

Tesis Doctoral

Regulación de la expresión del gen UGA4 de *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a los aminoácidos extracelulares

Cardillo, Sabrina Beatriz

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cardillo, Sabrina Beatriz. (2011). Regulación de la expresión del gen UGA4 de *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a los aminoácidos extracelulares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Cardillo, Sabrina Beatriz. "Regulación de la expresión del gen UGA4 de *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos moleculares involucrados en la respuesta a los aminoácidos extracelulares". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *UGA4* DE
Saccharomyces cerevisiae: MECANISMOS MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A LOS AMINOÁCIDOS
EXTRACELULARES**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Sabrina Beatriz Cardillo

Director de Tesis: Dra. Susana Correa García
Director Asistente: Dra. Mariana Bermúdez Moretti
Consejero de Estudios: Dra. Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación Génica en Levaduras,
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, abril de 2011

Regulación de la Expresión del Gen *UGA4* de *Saccharomyces cerevisiae*: Mecanismos Moleculares Involucrados en la Respuesta a los Aminoácidos Extracelulares

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de incorporar y metabolizar el ácido γ -aminobutírico (GABA) gracias a los productos de tres genes: *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*. El primero de ellos, *UGA4*, codifica para una permeasa específica de GABA que es capaz de incorporar este aminoácido a las células. Luego, el GABA puede ser degradado por las enzimas GABA transaminasa y succinato semialdehído deshidrogenasa, codificadas por los genes *UGA1* y *UGA2*, respectivamente. Estos genes son inducibles por GABA y esta inducción depende de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81. Estudios previos reportaron que la inducción del gen *UGA4* se ve afectada por la presencia de aminoácidos en una forma dependiente del sensor SPS.

En este trabajo demostramos no sólo que el sensor SPS interviene en la regulación por leucina del gen *UGA4*, sino que también los factores Stp1 y Stp2 intervienen en esta regulación. En presencia de leucina, se observó un menor reclutamiento de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor *UGA4*, lo que sería la causa de la menor inducción observada en esas condiciones. Por otra parte, se demostró que esta alteración en la interacción de dichos factores con el promotor *UGA4* es causada por una señal disparada por el sensor SPS. Ambos factores, Uga3 y Uga35/Dal81, actúan a través del elemento UAS_{GABA} presente en el promotor de *UGA4* y dependen uno del otro para poder interactuar con dicho elemento. Más aún, nuestros resultados sugieren que el factor de transcripción Uga35/Dal81 interactúa con el promotor *UGA4* a través del factor Uga3. Por otra parte, se demostró que la inducción de la expresión de los otros genes miembros del regulón *UGA*, *UGA1* y *UGA2*, es también inhibida por aminoácidos en una forma dependiente del sensor SPS y que esta regulación ocurre muy probablemente a través del mecanismo establecido para *UGA4*. Por último, demostramos que el factor de transcripción Leu3 regula negativamente la expresión de los genes *UGA4* y *UGA1* pero no interviene en la regulación de *UGA2*.

Palabras clave: *UGA4*, GABA, leucina, sensor de aminoácidos SPS.

Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *UGA4* Gene Expression: Molecular Mechanisms Involved in the Response to Extracellular Amino Acids

Saccharomyces cerevisiae yeast cells are able to transport and metabolize γ -aminobutyric acid (GABA) using the product of three genes: *UGA4*, *UGA1* and *UGA2*. The first one, *UGA4*, encodes a GABA specific permease, while the other two genes, *UGA1* and *UGA2*, encode the GABA transaminase and semialdehyde dehydrogenase enzymes, both responsible for GABA degradation. These genes are inducible by GABA and this induction depends on Uga3 and Uga35/Dal81 transcription factors. Previous reports demonstrated that *UGA4* induction is inhibited by the presence of extracellular amino acids being this effect mediated by the SPS amino acid sensor.

In this work we demonstrated that the effect of leucine on *UGA4* induction is not only mediated by the SPS sensor, but also by the Stp1 and Stp2 transcription factors. Uga3 and Uga35/Dal81 recruitment to *UGA4* promoter was affected by the presence of leucine, which would be the reason of the low induction levels observed in these conditions. We also demonstrated that the low recruitment of these transcription factors to the *UGA4* promoter was mediated by a signal triggered by the SPS amino acid sensor. Both transcription factors, Uga3 and Uga35/Dal81, act through the UAS_{GABA} element present in the *UGA4* promoter and they depend on each other to interact with that element. In addition, our results suggest that the Uga35/Dal81 transcription factor interacts with the *UGA4* promoter through Uga3. Moreover, we demonstrated that the induction of the other two members of the *UGA* regulon, *UGA1* and *UGA2*, is also inhibited by extracellular amino acids by the same mechanism we established for *UGA4*. Finally, we demonstrated that the Leu3 transcription factor negatively regulates *UGA4* and *UGA1* expression, but does not participate in *UGA2* regulation.

Key words: *UGA4*, GABA, leucine, SPS amino acid sensor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la FCEN por haberme formado como bióloga y haberme dado un lugar para realizar mi tesis de doctorado. También quiero agradecer al CONICET por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este doctorado.

En especial les quiero agradecer a la Dra. Susana Correa García y a la Dra. Mariana Bermúdez Moretti (las jefas) por haberme abierto las puertas de su laboratorio. Gracias por confiar en mí, por escucharme, por discutir conmigo hasta el último resultado, por alentarme cuando las puestas a punto parecían imposibles, por enseñarme a pensar y a hacer ciencia. Por mostrarme qué cosas son importantes en la vida y demostrarme día a día que ningún tropezón es caída. Gracias por hacerme sentir como en casa todos los días...

Gracias a todos los integrantes pasados y presentes del laboratorio de Regulación Génica en Levaduras sin los que estos cinco años no hubieran sido lo mismo. A Toti, Guille, Nico y Charly con quienes pude compartir por mucho tiempo más que una mesada. Gracias por las largas charlas (científicas y no tan científicas), por su ayuda desinteresada, sus palabras de aliento, su compañía hasta altas horas de la noche y principalmente por su amistad. Gracias por hacerme un lugarcito en sus vidas. A los peques: Cari, Cristian y al Chinito, por haber traído tanta alegría al laboratorio cuando realmente se necesitaba. Gracias por su voluntad de ayudar, por acompañarme en este último año del doctorado y por compartir tantas cosas conmigo.

También quiero agradecer a la Dra. Alejandra Guberman por su inagotable generosidad, energía y buena onda. Gracias por su ayuda y su confianza. A sus becarios, Noe, Clau y Ari, por hacer que nuestro laboratorio y el de células madre parezca uno solo. A Charly, gracias por tu amistad y por seguir acompañándome y ayudándome.

También quiero agradecer a la Dra. Elba Vazquez por su increíble buen humor y generosidad y a la Dra. Adriana de Siervi por sus consejos y por contestar pacientemente cada una de mis preguntas. También a los integrantes de su laboratorio: Cristian, Pao, Belén, Flor, Mechi, Felipe, Daiana, Javi, Angie y Geraldine. Gracias por haber convertido al CM1 en un lugar increíble para trabajar. A Pao gracias por el apoyo y por venir a hacerme compañía cada vez que se me hacía tarde.

Gracias a la Dra. Adalí Pecci y a la Dra. Edith Kordon y a todos los integrantes de su laboratorio: Diego, Pao, Vicky, Leo, Esteban, Luciana, Naty, Sol, Joy, Andrés, Anita, Anitita, Dieguito, Lautaro, Nadia, Carolina, Yanina, Popi y Martín. Gracias a ustedes también por la buena onda y por la ayuda.

También quiero agradecer a todos los miembros del laboratorio de Biología Molecular y Transducción de señales de la FCEN por toda su ayuda: a las Dras. Silvia Rossi, Paula Portela y Silvia Moreno y muy especialmente a sus becarios: Jose, Coty, Lucas, Leti, Fiore, Richard, Vane y Nico.

A mi familia, por darme todo... a mamá, por hacer lo posible y también lo imposible para que pudiéramos hacer lo que nos gusta. Gracias por su apoyo y su eterna paciencia. A Ale por ser mucho más que mi hermana, por ser también mi amiga y porque sé que puedo contar con ella para lo que sea. A Javier, por haber traído tanta alegría a casa, a papá por estar cerca a pesar de estar lejos, a tía Lucy por su apoyo incondicional y por alentarme y contenerme siempre, a July, a mi Moni hermosa, a Ari y a Hemilce. Quiero agradecer muy especialmente a mis abuelas Queta y Pi que me guiaron y apoyaron desde que tengo memoria y por último a mi abuelo Coco porque aunque no esté más conmigo sigue vivo en mi recuerdo.

A Eli, Lu, Fiore, José, Pau y Joaquín, gracias por haber compartido esta carrera conmigo y por seguir hasta el día de hoy compartiendo conmigo su amistad. Gracias por las largas horas de estudio en la casita, por las charlas, los asados y las tardes de mate.

A Fiore, por haber transitado conmigo este camino desde el principio y por haber compartido conmigo alegrías y momentos difíciles. Gracias por haberme hecho un lugarcito en su vida y su familia.

A Sabri, por ser mi amiga desde hace tanto tiempo y por estar siempre lista para escucharme y aconsejarme.

A Diego... gracias por acompañarme durante esta etapa y darme siempre una palabra de aliento. Gracias por tu paciencia, tu buen humor, tu generosidad, y por tanto más.

Y gracias a todas las personas que no nombré pero que me acompañaron y apoyaron durante este tiempo...

A mi familia

INDICE

TRABAJOS PUBLICADOS	10
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCION	12
1. Generalidades	13
2. Metabolismo del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i>	14
2.1 Regulación del metabolismo del nitrógeno	15
2.1.1 Anabolismo	15
2.1.2 Catabolismo	16
3. El ácido γ -aminobutírico (GABA)	21
3.1 El GABA como fuente de nitrógeno	23
3.2 Catabolismo del GABA	24
3.3 Regulación transcripcional de los genes <i>UGA</i>	24
3.3.1 <i>UGA4</i>	24
3.3.2 <i>UGA1</i>	27
3.3.3 <i>UGA2</i>	27
4. Sensado de aminoácidos extracelulares: el camino de señalización SPS	28
4.1 El sensor SPS	28
4.2 Factores de transcripción efectores de la señal disparada por SPS	30
4.3 Modelo para el sensado de aminoácidos extracelulares	32
5. Factores de transcripción con motivos de dedos de zinc	33
5.1 Factores de clase I	33
5.1.1 Stp1 y Stp2	33
5.2 Factores de clase II	34
5.2.1 Factores GATA en <i>S. cerevisiae</i>	34
5.3 Factores de clase III	35
5.3.1 Uga3	37
5.3.2 Uga35/Dal81	37
5.3.3 Leu3	38
OBJETIVOS	42
Objetivo general	43
Objetivos particulares	43
MATERIALES Y METODOS	44
1. Cepas y medios de cultivo	45
1.1 Levaduras	45
1.2 Bacterias	46
2. Plásmidos	46
2.1 Estrategias utilizadas para la construcción de plásmidos	47
2.2 Extracción de DNA genómico	49
2.3 <i>Primers</i> y templados	49
2.4 Obtención de los fragmentos de ADN a clonar	50
2.5 Visualización y purificación de los fragmentos de PCR	51
2.6 Extracción y purificación de plásmidos	51
2.7 Reacciones de restricción	51
2.8 Reacciones de ligación	52
2.9 Preparación de bacterias competentes	52
2.10 Transformación de bacterias	52
2.11 <i>Screening</i> de las colonias	53
2.12 Mutagénesis dirigida	54
3. Transformación de levaduras	55
4. Construcción de cepas mutantes de levaduras	55
4.1 Obtención de fragmentos de ADN	55
4.2 Precipitación de los fragmentos de PCR	56

4.3	Transformación de levaduras	57
4.4	<i>Screening</i> de colonias	57
4.5	Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre.....	58
4.6	Plásmidos, <i>primers</i> y cepas parentales	59
5.	Ensayos de expresión	67
5.1	Ensayo del gen reportero <i>lacZ</i>	67
5.2	Medición de los niveles de ARN mensajero	68
5.2.1	Extracción de ARN	68
5.2.2	Retrotranscripción (generación de ADNc).....	68
5.2.3	PCR en tiempo real	69
6.	Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).....	70
6.1	Tratamientos	70
6.2	Fijación	71
6.3	Ruptura celular.....	71
6.4	Sonicado	71
6.5	Inmunoprecipitación	72
7.	<i>Western Blot</i>	74
7.1	Extracción de proteínas.....	74
7.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida	74
7.3	Transferencia de proteínas y revelado de la membrana.....	74
CAPITULO I.....		76
ANTECEDENTES		77
RESULTADOS		79
1.	Mutantes de delección.....	79
1.1	Reemplazo del gen de interés por un marcador de selección.....	79
1.2	Reemplazo del gen de interés por un marcador de selección y posterior escisión del mismo.....	81
2.	Cepas que expresan proteínas de fusión con el epítoto HA en el extremo C- terminal.....	83
3.	Cepas que expresan proteínas de fusión con el epítoto HA en el extremo N- terminal.....	85
4.	Intercambio de marcadores de selección.....	87
5.	Cepas auxótrofas para histidina.....	88
6.	Construcción de cepas por mutagénesis sitio-dirigida <i>in vivo</i> o " <i>Delitto</i> <i>Perfetto</i> ".....	89
7.	Construcción de la cepa que expresa la proteína Leu4 ^{fbr}	91
CAPITULO II.....		94
ANTECEDENTES		95
RESULTADOS		97
1.	El sensor SPS media el efecto negativo de los aminoácidos sobre la inducción del gen <i>UGA4</i>	97
2.	Análisis de la región regulatoria del gen <i>UGA4</i>	100
2.1	Búsqueda <i>in silico</i> de sitios consenso de unión de factores de transcripción.....	100
2.2	Estudio de los elementos presentes en la región regulatoria del gen <i>UGA4</i> involucrados en la respuesta a aminoácidos	102
3.	El factor de transcripción Leu3 actúa como represor sobre el elemento <i>UAS_{GABA}</i> del promotor <i>UGA4</i> de forma indirecta e independiente de α -IPM.....	108
4.	Gcn4 no interviene en la regulación del gen <i>UGA4</i> por leucina	114
5.	Los factores Stp1 y Stp2 están involucrados en la respuesta de <i>UGA4</i> a los aminoácidos extracelulares	116
6.	La unión de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor de <i>UGA4</i> depende de GABA y de leucina	117

7. Los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 se requieren mutuamente para la unión al promotor del gen <i>UGA4</i>	120
8. El dominio de unión al ADN Zn(II) ₂ -Cys ₆ de la proteína Uga35/Dal81 no es necesario para que cumpla su rol en la inducción por GABA del gen <i>UGA4</i>	122
9. Uga3 y Uga35/Dal81 se unen al promotor del gen <i>UGA4</i> a través de la secuencia central del elemento <i>UAS_{GABA}</i>	124
10. El factor Uga35/Dal81 estaría regulando jerárquicamente los procesos de inducción en los que participa.....	126
11. Leu3 interviene en el reclutamiento de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor del gen <i>UGA4</i>	128
CAPITULO III.....	132
ANTECEDENTES	133
RESULTADOS.....	135
1. La leucina causa un efecto negativo sobre la inducción de los genes <i>UGA1</i> y <i>UGA2</i> a través del sensor SPS.....	135
2. Los factores Uga3 y Uga35/Dal81 interactúan con los promotores de los genes <i>UGA1</i> y <i>UGA2</i> en una forma dependiente de GABA.....	136
3. El factor de transcripción Uga35/Dal81 cumple un rol similar en la inducción por GABA de los genes <i>UGA4</i> , <i>UGA1</i> y <i>UGA2</i>	138
4. El factor de transcripción Leu3 actúa como represor sobre el promotor del gen <i>UGA1</i> pero no sobre el promotor del gen <i>UGA2</i>	140
DISCUSION.....	143
APENDICE	157
1. Medios de cultivo	158
2. <i>Buffers</i>	158
3. Plásmidos	161
REFERENCIAS	171

TRABAJOS PUBLICADOS

Los resultados presentados en este trabajo dieron origen a las siguientes publicaciones:

Carlos Luzzani, Sabrina Beatriz Cardillo, Mariana Bermúdez Moretti and Susana Correa García. New insights into the regulation of *Saccharomyces cerevisiae UGA4* gene: two parallel pathways participate in carbon-regulated transcription. *Microbiology* (SGM) 153, 3677-84 (2007).

Sabrina Beatriz Cardillo, Mariana Bermúdez Moretti and Susana Correa García. Uga3 and Uga35/Dal81 transcription factors regulate *UGA4* transcription in response to gamma-aminobutyric acid and leucine. *Eukaryotic Cell* 9(8), 1262-71 (2010).

ABREVIATURAS

5-FOA: ácido 5-fluorótico
AcLi: Acetato de litio
ADN: ácido desoxiribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
BSA: seroalbúmina bovina
ClonNat: nourseotricina
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
G418: geneticina
GABA: ácido γ -aminobutírico
GFP: proteína verde fluorescente
HA: hemoaglutinina
lacZ: gen que codifica para la enzima β -galactosidasa
NCR: represión catabólica por nitrógeno
ONPG: orto-nitrofenilgalactopiranósido
PBS: buffer salino con fostatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEG: Polietilenglicol
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF: polivinilideno difluorido
RNAsa: enzima que degrada ácido ribonucléico
SDS: duodecil sulfato de sodio
SPS: sensor de aminoácidos
Taq: *Thermus aquaticus*
TAP: Tandem Affinity Purification
TEMED: N,N,N-tetrametilendiamina
TFL: 5'5'5'-trifluorleucina
UAS: secuencia activadora ubicada río arriba de la TATA Box
YNB: Yeast Nitrogen Base
 α -IPM: α -isopropilmalato

INTRODUCCION

1. Generalidades

Todos los organismos vivos se encuentran constantemente con el desafío de sentir el ambiente y responder de forma adecuada con el fin de sobrevivir y proliferar en diferentes nichos biológicos. Los procesos de recepción, transducción y respuesta ocurren secuencialmente y median las diferentes respuestas celulares. Los hongos, que comprenden uno de los tres principales reinos eucariotas, son excelentes modelos para estudiar el sentido del entorno extracelular debido a que poseen simples pero conservados caminos de señalización, que son a menudo equivalentes a los presentes en organismos eucariotas multicelulares (Bahn *et al.*, 2007).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, al igual que otros organismos, tiene la capacidad de aprovechar al máximo los distintos nutrientes y es capaz de adaptarse a situaciones de falta de los mismos para asegurar su supervivencia. Así, las levaduras son capaces de modificar sus estados metabólicos, transcripcionales y de ciclo celular en respuesta a la cantidad y/o calidad de los nutrientes disponibles (Zaman *et al.*, 2008). En los últimos años, la aplicación de la genómica y la proteómica en levaduras permitió ayudar a comprender cómo es la respuesta a los distintos nutrientes, no sólo a nivel global, sino también los mecanismos involucrados en dicha respuesta (Santangelo, 2006).

Este organismo eucariota no patogénico es fácilmente cultivable en el laboratorio y su manipulación genética es sencilla. En la actualidad existe una gran cantidad de protocolos y técnicas de manipulación genética aplicables en levaduras. Se encuentran disponibles colecciones de plásmidos que permiten realizar deleciones y fusiones a distintos epítopes (HA, GFP, etc) en regiones genómicas de interés. Por otra parte, existen también colecciones de cepas que expresan proteínas de fusión (GFP, TAP, etc) o que contienen deleciones de casi todos los marcos de lectura abiertos presentes en este organismo. Todas estas características convierten a la levadura *S. cerevisiae* en un organismo ampliamente utilizado como modelo experimental.

2. Metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*

Las dos fuentes de nutrientes básicas para los organismos celulares, carbono y nitrógeno, se utilizan para producir energía y sintetizar una amplia variedad de biomoléculas.

Las levaduras pueden utilizar casi 30 compuestos nitrogenados diferentes como fuente de nitrógeno, incluyendo aminoácidos, urea, amonio, bases nitrogenadas y derivados de purinas (Figura 1) (Godard *et al.*, 2007).

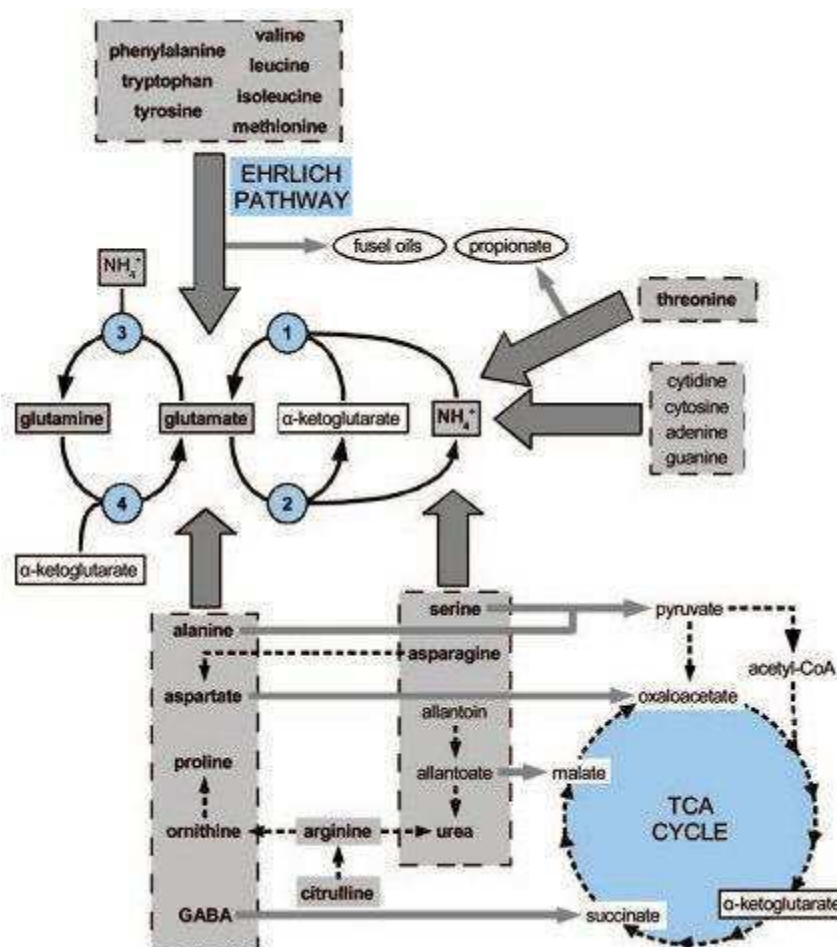


Figura 1. Principales reacciones involucradas en la utilización del nitrógeno en la levadura *S. cerevisiae*. Los rectángulos grises incluyen 27 fuentes de nitrógeno utilizables por *S. cerevisiae*. Las flechas grises representan caminos catabólicos que llevan a la producción de amonio o de glutamato. Las flechas punteadas representan caminos metabólicos que llevan a la producción de compuestos carbonados. Las enzimas involucradas en el camino metabólico central del nitrógeno y que asocian amonio, glutamato y glutamina están indicadas con números: (1) NADPH glutamato deshidrogenada (GDH1), (2) NAD^+ glutamato deshidrogenasa (GDH2), (3) glutamina sintetasa (GS) y (4) glutamato sintetasa (GOGAT). TCA cycle, ciclo de los ácidos tricarboxílicos; CoA, coenzima A (Godard *et al.*, 2007).

En el hábitat natural de la levadura *S. cerevisiae* existe una gran variedad de fuentes de nitrógeno disponibles. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno son capaces de favorecer el crecimiento de la misma manera. El crecimiento en fuentes ricas de nitrógeno permite alcanzar rendimientos mayores que los obtenidos cuando las células crecen en presencia de una fuente pobre. Fuentes ricas de nitrógeno son por ejemplo amonio, glutamina y asparagina mientras que prolina y urea, entre otras, se clasifican como fuentes pobres. Para poder utilizar estas moléculas como fuente de nitrógeno, las células necesitan convertirlas en glutamato y amonio, compuestos que luego pueden combinarse para formar glutamina. Ambos aminoácidos, glutamato y glutamina, sirven como compuestos donores de nitrógeno para la síntesis de todos los componentes celulares que contienen nitrógeno. La interconversión entre amonio, glutamato y glutamina juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno y se denomina metabolismo central del nitrógeno (CNM: Central Nitrogen Metabolism) (ter Schure *et al.*, 2000) (Figura 1).

2.1 Regulación del metabolismo del nitrógeno

Los procesos de transporte, anabolismo y catabolismo del nitrógeno están sujetos a un riguroso control de acuerdo a la calidad de la fuente de nitrógeno del medio. Este control actúa a nivel de la transcripción de genes y sobre la síntesis, actividad y/o degradación de enzimas y permeasas (Magasanik & Kaiser, 2002).

2.1.1 Anabolismo

Los controles transcripcionales de los genes involucrados en el anabolismo del nitrógeno son de dos tipos: específicos, los cuales afectan genes de un camino anabólico particular, y generales, los cuales afectan varias rutas biosintéticas de aminoácidos por medio del control general de la biosíntesis de aminoácidos (GAAC: General Amino Acid Control).

La biosíntesis de arginina, de los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina, valina), de metionina y de lisina son ejemplos de regulación transcripcional de una ruta biosintética específica (Godard *et al.*, 2007). El caso particular de la

biosíntesis de los aminoácidos ramificados se desarrollará más adelante en este trabajo.

En cuanto a los controles transcripcionales generales, el ayuno de aminoácidos dispara una señal que lleva a la fosforilación, mediada por la quinasa Gcn2, del factor eIF2 α (factor eucariota de iniciación 2). La fosforilación de este factor reduce su actividad, resultando en una reducción de los niveles traducionales a nivel global. Esto le permitirá a las células conservar recursos y reconfigurar el transcriptoma, aliviando así el estrés producido por la falta de nutrientes. La fosforilación del factor eIF2 α también causa una traducción preferencial del ARNm del factor de transcripción Gcn4. Este factor produce la activación de genes sujetos a GAAC, muchos de los cuales están involucrados en rutas biosintéticas de aminoácidos (Hinnebusch, 2005, Natarajan *et al.*, 2001).

2.1.2 Catabolismo

Al igual que los genes involucrados en el anabolismo del nitrógeno, los genes involucrados en el transporte y catabolismo también pueden ser regulados de dos formas: una específica, la cual sólo afecta un número limitado de genes, o una general, denominada represión catabólica por nitrógeno o NCR (Nitrogen Catabolite Repression). Las vías de utilización de compuestos nitrogenados como arginina, prolina, serina, treonina, urea, alantoína, ácido γ -aminobutírico (GABA) y aminoácidos aromáticos son ejemplos de regulación específica. Estos compuestos son capaces de inducir la transcripción de genes involucrados en su propia utilización (Godard *et al.*, 2007). La inducción de los genes involucrados en la utilización de GABA como fuente de nitrógeno será desarrollada más adelante.

Por otra parte, la represión catabólica por nitrógeno (NCR) es el proceso fisiológico por medio del cual se produce un uso selectivo de las fuentes de nitrógeno disponibles. Esta represión se alcanza principalmente por el control de la expresión de genes del catabolismo del nitrógeno (Cooper, 2002) (Figura 2). De esta forma, cuando una fuente rica de nitrógeno se encuentra disponible, la transcripción de ciertos genes involucrados en la utilización de fuentes más pobres de nitrógeno se encuentra reprimida y sus correspondientes productos

son inactivados y degradados (ter Schure *et al.*, 2000). Como se mencionó anteriormente, muchas veces las fuentes de nitrógeno se clasifican de acuerdo con el rendimiento en el crecimiento en presencia de esa determinada fuente de nitrógeno; sin embargo, estudios globales demostraron que dicha correlación no siempre se cumple. Por ejemplo, en presencia de glutamato y aspartato, el crecimiento es rápido pero la presión ejercida sobre los genes sensibles a NCR es parcialmente liberada (Godard *et al.*, 2007).

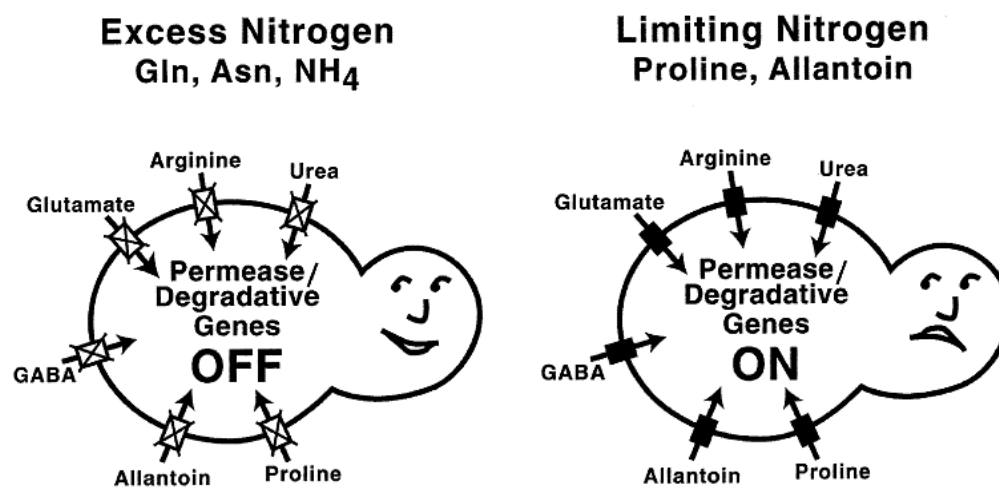


Figura 2. Esquema de los procesos que llevan a la utilización de fuentes pobres de nitrógeno en presencia o ausencia de fuentes ricas. En condiciones de exceso de nitrógeno, la transcripción de genes que codifican para las proteínas necesarias para el transporte y degradación de fuentes pobres de nitrógeno se encuentra reprimida (panel de la izquierda). Por el contrario, cuando la fuente rica de nitrógeno es limitante (o cuando sólo hay fuentes pobres) dichos genes se transcriben (panel de la derecha) (Cooper, 2002).

La expresión de genes sensibles a NCR es coordinada por la proteína Ure2 y por cuatro factores de transcripción de la familia GATA, dos de ellos positivos (Gln3 y Gat1/Nil1) y dos negativos (Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1) (Cooper, 2002, Magasanik, 2005, Magasanik & Kaiser, 2002).

La proteína Ure2 controla la transcripción mediada por Gln3, y en menor medida, la transcripción mediada por Gat1/Nil1 (Tate *et al.*, 2010). Si bien se ha demostrado la existencia de un complejo Ure2-Gln3, la formación del complejo Ure2-Gat1/Nil1 no ha sido demostrada aún (Blinder *et al.*, 1996, Beck & Hall, 1999, Bertram *et al.*, 2000). La formación del complejo Ure2-Gln3 depende de la actividad de las proteínas componentes del complejo TORC1 (*targets of*

rapamycin), Tor1 y Tor2 y de fosfatasa como Tap42, Sit4, PP2A. La fosfatasa PP2A puede existir como un heterotrímero formado por una subunidad catalítica (Php21/Php22), una proteína de anclaje (Tpd3) y una subunidad reguladora (Cdc55 o Rts1) (Tate et al., 2010, Georis *et al.*, 2008).

Se ha postulado que los niveles intracelulares de glutamina/glutamato afectan la actividad del complejo TORC1; este complejo, a su vez, controla la localización de Gln3 regulando su estado de fosforilación y/o el estado de fosforilación de Ure2 (Tate *et al.*, 2006). En condiciones de exceso de nitrógeno, TORC1 fosforila a Tap42 (*Tor associated protein*). Tap42 en estado fosforilado puede asociarse con la fosfatasa Sit4. El complejo Tap42-Sit4 unido a TORC1 es inactivo y, por lo tanto, incapaz de desfosforilar a Gln3. En condiciones limitantes de nitrógeno o bajo tratamiento con rapamicina (donde se inhibe el complejo TORC1), el complejo Tap42-Sit4 se libera y Sit4 se activa. Luego, por acción de la fosfatasa PP2A, Tap42 y Sit4 se separan. El complejo Tap42-Sit4 libre es el responsable de desfosforilar al factor GATA Gln3, lo que produce su disociación de Ure2. La forma no fosforilada de Gln3 transloca al núcleo donde activa la expresión de los genes regulados por nitrógeno (Tate & Cooper, 2007) (Figura 3).

Así, en presencia de una fuente rica de nitrógeno, Gln3 y Gat1/Nil1 se localizan mayoritariamente en el citoplasma y la expresión de genes sensibles a NCR se encuentra reprimida. En presencia de una fuente pobre de nitrógeno o luego de tratar a las células con rapamicina, Gln3 y Gat1/Nil1 tienen localización nuclear y la expresión de genes sensibles a NCR se desreprime (Tate et al., 2010).

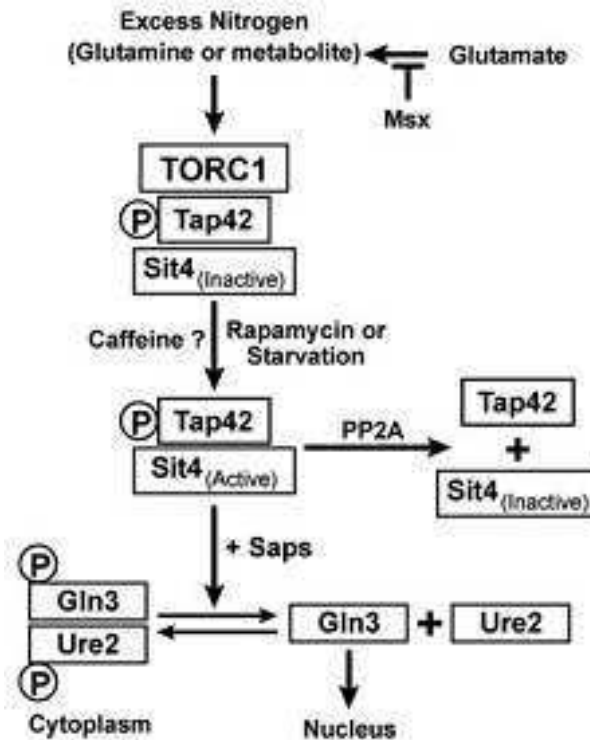


Figura 3. Modelo de la vía de señalización de TORC1 (Tate & Cooper, 2007).

Sin bien este es el modelo más aceptado, presenta algunas contradicciones. Existen evidencias que indican que células creciendo en fuentes pobres de nitrógeno, o tratadas con metilsulfoximina (Msx; un inhibidor de la enzima glutamina sintetasa), presentan una localización nuclear de Gln3 fosforilado. Es decir, no siempre existe una correlación entre los niveles de fosforilación y la localización subcelular de Gln3 (Tate *et al.*, 2005). Otros experimentos demuestran que el tratamiento con rapamicina no produce los mismos efectos que el ayuno de nitrógeno; por ejemplo, se puede destacar que los patrones de fosforilación de Gln3 obtenidos por ayuno de nitrógeno y por rapamicina son diferentes (Cox *et al.*, 2004). Recientemente se demostró que las diferencias observadas en los patrones de fosforilación de la proteína Gln3, así como también de la proteína Gat1/Nil1, en respuesta a tratamientos con rapamicina o al crecimiento en presencia de fuentes pobres de nitrógeno, se deben a una actividad diferencial de las distintas fosfatasa intervinientes en la regulación (Figura 4) (Tate *et al.*, 2010, Georis *et al.*, 2008).

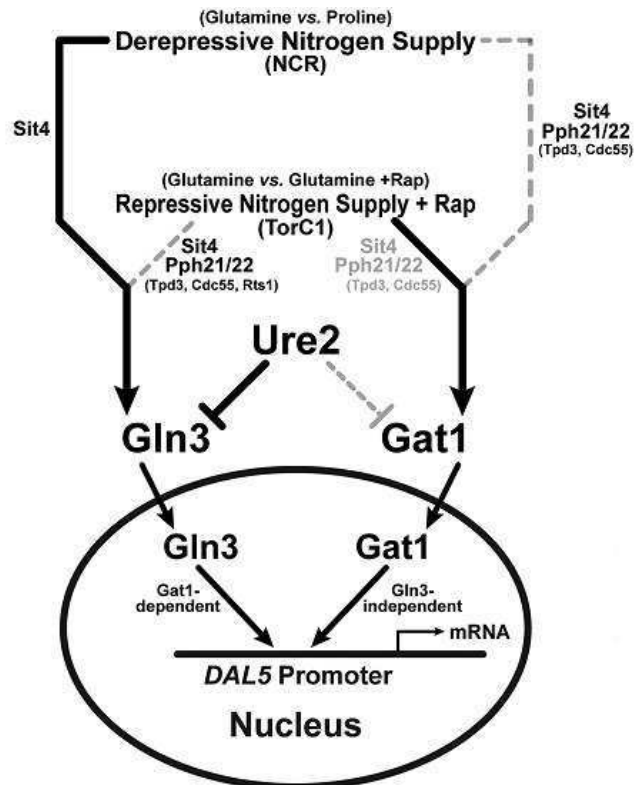


Figura 4. Esquema que resume los requerimientos de las fosfatasa Sit4 y Pph21/22-Tdp3-Cdc55/Rts1 para la localización intracelular de Gln3 y Gat1/Nil1 en respuesta a las fuentes de nitrógeno disponibles y al tratamiento con rapamicina. Las líneas negras y grises representan regulación fuerte o débil, respectivamente. Las letras negras y grises representan requerimientos fuertes o débiles de las fosfatasa, respectivamente (Tate et al., 2010).

Además de la acción de los dos factores GATA positivos, los factores GATA negativos, Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1, modulan la expresión de genes sensibles a NCR. Gzf3/Deh1 parece inhibir la expresión de genes en condiciones de represión por nitrógeno (Soussi-Boudekou *et al.*, 1997), mientras que Uga43/Dal80 limita la activación de genes sensibles a NCR en presencia de fuentes pobres de nitrógeno (Cunningham *et al.*, 2000).

Una característica interesante de los factores GATA es la regulación transcripcional de sus genes mediada por otros miembros de la familia GATA (Cooper, 2002) (Figura 5). Esto se cumple para *GAT1/Nil1*, *GZF3/DEH1* y *UGA43/DAL80* pero no para *GLN3*, el cual se expresa constitutivamente (Georis *et al.*, 2009, Cooper, 2002).

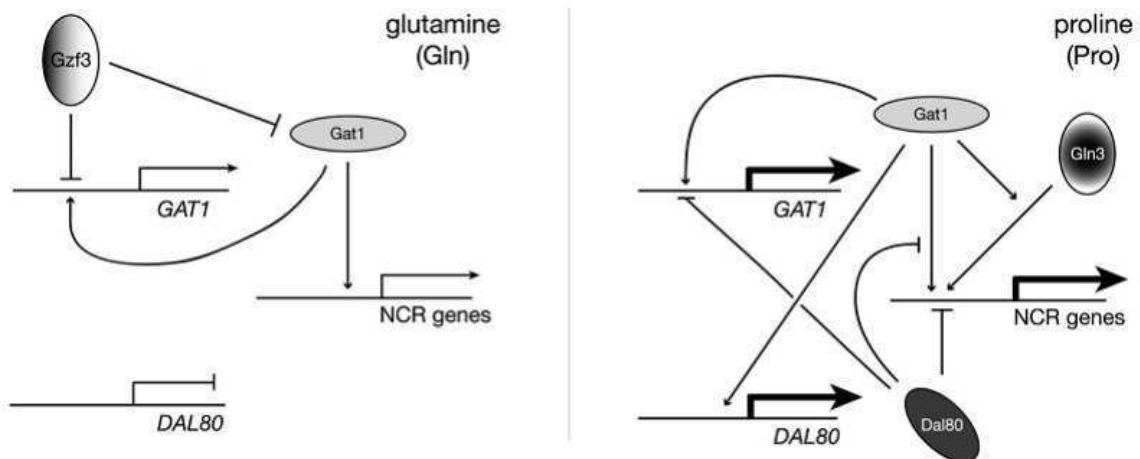


Figura 5. Esquema de la autoregulación de los factores GATA y la regulación sobre la expresión de genes sensibles a NCR (Georis et al., 2009).

En un principio se había postulado que los factores GATA negativos y positivos competían por los sitios de unión al ADN presentes en los promotores de los genes blanco y el resultado de esta competencia llevaba a niveles de expresión dependientes de la fuente de nitrógeno (Coffman *et al.*, 1997, Soussi-Boudekou et al., 1997). Sin embargo, recientemente se demostró que en presencia de una fuente rica de nitrógeno como glutamina, Gzf3/Deh1 se encuentra formando un homodímero capaz de secuestrar a Gat1/Nil1 en el núcleo y por ende inhibiendo su acción (Georis et al., 2009). Estos resultados indican la existencia de un mecanismo de control adicional a la regulación transcripcional entre los factores GATA.

3. El ácido γ -aminobutírico (GABA)

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrado tanto en bacterias como en plantas y vertebrados. Se lo descubrió en tubérculos de papa hace más de medio siglo pero la mayor parte de los estudios se focalizaron en vertebrados luego de que se descubrió su función como neurotransmisor clave para el sistema nervioso

central y como hormona o factor trófico en sistemas periféricos no neurológicos o endócrinos (Bouche & Fromm, 2004).

Existen evidencias experimentales que sugieren que el GABA es sintetizado en plantas como metabolito o molécula señal en respuesta a distintos tipos de estrés, incluyendo infecciones por patógenos, shock térmico, hipoxia, estrés hídrico, etc. Recientemente, también se ha sugerido que el GABA puede afectar la expresión de genes en plantas (Bach *et al.*, 2009).

En levaduras, también se ha vinculado al GABA con procesos de tolerancia al estrés (Bach *et al.*, 2009, Coleman *et al.*, 2001), aunque la mayor parte de los estudios realizados en este organismo están centrados en el uso del GABA como fuente de nitrógeno.

La regulación de los niveles de GABA en las células de levadura es consecuencia de un balance entre la síntesis, catalizada por la enzima glutamato decarboxilasa (cataliza la conversión de glutamato a GABA), y la degradación, catalizada por las enzimas GABA transaminasa y succinato semialdehído deshidrogenasa. Se ha reportado que mutaciones en las enzimas intervinientes en el metabolismo del GABA causan sensibilidad al estrés oxidativo, demostrando la importancia de esta ruta metabólica en la tolerancia a dicho estrés (Coleman *et al.*, 2001). Uno de los productos del catabolismo del GABA es el NADPH (Figura 6). El NADPH es esencial para el mantenimiento del balance redox normal en las células y es requerido para la reducción de glutatión y tiorredoxina, catalizada por las enzimas glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa, respectivamente. El mantenimiento apropiado de los niveles de antioxidantes tan importantes como el glutatión y el NADPH es crucial para la resistencia normal al estrés oxidativo (Coleman *et al.*, 2001, Jamieson, 1998).

Por otra parte, una gran proporción del GABA consumido por las células no es catabolizado sino que es acumulado en algún compartimento celular, probablemente la vacuola (McKelvey *et al.*, 1990, Uemura *et al.*, 2004). Se propuso, además, que su acumulación puede tener una función fisiológica en mecanismos de tolerancia al estrés, de forma similar a lo que ocurre con la acumulación de arginina y prolina en la vacuola (Bach *et al.*, 2009).

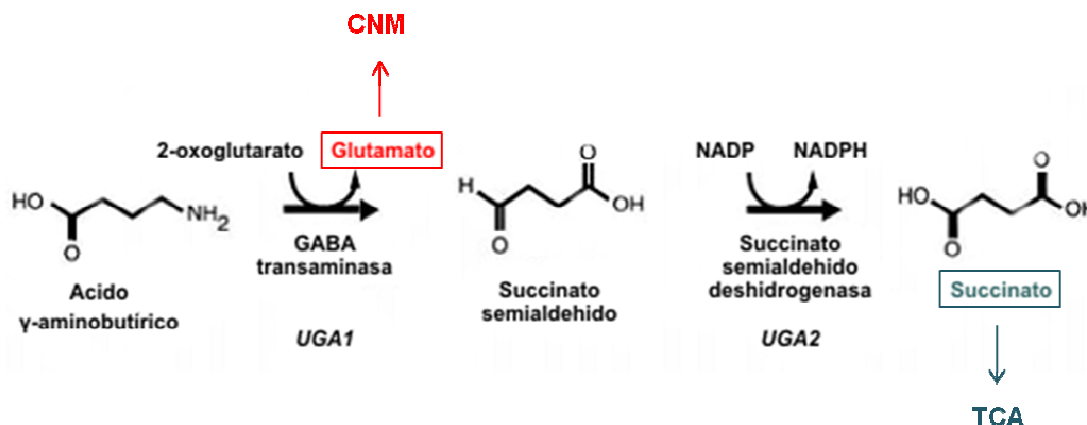


Figura 6. Esquema del camino catabólico del GABA. Representación esquemática de los productos obtenidos a partir del catabolismo del GABA, el destino de dichos productos, las enzimas participantes en las distintas reacciones y los genes que las codifican.

3.1 El GABA como fuente de nitrógeno

En el laboratorio, las células de levadura son capaces de crecer en medio mínimo utilizando GABA como única fuente de nitrógeno (Ramos *et al.*, 1985, Andre *et al.*, 1993). Fuera del laboratorio, el GABA es una de las tantas fuentes de nitrógeno disponibles en la naturaleza ya que, como se mencionó anteriormente, se distribuye en forma ubicua entre los seres vivos. El GABA también es importante para ciertos procesos industriales en los que se utiliza la levadura *S. cerevisiae*. Por ejemplo, en la industria vitivinícola el GABA, que representa el 20% del nitrógeno asimilable disponible en las uvas, influye en la acidez del vino debido al producto final de su degradación, el succinato (Bach, 2009). Otro ejemplo es la pasta de arroz *kome-koji*, materia prima fundamental en la fabricación de *sake*. En la elaboración de la pasta de arroz *kome-koji* se realiza un tratamiento con el hongo *Aspergillus oryzae* (*koji-kin*), el cual posee enzimas que convierten el almidón del arroz en azúcar que luego es utilizado por las levaduras como fuente de carbono en el proceso de fermentación. Al mismo tiempo, *A. oryzae* produce grandes cantidades de GABA (Kato *et al.*, 2002), convirtiendo a este aminoácido en mayoritario en la pasta de arroz *kome-koji* (Takahashi *et al.*, 2004), y por lo tanto siendo una de las principales fuentes de nitrógeno para las levaduras en este proceso.

3.2 Catabolismo del GABA

La incorporación de GABA a las células de *S. cerevisiae* es mediada por tres permeasas: la permeasa general de aminoácidos Gap1, la permeasa específica de prolina Put4 y la permeasa específica de GABA Uga4 (Andre et al., 1993, Grenson, 1987). Células deficientes en *GAP1*, *PUT4* y *UGA4* no crecen en medio mínimo conteniendo GABA como única fuente de nitrógeno debido a su incapacidad para incorporarlo (Grenson, 1987).

El gen *UGA1* codifica para la enzima GABA transaminasa (4-aminobutirato: 2-oxoglutarato aminotransferasa), la cual está involucrada en el primer paso catabólico, en donde el GABA es convertido en succinato semialdehído (SSA) y glutamato (Andre & Jauniaux, 1990b, Ramos et al., 1985). El SSA es tóxico para las células y su conversión a succinato es catalizada por la enzima succinato semialdehido deshidrogenasa, codificada por el gen *UGA2* (Coleman et al., 2001, Ramos et al., 1985) (Figura 6).

La capacidad de crecer en presencia de GABA como única fuente de nitrógeno se ve severamente comprometida en células *uga1Δ uga2Δ*, indicando la importancia funcional de los productos codificados por estos genes en la utilización del GABA y en el mantenimiento del flujo metabólico de glutamato en las células (Coleman et al., 2001, Ramos et al., 1985).

Las reacciones catabólicas del GABA llevan a la producción de glutamato y succinato; el primero sirve como donador de nitrógeno para la síntesis de componentes celulares nitrogenados, y el segundo puede ser catabolizado en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figuras 1 y 6).

3.3 Regulación transcripcional de los genes *UGA*

3.3.1 *UGA4*

La regulación de la expresión del gen *UGA4* es compleja y responde a variaciones en la disponibilidad de varios nutrientes necesarios para la supervivencia de las células. En primer lugar, la expresión de este gen es inducible por GABA, es decir que se expresa en presencia de dicho aminoácido (Vissers et al., 1989). La expresión del gen *UGA4* también se encuentra

regulada por NCR, por la fuente de carbono disponible, por el pH y por los aminoácidos extracelulares (Bermudez Moretti *et al.*, 2005, Luzzani *et al.*, 2007, Moretti *et al.*, 2001, Andre *et al.*, 1993). El efecto negativo de los aminoácidos sobre la inducción de *UGA4* es mediada por el sensor de aminoácidos SPS (Bermudez Moretti *et al.*, 2005).

La inducción dependiente de GABA del gen *UGA4* requiere la acción de dos factores de transcripción, uno específico, Uga3, y otro pleiotrópico, Uga35/Dal81. Ambos factores actúan a través de una secuencia activadora rica en nucleótidos GC denominada *UAS_{GABA}*, presente en el promotor *UGA4* (Figura 7), y son esenciales para la inducción de su expresión (Andre *et al.*, 1993). La secuencia central del elemento *UAS_{GABA}* está formada por un palíndromo perfecto de diez pares de bases con la secuencia 5'-CCGCCGGCGG-3' (Andre *et al.*, 1995, Talibi *et al.*, 1995, Cunningham *et al.*, 1994). A partir de ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA: Electromobility Shift Assay) utilizando sondas conteniendo la secuencia correspondiente a los elementos *UAS_{GABA}* de los promotores de *UGA4* y *UGA1*, se demostró interacción entre la proteína Uga3 y dichos elementos. Además se determinó que la secuencia consenso de unión del factor Uga3 es un palíndromo formado por dos sitios independientes de unión de Uga3, cada uno formado por la secuencia 5'-SGCGGNWWT-3 (S = G o C, W = A o T, y N = ningún nucleótido o G). También se reportó que ambos sitios de unión deben estar ocupados por el factor Uga3 para que ocurra la activación transcripcional *in vivo* (Idicula *et al.*, 2002, Noel & Turcotte, 1998).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo que lleva a la activación de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 en respuesta al GABA. Como los niveles de expresión de ninguno de estos dos factores se modifican en respuesta a este compuesto, se supone que la activación ocurre por medio de una modificación post-traducciona l de las moléculas que ya se encuentran en la célula (Andre, 1990).

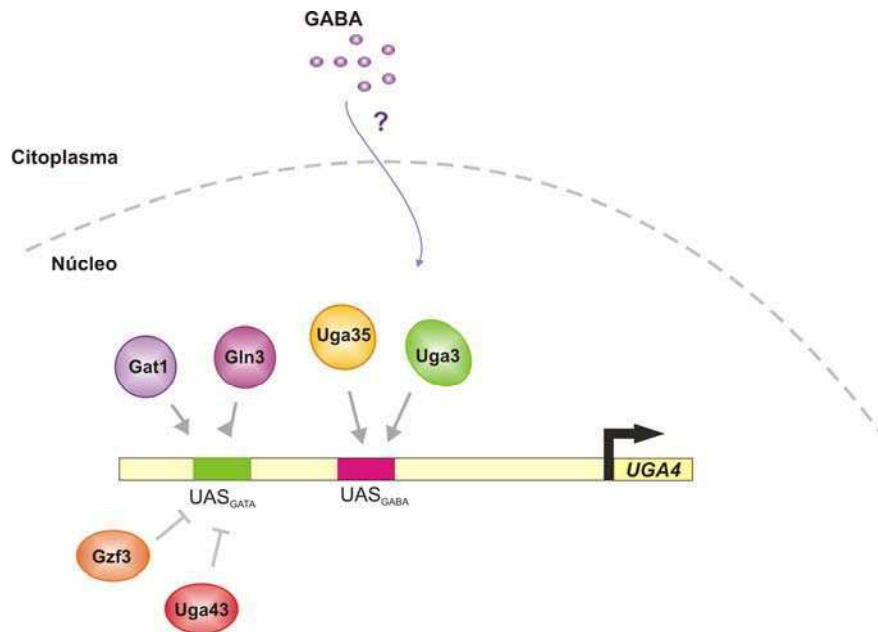


Figura 7. Factores de transcripción que actúan sobre la región promotora del gen *UGA4*.

Además, el gen *UGA4* es sensible a NCR, es decir que en presencia de una fuente rica de nitrógeno como por ejemplo amonio su expresión se encuentra reprimida, incluso en presencia del inductor GABA (Andre et al., 1993). Su promotor tiene nueve repeticiones 5'-GAT(A/T)A-3' o su reverso complementario 5'-T(T/A)ATC-3'. Cuatro de estas repeticiones se encuentran formando un *cluster* ubicado 28 pares de bases río arriba del elemento UAS_{GABA} , el cual constituye el elemento UAS_{GATA} , mientras que el resto de las repeticiones se distribuyen río abajo de dicho elemento. Sobre el elemento UAS_{GATA} pueden actuar los factores GATA positivos (Gln3 y Gat1/Nil1) y negativos (Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1) (Figura 7), regulando así la expresión de *UGA4* en respuesta a la fuente de nitrógeno disponible (Coffman et al., 1997, Soussi-Boudekou et al., 1997). En presencia de una fuente pobre de nitrógeno como prolina, Gln3 se transloca al núcleo y compite con Uga43/Dal80 por los sitios de unión presentes en el elemento UAS_{GATA} , favoreciendo la inducción por GABA del gen *UGA4* (Andre et al., 1995, Talibi et al., 1995). En estas condiciones, se ha observado que, en ausencia de Uga43/Dal80, se favorece el reclutamiento de los factores GATA positivos Gln3 y Gat1/Nil1 al promotor de

UGA4, justificando los valores altos de expresión observados en ausencia del factor Uga43/Dal80 (Georis et al., 2009).

Hasta el momento no se ha demostrado la participación del factor Gzf3/Deh1 en la regulación de *UGA4*. Esto probablemente sea consecuencia de que dicho factor parece ser funcional en condiciones de represión por nitrógeno (Soussi-Boudekou et al., 1997), condición bajo la cual los factores GATA positivos que actúan en la regulación de *UGA4* se encuentran retenidos en el citoplasma.

3.3.2 UGA1

En forma similar a lo descrito para el gen *UGA4*, la expresión de *UGA1* es inducible por GABA y esta inducción es mediada por los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 (Andre, 1990, Ramos et al., 1985, Talibi et al., 1995). El elemento UAS_{GABA} presente en el promotor de *UGA1* es similar al presente en el promotor de *UGA4* aunque su secuencia central está formada por un palíndromo imperfecto de secuencia 5'-CCGCGGGCGG-3' (Talibi et al., 1995, Cunningham et al., 1994).

El gen *UGA1* es altamente sensible a NCR (Coffman *et al.*, 1994) y su promotor contiene siete repeticiones 5'-GAT(A/T)A-3' o su reverso complementario 5'-T(T/A)ATC-3' (Talibi et al., 1995). La delección del factor GATA negativo Uga43/Dal80 genera niveles altos de expresión en ausencia de inductor (Talibi et al., 1995, Cunningham et al., 1994, Daugherty *et al.*, 1993), mientras que la participación del factor GATA positivo Gln3 en esta regulación es controversial. Un grupo de investigación reportó una disminución del 60% en la inducción del gen *UGA1* en ausencia de Gln3 (Talibi et al., 1995), mientras que otro grupo reportó que dicho factor de transcripción no participa en la regulación de *UGA1* (Cunningham et al., 1994, Daugherty et al., 1993).

3.3.3 UGA2

La regulación transcripcional del gen *UGA2* es similar a la de los demás miembros del regulón *UGA*, es decir que su inducción por GABA requiere de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 y que la delección del factor Uga43/Dal80

produce expresión constitutiva (Coleman et al., 2001, Vissers *et al.*, 1990). El promotor de este gen contiene secuencias 5'-GAT(A/T)A-3' y es sensible a NCR (Coleman et al., 2001).

El promotor de este gen no contiene un elemento UAS_{GABA} , sino que contiene una sola copia de la secuencia consenso de unión del factor Uga3 5'-SGCGGNWWT-3' (Idicula, 2002). Si bien el factor Uga3 es capaz de unirse a dicho sitio consenso como monómero, se propuso que sólo cuando se une a ambos sitios consenso presentes en el elemento UAS_{GABA} de los genes *UGA1* y *UGA4*, ocurre la activación transcripcional *in vivo* (Idicula et al., 2002). Hasta el momento no se han llevado a cabo ensayos para estudiar la interacción de Uga3 con el promotor de *UGA2*, aunque es probable que ocurra, ya que la inducción del gen depende de este factor.

4. Sensado de aminoácidos extracelulares: el camino de señalización SPS

Las células de levadura dependen del camino de señalización SPS para responder a los aminoácidos extracelulares. El sensor de aminoácidos SPS, junto con los componentes que actúan río abajo del mismo, conforman una red regulatoria que controla la incorporación de aminoácidos a la célula por medio de la inducción de la transcripción de genes que codifican para permeasas de aminoácidos (Ljungdahl, 2009).

Se ha determinado un número importante de genes regulados por la actividad del sensor SPS y muchos de estos genes codifican para proteínas involucradas en el transporte de aminoácidos y péptidos, tales como *AGP1*, *BAP2*, *BAP3*, *DIP5*, *GNP1*, *TAT1*, *TAT2*, *PTR2* (Bernard & Andre, 2001a, Didion *et al.*, 1998, Forsberg *et al.*, 2001a, Kodama *et al.*, 2002).

4.1 El sensor SPS

El sensor SPS es un complejo proteico localizado en la membrana plasmática y está compuesto por tres proteínas, \underline{S} sy1, \underline{P} tr3 y \underline{S} sy5 (Forsberg & Ljungdahl, 2001). A pesar de compartir cierta homología con secuencias de permeasas de

aminoácidos, la proteína Ssy1 tiene características únicas. Esta proteína tiene un extenso dominio N-terminal orientado hacia el citoplasma que no se encuentra presente en otros miembros de la familia de permeasas de aminoácidos. Además, la proteína Ssy1 no interviene en la incorporación de aminoácidos (Didion *et al.*, 1998, Iraqui *et al.*, 1999, Gaber *et al.*, 2003). Se ha postulado que esta proteína sensa los aminoácidos extracelulares y que la unión del ligando causa cambios que oscilan entre una conformación de cara al exterior (forma activa) y una conformación de cara al interior celular (forma inactiva) (Wu *et al.*, 2006).

El dominio N-terminal de la proteína Ssy1 interactúa físicamente con otras dos proteínas, Ptr3 y Ssy5. Luego de la inducción por aminoácidos extracelulares, el receptor primario de aminoácidos, la proteína Ssy1, inicia la señal que, vía hiperfosforilación de Ptr3, resulta en la activación de la proteasa Ssy5. Esto lleva al procesamiento endoproteolítico de dos factores de transcripción denominados Stp1 y Stp2. Luego del procesamiento, estos factores ingresan al núcleo e inician la transcripción de genes de permeasas de aminoácidos (Wu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2008, Andreasson & Ljungdahl, 2002).

La proteasa Ssy5 es controlada por un proceso que se conoce como proteólisis activada por receptor (RAP: Receptor Activated Proteolysis) (Figura 8A). Tiene homología con una serina-proteasa y se expresa como un zimógeno, el cual se cliva a sí mismo dando como productos un prodominio N-terminal y un dominio catalítico (Cat) C-terminal. El prodominio y el dominio Cat permanecen asociados entre sí y además asociados al factor Stp1 latente, formando una proteasa inactiva pero catalíticamente competente (Andreasson *et al.*, 2006).

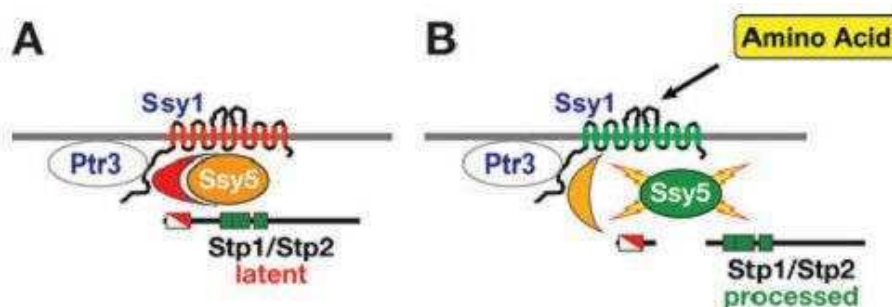


Figura 8. Esquema del fenómeno de proteólisis activada por receptor (RAP) (Ljungdahl, 2009)

Cuando los aminoácidos son sensados, la señal es transducida por las proteínas Ssy1 y Ptr3, resultando en un cambio conformacional del prodominio de Ssy5, que reduce su afinidad por el dominio Cat. Entonces, el dominio Cat procesa los factores Stp1 y Stp2 por clivado de sus extremos N-terminales (Figura 8B). Como consecuencia de la activación del sensor SPS, el prodominio es degradado vía proteasoma (Pfaffmann *et al.*, 2010).

El clivado de Stp1 y Stp2 mediado por el sensor SPS también requiere del complejo ubiquitina-ligasa SCF^{Grr1} E3 y de la actividad de las caseína-quinasas Yck (Yck1/2) (Abdel-Sater *et al.*, 2004a, Andreasson & Ljungdahl, 2004, Bernard & Andre, 2001b, Spielwoy *et al.*, 2004). Esto sugiere que cambios en los niveles de ubiquitinación y fosforilación de los componentes del sensor SPS están involucrados en la transducción de señales inducidas por aminoácidos. En varias oportunidades se ha observado que la fosforilación dependiente de Yck1/2 lleva a la poliubiquitinación de proteínas y su subsecuente degradación vía proteasoma. Estas observaciones, junto con los hallazgos que indican que el prodominio de la proteína Ssy5 es degradado vía proteasoma luego de la activación por aminoácidos del sensor SPS, han llevado a proponer que la fosforilación dependiente de Yck1/2 y la ubiquitinación mediada por Grr1 podrían estar gobernando la conformación del prodominio y por lo tanto, su actividad inhibitoria (Pfaffmann *et al.*, 2010).

4.2 Factores de transcripción efectores de la señal disparada por SPS

Como ya se mencionó, Stp1 y Stp2 son dos factores de transcripción que participan como efectores río abajo del sensor SPS en la vía de sensado de aminoácidos. Estos factores tienen funciones que se solapan y son parcialmente redundantes (Andreasson & Ljungdahl, 2002, de Boer *et al.*, 2000) Los genes *STP1* y *STP2* se generaron a partir de una duplicación completa del genoma en una levadura ancestral y divergieron funcionalmente durante la evolución (Wielemans *et al.*, 2010). Ambos factores son sintetizados en el citoplasma como proteínas latentes con un dominio N-terminal de 10 kDa crucial para su actividad (Andreasson *et al.*, 2006). En ausencia de aminoácidos, Stp1 y Stp2 se encuentran en el citoplasma. Cuando se agregan

aminoácidos al medio de cultivo, estos factores son activados por remoción endoproteolítica de sus dominios N-terminales y translocan al núcleo donde se unen a secuencias conocidas como UAS_{aa} presentes en algunos promotores. Las secuencias UAS_{aa} consisten en al menos dos copias del tetranucleótido 5'-CGGC-3' separadas por entre tres y seis nucleótidos y son las secuencias blanco de la señal disparada por el sensor SPS en respuesta a los aminoácidos extracelulares (De Boer *et al.*, 1998, Abdel-Sater *et al.*, 2004b).

Los mecanismos para retener en el citoplasma a las formas latentes de Stp1 y Stp2 no son absolutamente eficientes. Como parte de un segundo punto de control, existen tres proteínas presentes en la membrana nuclear interna, Asi1, Asi2 y Asi3, que impiden que las formas no procesadas de Stp1 y Stp2 que logran escapar a la retención citoplasmática lleguen a sus promotores blanco (Boban *et al.*, 2006, Zargari *et al.*, 2007). A diferencia de lo que ocurre en células *wild type* donde sólo las formas procesadas de Stp1 y Stp2 se unen a sus promotores blanco, en células deficientes en cualquiera de los genes *ASI*, las formas latentes no procesadas de Stp1 y Stp2 son capaces de unirse a sus promotores blanco, provocando una activación constitutiva de los genes regulados por el sensor SPS, aún en ausencia de aminoácidos o en ausencia de un sensor SPS funcional (Boban *et al.*, 2006, Zargari *et al.*, 2007, Forsberg *et al.*, 2001b). Es interesante destacar que las proteínas Asi no influyen en los mecanismos de retención en citoplasma de los factores Stp1 y Stp2 sino que actúan manteniendo el camino de señalización SPS en un estado reprimido en ausencia de aminoácidos. Así, dos mecanismos independientes impiden la actividad de Stp1 y Stp2, uno es la retención citoplasmática y el otro es la represión dependiente de Asi. Ambos mecanismos ejercen sus efectos regulatorios vía el dominio N-terminal de estos factores (Boban *et al.*, 2006, Zargari *et al.*, 2007).

Otro factor de transcripción importante para la inducción de genes regulados por SPS es la proteína Uga35/Dal81 (Bernard & Andre, 2001a, Iraqui *et al.*, 1999, Abdel-Sater *et al.*, 2004b). Se ha demostrado que la presencia de este factor es necesaria para la transcripción dependiente de aminoácidos de la permeasa de aminoácidos *AGP1*, debido a que favorece la interacción del factor Stp1 con el promotor *AGP1* (Boban & Ljungdahl, 2007).

4.3 Modelo para el sensado de aminoácidos extracelulares

El modelo actualmente aceptado para el camino de señalización SPS propone que en ausencia de aminoácidos (Figura 9A), el sensor SPS se encuentra en una conformación de pre-activación, los factores de transcripción Stp1 y Stp2 son sintetizados como precursores inactivos que se localizan en el citoplasma debido a la presencia del dominio N-terminal, el cual actúa como un ancla en el citoplasma y las proteínas Asi inhiben la acción de moléculas de Stp1 y Stp2 no procesadas que hubieran escapado al mecanismo de retención citoplasmática. En presencia de aminoácidos extracelulares (Figura 9B), el sensor SPS es activado, lo que desencadena la actividad proteolítica intrínseca de Ssy5 que produce el procesamiento endoproteolítico de Stp1 y Stp2. Las formas procesadas de estos factores que carecen de sus dominios inhibitorios N-terminal entran al núcleo y se unen a los promotores de los genes que codifican para permeasas de aminoácidos a través de los elementos UAS_{aa} (Ljungdahl, 2009).

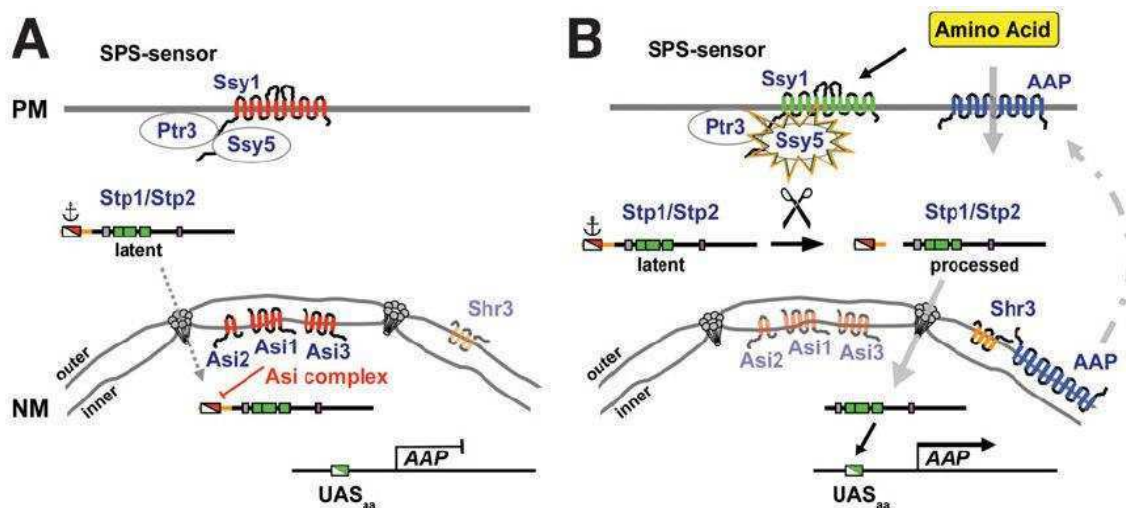


Figura 9. Esquema del sistema de sensado SPS. (A) Estado no inducido en ausencia de aminoácidos extracelulares. **(B)** Estado inducido en presencia de aminoácidos extracelulares. AAP: genes de permeasas de aminoácidos (Ljungdahl, 2009).

5. Factores de transcripción con motivos de dedos de zinc

La mayor parte de las proteínas que contienen zinc son factores de transcripción capaces de interactuar con el ADN y son llamadas proteínas con dedos de zinc. Estos factores pueden ser agrupados en tres clases (I, II y III) de acuerdo con sus motivos de unión a zinc.

5.1 Factores de clase I

Esta clase comprende proteínas con motivos Cys₂His₂ (C₂H₂) y es la clase de factores de transcripción más abundante dentro de los organismos eucariotas. Los factores de transcripción Sp1 de humanos, TFIIIA de *Xenopus laevis* y Stp1/Stp2 de *S. cerevisiae* son ejemplos de factores de transcripción con motivos C₂H₂. En general, estas proteínas contienen dos o más repeticiones del motivo C₂H₂ y cada unidad repetida interactúa con un átomo de zinc. Los miembros de esta clase se unen como monómeros a los ácidos nucleicos (MacPherson *et al.*, 2006).

5.1.1 Stp1 y Stp2

Como se mencionó anteriormente, las proteínas Stp1 y Stp2 son dos factores de transcripción homólogos que participan como efectores río abajo del sensor SPS en la vía de sensado de aminoácidos. Estos factores poseen tres dominios putativos de dedos de zinc C₂H₂ (residuos 160-187, 188-228 y 240-270 en Stp1 y residuos 204-226, 232-267, 284-309 en Stp2) y actúan sobre secuencias blanco que incluyen al menos dos copias del tetranucleótido 5'-CGGC-3' separadas por entre tres y seis nucleótidos (De Boer *et al.*, 1998, Abdel-Sater *et al.*, 2004b)

En la Figura 10 se muestra un esquema de los dominios presentes en la proteína Stp1. El dominio N-terminal de las proteínas Stp1 y Stp2, el cual es removido endoproteolíticamente como consecuencia de la activación del sensor SPS, posee dos regiones conservadas, región I y región II, que son requeridas para el control del estado latente. La región I (residuos 16-35 para Stp1 y 13-72 para Stp2) tiene un alto contenido de aminoácidos ramificados y

es necesaria para la retención citoplasmática y la exclusión de los promotores. Su delección lleva a una desrepresión constitutiva de los genes regulados por SPS, independientemente del procesamiento del factor de transcripción. La región II (residuos 65-97 para Stp1 y 73-105 para Stp2) es necesaria para la unión de Stp1 y Stp2 a Ssy5, y por ende para el procesamiento proteolítico inducido por aminoácidos (Andreasson & Ljungdahl, 2004).

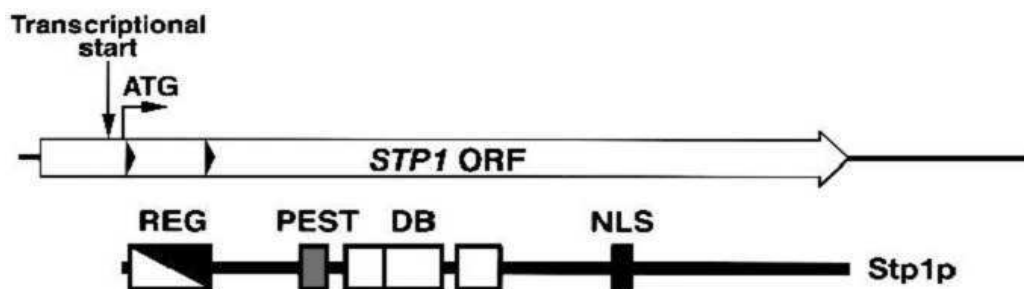


Figura 10. Diagrama esquemático de la proteína Stp1. En la proteína se pueden distinguir un dominio regulador (REG), una región PEST (posible señal para la degradación proteolítica), un dominio de unión al ADN (DB) y una señal de localización nuclear (NLS: Nuclear Localization Signal) (Andreasson & Ljungdahl, 2002).

5.2 Factores de clase II

Esta clase, dentro de la cual se puede incluir a los factores GATA, comprende proteínas con dominios Cys_4 (C_4). Estos factores en general tienen una unidad de dedos de zinc por la que reconocen repeticiones invertidas como homodímeros y repeticiones directas como heterodímeros (MacPherson et al., 2006).

5.2.1 Factores GATA en *S. cerevisiae*

Los factores GATA son una clase de factores de transcripción que se encuentran presentes tanto en hongos como en plantas y animales. El dominio de unión al ADN de estos factores comprende una unidad de dedos de zinc formado por cuatro residuos de cisteína seguidos por un dominio básico terminal. Estos factores se unen a motivos en el ADN denominados GATA GAT(T/A)A, presentes en las regiones regulatorias de sus genes blanco. La

familia de factores de transcripción GATA en *S. cerevisiae* tiene al menos ocho miembros (MacPherson et al., 2006, Scazzocchio, 2000).

Los factores GATA Gln3, Gat1/Nil1, Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1 de *S. cerevisiae* tienen un motivo C₄ con un consenso C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C (Coffman *et al.*, 1996, Minehart & Magasanik, 1991, Soussi-Boudekou et al., 1997, Stanbrough *et al.*, 1995).

Los dos factores GATA positivos, Gln3 y Gat1/Nil1, difieren de los negativos, Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1, en que poseen una región homóloga rica en asparagina, ubicada a doscientos residuos del extremo N-terminal (Stanbrough et al., 1995). Por otra parte, Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1 comparten un motivo cierre de leucina en su extremo C-terminal, que no está presente en Gat1/Nil1 ni en Gln3, y que puede ser el responsable de la capacidad que poseen esas proteínas de homo o heterodimerizar (Svetlov, 1998). Dado que los cuatro factores regulan la expresión de muchos genes y que Gln3 y Uga43/Dal80 pueden unirse al mismo UAS_{GATA} (Coffman et al., 1997), se ha postulado que los factores GATA negativos compiten por la unión a la secuencia blanco con los factores GATA positivos (Cooper, 2002).

5.3 Factores de clase III

Las proteínas de esta clase son exclusivas de los hongos y contienen dominios de unión al ADN formados por seis residuos de cisteína (C₆) unidos a dos átomos de zinc, por lo que se les da el nombre de *clusters* binucleados de zinc o Zn(II)₂-Cys₆ (Zn₂C₆). Los factores de transcripción Gal4, Uga3, Uga35/Dal81 y Leu3 son ejemplos de factores de transcripción con motivos Zn(II)₂-Cys₆. Estas proteínas tienen la particularidad de que contienen sólo una unidad de dedos de zinc que une dos átomos de zinc. Como la mayor parte de los factores de transcripción, estas proteínas contienen varios dominios funcionales además del dominio de unión al ADN rico en cisteínas, incluyendo un dominio regulatorio y un dominio de activación (MacPherson et al., 2006) (Figura 11).



Figura 11. Dominios funcionales en proteínas con *clusters* de zinc ($\text{Zn(II)}_2\text{-Cys}_6$). Se pueden distinguir tres dominios funcionales: el dominio de unión a ADN (DBD), el dominio regulatorio y la región acídica. El DBD se puede subdividir en tres regiones: el dedo de zinc, la región *linker* y el dominio de dimerización. Estas regiones contribuyen a la especificidad de unión al ADN y a las interacciones ADN-proteína y proteína-proteína (MacPherson et al., 2006).

Muchos estudios muestran que las proteínas con *clusters* de zinc reconocen elementos relacionados que contienen secuencias de tres nucleótidos en forma simple o repetida y en forma simétrica o asimétrica. Estos triplete generalmente son CGG, aunque se han reportado variantes. Las proteínas con *clusters* de zinc pueden unirse como homodímeros a tripletes CGG que están orientados en repeticiones directas, invertidas o evertidas. También pueden unirse al ADN como monómeros y heterodímeros (MacPherson et al., 2006) (Figura 12).

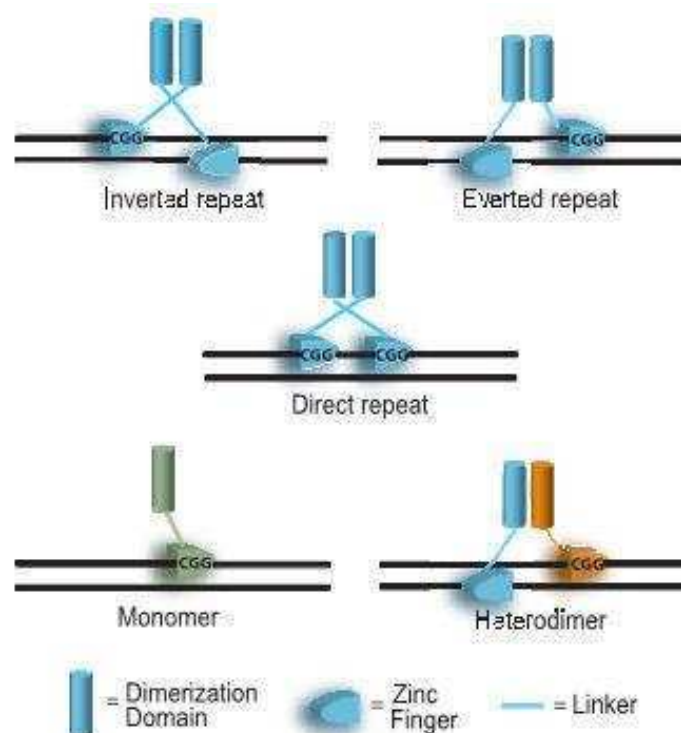


Figura 12. Modelo para la unión de proteínas con *clusters* de zinc ($\text{Zn(II)}_2\text{-Cys}_6$) al ADN (MacPherson et al., 2006).

5.3.1 Uga3

Uga3 es un factor específico en la regulación de la transcripción de los genes *UGA* involucrados en el transporte y catabolismo del GABA y es esencial para la inducción dependiente de GABA de dichos genes (*UGA1*, *UGA2* y *UGA4*) (Andre, 1990, Vissers *et al.*, 1990). Esta proteína contiene un dominio de dedos de zinc de tipo C₆ (Zn(II)₂-Cys₆) (residuos 17-44), una señal de localización nuclear (residuos 55-62) y un dominio ácido C-terminal presente también en dominios de activación de otras proteínas con *clusters* de zinc. Mutaciones en el dominio Zn(II)₂-Cys₆ de la proteína Uga3 resultan en una pérdida de su actividad (Talibi *et al.*, 1995).

El factor Uga3 reconoce secuencias que contienen tripletes CGG. Se ha demostrado que los nucleótidos que se encuentran alrededor de los tripletes CGG, la orientación de estos tripletes y la cantidad de nucleótidos entre dichos tripletes son importantes para el reconocimiento de la secuencia por un determinado factor. Por ejemplo, los factores de transcripción Leu3 y Uga3 reconocen una región con repeticiones CGG evertidas y espaciadas por cuatro bases, pero Leu3 no reconoce secuencias blanco de Uga3 ni Uga3 de Leu3, ya que la especificidad estaría dada por los nucleótidos localizados entre los tripletes CGG (Noel & Turcotte, 1998). Además, los nucleótidos que flanquean el motivo CCG-N4-CGG también son esenciales para la unión *in vitro* de Uga3 y para la activación transcripcional de sus genes blanco (Idicula *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que mutaciones en la glicina de la posición 224 o en la glicina de la posición 451 de Uga3 son suficientes para que esta proteína sea capaz de activar constitutivamente la expresión de los genes *UGA* en ausencia de inductor (Andre, 1990).

5.3.2 Uga35/Dal81

El factor Uga35/Dal81 posee un rol sinérgico e importante en la amplificación de la expresión inducida de genes de varias vías para la utilización de fuentes de nitrógeno. Así, Uga35/Dal81 es requerido para la inducción por GABA de los genes *UGA* (utilización de GABA) (Vissers *et al.*, 1990, Coornaert *et al.*, 1991) y

para la inducción por alofanato de los genes *DUR* y *DAL* (degradación de urea y alantoína) (Turoscy & Cooper, 1982, Jacobs *et al.*, 1980). En ambos procesos, Uga35/Dal81 actúa junto con un factor de transcripción específico de inductor, como por ejemplo Uga3 (inducción por GABA) (Andre, 1990) y Dal82/DurM (inducción por alofanato) (Olive *et al.*, 1991, Jacobs *et al.*, 1980, Andre & Jauniaux, 1990a). También actúa junto con Stp1 para la inducción del gen *AGP1* (inducción por aminoácidos) (Abdel-Sater *et al.*, 2004b, Boban & Ljungdahl, 2007). Cada uno de estos pares de factores de transcripción actúa a través de un elemento *UAS* específico de regulación (Talibi *et al.*, 1995, Dorrington & Cooper, 1993, Abdel-Sater *et al.*, 2004b). Así, Uga35/Dal81 actúa junto con varios factores de transcripción específicos de inductor a través de elementos *UAS* específicos para promover la inducción de la transcripción de genes de la utilización de nitrógeno en respuesta a distintos estímulos.

La proteína Uga35/Dal81 contiene un dominio de dedos de zinc de tipo C₆ (Zn(II)₂-Cys₆) (residuos 150-179) y dos motivos de poliglutamina (residuos 73 a 94 y 227 a 237). Deleciones en el dominio Zn(II)₂-Cys₆ de esta proteína no afectan su función en la activación de los genes *DUR1* y *DUR2*, medida indirectamente a través de la actividad de la enzima urea amidoliasa (Bricmont *et al.*, 1991). Una situación similar se describió para la proteína TamA de *Aspergillus nidulans*. Esta proteína es similar a Uga35/Dal81 y está involucrada en la expresión de genes en respuesta a compuestos nitrogenados, entre ellos GABA (Davis *et al.*, 1996).

Por otra parte, se observó que el dominio de poliglutamina presente en la proteína Uga35/Dal81 (posición 73 a 94) es esencial para la inducción por alofanato de la actividad de la enzima urea amidoliasa (Bricmont *et al.*, 1991).

5.3.3 Leu3

Leu3 es un regulador transcripcional que controla la expresión de los genes *ILV2*, *ILV5*, *ILV3*, *LEU4*, *LEU9*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *BAT2*, todos involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Zhou & Kohlhaw, 1990, Friden & Schimmel, 1988) (Figura 13). También participa en la regulación de la transcripción de la permeasa de aminoácidos ramificados *BAP2* (Nielsen *et al.*,

2001) y del gen *GDH1*, responsable principalmente de la asimilación de amonio (Hu *et al.*, 1995). Sin embargo, por medio de estudios globales, se ha demostrado la regulación por Leu3 de más genes, lo que ha permitido considerar a Leu3 como un regulador más general (Tang *et al.*, 2006, Boer *et al.*, 2005).

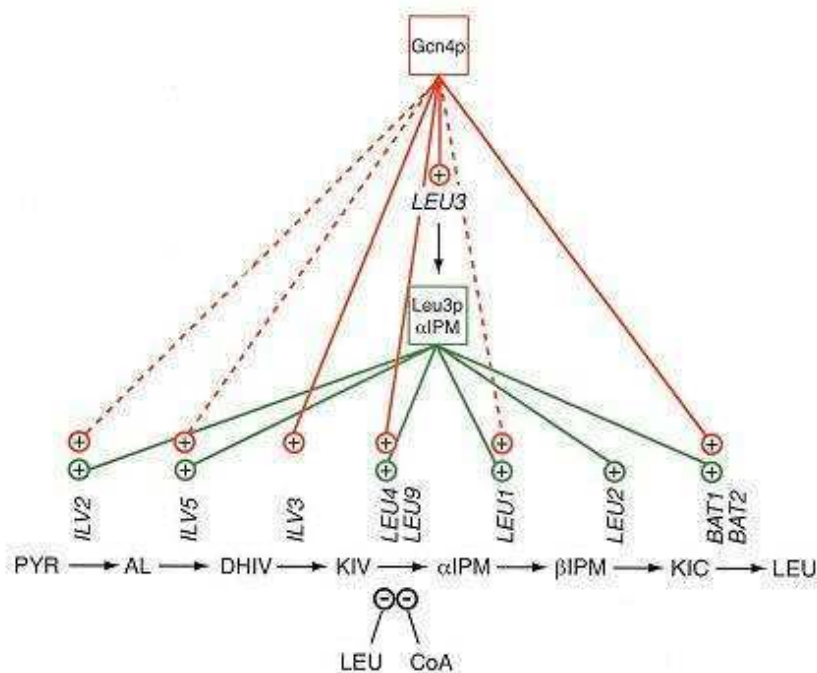


Figura 13. Esquema de los mecanismos regulatorios que afectan la ruta de la biosíntesis de la leucina en *S. cerevisiae* (Kohlhaw, 2003).

La proteína Leu3 contiene un dominio de unión al ADN (DB) de tipo $Zn(II)_2-Cys_6$ localizado cerca del extremo N-terminal de la proteína (residuos 37 a 67) (Figura 14). También se distingue una región media de homología (MHR: Middle Homology Region) (residuos 300-380), la cual se encontró en varias proteínas con motivos $Zn(II)_2-C_6$, y un dominio de activación transcripcional (AD) (residuos 857-875) (Kohlhaw, 2003).

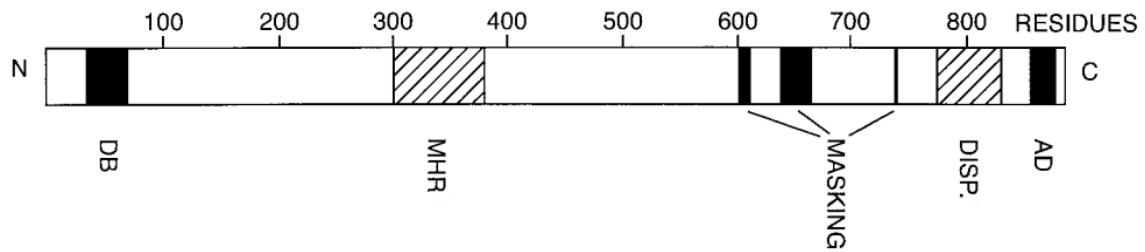


Figura 14. Diagrama esquemático de la proteína Leu3 (Kohlhaw, 2003).

La actividad de este factor de transcripción, que tiene la capacidad de actuar como represor o como activador, está modulada por la concentración intracelular del intermediario de la biosíntesis de leucina, el α -isopropilmalato (α -IPM). La región en la proteína Leu3 responsable de enmascarar la función de activador o “*self masking region*” se localiza entre los residuos 604 y 741 (Figura 14) (Friden *et al.*, 1989, Kohlhaw, 2003, Wang *et al.*, 1999, Zhou *et al.*, 1990). El α -IPM sirve como sensor de los niveles intracelulares de leucina, ya que cuando su concentración es elevada, Leu3 actúa como un activador transcripcional. Por el contrario, a bajas concentraciones o en ausencia de α -IPM, Leu3 actúa como un represor de la transcripción (Sze *et al.*, 1992). Se ha propuesto que Leu3 estaría unido a sus sitios regulatorios en el ADN y su activación ocurriría a través de un cambio conformacional o una modificación post-traducciona (Kirkpatrick & Schimmel, 1995).

La enzima α -IPM sintasa codificada por el gen *LEU4*, cataliza la formación de α -IPM y está sujeta a inhibición por *feedback* por leucina. A su vez, la acumulación de α -IPM depende de la relación intracelular de acetil CoA/CoA, que depende del estado metabólico de las células (Kohlhaw, 2003).

Como Uga3, el factor Leu3 reconoce secuencias que contienen repeticiones evertidas del triplete CGG (Noel & Turcotte, 1998) y se une al ADN en forma de homodímero (Kohlhaw, 2003, Sze & Kohlhaw, 1993).

Por otra parte, la expresión de Leu3 se encuentra bajo el control general de aminoácidos (GAAC) (Zhou *et al.*, 1987) y su expresión es regulada positivamente por Gcn4 (Natarajan *et al.*, 2001, Harbison *et al.*, 2004, Kohlhaw, 2003) (Figura 13). También se ha sugerido que *GCN4* es un blanco directo de

Leu3, es decir que entre ambos factores existe una mutua retroalimentación positiva (Tang et al., 2006).

Los resultados presentados en esta tesis contribuyeron al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que llevan a la regulación por aminoácidos del regulón *UGA*, en particular del gen *UGA4*, mediada por el sensor SPS y del rol de los factores de transcripción Uga3, Uga35/Dal81, Leu3, Gcn4, Stp1 y Stp2 en esta regulación.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo fue contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la transducción de señales disparadas por los aminoácidos extracelulares sobre el gen *UGA4*.

Objetivos particulares:

Objetivo 1: Identificar las regiones regulatorias presentes en el promotor del gen *UGA4* involucradas en la respuesta a los aminoácidos extracelulares.

Objetivo 2: Identificar los factores de transcripción que participan en la regulación del gen *UGA4* por aminoácidos extracelulares.

Objetivo 3: Analizar la interacción entre el promotor de *UGA4* y los factores de transcripción responsables de la regulación por GABA y aminoácidos.

Objetivo 4: Evaluar si los otros miembros del regulón *UGA*, *UGA1* y *UGA2*, comparten el mecanismo de regulación establecido para *UGA4*.

MATERIALES Y METODOS

1. Cepas y medios de cultivo

1.1 Levaduras

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo (Tabla 1) son isogénicas con la cepa *wild type* Σ 1278b.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Parental	Primers	Referencia
Σ 1278b	<i>Mata</i>	-	-	(Bechet <i>et al.</i> , 1970)
23344c	<i>Mata ura3</i>	-	-	M.Grenson
30995b	<i>Mata ura3 ssy1Δ::kanMX2</i>	-	-	(Bernard & Andre, 2001b)
FB90	<i>Mata ura3 ssy5Δ::kanMX2</i>	-	-	(Bernard & Andre, 2001b)
FB98	<i>Mata ura3 ptr3Δ::kanMX2</i>	-	-	(Bernard & Andre, 2001b)
KW018	<i>Mata ura3 stp1Δ</i>	-	-	(Wielemans <i>et al.</i> , 2010)
KW021	<i>Mata ura3 stp2Δ</i>	-	-	(Wielemans <i>et al.</i> , 2010)
KW023	<i>Mata ura3 stp1Δ stp2Δ</i>	-	-	(Wielemans <i>et al.</i> , 2010)
26790a	<i>Mata ura3 uga3Δ</i>	-	-	(Talibi <i>et al.</i> , 1995)
FA050	<i>Mata ura3 uga35Δ::kanMX2</i>	-	-	(Abdel-Sater <i>et al.</i> , 2004b)
SBCY01	<i>Mata ura3 leu3Δ::kanMX4</i>	23344c	F/R- <i>leu3</i>	Este trabajo
SBCY02	<i>Mata ura3 LEU3-3HA-kanMX6</i>	23344c	F/R- <i>LEU3</i> -Tag	Este trabajo
SBCY03	<i>Mata ura3 gcn4Δ::kanMX4</i>	23344c	F/R- <i>gcn4</i>	Este trabajo
SBCY04	<i>Mata ura3 leu4Δ::loxp</i>	23344c	F/R- <i>leu4</i>	Este trabajo
SBCY05	<i>Mata ura3 leu4Δ::loxp leu5Δ::kanMX4</i>	SBCY04	F/R- <i>leu5</i>	Este trabajo
SBCY08	<i>Mata ura3 his3::kanMX leu4Δ::loxp</i>	SBCY04	Plásmido M3929	Este trabajo
SBCY09	<i>Mata ura3 6HA-LEU3</i>	23344c	F/R-Tag- <i>LEU3</i>	Este trabajo
SBCY10	<i>Mata ura3 6HA-UGA35</i>	23344c	F/R-Tag- <i>UGA35</i>	Este trabajo
SBCY13	<i>Mata ura3 6HA-UGA3</i>	23344c	F/R-Tag- <i>UGA3</i>	Este trabajo
SBCY17	<i>Mata ura3 uga35Δ::natMX4</i>	FA050	F/R-ME	Este trabajo
SBCY18	<i>Mata ura3 ssy1Δ::natMX4</i>	30995b	F/R-ME	Este trabajo
SBCY20	<i>Mata ura3 uga35Δ::natMX4 leu3Δ::kanMX4</i>	SBCY17	F/R- <i>leu3</i>	Este trabajo
SBCY22	<i>Mata ura3 leu3Δ::kanMX4 6HA-UGA3</i>	SBCY13	F/R- <i>leu3</i>	Este trabajo
SBCY23	<i>Mata ura3 leu3Δ::kanMX4 6HA-UGA35</i>	SBCY10	F/R- <i>leu3</i>	Este trabajo
SBCY24	<i>Mata ura3 ssy1Δ::natMX4 6HA-UGA35</i>	SBCY18	F/R-Tag- <i>UGA35</i>	Este trabajo
SBCY25	<i>Mata ura3 uga35Δ::natMX4 6HA-UGA3</i>	SBCY17	F/R-Tag- <i>UGA3</i>	Este trabajo
SBCY26	<i>Mata ura3 ssy1Δ::natMX4 6HA-UGA3</i>	SBCY18	F/R-Tag- <i>UGA3</i>	Este trabajo
SBCY27	<i>Mata ura3 uga3Δ 6HA-UGA35</i>	26790a	F/R-Tag- <i>UGA35</i>	Este trabajo
SBCY28	<i>Mata ura3 uga4::URA3-kanMX</i>	23344c	F-Delitto P_UAS _{GABA}	Este trabajo
SBCY29	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut</i>	SBCY28	F/R- <i>UGA4</i> DP	Este trabajo
SBCY30	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}del</i>	SBCY28	F/R- <i>UGA4</i> DP	Este trabajo
SBCY31	<i>Mata ura3 UGA4-3HA-kanMX6</i>	23344c	F/R- <i>UGA4</i> -Tag	Este trabajo
SBCY33	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA3</i>	SBCY29	F/R-Tag- <i>UGA3</i>	Este trabajo
SBCY34	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA3</i>	SBCY30	F/R-Tag- <i>UGA3</i>	Este trabajo
SBCY35	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA35</i>	SBCY29	F/R-Tag- <i>UGA35</i>	Este trabajo

SBCY36	<i>Mata ura3 UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA35</i>	SBCY30	F/R-Tag-UGA35	Este trabajo
SBCY37	<i>Mata ura3 ssy1Δ::natMX4 UGA4-3HA-kanMX6</i>	SBCY18	F/R-UGA4-Tag	Este trabajo
XK14-15D	<i>Mata LEU4^{br} his4 ura1 MAL2 gal1 SUC</i>	-	-	G.B. Kohlhaw

Se utilizó YPD (ver Apéndice) como medio de mantenimiento. Para las cepas transformadas se utilizó el medio mínimo (MM) definido (pH 6,1) previamente descrito por Jacobs et al. (Jacobs et al., 1980), cuyas fuentes de carbono y nitrógeno son glucosa 3% y prolina 10 mM, respectivamente. Este medio se suplementó con leucina, fenilalanina, triptofano o metionina 1,3 mM, según el experimento.

El medio de cultivo sólido se preparó agregando agar 2%.

Los antibióticos geneticina (G418) y nourseotricina (ClonNAT) se agregaron en concentraciones finales de 200 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

Las placas conteniendo ácido 5-fluorótico (5-FOA) se prepararon agregando al medio mínimo 5-FOA 2 mg/ml y uracilo 24 µg/ml.

1.2 Bacterias

Para el crecimiento de las bacterias se utilizó medio LB (ver Apéndice) con el agregado o no de ampicilina en una concentración de 100 µg/ml.

El medio de cultivo sólido se preparó agregando agar 2%.

2. Plásmidos

En la Tabla 2 se resumen los plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Descripción	Referencia
YEp357	Plásmido para realizar ensayos de expresión de β-galactosidasa (ver Apéndice).	(Myers <i>et al.</i> , 1986)
YEp357-UGA4	Contiene al promotor del gen <i>UGA4</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	(García <i>et al.</i> , 2000)
YEp357-UASA	Contiene un fragmento del promotor del gen <i>UGA4</i> , que no incluye ni al elemento <i>UAS_{GATA}</i> ni al elemento <i>UAS_{GABA}</i> , clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-UAS_{GATA}Δ	Contiene un fragmento del promotor del gen <i>UGA4</i> , que no incluye al elemento <i>UAS_{GATA}</i> , clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-UAS_{GABA}mut	Contiene una versión mutada del promotor del gen <i>UGA4</i> donde se alteró por mutagénesis la región central del elemento <i>UAS_{GABA}</i> , clonada río arriba	Este trabajo

	del gen reportero <i>lacZ</i> .	
Yep357-UAS_{GABA}del	Contiene una versión mutada del promotor del gen <i>UGA4</i> donde se delecionó la región central del elemento <i>UAS_{GABA}</i> , clonada río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-BAP2	Contiene al promotor del gen <i>BAP2</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-AGP1	Contiene al promotor del gen <i>AGP1</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-UGA3	Contiene al promotor del gen <i>UGA3</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp357-UGA35	Contiene al promotor del gen <i>UGA35</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pRS413	Plásmido de clonado (ver Apéndice).	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
pSBC-LEU4^{br}	Contiene una versión mutada del gen <i>LEU4</i> (<i>LEU4^{br}</i>), que codifica para una enzima α -isopropilmalato sintasa resistente al <i>feedback</i> por leucina.	Este trabajo
p426-GPD	Plásmido para expresión de proteínas en levaduras bajo el control del promotor constitutivo <i>GPD</i> (ver Apéndice).	(Mumberg <i>et al.</i> , 1995)
pSBC-HA-UGA35	Contiene clonado el gen <i>UGA35</i> fusionado al epítipo HA en su extremo N-terminal bajo el control del promotor <i>GPD</i> .	Este trabajo
pPB67	Contiene una versión mutada del gen <i>UGA35</i> donde se delecionó el primer motivo de poliglutamina de la proteína Uga35.	(Bricmont <i>et al.</i> , 1991)
pPB68	Contiene una versión mutada del gen <i>UGA35</i> donde se delecionó el segundo motivo de poliglutamina de la proteína Uga35.	(Bricmont <i>et al.</i> , 1991)
pPB70	Contiene una versión mutada del gen <i>UGA35</i> donde se delecionó el motivo Zn(II) ₂ Cys ₆ de la proteína Uga35.	(Bricmont <i>et al.</i> , 1991)
pPB71	Contiene clonado el gen <i>UGA35</i> .	(Bricmont <i>et al.</i> , 1991)
pPB72	Contiene una versión mutada del gen <i>UGA35</i> donde se deleccionaron los dos motivos de poliglutamina de la proteína Uga35.	(Bricmont <i>et al.</i> , 1991)
pFA6a-KanMX4	Plásmido para la construcción de cepas de delección (ver Apéndice).	(Wach <i>et al.</i> , 1994)
pFA6a-3HA -KanMX6	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con tres epítopos HA en el extremo C-terminal (ver Apéndice).	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)
pUG6	Plásmido para la construcción de cepas de delección (ver Apéndice).	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)
pOM10	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con seis epítopos HA en el extremo N-terminal (ver Apéndice).	(Gauss <i>et al.</i> , 2005)
pSH47	Contiene al gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor <i>GAL1</i> (ver Apéndice).	(Guldener <i>et al.</i> , 2002)
pAG25	Plásmido para la construcción de cepas de delección (ver Apéndice).	(Goldstein & McCusker, 1999)
M3929	Plásmido para la construcción de cepas auxótrofas para histidina (ver Apéndice).	(Voth <i>et al.</i> , 2003)
pCORE	Plásmido para la construcción de cepas por mutagénesis sitio-dirigida <i>in vivo</i> .	(Storici <i>et al.</i> , 2001, Storici & Resnick, 2003)

2.1 Estrategias utilizadas para la construcción de plásmidos

- Clonado de las regiones regulatorias de los genes *UGA3*, *UGA35*, *BAP2* y *AGP1*

Se clonaron las regiones 5' regulatorias de los genes *UGA3* (-795 a +24, con respecto al codón de iniciación ATG), *UGA35* (-788 a +30, con respecto al codón de iniciación ATG), *BAP2* (-800 a + 21, con respecto al codón de iniciación ATG) y *AGP1* (-983 a + 18, con respecto al codón

de iniciación ATG) río arriba del gen *lacZ* en el plásmido *shuttle* YEp357 (Myers et al., 1986) (ver Apéndice).

- **Clonado de regiones del promotor de *UGA4***

Se clonaron distintos fragmentos de la región 5' regulatoria del gen *UGA4* río arriba del gen *lacZ* en el plásmido *shuttle* YEp357 (Myers et al., 1986). Para la construcción *UAS Δ -lacZ* se clonó el fragmento -385 a +15, con respecto al codón de iniciación ATG. Para la construcción *UAS_{GATA} Δ -lacZ* se clonó el fragmento -406 a +15, con respecto al codón de iniciación ATG.

- **Clonado del gen *LEU4*^{fbr} (pSBC-*LEU4*^{fbr})**

El plásmido pSBC-*LEU4*^{fbr} se construyó clonando un fragmento que contiene al promotor, a la región codificante y a la región 3' no codificante (-996 a +2016 con respecto al codón de iniciación ATG) del gen *LEU4*^{fbr} en el plásmido pRS413 (Christianson et al., 1992) (ver Apéndice).

- **Clonado del gen de fusión *HA-UGA35* (pSBC-*HA-UGA35*)**

El plásmido pSBC-*HA-UGA35* se construyó clonando un fragmento que contiene al epítotope HA y a la región codificante del gen *UGA35* en el plásmido p426-*GPD* (Mumberg et al., 1995) (ver Apéndice).

- **Mutagénesis dirigida**

Utilizando la técnica de mutagénesis dirigida (Strachan, 1999) se construyeron dos versiones mutantes del promotor del gen *UGA4* que se clonaron río arriba del gen *lacZ* en el plásmido *shuttle* YEp357. En la primera de las construcciones, denominada *UAS_{GABA}mut-lacZ*, se intercambiaron nueve pares de bases de la secuencia central del elemento *UAS_{GABA}*. Dicho cambio consistió en el reemplazo de purinas por pirimidinas y de pirimidinas por purinas. En el caso de la segunda construcción, denominada *UAS_{GABA}del-lacZ*, se delecionaron las nueve

pares de bases que habían sido intercambiadas en la construcción *UAS_{GABA}mut-lacZ*.

La metodología para llevar adelante esta estrategia se explica en el ítem 2.12.

2.2 Extracción de DNA genómico

Las células de un cultivo *overnight* en medio completo YPD, se cosecharon por centrifugación y se lavaron con 0,5 ml de agua destilada. Se agregó al *pellet* un volumen equivalente a 200 μ l de perlas de vidrio, 200 μ l de Buffer de Lisis (ver Apéndice) y 200 μ l de la mezcla fenol:cloroformo (1:1). Se agitó con *vortex* durante 4 minutos y se agregaron 200 μ l de *buffer* TE (ver Apéndice). Luego de centrifugar, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa para precipitar el ADN genómico y se centrifugó a máxima velocidad, descartando luego el sobrenadante. El precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol 70% frío, se dejó secar y se resuspendió en 200 μ l de *buffer* TE.

2.3 Primers y templados

Los promotores de los genes *UGA3* y *UGA35* se amplificaron por PCR utilizando los *primers* F/R-P_{UGA3} y F/R-P_{UGA35}, respectivamente. Para el clonado del promotor del gen *BAP2* se utilizaron los *primers* F-Eco_*BAP2* y R-Bam_*BAP2* y para el clonado del promotor del gen *AGP1* se utilizaron los *primers* F-Eco_*AGP1* y R-Bam_*AGP1*. Para la construcción *UAS_{GATA} Δ* se utilizaron los *primers* F-*GATA* Δ y R-Hind-*UGA4* y para la construcción *UAS* Δ , los *primers* F-*UAS* Δ y R-Hind-*UGA4*. En estos casos se utilizó ADN genómico de la cepa Σ 1278b como templado para la reacción de PCR.

El gen *LEU4^{fbr}* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa XK14-15D (gentilmente provista por el Dr. Anders Brandt (Carlsberg Laboratory, Copenhagen Valby, Denmark) utilizando los *primers* F/R-*LEU4^{fbr}*.

El gen de fusión HA-*UGA35* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa SBCY10 utilizando los *primers* F/R-Hind-HA-*UGA35*.

Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados para la construcción de plásmidos.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
F-P _{UGA3}	CGCGGAATCCCGGAATCACATTTGCCAAGA
R-P _{UGA3}	CGCGGATCCCAGCTTCTCCACGCCATAATT
F-P _{UGA35}	CGCGGAATTCTGAGGCAACATAACAATCACGC
R-P _{UGA35}	CGCGGATCCATTATCAGCTGGTGATTGGTG
F-Eco_BAP2	CGCGGAATTCAGCATTAATGCAAGTCGAGAA
R-Bam_BAP2	CGCGGATCCTCCTCAAAATCTTCTGAAGATAG
F-Eco_AGP1	CGCGGAATCCCTCAACCTACCATGGCAAAC
R-Bam_AGP1	CGCGGATCCAGACTTCGACGACGACATTGT
F-Mut	ACATAAAACATCTCGAAATTATTACTAATGGTTTTTGGCGCACGA
R-Mut	TCGTGCGCCAAAACCATTAGTAATAATTTTCGAGATGTTTTATGT
R-Del	ACATAAAACATCTCGAAATTGGTTTTTGGCGCACGA
F-Del	TCGTGCGCCAAAACCAATTTTCGAGATGTTTTATGT
F-Eco-UGA4	CGCGGAATTCGACAATTTCTTCAATCATTGAAATG
R-Hind-UGA4	CCCCAAGCTTCATACTCATTGTTAGTAATAATAAAT
F-GATAΔ	CGCGGAATCCCAAAAACCGCCGGCGCAATTT
F-UASΔ	CGCGAAATTCGAGATGTTTTATGTCATGTTGG
F-Eco-LEU4 ^{fbr}	CGCGGAATTCCTGCTCCTGCTTCATCG
R-Eco-LEU4 ^{fbr}	CGCGGAATCCGTCCTAACCAGCCAAAC
F-Hind-HA-UGA35	CCGAAGCTTATGTGCAGGTCGACAACCCCTT
R-Hind-HA-UGA35	CCGAAGCTTTCCATTTTACTTATGTGCTA
pIU	TGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
pID	TGGCGAAAGGGGATGTGCT
F-GPD prom	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG

2.4 Obtención de los fragmentos de ADN a clonar

Las reacciones de PCR tanto para el clonado de las regiones regulatorias de los genes *UGA3*, *UGA35*, *BAP2* y *AGP1* como para el clonado de los fragmentos del promotor del gen *UGA4* se realizaron en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, *primers* 0,5 μM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1,25 unidades/50 μl (Invitrogen) y 0,5 μg de templado. Para realizar un clonado direccionado, los extremos 5' de los *primers* tienen sitios de reconocimiento para dos enzimas de restricción diferentes que no cortan la secuencia que se quiere amplificar.

Para el clonado de los genes *LEU4^{fbr}* y *HA-UGA35* las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *Buffer* conteniendo magnesio

(Fermentas), dNTPs 0,2 mM, *primers* 0,5 μ M, *Taq Long Range* 1,25 unidades/50 μ l (Fermentas) y 0,5 μ g de templado.

2.5 Visualización y purificación de los fragmentos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1,2% con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de ADN en un transiluminador con luz UV. Luego se purificaron utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.6 Extracción y purificación de plásmidos

La extracción y purificación de ADN plasmídico se realizó a partir de un cultivo *overnight* de *E. coli* DH5 α en medio LB con ampicilina utilizando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.7 Reacciones de restricción

Tanto los productos de PCR purificados como los plásmidos YEp357, pRS413 y p426-*GPD* se sometieron a reacciones de restricción. Para todas las reacciones de digestión se puso a digerir 1 μ g de ADN con las enzimas de restricción correspondientes en las condiciones recomendadas por el fabricante. Para el clonado de los promotores de los genes *UGA3*, *UGA35* y *AGP1*, la digestión se realizó con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* y el *buffer BamHI* (Fermentas). Para las construcciones *UAS Δ* y *UAS_{GATA} Δ* , la digestión se hizo con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y se utilizó el *buffer R* (Fermentas). Para el clonado de *LEU4^{fbr}*, la digestión se hizo con la enzima *EcoRI* y se utilizó el *buffer EcoRI* (Fermentas). Para el clonado del gen *HA-UGA35* la digestión se hizo con la enzima *HindIII* y se utilizó el *buffer R* (Fermentas). Cada incubación fue de 3 horas a 37°C. Una vez finalizadas las reacciones de restricción, los plásmidos digeridos se trataron durante 30 minutos con fosfatasa alcalina (Promega). Antes de ligar, los fragmentos de PCR y los plásmidos digeridos se purificaron nuevamente utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) y

se cuantificaron en un gel de agarosa por comparación de intensidad de bandas con el marcador lambda *EcoRI/HindIII* (Promega).

2.8 Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l respetando una relación molar inserto:vector de 3:1. Los tubos se incubaron a 25°C durante 90 minutos. Como control se realizó paralelamente una ligación sin inserto. El contenido de cada tubo se utilizó para transformar bacterias.

2.9 Preparación de bacterias competentes

Las células de *E. coli* DH5 α se cultivaron *overnight* a 37°C en medio LB. Se inocularon 2 ml de este cultivo en 40 ml de LB y se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en 16 ml de CaCl₂ 50 mM y se incubaron a 4°C durante 15 minutos. Por último, se centrifugaron 2 minutos a 4°C, se resuspendieron en 3 ml de CaCl₂ 50 mM y glicerol 15% y se guardaron a -80°C.

2.10 Transformación de bacterias

En un tubo estéril se colocaron 100 μ l de bacterias competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* y 20 μ l de la reacción de ligación. Luego de 30 minutos de incubación a 4°C, las células se sometieron a un *shock* térmico a 42°C durante 2 minutos y se incubaron a 4°C durante 5 minutos. Luego se agregó 1 ml de medio LB y se dejó recuperar durante 1 hora a 37°C en agitación. Las células se centrifugaron y se sembraron en medio LB sólido con ampicilina 100 μ g/ml. En este medio sólo crecen aquellas bacterias que contienen al plásmido que posee la resistencia al antibiótico, seleccionándose así las células exitosamente transformadas.

2.11 *Screening* de las colonias

Para verificar que las colonias de bacterias resistentes a ampicilina contenían a los plásmidos con los insertos correspondientes, se realizó PCR *colony*. Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, *primers* 0,5 μ M, dNTPs 0,2 mM y Taq polimerasa 0,6 unidades/25 μ l (Invitrogen). Se picó la colonia que se deseaba analizar con un *tip* para utilizar como fuente de ADN molde. Para verificar la inserción de los fragmentos correspondientes en el plásmido YEp357, se utilizaron los *primers* pIU y pID (Tabla 3), los cuales hibridan a ambos lados del sitio múltiple de clonado del vector. Aquellas colonias que tenían el vector vacío debían dar un producto de 230 pares de bases en la reacción de PCR. El tamaño esperado para aquellas colonias que hubieran incorporado al vector conteniendo a los promotores de *UGA3*, *UGA35* o *BAP2* era de 1000 pares de bases, mientras que para las colonias que hubieran incorporado el vector conteniendo el promotor del gen *AGP1* el producto esperado era de aproximadamente 1200 pares de bases. En el caso de la construcción *UAS_{GATA} Δ* , el producto de PCR esperado era de aproximadamente 640 pares de bases y en el caso de la construcción *UAS Δ* , de 600 pares de bases.

Para verificar la incorporación de *LEU4^{ibr}* en el plásmido pRS413 se utilizaron los *primers* F/R-*LEU4^{ibr}* (Tabla 3). Las colonias que habían incorporado el vector con el inserto *LEU4^{ibr}* debían presentar un producto de 3092 pares de bases. Para verificar la incorporación del fragmento *HA-UGA35* en el plásmido p426-*GPD* se utilizaron los *primers* F-*GPD* prom (Tabla 3) y R-*UGA35* int (Tabla 5). Las colonias que habían incorporado el vector con el inserto *HA-UGA35* debían presentar un producto de 672 pares de bases.

Las células de las colonias que dieron positivo en el *screening* se guardaron en medio LB líquido con ampicilina conteniendo glicerol 15% a -80 °C.

Las secuencias de las regiones clonadas se verificaron por secuenciación.

2.12 Mutagénesis dirigida

Para la construcción $UAS_{GABA}mut-lacZ$ se utilizaron dos pares de *primers*, F-Mut con R-Hind-UGA4 y F-Eco-UGA4 con R-Mut (Tabla 3). Para la construcción $UAS_{GABA}del-lacZ$ se utilizaron los pares de *primers* F-Del con R-Hind-UGA4 y F-Eco-UGA4 con R-Del (Tabla 3). Se utilizó el plásmido YEp357-UGA4 como templado para la reacción de PCR (Garcia et al., 2000).

Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, *primers* 0,5 μ M, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1,25 unidades/50 μ l (Invitrogen) y 2 μ g de templado. Los fragmentos de PCR obtenidos para cada construcción se purificaron a partir de un gel de agarosa utilizando el *kit* de purificación *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante.

Ambos fragmentos purificados se combinaron en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM y Taq polimerasa 1,25 unidades/50 μ l (Invitrogen). Se desnaturalizó, se permitió la hibridación y se elongó utilizando los extremos 3' libres del heterodúplex. Una vez elongado el heterodúplex, se amplificó la secuencia utilizando los *primers* F-Eco-UGA4 y R-Hind-UGA4.

Los productos de PCR purificados y el plásmido YEp357 se sometieron a reacciones de restricción utilizando las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Luego se ligó y se transformaron células de *E. coli* competentes. El chequeo de colonias se realizó por PCR *colony* utilizando los *primers* pIU y pID (Tabla 3). Las colonias que habían incorporado el vector con el inserto debían presentar un producto de 830 pares de bases.

Las células de las colonias que resultaron positivas en el *screening* se guardaron a -80°C en medio LB líquido con ampicilina conteniendo glicerol 15%.

Las secuencias de las regiones clonadas se verificaron por secuenciación.

3. Transformación de levaduras

Se sembró 1 ml de cultivo *overnight* en 50 ml de medio YPD y se incubó con agitación a 30 °C. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4, las células se cosecharon, se lavaron con 20 ml de agua estéril, se resuspendieron en 12,5 ml de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M y se incubaron en agitación por 30 minutos. Luego, las células se cosecharon y se resuspendieron en 500 µl de solución de TE 1X/AcLi 0,1 M. A 50 µl de la suspensión celular se le agregó 1 µg de ADN plasmídico y 50 µg de ADN de espermatozoos de salmón. Se agitó bien y se incubó durante 30 minutos a 30 °C. Luego se agregaron 350 µl de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M/PEG 40% y se incubó 1 hora a 30 °C. Pasado este tiempo se realizó un *shock* térmico a 42 °C durante 5 minutos (Gietz & Woods, 2002). Las células se lavaron con 200 µl de TE 1X y se plaquearon en medio mínimo sin el agregado de uracilo o histidina según la transformación.

4. Construcción de cepas mutantes de levaduras

Todas las cepas generadas en este trabajo, excepto las SBCY08, SBCY28, SBCY29 y SBCY30, se construyeron utilizando la técnica de delección de genes basada en PCR (Wach, 1996, Wach et al., 1994) o versiones modificadas de la misma (Longtine et al., 1998, Guldener et al., 1996, Gauss et al., 2005, Goldstein & McCusker, 1999). La cepa SBCY08 se construyó usando la estrategia de intercambio de marcadores de selección (Voth et al., 2003). Las cepas SBCY28, SBCY29 y SBCY30 se construyeron utilizando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida *in vivo* (Storici et al., 2001).

En el Capítulo I de este trabajo de tesis se describe en detalle cada una de las estrategias empleadas para la construcción de estas cepas.

4.1 Obtención de fragmentos de ADN

Las reacciones de PCR para amplificar los fragmentos de ADN lineales conteniendo al marcador de selección deseado flanqueado por regiones de

homología al gen blanco se realizaron en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 1,5 mM, *primers* 0,5 μ M (Tabla 4), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 2,5 unidades/50 μ l (Invitrogen) y 0,5 μ g de templado.

Tabla 4. Primers para la construcción de cepas.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
Primers para la construcción de cepas por delección	
F- <i>leu3</i>	TGCAATTATGGAAGGAAGATCAGATTTTGTGGCGACTTCACACGTACGCTGCAGGTCGAC
R- <i>leu3</i>	GGACTTTAAACCTTGGGATTGAACGCAAATTCATTCATTAATAATCGATGAATTCGAGCTC
F- <i>gcn4</i>	TGTCTGCTCAAGAAAATAAATTAATAACAATAAAATGTCCCGTACGCTGCAGGTCGAC
R- <i>gcn4</i>	AATATAAAATAAAAGGTAATGAAATCAGCGTTCGCCAACTATCGATGAATTCGAGCTC
F- <i>leu4</i>	AAAGGATTCTCACACTAGAAGTTTACTGTAGACTTTTTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
R- <i>leu4</i>	TATAGAAAATAAATAGAAGCGAATAAGTCCTGAAATACAGACATAGGCCACTAGTGGATCTG
F- <i>leu5</i>	ACTGCTAAAATAACACAGTTCTTAAGTATGACGCGAGATCAGCTGAAGCTTCGTACGC
R- <i>leu5</i>	AATAAATGCCAAAATTCATTTTCATTTTCATAGACGACATAGGCCACTAGTGGATCTG
F-ME	CGTACGCTGCAGGTCGAC
R-ME	ATCGATGAATTCGAGCTC
Primers para la construcción de cepas con tags	
F- <i>LEU3</i> -Tag	GTTGATATTTTAAATGAATGAATTTGCGTTCAATCCCAAGGTTCCGATCCCCGGGTTAATTAA
R- <i>LEU3</i> -Tag	ACGTATATAGAAAATCATTTACCTCTCCTGTAGCACCCGAGTATCGATGAATTCGAGCTC
F-Tag- <i>LEU3</i>	AAAAATCGCTTCGTAACATTAATAACAATTCCTTTTTGCAATTATGTGCAGGTCGACAACCCCTAAT
R-Tag- <i>LEU3</i>	TTCACTTCCGGACTGTGAAGTCGCCACAAAATCTGATCTTCTTCCGCGCCGCATAGGCCACT
F-Tag- <i>UGA3</i>	CATGTATGGATGCCAAGAAAACAAAGTTTTTTAAAGTGAGGTATGTGCAGGTCGACAACCCCTAAT
R-Tag- <i>UGA3</i>	CATGCTTCGAATATTTCAATTCAGCTTCTCCACGCCATAATTGCGGCCGCATAGGCCACT
F-Tag- <i>UGA35</i>	TGTTTAGACGAGCGGCAGAACGACAGGCAGCCATACTATCAAATGTGCAGGTCGACAACCCCTAAT
R-Tag- <i>UGA35</i>	CTTCGTAGGCCGATGCGGCATTATCAGCTGGTATTGGTGAGGGTCGCGGCCGCATAGGCCACT
F- <i>UGA4</i> -Tag	TGGTGCTGATGTTATCGACACAATTATGTCCAACAGGAACCACGGATCCCCGGGTTAATTAA
R- <i>UGA4</i> -Tag	CTTATAAACTCTGAATATAAAATCTTTATAAAGGTTTGAACATATCGATGAATTCGAGCTC
Primers para construcción de cepas con mutaciones en genoma	
F-Delitto P- <i>UAS</i> _{GABA}	TAAGGTACTCTTATCGCTAATCGCTTATCGCTTATCGTGCGCCGAGCTCGTTTTCGACTGG
R-Delitto P- <i>UAS</i> _{GABA}	GGTAATAGATTGCAAAATCCAACATGACATAAAACATCTCGAATCCTTACCATTAAGTTGATC
F- <i>UGA4</i> DP	GACAATTTCTCAATCATTG
R- <i>UGA4</i> DP	CTTTGGGTTAGAATCTTGATGTG

4.2 Precipitación de los fragmentos de PCR

Se mezclaron 625 μ l de etanol 96% y 25 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5,2 con 100 μ l de producto de PCR. Se incubó 1 hora a -80°C y se centrifugó 30 minutos a 17.000 x g. El precipitado se lavó con 500 μ l de etanol 70% y el *pellet* se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada.

4.3 Transformación de levaduras

Se sembró 1 ml de un cultivo *overnight* en 50 ml de medio YPD y se incubó con agitación a 30 °C. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0,4 a 600 nm, las células se cosecharon, se lavaron con 20 ml de agua estéril, se resuspendieron en 12,5 ml de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M y se incubaron con agitación a 30 °C por 30 minutos. Luego, las células se cosecharon y se resuspendieron en 500 µl de solución de TE 1X/AcLi 0,1 M. A 50 µl de suspensión celular se le agregó 5 µl de fragmento lineal de PCR y 50 µg de ADN de esperma de salmón. Se agitó y se incubó durante 30 minutos a 30 °C. Luego se agregaron 350 µl de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M/PEG 40% y se incubó 1 hora a 30 °C. Pasado este tiempo, se realizó un *shock* térmico a 42 °C durante 5 minutos. Las células se lavaron con 500 µl de YPD, se resuspendieron en 1 ml de YPD y se dejaron recuperando a 30 °C durante 4 horas. Luego, las células se sembraron en placas de YPD conteniendo G418 o ClonNAT.

En el caso de las cepas SBCY29 y SBCY30, luego de la transformación las células se sembraron en placas de YPD y se incubaron durante 15 horas a 30 °C. Luego se realizó un ensayo de réplica en placa en medio mínimo conteniendo ácido 5-fluorótico (5-FOA) y uracilo.

4.4 *Screening* de colonias

Para verificar la correcta inserción de los marcadores de selección en las distintas cepas se realizó PCR *colony*. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, *primers* 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM y Taq polimerasa 2,5 unidades (Invitrogen). Se picó la colonia que se deseaba analizar con un *tip* y se utilizó como fuente de ADN molde. Para cada colonia a analizar se utilizaron dos pares de *primers* (Tabla 5), uno que amplifica un producto de PCR en la cepa *wild type* y otro que genera un producto de PCR en la cepa mutante.

Las colonias que resultaron positivas se estriaron de modo de obtener colonias aisladas, se volvió a verificar su genotipo por PCR y se guardaron a -80 °C en medio YPD conteniendo glicerol 15%. En los casos en los que las cepas

tuvieran un fenotipo característico se procedió a incubar las células en las condiciones adecuadas para su observación.

Tabla 5. Primers para la verificación de mutantes.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
F- <i>LEU3</i> prom	AGGTGCCGCCTAATTTATCG
R- <i>LEU3</i> int	ACTTCTGCTGACGACATTCC
F- <i>LEU3</i> int	TCTACAGACATCAAGGACACTG
R- <i>LEU3</i> down	TTCGCATCATAACCTGTGG
F- <i>GCN4</i> int	TGGAAAGGATGACGAATCGAG
R- <i>GCN4</i> down	GTGGAGTCAGCTGAGAAGTT
F- <i>LEU4</i> prom	CGTGTAAGTGACTCAGTTCTTTC
R- <i>LEU4</i> int	AGCCTTCTTAACAGCTTCGCA
R- <i>LEU4</i> down	AGCACTAGCCCTAGATATGGA
F- <i>LEU5</i> prom	GAAGGACATAACAGCCAGAGTAA
R- <i>LEU5</i> int	CGAGATCTAACGGATATGTTATGA
F- <i>UGA3</i> prom	GTATAGGGTTGAACGGTAGGG
R- <i>UGA3</i> int	CAACTGGTGCTGTATATCTGC
F- <i>UGA35</i> prom	GGTAGAGCAGAAGCAGTCC
R- <i>UGA35</i> int	AGTATATTAGGATGGTCGTTTGC
F- <i>UGA4</i> RT	CTGCTGCTGTACATTAACC
R- <i>UGA4</i> down	GCTTGGTGGTCCCTTGCTC
F- <i>UGA4</i> -780	AGTCTTGTATTAGTTGTTATCC
R- <i>UGA4</i> ChIP	CACCTCCATGGTAATAGATTGC
F-kan int	CATCCTATGGAAGTGCCTCG
R-kan int	GATAGATTGTGACCTGATTG
R-nat int	TGTGATGTGAGAAGTGTATCC

4.5 Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre

Una vez obtenida la inserción del módulo de selección en las cepas SBCY04, SBCY09, SBCY10, SBCY13, SBCY25, SBCY26, SBCY27, SBCY33, SBCY34, SBCY35 y SBCY36, las células se transformaron con el plásmido pSH47 (Guldener et al., 1996) (ver Apéndice), que contiene al gen de la recombinasa Cre bajo un promotor inducible por galactosa. Células transformadas provenientes de medio selectivo se transfirieron a medio mínimo conteniendo galactosa 2% y se incubaron durante 6 horas en agitación a 30°C. Luego se

estriaron en medio YPD de modo de obtener colonias aisladas. Se seleccionaron aquellas colonias que en un ensayo de réplica en placa mostraron incapacidad de crecer en medio YPD conteniendo G418 y se corroboró la correcta escisión del módulo de selección nuevamente por PCR *colony*. Una vez obtenida la mutante se estriaron las células en medio mínimo conteniendo 5-FOA y uracilo para seleccionar a las que hubieran perdido el plásmido pSH47. Aquellas células que no tienen el plásmido son auxótrofas para uracilo, es decir, son incapaces de crecer en medio mínimo sin uracilo.

4.6 Plásmidos, *primers* y cepas parentales

- **Cepa SBCY01 (*ura3 leu3Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY02 (*ura3 LEU3-3HA*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*LEU3*-Tag (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* int, R-*LEU3* down y F-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY03 (*ura3 gcn4Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*gcn4* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Para verificar la correcta inserción del

marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*GCN4* int, R-*GCN4* down y F-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY04 (*ura3 leu4Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pUG6 (Guldener et al., 1996) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu4* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Una vez obtenida la mutante *leu4Δ::loxP-kan-loxP*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU4* prom, R-*LEU4* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY05 (*ura3 leu4Δ leu5Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu5* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY04 (*ura3 leu4Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU5* prom, R-*LEU5* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY08 (*ura3 his3Δ leu4Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó al vector M3929 (Voth et al., 2003) linealizado por digestión con la enzima de restricción *BamHI*. El producto de la digestión se utilizó para transformar la cepa SBCY04 (*ura3 leu4Δ*). La interrupción del gen *HIS3* se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio sin histidina.

- **Cepa SBCY09 (*ura3 6HA-LEU3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*LEU3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-LEU3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la

recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY10 (*ura3 6HA-UGA35*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*UGA35* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA35*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*UGA35* prom, R-*UGA35* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY13 (*ura3 6HA-UGA3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*UGA3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*UGA3* prom, R-*UGA3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY17 (*ura3 uga35Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein & McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-ME (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa FA050 (*ura3 uga35Δ*). El reemplazo del módulo *kanMX* por *natMX* se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio conteniendo G418 y capacidad de crecer en medio conteniendo ClonNAT. También se verificó el reemplazo por PCR *colony* utilizando los *primers* F-*UGA35* prom, R-*UGA35* int y R-nat int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY18 (*ura3 ssy1Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein & McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-ME (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 30995b (*ura3 ssy1Δ*). El reemplazo del módulo *kanMX* por *natMX* se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio conteniendo G418 y la capacidad de crecer en medio conteniendo ClonNAT.

- **Cepa SBCY20 (*ura3 uga35Δ leu3Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY17 (*ura3 uga35Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY22 (*ura3 6HA-UGA3 leu3Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY13 (*ura3 6HA-UGA3*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY23 (*ura3 6HA-UGA35 leu3Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY10 (*ura3 6HA-UGA35*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY24 (*ura3 ssy1Δ 6HA-UGA35*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA35 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY18 (*ura3 ssy1Δ*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA35*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA35 prom, R-UGA35 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY25 (*ura3 uga35Δ 6HA-UGA3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY17 (*ura3 uga35Δ*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA3 prom, R-UGA3 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY26 (*ura3 ssy1Δ 6HA-UGA3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY18 (*ura3 ssy1Δ*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA3 prom, R-UGA3 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY27 (*ura3 uga3Δ 6HA-UGA35*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA35 (Tabla

4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 26790a (*ura3 uga3*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA35*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA35 prom, R-UGA35 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY28 (*ura3 uga4::URA3-KanMX*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pCORE (Storici et al., 2001) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Delitto P_*UAS_{GABA}* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA4 -780, R-UGA ChIP y F-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY29 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido YEp357-*UAS_{GABA}mut* (esta tesis) como templado para la PCR y los *primers* F/R-UGA4 DP (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY28 (*ura3 uga4::URA3-kanMX*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA4 -780, R-UGA ChIP y F-kan int (Tabla 5). El reemplazo del pCORE por el fragmento conteniendo la mutación en el promotor de *UGA4* se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio rico conteniendo G418. Una vez obtenida la cepa, la presencia de la mutación deseada se verificó por secuenciación.

- **Cepa SBCY30 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}del*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido YEp357-*UAS_{GABA}del* (este trabajo) como templado para la PCR y los *primers* F/R-UGA4 DP (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY28 (*ura3 uga4::URA3-kanMX*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-

UGA4 -780, R-*UGA* ChIP y F-kan int (Tabla 5). El reemplazo del pCORE por el fragmento conteniendo la mutación en el promotor de *UGA4* se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio rico conteniendo G418. Una vez obtenida la cepa, la presencia de la mutación deseada se verificó por secuenciación.

- **Cepa SBCY31 (*ura3 UGA4-3HA*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*UGA4*-Tag (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*UGA4* RT, R-*UGA4* down y F-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY33 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*UGA3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY29 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*UGA3* prom, R-*UGA3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY34 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA3*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*UGA3* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY30 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}del*). Una vez obtenida la mutante *6HA-loxP-kan-loxP-UGA3*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*UGA3* prom, R-*UGA3* int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY35 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA35*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA35 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY29 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}mut*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA35*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA35 prom, R-UGA35 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY36 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA35*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-UGA35 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY30 (*ura3 UGA4::UAS_{GABA}del*). Una vez obtenida la mutante *loxP-kan-loxP-6HA-UGA35*, el marcador de selección fue escindido por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y posterior escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA35 prom, R-UGA35 int y R-kan int (Tabla 5).

- **Cepa SBCY37 (*ura3 ssy1Δ UGA4-3HA*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pFA6a-3HA-kanMX4 (Longtine et al., 1998) como templado para la PCR y los *primers* F/R-UGA4-Tag (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY18 (*ura3 ssy1Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA4 RT, R-UGA4 down y F-kan int (Tabla 5).

5. Ensayos de expresión

5.1 Ensayo del gen reportero *lacZ*

Células transformadas crecieron en medio mínimo a 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5 – 0,9. Luego, se cosecharon por centrifugación, se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no leucina, fenilalanina, metionina o triptofano en una concentración final de 1,3 mM y se incubaron por media hora. En los casos en los que se determinó la actividad promotora de *UGA4*, se realizó una incubación con GABA 0,1 mM a 30 °C. Luego, se cosecharon 10 ml de cada cultivo a los tiempos indicados en los experimentos. Las células se resuspendieron en 2 ml de *buffer Z* (ver Apéndice). La densidad óptica de esta suspensión celular se midió a 570 nm. Para la determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa se colocó, por duplicado, un volumen determinado de suspensión celular y cantidad suficiente de *buffer Z* para completar 1 ml. Luego, se agregaron 20 μ l de SDS 0,1% y 30 μ l de cloroformo. Los tubos se agitaron por 15 segundos para permeabilizar las células. Por último, se agregaron 200 μ l de ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido) 4 mg/ml y se incubó a 30 °C hasta la aparición de producto coloreado. La reacción se detuvo agregando 0,5 ml de Na_2CO_3 1 M. El ONPG es un sustrato incoloro que, por acción de la enzima β -galactosidasa, se hidroliza dando orto-nitrofenol como uno de los productos. Este compuesto es de color amarillo y se cuantifica por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 420 nm. La actividad de β -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (Miller, 1972), se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{U. Miller} = \frac{A_{420} \times 1000}{A_{570} \times \text{Vol} \times \Delta t}$$

donde Δt es el tiempo transcurrido desde el agregado del ONPG hasta que la reacción es detenida, expresado en minutos; Vol. es el volumen de la suspensión celular ensayada, expresado en ml; A_{420} es el valor de absorbancia a 420 nm y A_{570} es la densidad óptica de la suspensión celular utilizada.

Los resultados se presentan como la media \pm EE (error estándar) de entre 2 y 6 experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura.

5.2 Medición de los niveles de ARN mensajero

5.2.1 Extracción de ARN

Células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio mínimo se transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de leucina 1,3 mM y/o GABA 0,1 mM. Se cosecharon 4 ml de cada cultivo, se lavó con 1 ml de agua destilada fría y se resuspendió en 750 μ l de *buffer* AE (ver Apéndice). Se agregaron 40 μ l de SDS 25% y 750 μ l de fenol ácido. Luego de mezclar, se incubó durante 60 minutos a 65°C agitando ocasionalmente con *vortex*. Pasado este tiempo, se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a 17.000 x g a 4°C durante 15 minutos. Se agregó 1 ml de cloroformo a la fase acuosa, se mezcló y se centrifugó a 4°C a 17.000 x g durante 10 minutos. Se agregaron 70 μ l de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 700 μ l de isopropanol a la fase acuosa, se mezcló y se centrifugó en frío a 17.000 x g durante 40 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C, se dejó secar y se resuspendió en 100 μ l de agua libre de nucleasas.

Para eliminar restos de ADN genómico, el ARN se trató con *DNAsa RQ1* (Promega) durante 60 minutos a 37°C.

La concentración del ARN obtenido se calculó como [μ g de ARN/ μ l de solución = $A_{260} \times 40 \times F_{dil}/1000$]. Para evaluar su integridad, el ARN obtenido se desnaturalizó utilizando formamida y calor y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

5.2.2 Retrotranscripción (generación de ADNc)

La transcripción reversa se llevó a cabo en una mezcla conteniendo *Buffer* (Fermentas), 1 μ g – 4 μ g de ARN, hexámeros al azar 5 μ M, dNTP 1 mM y 200 unidades de Transcriptasa Reversa *RevertAidTM* (Fermentas). En primer lugar, la muestra de ARN, junto con los hexámeros al azar, se llevó a un volumen

final de 12,5 μ l con agua bidestilada libre de nucleasas y el ARN se desnaturalizó por calentamiento a 65 °C durante 5 minutos. Para evitar la renaturalización, la muestra se colocó inmediatamente en hielo. Finalmente, se agregó el resto de los reactivos mencionados anteriormente hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l y se llevó a cabo la reacción siguiendo el siguiente programa: 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 42 °C y 10 minutos a 70 °C.

5.2.3 PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, *primers* 0,5 μ M, dNTPs 0,2 mM, *SYBR green* 1:300000 (Roche) y Taq polimerasa 0,6 unidades/25 μ l (Invitrogen), utilizando un ciclador Opticon Monitor 3 (MJ Research). Como molde de ADN se utilizaron 5 μ l de una dilución 1:10 de cada ADNc obtenido. Cada muestra se analizó por triplicado. Los *primers* para la PCR cuantitativa (qPCR) (Tabla 6) se diseñaron usando el programa *Beacon Designer 7*.

El programa utilizado en todos los casos fue el siguiente: 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 30 segundos a 72 °C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un solo producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Para cada par de *primers* se evaluó la eficiencia de la reacción realizando una curva de calibración con diluciones seriadas al medio partiendo de una mezcla de ADNc, debiendo cumplir con una eficiencia cercana a 2. Para calcular la masa inicial relativa en cada muestra se realizaron curvas de calibración con diluciones seriadas al medio de una mezcla de los ADNc en estudio. Una vez calculada la masa inicial en cada réplica, se promediaron las tres réplicas y se normalizaron los valores obtenidos para cada gen con el valor obtenido para el control interno *TBP1*.

Los resultados se presentan como la media \pm EE (error estándar) de al menos 3 experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con diseño en bloques seguido por la prueba de Tukey. En algunos casos fue necesario realizar transformaciones aplicando raíz cuadrada o logaritmo a los datos para

que éstos cumplieran con los supuestos requeridos para el análisis estadístico. Las barras con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Tabla 6. Primers para PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
Primers para RT-qPCR	
F-qRT-UGA4	CTGCTGCTGTCACATTAACC
R-qRT-UGA4	AATACACATAACCACCACTGC
F-UGA1 RT qPCR	GTTCCACGGTAGATTGTTTGC
R-UGA1 RT qPCR	GTCATCCTCTTTACGGTTTGC
F-UGA2 RT qPCR	AAGCGATTGATGTTGCCTATG
R-UGA2 RT qPCR	GCGTATTTGATTTCTCCTTTAGC
F-TBP qPCR	TATAACCCCAAGCGTTTTGC
R-TBP qPCR	GCCAGCTTTGAGTCATCCTC
Oligos para qChIP	
F-UGA4qPCR	AATCGCTTATCGCTTATCGTG
R-UGA4qPCR	GGAAGTACTGTTGTTGTTGTTG
F-LEU2qPCR	TCGCCTGACGCATATAACC
R-LEU2qPCR	ACGATTGCTAACCACCTATTG
F-UGA4 UCqPCR	AGTCCAATACCTCTGTCCTC
R-UGA4 UCqPCR	AGCCGCAACTTCATTCTG
F-UGA1-qChIP	ACAATCTTTCCAACCTATCC
R-UGA1-qChIP	TGTTCTATTATCTATCTCTTCC
F-UGA2-qChIP	CGGCGTGGTGGTGATAAAGG
R-UGA2-qChIP	TGATGGTGATGTGATGTGATGTGG

6. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

6.1 Tratamientos

Células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio mínimo (100 ml de cultivo con una densidad óptica a 600 nm de 0,8 por cada condición ensayada) se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no leucina 1,3 mM y se incubaron durante 30 minutos. Cuando fue necesario, se agregó GABA 0,1 mM y se incubó 30 minutos.

6.2 Fijación

Luego de los distintos tratamientos las células se fijaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con formaldehído 1%. Luego se agregó glicina en una concentración final de 125 mM y se incubó durante cinco minutos. Las células se cosecharon por centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm, se lavaron con 20 ml de *buffer* TBS-glicina 125 mM (ver Apéndice), luego con 20 ml de *buffer* TBS y por último se transfirieron a un tubo de 2 ml donde se lavaron con 200 µl de *buffer* FA (ver Apéndice). Todos los lavados se realizaron a 4 °C. Las células se guardaron para su posterior uso a -80 °C.

6.3 Ruptura celular

Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 400 µl de *buffer* FA conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM. Se agregó un volumen de bolitas de vidrio (0,5 mm) y las células se lisaron por ruptura mecánica. Para esto se realizaron cuatro pulsos de agitación con *vortex* de 10 minutos cada uno a 4 °C con intervalos en hielo. El extracto se separó de las bolitas de vidrio perforando el tubo en su parte inferior con una aguja caliente, colocando el mismo dentro de un tubo Falcon de 15 ml y centrifugando a 3500 rpm durante un minuto a 4 °C. Luego se transfirió el extracto a un tubo *ependorf* de 1,5 ml y se centrifugó a 17.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles se descartó y el precipitado conteniendo la cromatina se resuspendió en 400 µl de *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM.

6.4 Sonicado

La cromatina se fragmentó colocando el tubo en hielo y sonicando con un sonicador marca Branson 3 veces durante 10 segundos a una amplitud de 15% con intervalos de 15 segundos en hielo entre cada pulso. Luego, los extractos se centrifugaron a 17.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se

transfirió a otro tubo y se centrifugó nuevamente a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se guardó a -80 °C.

La amplitud y el tiempo de sonicado se pusieron a punto de manera de que la mayoría de los fragmentos fueran de 500 pares de bases. Para controlar el tamaño de los fragmentos se mezclaron 30 µl de extracto con 1 µl de SDS 10% y 0,75 µl de proteinasa K (18,7 mg/ml), se incubó una hora a 37 °C para permitir la actividad de la proteinasa K y dos horas a 65 °C para revertir la fijación. El ADN se purificó y se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

6.5 Inmunoprecipitación

Los extractos se descongelaron en hielo y las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada condición se utilizaron 2 mg de proteínas y se ajustó el volumen a 1,6 ml con *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM. A dichos extractos se les agregaron 10 µl de bolitas magnéticas acopladas a proteína G (Dynabeads) lavadas tres veces con PBS-BSA 5 mg/ml y se incubaron por tres horas en rotación a 4 °C. El extracto se separó de las bolitas. Un 1% del extracto se reservó para utilizar como control antes de la Inmunoprecipitación o *Input* (IN). El resto se dividió en dos tubos: a uno se le agregaron 4 µg de anticuerpo anti HA (Santa Cruz F-7) y al otro, 4 µg de IgG de ratón no específica (Santa Cruz), y se incubó durante toda la noche en rotación a 4 °C. A cada tubo se le agregaron 25 µl de bolitas magnéticas acopladas a proteína G lavadas tres veces con PBS-BSA 5 mg/ml. Luego de una incubación de tres horas en rotación a 4 °C, los complejos inmunes se lavaron cinco veces con *Buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM, cuatro veces con *buffer* FA conteniendo NaCl 500 mM y PMSF 2 mM, cinco veces con *buffer* de lavado (ver Apéndice) y dos veces con *buffer* TE (ver Apéndice). Las proteínas se eluyeron de las bolitas agregando 150 µl de *buffer* de elución (ver Apéndice) y se incubó 15 minutos a 65 °C. El *crosslinking* se revirtió por incubación a 65 °C durante toda la noche en presencia de proteinasa K (0,25 mg/ml). Se purificó el ADN utilizando el kit de purificación de productos de PCR *QIAquick PCR purification Kit* y se eluyó en 100 µl de *buffer* EB (provisto por el kit).

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *Buffer* (Invitrogen), $MgCl_2$ 3 mM, *primers* 0,5 μ M, dNTPs 0,2 mM, *SYBR green* 1:300000 (Roche) y Taq polimerasa 0,6 unidades/25 μ l (Invitrogen), utilizando un ciclador Opticon Monitor 3 (MJ Research). Como ADN molde se utilizaron 2 μ l de *Input* o 5 μ l de inmunoprecipitado (IP) o 5 μ l del control de IgG. Cada muestra se analizó por triplicado.

El programa utilizado en todos los casos fue el siguiente: 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 30 segundos a 72 °C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un solo producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Para cada par de *primers* se evaluó la eficiencia de la reacción realizando una curva de calibración con diluciones seriadas al medio de una muestra de *Input*, debiendo cumplir con una eficiencia cercana a 2. Los *primers* para la PCR cuantitativa (Tabla 6) se diseñaron usando el programa *Beacon Designer 7*.

El inmunoprecipitado (IP) se normalizó con el Input (IN) y se calculó un cociente de señal sobre ruido con el control de IgG (IgG). Para calcular la unión a los promotores de interés o enriquecimiento se utilizó el método de $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Los resultados se presentan como la media \pm EE (error estándar) o como la media \pm SD (desvío estándar) de 2 o más experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con diseño en bloques seguido por la prueba de Tukey. En algunos casos fue necesario realizar transformaciones aplicando raíz cuadrada o logaritmo a los datos para que éstos cumplieran con los supuestos requeridos para el análisis estadístico. Las barras con letras diferentes (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

7. Western Blot

7.1 Extracción de proteínas

Células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio mínimo (densidad óptica a 600 nm de 0,8 – 1,0) se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no leucina 1,3 mM y se incubaron durante media hora. Transcurrido este tiempo se agregó GABA 0,1 mM y luego de incubar durante 30 minutos las células se cosecharon. De cada muestra se cosechó un volumen tal que multiplicado por la densidad óptica del cultivo diera 3. Para la extracción de proteínas, se siguió el protocolo descrito por Liu y col. (Liu et al., 2008). Las células se lisaron con una solución de NaOH 1,85 N y β -mercaptoetanol 7,5%, incubando 10 minutos en hielo. Luego, las proteínas totales se obtuvieron por precipitación con ácido tricloroacético 8%. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* se resuspendieron en 200 μ l de *loading buffer* con SDS (ver Apéndice), 10 μ l de ditioneitol 1M y 10 μ l de Tris 1M. Finalmente, las muestras se calentaron a 100 °C durante 3 minutos.

7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras correspondientes a los extractos de proteínas totales se resolvieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% o 12%. Las electroforesis se realizaron a 40 V hasta que el frente de corrida ingresara al gel separador y luego, a 80 V.

7.3 Transferencia de proteínas y revelado de la membrana

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare) a 90 V durante 90 minutos. La membrana se incubó durante toda la noche a 8 °C con solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% en PBS con Tween 20 0,1%). Luego, se incubó durante 1 hora con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti HA (hecho en rata, clon 3F10, Roche). Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 15

minutos a temperatura ambiente con PBS conteniendo Tween 20 0,1%. A continuación, se incubó durante 1 hora con una dilución 1:3000 de anticuerpo anti IgG de rata conjugado a la enzima peroxidasa de rabanita (hecho en cabra, Santa Cruz). Luego de lavar la membrana, se detectaron las especies inmuno-reativas incubando con una mezcla de partes iguales de solución A (ver Apéndice) y solución B (ver Apéndice). Las imágenes se obtuvieron por medio del analizador de imágenes FUJIFILM LAS-1000 Reader.

Luego del revelado, las membranas se incubaron durante 30 – 45 minutos con la solución de tinción conteniendo el colorante *Coomassie Blue* R250 (ver Apéndice). Luego se realizaron lavados con una solución desteñidora (ver Apéndice) hasta que se visualizaron bandas. Luego de dejar secar, se adquirió la imagen de la membrana utilizando un escáner y se cuantificaron las proteínas de cada calle utilizando el programa Image-J.

La señal obtenida para cada muestra se normalizó con las proteínas totales cargadas en cada calle.

CAPITULO I

*“Construcción y
caracterización de cepas de
levaduras”*

ANTECEDENTES

El análisis funcional de genes de *Saccharomyces cerevisiae* ha tenido un gran avance en los últimos años debido al desarrollo de técnicas que permiten deletar o etiquetar genes por recombinación homóloga en el genoma de dicho organismo de forma rápida y sencilla (Sheff & Thorn, 2004). En un procedimiento estándar sería necesario clonar fragmentos del gen de interés flanqueando a un determinado marcador de selección. Luego de transformar a las células con esta construcción, ocurre recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes lo que resulta en la delección del gen y la simultánea integración del marcador de selección. Debido a la elevada frecuencia de recombinación en la levadura *S. cerevisiae*, ha sido posible reducir estas regiones flanqueantes a secuencias de 35 – 40 pares de bases, permitiendo la construcción de módulos de delección utilizando la técnica de PCR. Este sistema permite entonces la construcción de módulos de delección sin pasar por el paso del clonado (Baudin *et al.*, 1993, Manivasakam *et al.*, 1995).

Existe un gran número de marcadores de selección, incluyendo marcadores de auxotrofia o marcadores de resistencia a drogas. La obtención de mutantes de delección se facilita cuando se utilizan marcadores heterólogos ya que se disminuye la recombinación del marcador con el genoma de la célula huésped. Por esta razón se han desarrollado numerosos módulos con marcadores heterólogos, como por ejemplo marcadores basados en el gen *kan^r* de *Escherichia coli* (confiere resistencia a geneticina o G418) y el gen *his5⁺* de *Schizosaccharomyces pombe* (complementa la mutación *his3* de *S. cerevisiae*) (Wach, 1996, Wach *et al.*, 1994, Longtine *et al.*, 1998, Goldstein & McCusker, 1999). También se han desarrollado sistemas para rescatar los marcadores de selección lo que permite reutilizarlos en un subsiguiente proceso de mutagénesis. Estos sistemas incluyen marcadores de selección flanqueados por secuencias con repeticiones directas (Wach *et al.*, 1994, Alani *et al.*, 1987, Langle-Rouault & Jacobs, 1995) o flanqueados por secuencias *loxP* donde el marcador se escinde por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre (Gueldener *et al.*, 2002, Gueldener *et al.*, 1996).

Por otra parte, existe un gran número de módulos para generar proteínas de fusión, los cuales incluyen epítopes para inmunohistoquímica, purificación de proteínas, microscopía de fluorescencia, etc. (Janke *et al.*, 2004, Gauss *et al.*, 2005, Longtine *et al.*, 1998). El hecho de que los epítopes se introduzcan directamente por recombinación homóloga en el genoma permite modificar a los genes blanco en su contexto natural sin perturbar su regulación nativa (Sheff & Thorn, 2004). El uso de esta técnica permite la expresión de proteínas en niveles endógenos y evita los problemas asociados al uso de proteínas de fusión expresadas en plásmidos que podrían generar patrones no homogéneos de expresión en una población celular (Gauss *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo los experimentos planteados durante este trabajo fue necesario construir varias cepas mutantes. Estas cepas se construyeron a partir de la cepa Σ 1278, o derivadas de la misma. La elección de esta cepa tuvo varios motivos; en primer lugar, la cepa Σ 1278 es la cepa de referencia en gran parte de los estudios que guiaron a establecer el concepto de NCR (Godard *et al.*, 2007, Andre *et al.*, 1995), así como también los mecanismos de regulación de los genes *UGA* (Andre, 1990, Andre *et al.*, 1993, Andre & Jauniaux, 1990b, Grenson, 1987, Vissers *et al.*, 1989, Vissers *et al.*, 1990, Bermudez Moretti *et al.*, 1995, Correa García, 2000, Correa Garcia *et al.*, 1997, Luzzani *et al.*, 2007, Moretti *et al.*, 2001) y los mecanismos de acción y activación del sensor SPS (Bermudez Moretti *et al.*, 2005, Abdel-Sater *et al.*, 2004a, Abdel-Sater *et al.*, 2004b, Iraqui *et al.*, 1999, Wielemans *et al.*, 2010, Bernard & Andre, 2001b). Más aún, la cepa Σ 1278 presenta diferencias con respecto a la cepa S288c, cuyo genoma fue secuenciado, en cuanto a la sensibilidad a NCR de los genes que codifican para enzimas y transportadores involucrados en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno (Godard *et al.*, 2007). Por otra parte, existen colecciones de mutantes de delección en casi todos los marcos de lectura abiertos de las levaduras. Dichas cepas poseen un gran número de auxotrofías y es debido a esto que no pudieron ser utilizadas para este trabajo ya que la mayor parte de los aminoácidos utilizados para suplementar los medios para el crecimiento de las cepas auxotróficas son capaces de inducir señales mediadas por el sensor SPS.

RESULTADOS

1. Mutantes de delección

1.1 Reemplazo del gen de interés por un marcador de selección

Las cepas SBCY01 (*leu3Δ*), SBCY03 (*gcn4Δ*), SBCY05 (*leu4Δ leu5Δ*), SBCY20 (*leu3Δ uga35Δ*), SBCY22 (*leu3Δ 6HA-UGA3*) y SBCY23 (*leu3Δ 6HA-UGA35*) se construyeron utilizando la estrategia de delección de genes basada en PCR (Wach et al., 1994, Wach, 1996), tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Esta técnica permite el reemplazo del gen de interés por un marcador de selección.

En la Figura 15 se muestra a modo de ejemplo cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY01 (*leu3Δ*). Se utilizó el plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach, 1996, Wach et al., 1994) (ver Apéndice) como templado para la PCR y *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al marcador de selección *kanMX4* y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas a *LEU3*. Se generó entonces un fragmento de PCR que contiene al marcador de selección *kanMX4*, que confiere resistencia a G418, flanqueado por dos regiones de homología al gen *LEU3*. Con este producto de PCR se transformaron células *wild type* y se seleccionaron las mutantes de delección que se obtuvieron por recombinación homóloga en placas de YPD con G418. La verificación del reemplazo correcto del gen se realizó también por PCR (Figura 15B y C).

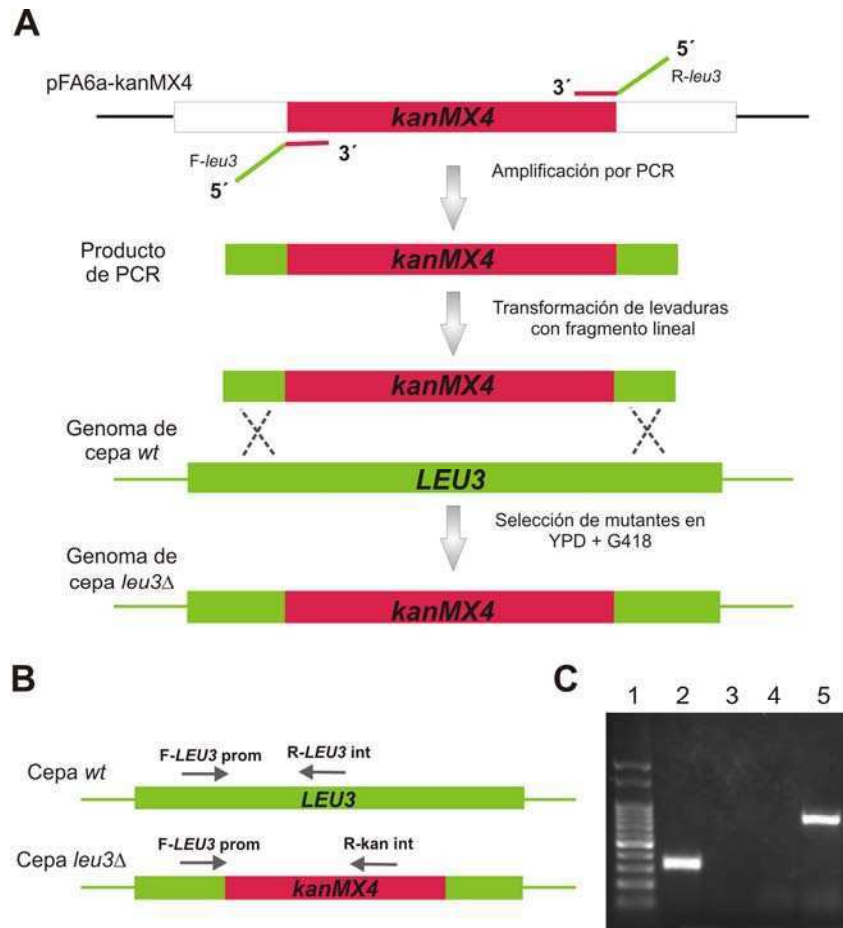


Figura 15. Construcción de la cepa SBCY01 (*leu3Δ*). (A) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa *leu3Δ*. (B) *Primers* para la verificación de la correcta delección del gen *LEU3*. (C) Electroforesis en gel de agarosa para verificar la inserción del módulo *kanMX4* en el *locus LEU3* por PCR *colony*. Una colonia positiva presenta un producto de 707 pares de bases en la reacción de PCR con los *primers* F-*LEU3* prom y R-kan int (calle 5) y ningún producto con los *primers* F-*LEU3* prom y R-*LEU3* int (calle 4). Una colonia negativa o células *wild type* presentan una banda de 342 pares de bases, correspondiente al producto obtenido con los *primers* F-*LEU3* prom y R-*LEU3* int (calle 2) y no presenta ningún producto con los *primers* F-*LEU3* prom y R-kan int (calle 3). En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de bases (PB-L)).

Las células deficientes en la proteína Leu3 (SBCY01, SBCY20, SBCY22 y SBCY23) así como también las cepas deficientes en Gcn4 (SBCY03) presentan una disminución en su tasa de crecimiento luego de cinco generaciones en un medio sin triptofano (Giaever *et al.*, 2002). Este fenotipo característico se aprovechó para verificar estas mutaciones.

El fenotipo de la cepa SBCY05 (*leu4Δ leu5Δ*) se corroboró por su incapacidad de crecer en medio mínimo sin leucina ya que al ser deficiente en los genes *LEU4* y *LEU5* esta cepa es incapaz de sintetizar leucina (Kohlhaw, 2003).

1.2 Reemplazo del gen de interés por un marcador de selección y posterior escisión del mismo

La cepa SBCY04 (*leu4Δ*) se construyó utilizando una modificación de la estrategia de delección de genes basada en PCR (Guldener et al., 1996), tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Esta técnica permite el reemplazo del gen de interés por un marcador de selección con la posterior escisión del mismo mediada por la recombinasa Cre.

En la Figura 16 se muestra cómo se llevó a cabo la construcción de dicha cepa. El plásmido pUG6 (Guldener et al., 1996) (ver Apéndice) se utilizó como templado para la PCR. Dicho plásmido contiene el marcador de selección *kanMX4* flanqueado por secuencias *loxP*. Los *primers* fueron diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al marcador de selección y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al gen *LEU4*. Se generó entonces un fragmento de PCR que contiene la secuencia *loxP-kanMX-loxP* flanqueada por dos regiones de homología a *LEU4*. Con este producto de PCR se transformaron células *wild type* y se seleccionaron las mutantes de delección que se obtuvieron por recombinación homóloga en placas de YPD con G418. La verificación del reemplazo correcto del gen se realizó también por PCR (Figura 16B y C). Una vez obtenida la mutante *leu4Δ::loxP-kanMX-loxP* las células se transformaron con el plásmido pSH47 (Guldener et al., 1996) (ver Apéndice) que contiene el gen que codifica para la recombinasa Cre río abajo del promotor inducible por galactosa *GAL1*. Luego de la inducción con galactosa se verificó la correcta escisión del marcador de resistencia al antibiótico tanto por incapacidad de crecimiento en medio conteniendo G418 como por PCR (Figura 16B y C).

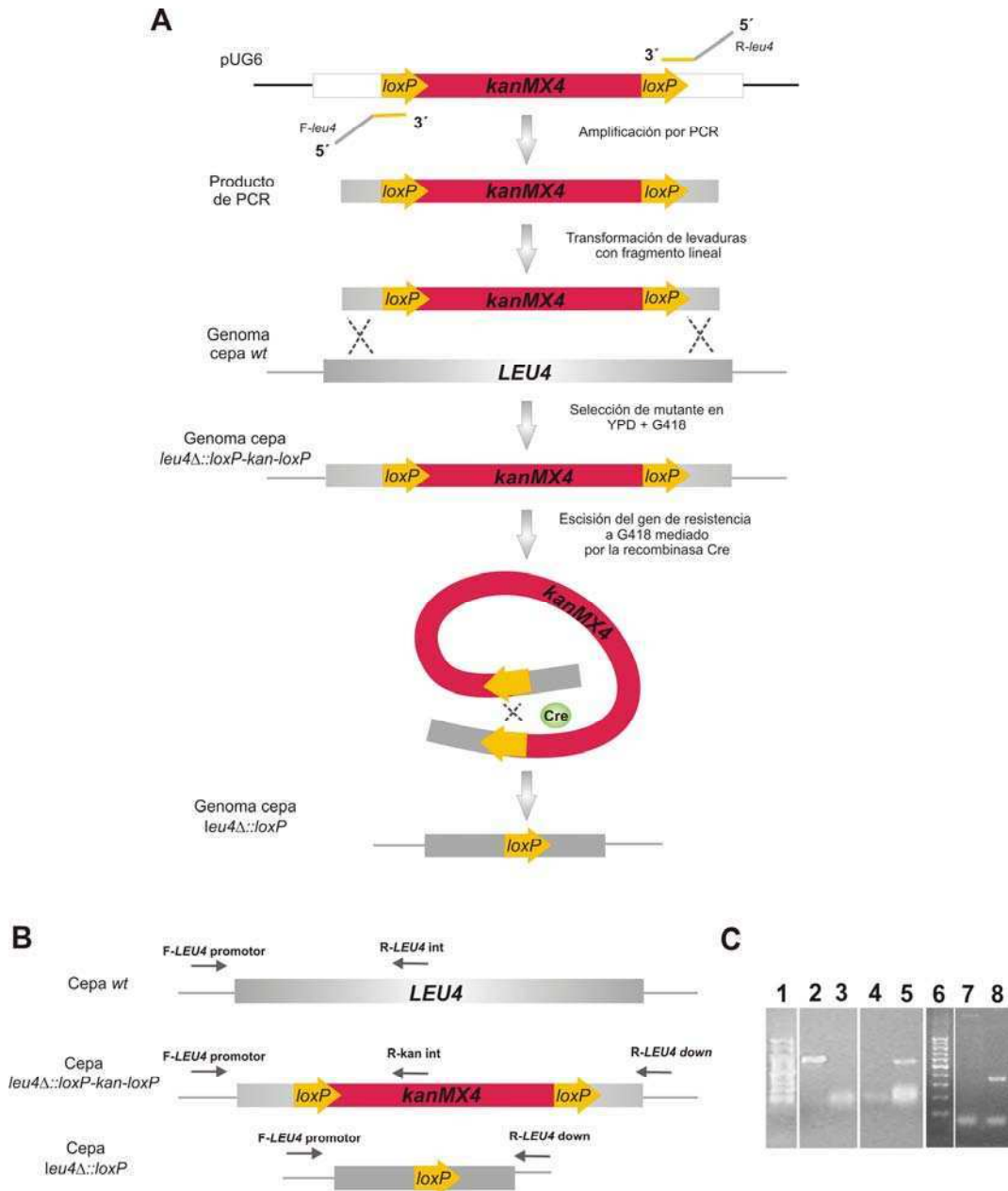


Figura 16. Construcción de la cepa SBCY04 (*leu4Δ*). (A) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa *leu4Δ*. (B) *Primers* para la verificación de la correcta delección del gen *LEU4* por recombinación homóloga y posterior escisión del marcador de selección. (C) Electroforesis en gel de agarosa para verificar la inserción y escisión del fragmento *loxP-kanMX4-loxP* en el *locus LEU4* por PCR *colony*. Una colonia negativa o células *wild type* presentan una banda de 794 pares de bases correspondiente al producto obtenido con los *primers* F-*LEU4* prom y R-*LEU4* int (calle 2) y no presenta ningún producto con los *primers* F-*LEU4* prom y R-kan int (calle 3). Una colonia positiva donde se insertó el fragmento *loxP-kanMX4-loxP* presenta un producto de 676 pares de bases en la reacción de PCR con los *primers* F-*LEU4* prom y R-kan int (calle 5) y ningún producto con los *primers* F-*LEU4* prom y R-*LEU4* int (calle 4). Si la escisión del módulo *loxP-kanMX4-loxP* ocurrió correctamente luego de la expresión de la recombinasa Cre, se obtiene un fragmento de 322 pares de bases con los *primers* F-*LEU4* prom y R-*LEU4* down (calle 8), mientras que si la recombinación no ocurrió se

obtiene un fragmento de 1863 pares de bases (calle 7). En las calles 1 y 6 se muestra el marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de bases (Biodynamics)).

La cepa SBCY04 (*leu4Δ*), que fue utilizada para la construcción de las cepas SBCY05 (*leu4Δ leu5Δ*) y SBCY08 (*his3Δ leu4Δ*), no presenta un fenotipo característico.

2. Cepas que expresan proteínas de fusión con el epítoto HA en el extremo C-terminal

Las cepas SBCY02 (*LEU3-3HA*), SBCY31 (*UGA4-3HA*) y SBCY37 (*ssy1Δ UGA4-3HA*) se construyeron utilizando una modificación de la técnica de deleción de genes basada en PCR (Longtine et al., 1998) tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Esta técnica permite realizar una modificación en el genoma de la cepa a construir donde se inserta una secuencia que codifica para un epítoto en el extremo 3' del gen de interés. De esta forma se obtiene un gen en su posición original en el genoma que codifica para una proteína de fusión bajo el control de su promotor natural, permitiendo así tener niveles de expresión similares a los fisiológicos.

En la Figura 17A se muestra a modo de ejemplo cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY02 (*LEU3-3HA*). Brevemente, se amplificó por PCR el módulo de selección *3HA-kanMX6* utilizando como templado el plásmido pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) (ver Apéndice) y *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo *kanMX6* y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al extremo 3' del gen *LEU3*. Con este producto de PCR se transformaron células *wild type* y las mutantes que se obtuvieron por recombinación homóloga se seleccionaron en placas de YPD con G418. La verificación de la obtención del gen de fusión se realizó también por PCR (Figura 17B y C).

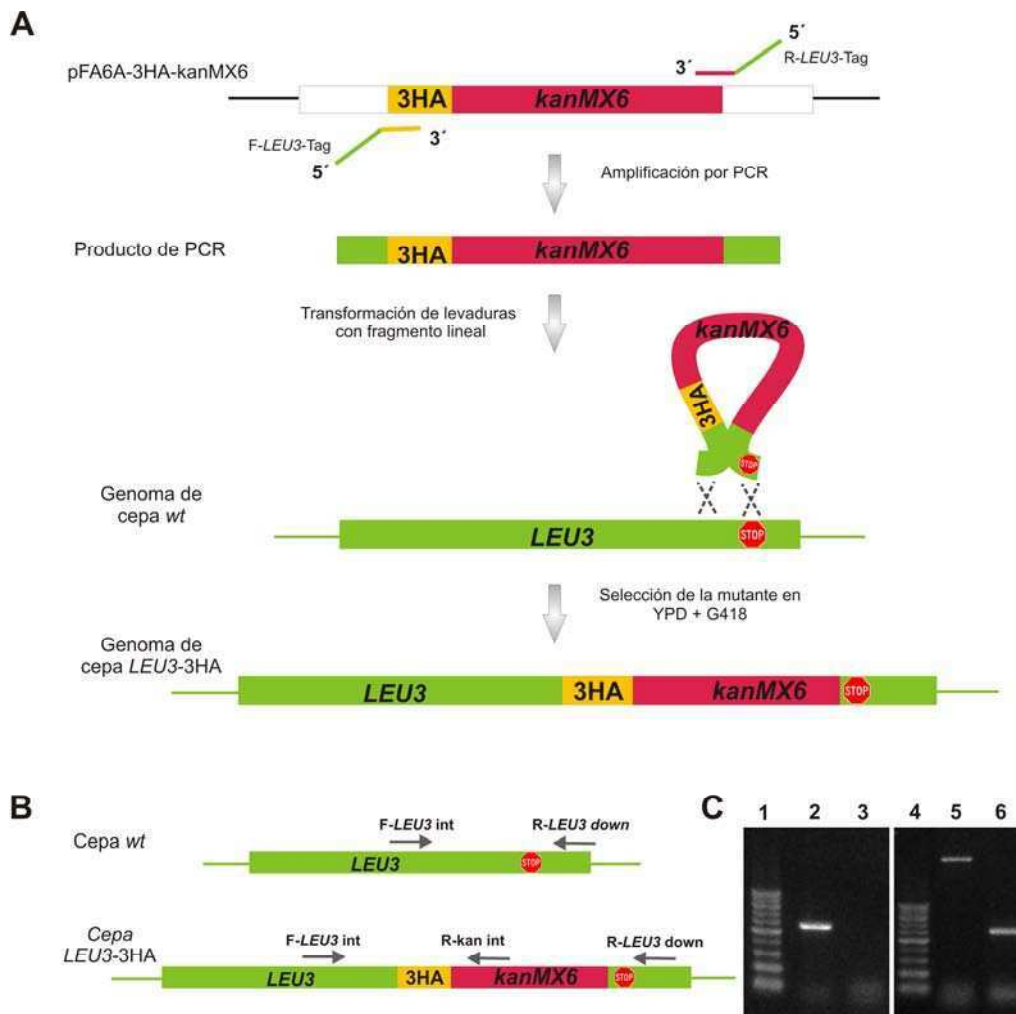


Figura 17. Construcción de la cepa SBCY02 (*LEU3-3HA*). (A) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa *LEU3-3HA*. (B) *Primers* utilizados para corroborar la correcta formación del gen de fusión. (C) Electroforesis en gel de agarosa para verificar la inserción del fragmento *3HA-kanMX6* en el locus *LEU3* por PCR *colony*. Una colonia positiva presenta un producto de 602 pares de bases en la reacción de PCR con los *primers* F-*LEU3* int y R-kan int (calle 6) y un producto de 2118 pares de bases en la reacción que contiene los *primers* F-*LEU3* int y R-*LEU3* down (calle 5). Una colonia negativa o células *wild type* presenta una banda de 584 pares de bases, correspondiente al producto obtenido con los *primers* F-*LEU3* int y R-*LEU3* down (calle 2) y no presenta producto con los *primers* F-*LEU3* int y R-kan int (calle 3). En las calles 1 y 4 se muestra el marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de bases (Biodynamics)).

Como se mencionó anteriormente, las cepas deficientes en la proteína Leu3 presentan una disminución en su tasa de crecimiento luego de cinco generaciones en un medio sin triptofano (Giaever *et al.*, 2002). Para verificar la funcionalidad de la proteína Leu3-3HA se realizaron pruebas de crecimiento en medio sin triptofano.

3. Cepas que expresan proteínas de fusión con el epítoto HA en el extremo N-terminal

La fusión del epítoto HA al extremo C-terminal de las proteínas Uga3 y Uga35/Dal81 afecta su función (comunicación personal con el Dr. Bernard Turcotte, *Department of Medicine, Royal Victoria Hospital, McGill University, Montréal, Québec, Canada*), por lo que se decidió en estos casos realizar la fusión en el extremo N-terminal.

Las cepas SBCY09 (*6HA-LEU3*), SBCY10 (*6HA-UGA35*), SBCY13 (*6HA-UGA3*), SBCY24 (*ssy1Δ 6HA-UGA35*), SBCY25 (*uga35Δ 6HA-UGA3*), SBCY26 (*ssy1Δ 6HA-UGA3*), SBCY27 (*uga3Δ 6HA-UGA35*), SBCY33 (*UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA3*), SBCY34 (*UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA3*), SBCY35 (*UGA4::UAS_{GABA}mut 6HA-UGA35*) y SBCY36 (*UGA4::UAS_{GABA}del 6HA-UGA35*) se construyeron utilizando una modificación de la técnica de deleción de genes basada en PCR (Gauss et al., 2005), que permite la fusión de un epítoto al extremo N-terminal del gen de interés en su posición original en el genoma. De esta manera se obtiene una cepa que expresa una proteína fusionada al epítoto HA en su extremo N-terminal bajo el control de su promotor natural.

En la Figura 18 se muestra a modo de ejemplo cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY10 (*6HA-UGA35*). El plásmido pOM10 (Gauss et al., 2005) (ver Apéndice) se utilizó como templado para la PCR tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Dicho plásmido contiene al gen de resistencia a antibiótico, *kanMX4*, flanqueado por secuencias *loxP* y 6 epítotos HA en tandem. Los *primers* fueron diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo de selección y a los epítotos HA y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas a la región 5' del gen *UGA35*. Se generó por PCR un fragmento que contiene la secuencia *loxP-kanMX4-loxP-6HA* flanqueada por dos regiones de homología a *UGA35*. Con este producto de PCR se transformaron células *wild type* y se seleccionaron las mutantes que se obtuvieron por recombinación homóloga en

placas de YPD con G418. La verificación de la inserción se realizó también por PCR (Figura 18B y C).

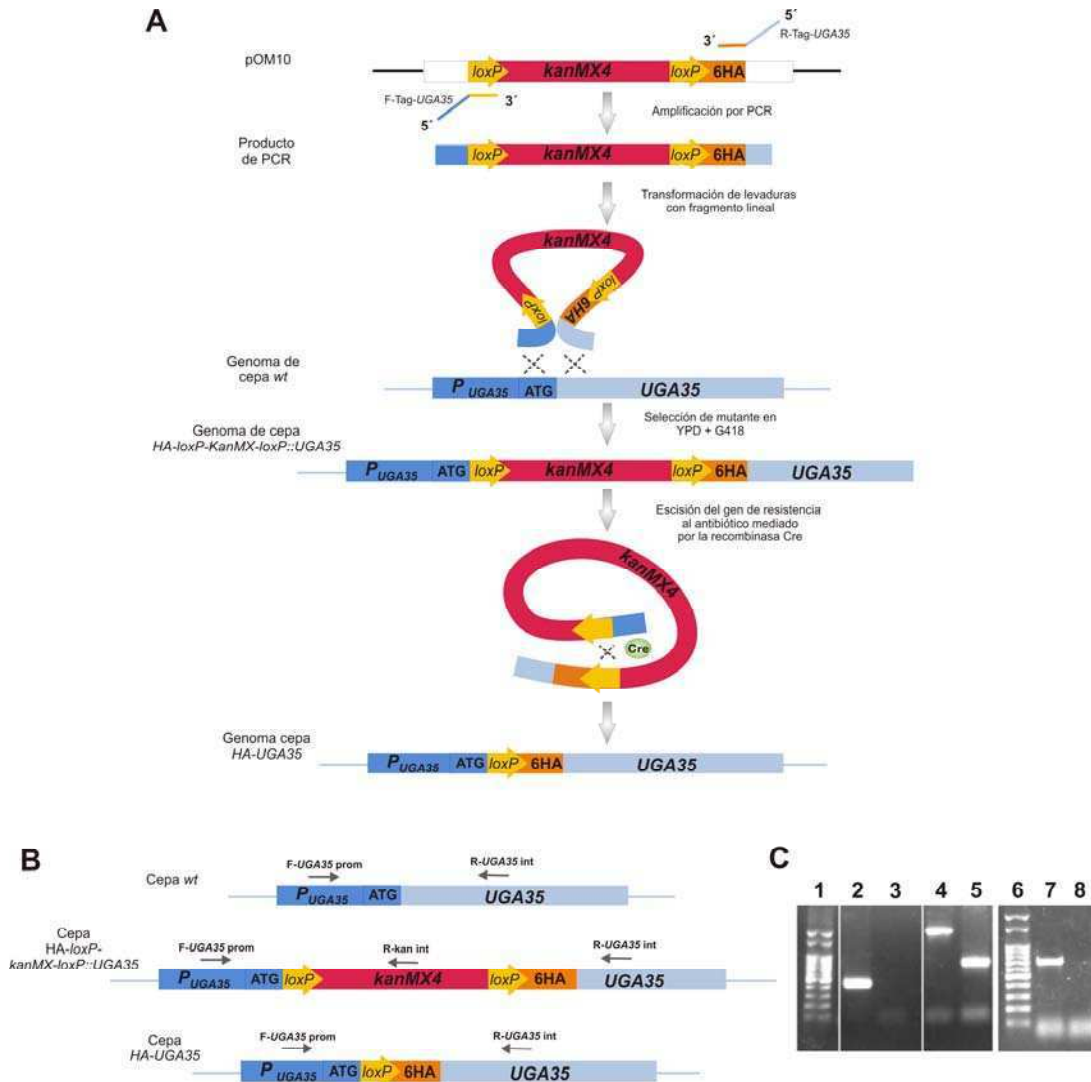


Figura 18. Construcción de la cepa SBCY10 (*6HA-UGA35*). (A) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa *6HA-UGA35*. (B) *Primers* utilizados para corroborar la correcta inserción del epítipo HA y la escisión del módulo de selección por recombinación homóloga. (C) Electroforesis en gel de agarosa para verificar la inserción del fragmento *loxP-kanMX4-loxP-6HA* en el locus *UGA35* y posterior escisión del fragmento *loxP-kanMX4-loxP* por PCR *colony*. Una colonia negativa o células *wild type* presentan una banda de 399 pares de bases correspondiente al producto obtenido con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*UGA35* int (calle 2) y no presenta ningún producto con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*kan* int (calle 3). Una colonia positiva, donde se insertó el fragmento *loxP-kanMX4-loxP-6HA*, presenta un producto de 775 pares de bases en la reacción de PCR con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*kan* int (calle 5) y un producto de 2218 pares de bases con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*UGA35* int (calle 4). Si la escisión del módulo *loxP-kanMX4-loxP* ocurrió correctamente se obtiene un fragmento de 677 pares de bases con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*UG35* int (calle 7) y ningún producto con los *primers* F-*UGA35* prom y R-*Kan* int (calle 8). En las calles 1 y 6 se muestra el marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de bases (PB-L)).

Una vez obtenida la mutante *loxP-kanMX4-loxP-6HA::UGA35*, las células se transformaron con el plásmido pSH47 (Guldener et al., 1996) (ver Apéndice), que contiene el gen que codifica para la recombinasa Cre río abajo del promotor inducible por galactosa *GAL1*. Luego de inducir con galactosa, se verificó la escisión del marcador de selección tanto por su incapacidad de crecimiento en medio conteniendo G418 como por PCR (Figura 18B y C).

Las cepas deficientes en la proteína Uga3 y/o Uga35/Dal81 son incapaces de crecer en medios conteniendo GABA como única fuente de nitrógeno. Para verificar la funcionalidad de las proteínas 6HA-Uga3 y 6HA-Uga35/Dal81 se realizaron pruebas de crecimiento para verificar que las cepas mantuvieran la capacidad de crecer en presencia de GABA como única fuente de nitrógeno.

4. Intercambio de marcadores de selección

Las cepas SBCY17 (*uga35Δ*) y SBCY18 (*ssy1Δ*) se construyeron intercambiando el módulo *kanMX* de cada cepa por el módulo *natMX* obtenido a partir del plásmido pAG25 (Goldstein & McCusker, 1999) (ver Apéndice). Ambos módulos de selección comparten homologías presentes en las regiones promotoras y terminadoras por lo cual se produce la recombinación homóloga con el consiguiente cambio de módulo.

En la Figura 19 se muestra a modo de ejemplo cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY18 (*ssy1Δ::natMX*). El reemplazo correcto del marcador *kanMX* por *natMX* se verificó por pérdida de la capacidad de crecer en medio con G418 y capacidad de crecer en medio con ClonNAT.

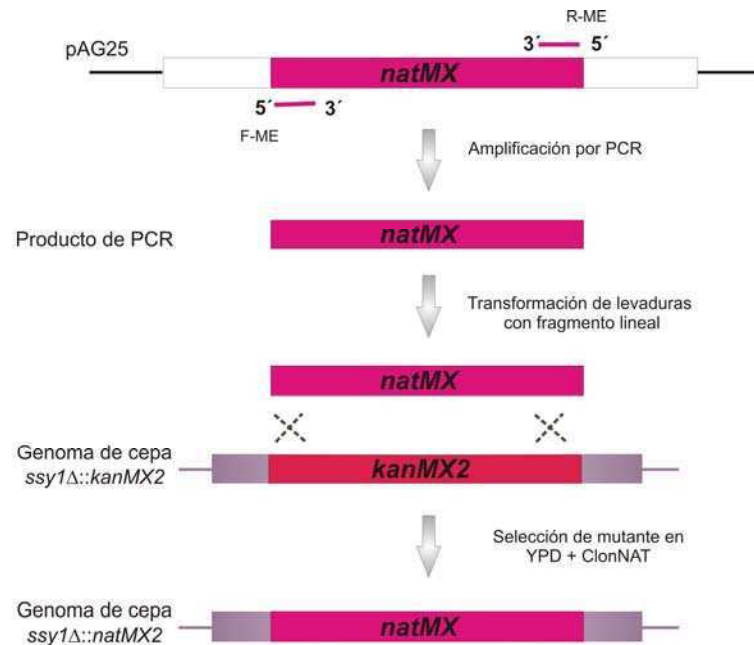


Figura 19. Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa SBCY18 (*ssy1Δ::natMX*).

5. Cepas auxótrofas para histidina

La cepa SBCY08 se construyó utilizando la técnica de intercambio de marcadores de selección descrita por Voth *et. al.* (Voth et al., 2003).

En la Figura 20 se muestra cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY08 (*his3Δ leu4Δ*). Se transformaron células *leu4Δ* con el plásmido M3929 (Voth et al., 2003) (ver Apéndice) previamente digerido con la enzima de restricción *BamHI*. Este plásmido contiene el gen *HIS3* interrumpido por el marcador de selección *kanMX*. Las mutantes obtenidas por recombinación homóloga se seleccionaron en medio YPD conteniendo G418. La correcta interrupción del gen *HIS3* se corroboró por incapacidad de crecimiento en medio mínimo sin histidina.

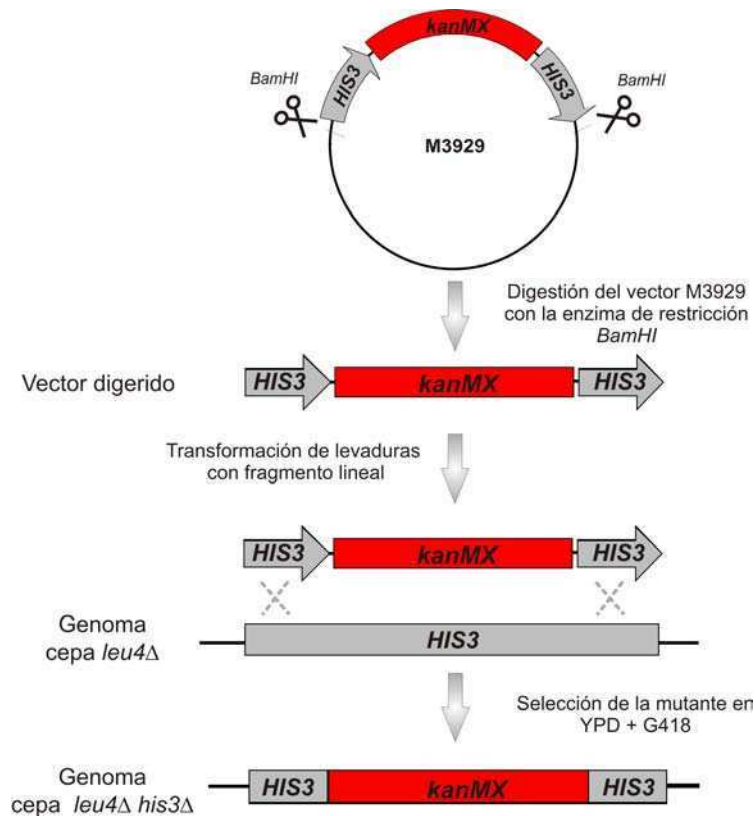


Figura 20. Esquema de la técnica utilizada para la construcción de las cepas auxótrofas para histidina.

6. Construcción de cepas por mutagénesis sitio-dirigida *in vivo* o “*Delitto Perfetto*”

Para la construcción de las cepas SBCY29 (*UGA4::UAS_{GABA}mut*) y SBCY30 (*UGA4::UAS_{GABA}del*) se utilizó la técnica de mutagénesis sitio-dirigida *in vivo* o “*Delitto Perfetto*” (Storici et al., 2001) con algunas modificaciones, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Esta técnica permite la generación de una determinada mutación en el genoma de la cepa que se quiere modificar sin que queden rastros de los marcadores de selección en la secuencia.

En la Figura 21 se muestra a modo de ejemplo cómo se llevó a cabo la construcción de la cepa SBCY29 (*UGA4::UAS_{GABA}mut*). En una primera etapa (Figura 21A), se insertó el módulo de selección *kanMX-KIURA3* en el promotor del gen *UGA4* por recombinación homóloga. Para esto se utilizó el plásmido

pCORE (Storici et al., 2001) como templado para la PCR y *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo de selección y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al promotor del gen *UGA4*. Se generó por PCR un fragmento que contiene la secuencia *kanMX-KIURA3* flanqueada por dos regiones de homología al promotor de *UGA4* y se lo utilizó para transformar células *wild type*. Las mutantes donde se produjo la inserción del módulo *kanMX-KIURA3* se seleccionaron en placas de YPD con G418. La verificación de la inserción se realizó también por PCR (Figura 21C y D).

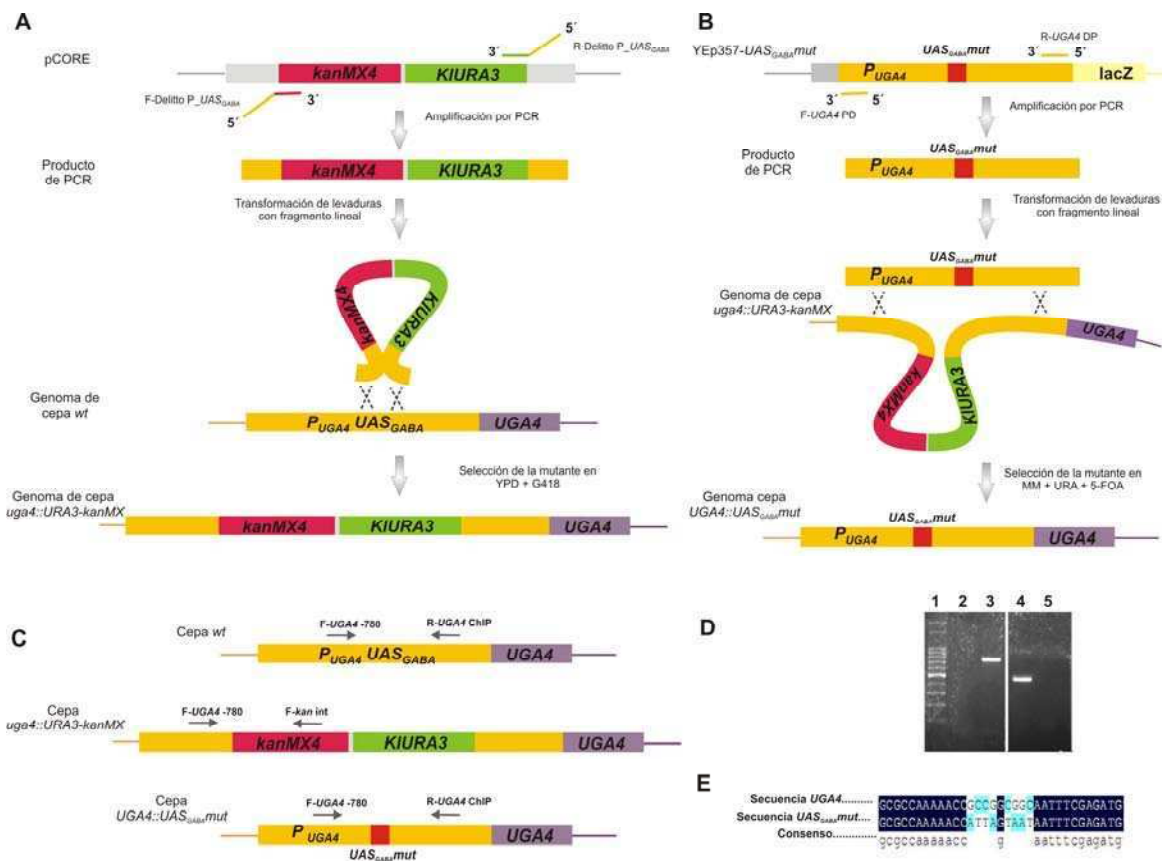


Figura 21. Técnica de mutagénesis sitio-dirigida in vivo o “Delitto perfetto”. (A) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa SBCY28 (*uga4::kanMX-KIURA3*). (B) Esquema de la técnica utilizada para la construcción de la cepa SBCY29 ($UGA4::UAS_{GABA}^{mut}$) (C) Esquema de los *primers* utilizados para corroborar la correcta inserción del módulo pCORE y el posterior reemplazo por la secuencia $UGA4::UAS_{GABA}^{mut}$. (D) Electroforesis en gel de agarosa para verificar la inserción del módulo pCORE y el posterior reemplazo por la secuencia $UGA4::UAS_{GABA}^{mut}$ en el *locus UGA4* por PCR *colony*. Una colonia donde se insertó el módulo

pCORE presenta un producto de aproximadamente 800 pares de bases en la reacción de PCR con los *primers* F-*UGA4* -780 y F-kan int (calle 3) y no presenta ningún producto con los *primers* F-*UGA4* -780 y R-*UGA4* ChIP (calle 2). Células que incorporaron la mutación *UGA4::UAS_{GABAMut}* o células *wild type* presentan una banda de 437 pares de bases correspondiente al producto obtenido con los *primers* F-*UGA4* -780 y R-*UGA4* ChIP (calle 4) y no presenta ningún producto con los *primers* F-*UGA* -780 y F-kan int (calle 5). En la calle 1 se muestra el marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de bases (PB-L)). **(E)** Alineamiento de secuencias comparando la secuencia del promotor *UGA4 wild type* con la secuencia obtenida para el promotor *UGA4::UAS_{GABAMut}*.

Luego, se amplificó la secuencia correspondiente al promotor mutado del gen *UGA4* a partir del plásmido YEp357-*UAS_{GABAMut}* y se transformaron células de la cepa SBCY28 (*uga4::kanMX-KIURA3*) con dicho fragmento de PCR (Figura 21B). La contra-selección se realizó en medio mínimo conteniendo uracilo y 5-FOA. Sólo aquellas células auxótrofas para uracilo son capaces de crecer en un medio conteniendo 5-FOA, o sea que se seleccionaron aquellas mutantes que intercambiaron el marcador de selección *URA3* por el fragmento del promotor del gen *UGA4* mutado. Se seleccionaron aquellas colonias capaces de crecer en medio conteniendo 5-FOA e incapaces de crecer en medio conteniendo G418, se les realizó una PCR *colony* para corroborar el intercambio del pCORE por la versión mutada del promotor de *UGA4* (Figuras 21C y D) y luego se secuenció para corroborar la generación de la mutación (Figura 21E).

7. Construcción de la cepa que expresa la proteína Leu4^{fbr}

La enzima α -isopropilmalato sintasa (α -IPM sintasa) codificada por el gen *LEU4* cataliza la síntesis de α -IPM, siendo ésta la primera reacción del proceso de biosíntesis de la leucina. Su actividad es inhibida por el producto final del proceso, leucina (Kohlhaw, 2003). Mutaciones en esta enzima generan cepas resistentes al análogo tóxico de la leucina 5'-5'-5'-trifluoro-leucina (TFL) (Satyanarayana *et al.*, 1968, Bussey & Umbarger, 1970).

Para construir la cepa que expresa la proteína Leu4 resistente al *feedback* por leucina (Leu4^{fbr}) se clonó el gen *LEU4^{fbr}* a partir de una cepa mutante espontánea aislada por crecimiento en TFL (cepa XK14-15D gentilmente

provista por el Dr. Anders Brandt (Carlsberg Laboratory, Copenhagen Valby, Denmark)) en el plásmido centromérico pRS413 (Christianson et al., 1992) (ver Apéndice), generando el plásmido pSBC-*LEU4^{fbr}*. Los detalles del clonado se describen en la sección Materiales y Métodos. La cepa XK14-15D no se utilizó para hacer los ensayos en este trabajo porque, además de no ser isogénica con la cepa Σ 1278, no contiene las auxotrofías necesarias para llevar a cabo los ensayos propuestos.

Estudios previos realizados sobre varias mutantes aisladas a partir de crecimiento espontáneo en TFL demostraron que los aminoácidos presentes en la región de unión a la leucina, o región regulatoria, de la proteína Leu4 son los responsables de la inhibición por este aminoácido. Entre los residuos identificados, se encuentran los siguientes: Gly₅₁₄, Gly₅₁₆, Ser₅₁₆, Ser₅₁₉, Ser₅₄₇, Ser₅₄₈ y Ala₅₅₂ (Figura 22) (Cavalieri et al., 1999).

Wild-type	DNA	GGT	-----GGT	-----TCT	-----GAG	-----CAT	-----TCT	TCT	-----GCT
	Protein	Gly ₅₁₄	-----Gly ₅₁₆	-----Ser ₅₁₉	-----Glu ₅₄₀	-----His ₅₄₁	-----Ser ₅₄₇	Ser ₅₄₈	-----Ala ₅₅₂
Mutants	DNA	GAT	-----GAT	-----ACT	-----AAG	-----CCT	-----TCT	-----ACT	
	Protein	Asp ₅₁₄	-----Asp ₅₁₆	-----Thr ₅₁₉	-----Lys ₅₄₀	-----Pro ₅₄₁	-----Ser ₅₄₇₋₈	-----Thr ₅₅₂	
Alleles		<u>LEU4-2</u>	<u>LEU4-3</u>	<u>LEU4-4</u>	<u>LEU4-5</u>	<u>LEU4-6</u>	<u>LEU4-1</u>	<u>LEU4-7</u>	

Figura 22. Esquema de las mutaciones identificadas en el gen *LEU4* a partir de cepas mutantes aisladas a partir de crecimiento espontáneo en TFL (Cavalieri et al., 1999).

Como no se conocía la mutación causante de la resistencia a TFL en la cepa XK14-15D se procedió a secuenciar el gen *LEU4^{fbr}*. Para esto se amplificó por PCR la región codificante del gen *LEU4^{fbr}* a partir de ADN genómico de la cepa XK14-15D y se secuenció con varios *primers* complementarios a la secuencia del gen *LEU4*. El ensamblaje de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el programa CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) y su análisis mostró la presencia de una mutación con respecto a la secuencia de *LEU4* disponible en la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database* www.yeastgenome.org/) que produce el cambio de la serina de la posición 547 por prolina. Si bien ya se había descrito una mutación en la Ser₅₄₇ (Cavalieri et

al., 1999), ésta consistía en una delección y no en un cambio por prolina. Publicamos esta secuencia en la base de datos GenBank del NCBI (Número de acceso GU598519).

Una vez obtenido el plásmido pSBC-*LEU4^{fbr}*, se lo utilizó para transformar la cepa SBCY08 (*leu4Δ his3Δ*). Para verificar que los niveles de α -IPM estuvieran efectivamente modificándose en esta cepa, se clonó el promotor del gen *BAP2* río arriba del gen *lacZ* en el plásmido YEp357, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos, ya que se sabe que la expresión de la permeasa Bap2 es modulada por el factor de transcripción Leu3 en una forma dependiente de α -IPM, siendo elevados sus niveles de expresión en condiciones donde se acumula este intermediario (Nielsen et al., 2001). Para ello se determinó actividad de la enzima β -galactosidasa en células *wild type* y *LEU4^{fbr}* transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP2-lacZ* crecidas en medio mínimo conteniendo amonio como fuente de nitrógeno. Se observó que los niveles de expresión de *BAP2-lacZ* en la cepa *LEU4^{fbr}* son 5 veces mayores que en la cepa *wild type*. Estos resultados concuerdan con los publicados (Nielsen et al., 2001) e indican que en esta cepa los niveles de α -IPM están siendo efectivamente modificados.

CAPITULO II

Mecanismos moleculares que llevan a la regulación por aminoácidos del gen *UGA4*

ANTECEDENTES

Como se mencionó en la introducción, la regulación transcripcional del gen *UGA4* es compleja, ya que, su expresión es inducible por GABA, está sujeto a NCR y además está regulado por el pH, por la calidad de la fuente de carbono y por los aminoácidos extracelulares disponibles. Los experimentos realizados durante este trabajo se llevaron a cabo en presencia de una fuente pobre de nitrógeno, en este caso prolina, debido a que *UGA4* es un gen sensible a NCR, y se utilizó glucosa como fuente de carbono. Además, se utilizó un medio con pH controlado ya que la acidificación del mismo puede generar aumentos en la expresión de *UGA4*.

En cuanto a la regulación por aminoácidos extracelulares del gen *UGA4*, se sabe que el agregado de una mezcla de aminoácidos al medio de cultivo, previo al agregado de GABA, inhibe la inducción del gen en una forma dependiente del sensor de aminoácidos SPS. Asimismo, estudios globales revelaron pequeños cambios en los niveles de expresión de *UGA4* en cepas deficientes en los factores de transcripción Stp1 y Stp2 (Eckert-Boulet *et al.*, 2004).

No todos los aminoácidos son capaces de activar de la misma forma al sensor SPS (Iraqi *et al.*, 1999). Por ejemplo el GABA y la prolina no son capaces de inducir su activación. Esto convierte a la prolina en una fuente pobre de nitrógeno ideal para este estudio.

La inducción del gen *UGA4* depende de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81, los cuales actúan a través del elemento UAS_{GABA} presente en el promotor de este gen. El hecho de que mutaciones en el dominio $Zn(II)_2-Cys_6$ presente en la proteína Uga3 resulte en una pérdida de su actividad *in vivo*, junto con evidencias que demuestran que dicha proteína es capaz de unirse *in vitro* a sondas conteniendo las secuencias correspondientes a los elementos UAS_{GABA} de los genes *UGA1* y *UGA4*, indican que Uga3 es capaz de interactuar con los promotores de dichos genes para ejercer su acción en respuesta al GABA. Por otra parte, el dominio $Zn(II)_2-Cys_6$ de la proteína Uga35/Dal81 no es necesario para que cumpla con su función en la activación

de de los genes *DUR1* y *DUR2*, sin embargo, en un estudio global se reportó interacción *in vivo* de dicho factor con el promotor de *UGA4* (Harbison et al., 2004).

El factor Uga35/Dal81 posee un rol sinérgico e importante en la amplificación de la expresión inducida de genes de varias vías para la utilización de fuentes de nitrógeno, y en todas las ocasiones, actúa junto con un factor específico de inductor. En el caso del catabolismo del GABA, este factor es Uga3, mientras que para la inducción del gen *AGP1* (catabolismo de aminoácidos), es Stp1.

Por todo lo expuesto, los objetivos de este capítulo fueron identificar las regiones regulatorias del promotor *UGA4* involucradas en la respuesta a los aminoácidos extracelulares mediada por el sensor SPS e identificar los factores de transcripción involucrados en dicha regulación. También se evaluó la interacción de algunos de estos factores con el promotor del gen *UGA4* así como también la posible interacción de algunos de estos factores entre sí.

RESULTADOS

1. El sensor SPS media el efecto negativo de los aminoácidos sobre la inducción del gen *UGA4*

Estudios previos demostraron que la inducción por GABA del gen *UGA4* de *Saccharomyces cerevisiae* es inhibida por el agregado de una mezcla de aminoácidos al medio de cultivo y que este efecto es mediado por el sensor de aminoácidos SPS (Bermudez Moretti et al., 2005). Para estudiar los mecanismos moleculares por los cuales los aminoácidos producen este efecto, células *wild type* y células deficientes en una de las proteínas componente del sensor SPS, Ssy1, transformadas con un plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ*, se trataron con distintos aminoácidos activadores del sensor SPS como leucina, fenilalanina, triptofano o metionina (Iraqi et al., 1999) y se realizaron ensayos de β -galactosidasa. Los resultados mostrados en la Figura 23A indican que cada uno de los distintos aminoácidos activadores del sensor también inhiben la inducción del gen *UGA4*. Además, esta inhibición depende del sensor SPS ya que este efecto disminuye cuando la proteína Ssy1 está ausente (Figura 23B).

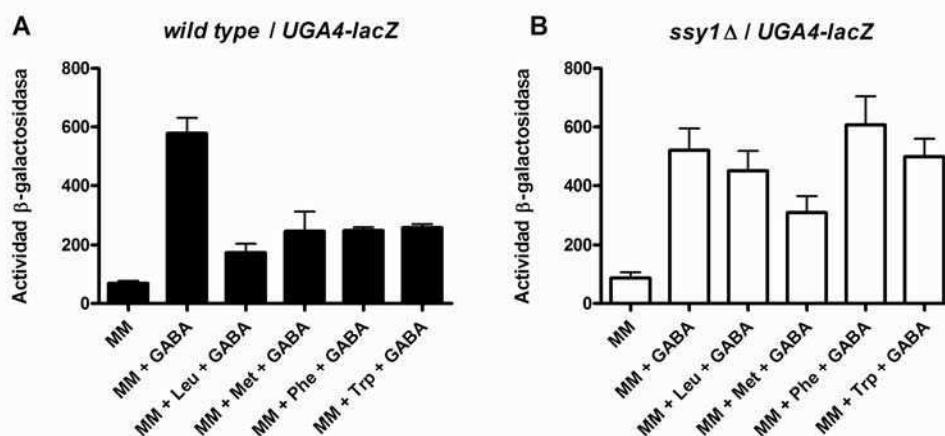


Figura 23. Efecto de los aminoácidos sobre la transcripción dirigida por la construcción *UGA4-lacZ* en células *wild type* y células *ssy1 Δ* . Células *wild type* (23344c) (A) y *ssy1 Δ* (30995b) (B) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron a medio fresco con el agregado o no de leucina, fenilalanina, metionina o triptofano 1,3 mM. Luego de 30 minutos de

incubación, se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a los 60 minutos y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 2 experimentos independientes.

A partir de estos resultados se continuó trabajando con leucina como aminoácido activador del sensor SPS debido a que es un aminoácido ampliamente utilizado en este tipo de estudios y es un fuerte activador de dicho sensor (Forsberg et al., 2001a).

Para corroborar los resultados obtenidos mediante ensayos de genes reporteros, se utilizaron también las técnicas de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) y *Western blot*. Células *wild type* y deficientes en *SSY1* se trataron con leucina y/o GABA y se procedió a la extracción del ARN o de proteínas, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Para realizar el ensayo de *Western blot* se construyeron dos cepas, una *wild type* y la otra *ssy1* Δ , que expresan a la proteína Uga4 fusionada al epítotope HA en su extremo C-terminal, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 2. Los resultados obtenidos al analizar la expresión de *UGA4* utilizando genes reporteros se confirmaron tanto por RT-qPCR (Figura 24A) como por *Western blot* (Figura 24B), es decir, que la leucina inhibe la inducción por GABA del gen *UGA4* y que este efecto es mediado por el sensor SPS.

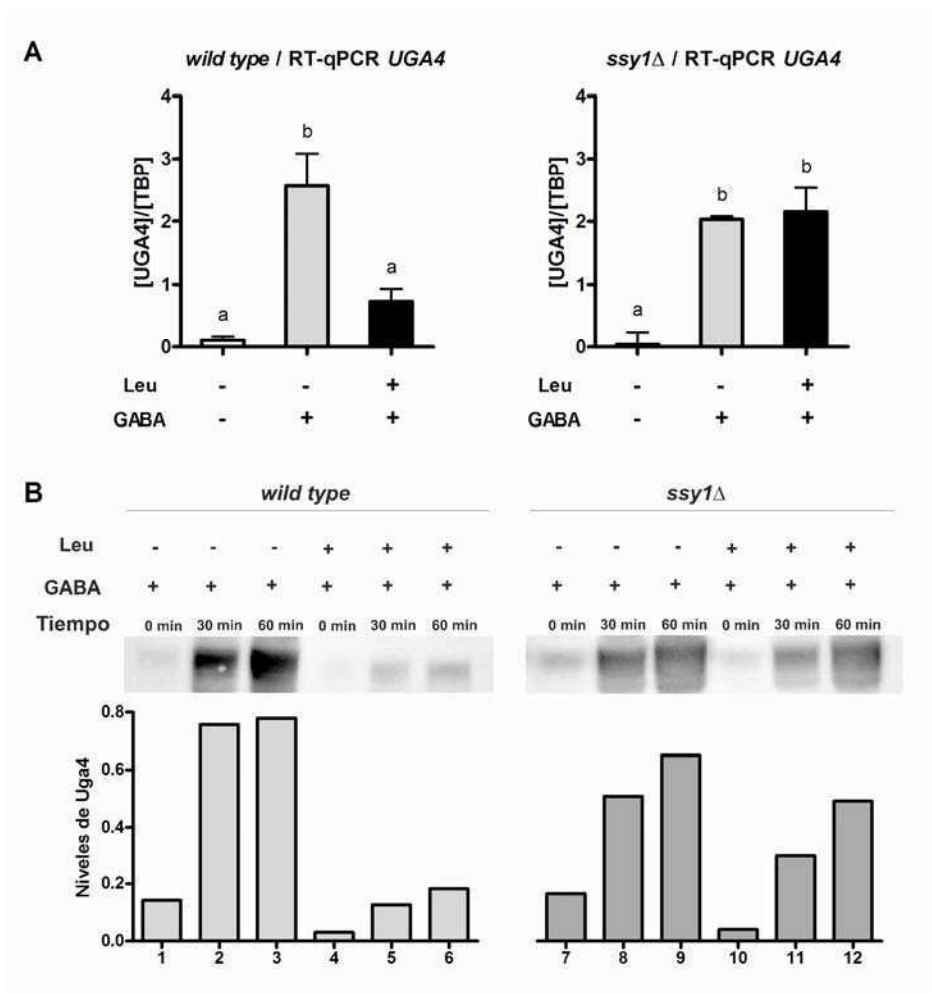


Figura 24. Efecto de la leucina sobre la expresión del gen *UGA4* en células *wild type* y células *ssy1Δ*. (A) Niveles de ARN mensajero del gen *UGA4* en células *wild type* (23344c) y *ssy1Δ* (30995b). Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras), se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). (B) Niveles de expresión de la proteína Uga4-HA en células *wild type* (SBCY31) y *ssy1Δ* (SBCY37). Células que expresan la proteína Uga4-HA provenientes de medio mínimo, se transfirieron al mismo medio con el agregado o no de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a distintos tiempos, se extrajeron proteínas y se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%. Debajo de cada calle se grafican los valores de expresión de la proteína Uga4 calculados normalizando la expresión de dicha proteína a las proteínas totales cargadas en cada calle. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el programa Image-J.

2. Análisis de la región regulatoria del gen *UGA4*

2.1 Búsqueda *in silico* de sitios consenso de unión de factores de transcripción

El promotor del gen *UGA4* contiene dos regiones regulatorias bien caracterizadas denominadas *UAS_{GABA}* y *UAS_{GATA}*. Los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 actúan a través del elemento *UAS_{GABA}* en respuesta al inductor GABA (Andre et al., 1995, Talibi et al., 1995), mientras que los factores GATA actúan a través del elemento *UAS_{GATA}* regulando la expresión dependiente de la fuente de nitrógeno (Coffman et al., 1997, Soussi-Boudekou et al., 1997).

Con el objeto de identificar las regiones regulatorias del gen *UGA4* involucradas en la respuesta a aminoácidos extracelulares se realizó una búsqueda *in silico* de sitios consenso de unión de factores de transcripción sobre el promotor de este gen. Para esto se utilizaron las bases de datos SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>) (Figura 25) e YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com/>) (Figura 26).

>YDL210W UGA4			
+	(118, 123)	GC/FAR	GGGCCC
-	(164, 170)	ECB	GGAAAA
-	(166, 174)	NBF	ATGTGGAAA
-	(189, 194)	GCN4	TGAGTG
+	(211, 216)	GCN4	TGAATG
-	(227, 232)	GCN4	TGATTG
+	(239, 244)	GCN4	TGATTG
+	(243, 248)	GCN4	TGATTT
-	(333, 339)	ECB	GGAAAA
+	(348, 354)	AP-1	TTACTAA
+	(400, 409)	LEU3	CCGCCGGCGG
-	(413, 419)	SCB	CTCGAAA
+	(520, 524)	STRE	AGGGG
-	(523, 527)	ADR1	TCTCC
-	(567, 572)	GCN4	TGATTA
+	(619, 624)	BAS2	TAATGA
+	(645, 650)	GCN4	TGAATA
-	(659, 665)	TBP	TATATAT
+	(660, 666)	TBP	TATATAT
+	(693, 698)	GCN4	TGACTG
+	(722, 727)	GCN4	TGATTA
-	(725, 731)	TBP	TATATAA
+	(726, 732)	TBP	TATATAA
+	(728, 734)	TBP	TATAAAA
-	(784, 789)	BAS2	TAATAA
-	(787, 792)	BAS2	TAATAA
+	(790, 796)	AP-1	TTACTAA

Figura 25. Sitios consenso de unión de factores de transcripción presentes en el promotor del gen *UGA4* obtenidos utilizando la base de datos SCPD.

La búsqueda realizada con la base de datos del SCPD (Figura 25) no mostró presencia de sitios consenso de unión para ninguno de los factores de transcripción efectores de la señal disparada por el sensor SPS como son Stp1, Stp2 o Uga35/Dal81.

La búsqueda realizada utilizando la base de datos del YEASTRACT (Figura 26) no sólo incluye los factores de transcripción potenciales sino que también incluye aquellos factores de transcripción cuya participación en la regulación de *UGA4* se encuentra documentada. Esta búsqueda mostró la participación de los factores Stp1, Stp2 y Uga35/Dal81 en la regulación del gen *UGA4*. En el caso de los factores Stp1 y Stp2 la evidencia proviene de estudios globales de transcripción donde se comparó la expresión del gen *UGA4* en células *wild type* y células deficientes en estos factores (Eckert-Boulet et al., 2004); sin embargo no aporta información acerca de la forma en que estos factores regulan al gen *UGA4* ni de si su efecto sobre el promotor *UGA4* es directo o indirecto. En el caso del factor de transcripción Uga35/Dal81, las evidencias de su participación en la regulación de *UGA4* a través del elemento *UAS_{GABA}* son indirectas (Vissers et al., 1989, Andre et al., 1993). Por otra parte, a partir de estudios globales se postuló su interacción con el promotor de *UGA4* (Harbison et al., 2004).

Considering documented regulations supported by **direct** or **indirect** evidence.

ORF/Gene Name	Documented	Potential	Potential
	Transcription Factor - Reference	Transcription Factor Promoter - TF Binding Site	Transcription Factor Promoter - TF Binding Site
YDL210w/UGA4 Back to top	Dal80p - Reference	Ash1p - Promoter - YTGAT	Mot3p - Promoter - WAGGTA
	Dal81p - Reference	Azf1p - Promoter - AAAAGAAA	Mot3p - Promoter - AAGGKA
	Gat1p - Reference	Azf1p - Promoter - AAGAAAAA	Mot3p - Promoter - CAGGYA
	Gln3p - Reference	Cad1p - Promoter - TTAATAA	Mot3p - Promoter - AAGAGG
	Gzf3p - Reference	Cin5p - Promoter - TTAATAA	Msn2p - Promoter - CCCCT
	Sfp1p - Reference	Fkh1p - Promoter - RYMAAYA	Msn4p - Promoter - CCCCT
	Sok2p - Reference	Fkh2p - Promoter - RYMAAYA	Nrq1p - Promoter - CCCTC
	Stb5p - Reference	Gat1p - Promoter - GATAAG	Nrq1p - Promoter - CCCCT
	Ste12p - Reference	Gcn4p - Promoter - TGATTCA	Rqt1p - Promoter - CGGANNNA
	Stp1p - Reference	Gcn4p - Promoter - TTGCGCAA	Rph1p - Promoter - CCCCT
	Stp2p - Reference	Gcr1p - Promoter - CTTCC	Rta1p - Promoter - GGTAC
	Uga3p - Reference	Gcr1p - Promoter - CWTCC	Rta3p - Promoter - GGTAC
	Ume5p - Reference	Gis1p - Promoter - AGGGG	Stb5p - Promoter - CGGNS
	Yox1p - Reference	Gln3p - Promoter - GATAAG	Swi4p - Promoter - CACGAAA
		Gln3p - Promoter - GATTAG	Tec1p - Promoter - CATTCC
		Gsm1p - Promoter - CGGNNNNNNNCGG	Tec1p - Promoter - CATTCT
		Gzf3p - Promoter - GATAAG	Uga3p - Promoter - SGCGGNWTTT
		Hap1p - Promoter - CGGN(6)CGG	Xbp1p - Promoter - CTCGA
		Leu3p - Promoter - CCGN(4)CGG	Yap1p - Promoter - TTAATAA
		Mcm1p - Promoter - CCYWWNNRG	Yap3p - Promoter - TTAATAA
	Mcm1p - Promoter - DCCYWWNNRG	YER130C - Promoter - AGGGG	
	Mot3p - Promoter - TMGGAA		

Figura 26. Sitios consenso de unión de factores de transcripción presentes en el promotor del gen *UGA4* obtenidos utilizando la base de datos YEASTRACT. En la segunda columna se muestran los factores cuya participación en la regulación de *UGA4* se encuentra reportada, mientras que en la tercera y cuarta columna se muestran los factores de transcripción potenciales de acuerdo con la presencia de sitios consenso para su interacción en el promotor de *UGA4*.

2.2 Estudio de los elementos presentes en la región regulatoria del gen *UGA4* involucrados en la respuesta a aminoácidos

Para estudiar las regiones regulatorias involucradas en la respuesta del gen *UGA4* a los aminoácidos extracelulares se construyeron distintas versiones mutadas del promotor de *UGA4*, las cuales se clonaron río arriba del gen reportero *lacZ* en el plásmido YEp357 (Figura 27), tal como se describió en la sección Materiales y Métodos.

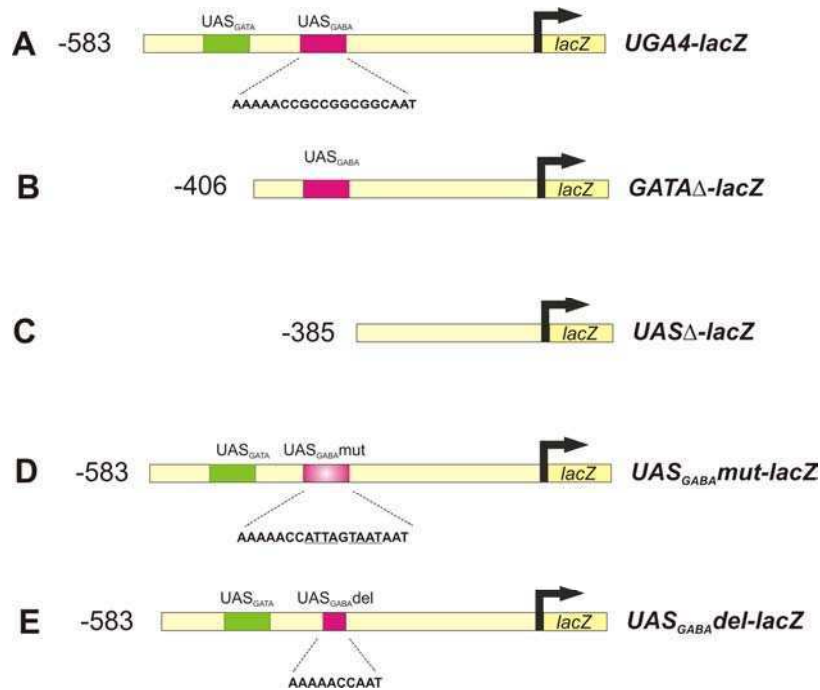


Figura 27. Delecciones y mutaciones realizadas sobre el promotor del gen *UGA4*. (A) Construcción *UGA4-lacZ* que contiene la región 5'-regulatoria y parte de la región codificante de *UGA4* (-583 a +15, con respecto al codón de iniciación ATG). (B) Construcción *UAS_{GATA}Δ-lacZ* que carece del elemento *UAS_{GATA}* (-406 a +15, con respecto al codón de iniciación ATG). (C) Construcción *UASΔ-lacZ* que carece de los elementos *UAS_{GATA}* y *UAS_{GABA}* (-385 a +15, con respecto al codón de iniciación ATG). (D) Construcción *UAS_{GABA}mut-lacZ* donde se alteró la secuencia central del elemento *UAS_{GABA}* cambiando la secuencia GCCGGCGGC por la secuencia ATTAGTAAT. (E) Construcción *UAS_{GABA}del-lacZ* donde se escindió la secuencia central del elemento *UAS_{GABA}* GCCGGCGGC.

Una vez obtenidos los plásmidos con las construcciones, se transformaron células *wild type* y *ssy1Δ* y se realizaron ensayos de medición de actividad de β-galactosidasa a partir de células tratadas con leucina y/o GABA (Figura 28). Los resultados muestran que cuando el elemento *UAS_{GATA}* no está presente, se siguen observando tanto la inducción por GABA como el efecto negativo de la leucina (Figura 28C). En la cepa deficiente en *Ssy1*, en cambio, el efecto negativo de la leucina desaparece (Figura 28D), tal como se había observado para el promotor completo (Figura 28A y B). Por lo tanto, el elemento *UAS_{GATA}* no parece estar involucrado en la respuesta a la leucina extracelular.

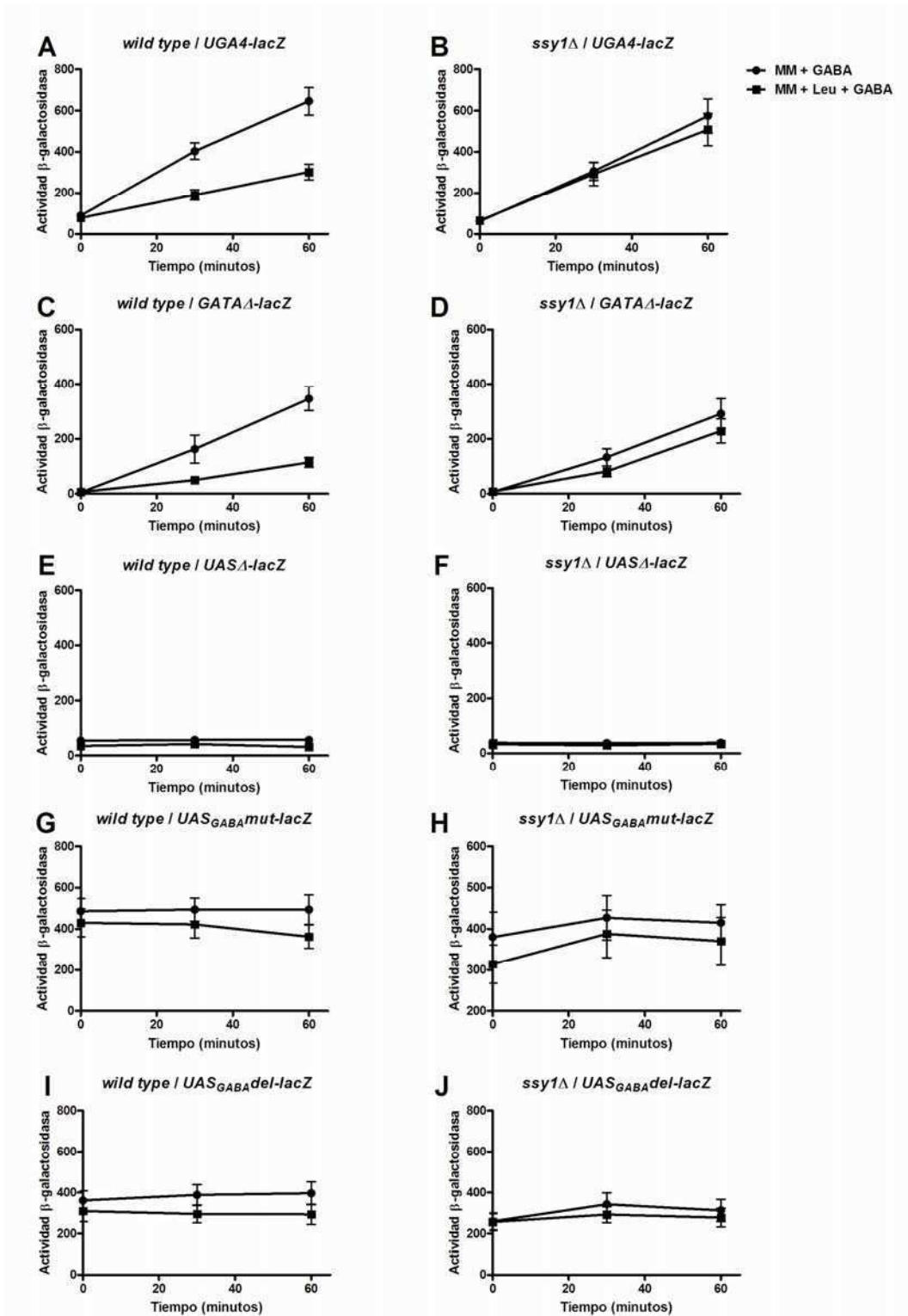


Figura 28. Efecto de la leucina sobre la transcripción dirigida por distintas versiones del promotor *UGA4* en células *wild type* y *ssy1Δ*. Células *wild type* (23344c) y *ssy1Δ* (30995b) transformadas con los plásmidos que contienen las construcciones *UGA4-lacZ*, *UAS_{GATAΔ}-lacZ*, *UASΔ-lacZ*, *UAS_{GABA}mut-lacZ* y *UAS_{GABA}del-lacZ* provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (cuadrados) o no

(círculos) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a distintos tiempos y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 5 experimentos independientes.

El hecho de que los niveles basales de expresión se reduzcan cuando el elemento UAS_{GATA} está ausente (comparar Figura 28A con Figura 28C) correlaciona con lo descrito por Talibi y col. (Talibi et al., 1995), quienes demostraron que el elemento UAS_{GATA} es capaz de producir niveles significativos de expresión en ausencia de inductor cuando las células están creciendo en presencia de una fuente pobre de nitrógeno como prolina.

En ausencia de ambos elementos regulatorios (UAS_{GATA} y UAS_{GABA}), no se observa inducción por GABA del gen $UGA4$ ni efecto de la leucina en ninguna de las dos cepas ensayadas (Figura 28E y F). El elemento UAS_{GABA} ha sido identificado como el blanco de los factores responsables de la inducción por GABA del gen $UGA4$ (Talibi et al., 1995), por lo que no se esperaba observar inducción al utilizar la construcción $UAS\Delta-lacZ$.

Por último, se estudió la participación de la región central del elemento UAS_{GABA} en la respuesta a aminoácidos. El factor de transcripción Uga35/Dal81 actúa, junto con el factor Uga3, a través del elemento UAS_{GABA} del gen $UGA4$ induciendo su transcripción en respuesta al GABA (Andre et al., 1995, Talibi et al., 1995). Además, Uga35/Dal81 es necesario para la inducción de la permeasa de aminoácidos $AGP1$ en respuesta a los aminoácidos extracelulares (Boban & Ljungdahl, 2007, Abdel-Sater et al., 2004b, Iraqui et al., 1999). Por otra parte, se ha reportado que las secuencias blanco de la respuesta a aminoácidos, denominadas UAS_{aa} , presentes en los promotores de los genes $BAP3$, $BAP2$ y $AGP1$, tienen en común la presencia de dos secuencias CGGC espaciadas por entre tres y seis nucleótidos (Abdel-Sater et al., 2004b) y que en el caso del gen de la permeasa $AGP1$ ésta secuencia sería también blanco del factor de transcripción Uga35/Dal81 (Boban & Ljungdahl, 2007). La secuencia central del elemento UAS_{GABA} del gen $UGA4$ contiene dos repeticiones CGGC similares a las presentes en los elementos UAS_{aa} pero espaciadas solamente por una base. Teniendo en cuenta esos antecedentes se decidió alterar esta secuencia y así estudiar su participación

en la regulación por aminoácidos del gen *UGA4*. En la Figura 28G se observa que al alterar el elemento UAS_{GABA} del gen *UGA4* los niveles de expresión aumentan significativamente inclusive en ausencia de inductor. Este resultado sugiere la presencia de un represor actuando a través del elemento UAS_{GABA} en el promotor *wild type* cuyo sitio de unión se alteró al realizar la mutagénesis dirigida. Para confirmar que los valores elevados de expresión eran causados por la alteración del elemento UAS_{GABA} y no por la secuencia generada luego de la mutación, se deletionó la secuencia central de dicho elemento. En la Figura 28I se puede ver que la expresión dirigida por la construcción $UAS_{GABAdel-lacZ}$ también es elevada en ausencia de inductor, confirmando los resultados obtenidos con la construcción $UAS_{GABAmut-lacZ}$.

En células *wild type* (Figura 28G e I), y en menor medida en células *ssy1Δ* (Figuras 28H y J), se puede observar que la transcripción dirigida por ambas construcciones, $UAS_{GABAmut-lacZ}$ y $UAS_{GABAdel-lacZ}$, se ve levemente afectada por el agregado de leucina al medio. El gen *lacZ* ha sido ampliamente utilizado como gen reportero en levaduras para estudiar sistemas inducibles donde se requiere síntesis *de novo* de la enzima β -galactosidasa (Serebriiskii & Golemis, 2000). Como las construcciones $UAS_{GABAmut-lacZ}$ y $UAS_{GABAdel-lacZ}$ generan niveles basales de expresión altos, es de esperar que haya una acumulación de la enzima β -galactosidasa, la cual podría estar impidiendo la visualización de disminuciones en los niveles de transcripción a tiempos cortos. Para determinar si existe una represión causada por el agregado de leucina al medio sobre la transcripción de las versiones mutadas del promotor *UGA4*, $UAS_{GABAmut}$ y $UAS_{GABAdel}$, se decidió medir los niveles de expresión a nivel de ARN mensajero de las versiones mutadas del promotor *UGA4*. Para ello, se construyeron dos cepas que contienen dichas mutaciones en el promotor del gen *UGA4* en el genoma, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 6. Los resultados (Figura 29) muestran que los niveles basales de expresión del gen *UGA4* bajo el control de los promotores $UGA4::UAS_{GABAmut}$ y $UGA4::UAS_{GABAdel}$ son significativamente mayores con respecto a la expresión de *UGA4* bajo el promotor *wild type* y el agregado de GABA no produce una expresión mayor confirmando los resultados observados en los ensayos de β -galactosidasa

(Figura 28G e I). Cuando se pre-incubaban las células con leucina antes del agregado del GABA se observa una disminución en la expresión similar a la observada en los ensayos de β -galactosidasa. Esta represión de la expresión constitutiva del promotor mutado parece ser menor a la inhibición de la inducción observada para el promotor *wild type* (comparar con Figura 24A), por lo que la secuencia central del elemento UAS_{GABA} podría ser en parte responsable del efecto de la leucina sobre el promotor del gen *UGA4*. Cabe aclarar que una represión de la expresión constitutiva no es comparable a una inhibición de la inducción por lo que es necesario utilizar otro abordaje experimental para estudiar la participación del elemento UAS_{GABA} en la respuesta a aminoácidos extracelulares.

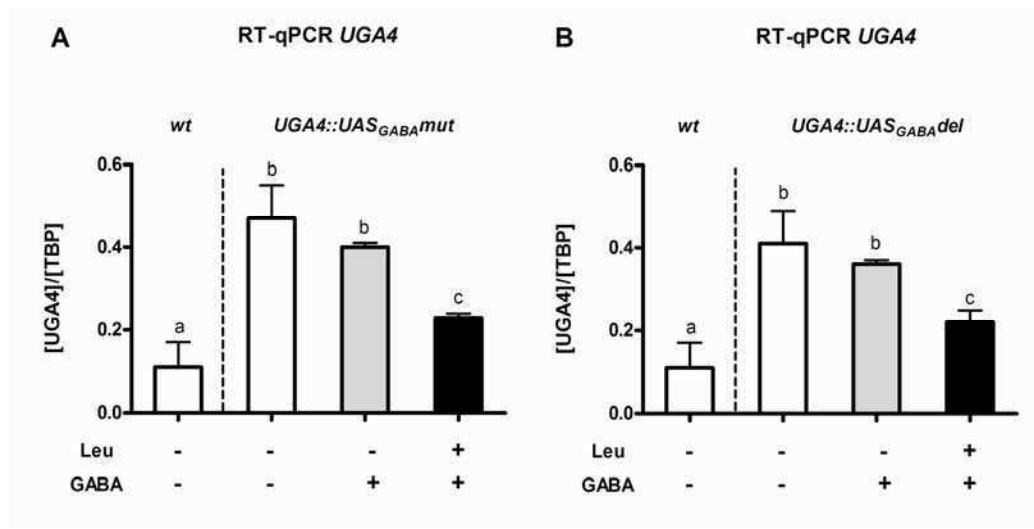


Figura 29. Transcripción del gen *UGA4* bajo el control de versiones mutadas de su promotor. Se midieron los niveles de ARN mensajero del gen *UGA4* en células *UGA4::UAS_{GABA}^{mut}* (SBCY29) (A) y *UGA4::UAS_{GABA}^{del}* (SBCY30) (B). En ambos casos se graficaron también los niveles basales de expresión de *UGA4* en células *wild type* para facilitar el análisis. Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

3. El factor de transcripción Leu3 actúa como represor sobre el elemento UAS_{GABA} del promotor $UGA4$ de forma indirecta e independiente de α -IPM

A partir de los resultados obtenidos alterando el elemento UAS_{GABA} del promotor $UGA4$ por mutagénesis dirigida se decidió realizar un análisis *in silico* buscando posibles factores de transcripción que pudieran estar actuando negativamente sobre esa región. Si bien se sabe que los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 actúan a través del elemento UAS_{GABA} no se los consideró posibles represores del gen $UGA4$ ya que la ausencia de estos factores produce niveles indetectables de expresión (Andre, 1990, Talibi et al., 1995).

Utilizando la base de datos SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>) se compararon los sitios consenso de unión de factores de transcripción presentes en el promotor del gen $UGA4$ y en la versión del mismo que tiene la secuencia central del elemento UAS_{GABA} mutada (Figura 30). Identificamos un factor de transcripción denominado Leu3 cuyo sitio consenso de unión al ADN coincide con la secuencia central del elemento UAS_{GABA} , como ya se había reportado (Talibi et al., 1995, Noel & Turcotte, 1998). Inicialmente se había vinculado a Leu3 con la regulación transcripcional de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Zhou & Kohlhaw, 1990, Friden & Schimmel, 1988), aunque luego se descubrió que también participa en la regulación de la transcripción de la permeasa de aminoácidos ramificados $BAP2$ (Nielsen *et al.*, 2001) y del gen $GDH1$, responsable principalmente de la asimilación de amonio (Hu *et al.*, 1995), entre otros genes. Estudios globales realizados utilizando células $leu3\Delta$ creciendo bajo condiciones limitantes de nitrógeno reportaron variaciones en los niveles transcripcionales de varios genes, entre los que se incluye $UGA4$ (Boer et al., 2005).

Sitios consenso presentes en el promotor de <i>UGA4</i>				Sitios consenso presentes en el promotor <i>UGA4_{mut}</i>			
-	(8, 13)	GCN4	TGATTG	-	(8, 13)	GCN4	TGATTG
+	(20, 25)	GCN4	TGATTG	-	(20, 25)	GCN4	TGATTG
+	(24, 29)	GCN4	TGATTG	+	(24, 29)	GCN4	TGATTG
-	(114, 120)		GGAAAA	-	(114, 120)	ECB	GGAAAA
-	(129, 135)	AP-1	TTACTAA	-	(129, 135)	AP-1	TTACTAA
+	(181, 190)	LEU3	CCGCCGCCG	+	(181, 190)	AP-1	TTAGTAA
+	(194, 200)	SCB	CTCGAAA	-	(188, 193)	BAS2	TAATAA
+	(301, 305)	STRE	AGGGG	-	(194, 200)	SCB	CTCGAAA
-	(304, 308)	ADR1	TCTCC	+	(301, 305)	STRE	AGGGG
-	(348, 353)	GCN4	TGATTA	-	(304, 308)	ADR1	TCTCC
-	(400, 405)	BAS2	TAATGA	-	(348, 353)	GCN4	TGATTA
+	(426, 431)	GCN4	TGAATA	+	(400, 405)	BAS2	TAATGA
-	(440, 446)	TBP	TATATAT	-	(426, 431)	GCN4	TGAATA
+	(441, 447)	TBP	TATATAT	-	(440, 446)	TBP	TATATAT
+	(474, 479)	GCN4	TGACTG	+	(441, 447)	TBP	TATATAT
+	(503, 508)	GCN4	TGATTA	-	(474, 479)	GCN4	TGACTG
+	(506, 512)	TBP	TATATAA	+	(503, 508)	GCN4	TGATTA
+	(507, 513)	TBP	TATATAA	-	(506, 512)	TBP	TATATAA
+	(509, 515)	TBP	TATATAA	+	(507, 513)	TBP	TATATAA
-	(565, 570)	BAS2	TAATAA	-	(509, 515)	TBP	TATATAA
-	(568, 573)	BAS2	TAATAA	-	(565, 570)	BAS2	TAATAA
+	(571, 577)	AP-1	TTACTAA	+	(568, 573)	BAS2	TAATAA
				+	(571, 577)	AP-1	TTACTAA

Figura 30. Comparación de los sitios consenso de unión de factores de transcripción presentes en el promotor *UGA4* y en el promotor *UGA4_{mut}*

El hecho de que alterar el sitio consenso de unión del factor de transcripción Leu3 presente en la secuencia central del elemento *UAS_{GABA}* produzca niveles elevados de transcripción en ausencia de inductor, junto con los resultados publicados por Boer y col. (Boer et al., 2005), nos llevaron a postular a Leu3 como un posible represor del gen *UGA4*. Para confirmarlo generamos una cepa deficiente en dicha proteína tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 1.1.

Células *leu3Δ* transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* se trataron con leucina y/o GABA y se realizaron ensayos de medición de actividad de β-galactosidasa. En la Figura 31A se observa que los niveles de expresión de la construcción *UGA4-lacZ* en la cepa *leu3Δ* son elevados inclusive en ausencia de inductor. Este patrón de expresión se asemeja al observado en la Figura 28G e I donde se analizó la actividad del promotor *UGA4* con el elemento *UAS_{GABA}* mutado o la del promotor incompleto pero en la cepa *wild type*. Estos resultados nos indican que el factor de transcripción Leu3 está actuando directa o indirectamente como un represor sobre el gen *UGA4*.

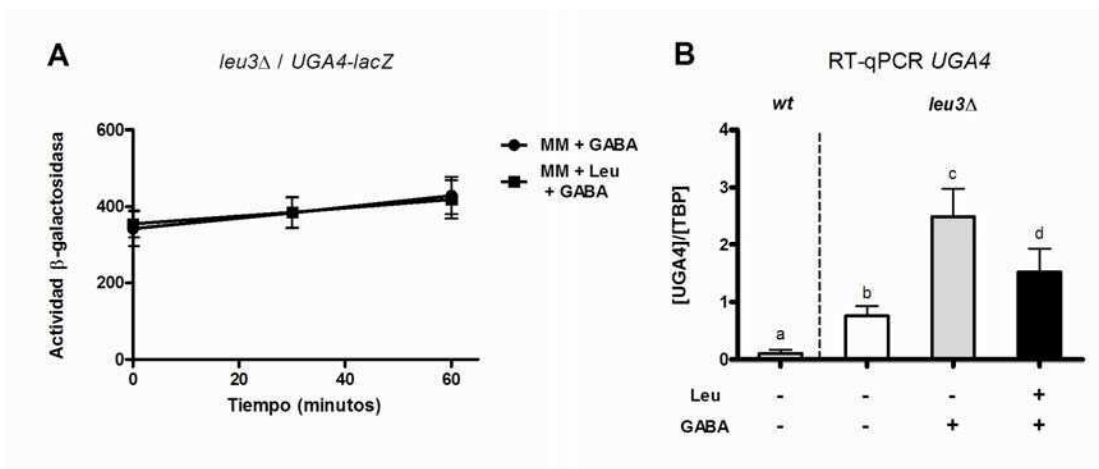


Figura 31. Regulación del gen *UGA4* por el factor *Leu3*. (A) Células *leu3Δ* (SBCY01) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (cuadrados) o no (círculos) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a distintos tiempos y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 5 experimentos independientes. (B) Se midieron los niveles de ARN mensajero del gen *UGA4* en células *leu3Δ* (SBCY01). Células provenientes de medio mínimo, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Se graficaron también los niveles basales de expresión de *UGA4* en células *wild type* para facilitar el análisis. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Los niveles de expresión de *UGA4-lacZ* no parecen aumentar a lo largo del tiempo luego del agregado de GABA ni tampoco parecen afectarse por el agregado de leucina (Figura 31A). Para confirmar estos resultados se midieron los niveles de ARN mensajero del gen *UGA4* en células de la cepa *leu3Δ* tratadas con leucina y/o GABA. Los resultados (Figura 31B) muestran que los niveles basales de expresión de *UGA4* son mayores en la cepa *leu3Δ* que en la cepa *wild type*, tal como se había observado en los ensayos de β -galactosidasa (Figura 31A). Si bien en ausencia del factor *Leu3* existe inducción por GABA del gen *UGA4* (3 veces de inducción), esta inducción es menor que en una cepa *wild type* (23 veces de inducción) (Figura 24A). Por otra parte, no se observa efecto de la leucina sobre la expresión de *UGA4-lacZ* (Figura 31A) pero sí sobre los niveles de ARN mensajero (Figura 31B). Estas diferencias probablemente se deban a la acumulación de la enzima β -

galactosidasa causada por la expresión constitutiva de *UGA4-lacZ* en la cepa *leu3Δ*, la cual enmascara la inducción en respuesta al GABA. En cuanto al efecto inhibitorio de la leucina sobre la inducción, este efecto es dos veces menor en la cepa *leu3Δ* (Figura 31B) que en la cepa *wild type* (Figura 24A). Estos resultados sugieren que el factor Leu3 podría estar mediando parte del efecto de la leucina sobre el gen *UGA4*.

Con el objetivo de determinar si la acción del factor Leu3 sobre el gen *UGA4* es directa a través de su interacción con el promotor de este gen se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP). Para esto fue necesario construir una cepa que expresa la proteína Leu3 fusionada en su extremo C-terminal al epítoto HA, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo 1, Sección 2. Las células que expresan la proteína de fusión Leu3-HA se trataron o no con leucina y se realizó el ensayo de ChIP tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. No se detectó unión significativa del factor Leu3 al promotor de *UGA4* en las condiciones ensayadas (Figura 32). Por el contrario, sí se detectó unión de Leu3-HA al promotor del gen utilizado como control positivo, *LEU2*.

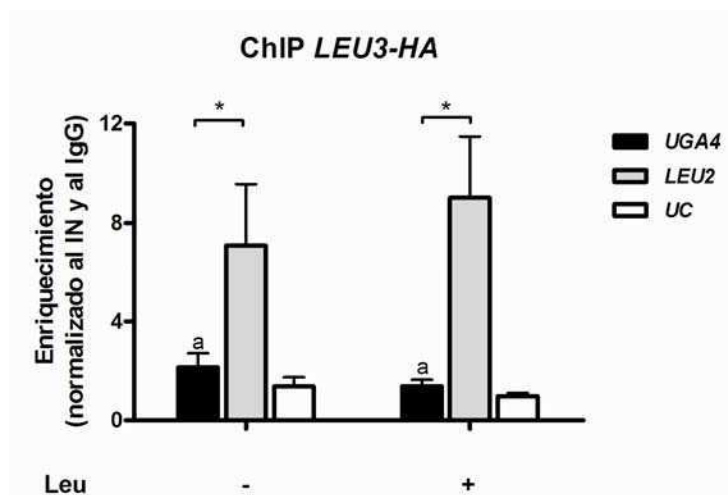


Figura 32. Análisis de la interacción del factor de transcripción Leu3 con el promotor de *UGA4*. Células que expresan la proteína Leu3-HA (SBCY02) provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de leucina 1,3 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítoto HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (F/R-UGA4qPCR) (barras negras), una región del promotor de *LEU2* (F/R-LEU2qPCR) (barras grises) (control positivo) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (F/R-UCqPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó el cociente de señal versus ruido sobre el

control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés o Enriquecimiento se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$. Los datos representan la media \pm EE de 5 experimentos independientes. Las letras representan la comparación entre condiciones para el promotor *UGA4*. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). El asterisco representa diferencias significativas entre distintos pares de *primers* ($p < 0,05$).

Estos resultados sugieren una acción indirecta del factor Leu3 sobre el gen *UGA4*, aunque no podemos descartar que la interacción entre Leu3-HA y el promotor de *UGA4* ocurra pero no esté siendo detectada.

Resultados similares se obtuvieron utilizando una cepa que expresa la proteína Leu3 fusionada al epítotope HA en su extremo N-terminal.

Se sabe que la actividad regulatoria de Leu3 depende de los niveles de α -IPM. En condiciones donde los niveles de α -IPM son altos, Leu3 actúa como un activador, mientras que cuando los niveles son bajos, actúa como un represor (Kohlhaw, 2003). Para determinar si el efecto represor de Leu3 sobre *UGA4* es también regulado por los niveles intracelulares de α -IPM, construimos dos cepas con distintas capacidades de sintetizar α -IPM, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo 1, secciones 1.1, 1.2, 5 y 7. La primera de ellas es una cepa *leu4 Δ leu5 Δ* que es incapaz de sintetizar α -IPM ya que carece de actividad de la enzima α -IPM sintasa. La segunda cepa expresa una versión mutada de la proteína Leu4 insensible al *feedback* negativo por leucina. Dicha mutación causa tanto acumulación del intermediario de la biosíntesis de la leucina, el α -IPM, como de leucina, incluso en condiciones donde hay exceso de dicho aminoácido (Hu et al., 1995).

Células *wild type*, *leu4 Δ leu5 Δ* , *LEU4^{fbr}* y *ssy1 Δ* transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* se hicieron crecer en medio mínimo o en medio mínimo conteniendo leucina (2 mM) e isoleucina (1 mM). En esta última condición se espera una disminución de los niveles intracelulares de α -IPM en células *wild type*, pero no en células *LEU4^{fbr}* (Hu et al., 1995). Luego las células se trataron o no con GABA y se realizaron ensayos de medición de actividad de β -galactosidasa. En la Tabla 7 se puede observar que tanto en la cepa *wild type* como en la cepa mutante que expresa la enzima α -IPM sintasa resistente a *feedback* por leucina (*LEU4^{fbr}*) la expresión de *UGA4-lacZ* dependiente de GABA en medio mínimo es alta. Sin embargo, cuando estas

dos cepas crecieron en presencia de leucina e isoleucina los niveles de inducción dependiente de GABA se redujeron. Cuando se realizó el experimento de la misma manera pero utilizando una cepa *ssy1Δ*, esta reducción no se produjo indicando que la menor inducción observada es causada por la señal disparada por el sensor SPS en respuesta a los aminoácidos y no por una disminución en los niveles intracelulares de α -IPM.

Tabla 7. Expresión de la construcción *UGA4-lacZ* en células con distintas capacidades de sintetizar α -IPM.

	<i>wild type</i>	<i>ssy1Δ</i>	<i>leu4Δ leu5Δ</i> ^a	<i>LEU4^{ibr}</i>
MM	70 ± 13	80 ± 8	45 ± 9	71 ± 9
MM + GABA	506 ± 80	495 ± 24	59 ± 7	511 ± 27
MM + Leu (2 mM) + Ile (1 mM)^b	66 ± 2	44 ± 3	21 ± 4	92 ± 9
MM + Leu (2 mM) + Ile (1 mM)^b + GABA	284 ± 27	470 ± 22	53 ± 5	266 ± 3

^a La cepa SBCY05 requiere leucina (0,23 mM) para su crecimiento.

^b Como altas concentraciones de leucina pueden causar retardo en el crecimiento, se agregó isoleucina para aliviar este efecto (Hu et al., 1995).

Células *wild type* (23344c), *ssy1Δ* (30995b), *leu4Δ leu5Δ* (SBCY05) y *LEU4^{ibr}* (SBCY08/pSBC-*LEU4^{ibr}*) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* crecieron en medio mínimo (MM) o medio mínimo con el agregado de leucina (2mM) e isoleucina (1 mM). Cada cultivo se dividió en dos partes y sólo una mitad fue incubada con GABA 0,1 mM durante 60 minutos. Pasado este tiempo se tomaron muestras y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

Por otra parte, cuando se analizaron los niveles de expresión de *UGA4-lacZ* en la cepa *leu4Δ leu5Δ*, donde se espera que Leu3 actúe como un fuerte represor debido a que esta cepa carece de actividad α -IPM sintasa (Kohlhaw, 2003), se observó una drástica disminución en la inducción en comparación con la observada para la cepa *wild type* indicando que la actividad represora de Leu3 sobre *UGA4* es mayor en estas condiciones.

Debido a la falta de inducción por GABA del gen *UGA4* en células *leu4Δ leu5Δ*, se decidió estudiar los niveles de expresión de los factores de transcripción responsables de esta inducción, Uga3 y Uga35/Dal81, en condiciones de bajo

α -IPM y en ausencia de Leu3. Para esto se midió la actividad de la enzima β -galactosidasa en cepas deficientes en Leu3 y en Leu4 y Leu5 transformadas con los plásmidos que contienen las construcciones *UGA3-lacZ* y *UGA35-lacZ*. En la Tabla 8 se observa que cuando Leu3 está ausente o cuando los niveles de α -IPM son bajos los niveles de expresión de *UGA35-lacZ* son prácticamente indetectables. Por otra parte los niveles de expresión de *UGA3-lacZ* también disminuyen en ausencia de Leu3 y prácticamente no se detectan cuando los niveles de α -IPM son bajos. Estos resultados sugieren que el efecto represor fuerte de Leu3 cuando los niveles de α -IPM son bajos podría ser en realidad un efecto indirecto a través de la regulación de la expresión de los factores de transcripción positivos Uga3 y Uga35/Dal81.

Tabla 8. Expresión de las construcciones *UGA35-lacZ* y *UGA3-lacZ* en células *wild type*, *leu3* Δ y *leu4* Δ *leu5* Δ .

	<i>wild type</i>	<i>leu3</i> Δ	<i>leu4</i> Δ <i>leu5</i> Δ
<i>UGA35-lacZ</i>	47 \pm 3	\leq 10	\leq 10
<i>UGA3-lacZ</i>	128 \pm 8	36 \pm 2	\leq 10

Células *wild type* (23344c), *leu3* Δ (SBCY01) y *leu4* Δ *leu5* Δ (SBCY05) transformadas con los plásmidos que contienen las construcciones *UGA35-lacZ* y *UGA3-lacZ* provenientes de medio mínimo, se cosecharon y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

4. Gcn4 no interviene en la regulación del gen *UGA4* por leucina

La expresión del factor de transcripción Leu3 se encuentra positivamente regulada por los mecanismos generales de control de aminoácidos (GAAC), los cuales son mediados por el factor de transcripción Gcn4 (Natarajan et al., 2001). También se ha sugerido que *GCN4* es un blanco directo del factor Leu3 y que entre ambos factores existe una mutua retroalimentación positiva (Tang et al., 2006).

La existencia de una regulación mutua entre los factores de transcripción Leu3 y Gcn4, junto con el hecho de que el análisis *in silico* del promotor de *UGA4* reveló la presencia de múltiples sitios consenso de unión al ADN para este

último factor (Figuras 25 y 26), nos impulsó a estudiar su participación en la regulación de la transcripción del gen *UGA4* por leucina.

Para esto, se construyó una cepa deficiente en el factor Gcn4 (ver sección Materiales y Métodos y Capítulo 1, sección 1.1) donde se analizó el patrón de expresión de la construcción *UGA4-lacZ*. Los resultados que se muestran en la Figura 33 indican que los patrones de inducción y de respuesta a la leucina extracelular en la cepa *gcn4Δ* son similares a los observados en la cepa *wild type*, es decir que se observa inducción por GABA y efecto negativo de la leucina. Por lo tanto Gcn4 no estaría involucrado en el efecto de los aminoácidos sobre *UGA4*.

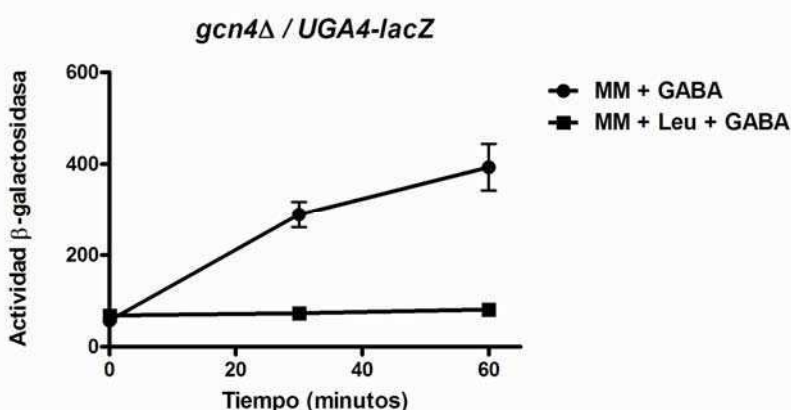


Figura 33. Efecto del factor Gcn4 en la expresión de *UGA4*. Células *gcn4Δ* (SBCY03) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* provenientes de medio mínimo (MM), se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (cuadrados) o no (círculos) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a distintos tiempos y se midió actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media ± EE de 4 experimentos independientes.

Llamativamente, el efecto de la leucina sobre la construcción *UGA4-lacZ* en la cepa *gcn4Δ* fue de mayor que en la cepa *wild type*, donde se observa una inducción residual luego de la pre-incubación con dicho aminoácido (comparar Figura 33 con Figura 28A).

5. Los factores Stp1 y Stp2 están involucrados en la respuesta de *UGA4* a los aminoácidos extracelulares

Se sabe que permeasas de aminoácidos, como por ejemplo *BAP2* y *AGP1*, responden a aminoácidos vía SPS a través de los factores de transcripción Stp1 y Stp2 (Ljungdahl, 2009) y que el factor de transcripción Uga35/Dal81 es necesario para la completa inducción de estos genes en respuesta a los aminoácidos (Abdel-Sater et al., 2004b, Bernard & Andre, 2001b, Iraqui et al., 1999, Boban & Ljungdahl, 2007). Para estudiar la participación de los factores Stp1, Stp2 y Uga35/Dal81 en la regulación por leucina del gen *UGA4* se transformaron cepas deficientes en cada uno de estos tres factores (*stp1Δ*, *stp2Δ* y *uga35Δ*) con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* y se realizaron ensayos de medición de actividad de β -galactosidasa en presencia de leucina y/o GABA. Si se compara el resultado obtenido para la cepa *wild type* (Figura 28A) con el obtenido con cada una de las mutantes simples *stp1Δ* y *stp2Δ* (Figuras 34A y B), se podría pensar que ninguno de estos factores interviene en la regulación por leucina del gen *UGA4* ya que en ambos casos se sigue observando un efecto inhibitorio causado por dicho aminoácido. Sin embargo, cuando el ensayo se realiza utilizando una cepa deficiente en ambos factores (Figura 34C) el efecto de la leucina se pierde casi por completo de forma similar a lo observado para la cepa *ssy1Δ* (Figura 28B). Estos resultados indican que al menos uno de los dos factores tiene que estar presente para que se produzca el efecto inhibitorio de la leucina. Estos resultados también refuerzan la propuesta de que Stp1 y Stp2 poseen funciones parcialmente redundantes (Andreasson & Ljungdahl, 2002).

Para estudiar la función del factor de transcripción Uga35/Dal81 en el efecto de aminoácidos sobre *UGA4* no es posible utilizar la metodología de genes reporteros ya que cuando este factor está ausente los niveles de inducción de *UGA4* son prácticamente nulos (Figura 34D).

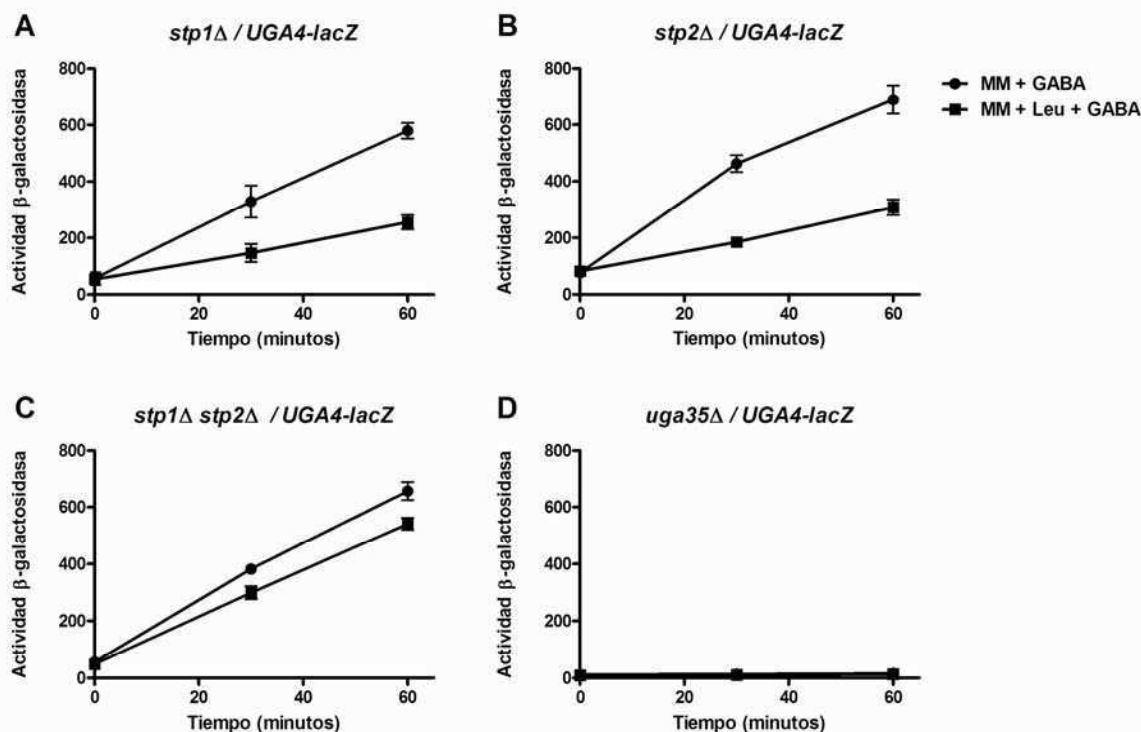


Figura 34. Efecto de la leucina sobre la transcripción dirigida por la construcción *UGA4-lacZ* en células *stp1Δ*, *stp2Δ*, *stp1Δ stp2Δ* y *uga35Δ*. Células *stp1Δ* (KW018) (A), *stp2Δ* (KW021) (B), *stp1Δ stp2Δ* (KW023) (C) y *uga35Δ* (FA050) (D) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ*, provenientes de medio mínimo (MM), se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (cuadrados) o no (círculos) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM, se tomaron muestras a distintos tiempos y se midió actividad de la enzima β -galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media \pm EE de 4 experimentos independientes.

6. La unión de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* depende de GABA y de leucina

El factor de transcripción Uga35/Dal81 es requerido para la inducción de varias permeasas de aminoácidos en respuesta a señales disparadas por el sensor SPS (Boban & Ljungdahl, 2007, Abdel-Sater et al., 2004b) y además es requerido para la inducción de los genes *UGA* en respuesta al GABA (Talibi et al., 1995). Por esto, se decidió estudiar la unión *in vivo* del factor de transcripción Uga35/Dal81 al promotor del gen *UGA4* y establecer si este factor está involucrado en el efecto de la leucina extracelular sobre la transcripción de *UGA4*.

Para llevar a cabo este objetivo se generó una cepa que expresa la proteína Uga35/Dal81 fusionada en su extremo N-terminal al epítipo HA bajo el control de su propio promotor tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 3. Dichas células se trataron con leucina y/o GABA y se llevaron a cabo ensayos de ChIP. Como se muestra en la Figura 35A, no se detectó unión del factor de transcripción HA-Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* ni en medio mínimo ni luego del agregado de leucina. Sin embargo, sí se detectó unión al promotor del gen *UGA4* luego de incubar las células con GABA (Figura 35A). Llamativamente, la pre-incubación de las células con leucina antes del agregado del GABA impidió esta unión, lo que correlaciona con los niveles menores de inducción observados en estas condiciones (Figuras 23A, 24 y 28A).

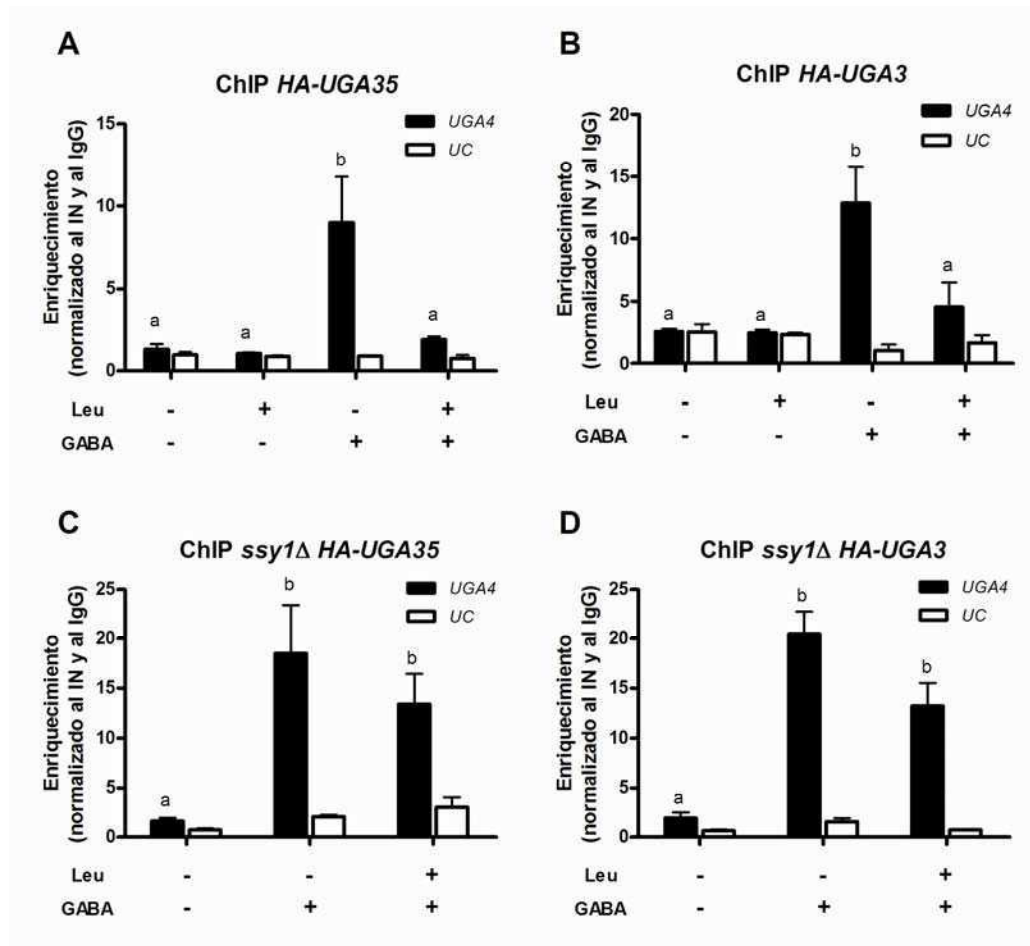


Figura 35. Efecto del GABA y la leucina sobre el reclutamiento de los factores de transcripción Uga35/Dal81 y Uga3 al promotor de *UGA4* en células *wild type* y *ssy1*Δ. Células *wild type* que expresan las proteínas HA-Uga35/Dal81 (SBCY10) (A) o HA-Uga3 (SBCY13) (B) y células *ssy1*Δ que expresan las proteínas HA-Uga35/Dal81 (SBCY24) (C) o

HA-Uga3 (SBCY26) **(D)** provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de leucina 1,3 mM y/o GABA 0,1 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítoto HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (F/R-UGA4qPCR) (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (F/R-UCqPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó un cociente de señal versus ruido sobre el control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés o Enriquecimiento se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las letras representan la comparación entre condiciones para el promotor *UGA4*. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Uga35/Dal81 actúa junto con un factor de transcripción específico de inductor (Abdel-Sater et al., 2004b) en distintos procesos de inducción: en la transcripción de genes controlados por el camino de señalización SPS y en la inducción por GABA de los genes *UGA*. En el caso de la respuesta al GABA del gen *UGA4*, este factor es Uga3. Por esta razón se decidió investigar la unión *in vivo* del factor de transcripción Uga3 al promotor del gen *UGA4* en las mismas condiciones ensayadas para estudiar la unión del factor Uga35/Dal81. Para llevar a cabo este objetivo se generó una cepa que expresa la proteína Uga3 fusionada al epítoto HA en su extremo N-terminal bajo el control de su propio promotor tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 3. Los resultados obtenidos muestran que la proteína HA-Uga3 interactúa con el promotor de *UGA4* en forma similar a HA-Uga35/Dal81 (Figura 35B), es decir que Uga3 también se une al promotor de *UGA4* en una forma dependiente de GABA y que la leucina debilita esta interacción.

Para determinar si el efecto de la leucina sobre la unión al promotor de *UGA4* de los factores HA-Uga3 y HA-Uga35/Dal81 depende del sensor SPS, se estudió la interacción de dichos factores con el promotor de *UGA4* en cepas deficientes en la proteína Ssy1. Para llevar a cabo este objetivo se construyeron cepas deficientes en la proteína Ssy1 que expresan versiones etiquetadas de las proteínas Uga3 y Uga35/Dal81 en su extremo N-terminal, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, secciones 3 y 4.

Las células *ssy1* Δ que expresan las proteínas de fusión HA-Uga35/Dal81 o HA-Uga3 se trataron con leucina y/o GABA y se realizaron ensayos de ChIP. Se detectó que ambos factores de transcripción se unen al promotor de *UGA4* en

una forma dependiente de GABA aún en presencia de leucina (Figura 35C y D), confirmando que la menor capacidad de unión de las proteínas HA-Uga3 y HA-Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* observada en células *wild type* (Figuras 35A y B) es causada por la señal disparada por la leucina a través del sensor SPS.

7. Los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 se requieren mutuamente para la unión al promotor del gen *UGA4*

En la literatura no existen reportes que relacionen al factor de transcripción Uga3 con los caminos de señalización disparados en respuesta a aminoácidos. Una posible explicación al hecho de que dicho factor no se una al promotor de *UGA4* en respuesta al GABA cuando las células son pre-incubadas con leucina, podría ser que Uga3 necesitara al factor Uga35/Dal81 para unirse apropiadamente al promotor de *UGA4*. Para estudiar esta hipótesis se construyó una cepa deficiente en la proteína Uga35/Dal81 que expresa la proteína Uga3 fusionada al epítipo HA en su extremo N-terminal tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 3. Dichas células se trataron o no con GABA y se realizaron ensayos de ChIP. Los resultados obtenidos (Figura 36A) muestran que en ausencia del factor Uga35/Dal81, el factor Uga3 no es capaz de interactuar con el promotor del gen *UGA4* en respuesta al GABA, indicando que el factor Uga3 necesita al factor Uga35/Dal81 para interactuar con promotor de *UGA4*. Estos resultados son similares a los observados para el gen *AGP1*, donde se demostró que el factor Uga35/Dal81 es necesario para que ocurra la interacción de Stp1 con dicho promotor (Boban & Ljungdahl, 2007).

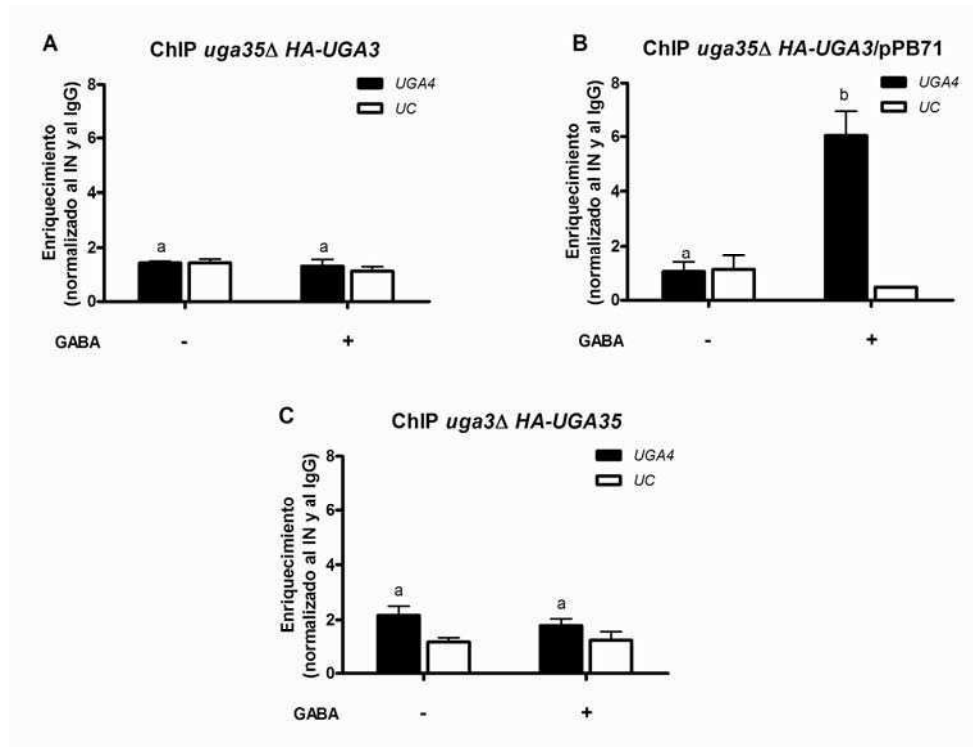


Figura 36. Requerimiento mutuo de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 para la unión al promotor del gen *UGA4*. Células *uga35Δ* HA-*UGA3* (SBCY25) transformadas (B) o no (A) con el plásmido pPB71 y células *uga3Δ* HA-*UGA35* (SBCY27) (C) provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de GABA 0,1 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (F/R-*UGA4*qPCR) (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (F/R-*UC*qPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó un cociente de señal versus ruido sobre el control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés o Enriquecimiento se utilizó el método del $\Delta\Delta C_7$. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las letras representan la comparación entre condiciones para el promotor *UGA4*. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

Cuando se restituye la expresión de la proteína Uga35/Dal81 (Figura 36B) transformando la cepa *uga35Δ* HA-*UGA3* con el plásmido pPB71, que contiene al gen completo *UG35/DAL81*, se puede ver que se recupera la capacidad de la proteína HA-Uga3 de unirse al promotor del gen *UGA4* en respuesta al GABA.

Se ha reportado que el dominio de unión al DNA $Zn(II)_2$ -Cys₆ de la proteína Uga35/Dal81 no es necesario para que cumpla con su rol en la transcripción de los genes *DAL* inducibles por alofanato (Bricmont et al., 1991). Si esto también

se cumpliera para la inducción por GABA del gen *UGA4*, el factor Uga35/Dal81 podría estar uniéndose al promotor de dicho gen a través de otra proteína, como por ejemplo Uga3. Para probar si la unión de Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* depende de Uga3 se construyó una cepa deficiente en la proteína Uga3 que expresa la proteína Uga35/Dal81 fusionada al epítipo HA en su extremo N-terminal, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, sección 3. Dichas células se trataron o no con GABA y se realizaron ensayos de ChIP. Los resultados obtenidos (Figura 36C) indican que el factor Uga35/Dal81 depende de la presencia del factor Uga3 para unirse al promotor de *UGA4* en presencia de GABA.

8. El dominio de unión al ADN Zn(II)₂-Cys₆ de la proteína Uga35/Dal81 no es necesario para que cumpla su rol en la inducción por GABA del gen *UGA4*

Nuestros resultados muestran que el factor de transcripción Uga35/Dal81 se une al promotor del gen *UGA4* en respuesta al GABA pero que necesita la presencia del factor Uga3 para poder hacerlo. Dichos resultados, junto con las evidencias que indican que el dominio de unión al ADN Zn(II)₂-Cys₆ de la proteína Uga35/Dal81 no es necesario para cumplir con su rol en la transcripción inducida por alofanato (Bricmont et al., 1991), sugieren que posiblemente el factor Uga35/Dal81 se esté uniendo al promotor del gen *UGA4* a través del factor Uga3. Para probar si la regulación del gen *UGA4* por GABA mediada por el factor Uga35/Dal81 tampoco requiere de su dominio de unión al ADN Zn(II)₂-Cys₆, se transformaron células deficientes en la proteína Uga35/Dal81 con una serie de plásmidos que codifican para versiones mutadas de la proteína Uga35/Dal81 (Figura 37A).

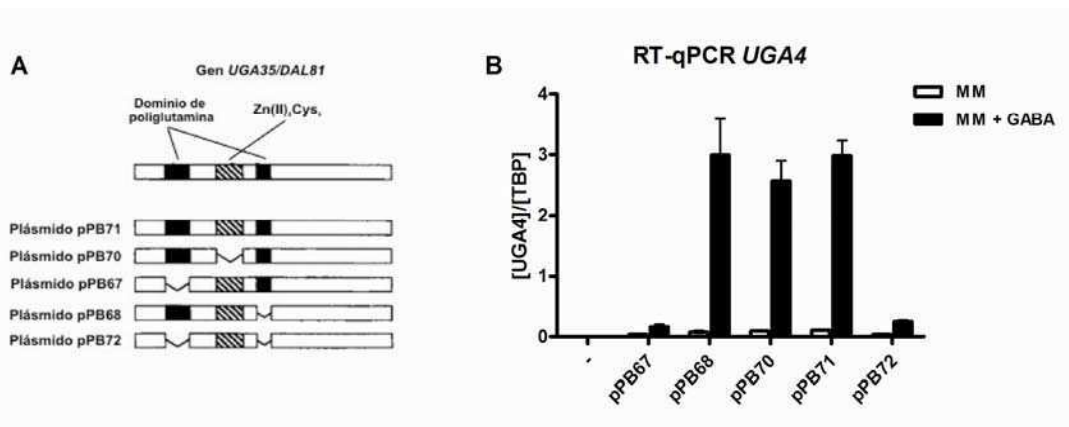


Figura 37. Efecto de distintas mutaciones en la proteína Uga35/Dal81 sobre la transcripción del gen *UGA4*. (A) Esquema de los plásmidos que codifican para versiones de la proteína Uga35/Dal81 con mutaciones en su motivo Zn(II)₂-Cys₆ y en sus motivos de poliglutamina (Bricmont et al., 1991). Estos plásmidos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Terrance Cooper, Universidad de Tennessee, Memphis, Tennessee. (B) Niveles de RNA mensajero del gen *UGA4* en células *uga35Δ* (SBCY17) transformadas o no con los distintos plásmidos que codifican para versiones mutadas de la proteína Uga35/Dal81. Células provenientes de medio mínimo (MM), se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 2 experimentos independientes.

Dichas células se trataron o no con GABA y se midió la expresión del gen *UGA4* por RT-qPCR. En la Figura 37B se puede observar que los niveles de inducción en respuesta al GABA del gen *UGA4* en presencia tanto de la versión de la proteína Uga35/Dal81 que carece del dominio Zn(II)₂-Cys₆ (plásmido pPB70), como de la versión que carece del motivo de poliglutamina situado en la posición 227 a 237 (plásmido pPB68) son similares a los niveles de inducción observados en presencia de la proteína Uga35/Dal81 completa (plásmido pPB71). Estos resultados nos permiten concluir que ni el dominio Zn(II)₂-Cys₆ de la proteína Uga35/Dal81, ni el motivo de poliglutamina situado en la posición 227 a 237, son necesarios para la inducción del gen *UGA4* por GABA, tal como se había descrito para la transcripción de genes inducida por alofanato. Por otra parte, el motivo de poliglutamina (residuos 73 a 94) (plásmido pPB67) es esencial para la inducción por GABA del gen *UGA4*, así como es esencial para la inducción por alofanato de la actividad de la enzima urea amidoliasa (Bricmont et al., 1991). Teniendo en cuenta que los

dominios ricos en glutamina forman parte de los dominios de activación de varios factores de transcripción (Escher et al., 2000), es posible que la secuencia que incluye el motivo de poliglutamina (residuos 73 a 94) forme parte del dominio de activación de Uga35/Dal81.

9. Uga3 y Uga35/Dal81 se unen al promotor del gen *UGA4* a través de la secuencia central del elemento UAS_{GABA}

El factor de transcripción Uga3 se une al promotor del gen *UGA4* a través de un sitio consenso presente en la secuencia central del elemento UAS_{GABA} (Idicula et al., 2002, Noel & Turcotte, 1998). Para confirmar que el factor de transcripción Uga35/Dal81 se esté uniendo al promotor del gen *UGA4* a través del factor Uga3 se construyeron cepas mutantes donde se alteró por mutación o delección en el genoma la secuencia central del elemento UAS_{GABA} del promotor del gen *UGA4* y que además expresan las proteínas Uga3 y Uga35/Dal81 fusionadas al epítotope HA en su extremo N-terminal tal como se describió en la sección Materiales y Métodos y en el Capítulo I, secciones 3 y 6. Dichas células se trataron o no con GABA y se realizaron ensayos de ChIP. Los resultados (Figura 38) muestran que ni el factor HA-Uga3 ni el factor HA-Uga35/Dal81 son capaces de interactuar con los promotores mutados del gen *UGA4* en respuesta al GABA, mientras que sí son capaces de hacerlo con el promotor del control interno positivo *UGA1*.

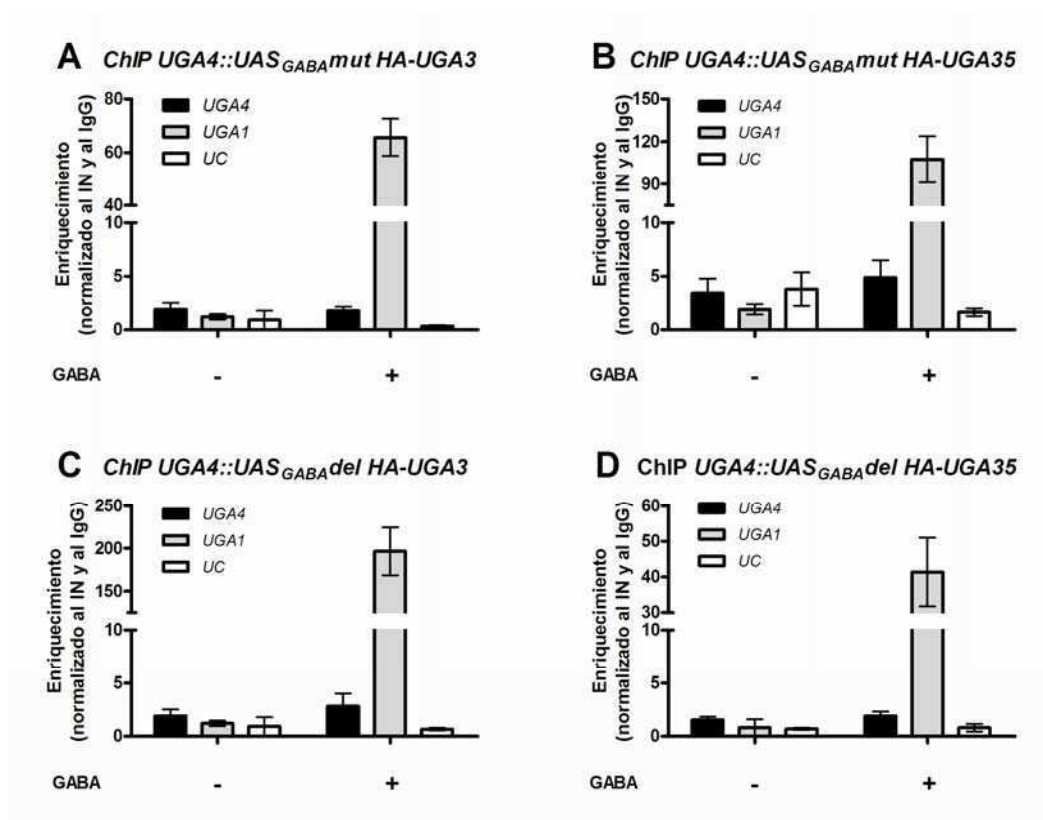


Figura 38. Efecto de la mutación en la secuencia central del elemento UAS_{GABA} sobre la unión de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor de $UGA4$. Células $UGA4::UAS_{GABA}mut$ y $UGA4::UAS_{GABA}del$ que expresan la proteína de fusión HA-Uga3 (SBCY33 y SBCY34) o que expresan la proteína de fusión HA-Uga35/Dal81 (SBCY35 y SBCY36) provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de GABA 0,1 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítoto HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor $UGA4$ (F/R- $UGA4$ qPCR) (barras negras), una región del promotor de $UGA1$ (F/R- $UGA1$ qChIP) (barras grises) (control positivo) o una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de $UGA4$ (F/R-UCqPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó un cociente de señal versus ruido sobre el control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés o Enriquecimiento se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$. Los resultados se expresan como la media \pm el desvío estándar de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

Es de esperar que el factor Uga3 no se una al promotor del gen $UGA4$ cuyo elemento UAS_{GABA} fue alterado ya que dicha secuencia coincide con su sitio consenso de unión. El hecho de que el factor Uga35/Dal81 tampoco sea capaz de interactuar con las versiones mutadas del promotor $UGA4$ en respuesta al GABA, coincide con la idea de que el factor de transcripción Uga35/Dal81 se une al promotor del gen $UGA4$ a través del factor de transcripción Uga3.

10. El factor Uga35/Dal81 estaría regulando jerárquicamente los procesos de inducción en los que participa

La señal disparada por SPS en respuesta a la leucina extracelular activa los factores Stp1 y Stp2 promoviendo la inducción de genes que codifican para distintas permeasas de aminoácidos; además el factor Uga35/Dal81 es necesario para que ocurra la correcta inducción de la permeasa *AGP1* (Boban & Ljungdahl, 2007). Una posible explicación para la disminución en el reclutamiento del factor Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* cuando la células se pre-incuban con leucina podría ser que se está produciendo un reclutamiento de Uga35/Dal81 en los promotores de otras permeasas de aminoácidos, disminuyendo así su disponibilidad para la inducción por GABA del gen *UGA4*. Estudios previos apoyan esta hipótesis y proponen una jerarquía entre los distintos procesos de inducción mediados por el factor Uga35/Dal81 (Abdel-Sater et al., 2004b).

Para comprobar si esta hipótesis es correcta, se clonó el gen *HA-UGA35* en un plásmido de alto número de copias río abajo del promotor de expresión constitutiva *GPD* generando el plásmido pSBC-*HA-UGA35*, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. El objetivo de la sobreexpresión de Uga35/Dal81 fue determinar si lo que causaba el efecto negativo de la leucina sobre el promotor de *UGA4* era una menor disponibilidad del factor Uga35/Dal81. Células *uga35Δ* transformadas con el plásmido pSBC-*HA-UGA35* se trataron con GABA y/o leucina y se midió la expresión del gen *UGA4* por RT-qPCR. Los resultados (Figura 39B) demuestran que la sobreexpresión de la proteína Uga35/Dal81 revierte el efecto negativo de la leucina sobre el promotor de *UGA4* (comparar con Figura 24A), es decir, que el efecto negativo de la leucina sobre el gen *UGA4* es causado por una menor disponibilidad del factor Uga35/Dal81.

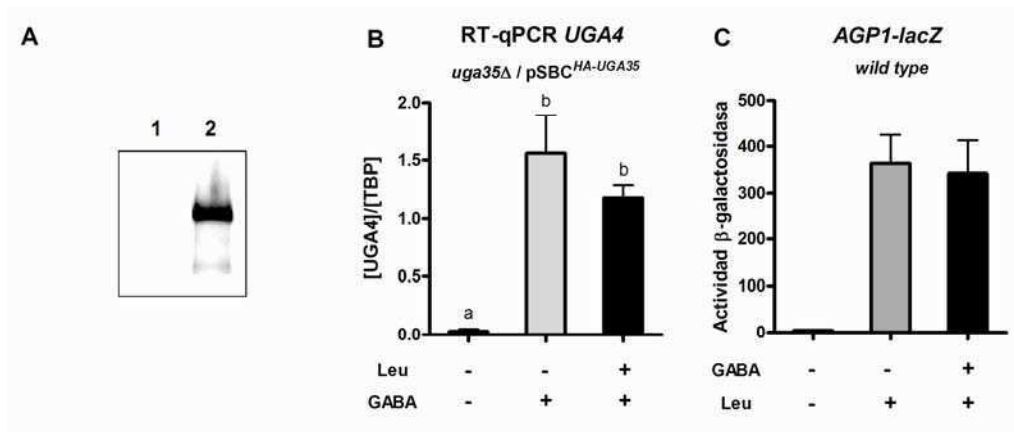


Figura 39. Estudio de la participación del factor Uga35/Dal81 como regulador jerárquico en procesos inducibles por aminoácidos. (A) Niveles de expresión de la proteína Uga35/Dal81 en células *wild type* HA-UGA35 (SBCY10) (calle 1) y *uga35Δ* (SBCY17) transformadas con el plásmido pSBC-HA-UGA35 (calle 2). Células provenientes de medio mínimo se cosecharon, se extrajeron proteínas y se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 6%. **(B)** Niveles de ARN mensajero del gen *UGA4* en células *uga35Δ* (SBCY17) transformadas con el plásmido pSBC-HA-UGA35. Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media ± EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). **(C)** Ensayo de actividad de β-galactosidasa en células *wild type* transformadas con la construcción *AGP1-lacZ*. Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de GABA 0,1 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó leucina 1,3 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 60 minutos y se midió actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media ± EE de 4 experimentos independientes.

La sobreexpresión de la proteína HA-Uga35/Dal81 se verificó por *Western blot* comparando con los niveles endógenos de la proteína HA-Uga35/Dal81 en la cepa donde se encuentra bajo el control de su promotor natural (Figura 39A). Otra alternativa a la falta de disponibilidad del factor Uga35/Dal81 podría ser que la señal disparada por los aminoácidos generara una modificación post-traducciona en dicha proteína causando selectividad por los genes blanco. Cabe aclarar que como la sobreexpresión de la proteína HA-Uga35/Dal81 fue tan intensa esta hipótesis no puede ser descartada ya que al haber un exceso tan grande de proteína es posible que la maquinaria que estaría produciendo esta modificación se encuentre en cantidades limitantes.

Para descartar la posibilidad de que el efecto de la leucina sobre la inducción por GABA del gen *UGA4* sea causado por el orden en que se agregaron los inductores y no por la jerarquía propuesta, se decidió clonar el promotor de la permeasa *AGP1* río arriba del gen *lacZ* en el plásmido YEp357, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. Si el efecto negativo en la inducción de *UGA4* fuera causado porque la leucina se agregó antes que el GABA, se esperaría un efecto similar sobre la inducción por leucina del gen *AGP1* cuando las células son pre-incubadas con GABA. Para esto, células *wild type* transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* se trataron o no con GABA durante media hora y luego se agregó el inductor leucina. Los resultados muestran que la pre-incubación con GABA no afecta la inducción de *AGP1-lacZ* en respuesta a la leucina (Figura 39C), reforzando la hipótesis de una jerarquía entre los distintos procesos de inducción mediados por Uga35/Dal81.

11. Leu3 interviene en el reclutamiento de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor del gen *UGA4*

Las versiones *UAS_{GABAmut}* y *UAS_{GABAdel}* del promotor *UGA4* en células *wild type* y el promotor *UGA4* completo en células *leu3Δ* producen niveles altos de expresión en ausencia de inductor. Con el objetivo de dilucidar las causas que producen estos aumentos en los niveles de expresión, células *wild type*, *leu3Δ*, *uga35Δ* y *leu3Δ uga35Δ* transformadas con los plásmidos que contienen las construcciones *UGA4-lacZ*, *UAS_{GABAmut}-lacZ* y *UAS_{GABAdel}-lacZ* se trataron con leucina y/o GABA y se realizaron ensayos de medición de actividad de β-galactosidasa. Los niveles de expresión de *UGA4-lacZ*, *UAS_{GABAmut}-lacZ* y *UAS_{GABAdel}-lacZ* (Figuras 40A, B y C) en la cepa *leu3Δ uga35Δ* son menores que los niveles de expresión en la cepa *leu3Δ*, indicando que el factor Uga35/Dal81 está involucrado de alguna manera en los niveles altos de expresión observados.

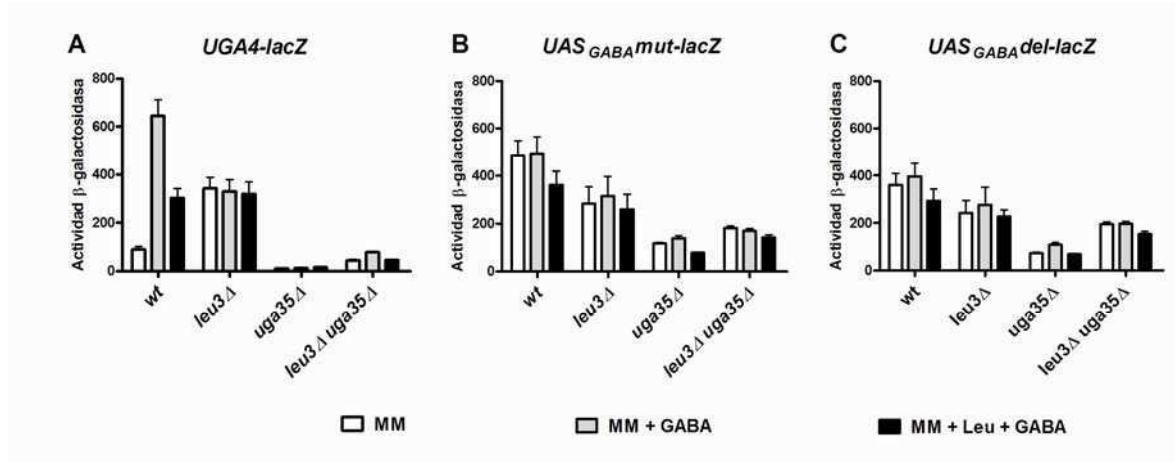


Figura 40. Efecto de la leucina sobre las construcciones *UGA4-lacZ*, *UAS_{GABA}mut-lacZ* y *UAS_{GABA}del-lacZ* en células *wild type*, *leu3Δ*, *uga35Δ* y *leu3Δ uga35Δ*. Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *uga35Δ* (SBCY17) y *leu3Δ uga35Δ* (SBCY20) transformadas con los plásmidos que contienen las construcciones *UGA4-lacZ* (A), *UAS_{GABA}mut-lacZ* (B) y *UAS_{GABA}del-lacZ* (C) provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras), se tomaron muestras a los 60 minutos y se midió actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan en Unidades Miller como la media ± EE de entre 2 y 4 experimentos independientes.

En la Tabla 8 se mostró que los niveles de expresión de la construcción *UGA35-lacZ* en células *leu3Δ* están debajo del umbral de detección del ensayo de β-galactosidasa. Sin embargo, los experimentos mostrados en la Figura 40 indican que dicho factor está de alguna manera involucrado en la generación de los niveles altos de expresión observados para las construcciones *UGA4-lacZ*, *UAS_{GABA}mut-lacZ* y *UAS_{GABA}del-lacZ* en células *leu3Δ*.

Para estudiar si los niveles altos de expresión en la cepa *leu3Δ* son causados por diferencias en el reclutamiento de los factores de transcripción Uga35/Dal81 y Uga3 al promotor del gen *UGA4*, se construyeron cepas deficientes en la proteína Leu3 que expresan versiones etiquetadas con el epítopo HA de las proteínas Uga3 y Uga35/Dal81 en su extremo N-terminal. Dichas células se trataron o no con GABA y se realizaron ensayos de CHIP. La unión del factor HA-Uga35/Dal81 en respuesta al GABA al promotor de *UGA4* (Figura 41A) parece estar afectada por la deficiencia en la proteína Leu3 correlacionando con los bajos niveles de expresión de la construcción *UGA35-lacZ* observados en dichas células (Tabla 8). Estos resultados no explican los

niveles basales altos de expresión de *UGA4* observados en ausencia de Leu3 (Figura 31), aunque sí podrían explicar los valores de inducción menores observados en dichas células (Figura 31B).

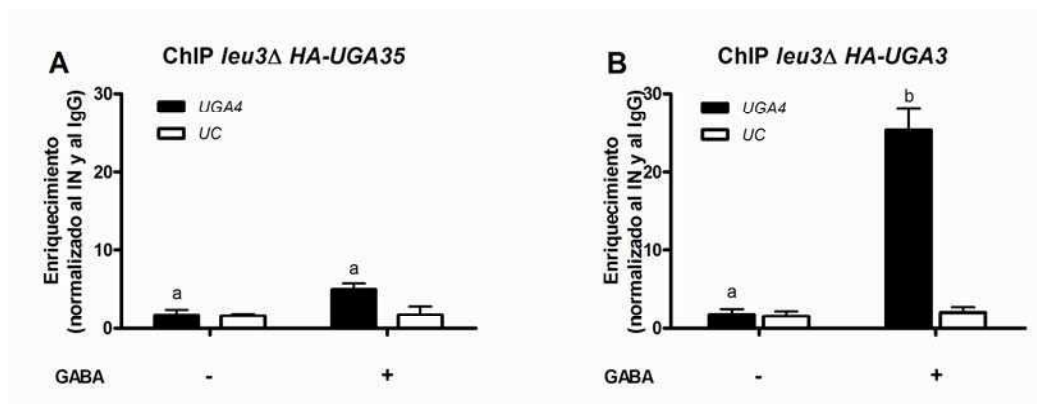


Figura 41. Participación de Leu3 en la interacción de Uga3 y Uga35/Dal81 con el promotor del gen *UGA4*. Células *leu3Δ* HA-*UGA35/DAL81* (SBCY23) (A) o *leu3Δ* HA-*UGA3* (SBCY22) (B) provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de GABA 0,1 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (F/R-*UGA4*qPCR) (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (F/R-*UC*qPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó un cociente de señal versus ruido sobre el control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés o Enriquecimiento se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las letras representan la comparación entre condiciones para el promotor *UGA4*. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

En cambio, se observó que a pesar de que la expresión de *UGA3-lacZ* disminuye en células *leu3Δ* (Tabla 8), su capacidad de unirse al promotor del gen *UGA4* en respuesta al GABA no se ve afectada (Figura 41B). Estos resultados tampoco explican los niveles altos de expresión en ausencia de inductor en células *leu3Δ*. Llamativamente, en condiciones donde el factor Leu3 está ausente y por ende la expresión y reclutamiento al promotor del gen *UGA4* del factor HA-Uga35/Dal81 son prácticamente nulas, el factor HA-Uga3 sí es capaz de unirse al promotor de *UGA4* (Figura 41B). Este resultado en principio contradictorio con nuestras propias observaciones que indican que el factor Uga3 necesita al factor Uga35/Dal81 para unirse al promotor *UGA4* (Figura

36A), abren un nuevo interrogante acerca del rol del factor Leu3 en la interacción entre los factores Uga3 y Uga35/Dal81.

Por otra parte, nuestros resultados (Figura 31B) sugirieron la participación, al menos en parte, del factor Leu3 en la regulación por leucina del gen *UGA4*. El hecho de que el factor de transcripción Uga35/Dal81 prácticamente no esté siendo reclutado al promotor de *UGA4* en la cepa *leu3Δ* podría explicar la menor represión de la leucina en esta cepa (Figura 41A).

En resumen, los resultados aquí presentados demostraron que el efecto de los aminoácidos sobre la inducción del gen *UGA4* es mediado por el sensor de aminoácidos SPS y que los factores de transcripción efectores de la señal disparada por dicho sensor, Stp1 y Stp2, intervienen en esta regulación. El factor Uga35/Dal81 parece tener la función de activar diferencialmente la transcripción de genes pertenecientes a distintas vías de utilización de fuentes de nitrógeno dependiendo de los inductores presentes en el medio y sería el responsable del efecto de la leucina sobre el gen *UGA4*. La inhibición de la inducción del gen *UGA4* se debería a un menor reclutamiento de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor de dicho gen ya que es revertida en condiciones de exceso del factor Uga35/Dal81. Ambos factores, Uga3 y Uga35, actúan de forma conjunta en el proceso de inducción de *UGA4*. Nuestros resultados sugieren que Uga35/Dal81 estaría interactuando con el elemento *UAS_{GABA}* del gen *UGA4* a través del factor Uga3. Por otra parte, el factor Uga3 depende de Uga35/Dal81 para interactuar con el gen promotor de *UGA4*. Demostramos además que el factor de transcripción Leu3 actúa como un regulador negativo sobre el gen *UGA4* y que, en ausencia de dicho factor, los niveles basales de expresión de *UGA4* aumentan significativamente. Este factor podría cumplir entonces con alguna función en la relación que existe entre los factores Uga3 y Uga35/Dal81, ya que en su ausencia Uga3 es capaz de interactuar con el promotor de *UGA4* independientemente del factor Uga35/Dal81.

CAPITULO III

Respuesta a los aminoácidos del regulón UGA

ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, la mayor parte de los estudios realizados acerca de la regulación transcripcional del regulón *UGA* se llevaron a cabo sobre el gen *UGA4* y en menor medida sobre el gen *UGA1*. Acerca de los genes *UGA1* y *UGA2* se sabe que ambos responden a la inducción por GABA de la misma forma que *UGA4*, es decir que requieren la acción de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81. Sin embargo, el promotor del gen *UGA2* no posee un elemento UAS_{GABA} en su promotor, sino que posee una sola copia de la secuencia consenso de unión del factor Uga3 5'-SGCGGNWWT-3' (Figura 42). El elemento UAS_{GABA} , que tiene dos copias de esta secuencia consenso, ha sido identificado en los promotores de los genes *UGA4* y *UGA1* como esencial para su inducción por GABA (Idicula et al., 2002).

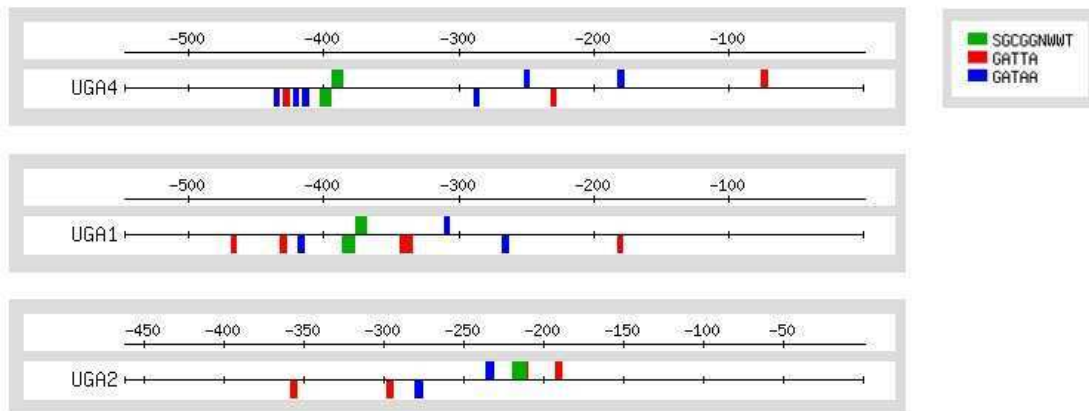


Figura 42. Esquema de las regiones promotoras de los genes *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*. En rojo y azul se muestran las secuencias GATA presentes en los promotores de los genes *UGA* y en verde se muestran los sitios consenso de unión para el factor de transcripción Uga3.

Por otra parte, los tres genes poseen secuencias 5'-GAT(T/A)A-3' en sus promotores (Figura 42) y son sensibles a NCR.

Pese a las diferencias en cuanto a la secuencia de sus promotores, los tres genes que conforman el regulón *UGA* se comportan de forma similar. En el capítulo anterior demostramos que existe un efecto negativo de la leucina sobre la inducción del gen *UGA4* causado por una señal disparada por el

sensor SPS que lleva a un menor reclutamiento del factor Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4*. Por otra parte, demostramos que el factor de transcripción Leu3 actúa como un represor sobre este gen.

El objetivo de este capítulo fue determinar si los resultados observados para el gen *UGA4* pueden ser generalizados al regulón *UGA*.

RESULTADOS

1. La leucina causa un efecto negativo sobre la inducción de los genes *UGA1* y *UGA2* a través del sensor SPS

Para estudiar si el efecto negativo de la leucina que se observó sobre la inducción de *UGA4* también se produce sobre los genes *UGA1* y *UGA2*, se midió la expresión de dichos genes por RT-qPCR en células *wild type* y *ssy1Δ*, en presencia de GABA y/o leucina. En la Figura 43A y B se puede observar que la expresión de ambos genes, *UGA1* y *UGA2*, se induce en presencia de GABA, y que la leucina causa un efecto negativo sobre esta inducción. Al igual que ocurre para el gen *UGA4*, dicho efecto es mediado por el sensor SPS ya que en ausencia de la proteína Ssy1, el efecto de la leucina desaparece (Figura 43C y D). La inhibición por leucina parece ser más intensa sobre el gen *UGA4* que sobre los genes *UGA1* y *UGA2*, aunque es estadísticamente significativa en los tres casos (comparar Figuras 43A y B con Figura 24A).

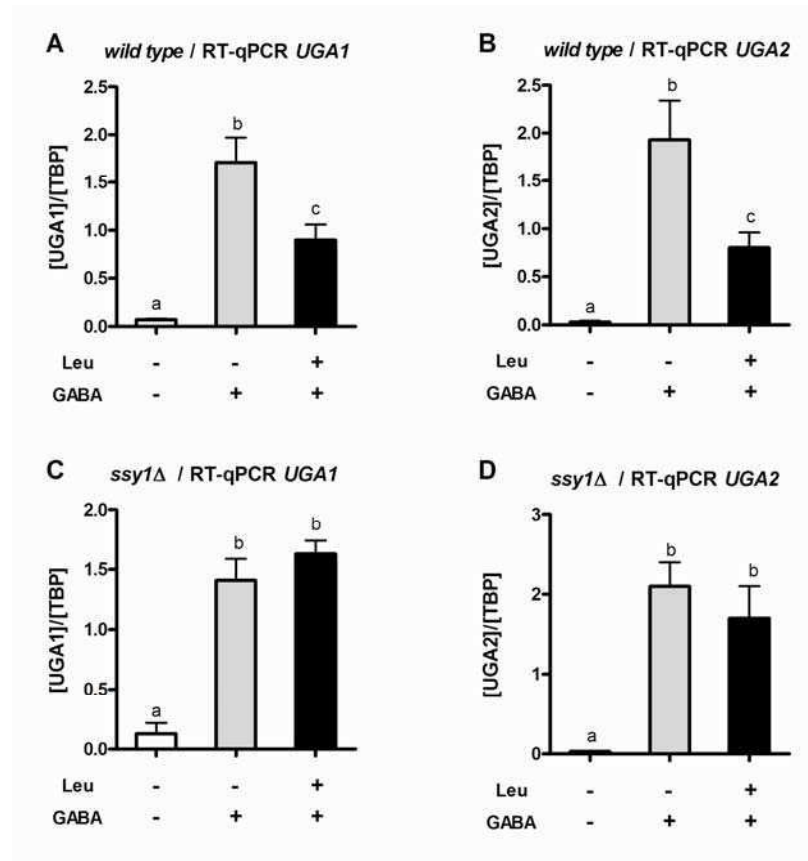


Figura 43. Efecto de la leucina sobre la expresión de los genes *UGA1* y *UGA2* en células *wild type* y células *ssy1Δ*. Se midieron los niveles de ARN mensajero de los genes *UGA1* y *UGA2* en células *wild type* (23344c) y *ssy1Δ* (30995b). Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras), se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA1* y *UGA2* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

2. Los factores Uga3 y Uga35/Dal81 interactúan con los promotores de los genes *UGA1* y *UGA2* en una forma dependiente de GABA

El factor Uga3 interactúa *in vitro* con sondas conteniendo la secuencia perteneciente al elemento UAS_{GABA} del gen *UGA1* (Idicula *et al.*, 2002, Noel & Turcotte, 1998), pero dicha secuencia no se encuentra presente en el promotor del gen *UGA2* que sólo posee una copia de la secuencia consenso de unión del factor Uga3 5'-SGCGGNWWT-3' (Idicula, 2002) (Figura 42). Sin embargo, no existían evidencias de interacción *in vivo* de los factores de transcripción

Uga3 y Uga35/Dal81 con los promotores de los genes *UGA1* y *UGA2*. Es por esto que se decidió estudiar la interacción *in vivo* de ambos factores de transcripción con los promotores de los genes *UGA1* y *UGA2* en respuesta al GABA. Para estudiar esta interacción se realizaron ensayos de ChIP utilizando células *wild type* que expresan las proteínas HA-Uga3 y HA-Uga35/Dal81 tratadas o no con GABA. Los resultados (Figura 44) muestran que ambos factores interactúan con los promotores de los genes *UGA1* y *UGA2* en respuesta al GABA de manera similar a lo observado para el promotor del gen *UGA4*.

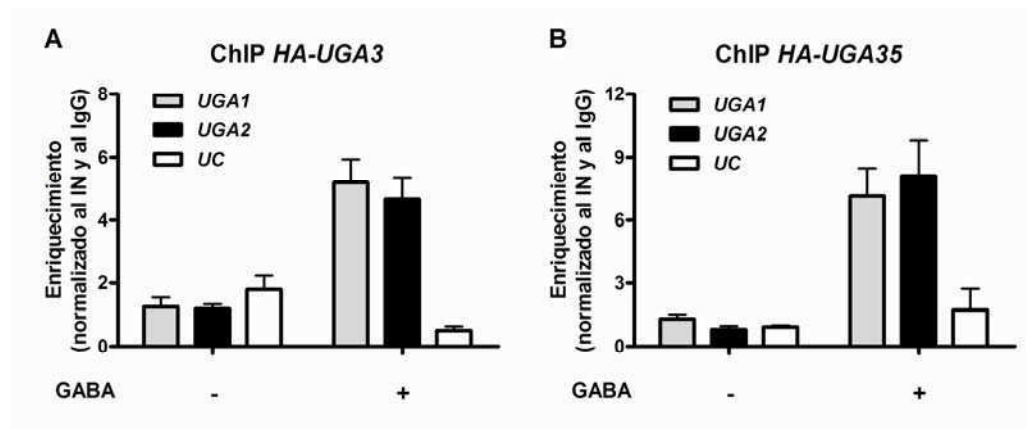


Figura 44. Efecto del GABA sobre el reclutamiento de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 a los promotores de los genes *UGA1* y *UGA2* en células *wild type*. Células *wild type* que expresan las proteínas HA-Uga3 (SBCY13) (A) o HA-Uga35/Dal81 (SBCY10) (B) provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de GABA 0,1 mM. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítoto HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA1* (F/R-*UGA1* qChIP) (barras grises), una región del promotor de *UGA2* (F/R-*UGA2* qChIP) (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (F/R-UCqPCR) (barras blancas) (control negativo). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado con el input (IN) y se calculó un cociente de señal versus ruido sobre el control (IgG). Para calcular la unión al promotor de interés (Enriquecimiento) se utilizó el método del $\Delta\Delta C_T$. Los datos representan la media \pm EE de 2 experimentos independientes.

Estudios previos habían reportado que los dos sitios de unión presentes en el elemento UAS_{GABA} de los genes *UGA1* y *UGA4* debían ser ocupados por el factor Uga3 para que ocurriera la activación transcripcional (Idicula et al., 2002). El promotor del gen *UGA2* no posee las secuencias consenso para que ocurra la unión de dos moléculas de Uga3, sin embargo se detecta unión de

dicho factor al promotor de *UGA2* en presencia de GABA, condición donde se observa activación transcripcional (Figura 43B). Más aún, se sabe que la inducción de *UGA2* depende de la presencia del factor Uga3 (Coleman et al., 2001, Vissers et al., 1990), por lo que la unión de una sola molécula de Uga3 debe ser suficiente para que ocurra la activación de este gen. Si bien los estudios que sugirieron que dos moléculas de Uga3 son necesarias para que ocurra activación transcripcional de *UGA1* y *UGA4* fueron realizados *in vivo* (Idicula et al., 2002), las construcciones utilizadas sólo contenían las secuencias pertenecientes a sus elementos UAS_{GABA} , o versiones mutadas de los mismos, fusionadas a la región promotora *CYC1*. Es posible que el contexto del promotor completo permita la interacción de una sola molécula de Uga3, y una consecuente activación, por lo menos en el promotor *UGA2*.

3. El factor de transcripción Uga35/Dal81 cumple un rol similar en la inducción por GABA de los genes *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*

Estudios previos (Bricmont et al., 1991) y resultados presentados en este trabajo demostraron que el dominio $Zn(II)_2$ -Cys₆ presente en la proteína Uga35/Dal81 no es requerido para la activación de los genes *DUR1* y *DUR2* ni para la inducción del gen *UGA4* (Figura 37B). Para probar si esto se cumple también para los genes *UGA1* y *UGA2*, se midieron los niveles de ARN de ambos genes por RT-qPCR en células deficientes en la proteína Uga35/Dal81 transformadas con plásmidos que codifican para versiones mutadas de dicha proteína (Figura 37A), en presencia o no de GABA. Como era de esperar, el dominio $Zn(II)_2$ -Cys₆ de la proteína Uga35/Dal81 tampoco es necesario para su acción en la inducción de los genes *UGA1* y *UGA2* (Figura 45A y B).

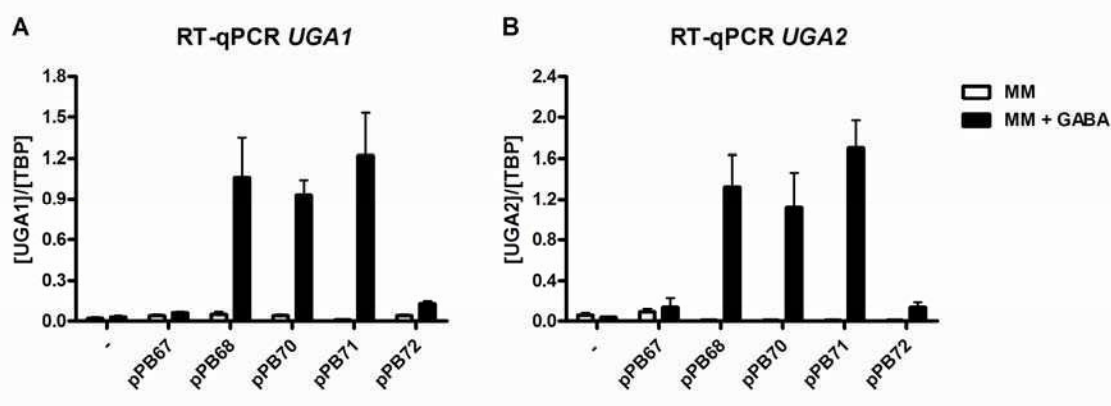


Figura 45. Efecto de distintas mutaciones en la proteína Uga35/Dal81 sobre la transcripción de los genes *UGA1* y *UGA2*. Se midieron los niveles de ARN mensajero de los genes *UGA1* (A) y *UGA2* (B) en células *uga35Δ* (SBCY17) transformadas o no con los distintos plásmidos que codifican para versiones mutadas de la proteína Uga35/Dal81 (Bricmont et al., 1991). Células provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negra) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA1* y *UGA2* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 2 experimentos independientes.

Por otra parte, como se observa en la Figura 45, el motivo de poliglutamina situado en la posición 227 a 237 (plásmido pPB68), no es necesario para la inducción, mientras que el motivo de poliglutamina situado en la posición 73 a 94 (plásmido pPB67) es esencial, tal como se había observado para *UGA4* (Figura 37B).

En el Capítulo II se propuso que el efecto negativo de la leucina sobre el gen *UGA4* es causado por una menor disponibilidad del factor Uga35/Dal81, lo que se confirmó al demostrar que la sobreexpresión de la proteína HA-Uga35/Dal81 revierte este efecto (Figura 39A y B). Nuevamente, se realizaron ensayos similares para evaluar si esto también se cumple para los genes *UGA1* y *UGA2*. Los resultados (Figura 46A y B) muestran que la sobreexpresión de la proteína HA-Uga35/Dal81 también revierte el efecto negativo que la leucina produce sobre los genes *UGA1* y *UGA2*, lo que indica que el efecto de los aminoácidos sobre *UGA1* y *UGA2*, al igual que sobre *UGA4*, se debe a una menor disponibilidad del factor Uga35/Dal81.

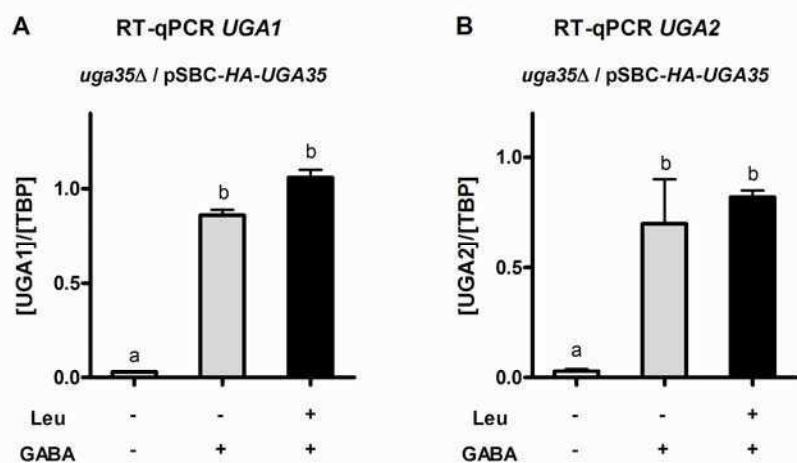


Figura 46. Estudio de la participación del factor Uga35/Dal81 como regulador de los genes del regulón UGA. Se midieron los niveles de ARN mensajero de los genes *UGA1* (A) y *UGA2* (B) en células *uga35Δ* (SBCY17) transformadas con el plásmido pSBC-HA-*UGA35*. Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de los genes *UGA1* y *UGA2* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

4. El factor de transcripción Leu3 actúa como represor sobre el promotor del gen *UGA1* pero no sobre el promotor del gen *UGA2*

El promotor del gen *UGA1*, al igual que el de *UGA4*, contiene la secuencia consenso de unión del factor de transcripción Leu3 dentro del elemento UAS_{GABA} . Por otra parte, dicho consenso no se encuentra presente en el promotor *UGA2*.

Con el objetivo de evaluar si el factor de transcripción Leu3 también interviene en la regulación transcripcional de los genes *UGA1* y *UGA2*, se midieron los niveles de ARN en células *leu3Δ* tratadas con leucina y/o GABA. Los resultados (Figura 47), indican que el factor de transcripción Leu3 actúa como un regulador negativo sobre la expresión del gen *UGA1*, de forma similar a lo que ocurre con *UGA4*. Por el contrario, Leu3 no tiene ningún efecto sobre la expresión de *UGA2*, de acuerdo con la ausencia de un sitio consenso para la unión de dicho factor en su promotor.

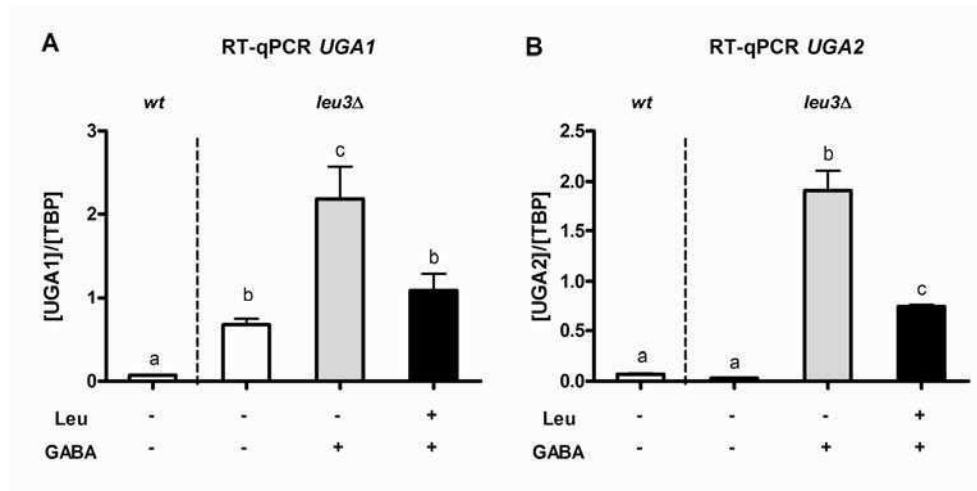


Figura 47. Regulación de los genes *UGA1* y *UGA2* por el factor *Leu3*. Se midieron los niveles de ARN mensajero de los genes *UGA1* y *UGA2* en células *leu3Δ*. Células provenientes de medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas y grises) de leucina 1,3 mM. Luego de 30 minutos de incubación se agregó GABA 0,1 mM (barras grises y negras). Se tomaron muestras a los 30 minutos, se extrajo el ARN y se realizaron reacciones de RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA1* y *UGA2* se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen de expresión constitutiva *TBP1*. Se graficaron también los niveles basales de expresión de ambos genes en células *wild type* para facilitar el análisis. Los datos representan la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Las barras con diferentes letras (a, b, c) son significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$).

A pesar de que la expresión del gen *UGA1* es regulada por *Leu3* y la de *UGA2* no, el efecto negativo de la leucina sobre la inducción por GABA de ambos genes es similar tanto en ausencia como en presencia de dicho factor (comparar Figuras 43A y 43B con Figura 47). En cuanto al gen *UGA4*, en el Capítulo II se demostró que si bien se observan diferencias en la represión por leucina entre la cepa *wild type* y la cepa *leu3Δ* (comparar Figura 31B con Figura 24A), esto puede ser en realidad una consecuencia de la baja expresión (Tabla 8) y la menor interacción del factor *Uga35/Dal81* con el promotor *UGA4* (Figura 41A). Todos estos resultados parecen indicar que *Leu3* no participa en la regulación por leucina del regulón *UGA*, aunque no son totalmente concluyentes.

En resumen, en este capítulo demostramos que la inducción de los tres genes que conforman el regulón *UGA* es afectada por la presencia de leucina en el medio. Por otra parte, los resultados aquí presentados sugieren que los mecanismos por los cuales la leucina regula a *UGA1* y *UGA2* son similares a los que actúan sobre *UGA4*. En cuanto al factor Leu3, los genes *UGA4* y *UGA1* son regulados negativamente por dicho factor, mientras que *UGA2* no, de acuerdo con la ausencia de un sitio consenso para el factor Leu3 en su promotor.

DISCUSION

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de aprovechar al máximo los nutrientes y es capaz de adaptarse a situaciones de falta de los mismos para asegurar su supervivencia. El estudio de los mecanismos por medio de los cuales este organismo es capaz de modificar sus estados metabólicos, transcripcionales y de ciclo celular en respuesta a la cantidad y/o calidad de los nutrientes disponibles es de gran importancia debido a que los hongos poseen simples pero conservados caminos de señalización, que son a menudo equivalentes a los presentes en organismos eucariotas multicelulares (Bahn et al., 2007). Por otra parte, el sentido y utilización de nutrientes juega un papel fundamental en un gran número de aplicaciones biotecnológicas que involucran a la levadura *S. cerevisiae* (Eckert-Boulet et al., 2004). En este tipo de procesos es fundamental conocer en detalle los mecanismos que llevan a la activación y/o represión de distintas rutas metabólicas y a la producción de metabolitos secundarios de interés para una determinada industria biotecnológica.

Partiendo del conocimiento de que los aminoácidos extracelulares inhiben la inducción del gen *UGA4* a través del sensor SPS (Bermudez Moretti et al., 2005), nos planteamos como objetivo general para este trabajo estudiar los mecanismos moleculares que llevan a esta regulación. En particular centramos nuestra atención en el efecto de la leucina, un fuerte activador del sensor de aminoácidos SPS, sobre la inducción del gen *UGA4*, así como también sobre la inducción de los demás genes miembros del regulón *UGA*, *UGA1* y *UGA2*.

En los procesos de inducción mediados por el sensor SPS, el agregado de aminoácidos al medio activa el sensor, lo que desencadena el procesamiento endoproteolítico de los factores Stp1 y Stp2, su translocación al núcleo y la activación transcripcional de genes de permeasas de aminoácidos (Wu et al., 2006, Liu et al., 2008, Andreasson & Ljungdahl, 2002). En el caso del gen *UGA4*, el efecto es inverso, es decir que la activación del sensor SPS por una mezcla de aminoácidos desencadena una inhibición de la inducción de dicho gen (Bermudez Moretti et al., 2005).

Al igual que al agregar una mezcla de aminoácidos, distintos aminoácidos activadores del sensor SPS, al ser agregados individualmente, inhiben la inducción del gen *UGA4* a través del sensor SPS (Figuras 23 y 24). Por otra parte, en ausencia de los factores de transcripción Stp1 y Stp2, el efecto negativo de la leucina sobre el gen *UGA4* disminuye (Figura 34C), confirmando la participación de los principales componentes del camino de señalización SPS en dicho efecto. El hecho de que ambos factores deban estar ausentes para que se pierda el efecto negativo de la leucina sobre *UGA4* refuerza la propuesta de que Stp1 y Stp2 poseen funciones parcialmente redundantes (Andreasson & Ljungdahl, 2002), y cuando uno de estos factores está ausente, el otro puede cumplir su función.

La inducción de los genes que conforman el regulón *UGA* depende de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81. Estos factores actúan a través de los elementos UAS_{GABA} presentes en los promotores de los genes *UGA1* y *UGA4* (Andre, 1990, Ramos et al., 1985, Talibi et al., 1995, Andre et al., 1995). En el caso del gen *UGA2*, si bien existe una secuencia consenso de unión para el factor Uga3 en su promotor (Idicula, 2002), no se sabe cuál es la secuencia blanco de la inducción. La proteína Uga3 producida y purificada a partir de *E. coli* es capaz de interactuar *in vitro*, y en ausencia de GABA, con sondas correspondientes a los elementos UAS_{GABA} de *UGA1* y *UGA4*, por lo que se había sugerido que la interacción de dicho factor con los promotores de los genes que regula sería independiente de GABA (Idicula et al., 2002). En este trabajo demostramos, no sólo que ocurre interacción *in vivo* de los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 con los promotores de los tres genes *UGA*, *UGA1*, *UGA2* y *UGA4*, sino que además esta interacción ocurre de manera dependiente de GABA (Figuras 35A, 35B y 44).

Además de participar en el proceso de inducción de los genes *UGA*, el factor Uga35/Dal81 participa en otros procesos de inducción de genes blanco de la señal disparada por el sensor SPS (Abdel-Sater et al., 2004b, Boban & Ljungdahl, 2007). Hasta el momento se desconocen los mecanismos que median esta regulación, aunque se ha propuesto que Uga35/Dal81 podría ser blanco directo de la señal disparada por el sensor SPS (Abdel-Sater et al., 2004b). Estudios globales han reportado la fosforilación de distintos residuos

de la proteína Uga35/Dal81 (Albuquerque *et al.*, 2008, Gruhler *et al.*, 2005, Smolka *et al.*, 2007), mientras que otros estudios identificaron a este factor como un posible regulador del ciclo celular y se reportó su fosforilación mediada por la quinasa Cdk1 (Ubersax *et al.*, 2003, Yang, 2005). La proteína Uga35/Dal81 puede estar entonces sufriendo una modificación post-traducciona que modifique su actividad en respuesta a los inductores, y dicha modificación podría ser una fosforilación, aunque esto necesita ser estudiado con mayor profundidad.

Cuando se analizó la participación de Uga35/Dal81 en la regulación del gen *UGA4* por leucina, pudimos demostrar que la interacción del factor Uga35/Dal81 con el promotor *UGA4* disminuye cuando las células son pre-incubadas con leucina antes del agregado de GABA (Figura 35A). Por otra parte, este efecto es causado por una señal disparada por el sensor SPS, ya que en ausencia de la proteína Ssy1 el reclutamiento del factor Uga35/Dal81 al promotor *UGA4* ocurre independientemente del agregado de leucina al medio (Figura 35C). El hecho de que la leucina impida la unión al promotor de *UGA4* de uno de los dos factores responsables de su inducción por GABA, correlaciona con la menor inducción observada en presencia de dicho aminoácido (Figuras 23, 24 y 28A).

Como ya se mencionó Uga35/Dal81 es el factor común que existe entre la regulación de genes involucrados en varias vías de utilización de fuentes de nitrógeno, como GABA (Vissers *et al.*, 1990, Coornaert *et al.*, 1991), urea, alantoína (Turoscy & Cooper, 1982, Jacobs *et al.*, 1980) y aminoácidos (Abdel-Sater *et al.*, 2004b). La existencia de un factor de transcripción compartido entre estas vías de inducción podría permitir una activación jerarquizada de las mismas cuando varias de las fuentes de nitrógeno antes mencionadas se encuentran disponibles simultáneamente (Abdel-Sater *et al.*, 2004b). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, ya que en presencia de otros aminoácidos se ve favorecida la inducción de genes involucrados en su transporte por sobre el transporte y utilización del GABA. De forma similar, Abdel-Sater y colaboradores (Abdel-Sater *et al.*, 2004b), reportaron que el agregado de aminoácidos a células creciendo con urea como fuente de nitrógeno induce la transcripción de genes regulados por Ssy1 e inhibe la expresión de los genes

DUR involucrados en la utilización de urea como fuente de nitrógeno. En contraposición, la pre-incubación de células *wild type* con GABA antes del agregado de leucina no afecta la inducción de la permeasa de aminoácidos *AGP1* (Figura 39C). Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la leucina sobre los genes *UGA* es debido a una activación jerarquizada y no es una consecuencia del orden en que se agregaron los inductores al medio. Nuestros resultados que muestran que la sobreexpresión de la proteína Uga35/Dal81 revierte el efecto negativo de la leucina sobre el gen *UGA4* (Figuras 39B), sugieren que esta regulación diferencial podría deberse a una menor disponibilidad del factor Uga35/Dal81 para que ocurra la inducción por GABA de este gen. También podría ser que Uga35/Dal81 sufriera una modificación post-traduccional en respuesta a los distintos inductores, la cual le brindaría mayor actividad sobre una determinada vía. Debido a que el nivel de sobreexpresión de la proteína Uga35/Dal81 fue tan elevado (Figura 39A), esta posibilidad no puede descartarse ya que es posible que la maquinaria que estaría produciendo esta modificación se encuentre en cantidades limitantes.

En la literatura no existen reportes que relacionen al factor de transcripción Uga3 con la vía de señalización SPS. Sin embargo, en este trabajo demostramos que, al igual que ocurre con Uga35/Dal81, la pre-incubación de células *wild type* con leucina antes del agregado de GABA disminuye la capacidad del factor Uga3 de interactuar con el promotor de *UGA4* en una forma dependiente del sensor SPS (Figuras 35B y 35D), también correlacionando con la menor inducción observada en los ensayos de expresión (Figuras 23, 24 y 28A). Estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que la interacción de la proteína Uga3 con el promotor de *UGA4* depende de la presencia de la proteína Uga35/Dal81 (Figuras 36A y B). Un efecto similar se observó para el gen *AGP1*, donde la interacción de Stp1 con dicho promotor depende de la presencia de Uga35/Dal81 (Boban & Ljungdahl, 2007). Entonces, la menor disponibilidad para la inducción de los genes *UGA* del factor Uga35/Dal81 causada por el agregado de aminoácidos podría ser el impedimento para la interacción de Uga3 con el promotor de *UGA4*.

Uga35/Dal81 posee un dominio de dedos de zinc $Zn(II)_2-Cys_6$ típico de los dominios de unión al ADN de factores de transcripción de hongos (MacPherson

et al., 2006). Sin embargo, Bricmont y colaboradores (Bricmont et al., 1991), demostraron que dicho dominio no es requerido para que Uga35/Dal81 cumpla su función en la inducción por alofanato de los genes *DUR1* y *DUR2*, de forma similar a lo que ocurre con la proteína TamA de *Aspergillus nidulans*, un factor homólogo a Uga35/Dal81 (Davis et al., 1996). Nuestros resultados demostraron que el dominio Zn(II)₂-Cys₆ tampoco es necesario para que el factor Uga35/Dal81 actúe en el proceso de inducción de los genes *UGA* (Figuras 37B y 45). Sin embargo, se ha detectado interacción de Uga35/Dal81 con los promotores de los genes *UGA* (Figuras 35A y 44B), *AGP1*, *DUR* y *DAL* (Harbison et al., 2004, Boban & Ljungdahl, 2007), es decir que si su dominio putativo de unión al ADN no es necesario para su función, es probable que dicho factor interactúe con los promotores de los genes que regula a través de otro factor. En el caso de la inducción por aminoácidos del gen *AGP1*, se ha sugerido que la interacción del factor Uga35/Dal81 sería a través de la misma región en el promotor a través de la cual interactúa Stp1, sugiriendo que dicha interacción podría ser a través de Stp1 (Boban & Ljungdahl, 2007). Por otra parte, por medio de ensayos de doble híbrido, se ha demostrado interacción entre los factores de transcripción Dal82 y Uga35/Dal81, responsables de la inducción de los genes *DUR* y *DAL* (Scott et al., 2000), y se ha sugerido que Dal82 podría estar actuando como un puente entre Uga35/Dal81 y el ADN (Scott et al., 2000). En el caso de los genes *UGA*, nuestros resultados sugieren que la interacción de Uga35/Dal81 con el promotor de *UGA4* ocurre a través de Uga3. Por ejemplo, Uga35/Dal81 es incapaz de interactuar con el promotor de *UGA4* en cepas deficientes en *UGA3* (Figura 36C). Más aún, mutaciones en el sitio consenso de unión al ADN para el factor Uga3 presente en el promotor de *UGA4* no sólo impiden la interacción del factor Uga3 con dicho promotor sino que también impiden la interacción del factor Uga35/Dal81 (Figura 38).

En resumen, todos estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de activación jerarquizado coordinado por el factor de transcripción Uga35/Dal81 (Figura 47). En presencia de GABA, los factores de transcripción Uga3 y Uga35/Dal81 son reclutados al elemento *UAS_{GABA}* del promotor de *UGA4* y ocurre la inducción de dicho gen. En esas condiciones, el sensor de aminoácidos SPS se encuentra en estado de reposo y los factores Stp1 y Stp2

no activados se encuentran en el citoplasma. Luego del agregado de aminoácidos al medio, ocurre la activación del sensor SPS, los factores Stp1 y Stp2 son procesados, translocan al núcleo y activan la transcripción de sus genes blanco. Esta activación de la transcripción depende del factor de transcripción Uga35/Dal81, el cual probablemente esté siendo reclutado a los promotores de dichos genes. En estas condiciones, el agregado de GABA es incapaz de inducir el reclutamiento del factor Uga35/Dal81, y en consecuencia de Uga3, al promotor de *UGA4*, efecto que se ve reflejado en una menor inducción de dicho gen. De acuerdo a las evidencias presentadas en este trabajo, el reclutamiento de Uga35/Dal81 al promotor del gen *UGA4* estaría ocurriendo a través del factor de transcripción Uga3.

En el caso de los demás miembros del regulón *UGA*, *UGA1* y *UGA2*, demostramos que la leucina también afecta negativamente su inducción en forma dependiente del sensor SPS. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que probablemente esta regulación ocurra a través del mismo mecanismo establecido para *UGA4*.

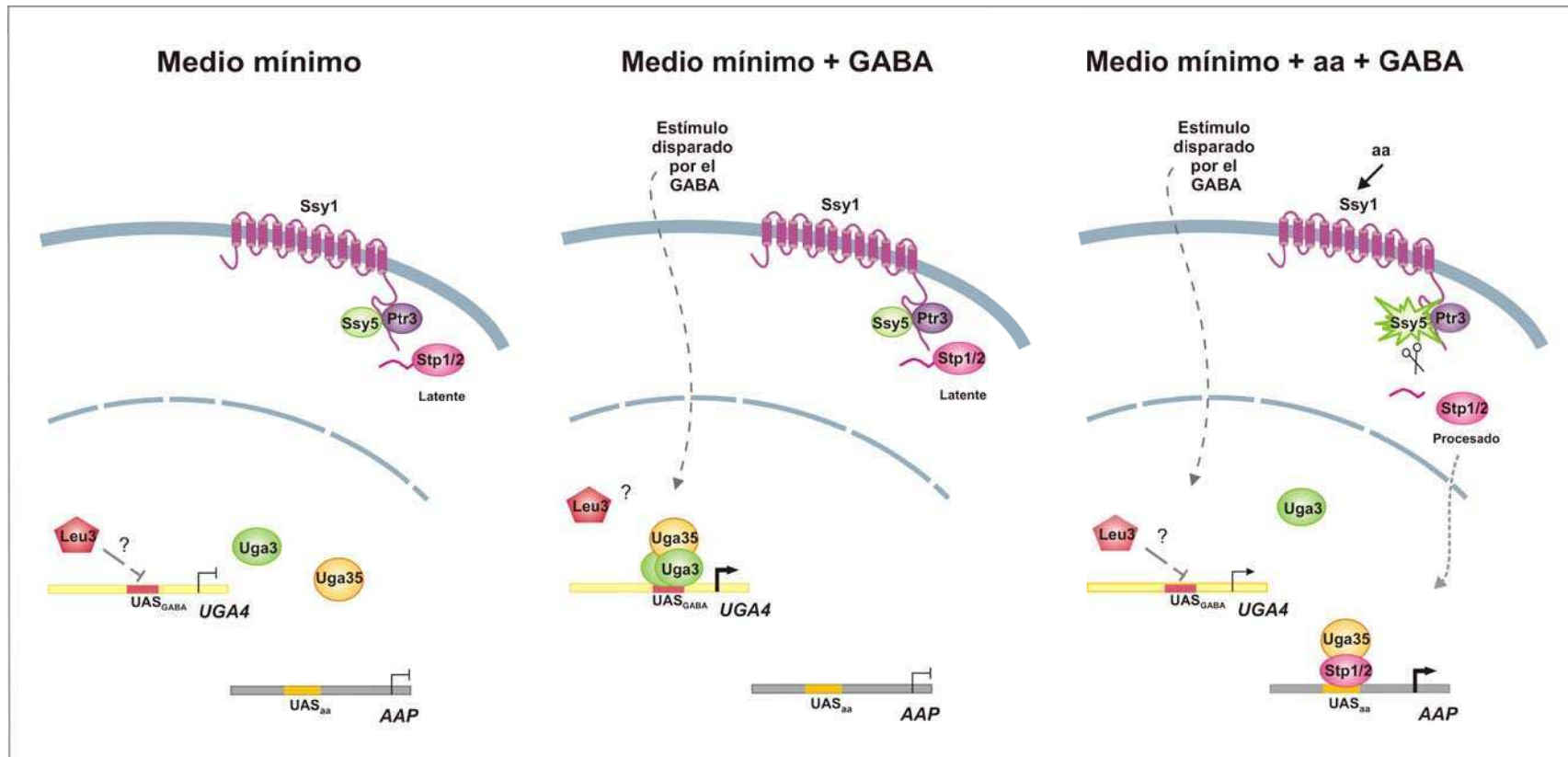


Figura 47. Representación esquemática de la regulación del gen *UGA4* por aminoácidos. AAP: genes de permeasas de aminoácidos.

Experimentos de mutagénesis realizados sobre el promotor de *UGA4* llevaron a identificar al factor de transcripción Leu3 como un posible regulador negativo de la expresión del gen *UGA4* (Figura 30). Cuando se analizó la expresión de dicho gen en una cepa deficiente en el factor Leu3 se observaron niveles altos de expresión en ausencia de inductor (Figura 31), en concordancia con lo reportado por Boer y colaboradores (Boer et al., 2005), quienes observaron niveles altos de expresión de *UGA4* en condiciones limitantes de nitrógeno, en una mutante *leu3Δ*. Resultados similares se observaron para el gen *UGA1* pero no para *UGA2* (Figura 47), de acuerdo con la ausencia de un sitio consenso para Leu3 en el promotor de este último gen. El hecho de que se observen patrones similares de expresión al mutar la secuencia central del elemento *UAS_{GABA}* del promotor de *UGA4* (Figuras 28G e I), o al deletar la proteína Leu3 (Figura 31), sugieren la interacción de dicho factor con el promotor de *UGA4*. Sin embargo, estudios *in vitro* habían reportado que si bien los factores de transcripción Leu3 y Uga3 se unen a secuencias que contienen repeticiones CGG evertidas y espaciadas por cuatro bases, Leu3 no reconoce secuencias blanco de Uga3 ni Uga3 de Leu3, ya que la especificidad estaría dada por los nucleótidos localizados entre los tripletes CGG (Noel & Turcotte, 1998). Nuestros resultados (Figura 32), concuerdan con los publicados por Noel y Turcotte en cuanto a que no se detecta interacción de Leu3 con el promotor de *UGA4*, aunque no podemos descartar que dicha interacción ocurra y no esté siendo detectada. Tang y colaboradores (Tang et al., 2006) observaron que sólo se detecta unión del factor Leu3 en el 3% de los promotores de los genes cuya expresión se ve afectada por la delección de este factor y que si se sobreexpresa una versión de la proteína Leu3 que contiene una mutación que la convierte en constitutivamente activa, la cantidad de genes regulados por Leu3 en los que se detecta unión de dicho factor aumenta considerablemente. Por otra parte, la regulación de *UGA4* por Leu3 parece ser independiente de los niveles de α -IPM ya que, a pesar de que la inducción de *UGA4* parece afectarse cuando los niveles de α -IPM son muy bajos, en estas condiciones los niveles de expresión de los dos factores responsables de la inducción de *UGA4*, Uga3 y Uga35/Dal81, son prácticamente indetectables (Tablas 7 y 8). Esto sugiere que la falta de inducción observada en estas condiciones sería

causada por la ausencia de dichos factores y por ende sería un efecto indirecto. Por otra parte, el hecho de que el factor de transcripción Uga35/Dal81 prácticamente no esté siendo reclutado al promotor de *UGA4* en la cepa *leu3Δ* (Figura 41A) podría explicar la menor represión de la leucina en esta cepa, sugiriendo que Leu3 no estaría involucrado en la regulación por aminoácidos del gen *UGA4*.

Si bien no fue posible esclarecer completamente las causas que llevan a la alta expresión del promotor *UGA4* que contiene el elemento *UAS_{GABA}* mutado o a la alta expresión del promotor *wild type* en células *leu3Δ*, sí pudimos determinar que parte de esta expresión constitutiva depende del factor de transcripción Uga35/Dal81, ya que en ausencia de dicho factor los niveles basales observados disminuyen (Figura 40). Por otra parte, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron que los niveles altos de expresión de las construcciones *UAS_{GABA}mut-lacZ* y *UAS_{GABA}del-lacZ* también dependen de los factores GATA positivos Gln3 y Gat1, ya que en ausencia de cualquiera de estos dos factores los niveles de expresión disminuyen a la mitad. En células creciendo en una fuente pobre de nitrógeno como prolina, el factor GATA negativo Uga43/Dal80 se encuentra unido al promotor de *UGA4* causando un efecto inhibitorio (Georis et al., 2009). En estas condiciones, la inducción de *UGA4* es dependiente del factor GATA positivo Gln3, ya que en ausencia del mismo, los niveles de inducción disminuyen (Luzzani et al., 2007, Talibi et al., 1995). Sin embargo, Gln3 no tiene la capacidad de *trans*-activar la expresión de *UGA4* a menos que actúen los factores Uga3 y Uga35/Dal81 en respuesta al agregado de inductor (Andre et al., 1995, Talibi et al., 1995). Se ha propuesto que luego del agregado de GABA, la unión de Gln3 podría verse favorecida por sobre la de Uga43/Dal80, lo que incrementaría los niveles de inducción (Andre et al., 1995, Talibi et al., 1995). Algo similar ocurre con la expresión de la permeasa *AGP1*, donde Gln3 no tiene la capacidad de *trans*-activar la expresión de dicho gen sin la previa acción de los factores Stp1 y Uga35/Dal81 a través del elemento *UAS_{aa}* (Abdel-Sater et al., 2004b). Dada la cercanía física que existe entre el elemento *UAS_{GABA}* y el elemento *UAS_{GATA}* sería lógico esperar que ocurriera algún tipo de interacción entre los factores que actúan sobre una u otra secuencia. Sería interesante entonces estudiar si las

mutaciones en el elemento UAS_{GABA} afectan la unión del represor Uga43/Dal80 al elemento UAS_{GATA} o si de alguna forma favorecen la unión del factor positivo Gln3 causando los altos niveles de expresión. Estudios realizados sobre los factores Gln3 y Dal82, ambos reguladores del gen $DAL7$, sugirieron una interacción entre dichos factores, aunque aparentemente no sería una interacción directa. Se demostró que construcciones LexA-Gln3 y LexA-Dal82 requieren distintos componentes del complejo SAGA para poder inducir la transcripción y se propuso que este complejo podría actuar como puente en la interacción Gln3-Dal82 (Scott *et al.*, 2000).

Nuestros resultados demostraron que la secuencia central del elemento UAS_{GABA} del gen $UGA4$ es el blanco de la señal disparada por el sensor SPS en respuesta a los aminoácidos. Esto se deduce de los resultados que indican que ambos factores, Uga3 y Uga35/Dal81, actúan a través del elemento UAS_{GABA} , y que además su interacción con el promotor $UGA4$ disminuye en respuesta a los aminoácidos extracelulares, en forma dependiente del sensor SPS. Sin embargo, los resultados presentados en las Figuras 28G, 28I y 29 muestran que las construcciones que contienen la secuencia central del elemento UAS_{GABA} mutada siguen teniendo cierto grado de sensibilidad a la leucina. Si se tiene en cuenta que la acción de los factores GATA sobre los promotores sensibles a NCR depende de un balance entre los distintos factores GATA positivos y negativos (Coffman *et al.*, 1997, Soussi-Boudekou *et al.*, 1997) y se tiene en cuenta además que la expresión de los factores GATA Gat1/Nil1 y Uga43/Dal80 es afectada por señales disparadas por el sensor SPS (Kodama *et al.*, 2002), podríamos pensar que el efecto residual de los aminoácidos observado sobre las construcciones antes mencionadas podría deberse a un efecto secundario producido por cambios en el balance de los factores GATA.

El factor Uga35/Dal81 actúa junto con Dal82 para inducir la transcripción de los genes DUR y DAL (Scott *et al.*, 2000), de la misma forma que ocurre con Uga3 en el caso de la inducción por GABA de los genes UGA . En este trabajo demostramos que el motivo de poliglutamina (residuos 73 a 94) (Figura 37 y 45) de la proteína Uga35/Dal81 es esencial para la inducción por GABA de los genes UGA , así como es esencial para la inducción por alofanato de la

actividad de la enzima urea amidoliasa (Bricmont et al., 1991). Los dominios ricos en glutamina son componentes integrales de muchas proteínas involucradas en la regulación transcripcional desde las levaduras hasta el hombre. En mamíferos, estos dominios ricos en glutamina forman parte de los dominios de activación de varios factores de transcripción y cumplen su función interactuando con componentes del complejo de iniciación de la transcripción. Más aún, se ha demostrado que el dominio rico en glutaminas presente en la proteína Snf5 de levaduras es capaz de activar la transcripción (Escher *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta esto, es posible que la secuencia que incluye el motivo de poliglutamina (residuos 73 a 94) forme parte del dominio de activación de Uga35/Dal81.

Por otra parte, sería interesante evaluar si el factor Leu3 cumple algún rol en la interacción entre los factores Uga3 y Uga35/Dal81 o si actúa de alguna manera como nexo entre los elementos UAS_{GABA} y UAS_{GATA} y los factores que actúan sobre ellos. Se ha propuesto que heterodímeros formados entre miembros de la familia de factores de transcripción $Zn(II)_2-Cys_6$, entre los que podemos encontrar a Leu3, Uga3 y Uga35/Dal81, podrían unirse preferencialmente a distintos elementos con distintas afinidades, aumentando el número de sitios potenciales para estos factores de transcripción (MacPherson et al., 2006). En células deficientes en Leu3, se observan niveles altos de expresión de *UGA4*, al igual que lo observado al alterar la secuencia central del elemento UAS_{GABA} . Sin embargo, estos valores elevados de expresión no son causados por un reclutamiento independiente de GABA de los factores Uga3 y Uga35/Dal81 al promotor de *UGA4* (Figura 41). Más aún, en ausencia de Leu3, Uga3 es capaz de interactuar con el promotor de *UGA4* independientemente de la interacción de Uga35/Dal81 con dicho promotor. El gen *gdhA* de *A. nidulans* codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP y su expresión es regulada por los factores TamA y AreA. TamA es un factor homólogo a Uga35/Dal81 mientras que AreA es un factor tipo GATA cuya función es similar a la de Gln3 (Small *et al.*, 2001). Estudios realizados en dicho organismo reportaron la interacción de TamA y LeuB, una proteína que comparte homología con Leu3 de *S. cerevisiae*. Estos autores propusieron que TamA tiene un rol importante en la regulación de *gdhA*, y actuaría estabilizando las

interacciones de AreA y LeuB con el ADN promoviendo la formación de un complejo capaz de aumentar o activar la expresión de *gdhA* (Polotnianka *et al.*, 2004).

Por último, cuando se estudió la participación del factor Gcn4 en la regulación por aminoácidos de *UGA4*, se determinó que dicho factor no está involucrado en esta regulación. Sin embargo, el efecto de la leucina sobre la construcción *UGA4-lacZ* en la cepa *gcn4Δ* produjo una represión muy fuerte (Figura 33), a diferencia de lo que ocurre en células *wild type* donde se observa una inducción residual luego de la pre-incubación con dicho aminoácido (comparar con Figura 28A). Por otra parte, en nuestro laboratorio se demostró que Gcn4 participa regulando positivamente la expresión de *UGA4* cuando las células crecen en presencia de una fuente de carbono no fermentable como acetato. Recientemente se demostró que en células transferidas a un medio conteniendo GABA como fuente de nitrógeno aumenta la fosforilación del factor eIF2 α , causando un aumento en la traducción y actividad transcripcional del factor Gcn4. En estas condiciones se observó que Gcn4 y Gln3 pueden inducir de forma coordinada la transcripción de genes uniéndose a diferentes elementos presentes en sus promotores (Staschke *et al.*, 2010). También se ha demostrado que el factor Gcn4 y el factor Gln3 forman parte de un mismo complejo transcripcional cuando las células crecen en presencia de GABA y son ayunadas de aminoácidos (Hernandez *et al.*, 2011). Existe la posibilidad de que el complejo Gln3-Gcn4 esté involucrado en potenciar el efecto inductor del GABA en el promotor de *UGA4* ya que en dicho promotor encontramos sitios consenso para ambos factores de transcripción (Figuras 25 y 26). En este caso, si uno de los componentes del complejo está ausente podría ser la causa de una menor activación del gen *UGA4* y por ende de un mayor efecto negativo de la leucina. Por otra parte, cuando se midió la actividad de la construcción *UAS_{GATA}Δ-lacZ* en células *wild type*, se observó una menor inducción en presencia de leucina en comparación con la construcción *UGA4-lacZ* (comparar Figuras 28A y 28C). En este caso, está ausente el elemento *UAS_{GATA}* donde se encuentra incluido el sitio consenso de unión del factor Gln3 y por lo tanto tampoco estaría actuando uno de los componentes del complejo Gln3-Gcn4 por faltar su sitio de interacción con el ADN.

En resumen, los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis contribuyeron a esclarecer los mecanismos moleculares que llevan a una disminución en la inducción de los genes *UGA* causada por los aminoácidos extracelulares y nos permitieron proponer un modelo según el cual el factor Uga35/Dal81 estaría actuando como un regulador jerárquico en la utilización de distintas fuentes de nitrógeno. Por otra parte los resultados aquí presentados abren un interrogante acerca de la interacción entre los factores que actúan sobre los elementos *UAS_{GABA}* y *UAS_{GATA}* presentes en el promotor de *UGA4* así como también acerca de su interacción con los factores Leu3, Gcn4 y con los componentes de la maquinaria transcripcional que llevan a la activación de los genes *UGA* en distintas condiciones de crecimiento.

APÉNDICE

1. Medios de cultivo

YPD

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%

LB

Extracto de levadura	0,5%
Peptona	1%
Cloruro de sodio	1%

2. Buffers

Buffer Z

Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β-mercaptoetanol	50 mM
pH 7.0	

Buffer de lisis

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	100 mM
SDS	1%
Tritón X-100	2%

Buffer FA (ChIP)

HEPES/KOH pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1%
Deoxicolato de sodio	0,1%
SDS	0,1%
PMSF	2 mM

Buffer de lavado (ChIP)

Tris-HCl pH 8	10 mM
LiCl	0,25 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0,5 %
Deoxicolato de sodio	0,5%

Buffer de elución (ChIP)

Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1%

Buffer TE

Tris-Cl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Buffer AE

NaAc pH 5,2	50 mM
EDTA	10 mM

Buffer TBS

Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	150 mM

Loading buffer con SDS

Tris-HCl pH 7,5	60 mM
Glicerol	10%
SDS	2%
β -mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,0025%

Solución A

Tris-HCl pH 8.0	0,1 M
Luminol	0,045%
Ácido p-cumárico	0,066%

Solución B

H ₂ O ₂	0,18%
Tris-HCl pH 8,0	0,1 M

Solución de tinción

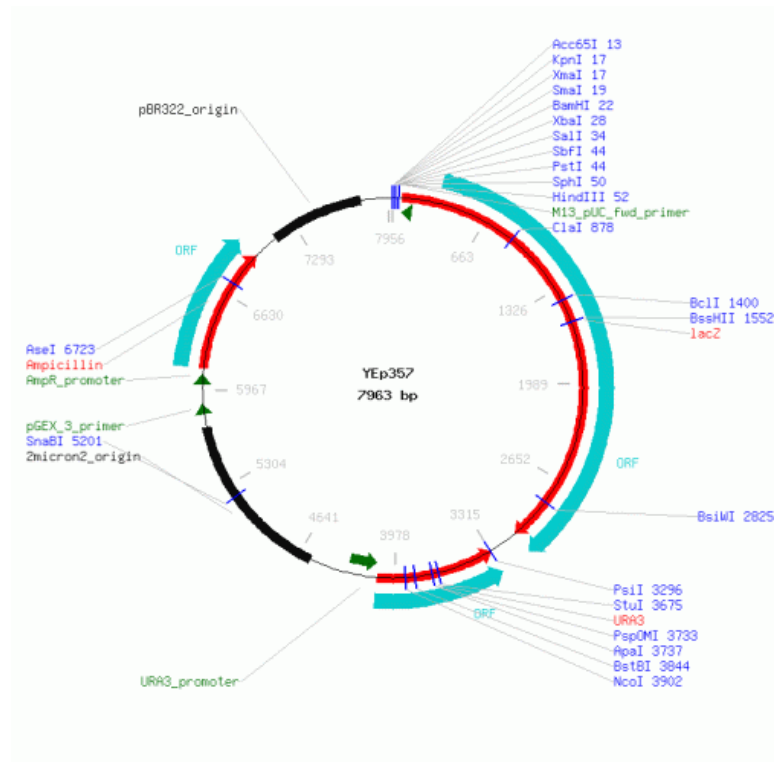
Coomassie Brilliant blue R-250	0.15%
Metanol	8%
Ácido acético	7%

Solución desteñidora

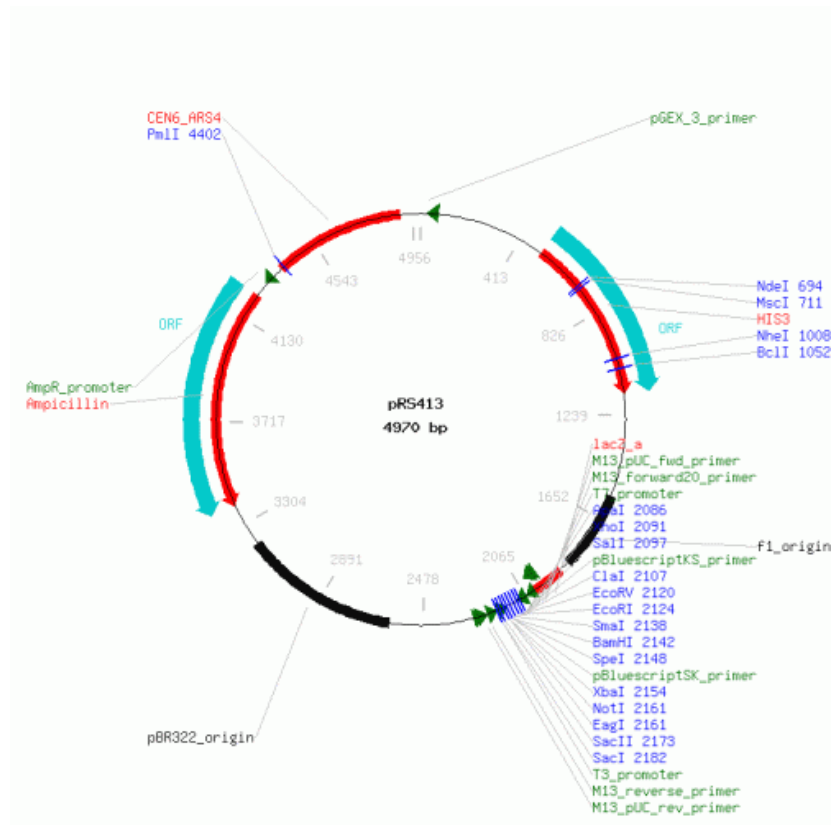
Metanol	45%
Ácido acético	7%

3. Plásmidos

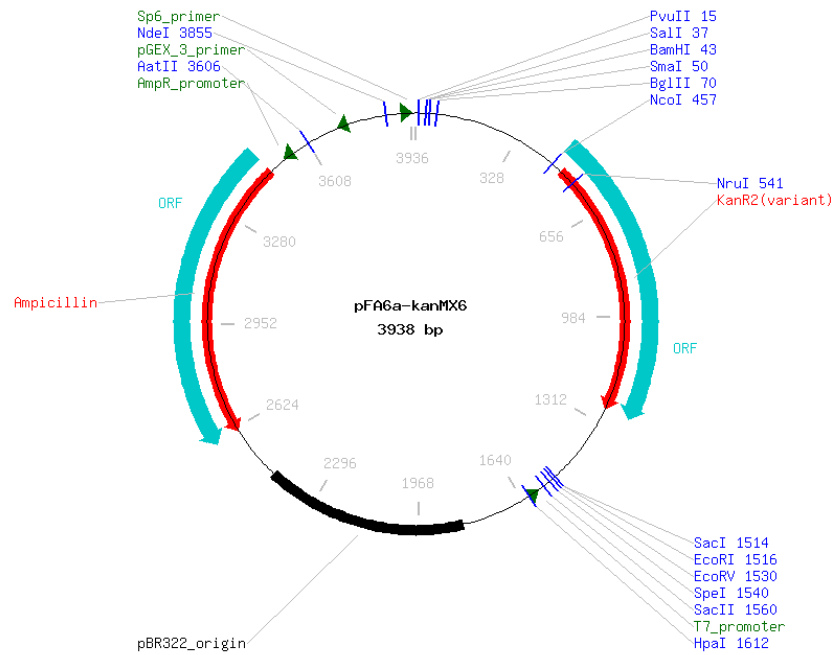
YEp357



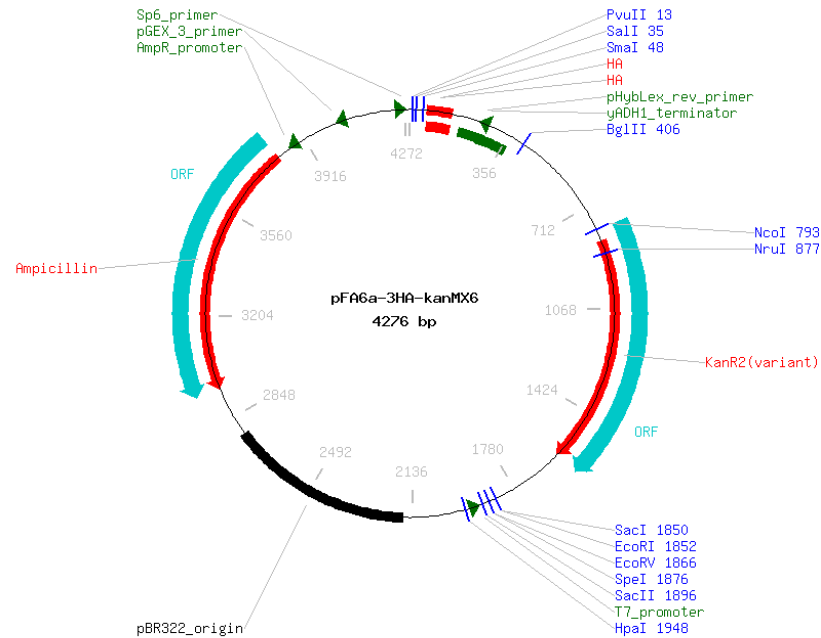
El plásmido YEp357 contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras 2μ . También posee los genes Amp^R y $URA3$ que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras respectivamente. Río abajo del sitio múltiple de clonado se encuentra el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa.

pRS413

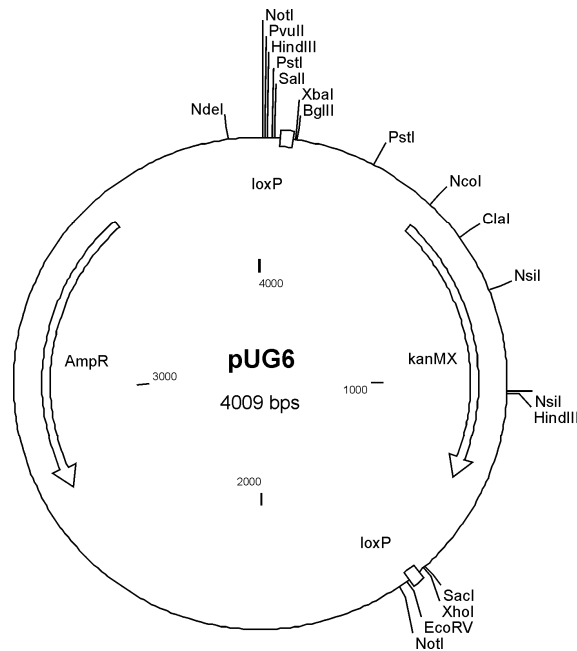
El plásmido pRS413 contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras *CEN6*. También posee los genes *Amp^R* e *HIS3* que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente.

pFA6a-kanMX

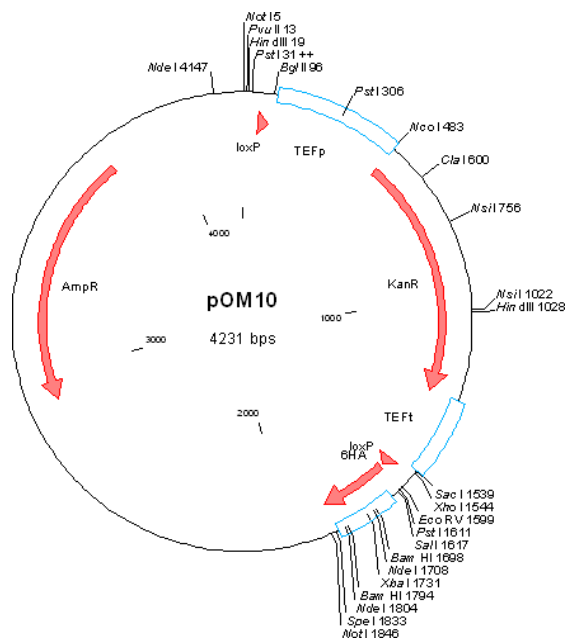
El plásmido pFA6a-kanMX contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp^R de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido no contiene origen de replicación de levaduras y contiene el módulo kanMX que confiere resistencia a geneticina (G418) en dicho organismo.

pFA6a-3HA-kanMX6

El plásmido pFA6a-3HA-kanMX6 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp^R de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Posee tres epítopes HA en tandem río arriba del módulo kanMX que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras y no contiene origen de replicación para dicho organismo.

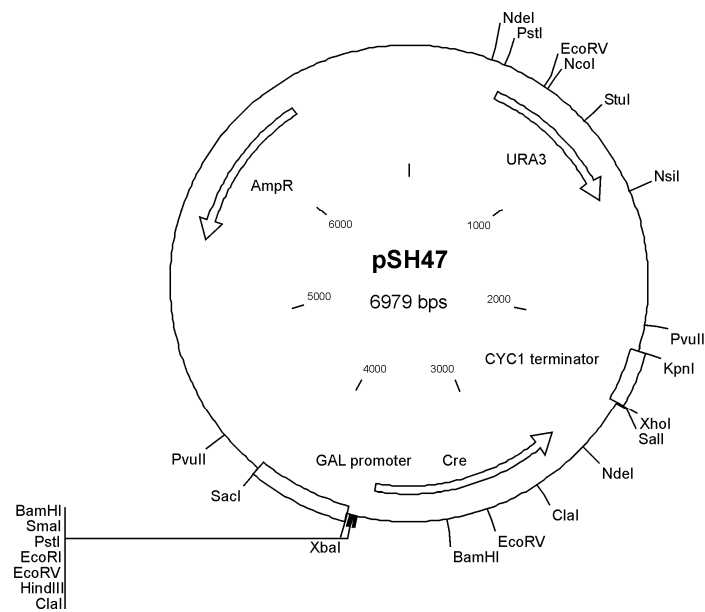
pUG6

El plásmido pUG6 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp^R de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el gen kanMX que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras flanqueado por secuencias loxP. No contiene origen de replicación para levaduras.

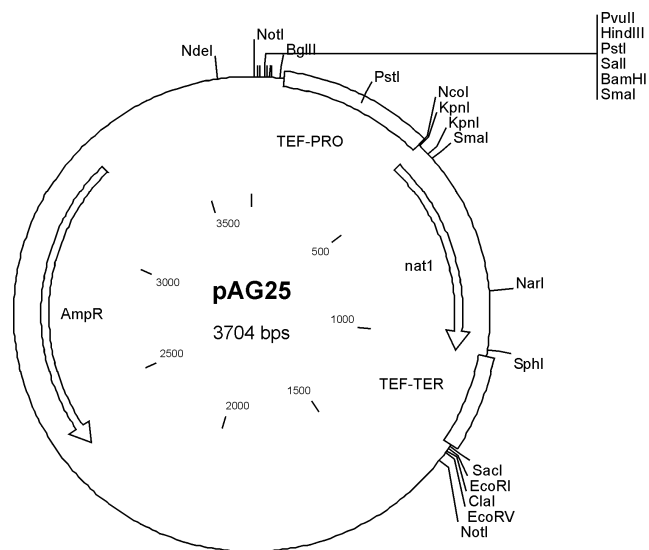
pOM10

El plásmido pOM10 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp^R de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el módulo kanMX que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras flanqueado por secuencias loxP río abajo de seis epítopes HA en tandem. No contiene origen de replicación para levaduras.

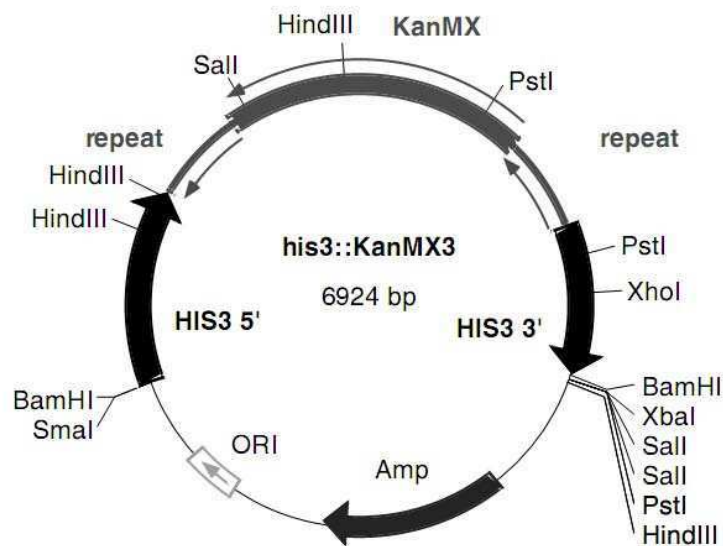
pSH47



El plásmido pSH47 contiene un origen de replicación bacteriano y un origen de replicación de levaduras. También posee los genes Amp^R y URA3 que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente. Este plásmido contiene un gen que codifica para la recombinasa Cre río abajo del promotor inducible por galactosa GAL1.

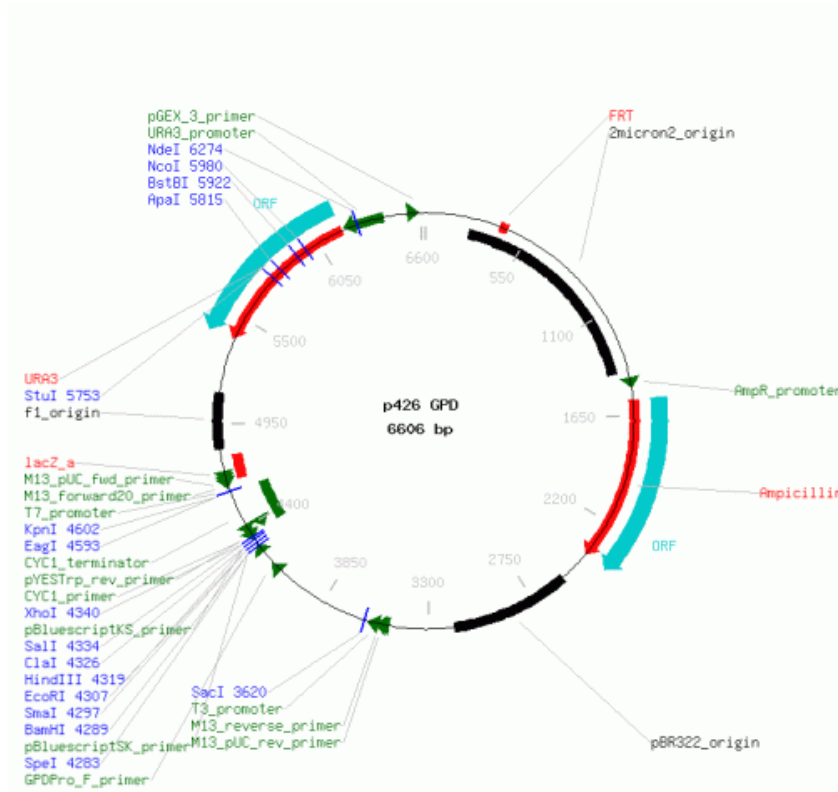
pAG25

El plásmido pAG25 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp^R de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el módulo natMX que confiere resistencia a nourseotricina (ClonNAT) en levaduras pero no contiene origen de replicación para dicho organismo.

M3929

El plásmido M3929 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen *Amp^R* de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el módulo *kanMX* que confiere resistencia a G418 interrumpiendo el gen *HIS3*. No posee origen de replicación de levaduras.

p426-GPD



El plásmido p426-GPD contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras 2 μ . También posee los genes Amp^R y URA3 que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras respectivamente.

REFERENCIAS

- Abdel-Sater, F., M. El Bakkoury, A. Urrestarazu, S. Vissers & B. Andre, (2004a) Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* **24**: 9771-9785.
- Abdel-Sater, F., I. Iraqui, A. Urrestarazu & B. Andre, (2004b) The external amino acid signaling pathway promotes activation of Stp1 and Uga35/Dal81 transcription factors for induction of the AGP1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **166**: 1727-1739.
- Alani, E., L. Cao & N. Kleckner, (1987) A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**: 541-545.
- Albuquerque, C. P., M. B. Smolka, S. H. Payne, V. Bafna, J. Eng & H. Zhou, (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1389-1396.
- Andre, B., (1990) The UGA3 gene regulating the GABA catabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* codes for a putative zinc-finger protein acting on RNA amount. *Mol Gen Genet* **220**: 269-276.
- Andre, B., C. Hein, M. Grenson & J. C. Jauniaux, (1993) Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **237**: 17-25.
- Andre, B. & J. C. Jauniaux, (1990a) Nucleotide sequence of the DURM gene coding for a positive regulator of allophanate-inducible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **18**: 7136.
- Andre, B. & J. C. Jauniaux, (1990b) Nucleotide sequence of the yeast UGA1 gene encoding GABA transaminase. *Nucleic Acids Res* **18**: 3049.
- Andre, B., D. Talibi, S. Soussi Boudekou, C. Hein, S. Vissers & D. Coornaert, (1995) Two mutually exclusive regulatory systems inhibit UASGATA, a cluster of 5'-GAT(A/T)A-3' upstream from the UGA4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**: 558-564.
- Andreasson, C., S. Heessen & P. O. Ljungdahl, (2006) Regulation of transcription factor latency by receptor-activated proteolysis. *Genes Dev* **20**: 1563-1568.
- Andreasson, C. & P. O. Ljungdahl, (2002) Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes Dev* **16**: 3158-3172.
- Andreasson, C. & P. O. Ljungdahl, (2004) The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Mol Cell Biol* **24**: 7503-7513.
- Bach, B., (2009) Role of -Aminobutyric Acid as a Source of Nitrogen and Succinate in Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **60**: 508-516
- Bach, B., E. Meudec, J. P. Lepoutre, T. Rossignol, B. Blondin, S. Dequin & C. Camarasa, (2009) New insights into {gamma}-aminobutyric acid catabolism: Evidence for {gamma}-hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4231-4239.
- Bahn, Y. S., C. Xue, A. Idnurm, J. C. Rutherford, J. Heitman & M. E. Cardenas, (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**: 57-69.
- Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute & C. Cullin, (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-3330.
- Beck, T. & M. N. Hall, (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Bechet, J., M. Grenson & J. M. Wiame, (1970) Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **12**: 31-39.
- Bermudez Moretti, M., S. Correa Garcia, E. H. Ramos & A. Batlle, (1995) GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**: 843-849.

- Bermudez Moretti, M., A. M. Perullini, A. Batlle & S. Correa Garcia, (2005) Expression of the UGA4 gene encoding the delta-aminolevulinic and gamma-aminobutyric acids permease in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by amino acid-sensing systems. *Arch Microbiol* **184**: 137-140.
- Bernard, F. & B. Andre, (2001a) Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **41**: 489-502.
- Bernard, F. & B. Andre, (2001b) Ubiquitin and the SCF(Grr1) ubiquitin ligase complex are involved in the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **496**: 81-85.
- Bertram, P. G., J. H. Choi, J. Carvalho, W. Ai, C. Zeng, T. F. Chan & X. F. Zheng, (2000) Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* **275**: 35727-35733.
- Blinder, D., P. W. Coschigano & B. Magasanik, (1996) Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**: 4734-4736.
- Boban, M. & P. O. Ljungdahl, (2007) Dal81 enhances Stp1- and Stp2-dependent transcription necessitating negative modulation by inner nuclear membrane protein Asi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **176**: 2087-2097.
- Boban, M., A. Zargari, C. Andreasson, S. Heessen, J. Thyberg & P. O. Ljungdahl, (2006) Asi1 is an inner nuclear membrane protein that restricts promoter access of two latent transcription factors. *J Cell Biol* **173**: 695-707.
- Boer, V. M., J. M. Daran, M. J. Almering, J. H. de Winde & J. T. Pronk, (2005) Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res* **5**: 885-897.
- Bouche, N. & H. Fromm, (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**: 110-115.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bricmont, P. A., J. R. Daugherty & T. G. Cooper, (1991) The DAL81 gene product is required for induced expression of two differently regulated nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 1161-1166.
- Bussey, H. & H. E. Umbarger, (1970) Biosynthesis of the branched-chain amino acids in yeast: a trifluoroleucine-resistant mutant with altered regulation of leucine uptake. *J Bacteriol* **103**: 286-294.
- Cavaliere, D., E. Casalone, B. Bondoni, G. Fia, M. Polsinelli & C. Barberio, (1999) Trifluoroleucine resistance and regulation of alpha-isopropyl malate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**: 152-160.
- Coffman, J. A., H. M. el Berry & T. G. Cooper, (1994) The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**: 7476-7483.
- Coffman, J. A., R. Rai, T. Cunningham, V. Svetlov & T. G. Cooper, (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.
- Coffman, J. A., R. Rai, D. M. Loprete, T. Cunningham, V. Svetlov & T. G. Cooper, (1997) Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 3416-3429.
- Coleman, S. T., T. K. Fang, S. A. Rovinsky, F. J. Turano & W. S. Moye-Rowley, (2001) Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 244-250.

- 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.
- Coornaert, D., S. Vissers & B. Andre, (1991) The pleiotropic UGA35(DURL) regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequence and identity with the DAL81 gene. *Gene* **97**: 163-171.
- Correa García, S., Bemúdez Moretti, M, Battle A, (2000) Constitutive expression of the UGA4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* depends on two positive-acting proteins, Uga3p and Uga35p. *FEMS microbiology letters* **184**: 219-224.
- Correa Garcia, S., M. Bermudez Moretti, E. Ramos & A. Batlle, (1997) Carbon and nitrogen sources regulate delta-aminolevulinic acid and gamma-aminobutyric acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1097-1101.
- Cox, K. H., A. Kulkarni, J. J. Tate & T. G. Cooper, (2004) Gln3 phosphorylation and intracellular localization in nutrient limitation and starvation differ from those generated by rapamycin inhibition of Tor1/2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 10270-10278.
- Cunningham, T. S., R. A. Dorrington & T. G. Cooper, (1994) The UGA4 UASNTR site required for GLN3-dependent transcriptional activation also mediates DAL80-responsive regulation and DAL80 protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**: 4718-4725.
- Cunningham, T. S., R. Rai & T. G. Cooper, (2000) The level of DAL80 expression down-regulates GATA factor-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 6584-6591.
- Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero & P. Hieter, (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**: 119-122.
- Daugherty, J. R., R. Rai, H. M. el Berry & T. G. Cooper, (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.
- Davis, M. A., A. J. Small, S. Kourambas & M. J. Hynes, (1996) The tamA gene of *Aspergillus nidulans* contains a putative zinc cluster motif which is not required for gene function. *J Bacteriol* **178**: 3406-3409.
- De Boer, M., J. P. Bebelman, P. M. Goncalves, J. Maat, H. Van Heerikhuizen & R. J. Planta, (1998) Regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **30**: 603-613.
- de Boer, M., P. S. Nielsen, J. P. Bebelman, H. Heerikhuizen, H. A. Andersen & R. J. Planta, (2000) Stp1p, Stp2p and Abf1p are involved in regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **28**: 974-981.
- Didion, T., B. Regenber, M. U. Jorgensen, M. C. Kielland-Brandt & H. A. Andersen, (1998) The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **27**: 643-650.
- Dorrington, R. A. & T. G. Cooper, (1993) The DAL82 protein of *Saccharomyces cerevisiae* binds to the DAL upstream induction sequence (UIS). *Nucleic Acids Res* **21**: 3777-3784.
- Eckert-Boulet, N., P. S. Nielsen, C. Friis, M. M. dos Santos, J. Nielsen, M. C. Kielland-Brandt & B. Regenber, (2004) Transcriptional profiling of extracellular amino acid sensing in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of Stp1p and Stp2p. *Yeast* **21**: 635-648.
- Escher, D., M. Bodmer-Glavas, A. Barberis & W. Schaffner, (2000) Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol Cell Biol* **20**: 2774-2782.
- Forsberg, H., C. F. Gilstring, A. Zargari, P. Martinez & P. O. Ljungdahl, (2001a) The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol* **42**: 215-228.

- Forsberg, H., M. Hammar, C. Andreasson, A. Moliner & P. O. Ljungdahl, (2001b) Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **158**: 973-988.
- Forsberg, H. & P. O. Ljungdahl, (2001) Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane *Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p* sensor of extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **21**: 814-826.
- Friden, P., C. Reynolds & P. Schimmel, (1989) A large internal deletion converts yeast LEU3 to a constitutive transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **9**: 4056-4060.
- Friden, P. & P. Schimmel, (1988) LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol Cell Biol* **8**: 2690-2697.
- Gaber, R. F., K. Ottow, H. A. Andersen & M. C. Kielland-Brandt, (2003) Constitutive and hyperresponsive signaling by mutant forms of *Saccharomyces cerevisiae* amino acid sensor *Ssy1*. *Eukaryot Cell* **2**: 922-929.
- Garcia, S. C., M. B. Moretti & A. Batlle, (2000) Constitutive expression of the UGA4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* depends on two positive-acting proteins, *Uga3p* and *Uga35p*. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 219-224.
- Gauss, R., M. Trautwein, T. Sommer & A. Spang, (2005) New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**: 1-12.
- Georis, I., A. Feller, F. Vierendeels & E. Dubois, (2009) The yeast GATA factor *Gat1* occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol Cell Biol* **29**: 3803-3815.
- Georis, I., J. J. Tate, T. G. Cooper & E. Dubois, (2008) Tor pathway control of the nitrogen-responsive *DAL5* gene bifurcates at the level of *Gln3* and *Gat1* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis & M. Johnston, (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391.
- Gietz, R. D. & R. A. Woods, (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Godard, P., A. Urrestarazu, S. Vissers, K. Kontos, G. Bontempi, J. van Helden & B. Andre, (2007) Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**: 3065-3086.
- Goldstein, A. L. & J. H. McCusker, (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 1541-1553.
- Grenson, M., (1987) 4 - aminobutyric acid (GABA) uptake in Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino- acid permease, the proline permease and GABA - specific integrated into the GABA - catabolic pathway. *Biochem*. **6**: 35-39.
- Gruhler, A., J. V. Olsen, S. Mohammed, P. Mortensen, N. J. Faergeman, M. Mann & O. N. Jensen, (2005) Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* **4**: 310-327.

- Gueldener, U., J. Heinisch, G. J. Koehler, D. Voss & J. H. Hegemann, (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**: e23.
- Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer & J. H. Hegemann, (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.
- Harbison, C. T., D. B. Gordon, T. I. Lee, N. J. Rinaldi, K. D. Macisaac, T. W. Danford, N. M. Hannett, J. B. Tagne, D. B. Reynolds, J. Yoo, E. G. Jennings, J. Zeitlinger, D. K. Pokholok, M. Kellis, P. A. Rolfe, K. T. Takusagawa, E. S. Lander, D. K. Gifford, E. Fraenkel & R. A. Young, (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99-104.
- Hernandez, H., C. Aranda, L. Riego & A. Gonzalez, (2011) Gln3-Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Hinnebusch, A. G., (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**: 407-450.
- Hu, Y., T. G. Cooper & G. B. Kohlhaw, (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of GDH1, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol Cell Biol* **15**: 52-57.
- Idicula, A. M., (2002) Binding and Transcriptional Activation by Uga3p, a Zinc Binuclear Cluster Protein of *Saccharomyces cerevisiae*: Redefining the UAS_{GABA} and the Uga3p Binding Site. In: Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology. Rhodes University, pp.
- Idicula, A. M., G. L. Blatch, T. G. Cooper & R. A. Dorrington, (2002) Binding and activation by the zinc cluster transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. Redefining the UAS_{GABA} and its interaction with Uga3p. *J Biol Chem* **277**: 45977-45983.
- Iraqi, I., S. Vissers, F. Bernard, J. O. de Craene, E. Boles, A. Urrestarazu & B. Andre, (1999) Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol* **19**: 989-1001.
- Jacobs, P., J. C. Jauniaux & M. Grenson, (1980) A cis-dominant regulatory mutation linked to the argB-argC gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **139**: 691-704.
- Jamieson, D. J., (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1511-1527.
- Janke, C., M. M. Magiera, N. Rathfelder, C. Taxis, S. Reber, H. Maekawa, A. Moreno-Borchart, G. Doenges, E. Schwob, E. Schiebel & M. Knop, (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962.
- Kato, Y., K. Furukawa & S. Hara, (2002) Cloning and nucleotide sequence of the glutamate decarboxylase-encoding gene gadA from *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2600-2605.
- Kirkpatrick, C. R. & P. Schimmel, (1995) Detection of leucine-independent DNA site occupancy of the yeast Leu3p transcriptional activator in vivo. *Mol Cell Biol* **15**: 4021-4030.
- Kodama, Y., F. Omura, K. Takahashi, K. Shirahige & T. Ashikari, (2002) Genome-wide expression analysis of genes affected by amino acid sensor Ssy1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **41**: 63-72.
- Kohlhaw, G. B., (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 1-15, table of contents.
- Langle-Rouault, F. & E. Jacobs, (1995) A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res* **23**: 3079-3081.

- Liu, Z., J. Thornton, M. Spirek & R. A. Butow, (2008) Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Mol Cell Biol* **28**: 551-563.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Ljungdahl, P. O., (2009) Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* **37**: 242-247.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen & J. R. Pringle, (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
- Luzzani, C., S. B. Cardillo, M. Bermudez Moretti & S. Correa Garcia, (2007) New insights into the regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* UGA4 gene: two parallel pathways participate in carbon-regulated transcription. *Microbiology* **153**: 3677-3684.
- MacPherson, S., M. Larochelle & B. Turcotte, (2006) A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 583-604.
- Magasanik, B., (2005) The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16537-16538.
- Magasanik, B. & C. A. Kaiser, (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**: 1-18.
- Manivasakam, P., S. C. Weber, J. McElver & R. H. Schiestl, (1995) Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**: 2799-2800.
- McKelvey, J., R. Rai & T. G. Cooper, (1990) GABA transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 263-270.
- Miller, J. H., (1972) Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring harbor*.
- Minehart, P. L. & B. Magasanik, (1991) Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **11**: 6216-6228.
- Moretti, M. B., A. Batlle & S. C. Garcia, (2001) UGA4 gene encoding the gamma-aminobutyric acid permease in *Saccharomyces cerevisiae* is an acid-expressed gene. *Int J Biochem Cell Biol* **33**: 1202-1207.
- Mumberg, D., R. Muller & M. Funk, (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122.
- Myers, A. M., A. Tzagoloff, D. M. Kinney & C. J. Lusty, (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**: 299-310.
- Natarajan, K., M. R. Meyer, B. M. Jackson, D. Slade, C. Roberts, A. G. Hinnebusch & M. J. Marton, (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.
- Nielsen, P. S., B. van den Hazel, T. Didion, M. de Boer, M. Jorgensen, R. J. Planta, M. C. Kielland-Brandt & H. A. Andersen, (2001) Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* amino acid permease gene BAP2. *Mol Gen Genet* **264**: 613-622.
- Noel, J. & B. Turcotte, (1998) Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *J Biol Chem* **273**: 17463-17468.
- Olive, M. G., J. R. Daugherty & T. G. Cooper, (1991) DAL82, a second gene required for induction of allantoin system gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 255-261.
- Pfirrmann, T., S. Heessen, D. J. Omnus, C. Andreasson & P. O. Ljungdahl, (2010) The prodomain of Ssy5 protease controls receptor-activated proteolysis of transcription factor Stp1. *Mol Cell Biol* **30**: 3299-3309.

- Polotnianka, R., B. J. Monahan, M. J. Hynes & M. A. Davis, (2004) TamA interacts with LeuB, the homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Leu3p, to regulate *gdhA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **272**: 452-459.
- Ramos, F., M. el Guezzar, M. Grenson & J. M. Wiame, (1985) Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **149**: 401-404.
- Santangelo, G., (2006) Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 253-282.
- Satyanarayana, T., H. E. Umbarger & G. Lindegren, (1968) Biosynthesis of branched-chain amino acids in yeast: correlation of biochemical blocks and genetic lesions in leucine auxotrophs. *J Bacteriol* **96**: 2012-2017.
- Scazzocchio, C., (2000) The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* **3**: 126-131.
- Scott, S., A. T. Abul-Hamd & T. G. Cooper, (2000) Roles of the Dal82p domains in allophanate/oxalurate-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 30886-30893.
- Serebriiskii, I. G. & E. A. Golemis, (2000) Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* **285**: 1-15.
- Sheff, M. A. & K. S. Thorn, (2004) Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661-670.
- Small, A. J., R. B. Todd, M. C. Zanker, S. Delimitrou, M. J. Hynes & M. A. Davis, (2001) Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **265**: 636-646.
- Smolka, M. B., C. P. Albuquerque, S. H. Chen & H. Zhou, (2007) Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10364-10369.
- Soussi-Boudekou, S., S. Vissers, A. Urrestarazu, J. C. Jauniaux & B. Andre, (1997) Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **23**: 1157-1168.
- Spielewoy, N., K. Flick, T. I. Kalashnikova, J. R. Walker & C. Wittenberg, (2004) Regulation and recognition of SCFGrr1 targets in the glucose and amino acid signaling pathways. *Mol Cell Biol* **24**: 8994-9005.
- Stanbrough, M., D. W. Rowen & B. Magasanik, (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.
- Staschke, K. A., S. Dey, J. M. Zaborske, L. R. Palam, J. N. McClintick, T. Pan, H. J. Edenberg & R. C. Wek, (2010) Integration of general amino acid control and target of rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. *J Biol Chem* **285**: 16893-16911.
- Storici, F., L. K. Lewis & M. A. Resnick, (2001) In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol* **19**: 773-776.
- Storici, F. & M. A. Resnick, (2003) Delitto perfetto targeted mutagenesis in yeast with oligonucleotides. *Genet Eng (N Y)* **25**: 189-207.
- Strachan, T. R., A. P., (1999) PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis. *Human Molecular Genetics 2. London: Garland Science*.
- Svetlov, V. V., (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80p and Deh1p can form homo- and heterodimeric complexes. *J. Bacteriol* **180**: 5682-5688.
- Sze, J. Y. & G. B. Kohlhaw, (1993) Purification and structural characterization of transcriptional regulator Leu3 of yeast. *J Biol Chem* **268**: 2505-2512.
- Sze, J. Y., M. Woontner, J. A. Jaehning & G. B. Kohlhaw, (1992) In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science* **258**: 1143-1145.

- Takahashi, T., A. Furukawa, S. Hara & H. Mizoguchi, (2004) Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in gamma-aminobutyric acid utilization in sake brewing. *J Biosci Bioeng* **97**: 412-418.
- Talibi, D., M. Grenson & B. Andre, (1995) Cis- and trans-acting elements determining induction of the genes of the gamma-aminobutyrate (GABA) utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **23**: 550-557.
- Tang, L., X. Liu & N. D. Clarke, (2006) Inferring direct regulatory targets from expression and genome location analyses: a comparison of transcription factor deletion and overexpression. *BMC Genomics* **7**: 215.
- Tate, J. J. & T. G. Cooper, (2007) Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. *J Biol Chem* **282**: 18467-18480.
- Tate, J. J., I. Georis, E. Dubois & T. G. Cooper, (2010) Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**: 17880-17895.
- Tate, J. J., R. Rai & T. G. Cooper, (2005) Methionine sulfoximine treatment and carbon starvation elicit Snf1-independent phosphorylation of the transcription activator Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 27195-27204.
- Tate, J. J., R. Rai & T. G. Cooper, (2006) Ammonia-specific regulation of Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase Npr1. *J Biol Chem* **281**: 28460-28469.
- ter Schure, E. G., N. A. van Riel & C. T. Verrips, (2000) The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 67-83.
- Turoscy, V. & T. G. Cooper, (1982) Pleiotropic control of five eucaryotic genes by multiple regulatory elements. *J Bacteriol* **151**: 1237-1246.
- Ubersax, J. A., E. L. Woodbury, P. N. Quang, M. Paraz, J. D. Blethrow, K. Shah, K. M. Shokat & D. O. Morgan, (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**: 859-864.
- Uemura, T., Y. Tomonari, K. Kashiwagi & K. Igarashi, (2004) Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 1082-1087.
- Vissers, S., B. Andre, F. Muyldermans & M. Grenson, (1989) Positive and negative regulatory elements control the expression of the UGA4 gene coding for the inducible 4-aminobutyric-acid-specific permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **181**: 357-361.
- Vissers, S., B. Andre, F. Muyldermans & M. Grenson, (1990) Induction of the 4-aminobutyrate and urea-catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Specific and common transcriptional regulators. *Eur J Biochem* **187**: 611-616.
- Voth, W. P., Y. W. Jiang & D. J. Stillman, (2003) New 'marker swap' plasmids for converting selectable markers on budding yeast gene disruptions and plasmids. *Yeast* **20**: 985-993.
- Wach, A., (1996) PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann & P. Philippsen, (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Wang, D., F. Zheng, S. Holmberg & G. B. Kohlhaw, (1999) Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem* **274**: 19017-19024.
- Wielemans, K., C. Jean, S. Vissers & B. Andre, (2010) Amino acid signaling in yeast: post-genome duplication divergence of the Stp1 and Stp2 transcription factors. *J Biol Chem* **285**: 855-865.

- Wu, B., K. Ottow, P. Poulsen, R. F. Gaber, E. Albers & M. C. Kielland-Brandt, (2006) Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. *J Cell Biol* **173**: 327-331.
- Yang, Y., (2005) Inferring yeast cell cycle regulators and interactions using transcription factor activities. *BMC Genomics* **6**.
- Zaman, S., S. I. Lippman, X. Zhao & J. R. Broach, (2008) How *Saccharomyces* respond to nutrients. *The Annual Review of Genetics* **42**: 2.1-2.55.
- Zargari, A., M. Boban, S. Heessen, C. Andreasson, J. Thyberg & P. O. Ljungdahl, (2007) Inner nuclear membrane proteins Asi1, Asi2, and Asi3 function in concert to maintain the latent properties of transcription factors Stp1 and Stp2. *J Biol Chem* **282**: 594-605.
- Zhou, K., P. R. Brisco, A. E. Hinkkanen & G. B. Kohlhaw, (1987) Structure of yeast regulatory gene LEU3 and evidence that LEU3 itself is under general amino acid control. *Nucleic Acids Res* **15**: 5261-5273.
- Zhou, K. M., Y. L. Bai & G. B. Kohlhaw, (1990) Yeast regulatory protein LEU3: a structure-function analysis. *Nucleic Acids Res* **18**: 291-298.
- Zhou, K. M. & G. B. Kohlhaw, (1990) Transcriptional activator LEU3 of yeast. Mapping of the transcriptional activation function and significance of activation domain tryptophans. *J Biol Chem* **265**: 17409-17412.