poco estudiado, se cree que su función es antagonizar a Gat1p por unirse a las mismas cajas GATA (Stanbrough *et al.*, 1995).

Se sabe que estos cuatro factores GATA se regulan entre sí, lo cual brinda estabilidad al circuito del cual forman parte y actúan, de manera competitiva pero rigurosamente coordinada, sobre aproximadamente dos docenas de genes relacionados de alguna manera con el catabolismo de nitrógeno (Cox *et al.*, 1999).

4. La cascada TOR y el efecto de la rapamicina.

La sobrevivencia de las células en su ambiente natural depende de su habilidad para adaptarse rápidamente a los cambios ambientales, esto lo logran por medio de mecanismos de transducción de señales que finalmente modifican la regulación génica. Una de las rutas de señalización más importante presente en todas las células eucariotas es la vía de la cinasa blanco de rapamicina (TOR).

En *S. cerevisiae* la cascada TOR, a través de las enzimas Tor1p y Tor2p, transmite señales que ocasionan la producción de proteínas y otras moléculas esenciales que regulan el crecimiento y la proliferación celular. Cuando el efector multifuncional TOR se encuentra inhibido ante una privación de nutrientes, la

transcripción y la traducción de cientos de genes se afecta y la célula presenta las siguientes modificaciones: 1) inhibición de la síntesis de proteínas, 2) acumulación de glucógeno, 3) detención en la etapa G1/S del ciclo celular con lo que se inhibe la división, el crecimiento y la proliferación celular, 4) inicio de autofagia y 5) inhibición de la biogénesis ribosomal. La presencia de estas modificaciones sugiere que TOR es un factor maestro en la regulación transcripcional de genes implicados en varias vías de respuesta celular (Schmelzle y Hall, 2000; Raught *et al.*, 2001).

Debido a que una de las principales funciones de la vía TOR es valorar las cantidades o calidades de nutrientes disponibles como son las fuentes de carbono y nitrógeno (Beck y Hall, 1999), en un medio rico en nitrógeno y con niveles intracelulares de glutamina elevados, la vía TOR previene la transcripción de los genes del catabolismo nitrogenado, al evitar mediante fosforilaciones la entrada del activador Gln3p al núcleo (Cárdenas *et al.*, 1999; Hardwich *et al.*, 1999).

Además la proteína Ure2p, constituida por 354 aminoácidos, disminuye la expresión de los genes directamente regulados por Gln3p reteniendo a este activador en el citoplasma cuando existe una buena fuente de nitrógeno (Courchesne y Magasanik, 1988).

Se desconoce si Ure2p es la única proteína responsable de antagonizar la acción de Gln3p y si actúa a través de la formación de un complejo con Gln3p o estabilizando su forma fosforilada (Bertram *et al.*, 2000). Es importante aclarar que Ure2p no afecta la expresión de *GLN3* y que los niveles de la proteína prepion Ure2p son constitutivos en la célula, por ello, la expresión del gen *URE2* aparentemente no esta regulada. (Ter Schure *et al.*, 2000).

Al cambiar a una fuente pobre de nitrógeno o mediante un tratamiento con la droga inmunosupresora y anti-neoplastica rapamicina, la cual mimetiza el efecto obtenido a partir de la utilización de fuentes pobres de nitrógeno, Gln3p se desfosforila y separa de Ure2p. Al encontrarse libre, Gln3p se acumula rápidamente en el núcleo y activa la transcripción de genes requeridos para asimilar las fuentes secundarias de nitrógeno.

Por lo tanto, Ure2p está situado por encima de Gln3p dentro de la vía reguladora, siendo responsable en gran medida de la regulación nitrogenada. Se

ha hipotetizado, pero no demostrado, acerca de un mecanismo similar para la acción de Ure2p sobre Gat1p (Beck y Hall, 1999).-

5. La proteína Dal5p.

La alantoína es un producto de la degradación de purinas que *S. cerevisiae* utiliza como la principal fuente de nitrógeno en su hábitat natural (Cooper, 1982). El catabolismo de alantoína se lleva a cabo a través de una compleja vía que incluye cinco enzimas y cuatro sistemas de transporte, siendo degradada hasta amonio y CO₂.

Uno de los cuatro sistemas de transporte es el producto del gen *DAL5*, una permeasa de 543 aminoácidos, capaz de introducir alantoato. Con la incorporación de este compuesto en la célula, el resto de la ruta para el catabolismo de alantoína se activa, degradando al alantoato para utilizarlo como fuente de nitrógeno (Hofman-Bang, 1999). Así mismo Dal5p es capaz de transportar ureidosuccinato, el primer intermediario específico en la biosíntesis de pirimidinas (Turoscy y Cooper, 1987).

El gen *DAL5* se encuentra en el cromosoma X, su región codificante consta de 1,632 pb y no posee intrones, tiene una expresión constitutiva que se induce a sus niveles mas altos ante fuentes pobres de nitrógeno como prolina y alantoína. En el caso de exponer a las células a una fuente nitrogenada rica, los niveles de RNAm de este gen caen rápidamente. El promotor de *DAL5* contiene secuencias activadoras río arriba (UAS_{NTR}) que lo hacen sensible a la represión catabólica nitrogenada mayoritariamente dependiente de Gln3p (Rai *et al.*, 1989). El promotor tiene diez cajas GATA, al parecer dos de ellas funcionan a su capacidad máxima y por lo tanto resultan esenciales para la transcripción, una caja mas funciona al 10% de su capacidad reconociendo específicamente a Gln3p y las otras siete cajas GATA restantes no han mostrado ser funcionales en ninguna de las condiciones estudiadas hasta ahora (Cooper, 2002).

Este promotor, a diferencia de otros implicados en la asimilación de fuentes secundarias de nitrógeno, carece de secuencias represoras río arriba (URS), es por ello que responde muy débilmente ante la represión por parte de Dal80p y Deh1p. La activación debida a Gat1p es de poca magnitud y solamente detectable

con prolina cuando se encuentra ausente Gln3p (Coffman *et al.*, 1995; Coffman *et al.*, 1996). A su vez, el promotor es completamente independiente de inducción por alofanato u oxalurato, el sustrato específico de la vía. Por consiguiente, *DAL5* está controlado únicamente por medio de la presencia o ausencia de Gln3p en el núcleo.

Estas características únicas dentro de los genes afectados por NCR, hacen de *DAL5* un buen modelo para estudiar los procesos regulatorios de la transcripción en la vía de asimilación de nitrógeno, por lo que es comúnmente empleado en estudios comparativos dentro del metabolismo nitrogenado (Rai *et al.*, 1987).

6. Control general de la biosíntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae*.

Como la mayoría de los microorganismos *S. cerevisiae* posee genes para biosintetizar los 20 aminoácidos que conforman a las proteínas. Al mutar uno de estos genes se impide la síntesis de algún aminoácido y al no suministrarle a la mutante con el aminoácido que necesita, se obtiene una auxotrofia genotípica. Mediante la aplicación de análogos de aminoácidos, como el comúnmente utilizado, 3-amino 1,2,4, triazol (3-AT), inhibidor de la biosíntesis de histidina, se pueden reprimir enzimas en las vías que llevan a la obtención de histidina y con ello producir una auxotrofia fenotípica.

S. cerevisiae responde a través del control general de aminoácidos (GCN) a la privación de 11 aminoácidos esenciales (Valenzuela *et al.*, 2001), aumentando de 2 a 10 veces la transcripción de más de 30 genes, cuyos productos participan en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1986).

El activador directo y principal de este circuito es Gcn4p, el cual es regulado a nivel de la traducción y se une en forma de dímero a las secuencias consenso 5'-TGACTCA-3' (elementos en *cis* AP1), mediante dominios de unión a DNA del tipo de cremalleras de leucinas (O'Neil *et al.*, 1991). La presencia de una sola caja para Gcn4p, en los genes blanco, es suficiente para responder eficientemente ante la presencia de este factor transcripcional, aunque generalmente se encuentra un número mayor de estas cajas (Hinnebusch, 1992).

Debido a que existen cajas para Gcn4p en los promotores de numerosos genes, los cuales no están directamente relacionados con la síntesis de aminoácidos y ante la posibilidad de que otras vías metabólicas respondieran al producto de *GCN4*, se realizó un estudio general en el cual se elevaron las concentraciones de Gcn4p y se observó la inducción de 235 genes que contienen en su promotor sitios de unión para Gcn4p y un número similar fue reprimido, cabe aclarar que los genes catabólicos no modificaron su expresión. Finalmente los genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos representan sólo un cuarto de los genes blanco para Gcn4p. De esta manera, Gcn4p desempeña un papel como regulador maestro en la expresión génica (Natarajan *et al.*, 2001). A niveles basales Gcn4p es capaz de inducir a varios genes biosintéticos y junto a Gln3p es capaz de regular al menos a tres genes del catabolismo nitrogenado (Valenzuela *et al.*, 2001); sin embargo, su papel en estas condiciones ha sido poco estudiado (Hinnebusch, 1992).

III. PLANTEAMIENTO.

El descubrimiento del efecto conjunto de Gcn4p y Gln3p sobre la expresión de genes implicados en el catabolismo nitrogenado, entre ellos *DAL5*, plantea preguntas acerca del papel de estos dos factores transcripcionales en presencia de distintas fuentes de nitrógeno. Además se desconoce si Gcn4p regula a los genes sensibles a NCR directa o indirectamente.

Este trabajo pretende aumentar el conocimiento acerca del modo de acción de Gcn4p en la expresión de *DAL5* e iniciar el estudio de este fenómeno en diferentes fuentes nitrogenadas y en mutantes de los factores transcripcionales mas importantes dentro del mecanismo de la NCR.

IV. HIPOTESIS.

Gcn4p se une directamente al promotor de *DAL5* incrementando su expresión en diferentes fuentes de nitrógeno.

V. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Estudiar el papel de Gcn4p en la regulación transcripcional de *DAL5*.

Objetivos específicos.

- 1) Conocer si Gcn4p se une directamente a un elemento UAS_{GCN4} de la región promotora de *DAL5*.
- 2) Identificar el control ejercido por Gcn4p sobre *DAL5* en diferentes fuentes de nitrógeno.
- 3) Determinar los patrones de expresión de *DAL5* en presencia y ausencia de sus reguladores (Gcn4p, Gln3p y Ure2p), de manera individual y en conjunto.

VI. MATERIALES Y METODOS.

1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

A. Determinación del efecto de Gcn4p sobre su caja consenso en el promotor de *DAL5*.

- a) Diseñar oligonucleótidos que permitan amplificar el promotor de *DAL5*.
- b) Diseñar oligonucleótidos que permitan mutar la caja consenso para el reconocimiento de Gcn4p en el promotor de *DAL5*.
- c) Amplificar el promotor de *DAL5* por PCR, tanto el silvestre como el que contiene la mutación en la caja consenso para Gcn4p.
- d) Clonar los productos de PCR en un vector que contiene al reportero *lacZ*.
- e) Transformar cepas de levadura con los plásmidos reporteros que llevan el promotor silvestre y el promotor mutado en la caja consenso para Gcn4p.
- f) Cultivar las cepas obtenidas en la transformación anterior en fuentes ricas y pobres de nitrógeno, y en presencia o ausencia de rapamicina.
- g) Medir la actividad enzimática del reportero β -galactosidasa en diferentes fuentes de nitrógeno.

B. Determinación de los efectos en conjunto e individuales de Gcn4p, Gln3p y Ure2p sobre la expresión de *DAL5* a partir de células cultivadas en fuentes nitrogenadas primarias y secundarias. Hasta el momento, se cuenta con cepas mutantes en los siguientes genes *GLN3*, *GCN4* y una doble mutante *gln3 Δ gcn4 Δ* ; todas ellas transformadas para presentar el plásmido con la fusión del promotor *DAL5* y el gen reportero *lacZ* (pLAL1).

- a) Diseño de oligonucleótidos que permitan realizar una interrupción en el gen *URE2* a partir de una cepa silvestre y de una mutante *gcn4 Δ* .
- b) Diseño de oligonucleótidos que permitan la amplificación del gen para comprobar la mutación.

- c) Transformación de las cepas mutantes con el plásmido pLAL1.
 d) Determinación del efecto de cada una de las mutaciones en distintas fuentes nitrogenadas sobre la expresión del gen *DAL5*.

2. MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Fuente
CLA1	<i>MATα ura3 leu2</i>	Avendaño <i>et al.</i> , 1997.
CLA-100-0	<i>MATα gcn4Δ::URA3 leu2</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 1998.
CLA-302	<i>MATα gln3Δ::kanMX ura3 leu2</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2001.
CLA-303	<i>MATα gln3Δ::kanMX gcn4Δ::URA3 leu2</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , 2001.
CLA-705	<i>MATα ure2Δ::kanMX ura3 leu2</i>	Este trabajo.
CLA-707	<i>MATα gcn4Δ::URA3 ure2Δ::kanMX ura3 leu2</i>	Este trabajo.
CLA-701	<i>MATα ura3/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-711	<i>MATα ura3/pLAL2 (pDAL5-cajagcn4mutada-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-702	<i>MATα gcn4Δ::URA3/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-703	<i>MATα ura3 gln3Δ::kan/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.

CLA-704	<i>MATα gln3Δ::kan gcn4Δ::URA3/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-706	<i>MATα ura3 ure2Δ::kan/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-708	<i>MATα gcn4Δ::URA3 ure2Δ::kan/pLAL1 (pDAL5-lacZ 2μ LEU2)</i>	Este trabajo.
CLA-300	<i>MATα ura3 leu2 + p180-URA3 pR315-LEU2</i>	Valenzuela et al., 2001.

2.2. Cepas de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	Fuente
TB1 + pLAL1	<i>F ara (lac-proAB) [ø80dlac (lacZ) M15] rpsL (Str^R) thi hsdR + pDAL5-LEU2</i>	Este trabajo.
TB1 + pLAL2	<i>F ara (lac-proAB) [ø80dlac (lacZ) M15] rpsL (Str^R) thi hsdR + pDAL5-gcn4-LEU2</i>	Este trabajo.

2.3. Lista de plásmidos.

Plásmido	Genotipo	Fuente
YEp363	<i>lacZ 2μ LEU2</i>	Myers et al., 1986.
pLAL1	<i>DAL5-lacZ 2μ LEU2</i>	Este trabajo.
pLAL2	<i>DAL5-cajagcn4mutada-lacZ 2μ LEU2</i>	Este trabajo.
pFA6	<i>kanMX</i>	Wach et al., 1994.
pR315	<i>CEN6 ARS4 LEU2</i>	Sikorski et al., 1989.
p180	<i>GCN4-lacZ CEN4 ARS1 URA3</i>	Hinnebusch, 1985.

3. MEDIOS DE CRECIMIENTO.

Todo el trabajo requiere de completa esterilidad por lo que el material y los medios se esterilizaron en autoclave a una presión de 15 libras a 120 °C durante 20 min. Los aminoácidos y antibióticos requeridos fueron esterilizados por filtración (Micropore, 0.22 micras) y agregados a los medios que previamente habían sido esterilizados por autoclave.

3.1. Bacterias.

Los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C, en estufa o en agitación a 250 rpm. Para la propagación de los plásmidos se utilizaron cepas bacterianas cultivadas en medios LB con la siguiente fórmula: triptona 1%, cloruro de sodio 1% y extracto de levadura al 0.5% en agua destilada.

Para los medios sólidos se añadió agar al 2% y para seleccionar a las bacterias portadoras del plásmido se agregó carbenicilina a una concentración final de 100 µg /ml.

3.2. Levaduras.

YPD.

Se preparó siguiendo la fórmula de Difco Yeast Base:

Extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2%, dextrosa anhidra al 2% en agua destilada, en el caso de medio sólido se le agregó agar al 2%.

Medio mínimo con amonio.

Se preparó siguiendo la siguiente fórmula de Difco Yeast Base:

Vitaminas 0.1%, trazas 0.1%, sales 2%, glucosa 2% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2% en agua destilada. En el caso de medios sólidos se agregó agar al 2%.

Medio mínimo con asparagina, glutamina o prolina como fuente nitrogenada.

Se preparó con la fórmula anterior pero sin el sulfato de amonio y dependiendo del experimento se agregó asparagina, glutamina o prolina a una concentración final de 1 mg/ml.

Nota: Se agregó leucina al 0.3% y/o uracilo al 0.1% para cubrir los requerimientos auxotróficos de las cepas.

4. CONDICIONES DE CULTIVO.

Todas las cepas, tanto mutantes como silvestres, se cultivaron en un cuarto de cultivo a 30 °C y con una agitación de 250 rpm.

A partir de colonias cultivadas en medios sólidos se inocularon precultivos de medio mínimo (MM) con amonio por asada, después de 12 h de agitación a 250 rpm las células se colectaron por centrifugación y se lavaron 3 veces con agua bidestilada, posteriormente se inocularon los cultivos finales, en el medio deseado, a una absorbancia de 0.05 a 600 nm.

Las células se colectaron cuando el cultivo presentó un crecimiento en fase logarítmica con una absorbancia de 0.5 a 600 nm, posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, y se lavaron los botones celulares con agua bidestilada por tres ocasiones. Finalmente, los botones celulares se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Para el cultivo celular en YPD se prepararon precultivos de 25 ml de medio y cultivos de 50 ml. Los matraces utilizados tenían una capacidad de 100 ml y 250 ml respectivamente, lo cual les asegura a las células el oxígeno necesario para su crecimiento.

Para los cultivos que llevaban amonio, prolina o asparagina, como fuente de nitrógeno, se utilizaron precultivos de medio mínimo con amonio. Tanto para los cultivos como para los precultivos, se utilizaron matraces con capacidad para 250 ml, los cuales contenían 50 ml de medio.

4.1. Tratamientos

Para obtener la privación de aminoácidos en las células:

A partir de un mismo precultivo para cada cepa, se inocularon dos cultivos uno con 3-AT 10 mM y el otro sin el inhibidor de histidina a una densidad óptica inicial de 0.15 a 0.4 (de acuerdo con el tiempo de duplicación de cada una de las cepa estudiadas). Se colectaron todas las células después de 6 h a 0.5 de absorbancia a 600 nm.

Para tratar a las células con rapamicina:

A partir de un precultivo para cada cepa se inocularon, a una absorbancia de 0.05 a 600 nm de densidad óptica, dos cultivos los cuales crecieron hasta presentar

una absorbancia de 0.5, uno de ellos se colectó en el momento, al restante se le agregó rapamicina (Cs1N79NO13) a una concentración final de 200 ng/ml y se recuperaron las células después de 45 min.

5. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pLAL1.

El uso de genes reporteros permite determinar, de manera indirecta y en varias condiciones fisiológicas, los niveles transcripcionales precisos de un gen de interés e identificar elementos en *trans* que modulen su expresión. Por ello, se fusionó el promotor completo de *DAL5* (561 pb), a la secuencia codificante de *lacZ*, presente en el plásmido YEp363, para obtener el plásmido pLAL1. El gen *lacZ* de *E. coli*, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa, es el reportero más utilizado en levadura y en otros sistemas biológicos porque su actividad enzimática puede ser ensayada cuantitativamente en cultivos líquidos.

5.1. Amplificación del promotor *DAL5* por PCR.

Se amplificó el promotor completo de *DAL5* con dos oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de este gen (Rai *et al.*, 1988).

Los oligonucleótidos fueron: F1 "forward" que contiene el sitio *BamHI* que se encuentra dentro de las 15 pb de la región promotora de *DAL5* (5'-CGC GCG GGA TCC CGG CGG ATT-3') y el oligonucleótido R1 "reverse" con el sitio *Sal I* y 19 pb de las cuales 9 corresponden a la región codificante de *DAL5*, y 10 pb de la región promotora (5'-GCG CGC GTC GAC GCT GAC ATC TTG AAT TTT-3').

Con 200 ng de cada uno de estos oligonucleótidos y con 30 ng de DNA total de la cepa CLA *ura leu* como templado, se llevó a cabo una reacción de PCR en el aparato MJ Research con el siguiente programa:

3 min. a 95 °C	
1 min. a 95 °C	} 4 ciclos
1 min. a 52 °C	
2 min. a 72 °C	
1 min. a 95 °C	} 24 ciclos
1 min. a 69 °C	
2 min. a 72 °C	
5 min. a 72 °C	

5.2. Fusión del promotor *DAL5* con el plásmido YEp363.

Tanto el plásmido YEp363 como el producto del-PCR descrito anteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sal I* durante 2 h a 37 °C y se obtuvo una banda de 561 pb del producto de PCR, tamaño que concuerda con la secuencia del promotor de *DAL5*. Finalmente mediante la enzima ligasa (incubación durante una noche a 16 °C) se logró la fusión del promotor *DAL5* en el marco de lectura de *LacZ* presente en el plásmido YEp363, obteniendo el plásmido pLAL1.

6. MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA DE LA CAJA GCN4

Con el fin de obtener una mutación en la caja consenso para Gcn4p (TGACTCT), presente en el promotor *DAL5*, se modificaron dos bases esenciales (resaltadas) para el reconocimiento por parte de la proteína Gcn4p, mediante reacciones de PCR en el aparato MJ Research obteniéndose la secuencia (TG**GG**TTCT). El proceso se esquematiza en la **Figura 1**. Las reacciones de PCR utilizadas fueron: PCR1 con 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos E1 (5'-GCG CGC **GTC GAC** AAA AGT GGT GCT TGA AAT G-3') "forward" con sitio *Sal I* y E2 (5'-GGA CAC TCC AGA ACC AGT CAT AGG CTG-3') "reverse" mutación de la caja GCN4, como templado se utilizaron 30 ng del DNA total de la cepa CLA *ura3 leu2*. El producto del PCR1 fue de 763 pb.

PCR2 con 200ng de cada uno de los oligonucleótidos L1 (5'-CAG CCT ATG ACT GGT T**C**T GGA GTG TCC-3') "forward" mutación de la caja GCN4 y L2 (5'-GCG CGC **GTC GAC** GCT GAC ATC TTG AAT TTT-3) "reverse" con sitio *Sal I* y como templado se utilizaron 30 ng del DNA total de la cepa CLA *ura3 leu2*. Obteniéndose un producto de 532 pb con el siguiente programa:

3 min. a 95 °C
1 min. a 95 °C }
1 min. a 52 °C } 4 ciclos
2 min. a 72 °C }
1 min. a 95 °C }
1 min. a 67 °C } 24 ciclos
2 min. a 72 °C }
5 min. a 72 °C

PCR3 con 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos Y1 (5'-CGC GCG **GGA TCC CGG CGG ATT**-3) "forward" con sitio **Bam HI** y L2 y como templado se utilizaron 30 ng de cada uno de los PCR1 Y PCR2. El producto fue de 583 pb.

Programa:

3 min. a 95 °C

1 min. a 95 °C

1 min. a 55 °C

2 min. a 72 °C

} 30 ciclos

5 min. a 72 °C

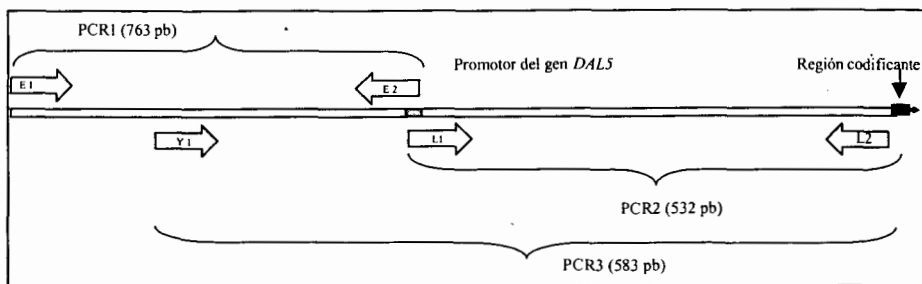


Figura 1. Esquema de la mutagénesis de la caja GCN4. El producto del PCR1 (763 pb) lleva un primer fragmento del promotor *DAL5* y en su extremo una mutación en la caja consenso GCN4. De manera independiente se realizó el PCR2 (532 pb) que lleva el fragmento complementario del promotor *DAL5* y en su extremo la misma mutación de la caja consenso GCN4. Finalmente en el PCR3 (583 pb) se unen ambas regiones, obteniéndose el promotor completo de *DAL5* que lleva la mutación de la caja consenso GCN4, los extremos de este producto presentan sitios de reconocimiento para dos diferentes enzimas de restricción, requeridos para la fusión con el plásmido YEp363. El tamaño del fragmento del PCR3 digerido es de 561 pb. Las flechas indican la dirección de los oligos, la caja gris en el centro señala a la caja consenso GCN4 a mutar, las llaves indican la longitud de cada producto de PCR.

6.1. Secuenciación del promotor mutado.

Se secuenció el promotor *DAL5* mutado en la caja consenso GCN4 (fragmento de 561 pb después de la digestión), con la intención de comprobar que la mutación sitio dirigida había sustituido únicamente las bases deseadas. Para lo cual se utilizó el aparato ABI PRISM Genetic Analyzer y el "Kit" para reacción de lectura de secuencia ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle de Applied Biosystems. Finalmente se llevó a cabo la fusión del promotor mutado en la caja consenso GCN4 con el gen *lacZ* del plásmido YEp363 como se describió previamente para el caso del promotor *DAL5* silvestre, obteniéndose el plásmido pLAL2.

7. ELECTROPORACIÓN.

Todo se hace en esterilidad. Por cada evento de transformación poner:

1 tubo eppendorf de 1.5 ml con 1 ml del "stock" SOC a temperatura ambiente.

1 tubo eppendorf vacío en hielo.

1 celda para electroporación en hielo.

- 1) Sacar del ultracongelador (-80 °C) las células electrocompetentes.
- 2) Ponerlas en hielo y esperar a que se descongelen. Tener cuidado de no dejarlas mucho tiempo a temperatura ambiente pues baja la eficiencia en la transformación.
- 3) Poner 40 μ l de células en cada tubo eppendorf vacío en el hielo.
- 4) Agregar a cada tubo con células 1 μ l de la siguiente dilución: 1 μ l de la reacción de ligación + 9 μ l de H₂O (aproximadamente 10 ng de DNA) y mezclar bien.
- 5) Dejar 5 min en el hielo. Cada transformación debe tener como control, un tubo con células sin DNA.
- 6) Pasar los 40 μ l de células de cada tubo a su correspondiente celda de electroporación.
- 7) Electroporar a: 2.5 volts, 400 Omhs y 500 μ F.
- 8) Recuperar las células enjuagando la celda con 1 ml del "stock" SOC, utilizando una pipeta Pasteur esterilizada.
- 9) Poner las células en el tubo eppendorf que originalmente contenía al SOC.
- 10) Incubar por 1 h a 37 °C.
- 11) Sembrar 100 μ l de la transformación en cajas de LB + carbenicilina a una concentración final de 100 μ g/ml.
- 12) Incubar las cajas aproximadamente por 12 h a 37 °C.

8. OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Todos los plásmidos fueron obtenidos utilizando un "Kit" de purificación de plásmidos Qiagen para maxipreparaciones.

9. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA.

Todas las cepas de levadura fueron transformadas con el plásmido pLAL1 y la cepa silvestre fue transformada a su vez y de manera independiente con el plásmido pLAL2.

Para este protocolo debe contarse con un cultivo en fase exponencial de la cepa a transformar. El volumen del cultivo es de 25 ml de YPD. Todo el protocolo requiere de esterilidad.

- 1) Centrifugar el cultivo de la cepa a transformar a 3,000 rpm por 5 min, recuperar el botón, lavar las células 2 veces con H₂O estéril y centrifugar.
- 2) Eliminar el sobrenadante con puntas de 1 ml y dependiendo de la D.O. del cultivo resuspender las células en 5, 10 o 15 ml de H₂O estéril.
- 3) Poner a hervir el DNA de esperma de salmón durante 5 min y después ponerlo en hielo otros 5 min.
- 4) Poner 500µl de células en tubos eppendorf de 1.5 ml. El número de tubos en los que se reparten las células depende del número de eventos de transformación que se vayan a llevar a cabo.
- 5) Centrifugar dando un pulso a 14,000 rpm y retirar el sobrenadante con la micropipeta.
- 6) Agregar 10µl de DNA carrier (DNA de esperma de salmón).
- 7) Poner el DNA transformante: 1µg y mezclar con vortex.
- 8) Agregar 500µl de "PLATE" (preparado al momento) a cada tubo, mezclar con "vortex" y dejar estático por lo menos 8 h a temperatura ambiente.
- 9) Sembrar de 50 a 100 µl de cada tubo en medio selectivo.

"PLATE": PEG 4000 45%, Acetato de Litio 1M, Tris-HCl 1M pH 7.5 y EDTA 0.5M pH 8.0

10. SELECCIÓN DE CEPAS QUE INCORPORARON EL PLÁSMIDO.

La selección de las cepas que han adquirido el plásmido pLAL1 o el pLAL2 fue posible ya que en la secuencia de este plásmido se encuentra el gen *LEU2*, el cual complementa la auxotrofia de las células por leucina, así las células que han incorporado el plásmido pueden crecer en un medio sin tal aminoácido, mientras que las células que no fueron transformadas no crecerán debido a que carecen del gen *LEU2* y por lo tanto son incapaces de sintetizar leucina.

11. OBTENCIÓN DE MUTANTES EN EL GEN *URE2*.

Para interrumpir al gen *URE2*, en una cepa silvestre y en la cepa *gcn4Δ*, se amplificó mediante PCR el módulo de interrupción *kanMX* (Wach *et al.*, 1994), mismo que se flanqueó en cada uno de sus extremos con un fragmento de la secuencia codificante de *URE2*. Para tal fin, se diseñaron los siguientes dos oligonucleótidos a partir de la secuencia del sitio de clonación múltiple presente en el plásmido pFA6 y en la secuencia nucleotídica del gen *URE2* obtenida de la base de datos del genoma de *Saccharomyces*: S1 "forward", (5'-GTA AAC ATA GGA AAC AGG AAC AGT AAT ACA ACC ACC GAT C **CGT ACG CTG CAG GTC GAC**-3') y S2 "reverse", (5'-GCC AAT TCT ATC CAC GAC ATT ATT CCA TGG GAC AAA GGC C **ATC GAT GAA TTC GAG CTC G**-3') los cuales contienen 40 pb de los extremos terminales 5' y 3' de la secuencia codificante de *URE2*, respectivamente (pb no resaltadas). Ambos oligos presentan a su vez, un sitio de clonación múltiple del plásmido pFA6 (bases resaltadas).

Con 200 ng de cada uno de estos oligonucleótidos y con 10 ng del plásmido pFA6 como templado, se llevó a cabo una reacción de PCR en el aparato MJ Research con el siguiente programa:

3 min. a 95 °C
1 min. a 95 °C
1 min. a 55 °C
2 min. a 72 °C
5 min. a 72 °C

} 30 ciclos

Con lo cual se obtuvo un producto de 1,500 pb, que fue purificado del gel y usado para generar a una cepa *ure2Δ* derivada de la cepa silvestre y a la doble mutante *gcn4Δ ure2Δ* derivada de la cepa *gcn4Δ*. Debido a las secuencias de *URE2*, el fragmento de PCR se integró en el genoma de la levadura por recombinación homóloga interrumpiendo específicamente a la región codificante de *URE2*. El proceso se esquematiza en la **Figura 2**.

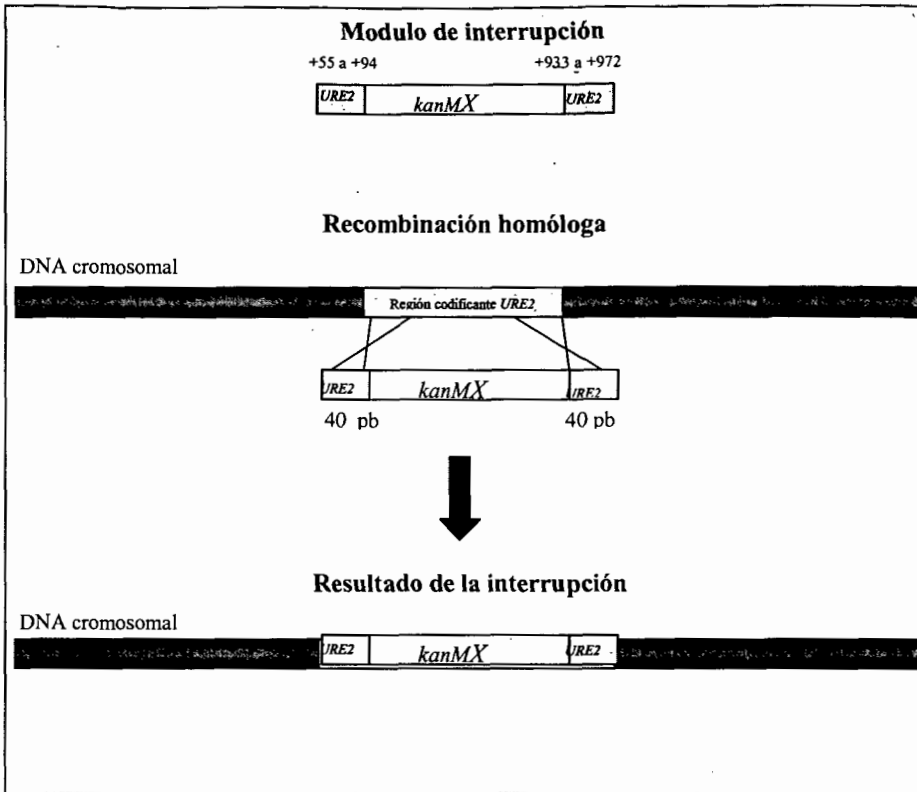


Figura 2. Interrupción de URE2. Esquema del procedimiento por el cual la región codificante de URE2 fue sustituida por el modulo *kanMX*.

11.1. Selección.

Las colonias capaces de crecer en un medio con geneticina fueron resistentes al antibiótico y por lo tanto integraron el modulo *kanMX* en la secuencia de URE2.

12. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Con el fin de comprobar la inserción del modulo *kanMX*, se obtuvo DNA genómico para amplificar a la secuencia codificante de URE2 con el siguiente protocolo:

- 1) Colectar las células del cultivo experimental por centrifugación por 5 min a 3,000 rpm.

- 2) Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 500 μ l de H₂O destilada y estéril.
- 3) Usar tubos de 1.5 ml y coleccionar por centrifugación a 14,000 rpm por 2 min.
- 4) Desechar el sobrenadante y mezclar con "vortex" al botón para resuspenderlo.
- 5) Adicionar: 200 μ l de una solución de: 2% de TRITON X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de Na₂ EDTA. 200 μ l de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y 0.3 g de perlas de vidrio.
- 6) Mezclar con "vortex" (al máximo) por 4 min.
- 7) Adicionar 200 μ l de TE pH 8, (TE: TrisHCl 10 mM y EDTA 1 mM)
- 8) Centrifugar por 5 min.
- 9) Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio, sin tocar las otras dos fases.
- 10) Adicionar 1 ml de etanol al 100% frío y mezclar por inversión 5 o 6 veces.
- 11) Centrifugar por 2 min a 14,000 rpm y desechar el sobrenadante.
- 12) Resuspender el botón en 400 μ l de amortiguador TE y 3 μ l de RNasa A (10 mg/ml).
- 13) Incubar por 5 min a 37 °C.
- 14) Adicionar: 10 μ l de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol al 100% y mezclar por inversión.
- 15) Centrifugar por 2 min a 14,000 rpm y desechar el sobrenadante, dejar secar el botón aproximadamente 30 min.
- 16) Resuspender en 50 μ l de TE o H₂O.
- 17) Ver la concentración de la muestra en un gel de agarosa al 1%

13. COMPROBACIÓN DE LA MUTACIÓN MEDIANTE PRODUCTOS DE PCR.

Una vez que se contaba con el DNA genómico de la cepa silvestre y de las mutantes *ure2Δ* se compró la inserción del modulo *kanMX* mediante reacciones de PCR para amplificar la secuencia codificante de *URE2*, en el aparato MJ Research. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos cuya secuencia se encuentra en la región codificante de *URE2*.

Oligo C1 "forward" (5'-ACG GCA ACC AAG TGT CG-3')

Oligo C2 "reverse" (5'-CCA CGC AAT GCC TTG ATG-3')

En la reacción se utilizaron 200 ng de ambos oligonucleótidos y como templado 30 ng de DNA total de cada cepa con el siguiente programa:

3 min. a 95 °C

1 min. a 95 °C

1 min. a 59 °C

1 min. a 72 °C

} 30 ciclos

5 min. a 72 °C

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa. La cepa silvestre presentó un fragmento con la secuencia codificante de *URE2* (1.02 kb) y las mutantes *ure2Δ* y *ure2Δ gcn4Δ* presentaron el fragmento que lleva la secuencia del modulo *kanMX* (1.45 kb).

14. ROMPIMIENTO CELULAR PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO PROTÉICO

- 1) Descongelar el botón celular de los cultivos colectados.
- 2) Resuspender los botones celulares en 800 µl de amortiguador de extracción pH 7.5 + DTT 1 mM a cada tubo y resuspender con cuidado.
- 3) Transferir a tubos de ensaye con puntas de 1 ml (se trabaja en hielo).
- 4) Agregar perlas frías y cerrar los tubos con parafilm.
- 5) Mezclar con "vortex" al máximo por 1 min y dejar descansar por otro min (4 veces).
- 6) Pasar el extracto a tubos eppendorf de 1 ml mediante pipetas Pasteur previamente recortadas en su extremo.
- 7) Lavar con 400 µl de amortiguador de extracción con vortex por 5 seg y recuperar el extracto.
- 8) Centrifugar 20 min a 4 °C.
- 9) Pasar el sobrenadante a tubos limpios por decantación.
- 10) Guardar los extractos proteicos a -20 °C.

Amortiguador de extracción: Solución de fosfato de potasio 100 mM y EDTA 1 mM.

Solución de fosfato de potasio 100 mM (1 litro): Fosfato de potasio bibásico 174.18 g y fosfato de potasio monobásico 33.2 g.

15. ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

Protocolo modificado (Rose y Botstein, 1983).

- 1) Agregar 900 μ l de amortiguador Z + DTT 1 mM y mezclar con "vortex" cada tubo.
- 2) Agregar amortiguador de extracción + DTT 1 mM. La cantidad de amortiguador de extracción depende del volumen de muestra que se utilice. Si se usa un volumen de 10 μ l de extracto, poner 90 μ l de amortiguador de extracción para que los tubos tengan un volumen final de 1 ml.
- 3) Mezclar con "vortex" a las muestras antes de transferirlas a los tubos, la transferencia de las muestras se lleva a cabo mediante jeringas Hamilton (lavar las jeringas antes y durante la adición del extracto).
- 4) Colocar las soluciones en un baño a 30 °C.
- 5) Iniciar la reacción con 200 μ l de la solución de ONPG (análogo de galactosa) y mezclar con "vortex". Se deja transcurrir la reacción el tiempo necesario para que las muestras adquieran un color amarillo, preferentemente claro.
- 6) Detener la reacción agregando 500 μ l de una solución de Na_2CO_3 1 M y posteriormente mezclar con "vortex".
- 7) Para cada muestra se requieren de tres reacciones detenidas a tiempos distintos. Anotar el tiempo que se llevó en cada una de las tres reacciones.
- 8) Leer la D.O. a 420 nm de las reacciones.
- 9) Con los tres datos de D.O. y los tiempos se hace una regresión lineal. Con la pendiente que se obtiene se realizan los cálculos para obtener la actividad específica de β -galactosidasa.

Notas adicionales:

El blanco debe tener: 900 μ l de amortiguador Z, 100 μ l de amortiguador de extracción, 200 μ l de la solución de ONPG y 500 μ l de Na_2CO_3 1 M.

Preparación de amortiguador Z:

1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0.06 M
2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.04 M
3	KCl	0.01M
4	MgSO_4	0.001M

Ajustar el pH a 7.0 y aforar a 500 ml con H₂O.

Preparación de la solución de ONPG: Sacar el ONPG del congelador y esperar a que tome temperatura ambiente. Por 1 ml de amortiguador Z se agrega 0.004 g de ONPG.

16. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTÉICO DE LOS EXTRACTOS CELULARES .

Protocolo modificado (Lowry *et al.*, 1951).

1) Preparar la curva estándar con albúmina bovina.

Albúmina (µg)	H ₂ O (µl)	ABC (ml)	Folin (µl)	D.O. (625nm)
0.0	1000	5	500	0.0
40	960	5	500	Aprox. 0.1
80	920	5	500	Aprox. 0.2
120	880	5	500	Aprox. 0.3
160	840	5	500	Aprox. 0.4
200	800	5	500	Aprox. 0.5

2) Para cada muestra se preparan tres tubos con cantidades crecientes de extracto más H₂O para obtener un volumen total de 1 ml. Para poner el extracto lo más recomendable es usar las pipetas Hamilton.

3) A cada tubo se le agregan 5 ml de solución ABC (usar la pipeta de repetición), mezclar con "vortex" y se espera 10 min.

Para preparar 100 ml de solución ABC se requieren de 98 ml de solución A, 1 ml de solución B y 1 ml de solución C.

Solución A: NaOH 0.1 N 4 g/l + Na₂CO₃ 20 g/l

Solución B: Tartrato de sodio y potasio al 2% (2 g/100 ml)

Solución C: Sulfato de cobre (cúprico) al 1% (1 g/100 ml).

Las soluciones B y C deben almacenarse a 4°C. La solución C debe guardarse, además en oscuridad.

4) A cada tubo se agregan 500 µl del reactivo folín diluido 1:1 con H₂O (usar la pipeta de repetición). Mezclar con "vortex" y se espera 30 min.

5) Leer la D.O. de cada muestra a 625 nm.

17. ANÁLISIS DE NORTHERN BLOT

Protocolo modificado (Struhl y Davis, 1981).

Obtención de muestras de RNA

Es conveniente trabajar con mechero y guantes. Cuando los cultivos de 100 ml a procesar alcancen la D.O. deseada:

- 1) Recuperar las células centrifugando 5 min. a 3,000 rpm y hacer 2 lavados con H₂O + DEPC fría.
- 2) Resuspender las células en 1 ml de H₂O + DEPC frío.
- 3) Transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml de tapa especial o a tubos eppendorf de 2 ml.
- 4) Centrifugar 2 min a 14,000 rpm y eliminar el sobrenadante con la micropipeta.
- 5) Resuspender células en 470 μ l de amortiguador de lisis: (Acetato de Na 0.1M pH=5 y MgCl₂ 5 mM) y mezclar con la micropipeta. Para preparar 10 ml (suficiente para 20 muestras):

H ₂ O	9,170 μ l
Acetato de Na 3M pH 5	330 μ l
MgCl ₂ 100mM	500 μ l
	<hr/>
Volumen total	10,000 μ l

- 6) Agregar rápidamente 25 μ l de SDS al 20% y 5 μ l de DEPC y mezclar con la micropipeta.
 - 7) Agregar 500 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y mezclar con "vortex" por 1 min. Para preparar 10 muestras
- | | |
|--------------------|--------------|
| Fenol | 7500 μ l |
| Cloroformo | 7200 μ l |
| Alcohol Isoamílico | 300 μ l |
| TOTAL | 15 ml |
- 8) Meter los tubos destapados 2 min a 65 °C y después taparlos, dejarlos 3 min más a 65 °C.
 - 9) Congelar en un baño hielo seco-etanol, aproximadamente 1 min.
 - 10) Centrifugar 8 min a 14,000 rpm.

- 11) Recuperar la fase acuosa, aprox. 600 μ l, y repetir los pasos del 7 al 10, 2 veces más.
- 12) Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo eppendorf de 1.5 ml, al que previamente se le han puesto 5 μ l de $MgCl_2$ 100 mM.
- 13) Extraer una vez con 500 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1) y mezclar con "vortex" por 1 min. Para preparar 5 ml (10 muestras): agregar 4,800 μ l de cloroformo y 200 μ l de isoamílico.
- 14) Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y recuperar la fase superior en un nuevo tubo eppendorf, aproximadamente 400 μ l.
- 15) Agregar 40 μ l de acetato de Na 3 M pH 5, (1/10 del volumen total) y mezclar con micropipeta.
- 16) Agregar 1000 μ l de etanol (2 1/2 volúmenes) de una botella exclusiva para RNA.
- 17) Poner en un baño de hielo seco-etanol hasta congelar (aproximadamente 15 min), posteriormente centrifugar 15 min a 14,000 rpm y decantar el sobrenadante.
- 18) Lavar el botón (sin resuspenderlo) en 500 μ l de etanol al 80% (preparado con H_2O + DEPC).
- 19) Centrifugar 5 min a 14,000 rpm. El botón se desprende del tubo con mucha facilidad, lo mejor es decantar la mayor cantidad de etanol y quitar el sobrenadante con micropipeta y secar el botón al aire.
- 20) Antes de que el botón esté transparente resuspender en 50 μ l de H_2O + DEPC.
- 21) Almacenar a -80 °C.

Electroforesis de RNA en geles con formaldehído

Soluciones requeridas:

- MAE 10X: 0.2 M MOPS, 50 mM acetato de Sodio y 10 mM EDTA. Ajustar el pH a 7 con NaOH 10N. Esterilizar por filtración y guardar refrigerado protegido de la luz.
- Formaldehído: 37% 12.3 M.

- Para preparar 4 ml del tampón de muestra RNA 1.25 X: mezclar 2.2 ml de formamida desionizada, 0.8 ml de formaldehído, 0.5 ml de MAE 10 X, 0.4 ml de glicerol al 80% y 100 µl de azul de bromofenol 2%. bromuro de etidio 1% (10 ml), preparar el tampón en la campana de extracción.
- Para preparar la solución de bromuro de etidio, pesar 100 mg de bromuro de etidio y disolverlo en H₂O + DEPC (usar mascara y guantes).
- SSC 20 X: Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio, ajustar el volumen a 11 ml con H₂O.

Electroforesis

- 1) Limpiar previamente la cámara y el tanque de electroforesis con SDS 1% y enjuagar con H₂O + DEPC.
- 2) Para preparar el gel (11 x 14 cm) mezclar 1 g de agarosa con 84 ml de H₂O bidestilada y 10 ml de MAE 10 X.
- 3) Hervir 30 seg.
- 4) Dejar enfriar a 55 °C y añadir 6 ml de formaldehído (en campana).
- 5) Vaciar al molde y esperar a que gelifique. Utilizar el peine de 10 pozos y 1.5 mm de grosor. El amortiguador de corrida es MAE 1 X y formaldehído 1.1%. Este amortiguador es para el tanque y para preparar un litro mezclar 100 ml de MAE 10 X y 30 ml de formaldehído, aforar con H₂O bidestilada .
- 6) Preparar la muestra mezclar 5-8 µl de RNA con 30-40 µl de Tampón 1.25 X y 2 µl de bromuro de etidio.
- 7) Calentar las muestras a 65 °C durante 15 min. Dar un pulso en la centrifuga y aplicar la muestra en el gel.
- 8) Correr el gel a 60 a 80 volts durante 4 h sin dejar que llegue a salir el colorante azul.
- 9) Ver el gel en el transiluminador y transferirlo si cada una de las muestras tiene dos bandas iguales en intensidad, las cuales corresponden a los RNA ribosomales.

Fotografía del gel.

- 1) Poner una regla fluorescente con el 0 exactamente a la mitad del pozo de carga.
- 2) Tomar la fotografía polaroid con apertura del diafragma 8 y a velocidad 1.

Transferencia de geles de RNA

Tratamiento del gel previo a la transferencia: .Para eliminar el exceso de formaldehído del gel: hacer dos lavados de 20 min cada uno con 250 ml de SSC 10 X en el agitador.

Transferencia tradicional por capilaridad. (Modificado de Thomas; 1980).

- 1) Cortar un papel filtro 3 MM de 35 X 14 cm y dos de 12 X 14 cm.
- 2) Cortar un papel Hybond-Nylon de 12 X14 cm.
- 3) Poner un vidrio apoyado en los bordes de un recipiente Pyrex.
- 4) Vertir en un recipiente Pyrex aproximadamente 400 ml de SCC 10X.
- 5) Usar guantes. Colocar encima del vidrio el papel filtro grande, previamente humedecido en SCC 10 X, de manera que las orillas queden sumergidas en el SCC 10 X a ambos lados del vidrio.
- 6) Colocar el gel encima del papel filtro, eliminando cualquier burbuja atrapada entre el papel filtro y el gel.
- 7) Poner tiras de parafilm encima de los bordes del gel, para evitar que el SCC sea absorbido por el papel sin pasar por el gel.
- 8) Humedecer la membrana de Hybond con H₂O destilada y después sumergirla en SCC 10 X durante 5 min.
- 9) Colocar la membrana encima del gel, eliminar las burbujas.
- 10) Poner encima del gel los dos papeles filtro de 12 X 14 cm, humedecidos con SCC 10 X.
- 11) Formar sobre el gel y el papel filtro, una pila con 7-10 cm de papel y un libro de aproximadamente 1 Kg. (poner un vidrio debajo del libro para que no se humedezca). Dejar transfiriendo por 8-16 h.
- 12) Después de la transferencia quitar todo el peso y el papel, marcar los pozos con un lápiz.

Fijación del filtro.

- 1) Lavar el filtro nylon con SCC 1 X durante 30 seg para quitar los restos de agarosa adheridos y cristales de sal. Agitar suavemente.
- 2) Prender el Stratalinker (botón POWER) y colocar el filtro dentro del aparato
- 3) Oprimir AUTOCROSSLINKER y comenzar con START.
- 4) A los 30 seg suena la alarma. Oprimir RESET. Sacar el filtro.

Hibridización de RNA

- 1) Sobre el transiluminador, marcar con un lápiz los extremos de la membrana que sobran, para recortarlos posteriormente. Buscar el mínimo tamaño de Hybond que contenga todas las muestras.
- 2) Meter la membrana a la bolsa de hibridización y sellarla, dejándola del tamaño más pequeño posible.
- 3) Con una jeringa introducir la solución de prehibridización por una de las orillas de la bolsa. Quitar las burbujas antes de volver a sellar la bolsa. Para 10 ml de solución de prehibridización: 7 ml de SDS 10%, 3 ml de Fosfato de Sodio Monobásico 1 M pH 7.2 y 10 μ l de EDTA 0.5 M.

Si la membrana es pequeña usar solamente 5 ml, si la membrana es grande o se requiere hibridizar 2 membranas juntas, poner los 10 ml de la solución.

- 4) Prehibridizar incubando 1 h a 65 °C.
- 5) Marcar radiactivamente la sonda, hervirla 10 min, colocarla en el hielo de 3 a 15 min y agregarla a la bolsa por un extremo, usando un tip. Sacar las burbujas y secar perfectamente.
- 6) Hibridizar durante 18 h a 65 °C. Si la sonda es heteróloga hibridizar a 45 °C.

Marcaje radioactivo de la sonda.

Las sondas utilizadas en este trabajo fueron fragmentos de DNA obtenidos por PCR y marcados con [α -³²P]CTP.

- 1) Obtener la sonda de DNA por GeneClean.
- 2) Cuantificar la concentración de la sonda en un gel de agarosa.
- 3) Marcar la sonda con el Kit de Random Primer (Stratagene).

Hervir durante 10 min: 50 ng de la sonda, 10 μ l de la mezcla primer y x μ l de agua destilada y estéril para obtener un volumen final de 34 μ l.

- 4) Enfriar a temperatura ambiente por 10 min y dar un pulso en la centrifuga.
- 5) Agregar 10 μ l de Buffer CTP descongelado y mezclar.
- 6) Agregar 5 μ l de la marca de [α -³²P]CTP. Mezclar bien (trabajar con la mampara).
- 7) Agregar 1 μ l de la enzima Klenow. Incubar a 37 °C durante 10 min.
- 8) Parar la reacción con 2 μ l de la mezcla STOP.

Continuación de la purificación de la sonda radioactiva.

- 7) Preparar una columna de Sephadex G25. Previamente la resina se hidrata en agua destilada durante toda la noche.
- 8) A una jeringa de 1 ml de insulina se le pone fibra de vidrio o un disco de material poroso que no permita que la resina se salga y se llena hasta arriba evitando que queden burbujas.
- 9) Centrifugar la columna 4 min a 1800 rpm en un tubo falcon de plástico.
- 10) Pasar la columna a otro tubo falcon al cual se le ha colocado un tubo eppendorf de 1.5 ml sin tapa.
- 11) Diluir 1:2 con agua la reacción de la sonda radioactiva, se le agregan 50 μ l de agua, se mezcla y se aplica a la columna de Sephadex. Centrifugar 4 min a 1,800 rpm.
- 12) Con unas pinzas sacar el tubo eppendorf (donde se recupera la sonda radioactiva). Al tubo ponerle su tapa de nuevo de tal modo que queda listo para hervirlo y usar la sonda en la hibridización.

Lavado del filtro.

- 1) Hacer cuatro lavados, dos de baja astringencia y 2 de alta astringencia a 65 °C si la sonda es homóloga y a 45 °C si la sonda es heteróloga.
- 2) Hacer un primer lavado de baja astringencia con una solución de SSC 2 X + SDS 0.1 X

Para 500 ml de esta solución: Tomar 50 ml del "stock" SSC 20 X y 5 ml del stock SDS 10 X y aforar con H₂O bidestilada.

- 3) Calentar esta solución a 65 °C y hacer un primer lavado de 5 min con 200 ml.
- 4) Hacer un segundo lavado de 30 min con los 300 ml restantes Este lavado se hace en un recipiente de plástico pequeño para meterlo en el horno de 65 °C.
- 5) Para el tercer lavado se prepara una solución de alta astringencia: SSC 0.15 X + SDS 0.1 X .

Para 500 ml de esta solución: Tomar 3.75 ml de "stock" SSC 20 X y 5 ml del stock SDS 10 X y aforar con H₂O bidestilada.

- 6) Calentar la solución y lavar con 200 ml durante 5 min.
- 7) Hacer el cuarto lavado con 300 ml durante 30 min en el horno.
- 8) Escurrir el filtro y colocarlo mojado en un cassette de autorradiografía.

- 9) Al cassette se le debe de poner papel plástico como Kleen Pack para proteger las pantallas.
- 10) Medir la actividad con el contador Geiger y decidir cuánto tiempo se va a exponer.
- 11) Poner un film Kodak BioMax y meter el cassette al ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 12) Revelar el film.

Exposición del filtro.

En el equipo Storm 840 es mucho más rápida la detección de la señal radioactiva, por lo tanto, es recomendable usarlo cuando se percibe una mínima señal con el contador Geiger. Su sensibilidad es aproximadamente diez veces mayor que la autorradiografía convencional.

- 1) Colocar el filtro en el cassette del Storm 840, anotando las coordenadas de su ubicación.
- 2) Dejar caer la pantalla y no moverla por un lapso de 2 a 24 h, dependiendo de la intensidad de la pantalla que registre el Geiger.
- 3) Meter la pantalla al equipo y realizar la cuantificación y el análisis de la señal mediante el software ImageQuant (Molecular Dynamics).

Reutilización de los filtros de nylon.

La reutilización de los filtros es necesaria para hibridar posteriormente con otras sondas de interés y con una que funcione como control interno. En todos los casos se utilizó para este fin la sonda de actina, ya que es un gen constitutivo que no es regulado por el sistema estudiado. Los filtros se pueden reutilizar tres veces.

- 1) El filtro no se debe dejar secar jamás y antes de volver a utilizarlo debe de lavarse en una solución hirviendo de 250 ml de SDS al 0.1%, dos veces.
- 2) Se verifica que la señal radioactiva haya desaparecido por estimación con el Geiger.
- 3) Se guarda el filtro en plástico autoadherible a -80 grados centígrados.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Identificación de elementos en *cis* que pudieran ser reconocidos por Gcn4p.

Para estudiar la posibilidad de que Gcn4p se uniera directamente al promotor de *DAL5*, se analizó la secuencia de este gen anteriormente reportada (Rai *et al.*, 1988) y se encontró, una caja consenso para Gcn4p y ocho secuencias que difieren de la primera por solo un par de bases (**Figura 3**). Así mismo, se señalan las cajas GATAA para *DAL5* reconocidas previamente (Daugherty *et al.*, 1993; Cooper, 2002).

2. Funcionalidad de la caja consenso GCN4 presente en el promotor de *DAL5*.

Existe la posibilidad de que la regulación positiva que ejerce Gcn4p sobre la expresión de *DAL5* (Valenzuela *et al.*, 2001) esté mediada por la presencia de una caja consenso para Gcn4p en el promotor de *DAL5*, la cual representa la secuencia de mayor afinidad al activador (Hinnebusch y Fink, 1983; Tavernarakis y Thireos, 1997); sin embargo, fue necesario determinar si esta caja era funcional. Para ello se llevaron a cabo dos construcciones, una con el promotor silvestre (pLAL1) y la segunda con el promotor mutado en la caja para Gcn4p (pLAL2) Ambos promotores se encuentran fusionados al gen *lacZ*, lo que permitió medir la expresión de *DAL5* a partir de células cultivadas en medio rico.

Como se puede apreciar en la **Figura 4**, el ensayo por β -galactosidasa muestra una baja expresión en las dos fusiones, lo cual evidencia que la expresión y actividad de la permeasa de alantoato (*DAL5*) no se detecta en medio rico (Rai *et al.*, 1987), de tal manera que los valores resultan insuficientes para llevar a cabo cualquier interpretación. Para determinar el valor fisiológico de la caja consenso GCN4 en la expresión del gen *DAL5* fue necesario dar un tratamiento con rapamicina para activar al gen.

Si se comparan los valores de expresión del promotor silvestre contra el promotor que lleva la mutación en la caja para Gcn4p (**Figura 4**), encontramos que son similares entre sí, con o sin rapamicina, lo cual indica que la caja consenso para Gcn4p no es funcional.

A

```

ATCCATGGTGGATCCCGCGGATTTTCTTTCTATTGCACCTTAATCAG
-570-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGTACCACCTAGGGCCGCCTAAAAGAAAGATAACGTGGAATTAGTC

GTTTACAGCCTATGACTGACTCTGGAGTGCTCCTTTCCCGATATCGATTG
-520-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAAATGTCGGATACTGACTGAGACCTCACAGGAAAGGGTCATAGACTAAC

TTTCCGCAACATCTATGCATATCAGAGAAGCGTTCTCATCAGTCACTTGA
-470-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAGGCGTTGTAGATACGTATAGTCTCTTCGCAAGAGTAGTCAGTGAECT

CAAATGCTCGAGGAGCTATCATTGCTGATAAGGTGTACAGCGCGCTCC
-420-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTTACGAGCTCCTCGATTGTAACGACTATTCCACGATGTCGCGCGGAGG

TGCCGCACGCTTTGTTCCCTTTTCGATAAGAGTCCCTCGCGTTAGTCTGAG
-370-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACGGCGTGCGAACAAGGAAAAGCTATTCTCAGGGAGCGCAATCAGACTC

TGAAGTGGCGAATTCAGCAACGAATAACAATCGACCTTATGATCATGTG
-320-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTCACGCCTTAAGTCGTTTGCTTATTGTTAGCTGGAATACTAGTACAC

GATTATCGGGGCAAAGATTGGCCAAGATGTCAGAGAAGCTTATCACCA
-270-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAATAGCCCGCTTTTCTAACCGGTTCTACAGTCTCTTGAATAGTGGT

ATCACTCACACAATTAAAGTGGTAGTGAACFCCGAAGATACGGCTAATAC
-220-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTGAGTGTTAATTCACCATCACATTGAGGCTCTATGCCGATTATG

TTATCATTATCTGGTTTTCGGAATACAGATGGATGAAGTAATATATG
-170-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATAGTAATAGACCAAAGGCTTATATGCTAACCTACTTCATTATATAC

TATATAATGGACCAAGGAACATCAAATTAGGAGATCATGAGGGAAGG
-120-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATATATTTACCTGGTCCCTTTGTAGTTTARTCCCTAGTACTCCCTTCC

TTTAAACATAACAACATGAAGAAAACAACAACAAGGATAATCAAATAG
-70-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATTGTATTGTTGTAACCTCTTTTGTGTTTGTTCCTATTAGTTTATC

          TGTAAAAAATTCAGGCTG
          -20-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
          ACATTTTTTTTTTAAGTCTAC
  
```

B

-570 PROMOTOR *DAL5*

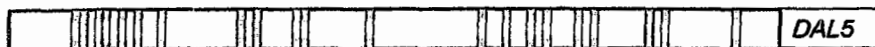


Figura 3. Análisis del promotor de *DAL5*. (A) Secuencia y (B) diagrama del promotor de *DAL5* de la posición -1 a la posición -570, se muestra el codón de inicio de la traducción (ATG).

- Caja GCN4 consenso
 secuencias similares a la caja GCN
 GATAAG funcionales
 GATAAG no funcionales
 secuencia TATAAA
 secuencia codificante

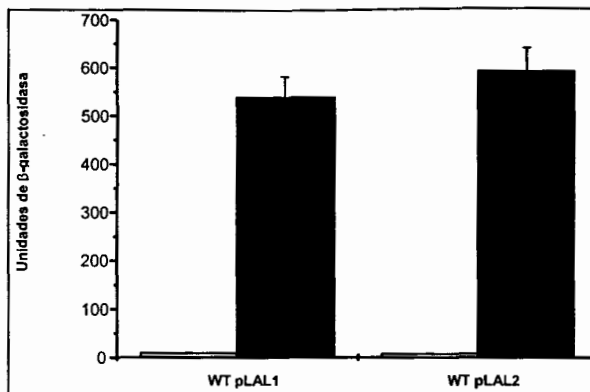


Figura 4. Funcionalidad de la caja GCN4 consenso en medio rico. La actividad específica de β -galactosidasa esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT pLAL1 (CLA *ura3*/pLAL1, promotor silvestre) y WT pLAL2 (CLA *ura3*/pLAL2, promotor con la mutación en la caja consenso para Gcn4p) fueron cultivadas en medio rico, sin rapamicina (barras grises) y tratadas con rapamicina durante 45 minutos (barras negras). Las cepas fueron colectadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

Ante la posibilidad de que fuera determinante una alta concentración de Gcn4p para que la secuencia consenso para Gcn4p (TGACTC) fuera reconocida por el activador, se midió la expresión del promotor silvestre y del mutado en la caja para Gcn4p a partir de células cultivadas en medio mínimo y tratadas con el análogo competitivo, 3-amino-1,2,4-triazol (3A-T), el cual inhibe la biosíntesis de histidina, causando una privación por este aminoácido, la levadura responde a tal alteración a través del control general de aminoácidos (GCN) aumentando las cantidades de Gcn4p en núcleo y logrando que los genes de la biosíntesis de aminoácidos se induzcan. Sin embargo, los datos obtenidos para las dos construcciones (pLAL1 y pLAL2) en medio mínimo con o sin 3-AT son semejantes entre si, una vez más (Figura 5), por lo que no existe efecto en la expresión de *DAL5* al mutar la caja consenso para Gcn4p en ninguna de las condiciones estudiadas.

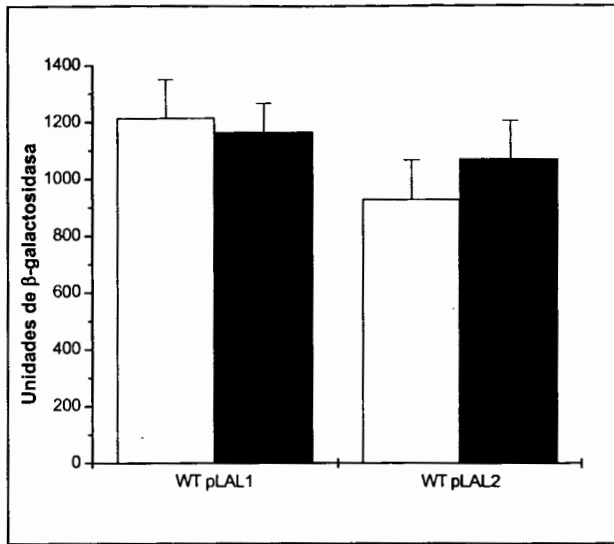


Figura 5. Funcionalidad de la caja GCN4 consenso en privación de aminoácidos. La actividad específica de β -galactosidasa esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT pLAL1 (CLA *ura3*/pLAL1, promotor silvestre) y WT pLAL2 (CLA *ura3*/pLAL2, promotor con la mutación en la caja consenso para Gcn4p) fueron cultivadas en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno, sin 3-AT (barras blancas) y tratadas con 3-AT (barras negras). Las cepas fueron colectadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

Si bien es cierto, que estos resultados indican que la inducción de *DAL5* es independiente de la única caja consenso para Gcn4p presente en el promotor, esta evidencia no es suficiente para descartar la posibilidad de un efecto directo de Gcn4p. Queda por establecer si las ocho secuencias similares a la caja consenso son funcionales, ya que existen zonas de control transcripcional en los promotores de los genes *ILV2*, *HIS4* y *HIS3*, que aún cuando varían levemente de la caja consenso, son capaces de responder en alguna medida a este factor transcripcional (Hinnebusch, 1992; Natarajan *et al.*, 2001). Para estudiar esta posibilidad, se requiere de mutaciones sitio dirigidas en cada una de estas 8 secuencias o llevar a cabo experimentos de footprinting *in vivo* sobre el promotor.

Debido a que el efecto directo ya se estudió de manera parcial al mutar la caja consenso para Gcn4p y a que los resultados no apoyan esta posibilidad, decidimos estudiar si el efecto de Gcn4p sobre *DAL5* responde a un efecto indirecto.

3. El papel de Gcn4p en la expresión de los genes *URE2* y *GLN3*.

Debido a que algunos factores transcripcionales, como Gln3p y Ure2p implicados en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno, son regulados por Gcn4p en una condición de privación de nitrógeno (Natarajan *et al.*, 2001), resulta factible que la expresión de una o más de las enzimas que modifican la transcripción de *DAL5* fueran susceptibles a Gcn4p en condiciones basales.

Por los datos que sugieren una conexión entre la acción activadora de Gcn4p y Gln3p en la expresión de *DAL5* (Valenzuela *et al.*, 2001), y con el conocimiento de que Gln3p es el principal activador en la expresión de *DAL5*, decidimos estudiar si Gcn4p inducía al gen *GLN3* y con ello resultara modificada la transcripción de *DAL5*.

Por otro lado, la acción inductora de Gln3p es antagonizada en el citoplasma por la proteína Ure2p, así Gcn4p a niveles basales podría reprimir la expresión del gen *URE2*, lo cual explicaría la disminución de la expresión de *DAL5* en una mutante *gcn4Δ* (Valenzuela *et al.*, 2001).

Para verificar la hipótesis de que el incremento en la expresión de *DAL5* por parte de Gcn4p obedeciera a un aumento en la expresión de *GLN3* y/o a una disminución en la transcripción de *URE2*, se llevó a cabo un análisis tipo Northern de extractos obtenidos a partir de una cepa *gcn4Δ* y de una silvestre, ambas cultivadas en una fuente nitrogenada represora (asparagina) y en una activadora (prolina). Estas fuentes nitrogenadas se utilizaron ya que son determinantes para la expresión de *DAL5* y del resto de los genes sensibles a NCR y para el funcionamiento de *URE2* y *GLN3* dentro de la vía del nitrógeno (Hofman-Bang, 1999). Los extractos obtenidos fueron hibridados con las sondas *GLN3* y *URE2* (**Figura 6**). Gracias al control de actina, cuya expresión es constitutiva en la célula, es posible valorar si existe una modificación en la transcripción de los genes estudiados. Estos resultados indican que las cantidades de RNAm de los genes *URE2* y *GLN3* se encuentran en igual cantidad en ambas cepas, lo que pone de manifiesto que a diferencia de lo que sucede bajo condiciones de privación de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001), Gcn4p, en concentraciones basales, no tiene efecto sobre la expresión de ninguno de estos dos genes, por lo que la activación de *DAL5* por Gcn4p obedece a una vía distinta.

Una posibilidad mas que podría explicar la acción inductora de Gcn4p en la expresión de *DAL5* sería que este regulador estuviera afectando la interacción citoplásmica entre Ure2p y Gln3p. Para verificar lo anterior y establecer si Gcn4p actúa en la misma vía que Ure2p, se obtuvieron mutantes en el gen *URE2*.

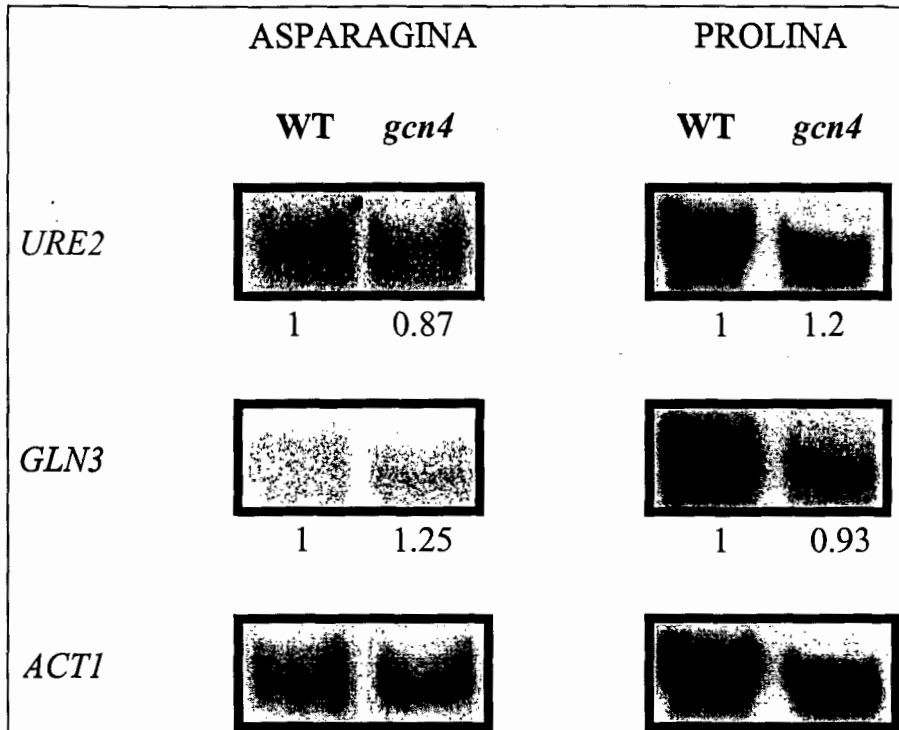


Figura 6. Efecto de Gcn4p en la transcripción de *URE2* y *GLN3*. Análisis de Northern blot a partir de RNA total de las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*) y *gcn4* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), cultivadas en medio mínimo con asparagina y prolina como fuentes de nitrógeno. Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Las muestras de RNA fueron separadas por electroforesis en un gel desnaturalizante al 1% y transferidos a un filtro Hybond-N. Los filtros fueron hibridados con el fragmento de PCR de 1.5-kb de la sonda *ACT1* y las sondas de 1-kb de los genes *URE2* y *GLN3*. Todas las sondas fueron marcadas con (α - 32 P)CTP. Los números indican los valores cuantitativos del RNAm para cada gen después de normalizar con actina.

4. Efecto de los principales reguladores de *DAL5* en medio rico.

Se sabe que la regulación de *DAL5* por Gln3p, Ure2p y Gcn4p ocurre a nivel transcripcional. Para comprender cómo actúan estos reguladores y con qué intensidad modulan la expresión de *DAL5*, se transformaron a las mutantes *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gln3Δ gcn4Δ* y *ure2Δ gcn4Δ* con el plásmido pLAL1 y se midió la

expresión de este gen por medio de un ensayo de β -galactosidasa. Los extractos fueron obtenidos de células cultivadas en medio rico.

Los resultados de dicho experimento se presentan en la **Figura 7**. En medio rico la expresión de *DAL5* se encuentra reprimida. Es posible lograr una inducción adicionando rapamicina al medio de cultivo, esta droga elimina el efecto represor de la vía TOR y con ello la expresión de *DAL5* en la cepa silvestre aumenta notoriamente.

En la mutante *gln3 Δ* el aumento en la expresión de *DAL5* no se puede llevar a cabo, lo cual concuerda con el conocimiento de que Gln3p es el principal activador de este gen.

Cuando se analiza la expresión de *DAL5* en una cepa *gcn4 Δ* , el incremento que se observa con el tratamiento con rapamicina es de alrededor de la mitad de la expresión que se alcanza en la cepa silvestre. Lo cual hace evidente que Gcn4p es indispensable para lograr la inducción óptima de *DAL5* en esta condición.

De manera similar a los datos de la cepa *gln3 Δ* , la doble mutante *gln3 Δ gcn4 Δ* presenta una baja expresión de *DAL5* aún con el tratamiento con rapamicina pues ambas carecen del activador principal. Estos datos indican que para que Gcn4p sea capaz de regular positivamente la transcripción de *DAL5* es necesaria la presencia de Gln3p.

Los resultados de β -galactosidasa presentados anteriormente, muestran la misma tendencia que los datos obtenidos previamente por un ensayo tipo Northern (Valenzuela *et al.*, 2001).

Con el fin de entender la manera en que los principales reguladores transcripcionales conocidos para *DAL5* se encuentran interactuando, así como también, estimar el papel de cada uno de ellos, se obtuvieron mutantes en el gen *URE2* y con ello poder estudiar si Gcn4p participa dentro de la vía TOR.

Como se aprecia en la **Figura 7**, en la condición de medio rico la expresión de *DAL5* en la mutante *ure2 Δ* es superior a la cepa silvestre ya que se impide que Gln3p se encuentre retenido en el citoplasma por el complejo que se forma entre Ure2 y Gln3p. Al agregar rapamicina al medio, la cepa *ure2 Δ* aumenta su expresión debido a que esta droga elimina la fosforilación de Gln3p y propicia su

translocación al núcleo. Esta inducción en la expresión es semejante a la que presenta la cepa silvestre con rapamicina, ya que Gln3p estaría localizado en el núcleo en ambos casos.

Al observar que con rapamicina la expresión de la mutante *ure2Δ* es semejante a la que presenta la cepa silvestre y dado que la mutante *gcn4Δ* muestra una expresión menor a la obtenida en la cepas silvestre, resulta inesperado que la doble mutante *ure2Δ gcn4Δ* presente la máxima expresión de *DAL5* superando notablemente al resto de las cepas, observada en la mutante sencilla *ure2Δ*. Esto sugiere que Gcn4p presenta también un efecto negativo en la expresión de *DAL5* independientemente de la represión debida a Ure2p ya que la carencia de ambas proteínas tiene un efecto activador aditivo en la expresión de *DAL5*.

Estos resultados nos permiten observar que Gcn4p presenta un efecto ambivalente en su función (**Figura 7**) ya que puede actuar como activador en medio rico mas rapamicina y en la misma condición tener un efecto negativo que sólo se observa en una doble mutante *ure2Δ gcn4Δ*. Es necesaria una revisión exhaustiva y fina del proceso por el cual Gcn4p lleva a cabo su función para determinar la causa de este comportamiento diferencial.

Al observar en la condición con rapamicina una inducción de *DAL5* en la cepa *ure2Δ gcn4Δ* y al comparar la transcripción de *DAL5* de la cepa silvestre con la alta inducción de la mutante *ure2Δ gcn4Δ*, es posible determinar que Gcn4p, Ure2p y la cascada TOR antagonizan la acción activadora de Gln3p por tres mecanismos distintos y no excluyentes entre sí.

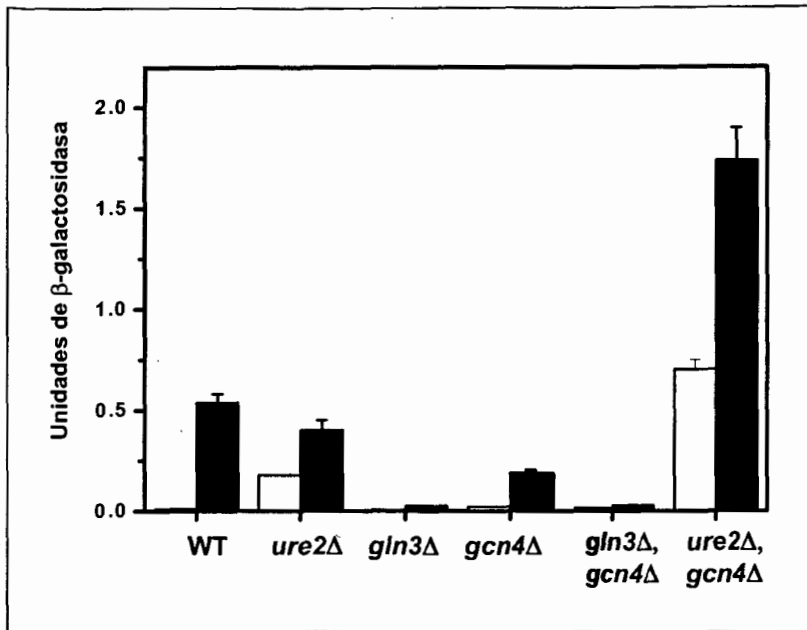


Figura 7. Regulación de *DAL5* en medio rico. La actividad enzimática está reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2Δ* (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *gln3Δ* (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4Δ* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3Δ gcn4Δ* (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*) y *ure2Δ gcn4Δ* (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*) fueron cultivadas en medio rico sin rapamicina (barras blancas) y con el tratamiento con rapamicina durante 45 minutos (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

5. Efecto de distintas fuentes de nitrógeno en la transcripción de *DAL5*.

S. cerevisiae puede utilizar diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, para que sean asimilados se requiere de la presencia de diversas permeasas y enzimas catabólicas, las cuales están sujetas a la represión catabólica nitrogenada.

La represión catabólica nitrogenada actúa en fuentes ricas de nitrógeno previniendo la expresión transcripcional de los genes involucrados en el catabolismo nitrogenado, en tanto que la falta de fuentes nitrogenadas de buena calidad, desencadena la producción de enzimas y permeasas capaces de asimilar fuentes nitrogenadas secundarias.

Para determinar el efecto de Gcn4p en relación con las distintas fuentes de nitrógeno y conocer si Gcn4p participa en el mecanismo de NCR, exploramos el efecto que produce la mutante *gcn4Δ* sobre la expresión de *DAL5* en presencia de

distintos aminoácidos como única fuente nitrogenada, iniciando con las fuentes ricas de nitrógeno y continuando en orden decreciente hasta llegar a la fuente de nitrógeno considerada como la más pobre.

5.1. Las fuentes represoras.

La glutamina y la asparagina son excelentes fuentes de nitrógeno ya que son los aminoácidos que permiten el crecimiento celular más rápido y ocasionan una fuerte NCR.

La asparagina puede ser degradada fácilmente hasta amonio y glutamato por lo que es el aminoácido más utilizado como fuente represora en el estudio del metabolismo del nitrógeno. Por su parte, la glutamina es un excelente donador de glutamato lo cual les permite a las células un crecimiento óptimo. Debido a que su concentración determina la utilización del nitrógeno del medio y la velocidad de síntesis y degradación del nitrógeno celular, se ha propuesto como el correpresor del catabolismo nitrogenado (Hofman-Bang, 1999).

Como se podría esperar en estas dos condiciones, la expresión de *DAL5* se encuentra fuertemente reprimida ya que es sensible a NCR (**Figuras 8 y 9**).

Nuevamente el efecto de la falta de Gcn4p resulta determinante en la transcripción de *DAL5*. Sin embargo, se encontró un contraste en el efecto activador por parte de Gcn4p reportado en YPD más rapamicina, pues en asparagina y glutamina, al comparar a la cepa silvestre con la mutante *gcn4Δ*, en esta última cepa se observa una expresión más alta, sugiriendo que Gcn4p presenta un efecto negativo en la transcripción de *DAL5*. Al comparar la inducción de *DAL5* en la mutante sencilla *gcn4Δ* con la expresión casi nula registrada en la cepa *gln3Δ gcn4Δ*, resulta evidente, al igual que en la condición con medio rico, que Gcn4p requiere de la presencia de Gln3p para regular la transcripción de *DAL5*.

En estas fuentes represoras al igual que en medio rico, la mutación del gen *URE2* reveló un aumento significativo en la expresión de *DAL5* con respecto a la cepa silvestre. La doble mutante *ure2Δ gcn4Δ*, mostró una desrepresión de *DAL5* superior al efecto sumatorio de ambas mutaciones individuales.

Para determinar el efecto de la rapamicina en una fuente rica de nitrógeno se agregó esta droga únicamente a la condición de asparagina (**Figura 8**), con lo cual la expresión de *DAL5* aumentó en todas las cepas que presentan el gen *GLN3* este incremento fue el máximo una vez mas en la doble mutante *gcn4Δ ure2Δ*. En asparagina con rapamicina la cepa *gcn4Δ* presenta un aumento en la expresión de *DAL5* en comparación con la cepa silvestre, de esta manera sólo se aprecia el efecto negativo de Gcn4p sobre el promotor.

Resulta interesante que la expresión de *DAL5* en la condición con glutamina (**Figura 9**) se encuentre reprimida en mayor medida por la acción de Gcn4p, lo cual concuerda con el hecho de que en esta fuente represora en particular, Ure2p no sea responsable de la represión de *DAL5* y contribuye a identificar al mecanismo principal que reprime su expresión (Cooper, 2002).

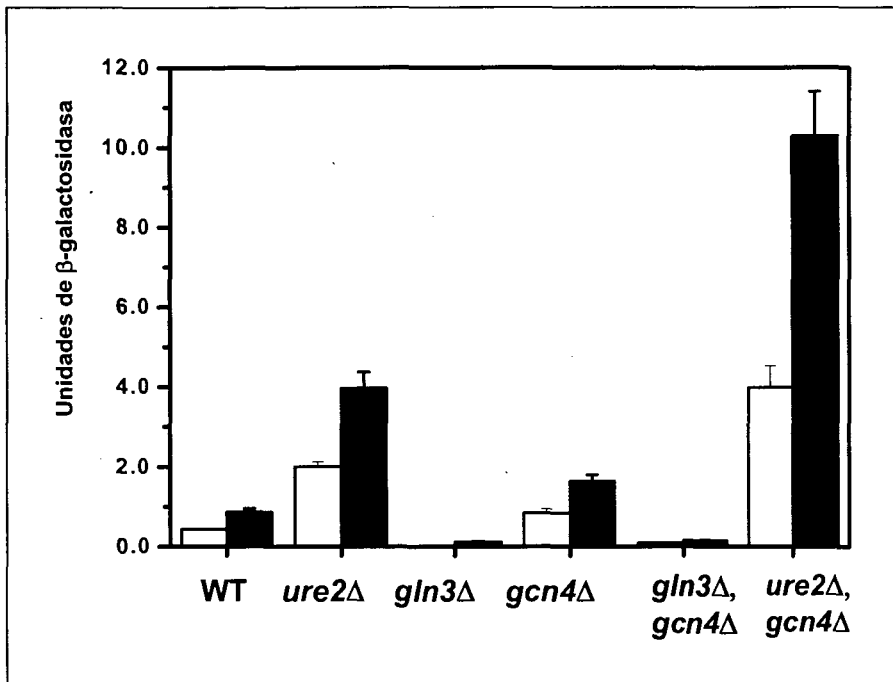


Figura 8. Regulación de *DAL5* en asparagina. La actividad enzimática esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2Δ* (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *gln3Δ* (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4Δ* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3Δ gcn4Δ* (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*) y *ure2Δ gcn4Δ* (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*) fueron cultivadas en medio mínimo con asparagina como fuente de nitrógeno, sin rapamicina (barras blancas) y con el tratamiento con rapamicina durante 45 minutos (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β-galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

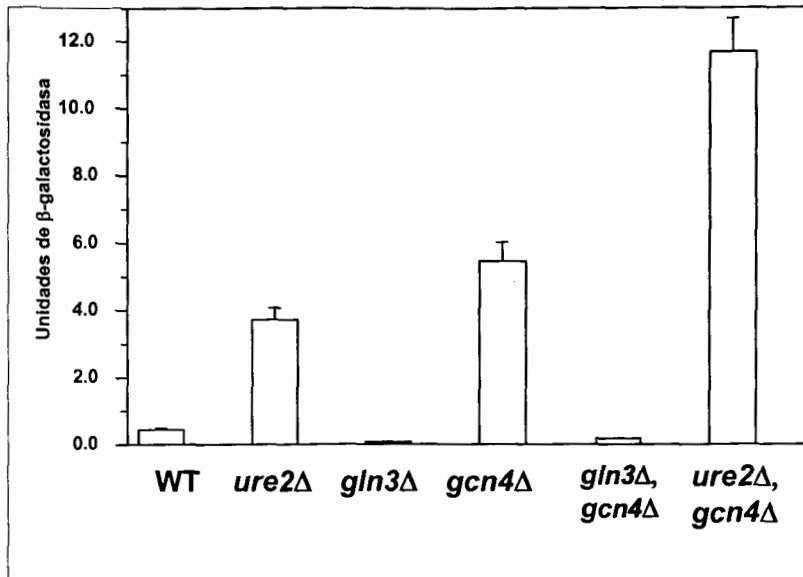


Figura 9. Regulación de *DAL5* en glutamina. La actividad enzimática esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2* Δ (CLA *ure2* Δ /*pLAL1*), *gln3* Δ (CLA *gln3* Δ /*pLAL1*), *gcn4* Δ (CLA *gcn4* Δ /*pLAL1*), *gln3* Δ *gcn4* Δ (CLA *gln3* Δ *gcn4* Δ /*pLAL1*) y *ure2* Δ *gcn4* Δ (CLA *ure2* Δ *gcn4* Δ /*pLAL1*) fueron cultivadas en medio mínimo con glutamina como fuente de nitrógeno. Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

5.2. Amonio.

Una vez con estos resultados el siguiente paso fue determinar el comportamiento de *DAL5* en la condición con amonio. Como muchos otros microorganismos, *S. cerevisiae* puede utilizar amonio como única fuente de nitrógeno ya que es catabolizado hasta glutamato y glutamina y a partir de estos intermediarios pueden ser sintetizados los constituyentes celulares que contienen nitrógeno.

Los resultados en la **Figura 10** revelan un incremento de tres veces en la expresión basal de las cepas crecidas en amonio con respecto a la expresión registrada en asparagina y glutamina (**Figuras 8 y 9**), ya que el amonio constituye una fuente menos represora y en la cual las células crecen ligeramente mas lento.

La transcripción de *DAL5* sigue un patrón similar al observado en el resto de las fuentes represoras; sin embargo, en amonio Gcn4p presenta una represión similar a la ejercida por Ure2p (**Figura 10**). En la cepa *ure2* Δ *gcn4* Δ , el efecto sumatorio de las dos mutaciones ocasiona la máxima expresión de *DAL5*

alcanzada hasta el momento. En la doble mutante *ure2Δ gcn4Δ*, la rapamicina no aumenta la expresión. Lo que sugiere que el mecanismo de desrepresión de *DAL5* por el cual actúa la rapamicina es equivalente al efecto que producen las dos mutaciones en *URE2* y *GCN4*. Así, el papel relativo de Ure2p, de la rapamicina y de Gcn4p no son equiparables entre sí y la intensidad con la que regulan a *DAL5*, depende finamente de la fuente de nitrógeno utilizada, lo cual ya había sido observado y discutido con anterioridad (Cooper, 2002).

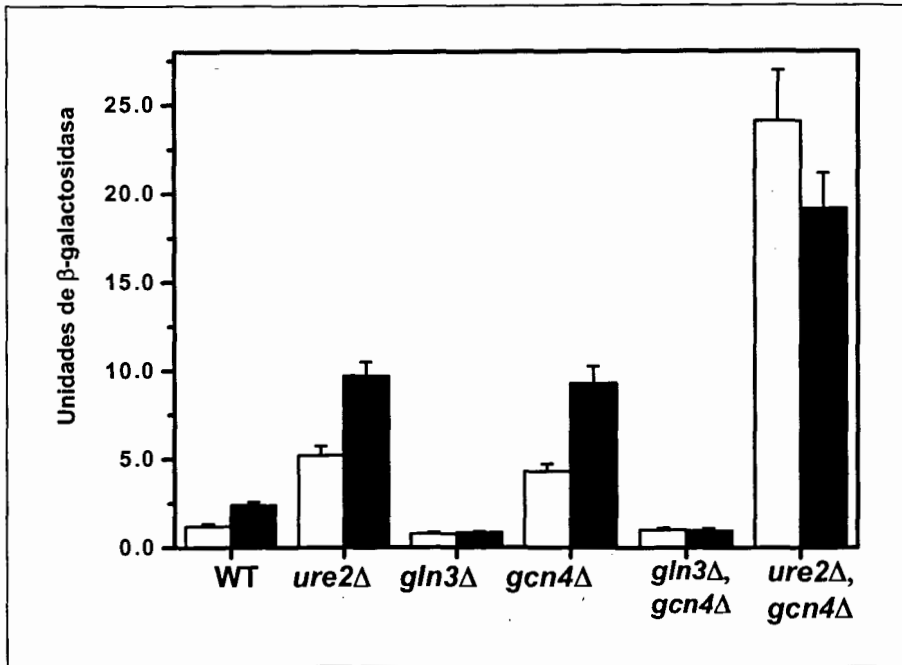


Figura 10. Regulación de *DAL5* en amonio. La actividad enzimática esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2Δ* (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *gln3Δ* (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4Δ* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3Δ gcn4Δ* (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*) y *ure2Δ gcn4Δ* (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*) fueron cultivadas en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno, sin rapamicina (barras blancas) y con el tratamiento con rapamicina durante 45 minutos (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β-galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

5.3. Prolina.

S. cerevisiae es capaz de asimilar alternativamente fuentes pobres de nitrógeno, cuando las fuentes preferentes están ausentes en su ambiente. La prolina es de las formas predominantes entre los compuestos nitrogenados encontrados en los sustratos naturales de la levadura, aunque es la fuente nitrogenada de más baja calidad en términos de la energía requerida y de la dificultad relativa de convertir a este componente en intermediarios nitrogenados utilizables. La prolina es la fuente nitrogenada utilizada en la mayoría de los estudios de la regulación por nitrógeno ya que es el aminoácido que ejerce la más débil represión (Hofman-Bang, 1999).

Como se aprecia en la **Figura 11**, en los cultivos con prolina como única fuente de nitrógeno, la transcripción de *DAL5* se encuentra mayormente activa. En todas las cepas la expresión de *DAL5* es similar con y sin rapamicina, con excepción de las mutantes *gln3Δ* y *gln3Δ gcn4Δ* en las cuales los valores de expresión disminuyeron notoriamente, indicando que la transcripción de *DAL5* es dependiente de Gln3p.

A diferencia de las fuentes de nitrógeno represoras, en prolina Gln3p se encuentra en el núcleo activando la expresión de *DAL5*, aún en presencia de Gcn4p y Ure2p, lo cual se refleja al comparar los niveles de expresión de la cepa silvestre con aquellos que presentan la cepa *gcn4Δ* y la mutante *ure2Δ*, con o sin rapamicina. Posiblemente el efecto de estos represores sobre el promotor no es evidente por el hecho de que existe suficiente cantidad de Gln3p capaz de activar al gen a su máxima expresión o debido a que la mala calidad de la fuente de nitrógeno ocasiona que la NCR no sea funcional.

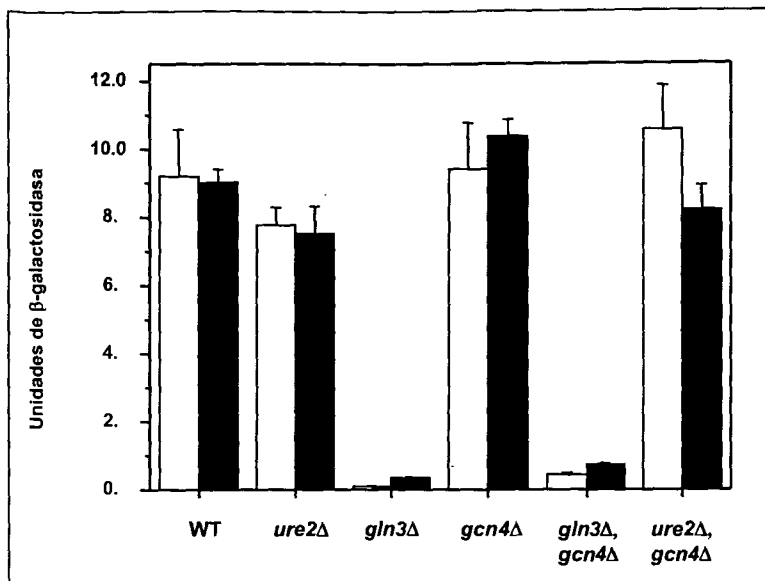


Figura 11. Regulación de *DAL5* en prolina. La actividad enzimática está reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2Δ* (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *gln3Δ* (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4Δ* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3Δ gcn4Δ* (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*) y *ure2Δ gcn4Δ* (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*) fueron cultivadas en medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno, sin rapamicina (barras blancas) y con el tratamiento con rapamicina durante 45 minutos (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

6. Consideraciones acerca del papel de Gcn4p en la regulación de los genes del catabolismo nitrogenado.

Aunque la regulación de cada gen es diferente, aquellos que responden al mismo factor transcripcional, comparten algunas características en su expresión. Al conocer que Gcn4p antagoniza la acción inductora de Gln3p, resultó factible que Gcn4p presentara una acción negativa en la expresión de aquellos genes sensibles a NCR que no se encuentran reprimidos por Ure2p en asparagina (Coffman *et al.*, 1994).

Como parte de este trabajo de investigación, se estudió el efecto de Gcn4p, en presencia de asparagina, sobre la expresión de dos genes que se comportan de esta manera, *GAP1* y *PUT4* incluyendo a *DAL5* como control del experimento (Figura 12). Los tres genes incrementaron notoriamente su expresión en una cepa *gcn4Δ* (13, 12 y 5.5 veces, respectivamente) en comparación con la cepa silvestre y presentaron su mayor expresión en la cepa *ure2Δ gcn4Δ* (37, 47 y 40 veces con

respecto a la cepa silvestre). A diferencia de los datos obtenidos por Coffman (Coffman *et al.*, 1994), la expresión de los tres genes estudiados revela una desrepresión en la mutante *ure2Δ*, lo cual no impidió identificar la represión causada por Gcn4p.

La cepa *gln3Δ* y la doble mutante *gln3Δ gcn4Δ* mostraron una nula expresión de los genes *DAL5* y *GAP1*, debido a que responden principalmente a Gln3p y en los cuales Gat1p solo induce de manera basal su expresión.

El gen *PUT4* es inducido tanto por Gln3p como por Gat1 y en ellos la mutación en *GLN3* disminuye pero no elimina totalmente su inducción debido a la presencia de Gat1p, por otro lado, una doble mutante *gln3Δ gcn4Δ* aumenta la inducción obtenida en una cepa *gln3Δ*, esta inducción concuerda con la intensidad en que *PUT4* responde a Gat1p. Lo anterior nos lleva a pensar que Gcn4p no solo contrarresta la acción inductora de Gln3p sino también la de Gat1p.

La posibilidad de que Gcn4p regule la expresión tanto de Gln3p como de Gat1p resulta factible debido a la similitud funcional, estructural y de secuencia entre Gln3p y Gat1, además existen evidencias de que algunas pero no todas las características de la regulación de Gln3p y Gat1p son similares como el hecho de que ambos activadores son retenidos en el citoplasma por Ure2p.

Finalmente la expresión de *DAL5* en el análisis tipo Northern confirman el papel negativo de Gcn4p sobre la actividad inductora de Gln3p reportada con el gen reportero.

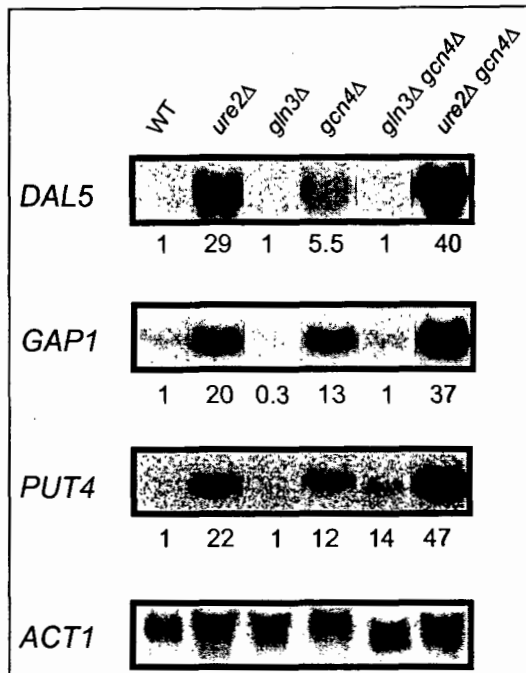


Figura 14. Expresión de *DAL5*, *GAP1* y *PUT4* en asparagina. Análisis de Northern blot a partir de RNA total de las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *ure2Δ* (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *gln3Δ* (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4Δ* (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3Δ gcn4Δ* (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*) y *ure2Δ gcn4Δ* (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*), cultivadas en medio mínimo con asparagina como fuentes de nitrógeno. Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Las muestras de RNA fueron separadas por electroforesis en un gel desnaturalizante al 1% y transferidos a un filtro Hybond-N. Los filtros fueron hibridados con fragmentos de PCR de las sondas *DAL5*, *GAP1*, *PUT4* y *ACT1*. Todas las sondas fueron marcadas con (α - 32 P)CTP. Los números indican los valores cuantitativos del RNAm para cada gen después de normalizar con actina.

7. Efecto de la privación de aminoácidos en la inducción de *DAL5*.

Gcn4p es el inductor principal de los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, los cuales se encuentran regulados globalmente a nivel transcripcional por el control general de la biosíntesis de aminoácidos GCN (Hinnebush, 1992). Este sistema actúa ante un desbalance de aminoácidos aumentando la traducción y la vida media del RNAm de *GCN4*, lo cual a su vez, provoca que muchos de los genes blanco para Gcn4p se expresen o se repriman (Natarajan *et al.*, 2001).

Debido a que en fuentes ricas de nitrógeno se evidenció una regulación de Gcn4p en la expresión de *DAL5*, fue importante establecer, si en una fuente

represora (amonió) y en una fuente no represora (prolina) *DAL5* responde al control general de la biosíntesis de aminoácidos. Para ello se aumentaron las cantidades de Gcn4p mediante un tratamiento con 3-AT.

Para comprobar dicho aumento, se utilizó como control a la cepa CLA p180 ya que posee un plásmido con el promotor de *GCN4* fusionado al gen reportero β -galactosidasa el cual permite cuantificar la presencia de Gcn4p. En las Figuras 13 y 14, se aprecia tanto en prolina como en amonió, que el perfil de expresión del todas las cepas que recibieron el tratamiento con 3-AT no cambia significativamente al compararse con la expresión de las cepas sin el tratamiento, lo que indica que el control general de la biosíntesis de aminoácidos y por lo tanto una concentración elevada de Gcn4p no es determinante en la regulación que Gcn4p ejerce sobre *DAL5*. Esto concuerda con el hecho de que la transcripción de *DAL5* no resulte modificada con el tratamiento de 3-AT (Natarajan *et al.*, 2001).

Estos resultados indican que es suficiente que Gcn4p se encuentre en la célula a niveles basales para apreciar su efecto en la expresión de *DAL5*.

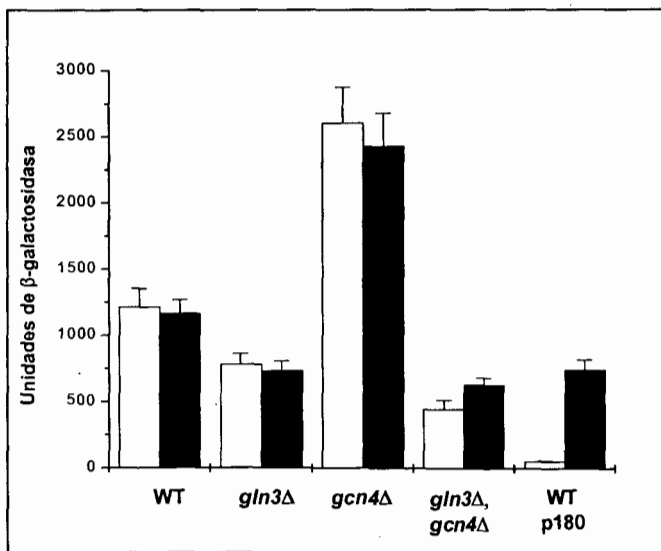


Figura 13. Efecto del 3-AT en la expresión de *DAL5* en amonió. La actividad enzimática esta reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), WT (CLA *ura3/pLAL2*), *gln3*Δ (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4*Δ (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3*Δ *gcn4*Δ (CLA *gln3*Δ *gcn4*Δ/*pLAL1*) y WT p180 (CLA *ura3/p180*) fueron cultivadas en medio mínimo con amonió como fuente de nitrógeno, sin 3-AT (barras blancas) y con 3-AT (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

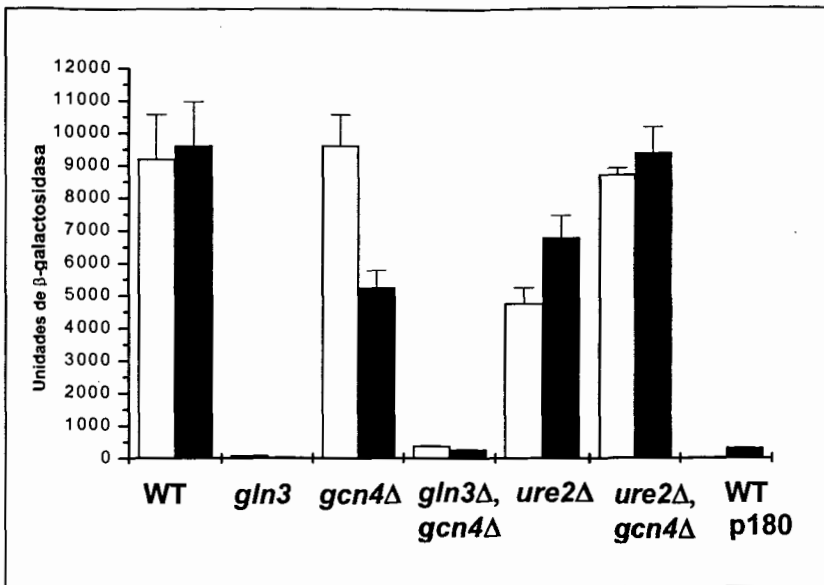


Figura 14. Efecto del 3-AT en la expresión de *DAL5* en prolina. La actividad enzimática está reportada en nmoles/min/mg de proteína. Las cepas WT (CLA *ura3/pLAL1*), *gln3*Δ (CLA *gln3Δ/pLAL1*), *gcn4*Δ (CLA *gcn4Δ/pLAL1*), *gln3*Δ *gcn4*Δ (CLA *gln3Δ gcn4Δ/pLAL1*), *ure2*Δ (CLA *ure2Δ/pLAL1*), *ure2*Δ *gcn4*Δ (CLA *ure2Δ gcn4Δ/pLAL1*), y WT p180 (CLA *ura3/p180*) fueron cultivadas en medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno, sin 3-AT (barras grises) y con 3-AT (barras negras). Las cepas fueron cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β-galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

VIII. MODELOS.

Con el fin de integrar los descubrimientos del presente trabajo dentro del contexto de los conocimientos actuales sobre el metabolismo nitrogenado presentamos los siguientes modelos:

1. Tres mecanismos mantienen reprimido a *DAL5* en fuentes ricas de nitrógeno.

Se puede considerar que el efecto represor de Ure2p tuviera dos componentes, uno independiente de la vía TOR y otro dependiente, así Ure2p formaría complejos con Gln3p en sus formas fosforiladas y desfosforiladas. Al mismo tiempo la fosforilación podría, por sí misma prevenir la localización nuclear de Gln3p (Bertram *et al.*, 2000). Un segundo mecanismo represor sería la formación de un complejo en el citoplasma entre Ure2p-Gln3p pero TOR independiente (**Figura 15**).

En virtud de que la regulación ejercida por Gcn4p depende de la presencia de Gln3p; de que la represión causada por Gcn4p es independiente de Ure2p y de la vía TOR y, considerando que Gcn4p se encuentra localizado en el núcleo (Pries *et al.*, 2002), cabría especular sobre la posibilidad de que Gcn4p antagonizara nuclearmente a Gln3p, lo que proveería un tercer mecanismo regulador.

En asparagina los tres mecanismos funcionarían dando lugar a la represión total de *DAL5*. Ure2p y Gcn4p continuarían ejerciendo su rol antagonista en amonio, donde la cascada TOR estaría parcialmente bloqueada, así la expresión basal de *DAL5* respondería al Gln3p no fosforilado que escapa al control de TOR. En prolina se previene la función de la cascada TOR, Gln3p no es fosforilado y así entra al núcleo. La carencia de Ure2p y Gcn4p no afecta la expresión de *DAL5* bajo esta condición.

Queda por analizar, si el efecto antagonista de Gln3p, que presentan Ure2p y Gcn4p independientemente de la vía TOR, son directas o mediadas por alguna otra molécula señalizadora que cense el estado de nitrógeno de la célula.

2. El mecanismo por el cual la vía TOR afecta la expresión de *DAL5*.

El hecho de que la vía TOR presente un efecto independiente de Ure2p y Gcn4p, lleva a cuestionar sobre cual es el mecanismo responsable de la represión

causada por la vía TOR. Una explicación sería la fosforilación de Gln3p, por sí misma, como se plantea en el modelo anterior y otra opción sería que la vía TOR afectara a una o más proteínas, aun no vinculadas con la capacidad de Gln3p para activar a sus genes blanco y/o de translocarse al núcleo.

3. El efecto ambivalente de Gcn4p en la expresión de *DAL5*.

Ya que los promotores que contienen sitios de reconocimiento para Gcn4p presentan una mayor posibilidad de ser inducidos que de ser reprimidos por este regulador (Natarajan *et al.*, 2001), la propuesta más simple que podría explicar el efecto ambivalente de Gcn4p en la transcripción de *DAL5*, sería que Gcn4p activara directamente la expresión de *DAL5* y por otro lado presentara la acción antagonista al efecto de Gln3p. En un medio altamente represor como YPD, Gln3p se encontraría retenido en el citoplasma por el resto de los mecanismos represores (TOR, fosforilación, Ure2p), de esta manera la mayor parte de Gcn4p se encontraría libre para unirse al promotor de *DAL5* y activarlo, así la inducción de *DAL5* en una mutante *gcn4Δ* resultaría en una menor que aquella obtenida en la cepa silvestre. En la doble mutante *ure2Δ gcn4Δ* más rapamicina al no encontrar ningún efecto antagonista en el citoplasma ni en el núcleo Gln3p se encontraría concentrado en el núcleo induciendo a *DAL5* a su más alta expresión, con lo cual se evidenciaría únicamente el efecto represor de Gcn4p y se ocultaría su efecto activador.

Con base en los datos que sugieren que el efecto de Gat1p pudiera ser antagonizado por Gcn4p, así como también, en la homología estructural y de secuencia y las evidencias del solapamiento fisiológico significativo que comparten Gln3p y Gat1p, se puede pensar en una posibilidad más para interpretar el efecto diferencial de Gcn4p. Dado que ambos reguladores activan a sus genes blancos reconociendo a cajas GATA similares, proponemos una competencia por la unión a estos elementos entre Gat1p y Gln3p.

Con el conocimiento de que la activación de *DAL5* debida a Gat1p es menos eficiente que la que se obtiene por la unión al promotor de Gln3p, cuando Gat1p se encuentre en las secuencias GATA, evitará que Gln3p pueda inducir al promotor con mayor intensidad.

En una cepa silvestre cultivada en YPD, *DAL5* se encuentra fuertemente reprimido, solo cuando se agrega rapamicina parte de Gln3p logra unirse al promotor de *DAL5* y la expresión aumenta. Al eliminar a Gcn4p en esta misma condición, tanto Gln3p como Gat1p pueden activar a sus genes blanco y este último es capaz de unirse a cajas ocupadas en la cepa silvestre por Gln3p, así, el efecto activador resulta más discreto que en una cepa silvestre, finalmente en la doble mutante *ure2Δ gcn4Δ* mas rapamicina los mecanismos antagonistas de Gln3p no operan y la totalidad de Gln3p puede viajar al núcleo donde por su elevada concentración ocupa el mayor numero de cajas GATAA presentes en el promotor *DAL5*.

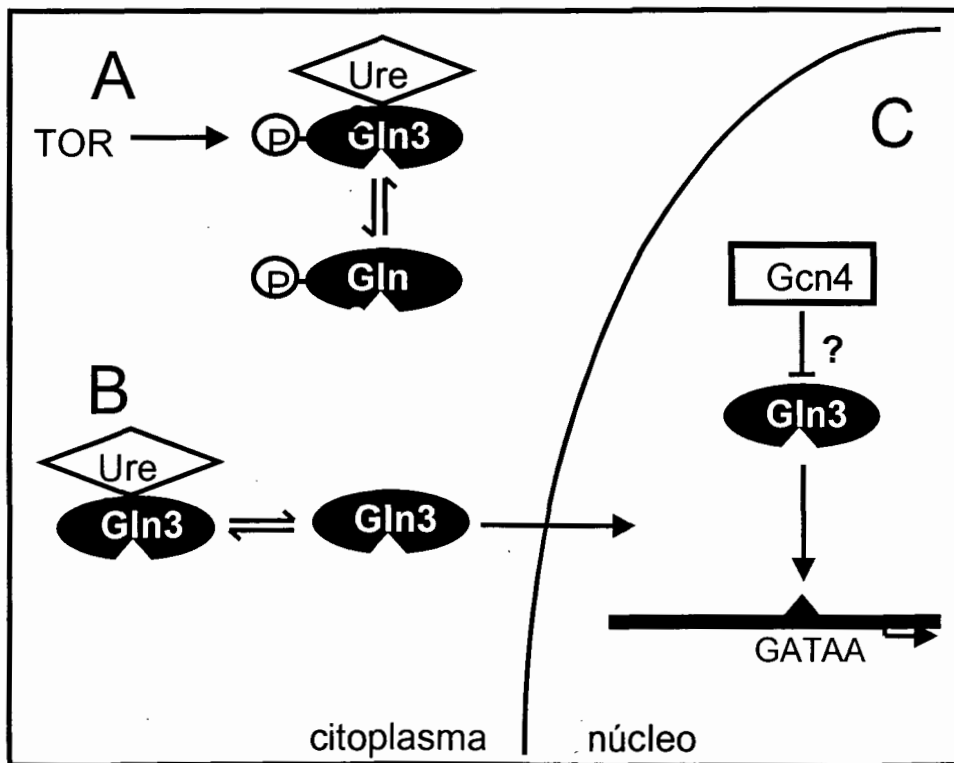


Figura 15. Modelo del mecanismo NCR. A, Represión TOR dependiente; B, Represión mediada por Ure2p TOR dependiente; C, Represión mediada por Ure2p TOR independiente.

IX. CONCLUSIONES.

La caja consenso para Gcn4p, presente en el promotor de *DAL5*, no es funcional sin importar a que concentración se encuentre Gcn4p.

El efecto positivo de Gcn4p en la expresión de *DAL5* sólo es detectable cuando se agrega rapamicina a un medio extremadamente represivo (YPD), ya que en medio mínimo con una fuente de nitrógeno preferente, la acción represora de Gcn4p prevalece de manera general, significativa y semejante a la represión ejercida por Ure2p y la vía TOR ya que estos tres mecanismos contrarrestan el efecto inductor de Gln3p y con ello la expresión de genes del catabolismo nitrogenado. De manera coherente, una fuente pobre de nitrógeno elimina el efecto de estos mecanismos represores, de manera que la expresión de *DAL5* en prolina depende exclusivamente de la presencia de Gln3p y de su translocación al núcleo. El efecto y la intensidad en que Gcn4p regula a los genes del catabolismo nitrogenado se encuentran condicionados finamente por la calidad de las fuentes nitrogenadas y no así por la privación de aminoácidos.

La aportación más relevante de este trabajo fue identificar la acción represora de Gcn4p sobre genes del catabolismo nitrogenado e integrar a este factor transcripcional como un efector fundamental de la NCR.

Además, la acción inductora de Gat1p podría ser antagonizada por la presencia de Gcn4p.

A concentraciones basales Gcn4p no regula la expresión de *URE2* ni la de *GLN3*.

X. PERSPECTIVAS.

Resulta sumamente difícil determinar todos los aspectos moleculares del complejo mecanismo de la represión catabólica nitrogenada en un solo trabajo puesto que los datos actuales no son suficientes para explicar todos los procesos observados.

Si bien es cierto que el mecanismo por el cual Gcn4p lleva a cabo su función dentro de la NCR no fue probado hasta el límite y que los resultados hasta aquí obtenidos no son suficientes para explicarlo totalmente, también es cierto que este trabajo contribuye considerablemente a lograr tal objetivo ya que brinda pautas a seguir para desarrollar posteriores trabajos sobre el tema.

Solo mediante el análisis minucioso de la fisiología celular, muchos de los procesos moleculares podrán ser apreciados debido a que constantemente se presentan interacciones que podrían ocultar la acción de factores implicados en la expresión génica, por lo que sucesivos trabajos en el área deben de llevarse a cabo aun más detalladamente de lo que comúnmente se han elaborado.

La pregunta más apremiante e interesante, pero también la que implica un mayor trabajo de investigación es la concerniente a clarificar la manera en que Gcn4p participa en la regulación de los genes del catabolismo nitrogenado. Lo cual daría luz sobre la relación observada entre Gcn4p y Gln3p, validaría o descartaría los modelos aquí presentados y explicaría la aparente contradicción entre el efecto activador y represor de Gcn4p sobre el gen *DAL5*.

Mediante un microarreglo se podría conocer la generalidad y el alcance sobre la participación de Gcn4p en la totalidad de los genes sensibles a NCR.

Es importante estudiar las diferencias y relaciones entre el efecto de las fuentes represoras del metabolismo nitrogenado, de la vía TOR y de las proteínas Gcn4p y Ure2p, así como determinar el mecanismo y las señales que las diferentes fuentes nitrogenadas utilizan para modular a los mecanismos represores.

XI. REFERENCIAS.

Avendaño A., DeLuna A., Olivera H., Valenzuela L. y González A. (1997) *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:5594-5597.

Beck T. y Hall M. (1999) The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**:689-692.

Bertram P.G., Choi J.H., Cavalho J., Ai W., Zeng C., Chan T.F. y Zheng X.F.S. (2000) Tripartite regulation of Gln3 by TOR, Ure2, and phosphatases. *J. Biol. Chem.* **275**:35727-35733.

Blinder D., Coschigano P.W. y Magasanik B. (1996) Interaction of the GATA factor Gln3 with the nitrogen regulator Ure2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**:4734-4736.

Blinder D. y Magasanik B. (1995) Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J. Bacteriol.* **177**:4190-4193.

Cardenas M.E., Cutler N.S., Lorenz M.C., Di Como C.J. y Heitman J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* **13**:3271-3279.

Coffman J.A., El Berry H.M. y Cooper T.G. (1994) The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing *UAS_{NTR}* element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:7476-7483.

Coffman J.A., Rai R. y Cooper T.G. (1995) Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:6910-6918.

Coffman J.A., Rai R., Cunningham T., Svetlov V. y Cooper T.G. (1996) Gat1p, a GATA-family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:847-858.

Cooper T.G. (1982) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. (Strathern J.N., Jones E.W. and Broach J.R. Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Cooper T.G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:223-238.

Cooper T.G. y Sumrada R.A. (1983) What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?. *J. Bacteriol.* **155**:623-627.

Cooper T.G., Rai R. y Yoo H.S. (1989) Requirement of upstream activation sequences for nitrogen catabolite repression of the allantoin system genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5440-5444.

Courchesne W.E. y Magasanik B. (1988) Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of *URE2* and *GLN3* genes. *J. Bacteriol.* **170**:708-713.

Cox K.H., Pinchak A.B. y Cooper T.G. (1999) Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* **15**:703-713.

Cunningham T.S. y Cooper T.G. (1991) Expression of the *DAL80* gene, whose product is homologous to GATA factors and is a negative regulator of multiple

catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolic repression. *Mol. Cell. Biol.* **11**:6205-6215.

Cunningham T.S. y Cooper T.G. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae* DAL80 repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URS_{GATA}). *J. Bacteriol.* **175**:5851-5861.

Cunningham T.S., Dorrington R.A. y Cooper T.G. (1994) The UGA4 UAS_{NTR} site required for *GLN3*-dependent transcriptional activation also mediates *DAL80*-responsive regulation and DAL80 protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:4718-4725.

Daugherty J.R. (1992) Role of the yeast GATA element, UAS_{NTR}, in activation and repression of nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Ph. D. Thesis. The University of Tennessee, Memphis, Tn.

Daugherty J.R., Rai R., El Berry H.M. y Cooper T.G. (1993) Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**:64-73.

Harbury P.A.B. y Struhl K. (1989) Functional distinctions between yeast TATA elements. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5298-5304.

Hardwick J.S., Kuruvilla F.G., Tong J.K., Shamji A.F. y Schreiber S.L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:14866-14870.

Hinnebusch A.G. (1985) A hierarchy of *trans*-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:2349-3260.

Hinnebusch A.G. (1986) The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem.* **21**:277-289.

Hinnebusch A.G. (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Gene expression vol. II (Jones E.W., Pringle J.R. and Broach J.R., Eds.) pp. 319-415. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hinnebusch, A.G. y Fink G.R. (1983) Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**:5374-5378.

Hofman-Bang J. (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biothec.* **12**:35-73.

Large P.J. (1986) Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* **2**:1-34.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Magasanik B. (1992) The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Gene expression. Vol. II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 283-318.

Marzluf G.A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:17-32.

Miller R.E. y Stadtman E.R. (1972) Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **247**:7407-7419.

Minehart P.L. y Magasanik B. (1991) Sequence and expression of *GLN3*, a positive regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **11**:6216-6228.

Myers A.M., Tzagoloff A., Kinney D.M. y Lusty C.J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**:299-310.

Natarajan K., Meyer M.R., Jackson B.M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A.G. y Marton M.J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4347-4368.

O'Neil K.T., Shuman J.D., Ampe C. y De Grado W.F. (1991) DNA-induced increase in the alpha-helical content of C/EBP and GCN4. *Biochem.* **30**:9030-9034.

Pries R., Bomeke K., Irniger S., Grundmann, O. y Braus, G.H. (2002) Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus. *Eukaryotic Cell.* **1**:663-672.

Rai R., Genbauffe F., Lea H.Z. y Cooper T.C. (1987) Transcriptional regulation on the *DAL5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**:3521-3524.

Rai R., Genbauffe F., Lea H.Z. y Cooper T.C. (1988) Structure and transcription of the allantoin permease gene (*DAL5*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170**:266-271.

Rai R., Genbauffe F., Sumrada R.A. y Cooper T.C. (1989) Identification of sequences responsible for transcriptional activation of the allantoin permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:602-608.

Raught B., Gingras A.C. y Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:7037-7044.

Rose M. y Botstein D. (1983) Construction and use of gene fusions *lacZ* (β -galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* **101**:167-180.

Schmelzle T. y Hall M.N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**:253-262.

Sherman F. (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3-38.

Sikorski R.S. y Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.

Stanbrough M. y Magasanik B. (1996) Two transcriptional factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**:2465-2468.

Stanbrough M., Rowen D.W. y Magasanik B. (1995) Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:9450-9454.

Stargell L.A. y Struhl K. (1996) Mechanisms of transcriptional activation *in vivo*: two steps forward. *Trends Genet.* **12**:311-315.

Struhl, K. y Davis, R.W. (1981) Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.

Svetlov V.V. y Cooper T.G. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80p and Deh1p can form homo- and heterodimeric complexes. *J. Bacteriol.* **180**:5682-5688.

Tavernarakis N. y Thireos G. (1997) The DNA target sequence influences the dependence of the yeast transcriptional activator Gcn4 on co-factors. *Mol. Gen. Genet.* **253**:766-769.

Ter Schure E.G., Van Riel N.A.W. y Verrips C.T. (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:67-83.

Thomas P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *PNAS* **77**:5201-5205.

Turoscy V. y Cooper T.G. (1987) Ureidosuccinate is transported by the allantoin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**:2598-2600.

Tyler B. (1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann.Rev.Biochem.* **47**:1127-1162.

Valenzuela L., Aranda C. y González A. (2001) TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* **183**:2331-2334.

Valenzuela L., Ballario P., Aranda C., Filetici P. y González A. (1998) Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**:3533-3540.

Wach A., Brachat A., Pohlmann R. y Philippsen P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1793-1808.

XII. INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la mutagénesis de la caja GCN4.	23
Figura 2.	Interrupción de <i>URE2</i> .	27
Figura 3.	Análisis del promotor de <i>DAL5</i> .	41
Figura 4.	Funcionalidad de la caja consenso GCN4 en medio rico.	42
Figura 5.	Funcionalidad de la caja consenso GCN4 en privación de aminoácidos.	43
Figura 6.	Efecto de Gcn4p en la transcripción de <i>URE2</i> y <i>GLN3</i> .	45
Figura 7.	Regulación de <i>DAL5</i> en medio rico.	48
Figura 8.	Regulación de <i>DAL5</i> en asparagina.	50
Figura 9.	Regulación de <i>DAL5</i> en glutamina.	51
Figura 10.	Regulación de <i>DAL5</i> en amonio.	52
Figura 11.	Regulación de <i>DAL5</i> en prolina.	54
Figura 12.	Expresión de <i>DAL5</i> , <i>PUT4</i> y <i>GAP1</i> en asparagina.	56
Figura 13.	Efecto del 3-AT en la expresión de <i>DAL5</i> en amonio.	57
Figura 14.	Efecto del 3-AT en la expresión de <i>DAL5</i> en prolina.	58
Figura 15.	Modelo del mecanismo NCR.	61

XIII. ABREVIATURAS

caja GATA	Secuencia en el DNA a la que se unen Gln3p y Dal80p
caja GCN4	Secuencia en el DNA a la que se une Gcn4p
<i>lacZ</i>	β -galactosidasa
MM	Medio mínimo de cultivo, con sulfato de amonio, glucosa, vitaminas, sales y elementos traza
NCR	Represión catabólica nitrogenada
ONPG	ORTO-o-NITROPHENYL - β - D - GALACTOPYRANOSIDE
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UAS _{NTR}	Secuencia activadora río arriba, regulada por nitrógeno
URS _{GATA}	Secuencia represora río arriba que contiene la secuencia 5'-GAT(T/A)A-3'
YPD	Medio rico para levadura con peptona, dextrosa y extracto de levadura

XIV. GENES Y OTRAS ANOTACIONES

<i>ACT1</i>	Actina
<i>DAL5</i>	Permeasa de alantoato
Dal5p	Producto del gen <i>DAL5</i>
<i>DAL80</i>	Represor general de los genes del metabolismo de nitrógeno
Dal80p	Producto del gen <i>DAL80</i>
FKBP	Receptor intracelular de la rapamicina, forma un complejo FKBP-rapamicina el cual inhibe específicamente a las proteínas TOR
<i>GCN4</i>	Activador general de los genes de la biosíntesis de aminoácidos
Gcn4p	Producto del gen <i>GCN4</i>
<i>gcn4Δ</i>	Mutante interrumpida en el gen <i>GCN4</i>
<i>GLN3</i>	Activador general de los genes del metabolismo de nitrógeno
Gln3p	Producto del gen <i>GLN3</i>
<i>gln3Δ</i>	Mutante interrumpida en el gen <i>GLN3</i>
TOR	Vía de transducción de señales que responde a rapamicina
<i>TOR1</i>	Proteína cinasa sensible a rapamicina, homólogo de <i>TOR2</i>
<i>TOR2</i>	Proteína cinasa sensible a rapamicina, homólogo de <i>TOR1</i>
UORF	Marco de lectura abierta localizada río arriba
<i>ure2Δ</i>	Mutante interrumpida en el gen <i>URE2</i>
<i>URE2</i>	Proteína citoplásmica capaz de contrarrestar la actividad de Gln3p y Gat1p
Ure2p	Producto del gen <i>URE2</i>

XV. APÉNDICE

Novel Role for Gcn4 as a Member of the *Saccharomyces cerevisiae* Nitrogen Discrimination Pathway

Eduardo Sosa¹, Cristina Aranda¹, Lina Riego¹, Lourdes Valenzuela¹, Alexander DeLuna¹, José M. Cantú², and Alicia González^{1*}

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 Mexico City, Mexico. ²Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950, 44034 Guadalajara, Jalisco, Mexico.

Running Title: Role of Gcn4 in Nitrogen Catabolite Repression

Keywords: TOR pathway / nitrogen-repression / Gcn4 / Gln3

Summary

When the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is grown in the presence of high quality nitrogen sources, nitrogen catabolite repression (NCR) prevents the expression of genes involved in the use of poor nitrogen sources. It has been considered that three key elements participate in this discrimination pathway: the *GLN3* and *GAT1*-encoded transcriptional activators, and their negative regulator *Ure2*. The fact that expression of various NCR-sensitive genes is not derepressed in the absence of *Ure2* has led to the proposition that at least for these genes there must exist a protein with a function similar to that of the Gln3-antagonist, *Ure2*. The results presented in this paper show that various NCR-sensitive genes are derepressed in a *gcn4* mutant, indicating that Gcn4 counteracts Gln3 activity. A model is presented which adds the novel role played by Gcn4 to the current view of operation of the nitrogen regulatory network.

Introduction

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to use a variety of compounds as nitrogen sources. When yeast cells are provided with poor nitrogen sources, genes coding for the enzymes involved in the catabolism of these compounds are highly expressed. Conversely, in the presence of high-quality nitrogen sources, a decrease in the levels of catabolic enzymes and transport systems is observed. The reduced expression of genes coding for enzymes involved in the utilization of poor-nitrogen sources is brought about through the action of a regulatory network known as nitrogen catabolite repression (NCR) (Blinder and Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1995; Courchesne and Magasanik, 1988). Nitrogen catabolite repression operates through the action of two transcriptional activators Gln3 and Gat1 (Nil1) (Coffman *et al.*, 1996; Stanbrough and Magasanik, 1966). The *URE2*-encoded protein negatively regulates transcriptional activity of these modulators (Courchesne and Magasanik, 1988). In yeasts grown on a rich nitrogen source, the TOR signalling pathway prevents transcription of genes expressed upon nitrogen limitation, by promoting Gln3 and Gat1 inactivation through phosphorylation and the antagonistic action of *Ure2* (Bertram *et al.*, 2000).

Neither the exact role nor the uniqueness in function of *Ure2* have been completely established. It is not known, for instance, whether the primary role of *Ure2*, which prevents Gln3 and Gat1 entry into the nucleus under repressive conditions, is the formation of a *Ure2*-Gln3 complex or the facilitation or

stabilization of the phosphorylated forms of Gln3 and Gat1 (Bertram *et al.*, 2000). The unique role played by Ure2 as Gln3 antagonist has, however, been challenged by observations that show that NCR-sensitive expression of multiple genes is readily observed in the absence of Ure2 (Coffman *et al.*, 1994; Coffman *et al.*, 1996), indicating that there could be more than one protein with a function analogous to that of Ure2.

The transcriptional activator encoded by *GCN4* is a master regulator of gene expression, which promotes a broad range of both, positive and negative transcriptional responses including amino acid biosynthesis under conditions of nutrient limitation (Hinnebusch, 1986; Natarajan *et al.*, 2001). However, its role under non-starvation conditions has been poorly studied. It seemed plausible that Gcn4 could also have a broader action under the later condition, orchestrating the equilibrated functioning of the biosynthetic and catabolic pathways.

This paper addresses the role of Gcn4 on the expression of catabolic pathways. Our results uncovered that Gcn4 plays an independent and similar role to that of *URE2* by negatively regulating Gln3-dependent induction of *DAL5* and Gat1-dependent induction of *GAP1* and *PUT4*. This establishes a new physiological role for Gcn4 in the nitrogen discrimination pathway.

Results

Gln3-dependent *DAL5* expression is negatively modulated by Gcn4. To gain information regarding the possible role of Gcn4 on *DAL5* expression, β -Gal activity fostered by the *DAL5* promoter was determined in extracts of a wild type strain grown on MM with asparagine or ammonium as nitrogen sources (Fig. 1A, B). As expected, β -Gal activity was low, indicating that *DAL5* expression is NCR-sensitive and repressed when the yeast is grown in the presence of high-quality nitrogen sources. Accordingly, β -Gal expression was five-fold increased in a *ure2* Δ mutant and barely detectable in a *gln3* Δ strain. However, when β -Gal activity was determined in a *gcn4* Δ mutant, a higher activity was detected as compared to that found in extracts of the wild type strain, suggesting a negative role of Gcn4 on *DAL5* expression. A double *ure2* Δ *gcn4* Δ mutant showed a high β -Gal derepression, indicating that the simultaneous lack of Ure2 and Gcn4 had an additive effect on *DAL5* expression (Fig. 1A, B). The *gln3* Δ *gcn4* Δ double mutant showed lower β -Gal activity than that found for *gcn4* Δ , suggesting that the Gcn4-dependent induction of *DAL5* expression is attained through the action of Gln3.

These results show that *DAL5* expression is negatively regulated by Gcn4 and by Ure2, when *S. cerevisiae* is grown in the presence of high quality nitrogen sources, suggesting a redundant role for these proteins.

β -Gal activity was determined in extracts obtained from cultures of the wild type strain grown on a non-repressive nitrogen source such as proline (Fig. 1C). In this condition, β -Gal activity was high and similar to that found in strains carrying the *ure2* Δ and/or *gcn4* Δ mutations. The *gln3* Δ and the *gln3* Δ *gcn4* Δ mutants showed low β -Gal activities. These results indicate that under non-repressive conditions, *DAL5* expression is Gln3-dependent and that Gcn4, as well as Ure2, plays no role on *DAL5* expression.

Northern analysis of *GLN3* and *URE2* expression carried out with total RNA obtained from the wild type and *gcn4* Δ mutant strains grown on asparagine as nitrogen source showed that, as opposed to what happens under

deprivation conditions (Natarajan *et al.*, 2001), Gcn4 does not regulate the expression of either one of these genes (Fig. 2).

Northern analysis confirms the negative role of Gcn4 on Gln3-induced expression and reveals its antagonistic effect on Gat1-induced expression. Northern analysis was carried out with total RNA obtained from cultures grown on asparagine. As compared to the wild type, *DAL5* mRNA was five-fold increased in a *gcn4Δ* mutant, 29-fold in a *ure2Δ* mutant and 40-fold in a double *ure2Δ gcn4Δ* mutant (Fig. 3). As expected, strains carrying the *gln3Δ* mutation showed a very faint signal.

To address whether the negative role of Gcn4 on *DAL5* transcriptional activation affected the expression of other catabolic genes, Northern analysis was performed with total RNA obtained from the wild type strain and from strains carrying the *ure2Δ*, *gln3Δ* and *gcn4Δ* mutations, using *GAP1* and *PUT4* as probes. The fact that expression of these genes is increased in the *gln3Δ gcn4Δ* mutant as compared to the *gln3Δ* mutant suggests that Gcn4 also counteracts Gat1-induced transcriptional activation (Fig. 3).

Ure2, Gcn4 and the TOR pathway independently regulate *DAL5* expression. In the presence of rapamycin, the TOR signalling pathway is impaired and the expression of genes involved in the catabolism of nitrogenous compounds is increased (Beck and Hall, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001). As Fig. 4 shows, β -Gal activity fostered by the *DAL5* promoter was several-fold increased after rapamycin treatment in extracts obtained from YPD cultures from either the wild type or the *ure2Δ* strains. In a *gcn4Δ* background, rapamycin-mediated induction was half of that found in a wild type strain; in a *gln3Δ* background no induction was observed (Fig. 4). These results indicate the positive role of Gln3 and Gcn4 on rapamycin induced *DAL5* expression. When β -Gal activity was determined in extracts from the *ure2Δ gcn4Δ* double mutant grown on YPD, *DAL5* basal and induced expression was four-fold higher to that observed in the single *ure2Δ* mutant (Fig. 4), indicating that the simultaneous loss of these two modulators has an additive and positive effect on *DAL5* expression.

When rapamycin was added to asparagine or ammonium-grown cultures, β -Gal activity was increased in extracts obtained from the wild type strain and from single mutant strains carrying either the *ure2Δ* or the *gcn4Δ* mutations (Fig. 1A, B). Induction was not observed in a *gln3Δ* genetic background. A 2.5-fold increment of β -Gal activity was observed after rapamycin treatment of an asparagine-grown double *ure2Δ gcn4Δ* mutant, whereas no increment was observed on ammonium-grown cultures. This suggests that in the presence of a less repressive nitrogen source like ammonium, the rapamycin-dependent derepression mechanisms acting on *DAL5* expression are equivalent to the effect that can be achieved in the absence of Ure2 and Gcn4, thus hindering the additive effect observed on asparagine. β -Gal levels in the *ure2Δ gcn4Δ* double mutant grown on asparagine or ammonium were respectively 12 or 19-fold higher than those attained in the wild type strain, again suggesting that inhibition of the TOR pathway leads to *DAL5* derepression through a Ure2- Gcn4-independent mechanism.

β -Gal activity determined in extracts obtained from proline-grown cultures show that in a non-repressive nitrogen source, rapamycin treatment has no effect on either the wild type or in strains carrying the *ure2Δ* and/or *gcn4Δ* mutations. These results confirm previous observations indicating that when *S. cerevisiae* is

grown on a highly repressive medium like YPD, rapamycin treatment induces expression of genes involved in nitrogen catabolism through the combined action of Gln3 and Gcn4 (Beck and Hall, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001). The positive effect of Gcn4 can only be detected in extremely repressive conditions (YPD); on MM it is no longer observed and the negative role of Gcn4 prevails.

Discussion

The fact that several NCR-sensitive genes are not derepressed in the absence of Ure2 (Coffman *et al.*, 1996) prompted us to investigate whether the master transcriptional regulator Gcn4 might have a similar role to that of Ure2 by negatively regulating Gln3- and Gat1-dependent gene expression. Our results show that under nitrogen repressive conditions, highest *DALS* induction is attained in a *ure2Δ gcn4Δ* background in the presence of rapamycin, indicating that the TOR pathway, Ure2 and Gcn4 are acting through independent and additive mechanisms preventing Gln3 transcriptional activity (Fig. 5) and that Gcn4 and Ure2 play analogous roles in the NCR regulatory network. It must be considered that the effect of *URE2* could have two components, a TOR-independent and a TOR-dependent one, thus Ure2 could form complexes with phosphorylated and unphosphorylated Gln3 (Bertram *et al.*, 2000). At the same time, phosphorylation could by itself prevent nuclear localization of this activator (Bertram *et al.*, 2000). The formation of a TOR-independent cytoplasmic Ure2-Gln3 complex constitutes a second repression mechanism (Beck and Hall, 1999). The antagonistic effect of Gcn4 described in this work would provide a third mechanism counteracting Gln3 activity. Considering that Gcn4 is nuclear located (Pries *et al.*, 2002), it seems plausible to contemplate that an intranuclear interaction between Gln3 and Gcn4 could be responsible of this effect. In asparagine, all three mechanisms would function resulting in *DALS* full repression. On ammonium, where the TOR cascade is partially hampered, *DALS* basal expression could be afforded by the unphosphorylated Gln3 that escapes TOR control; Ure2 and Gcn4 would continue to exert their antagonistic role. On proline, the functioning of the TOR cascade is prevented (Beck and Hall, 1999), Gln3 is unphosphorylated and thus enters the nucleus. Lack of either Ure2 or Gcn4 does not affect *DALS* expression. This indicates that under a non-repressive condition, Ure2 and Gcn4 are unable to antagonize Gln3, and that the functional restraint of the TOR pathway can by itself allow appropriate nuclear-Gln3 compartmentalization. Whether the TOR-independent capacities of Ure2 and Gcn4 to prevent Gln3 functioning are direct ones or mediated by still other signal molecules that could sense the nitrogenous status of the cell remains to be analyzed.

In regard to the physiological meaning of the negative role played by Gcn4 on Gln3 and Gat1 transcriptional activity, it could be considered that the simultaneous operation of biosynthetic and catabolic pathways could result in the formation of futile cycles endangering provision of key molecules that would hinder cell proliferation. Thus in the presence of high quality nitrogen sources, functioning of Gcn4 as a master regulator could prevent such short-circuiting.

Experimental procedures

Strains. The wild type strain CLA1 (*MATα ura3 leu2*) and the mutants CLA-100-0 (*MATα gcn4Δ::URA3 leu2*), CLA-101-0 (*MATα gln3Δ::URA3 leu2*) (17) and CLA-303 (*MATα gcn4Δ::URA3 gln3Δ kanMX leu2*) (18) were transformed as previously described (17) with plasmid pLAL5 (*DALS-lacZ LEU2*) generating strains CLA-701, CLA-702, CLA-703 and CLA-704, respectively.

The isogenic *ure2Δ* derivative (CLA-705), was obtained from strain CLA1 by gene replacement. A PCR generated *KanMX* module was prepared with plasmid pFA6a following the method of Wach *et al.* (1994) using deoxyoligonucleotides S1 (5'-GTA AAC ATA GGA AAC AGG AAC AGT AAT ACA ACC ACC GAT C CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3') and S2 (5'-GCC AAT TCT ATC CAC GAC ATT ATT CCA TGG GAC AAA GGC C ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3') which contained 40 bases of the 5' and 3' ends of the *URE2* sequence (bold), respectively. The same module was used to obtain a *ure2Δ gcn4Δ* double mutant by gene replacement transforming strain CLA-100-0, yielding strain CLA-707. Both *ure2Δ* derivatives were transformed with pLAL5 (*DAL5-LacZ LEU2*), yielding strains CLA-706 (*ure2Δ*) and CLA-708 (*ure2Δ gcn4Δ*).

Growth conditions. Strains were routinely grown on rich medium containing 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose (YPD) or on minimal medium (MM), following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter sterilized 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% asparagine or proline were used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01% (wt/vol). Cells were incubated at 30°C with shaking (250 rpm). For the treatment with rapamycin, cells were grown to an optical density (OD) of 0.8 on YPD. Pertinent aliquots of these cultures were used to inoculate flasks containing 25 ml of YPD to an OD of 0.05. These cultures were allowed to grow to an OD of 0.50 and 25 ml aliquots were independently collected by centrifugation. The rest of the cultures were treated with 200 ng of rapamycin per ml for 45 min, after which 25 ml aliquots were independently collected and centrifuged.

Construction of *lacZ* fusions. The full *DAL5* promoter was PCR amplified using deoxyoligonucleotide F1 containing a *BamHI* site comprised in the last 15 bases of the *DAL5* promoter region (Rai *et al.*, 1988), (5'-CGC GCG GGA TCC CGG CGG ATT-3) deoxyoligonucleotide R1 contained a *Sall* site, and 19 bases of which 9 corresponded to the *DAL5* coding region, and 10 bases to the *DAL5* promoter region (5'-GCG CGC GTC GAC GCT GAC ATC TTG AAT TTT-3). Deoxyoligonucleotides F1 and R1 were used to amplify the complete *DAL5* promoter with an MJ Research thermocycler, following a previously described program (Valenzuela *et al.*, 2001). A 561 bp product was obtained digested, gel purified, and fused in frame to the *Escherichia coli lacZ* gene of YEp353 (2μm *LEU2*) (10).

Determination of β-Gal activity. Preparation of soluble extracts and β-galactosidase determinations were done as previously described (Rose and Botstein, 1983; Valenzuela *et al.*, 1998). One unit of activity was defined as the production of one μmole of *o*-nitrophenol generated per minute. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (9), with bovine serum albumin as a standard.

Northern analysis. Northern analysis was carried out by preparing total RNA from 100 ml samples of the pertinent cultures (Struhl and Davis, 1981). Prehybridization and hybridization was carried out as previously described (Valenzuela *et al.*, 2001). Signal was quantified using STORM 840 and Image Quant Software (Molecular Dynamics). Before the addition of each probe, filters were boiled for 15 min in 0.1% SDS and prehybridized.

Figure Legends

Figure 1. *DAL5* expression is enhanced in *gcn4Δ* mutants. Strains harbouring *DAL5-lacZ* fusion were cultured on MM with *A*, asparagine; *B*, ammonium sulfate and *C*, proline as nitrogen sources. Cells were

harvested in the log phase, aliquots were withdrawn and β -Gal activity determined in extracts of wild type (CLA-701), *ure2* Δ (CLA-706), *gln3* Δ (CLA-703) *gcn4* Δ (CLA-702) *gln3* Δ *gcn4* Δ (CLA-704) and *ure2* Δ *gcn4* Δ (CLA-708). White bars, no rapamycin treatment; black bars 45min rapamycin treatment.

Figure 2. Gcn4 does not regulate either *GLN3* or *URE2* expression. Northern blot of total RNA from strains wild type (CLA-701) and *gcn4* Δ (CLA-702). A filter was prepared as stated in Methods and sequentially hybridized with PCR fragments of 2.2, 1.0 and 0.87 kb from *GLN3*, *URE2* and *ACT1*, respectively. Representative results from three experiments are shown. Numbers indicate mRNA quantitative values after normalizing with actin.

Figure 3. *DAL5*, *GAP1* and *PUT4* mRNA steady state levels increase in *gcn4* Δ mutants. Northern blot of total RNA from strains wild type (CLA-701), *ure2* Δ (CLA-706), *gln3* Δ (CLA-703), *gcn4* Δ (CLA-702), *gln3* Δ *gcn4* Δ (CLA-704) and *ure2* Δ *gcn4* Δ (CLA-708). A filter was prepared as stated in Methods and sequentially hybridized with PCR fragments of 0.94, 1.0, 0.96, and 0.87 kb from *DAL5*, *GAP1*, *PUT4* and *ACT1*, respectively. Representative results from three experiments are shown. Numbers indicate mRNA quantitative values after normalizing with actin.

Figure 4. A *ure2* Δ *gcn4* Δ double mutant increases *DAL5* expression on YPD, as determined by β -Gal activity in mutants harbouring a *DAL5-lacZ* fusion. Strains harbouring *DAL5-lacZ* fusion were cultured on YPD. Cells were harvested in log phase, aliquots were withdrawn and β -Gal activity was determined in extracts of wild type (CLA-701), *ure2* Δ (CLA-706), *gln3* Δ (CLA-703), *gcn4* Δ (CLA-702), *gln3* Δ *gcn4* Δ (CLA-704) and *ure2* Δ *gcn4* Δ (CLA-708). White bars, no rapamycin treatment; black bars 45min rapamycin treatment.

Figure 5. Three mechanisms prevent Gln3-mediated transcriptional activity. Diagrammatic representation of a model depicting: A, TOR-dependent repression; B, TOR-independent Ure2-mediated repression and C, TOR-independent Gcn4-mediated repression.

Acknowledgements

We acknowledge F. Bastarrachea for critical review of the manuscript, and H. Quezada for insightful comments throughout this work. We are grateful to L. Ongay, G. Codiz, and M. Mora (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for DNA sequencing and synthesis of oligonucleotides. This work was supported in part by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, Grant IN212898 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant 317744.

References

- Beck, T., and Hall, M.N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402: 689-692.
- Bertram, P.G., Choi, J.H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T.F., and Zheng, X.F.S. (2000) Tripartite regulation of Gln3 by TOR, Ure2, and phosphatases. *J Biol Chem* 275: 35727-35733.
- Blinder, D., and Magasanik, B. (1995) Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J Bacteriol* 177: 4190-4193.

- Coffman, J.A., El Berry, H.M., and Cooper, T.G. (1994) URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATA-containing *UAS_{NTR}* element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176: 7476-7483.
- Coffman, J.A., Rai, R., and Cooper, T.G. (1995) Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177: 6910-6918.
- Coffman, J.A., Rai, R., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T.G. (1996) Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 847-858.
- Courchesne, W.E., and Magasanik, B. (1988) Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of *URE2* and *GLN3* genes. *J Bacteriol* 170: 708-713.
- Hinnebusch, A.G. (1986) The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit Rev Biochem* 21: 277-289.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Myers, A.M., Tzagaloff, A., Kinney, D.M., and Lusty, C.J. (1986) Yeast shuttle integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* 45: 299-310.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G., and Marton, M.J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21: 4347-4368.
- Pries, R., Bomeke, K., Irmiger, S., Grundmann, O., and Braus, G.H. (2002) Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus. *Eukaryotic Cell* 1: 663-672.
- Rai, R., Genbauffe, F.S., and Cooper, T.G. (1988) Structure and transcription of the allantoate permease gene (*DAL5*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 170: 266-271.
- Rose, M., and Botstein, D. (1983) Construction and use of gene fusions *lacZ* (-galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods Enzymol* 101: 247-260.
- Stanbrough, M., and Magasanik, B. (1996) Two transcriptional factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178: 2465-2468.
- Struhl, K., and Davis, R.W. (1981) Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152: 535-552.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P., and González, A. (1998) Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180: 3533-3540.
- Valenzuela, L., Aranda, C., and González, A. (2001) TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* 183: 2331-2334.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.

