



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

# **Regulación transcripcional de genes de permeasas de *Saccharomyces cerevisiae***

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

**Marcos Daniel Palavecino Ruiz**

Director de Tesis: Dra. Susana Correa García

Director Asistente: Dra. Mariana Bermúdez Moretti

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vázquez

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, 2017



## Regulación transcripcional de genes de permeasas de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede usar una amplia variedad de fuentes de nitrógeno. En la naturaleza las células utilizan preferencialmente fuentes ricas de nitrógeno que permiten una mayor tasa de crecimiento, limitando la síntesis de enzimas y permeasas necesarias para el catabolismo de fuentes pobres. Este mecanismo se conoce como represión catabólica por nitrógeno (NCR) y en él intervienen los factores de transcripción GATA: Gln3 y Gat1, dos activadores, y Uga43 y Gzf3, dos represores. Sin embargo, en ausencia de fuentes ricas, las células pueden utilizar otras fuentes mediante caminos metabólicos que requieren la síntesis *de novo* de proteínas necesarias para su catabolismo; esto ocurre en presencia de un inductor, generalmente un sustrato de la vía. Así, para el catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno, como GABA, alantoína y leucina, son necesarios el factor de transcripción pleiotrópico Dal81 y otro factor específico de cada fuente (Uga3, Dal82 y Stp1/Stp2) para que se produzca la activación transcripcional de los genes que codifican para permeasas tales como Uga4, Dur3, Agp1, Bap2 y Bap3. El objetivo general de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de estos genes que están regulados por al menos dos mecanismos complementarios: uno dependiente de la calidad de la fuente de nitrógeno y el otro dependiente de inductor.

En este trabajo demostramos que los factores GATA regulan de manera diferente a cada uno de los genes estudiados. Encontramos que Uga43 y Gzf3 pueden tener un efecto positivo sobre la expresión de ciertos genes sensibles a nitrógeno. Además demostramos que Uga43 requiere de Leu3 para interaccionar con sus secuencias blanco y este mecanismo es responsable de la expresión basal de *UGA4*. En cambio, Uga43 y Gln3 no son necesarios para la interacción de Uga3 y Dal81 con los promotores *UGA*.

Por otra parte mostramos que tanto Stp1 como Dal81 son reclutados al promotor *AGP1* de manera dependiente de inductor y que ambos factores de transcripción se necesitan mutuamente para cumplir su función. También Stp1, Stp2 y Dal81 actúan de manera concertada en la regulación de *BAP2* y *BAP3*. Finalmente, encontramos que Leu3 actúa como un activador de la expresión de *BAP2*, mientras que no tiene efecto sobre la expresión de *AGP1* y de *BAP3*.

Por último, demostramos también que existe una jerarquía en el uso de fuentes pobres de nitrógeno. Cuando se encuentran presentes en el medio de cultivo, las células consumen primero leucina, luego alantoína y finalmente GABA a través de la expresión de *AGP1*, luego *DUR3* y *DAL7* y finalmente *UGA4*. Además, se demostró que Dal81 es el regulador central responsable de esta jerarquía.

La complejidad en la regulación de cada una de las permeasas estudiadas sin duda refleja la alta capacidad que tienen las células de levadura a adaptarse a diversas y cambiantes condiciones del entorno, activando determinadas vías metabólicas.

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae*, factores de transcripción, permeasas, NCR.

---

## Transcriptional regulation of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding permeases

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can use a wide variety of nitrogen sources. Nitrogen catabolite repression (NCR) is the mechanism by which cells use preferentially rich nitrogen sources and allows fast growth. On the other hand, NCR limits the synthesis of enzymes and other proteins responsible for the catabolism of poor nitrogen sources. This mechanism is controlled by four GATA transcription factors, the activators Gln3 and Gat1, and the repressors Uga43 and Gzf3. When NCR is relieved, yeast cells can metabolize poor nitrogen sources such as GABA, allantoin and leucine. For this purpose the pleiotropic transcription factor Dal81 and a specific regulatory protein (e.g. Uga3, Stp1, Stp2 and Dal82,) are needed for the activation of the permeases Uga4, Dur3, Agp1, Bap2 and Bap3. The main purpose of this work was to study the molecular mechanisms involved in the regulation of these permeases that are regulated by at least two complementary ways: one dependent on the quality of the nitrogen source and other dependent of the inducer.

In this work we demonstrate that GATA factors differentially regulate each gene studied. We find that both Uga43 and Gzf3 can have a positive effect on the expression of nitrogen sensitive genes. Moreover, we demonstrate that Uga43 requires Leu3 to interact with its target promoters and this mechanism is responsible for the basal *UGA4* expression. In contrast, Uga43 and Gln3 are not necessary for Uga3 and Dal81 interaction with *UGA* promoters.

We also show that both Stp1 and Dal81 are recruited to *AGP1* promoter only in the presence of inducer and that both transcription factors are mutually dependent. On *BAP2* and *BAP3* regulation the factors Stp1, Stp2 and Dal81 act in a concerted way. Finally, we find that Leu3 is an activator of *BAP2* expression whereas it has no effect on *AGP1* and *BAP3* expression.

We also demonstrated that there is a hierarchy by which *S. cerevisiae* uses different poor nitrogen sources. When they are present in the culture media, yeast cells use leucine, then allantoin, and finally GABA through the regulation of the *AGP1*, *DUR3*, *DAL7* and *UGA4* genes. Moreover, our experiments show that Dal81 is the central protein responsible for the utilization of these poor nitrogen sources.

The complexity of the regulation of each permease studied undoubtedly reflects the high capacity of yeast cells to adapt to different and changing environmental conditions, activating particular metabolic pathways.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, transcription factors, permeases, NCR.

## Agradecimientos

Durante el transcurso de esta tesis he encontrado el apoyo de mucha gente. Me siento muy feliz de escribir esta sección.

A mis directoras, Susana Correa García y Mariana Bermúdez Moretti por su dedicación y apoyo constante a lo largo de todo este tiempo. Gracias por haberme hecho formar parte del laboratorio, por ponerse contentas con cada experimento que salía bien y tristes cuando las cosas no salen como uno esperaba, por tomar la pipeta y ayudarme en todos los experimentos posibles, por analizar y discutir todos los resultados, por haberme dado libertad plena para trabajar y por haber leído y corregido esta tesis, mejorándola cada vez. ¡Gracias Sú y Marian!

A Sabrina Cardillo por resolverme a la distancia todas las dudas cuando entré al laboratorio.

También quiero agradecer a todos los que pasaron por el labo, Cris, Flor, Aldana. A Dani Galván por haberme ayudado en todo lo que podía. A los nuevos, Jeni, Facu y Seba, por ponerle onda y ayudarme este último tiempo.

A mi consejera de estudios, Dra. Elba Vázquez, porque a pesar de que siempre está ocupada tiene un momento para contestar alguna duda académica, sobre un curso o para leer el informe anual de doctorado. Aprovecho para agradecer a su grupo de trabajo, especialmente a Javi C., Mer, Daia (¡ya queda menos!) y a Ale, por la ayuda diaria, los consejos y las charlas.

Al Departamento de Química Biológica donde se realizó esta tesis. A Ayelén por contestar pacientemente las dudas burocráticas no solamente a mi, sino a todos los doctorandos de QB. A la gente del IFIBYNE y del FBMC por dar siempre una mano desinteresadamente. Al CONICET, por la beca doctoral para llevar a cabo este trabajo.

A Cipriana y María José, por tener nuestro material listo, facilitándonos siempre nuestro trabajo.

A Fede Coluccio y Oscar Pérez. Por los consejos y la ayuda permanente. A su grupo de trabajo: Lucía, Martín, Ceci, Pako, Facu y Flor. A Jimenita por la buena onda constante, por ayudarme con la docencia, la catarsis y por tener alguien con quien hablar los fines de semana y feriados en el CM1. A Amparito, otra asidua de los fines de semana, por la paz y calma que transmite. A Pauli, por la ayuda estadística, por las ricas cervezas y la buena onda constante ¡Gracias chicos del L3 y L10!

A los demás miembros del CM1, orgánicos y del L6, por hacer del CM1 un gran lugar para trabajar. A Ale Castro, Vane y Gabi.

A la gente de Agrobio, especialmente a Hernán, Leandro, Axel y Leandrito.

A Amaranta y a Lira, por compartir conmigo almuerzos, charlas y consejos. A Amaranta por ser tan buena conmigo y a Lira por esa energía y filosofía de vida tan envidiables.

Quiero agradecer muy especialmente a las doctoras Edith Kordon y Adali Pecci, por su enorme generosidad. No sólo con el L9, sino con todos los grupos del CM1 y QB. Por poner a disposición de todos equipamiento para que podamos trabajar y llevar cabo nuestras tesis y postdocs. Por haberme permitido invadir su laboratorio incontables veces y haberme invitado a compartir cenas con su grupo de trabajo. ¡Muchas gracias por todo Ada y Edith!

A los Pecci: Flopy, Lauti, Vir, Santi, Silvio, Luchito, Andrés, Meli, Santi, Dan, Dieguito, Martincito, Chocha, Cari y Mica. A las Kordon: Mica, Nati, Caro, Nadia, Vicky, Johi, Carlita y Lourdes. Gracias por haber hecho del CM1, cuando estaban, un lugar increíble para trabajar. Por los divertidos almuerzos, los deliciosos viernes gordos, los tecitos, los asados y el amplicón volador. Gracias por el préstamo constante de aparatos y reactivos; son un grupo de gente no sólo talentosa sino también muy generosos. Gracias por haberme adoptado como si fuese uno más.

Quiero agradecerles especialmente a Martincito por su siempre particular punto de vista respecto a todo y a Dieguito por compartir este arduo camino que es la tesis. A Lauti por el regalo pre-escritura. A Flopy y Chocha por los consejos y por la ayuda con los ChIPs y las Co-IPs. A Car, por hacerme conocer el Taekwondo. A Luchito, por haber hecho tan desafiante el hablar en neutro cuando recién se incorporó al laboratorio. A Silvio, por esa manera tan interesante de ver las cosas y arreglarnos todo lo que tenga cables. A Dan, por confiar en nosotros y hacer las cuentas cada vez que salimos a comer, por compartir el fanatismo por RuPaul.

Esta tesis tampoco podría haber llegado a puerto sin la gran ayuda de tres grandes personas: Vir, Vicky y Johi. ¿Quién diría que todo comenzó con un corte de luz? Son de lo mejor que me llevo después de estos años de trabajo.

Gracias Vir por los consejos, por musicalizar las tardes, los mates lavados y las tortas de la ventanita. Por estar ahí siempre y no dejarme bajar los brazos. Por ser tan solidaria y predispuesta a enseñar todo lo que sabés. Por arreglar todo lo que se rompe en el CM1. Por los almuerzos en el comedor. ¡Porque siempre, siempre, tenés razón rubia!

Gracias Vicky, por haber sido la primera en hablarme allá por el 2012. Por compartir el amor por los gatos y la comida. Por las charlas caminando desde ciudad universitaria hasta Belgrano. Por la oreja y los consejos sobre el presente y el futuro. Por entender cuando digo que en Santiago del Estero hace mucho calor. Porque en el fondo sos una dulce que le gustan los abrazos.



A Johanna, por ser una genia absoluta. Por ponernos a prueba mutuamente nuestra paciencia. Por las Morias, las Valerias y las Elviras. Por los abrazos, las clases de danza y las risas. Por tener la palabra justa y hacerse querer tan fácil. Por cuestionar todo, desde la ropa hasta los experimentos. Por aguantarme y estar ahí siempre, y muchas cosas más que no voy a escribir acá. ¡Gracias Marta por haberme hecho un lugar en tu vida!

A mis amigos: Carmen, Marce, Fabi, Romi y Carlita. A Jorge y a la gente de Botánica por recibirme siempre como si nunca me hubiese ido. A Agustín Álvarez Costa, por las interminables charlas, aunque siempre esté ocupado haciendo algún deporte.

A Claudia, que a pesar de la distancia siempre está ahí.

A Román, por ser un gran amigo y un ejemplo de perseverancia. Por los intensos meses de convivencia. Por ayudarme siempre en todo.

A la Mari, la Vane y la familia Aranda, por ser como una segunda familia allá en Santiago.

A Ana Palazzesi por la ayuda constante, a Vini y a Cristina Guillén.

A mi familia por estar siempre y darme todo. Por el apoyo y la paciencia. A mis papás por enseñarme el valor del estudio y el trabajo. A mis hermanos por su ayuda. A Leo por venir a alegrar a la familia. A mi abuela. A Moni y a Panchi por alegrarme cuando vuelvo a casa.

A Luis por estar ahí siempre y tenerme tanta paciencia. Por los viajes que pasaron y los que se vienen. Por el compañerismo y contención.

*Sashay Away*



A Vicky, Vir y Johi  
por su amistad



A mis abuelos



Parte de los resultados presentados en este trabajo dieron origen a la siguiente publicación:

Genes of Different Catabolic Pathways Are Coordinately Regulated by Dal81 in *Saccharomyces cerevisiae*. Marcos Palavecino, Susana Correa García and Mariana Bermúdez Moretti. Journal of Amino Acids. 2015:484702.





## Abreviaturas

AcLi: Acetato de litio  
BAAs: Aminoácidos ramificados  
BSA: Seroalbúmina bovina  
ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina  
ClonNat: Nourseotricina  
DNAsa: Enzima que degrada ácido desoxirribonucleico  
dNTP: Desoxirribonucleotido trifosfato  
EDTA: Etilendiaminotetraacético  
G418: Geneticina  
GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
HA: Hemoaglutinina  
*lacZ*: Gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa  
Leu: Leucina  
NCM: Metabolismo central del nitrógeno  
NCR: Represión catabólica por nitrógeno  
ONPG: Otro-nitrofenilgalactopiranosido  
PBS: *Buffer* fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PEG: Polietilenglicol  
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
RNAsa: Enzima que degrada ácido ribonucleico  
RT-qPCR: Retrotranscripción seguido de PCR cuantitativa  
SDS: Duodecil sulfato de sodio  
SPS: Complejo sensor de aminoácidos extracelulares  
Taq: *Thermus aquaticus*  
TBS: Tris *buffer* salino  
TEMED: N,N,N-tetrametilendiamina  
TOR: *Targets of rapamycin*  
UAS: Secuencia activadora ubicada rio arriba de la TATA *box*  
YNB: *Yeast nitrogen base*  
 $\alpha$ -IPM:  $\alpha$ - alfa isopropilmalato



## Índice

<b>Introducción</b> .....	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	3
2. El metabolismo del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i> .....	4
2.1 Represión catabólica por nitrógeno.....	5
2.2 La vía TOR.....	8
3. Sensado de aminoácidos extracelulares.....	9
4. Fuentes de nitrógeno pobres.....	13
4.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico.....	13
4.2 Aminoácidos ramificados.....	16
4.3 Alantoína.....	19
5. Factores de transcripción.....	21
<b>Objetivos</b> .....	25
<b>Materiales y métodos</b> .....	29
1. Cepas y medios de cultivo.....	31
1.1 Levaduras.....	31
1.2 Bacterias.....	33
2. Plásmidos.....	33
2.1 Construcción de plásmidos.....	34
2.1.1 Extracción de ADN genómico.....	34
2.1.2 Obtención de fragmentos de ADN a clonar.....	35
2.1.3 Visualización y purificación de los fragmentos de PCR.....	35
2.1.4 Extracción y purificación de plásmidos.....	35
2.1.5 Reacciones de restricción.....	35
2.1.6 Reacciones de ligación.....	36
2.1.7 Preparación de bacterias competentes.....	36
2.1.8 Transformación de bacterias.....	36

2.1.9 <i>Screening</i> de colonias.....	36
2.1.10 Extracción y purificación de plásmidos .....	37
3. Transformación de levaduras con ADN plasmídico .....	38
4. Construcción de cepas mutantes de levaduras.....	39
4.1 Obtención de fragmentos de ADN.....	39
4.2 Precipitación de los fragmentos de PCR.....	39
4.3 Transformación de levaduras.....	39
4.4 <i>Screening</i> de colonias.....	40
4.5 Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre.....	40
4.6 Cepas.....	40
5. Ensayos de expresión.....	43
5.1 Ensayo del gen reportero <i>lacZ</i> .....	43
5.2 Medición de los niveles de ARN mensajero.....	44
5.2.1 Extracción de ARN.....	44
5.2.2 Retrotranscripción (generación de ADNc).....	45
5.2.3 PCR en tiempo real.....	45
6. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).....	47
6.1 Fijación.....	47
6.2 Ruptura celular.....	47
6.3 Sonicado.....	48
6.4 Inmunoprecipitación.....	48
7. Extracción de proteínas y <i>Western blot</i> .....	49
8. Co-inmunoprecipitación.....	50
<b>Resultados</b> .....	53
Capítulo 1.....	55
Discusión.....	70
Capítulo 2.....	75

---

Discusión.....	87
Capítulo 3.....	89
Discusión.....	101
Capítulo 4.....	103
Discusión.....	110
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>113</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>119</b>
Medios de cultivo.....	121
<i>Buffers</i> .....	121
Plásmidos.....	123
Análisis estadístico.....	132
<b>Bibliografía.....</b>	<b>139</b>



# **Introducción**





## 1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo unicelular eucariota, que presenta un ciclo de vida tanto haploide como diploide. Se encuentra en distintos ambientes como frutas, suelo, plantas, piel y en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente. Se multiplica por gemación y puede presentar un crecimiento pseudohifal. Es un organismo fácilmente cultivable, con un tiempo de duplicación de 2-4 horas. Presenta 16 cromosomas en el núcleo con más de 13 millones de bases y su genoma se encuentra totalmente secuenciado. Aproximadamente el 60% de sus genes presenta homología con ortólogos de humanos (Botstein, 1997) y un 25% de los genes relacionados con enfermedades humanas tiene homología con genes de levaduras (Franssens et al., 2013; Karathia et al., 2011).

La facilidad de la manipulación de las levaduras ha permitido el desarrollo de herramientas de biología molecular y genética para realizar modificaciones en el genoma, lo que ha facilitado el estudio de un gran número de procesos biológicos fundamentales como plegamiento de proteínas, ciclo celular y estabilidad genómica, sensado de nutrientes y transducción de señales, entre otros. Las modificaciones genéticas producidas de manera relativamente sencilla son altamente específicas y estables. Actualmente existen colecciones de cepas que contienen proteínas fusionadas a un epítipo (GFP, TAP, HA) o que presentan deleciones de casi todos los marcos de lectura abiertos. Además, la facilidad de su cultivo las convierten en excelentes herramientas para estudios globales o para el *screening* de compuestos de importancia farmacéutica (Botstein and Fink, 2011).

La levadura *S. cerevisiae* posee muchas características ventajosas para ser empleada en la industria. Es un microorganismo no patogénico, la eliminación de los desechos generados es fácil y además presenta buena tolerancia al bajo pH, lo que disminuye el riesgo de contaminación bacteriana (Borodina and Nielsen, 2014). *S. cerevisiae* se utiliza en la producción de alimentos como en la elaboración de panificados, en cervecería y en la industria vitivinícola. Otros usos industriales son la producción de biomasa como suplemento proteico para animales o humanos (Vieira et al., 2013) y la producción de enzimas, biocombustibles y ácidos orgánicos (Borodina and Nielsen, 2014).

El estudio del sensado de nutrientes y de los distintos caminos de transducción de señales es de gran importancia para la optimización de los procesos industriales diseñados para obtener productos de interés biotecnológico.

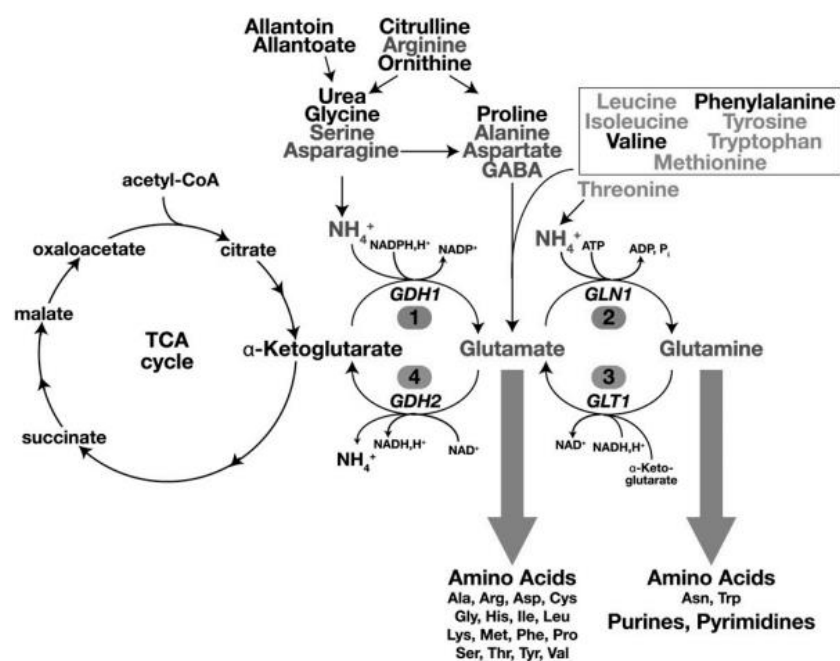
## ***2. El metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae****

Las células de levadura sienten el ambiente en el que se encuentran y, frente a alteraciones en el mismo, se activan mecanismos que actúan tanto a nivel transcripcional como traduccional que producen cambios en el metabolismo celular. Estos mecanismos se regulan a nivel global pero también existen mecanismos de regulación que permiten responder de manera más precisa a cambios en un determinado compuesto o familia de compuestos. De esta manera, las células de levadura responden a estos cambios modulando la expresión y actividad de enzimas, permeasas y factores de transcripción que darán lugar a un determinado flujo de metabolitos dentro y fuera de la célula y de las organelas intracelulares (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Estos mecanismos tienen particular importancia desde el punto de vista industrial para el mejoramiento de cepas o para el mejor aprovechamiento de los medios de cultivo con el fin de obtener un determinado metabolito de interés.

*S. cerevisiae* tiene la capacidad de usar una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno como por ejemplo amonio, urea, alantoína, aminoácidos y purinas. Para esto cuenta con proteínas capaces de sentir la disponibilidad de estos compuestos y transportarlos al interior celular. Una vez dentro de la célula, estos compuestos son catabolizados dando lugar a amonio el cual reacciona con  $\alpha$ -cetoglutarato, producto del metabolismo de la fuente de carbono del medio de crecimiento, para producir glutamato. Además, el glutamato puede reaccionar con amonio para dar lugar a la formación de glutamina (Figura 1). El 85% del nitrógeno celular se obtiene a partir del glutamato, mientras que el 15% restante proviene de la glutamina (Magasanik and Kaiser, 2002).

No todos los compuestos que *S. cerevisiae* puede usar como fuente de nitrógeno permiten la misma tasa de crecimiento. El crecimiento en una fuente rica o preferida de nitrógeno es mayor que en una fuente pobre o no preferida. Aunque la velocidad de crecimiento es una forma simple de clasificar a las fuentes de nitrógeno y la

mayoría de las cepas de levadura presentan la mayor tasa de crecimiento en presencia de una fuente rica de nitrógeno como glutamina, la diferencia en el crecimiento en presencia de otras fuentes no es tan clara, y por lo tanto se hace difícil clasificar la calidad de las fuentes de nitrógeno basándose solamente en este criterio. Es por esto que para la clasificación de fuentes ricas o pobres se emplea también el criterio basado en el hecho de que las fuentes ricas generalmente reprimen los procesos requeridos para la utilización de las fuentes pobres de nitrógeno (Cooper, 2002; Magasanik, 2005; Magasanik and Kaiser, 2002).

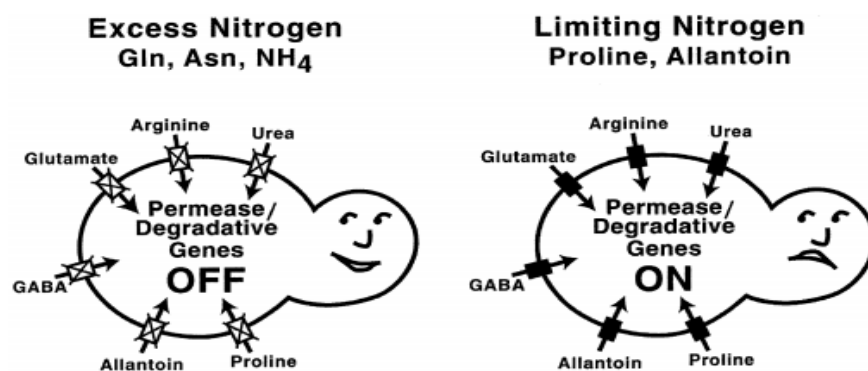


**Figura 1. Vías principales involucradas en el metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*.** Los compuestos nitrogenados se sintetizan a partir de glutamato o glutamina, productos del catabolismo de las fuentes de nitrógeno disponibles. Las reacciones 1 y 2 catalizadas por las enzimas Gdh1 (NADPH glutamato deshidrogenasa) y Gln1 (glutamina sintetasa) respectivamente, son las responsables de producir glutamato y glutamina. Las reacciones 3 y 4 están catalizadas por las enzimas Glt1 (NADPH glutamato sintasa) y Gdh2 (NAD<sup>+</sup> glutamato deshidrogenasa) (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

## 2.1 Represión catabólica por nitrógeno

El mecanismo por el cual se hace un uso selectivo de las fuentes de nitrógeno se conoce como represión catabólica por nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*). En presencia de una fuente rica como glutamina o amonio, se produce la represión de los genes involucrados en el catabolismo de fuentes pobres como GABA, urea, alantoína, prolina. En cambio, cuando la fuente rica de nitrógeno se vuelve limitante o

cuando solamente hay fuentes pobres disponibles, se expresan los genes necesarios para el transporte y catabolismo de dichas fuentes pobres (Figura 2). El mecanismo de NCR es un mecanismo global de control transcripcional que permite a las células de levadura utilizar, en primer lugar, una fuente de nitrógeno rica cuando fuentes de distinta calidad están presentes simultáneamente, de manera de obtener una mayor tasa de crecimiento. Esto tiene importancia tanto en la industria, como por ejemplo en la utilización de las distintas fuentes de nitrógeno presentes en el mosto de uva (Beltran et al., 2004; Crepin et al., 2012) así como también en la clínica, ya que la disponibilidad de nitrógeno regula procesos como el crecimiento filamentoso o la secreción de proteasas, que contribuyen a la patogenicidad de la levadura *Candida albicans* (Morschhauser, 2011).



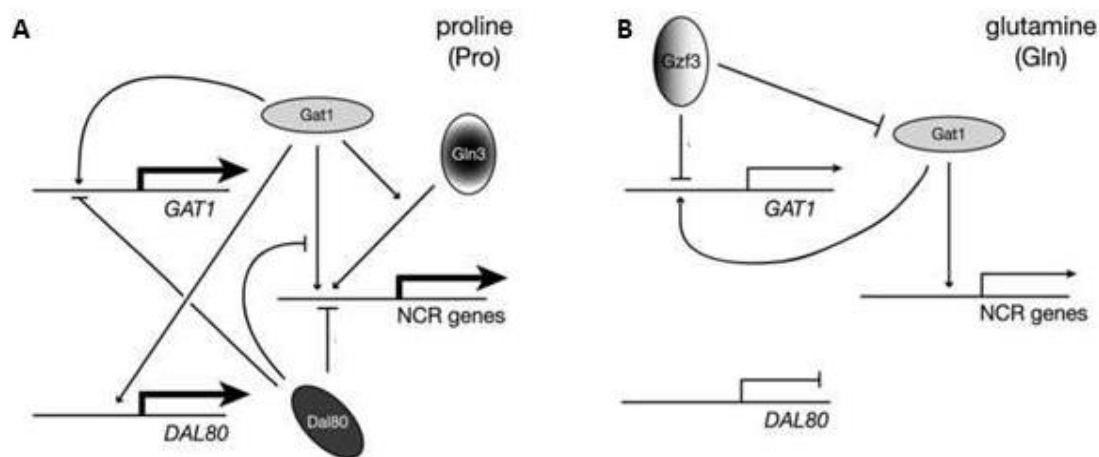
**Figura 2. Esquema del mecanismo de NCR.** En presencia de una fuente rica de nitrógeno se reprime la transcripción de genes involucrados en el transporte y catabolismo de fuentes pobres nitrógeno (glutamato, arginina, urea, GABA, alantoina, prolina), mientras que en presencia de fuentes pobres de nitrógeno solamente, se produce la expresión de estos genes (Cooper, 2002).

En el mecanismo de NCR están involucradas la proteína pre-priónica Ure2 y cuatro factores de transcripción de la familia GATA, dos activadores, Gln3 y Gat1/Nil1, y dos represores, Uga43/Dal80 y Gzf3/Deh1. A excepción de Gln3, que se expresa constitutivamente, la expresión de los genes de los factores GATA está regulada por los otros miembros de esta familia (Figura 3). Esto incluye la regulación autógena de Gat1, Uga43 y Gzf3 (Cooper, 2002; Georis et al., 2009b).

En presencia de una fuente rica de nitrógeno, Gln3 está fosforilada y se encuentra unida a Ure2 en el citoplasma (Beck and Hall, 1999; Cox et al., 2000; Cox et al., 2002), mientras que Gat1 se distribuye entre el citoplasma y el núcleo (Georis et al., 2008). Así, la expresión de los genes necesarios para el catabolismo de fuentes pobres se encuentra reprimida. Cuando en el medio de crecimiento hay una fuente

pobre de nitrógeno, Gln3 y Gat1 se defosforilan y translocan al núcleo donde se unen a las secuencias GATA presentes en sus genes blanco (Cunningham et al., 2000; Georis et al., 2009b; Scherens et al., 2006) (Figura 3A).

Por su parte, los represores transcripcionales actúan de manera diferencial, siendo Uga43 el responsable de modular la expresión de genes sensibles a NCR en presencia de fuentes pobres de nitrógeno (Cunningham and Cooper, 1991, 1993) mientras que Gzf3 actuaría principalmente en condiciones de represión (Georis et al., 2009b; Soussi-Boudekou et al., 1997) (Figuras 3A y B). Mediante este mecanismo de regulación, cuando en el medio de cultivo se encuentra presente más de una fuente de nitrógeno, sólo se expresan determinados genes.



**Figura 3. Interacción de los factores GATA en la regulación de genes sensibles a NCR.** (A) En presencia de una fuente pobre de nitrógeno (prolina) Gln3 y Gat1 interactúan con los promotores de los genes sensibles a NCR dando lugar a la expresión de los mismos. (B) Regulación de los genes sensibles a NCR por el factor de transcripción Gzf3 en presencia de una fuente rica de nitrógeno (glutamina) (Georis et al., 2009b).

El mecanismo de NCR y la represión mediada por Uga43 se dan por mecanismos diferentes y sirven a distintos propósitos fisiológicos. Desde el punto de vista del mecanismo, NCR es la ausencia de activación transcripcional y no inhibición de la transcripción. La represión mediada por Uga43 es un mecanismo de competencia por la unión a la región regulatoria de sus genes blanco, entre los factores GATA positivos y negativos. La represión por Uga43 y NCR no ocurren simultáneamente, debido a que la expresión de *UGA43* es altamente sensible a NCR, es decir que en presencia de una fuente rica de nitrógeno prácticamente no hay

Uga43. Esto tiene sentido, ya que la expresión de genes que están apagados no necesita una modulación tan fina (Cooper, 2002; Magasanik, 2005).

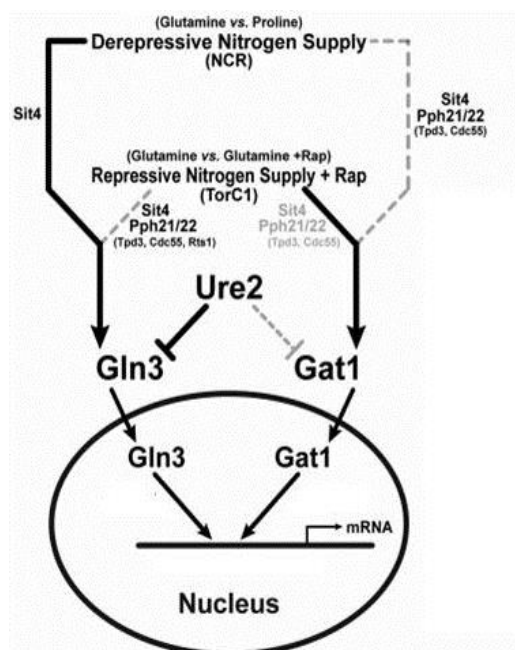
## 2.2 La vía TOR

La vía de la proteína TOR (*Target of Rapamycin*) es central en la regulación del crecimiento celular en respuesta a nutrientes (Wullschleger et al., 2006). Esta proteína es una quinasa muy conservada a lo largo de la evolución. En levaduras existen dos proteínas Tor, Tor1 y Tor2, que forman dos complejos llamados TORC1 y TORC2. TORC1 es sensible a rapamicina y participa en la regulación de la síntesis proteica y en el catabolismo de nitrógeno, mientras que TORC2 es insensible a rapamicina y participa en la división celular y otros procesos esenciales (Tate and Cooper, 2013; Zaman et al., 2008). El tratamiento con rapamicina produce un efecto similar al ayuno de nutrientes, observándose una caída en la síntesis proteica, inducción de autofagia e ingreso al estado G0. TORC1, además de regular el crecimiento frente a señales disparadas por distintos nutrientes, está involucrado en la regulación de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas (Rohde and Cardenas, 2003; Workman et al., 2016).

Una de las proteínas blanco de TORC1 es la quinasa Sch9 (Urban et al., 2007). En presencia de exceso de nutrientes, TORC1 fosforila al menos 6 residuos del extremo C-terminal de Sch9. Sch9 activa a genes que codifican proteínas ribosomales y factores necesarios para la biogénesis de ribosomas. Otra proteína blanco de TORC1 es la quinasa Ypk3; sin embargo, esta vía permanece poco caracterizada (Gonzalez et al., 2015).

En exceso de nitrógeno, TORC1 se activa y fosforila a la proteína Tap42 (*Tor associated protein*). Tap42 fosforilada forma un complejo con las fosfatasas PP2A o Sit4 y con TORC1; y de esta manera las fosfatasas se mantienen inactivas (Di Como and Arndt, 1996; Jiang and Broach, 1999; Tate and Cooper, 2013). En presencia de una fuente pobre de nitrógeno o al tratar a las células con rapamicina, se produce la disociación de TORC1 de las fosfatasas, las cuales se activan y defosforilan a Gln3 lo que produce su disociación de la proteína citoplasmática Ure2. Así, Gln3 transloca al núcleo y activa la transcripción de genes sensibles a NCR (Beck and Hall, 1999; Tate and Cooper, 2007; Tate et al., 2010). Además, el estado de fosforilación de Gln3 depende también de la quinasa Snf1 (Bertram et al., 2000; Bertram et al., 2002; Levi et al., 2012).

Cooper y col. han estudiado exhaustivamente el mecanismo de NCR y la localización subcelular de los factores de transcripción Gln3 y Gat1. Utilizando rapamicina o inhibidores de la enzima glutamina sintetasa, han demostrado que Gln3 y Gat1 tienen requerimientos de fosfatasa y de Ure2 diferentes (Figura 4) (Georis et al., 2008; Tate and Cooper, 2013; Tate et al., 2010). Por lo tanto, si bien Gln3 y Gat1 son dos factores GATA positivos, la actividad de cada uno depende de las condiciones del medio de crecimiento y la respuesta fisiológica que generan no es exactamente la misma.

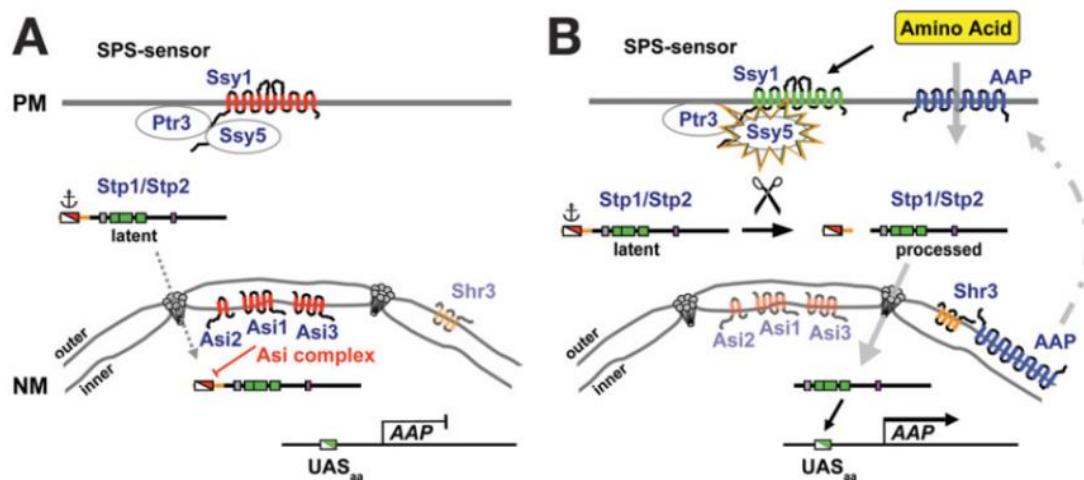


**Figura 4. Requerimiento de fosfatasa responsable de la localización subcelular de Gln3 y Gat1 en respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno disponible o rapamicina.** Las líneas negras y grises representan una respuesta fuerte o débil, respectivamente; mientras que las palabras en negro representan un requerimiento absoluto y en gris un requerimiento débil (Tate et al., 2010).

### 3. Sensado de aminoácidos extracelulares

Todos los L-aminoácidos, a excepción de lisina, histidina y cisteína, pueden servir como única fuente de nitrógeno para la mayoría de las cepas de levadura. Sin embargo, los tiempos de duplicación de cada cultivo son diferentes, ya que no todos los aminoácidos producen la misma velocidad de crecimiento (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

*S. cerevisiae* puede sentir la presencia de aminoácidos extracelulares e inducir la expresión de los genes necesarios para su incorporación y catabolismo. Para esto cuenta con un complejo proteico localizado en la membrana celular que actúa como sensor. Este sensor, llamado SPS por las proteínas que lo componen, Ssy1, Ptr3 y Ssy5 (Forsberg et al., 2001a), tiene como efectores finales a los factores de transcripción Stp1 y Stp2, los cuales en ausencia de inductor permanecen en estado latente en el citoplasma (Figura 5A). En presencia de aminoácidos extracelulares, estos factores de transcripción son clivados en su extremo N-terminal (Andreasson and Ljungdahl, 2002, 2004), luego translocan al núcleo donde se unen a secuencias llamadas UAS<sub>AA</sub> (*Upstream Activating Sequences*) presentes en los promotores de sus genes blanco (Figura 5B). Entre los genes blanco se encuentran *AGP1*, *BAP2*, *BAP3*, *TAT1*, *TAT2* (Andreasson and Ljungdahl, 2004; Didion et al., 1996; Grauslund et al., 1995; Iraqui et al., 1999b; Schmidt et al., 1994). Estos genes codifican para permeasas responsables de la incorporación de aminoácidos.



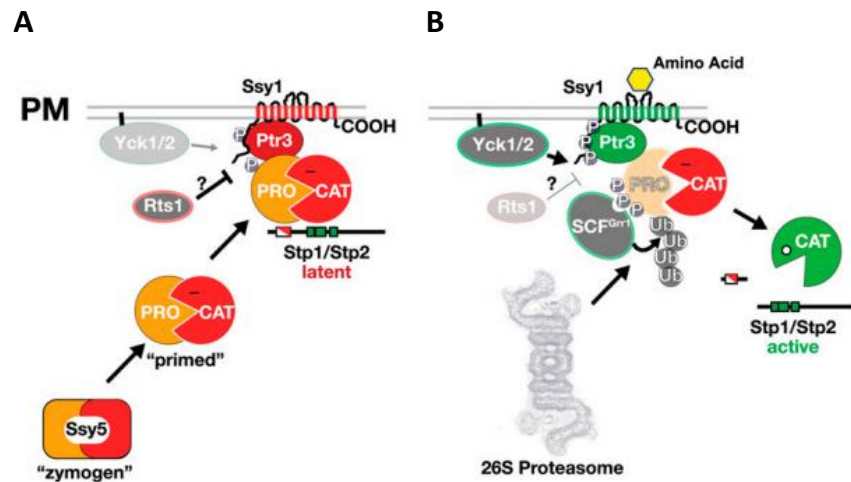
**Figura 5. Sensado de aminoácidos extracelulares por el complejo SPS. (A)** Estado inactivo del sensor SPS en ausencia de estímulo. **(B)** Activación de la vía SPS en presencia de aminoácidos extracelulares. PM membrana plasmática, AAP permeasas de aminoácidos. (Ljungdahl, 2009).

A pesar de compartir cierta homología con secuencias de permeasas de aminoácidos, la proteína Ssy1 tiene características únicas. Ssy1 actúa como sensor de los aminoácidos extracelulares, aunque es incapaz de incorporarlos al interior celular. Presenta un dominio N-terminal orientado hacia el citoplasma ausente en otros miembros de la familia de permeasas de aminoácidos (Didion et al., 1998; Iraqui et al., 1999b; Klasson et al., 1999; Wu et al., 2006).



Ssy1 es la proteína encargada de monitorear la relación entre los aminoácidos externos e internos a través de la membrana celular. Posee la capacidad de alternar entre dos conformaciones: una activa, hacia el exterior celular que desencadena la señal frente a la presencia de aminoácidos extracelulares, y otra interior, inactiva (Poulsen et al., 2005; Wu et al., 2006). De esta manera, se induce la vía SPS solamente cuando la concentración de aminoácidos extracelulares es mayor a la de los intracelulares. El extenso dominio N-terminal de Ssy1 actúa como *scaffold* para los otros dos miembros del sensor, Ptr3 y Ssy5 (Bernard and Andre, 2001b; Forsberg et al., 2001b; Liu et al., 2008).

Ssy5 se expresa como un zimógeno, que se cliva mediante un proceso denominado proteólisis activada por receptor (RAP, *R*eceptor *A*ctivado *P*roteólisis), dando un prodominio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal. El prodominio N-terminal se asocia no covalentemente al dominio catalítico formando un complejo inactivo, aunque catalíticamente competente, que interactúa con las formas no procesadas de Stp1 y Stp2 (Figura 6A). En presencia de aminoácidos extracelulares (Figura 6B), el sensor Ssy1 se estabiliza en una conformación que facilita la fosforilación del prodominio N-terminal de Ssy5 (Omnus et al., 2011; Pfirrmann et al., 2010) a través de las quinasas Yck1 e Yck2 (Andreasson et al., 2006; Liu et al., 2008). Este aumento de la fosforilación permite que actúe el complejo ubiquitina ligasa SCF<sup>Grr1</sup>, con la subsiguiente poliubiquitinación de los residuos fosforilados de Ssy5. Así, el prodominio resulta marcado para degradación por el proteasoma 26S, desencadenando el procesamiento de Stp1/Stp2 por el dominio catalítico de Ssy5 (Abdel-Sater et al., 2004a). El procesamiento de Stp1/Stp2 permite su translocación al núcleo.



**Figura 6. Regulación de la actividad de Ssy5.** (A) Conformación inactiva de Ssy5 en ausencia de aminoácidos. (B) Activación de Ssy5 por aminoácidos extracelulares y regulación de su actividad por las quinasas Yck1/2 y el complejo SCF<sup>Grr1</sup> (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

El componente menos estudiado de este sensor es la proteína Ptr3. Funciona como una proteína adaptadora transmitiendo la información recibida por Ssy1 hasta la degradación del prodominio N-terminal de Ssy5. Ptr3 posee en su extremo N-terminal un dominio pequeño pero muy conservado compuesto por aminoácidos hidrofóbicos (entre los aminoácidos 160-180) que interactúa con Ssy5 formando el complejo Ptr3-Ssy5 (Liu et al., 2008; Omnus and Ljungdahl, 2013).

Los factores de transcripción Stp1/Stp2 son los responsables de llevar al núcleo la señal generada por los aminoácidos extracelulares. Estas proteínas son sintetizadas y permanecen en estado latente en el citoplasma (Figura 5). Los aminoácidos extracelulares activan a Ssy5 (Figura 6) que produce el clivado del extremo N-terminal de Stp1/Stp2, la translocación de estos factores al núcleo y la activación de sus genes blanco (Figura 5) (Andreasson and Ljungdahl, 2004). Las proteínas del complejo Asi (Asi1, Asi2 y Asi3), localizadas en la membrana nuclear interna, constituyen un mecanismo de control. En ausencia de aminoácidos extracelulares, Stp1 y Stp2 sin clivar pueden escapar al mecanismo de retención citoplasmática mediado por Ssy5 y entrar al núcleo. El complejo Asi tiene la función de evitar que estas formas de Stp1/Stp2 actúen sobre sus genes blanco, facilitando su salida del núcleo (Figura 5) (Boban et al., 2006; Zargari et al., 2007).

#### 4. Fuentes de nitrógeno pobres

*S. cerevisiae* puede utilizar como fuente de nitrógeno una amplia variedad de compuestos. Godard y col. encontraron que más de 500 genes se encuentran regulados por la fuente de nitrógeno (Godard et al., 2007). Además, demostraron que no hay una correlación estricta entre NCR y el tiempo de generación; por ejemplo, en presencia de aspartato o glutamato, condiciones en las cuales los genes sensibles a NCR no están reprimidos, las células presentan un rápido crecimiento.

En la Figura 7 se muestran los sistemas de transporte relacionados con el metabolismo de aminoácidos y otras fuentes nitrogenadas.

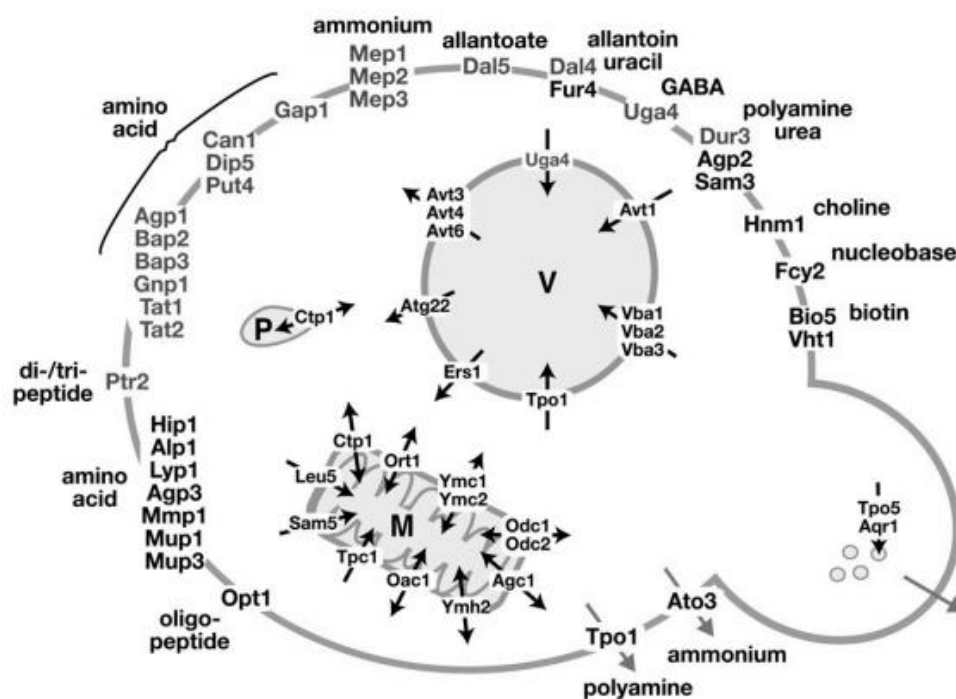


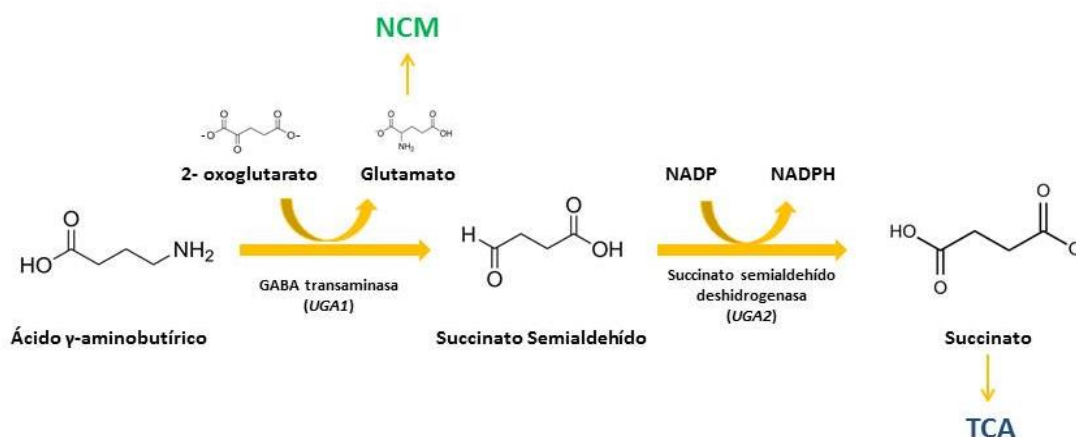
Figura 7. Sistemas de transporte importantes para el metabolismo de aminoácidos (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). M: mitocondria; V: vacuola; P: peroxisoma.

##### 4.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es un aminoácido no proteico que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. En plantas, el GABA actúa como una molécula protectora frente a distintos tipos de estrés; en animales, actúa como neurotransmisor; y en microorganismos está involucrado en la esporulación, resistencia a ambientes ácidos, etc. (Dhakal et al., 2012).

El GABA es utilizado por *S. cerevisiae* como fuente de nitrógeno (Ramos et al., 1985) y su esqueleto carbonado entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos como succinato. El transporte del GABA al interior celular está mediado por tres permeasas: Gap1 (permeasa general de aminoácidos), Put4 (permeasa específica de prolina) y Uga4 (permeasa específica del GABA). Esta última se encuentra tanto en la membrana plasmática como en la vacuola (Andre et al., 1993; Grenson, 1987b; Uemura et al., 2004). Uga4 también está involucrada en la incorporación del ácido  $\delta$ -aminolevulínico, precursor de la síntesis de porfirinas y relacionado estructuralmente con el GABA (Bermudez Moretti et al., 1995; Correa Garcia et al., 1997), y en la incorporación de putrescina (Uemura et al., 2004).

Una vez dentro de la célula, el GABA reacciona con el 2-oxoglutarato (Figura 8). Esta reacción es catalizada por la enzima GABA transaminasa, codificada por el gen *UGA1*. Así se forman glutamato, que ingresa al metabolismo central del nitrógeno, y succinato semialdehído (SSA) (Andre and Jauniaux, 1990b; Ramos et al., 1985). El SSA es tóxico para la célula y es oxidado rápidamente a succinato por la enzima succinato semialdehído deshidrogenasa (SSDH), producto del gen *UGA2* (Ramos et al., 1985). Los genes *UGA4*, *UGA1* y *UGA2* involucrados en la incorporación y el catabolismo del GABA conforman el regulón *UGA*.



**Figura 8. Esquema de las reacciones involucradas en el catabolismo del GABA.** NCM, metabolismo central del nitrógeno; TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

La expresión del gen *UGA4* es inducible por su sustrato, el GABA (Cardillo et al., 2012; Cunningham and Cooper, 1993; Georis et al., 2009b; Vissers et al., 1989) y depende de la fuente de nitrógeno (es sensible a NCR), del pH, de la fuente de carbono y de la presencia de aminoácidos extracelulares a través del sensor SPS

(Andre et al., 1993; Andre et al., 1995; Bermudez Moretti et al., 2005; Cardillo et al., 2011; Coffman et al., 1997; Cunningham et al., 1996; Levi et al., 2012; Luzzani et al., 2007; Talibi et al., 1995).

La inducción por GABA de los genes del regulón *UGA* depende de los factores de transcripción Uga3 y Dal81 que actúan sobre una secuencia rica en GC. Uga3 es específico de los genes *UGA*, mientras que Dal81 es un factor pleiotrópico involucrado también en la utilización de otras fuentes pobres de nitrógeno como urea, aminoácidos ramificados y alantoína. La región regulatoria rica en GC del gen *UGA4* se conoce como elemento UAS<sub>GABA</sub> y es un palíndromo perfecto formado por la secuencia 5'-CCGCCGGCGG-3' (Idicula, 2002; Idicula et al., 2002; Talibi et al., 1995). Los promotores de los genes *UGA4* y *UGA1* presentan dos copias de la secuencia consenso 5'-SGCGGNWWT-3' (S=G o C, W=A o T y N= ningún nucleótido o G) y la transcripción se activa solamente si ambos sitios se encuentran ocupados por Uga3 (Idicula et al., 2002; Noel and Turcotte, 1998). El gen *UGA2*, en cambio, posee una sola copia de esta secuencia (Cunningham et al., 1994; Idicula, 2002) la cual es suficiente para producir su activación transcripcional (Cardillo et al., 2012).

Se ha demostrado que Uga3 y Dal81 interactúan *in vivo* con los promotores de los genes *UGA* solamente en presencia de GABA (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011; Cardillo et al., 2012), a diferencia de lo observado en ensayos *in vitro* en los cuales se detecta que Uga3 se une a los promotores de *UGA1* y *UGA4* de manera independiente del GABA (Idicula et al., 2002). Además, en ausencia de Uga3 no se detecta interacción de Dal81 con los promotores de los genes del regulón *UGA*. Esto sugiere que la interacción de Dal81 con estos promotores se realizaría a través de Uga3 (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2012). 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 de Uga3 con dicho promotor sino que también impiden la interacción del factor Dal81 (Cardillo et al., 2012). Así, Uga3 actuaría como puente entre el ADN y Dal81 (Cardillo et al., 2012)

Otro factor de transcripción que interviene en la regulación transcripcional de los genes del *UGA* es Leu3. Este factor de transcripción controla la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de los aminoácidos ramificados (Friden and Schimmel, 1988a; Zhou and Kohlhaw, 1990) y también regula la expresión de los genes *BAP2* y *GDH1*, responsables del transporte de aminoácidos ramificados y de la utilización del

amonio, respectivamente (Hu et al., 1995; Nielsen et al., 2001). Leu3 actúa como represor sobre el gen *UGA4* (Cardillo et al., 2010); sin embargo, a pesar de que la secuencia UAS<sub>GABA</sub> contiene un sitio putativo de unión para Leu3, no se ha detectado interacción con el promotor, por lo que se postula que este gen interactúa de manera indirecta (Cardillo et al., 2010). Por otra parte, Leu3 regula negativamente a *UGA1* pero no modifica la expresión de *UGA2*. Cabe aclarar que en la región regulatoria de *UGA2* no hay sitio consenso para la unión de Leu3 (Cardillo et al., 2011).

Los genes del regulón *UGA* presentan secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción GATA, por lo que son sensibles a NCR. El promotor de *UGA4* presenta un sitio denominado UAS<sub>GATA</sub>, formado por nueve repeticiones de la secuencia 5'-GATA(A/T)-3', ubicado 28 pares de bases río arriba del elemento UAS<sub>GABA</sub>, y también posee otros sitios de reconocimiento para los factores GATA ubicados río abajo de este elemento (Andre et al., 1995). El promotor de *UGA1* contiene siete repeticiones, mientras que *UGA2* posee solo dos (Coleman et al., 2001; Cunningham et al., 1994). Cardillo y col. demostraron que Gln3 interactúa con los tres promotores *UGA*, mientras que Uga43 solo se une a los promotores de *UGA4* y *UGA1*. La interacción de Uga43 con estos promotores depende de Uga3 y Dal81 (Cardillo et al., 2012). Estos resultados constituyen una de las primeras evidencias que apoyan la hipótesis de la acción concertada entre factores de transcripción que actúan sobre distintos elementos UAS.

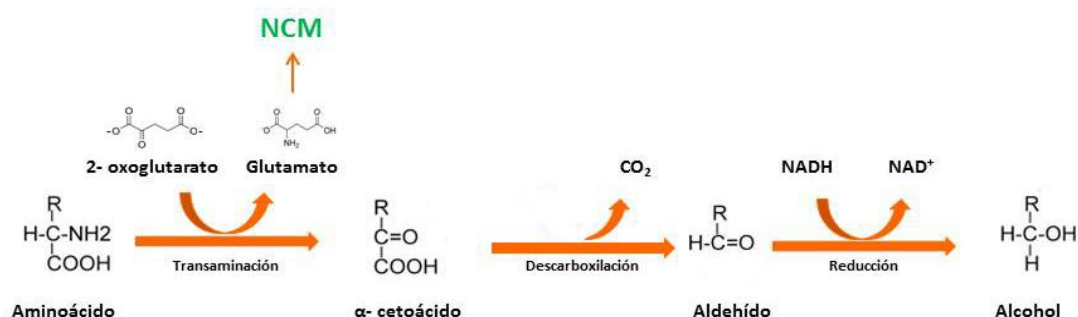
Además, los genes *UGA* están regulados negativamente por la presencia de aminoácidos extracelulares a través de la vía del sensor de aminoácidos SPS (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011). Al pre-incubar las células con leucina, un fuerte inductor de esta vía (Forsberg et al., 2001a), se produce la inhibición de la inducción por GABA de *UGA4*. Se demostró que la interacción de Dal81 así como la de Uga3 con el promotor de este gen disminuye en presencia de leucina, mientras que en ausencia de Ssy1, una de las proteínas componentes del sensor, esta disminución no se produce (Cardillo et al., 2010). También *UGA1* y *UGA2* se encuentran regulados por la vía de sensado SPS (Cardillo et al., 2011).

#### **4.2 Aminoácidos ramificados**

Los aminoácidos ramificados (BAAs, *Branched Amino Acids*), L-valina, L-leucina y L-isoleucina, se emplean como aditivos alimentarios, precursores en la síntesis de herbicidas y en cosmética (Park and Lee, 2010). Su metabolismo tiene importancia a

nivel industrial, ya que estos aminoácidos están involucrados en la biosíntesis de compuestos aromáticos, importantes en la producción de alimentos fermentados por levaduras, como vinos y cervezas (Krogerus and Gibson, 2013). Además de ser aminoácidos esenciales para el hombre, presentan efectos beneficiosos en la regulación del peso corporal y en la síntesis proteica. En individuos obesos están asociados con la resistencia a insulina y diabetes tipo II (Lynch and Adams, 2014).

*S. cerevisiae* puede utilizar a los BAAs como fuentes de nitrógeno. El transporte de estos aminoácidos desde el medio extracelular está mediado principalmente por las permeasas Gap1, Bap2, Bap3 y Agp1 (Didion et al., 1996). Una vez dentro de la célula, los BAAs reaccionan con el 2-oxoglutarato por acción de aminotransferasas. Así se producen glutamato, que ingresa al metabolismo central del nitrógeno, y el correspondiente  $\alpha$ -cetoácido, que es descarboxilado dando un aldehído que se reducirá para dar un alcohol o un éster (Figura 9). Estos últimos compuestos son algunos de los responsables de las características organolépticas de productos como vinos o cervezas (Dickinson, 2000; Hazelwood et al., 2008).



**Figura 9. Esquema de las reacciones involucradas en el catabolismo de aminoácidos ramificados.** NCM, metabolismo central del nitrógeno.

La permeasa de aminoácidos ramificados Bap2 contiene 12 dominios transmembrana y un peso molecular de 68 KDa, y presenta un 68% de homología con Gap1, una permeasa general de aminoácidos (Grauslund et al., 1995). Su expresión es altamente inducible por la presencia de aminoácidos ramificados, especialmente leucina, y depende de las proteínas que componen el sensor de aminoácidos SPS (Didion et al., 1996) y de los factores de transcripción de Stp1 y Stp2 que actúan río abajo en la vía SPS (Jorgensen et al., 1997; Nielsen et al., 2001). Se ha demostrado que ambos factores de transcripción pueden unirse *in vivo* e *in vitro* entre las bases -590 a -526 con respecto al codón de iniciación ATG de *BAP2* y que esta región contiene un

elemento PuCGGC-N<sub>3</sub>-PuCGGC similar al UAS<sub>AA</sub> identificado en *BAP3* (GCCGPy-N4-PuCGGC) (De Boer et al., 1998; Nielsen et al., 2001). En la región promotora de *BAP2* también se encuentra un sitio consenso de unión para el factor de transcripción Leu3, 5'-CGGAACCGG-3', ubicado entre las bases -385 hasta -377 respecto del codón de iniciación ATG (Didion et al., 1996; Nielsen et al., 2001). La presencia de Leu3 es indispensable para que se produzcan los máximos niveles de inducción de *BAP2* (Nielsen et al., 2001). Bernard y André, también demostraron que la expresión de *BAP2* depende de la presencia del factor de transcripción pleiotrópico Dal81 (Bernard and Andre, 2001a). Se ha descrito que la permeasa Bap2 no está sujeta a NCR, siendo la responsable de incorporar aminoácidos presentes en el medio extracelular en presencia de una fuente rica de nitrógeno (De Boer et al., 1998; de Boer et al., 2000; Didion et al., 1996; Nielsen et al., 2001). Sin embargo, Forsberg y col. no detectaron niveles de ARNm de *BAP2* en células crecidas en amonio como fuente de nitrógeno (Forsberg et al., 2001a).

El gen *BAP3*, parálogo de *BAP2*, también está involucrado en el transporte de BAAs y es inducible por leucina, entre otros muchos aminoácidos (De Boer et al., 1998; Didion et al., 1998). La expresión de *BAP3* depende de los factores de transcripción Stp1 y Stp2 (de Boer et al., 2000). *BAP3* posee en su región regulatoria un elemento UAS<sub>AA</sub> localizado entre las bases -417 y -397 sobre el cual actúan Stp1/Stp2. Por otra parte, la inducción de *BAP3* por leucina no depende del factor de transcripción Leu3, sin embargo se postula que esta proteína actúa como un represor en ausencia de inductor (De Boer et al., 1998).

La permeasa Agp1 es una permeasa de baja afinidad, transportadora de un amplio rango de sustratos. Está involucrada en el transporte de asparagina, glutamina y otros aminoácidos con excepción de la prolina. Su expresión está sujeta a NCR (Schreve et al., 1998), está regulada por el sensor SPS y depende de la presencia de los factores de transcripción Stp1 y Dal81 pero no Stp2 (Forsberg et al., 2001a; Iraqui et al., 1999b; Wielemans et al., 2010). Stp1 y Dal81 actuarían sobre una región de 21 pares de bases similar al UAS<sub>AA</sub> de los promotores de *BAP2* y *BAP3* (Abdel-Sater et al., 2004b; Wielemans et al., 2010) y la interacción de Stp1 con el promotor *AGP1* parece depender de Dal81 (Boban and Ljungdahl, 2007). El UAS<sub>AA</sub> en la región regulatoria de *AGP1* consiste en dos copias invertidas 5'-CGGC-3', separadas por seis nucleótidos (Abdel-Sater et al., 2004b). Además, el promotor de *AGP1* posee sitios 5'-GATA-3'



donde podrían interactuar los factores de transcripción de la familia GATA (Abdel-Sater et al., 2004b).

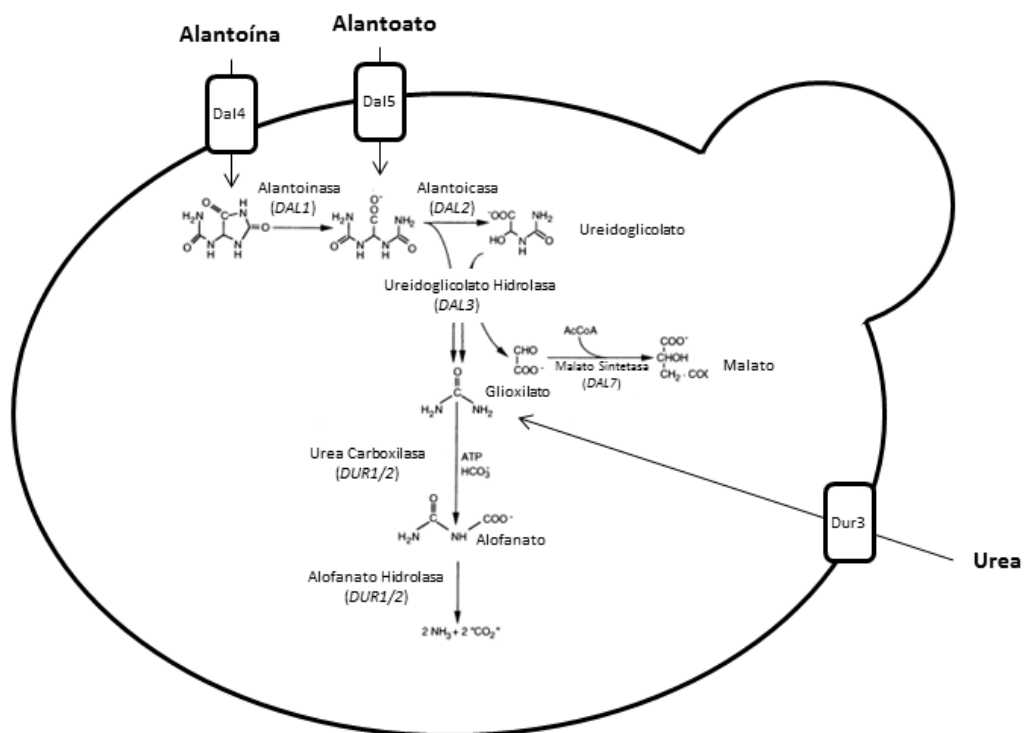
### 4.3. Alantoína

La alantoína (2,5-dioxo-4-imidazolidinyl urea) es un intermediario del catabolismo de las purinas. Se encuentra presente en el ambiente y también en la vacuola de las levaduras en concentraciones de hasta 1 mM. Este compuesto funciona como molécula de reserva, ya que posee una alta relación nitrógeno/carbono. La alantoína intracelular no es utilizada si en el medio de crecimiento de las levaduras se encuentra presente otra fuente de nitrógeno que dé lugar a una mayor tasa de crecimiento; sin embargo, si la cantidad o calidad de la fuente de nitrógeno disminuye, esta reserva de alantoína es utilizada por las células (Cooper, 1996).

Alantoína y alantoato son transportados al interior celular a través de permeasas codificadas por los genes *DAL4* y *DAL5*, respectivamente (Cooper, 1996), mientras que la urea, además de ser un producto de la degradación de estos ureídos, puede ingresar a la célula a través de la permeasa *DUR3*, y de esta manera se acopla al catabolismo de la alantoína generando amonio (Figura 10). En la conversión de alantoína y alantoato (otro producto de la degradación de los compuestos ureídos) a amonio participan las enzimas productos de los genes *DAL1* (alantoinasa), *DAL2* (alantoicasa) y *DAL3* (ureidoglicolato hidrolasa) (Yoo et al., 1985). Por acción de estas enzimas se genera urea, que es degradada a amonio en dos pasos, por acción de la enzima urea amidoliasa. Esta enzima multimérica codificada por el gen *DUR1/2* presenta actividad de urea carboxilasa y de alofanato hidrolasa (Cooper et al., 1980). Los genes para el catabolismo de la alantoína forman uno de los grandes *clusters* de genes en *S. cerevisiae* (Naseeb and Delneri, 2012), que consiste en seis genes adyacentes. Todos los genes involucrados en esta vía están regulados por el mecanismo de NCR y, a excepción de *DAL3* y *DAL5* que son de expresión constitutiva, responden a la presencia de alantoína, alantoato o su análogo no metabolizable, oxalurato.

A partir del ureidoglicolato, intermediario de la degradación de alantoína y alantoato, se producen urea y glioxilato (Figura 10). Este último, al tener un grupo aldehído, es muy reactivo y tóxico para la célula, por lo que es convertido en malato por condensación con acetil-CoA gracias a la actividad del producto del gen *DAL7*, la enzima malato sintasa. El malato entra en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. La

formación de malato es un paso clave en la detoxificación de la célula; y se ha demostrado que la delección de *DAL7* produce una tasa mucho menor de crecimiento en presencia de alantoína como única fuente de nitrógeno (Hartig et al., 1992). Por otra parte, la permeasa Dur3 está involucrada en el transporte de urea y poliaminas (ElBerry et al., 1993; Klebl et al., 2003; Uemura et al., 2007). Al igual que los genes *DAL*, la expresión de *DUR3* es sensible a NCR e inducible por oxalurato (ElBerry et al., 1993).



**Figura 10. Esquema de la vía del catabolismo de la alantoína.** Adaptado de Cooper 1996 (Cooper, 1996).

La inducción de la vía del catabolismo de la alantoína se produce rápidamente luego de la incubación de las células con alantoína u oxalurato. La actividad enzimática comienza dentro de los 3-4 minutos y es por esto que, si no hay alguna fuente nitrogenada mejor, las células de levadura pueden rápidamente hacer uso de los intermediarios de la degradación de las purinas que se encuentran en el ambiente (Cooper, 1996).

La expresión de los genes involucrados en el catabolismo de la alantoína está mediada por la acción de los factores de transcripción Gln3, Gat1, Dal82, Dal81 y Uga43. En los promotores de estos genes se encuentran elementos regulatorios  $UAS_{NTR}$ , donde interactúan Gln3 y Gat1 (Coffman et al., 1996), la secuencia

URS<sub>GATA</sub>, donde interactúa Uga43 (Cunningham and Cooper, 1993) y la secuencia UAS<sub>ALL</sub>, que es el elemento de respuesta a inductor, sobre el cual interactúan las proteínas Dal81 y Dal82 (Dorrington and Cooper, 1993). El elemento UAS<sub>ALL</sub> es un dodecanucleótido 5'-GAAAATTGCGTT-3' presente en cada gen inducible del catabolismo de la alantoína (van Vuuren et al., 1991). La delección de Gln3 impide la expresión de todos los genes de esta vía (Cooper et al., 1990; Daugherty et al., 1993); mientras que mutaciones en los genes *DAL81* y *DAL82* producen una pérdida en la respuesta a inductor, por lo que la expresión de los genes *DAL* y *DUR* es muy baja, aún cuando el inductor está presente (Cooper, 1996).

## 5. Factores de transcripción

Las proteínas capaces de coordinar al zinc, también llamadas proteínas con dedos de zinc, se unen al ADN y actúan como factores de transcripción regulando una variedad de procesos, como por ejemplo metabolismo de aminoácidos, respiración, gluconeogénesis, regulación del ciclo celular, remodelado de la cromatina, entre otros, que están involucrados en la supervivencia, proliferación y diversidad en un determinado nicho ecológico (Shelest, 2008; Todd et al., 2014).

La interacción de estas proteínas con el zinc se produce a través de residuos cisteína o histidina. Al coordinar al zinc, la proteína adquiere la estructura necesaria para interactuar con el ADN. Estructuralmente, el motivo de dedos de zinc consiste en una  $\alpha$ -hélice y un par de láminas  $\beta$  antiparalelas (Wolfe et al., 2000). *S. cerevisiae* presenta más de 50 proteínas con dedos de zinc y se las puede clasificar en tres clases según el motivo de zinc que presenten (MacPherson et al., 2006).

La clase I comprende las proteínas del tipo Cys2His2 (C2H2), cuya secuencia consenso de aminoácidos es Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-X<sub>12</sub>-His-X<sub>3-5</sub>-His. Estos factores de transcripción se unen al ADN como monómeros y presentan dos o más unidades repetitivas de dedos de zinc. Se encuentran en humanos, en *Xenopus* y levaduras (Laity et al., 2001). Los factores de transcripción homólogos Stp1/2 (specific tRNA processing) son dos miembros de esta familia. Se identificaron inicialmente como facilitadores del procesamiento de ARNt en medios que contenían aminoácidos (Wang and Hopper, 1988), y como se mencionó anteriormente, son los efectores finales de la señal disparada por el sensor SPS en presencia de aminoácidos extracelulares. Presentan tres dominios putativos de dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, que en el caso de Stp1 se

encuentran comprendidos entre los aminoácidos 160-170, 188-228 y 240-270 (Abdel-Sater et al., 2004b; De Boer et al., 1998; Wang et al., 1992).

La clase II de proteínas con dedos de zinc está formada por proteínas que presentan un dominio Cys<sub>4</sub> (C4), capaz de unirse a sus secuencias blanco como homodímeros o heterodímeros y presentan la secuencia consenso Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys. Los miembros de esta familia se encuentran tanto en hongos como en plantas y animales (MacPherson et al., 2006). Los homodímeros reconocen repeticiones invertidas en sus secuencias blanco, mientras que los heterodímeros reconocen repeticiones directas. Dentro de esta familia se encuentran los miembros de la familia GATA. Estos últimos son capaces de reconocer las secuencias 5'-GATA(A/G)-3' presentes en los promotores de sus genes blanco. Los factores GATA de *S. cerevisiae* Gln3, Gat1, Uga43 y Gzf3 presentan el dominio Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (Coffman et al., 1996; Soussi-Boudekou et al., 1997; Stanbrough et al., 1995).

Los miembros de proteínas con dedos de zinc de la clase III son exclusivamente factores de transcripción de hongos. Contienen un dominio de unión al ADN formado por seis residuos de cisteína unidos a dos átomos de zinc, por lo que también se los conoce como proteínas con *clusters* binucleados de zinc Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> (Zn<sub>2</sub>C<sub>6</sub>) (MacPherson et al., 2006). Tienen la particularidad de unir dos átomos de zinc a través de un solo dominio de dedos de zinc y de poder actuar como monómeros, homodímeros o heterodímeros. Con algunas excepciones, el dominio de unión al ADN rico en cisteínas se localiza en el extremo N-terminal. Estas proteínas reconocen secuencias CGG, las cuales pueden estar repetidas y orientadas de manera simétrica o asimétrica. Además, la orientación y el espaciamiento entre estos tripletes son los responsables de la especificidad (Mamane et al., 1998). El miembro más estudiado de la clase III es el factor de transcripción Gal4. Dentro de esta familia también se encuentran los factores de transcripción Uga3, Dal81 y Leu3.

La proteína Dal81 es un factor de transcripción pleiotrópico involucrado en el catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno como urea, alantoína, GABA y leucina. Dal81 actúa en forma conjunta con otro factor de transcripción específico de inductor, tal como Stp1 (Abdel-Sater et al., 2004b; Boban and Ljungdahl, 2007; Iraqui et al., 1999b), Uga3 (Cardillo et al., 2010; Coornaert et al., 1991) o Dal82 (Bricmont et al., 1991; Scott et al., 2000).

Además del dominio de dedos de zinc de tipo C<sub>6</sub> (Zn(II)<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>) (residuos 150-179), Dal81 presenta dos motivos de poliglutamina (residuos 73 a 94 y 227 a 237). Deleciones en el dominio Zn(II)<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub> de Dal81 no afectan su función en la activación de los genes *DUR1/2*, medida indirectamente a través de la actividad de la enzima que codifican, la urea amidoliasa (Bricmont et al., 1991). El dominio de unión al ADN de Dal81 tampoco es necesario para que este factor actúe en el proceso de inducción de los genes *UGA* (Cardillo et al., 2012). Si el dominio putativo de unión al ADN no es necesario para su función, es probable entonces que dicho factor interactúe con los promotores de los genes que regula a través de otro factor. Para los genes *UGA*, Uga3 actuaría como un puente entre Dal81 y el ADN (Cardillo et al., 2012). En el caso de la inducción por aminoácidos del gen *AGP1*, se propuso que el factor Dal81 actuaría a través de la misma región en la cual interactúa Stp1, sugiriendo que Dal81 podría interactuar con el promotor *AGP1* a través de Stp1 (Boban and Ljungdahl, 2007). Por otra parte, por medio de ensayos de doble híbrido, se ha demostrado interacción entre los factores de transcripción Dal82 y Dal81, responsables de la inducción de los genes *DUR* y *DAL*, y se ha sugerido que Dal82 sería el puente entre Dal81 y el ADN (Scott et al., 2000). Analizando la función de los otros dominios de Dal81, se observó que el dominio de poliglutamina (posición 73 a 94) es esencial para la inducción por alofanato de la enzima urea amidoliasa (Bricmont et al., 1991) y también es requerido para la inducción por GABA del gen *UGA4* (Cardillo et al., 2012). Todas estas evidencias indican que Dal81 tiene un rol central en la activación de distintas vías de utilización de fuentes pobres de nitrógeno. Por esto, Dal81 es un buen candidato a ser responsable de que las distintas vías no se activen simultáneamente cuando varias de estas fuentes de nitrógeno pobres se encuentran disponibles, sino que lo hagan en un determinado orden. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que llevan a que Dal81 active la transcripción de los genes de una determinada vía y no los genes de otra, cuando se encuentran presentes los inductores de ambas vías en el medio de crecimiento.

La proteína Uga3 está involucrada en la regulación transcripcional de los genes responsables del catabolismo del GABA, *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*, a través de secuencias que contienen tripletes CGG (Andre, 1990; Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011; Vissers et al., 1990). El dominio de dedos de zinc se encuentra entre los residuos 17-44 y mutaciones en este dominio resultan en una pérdida de su actividad (Talibi et al., 1995). La señal de localización nuclear está entre los residuos 55-62 y

contiene un dominio ácido en el extremo C-terminal presente en otros dominios de activación de otras proteínas con *clusters* de zinc (Andre, 1990).

El factor de transcripción Leu3 es un regulador transcripcional global (Boer et al., 2005; Tang et al., 2006), si bien fue descrito inicialmente como un factor de transcripción esencial en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Friden and Schimmel, 1988a). Leu3 reconoce las repeticiones CGG evertidas con un espaciamiento de 4 pares de bases 5'-CCGGN<sub>4</sub>CCGG-3' (Friden and Schimmel, 1988b; Hellauer et al., 1996). Esta proteína puede actuar como un activador o como un represor transcripcional según los niveles del intermediario  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM). Cuando los niveles de  $\alpha$ -IPM son elevados, Leu3 actúa como un activador transcripcional, y cuando los niveles disminuyen, actúa como un represor (Kohlhaw, 2003). La modulación de la actividad de Leu3 frente a los niveles de  $\alpha$ -IPM ha permitido usar este sistema como un sistema de expresión altamente específico para inducir la transcripción de genes en pre-adipocitos y fibroblastos de ratón (Guo and Kohlhaw, 1996; Poulou et al., 2010)

# Objetivos





El **objetivo general** de este trabajo de tesis fue estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de genes que codifican para permeasas de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*. Los genes estudiados en esta tesis están regulados por al menos dos mecanismos complementarios: uno dependiente de inductor y el otro dependiente de la calidad de la fuente de nitrógeno.

Como **objetivos específicos** nos planteamos:

1- Estudiar la participación de los factores GATA en la regulación transcripcional de *UGA4*, *AGP1*, *BAP2* y *BAP3*.

2- Estudiar la participación de Uga3, Dal81, Stp1/2 y Leu3 en la regulación de *UGA4*, *AGP1*, *BAP2* y *BAP3*.

3- Evaluar la relación entre los factores GATA y los factores Uga3, Dal81 y Stp1 en la regulación transcripcional de *UGA4*, *AGP1* y *BAP2*.

4- Analizar la relación entre Leu3 y los factores GATA en la regulación de *UGA4*, *AGP1*, *BAP2* y *BAP3*.

5- Analizar el mecanismo de acción concertada entre los factores Uga43 y Leu3, en la regulación de *UGA4*, *AGP1* y *BAP2*.

6- Analizar la participación de Dal81 en la activación jerarquizada de las vías involucradas en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno.



# **Materialles y Métodos**



## 1. Cepas y medios de cultivo

### 1.1 Levaduras

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

**Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas.**

Cepa	Genotipo	Parental	Primers	Referencia
$\Sigma$ 1278b	<i>Mat<math>\alpha</math></i>	-	-	(Bechet et al., 1970)
23344c	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3</i>	-	-	(Grenson, 1987a)
26790a	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 uga3<math>\Delta</math></i>	-	-	(Talibi et al., 1995)
KW18	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 stp1<math>\Delta</math></i>	-	-	(Wielemans et al., 2010)
KW21	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 stp2<math>\Delta</math></i>	-	-	(Wielemans et al., 2010)
KW23	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 stp1<math>\Delta</math> stp2<math>\Delta</math></i>	-	-	(Wielemans et al., 2010)
30505b	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 gln3<math>\Delta</math></i>	23344c	-	(Andre, 1990)
32164b	<i>Mat<math>\alpha</math> Mat<math>\alpha</math> ura3 gat1<math>\Delta</math></i>	23344c	-	Laboratorio B. André
34411c	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 gln3<math>\Delta</math> gat1<math>\Delta</math></i>	23344c	-	Laboratorio B. André
30078c	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 uga43<math>\Delta</math></i>	23344c	-	(Coornaert et al., 1992)
SBS10	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 gzf3<math>\Delta</math></i>	23344c	-	(Soussi-Boudekou et al., 1997)
50000b	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 uga43<math>\Delta</math> gzf3<math>\Delta</math></i>	23344c	-	(Soussi-Boudekou et al., 1997)
FA050	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 dal81<math>\Delta</math>::kanMX2</i>	-	-	(Abdel-Sater et al., 2004b)
SBCY01	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 leu3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	23344c	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY02	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 6HA-LEU3</i>	23344c	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY10	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 6HA-DAL81</i>	23344c	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY13	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 6HA-UGA3</i>	23344c	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY17	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 uga35<math>\Delta</math>::natMX4</i>	FA050	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY20	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 dal81<math>\Delta</math>::natMX4 leu3<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	SBCY17	-	(Cardillo et al., 2010)
SBCY41	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 UGA43-3HA-kanMX6</i>	23344c	-	(Cardillo et al., 2012)
TOY01	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 tor1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	23344c	-	(Levi et al., 2012)
CELY01	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 snf1<math>\Delta</math>::KanMX4</i>	23344c	-	(Levi et al., 2012)
CELY02	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 tor1<math>\Delta</math>:: natMX4 snf1<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	CELY01	-	(Levi et al., 2012)
CRY01	<i>Mat<math>\alpha</math> ura3 sch9<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	23344c	-	Tesis Lic. Cristian Ríos

<b>DEBY01</b>	<i>Matα ura3 STP1-3HA-kanMX6</i>	23344c	-	Tesis Lic. Darío Balcázar
<b>DEBY02</b>	<i>Matα ura3 dal81Δ::nat STP1-3HA-kanMX</i>	SBCY17	-	Tesis Lic. Darío Balcázar
<b>MPY01</b>	<i>Matα ura3 snf1Δ::natMX4</i>	CELY01	F/R-ME	Este trabajo
<b>MPY07</b>	<i>Matα ura3 6HA-UGA3-9cMYC-DAL81</i>	SBCY13	F/R Tag-DAL81	Este trabajo
<b>MPY09</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::loxP</i>	23344c	F/R leu3-loxP	Este trabajo
<b>MPY10</b>	<i>Matα ura3 6HA-DAL81-9cMYC-UGA3</i>	SBCY10	F/R Tag-UGA3	Este trabajo
<b>MPY13</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::loxP UGA43-3HA-kanMX6</i>	MPY09	F/R UGA43-Tag	Este trabajo
<b>MPY14</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ</i>	30505b	F/R leu3	Este trabajo
<b>MPY15</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ gat1Δ</i>	34411c	F/R leu3	Este trabajo
<b>MPY16</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ</i>	30078c	F/R leu3	Este trabajo
<b>MPY17</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 gzf3Δ</i>	SBS10	F/R leu3	Este trabajo
<b>MPY18</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 gat1Δ</i>	32164b	F/R leu3	Este trabajo
<b>MPY19</b>	<i>Matα ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ gzf3Δ</i>	50000b	F/R leu3	Este trabajo

Para el mantenimiento de cepas se empleó el medio YPD (ver Apéndice), mientras que para el mantenimiento de cepas transformadas con plásmidos se empleó el medio mínimo sintético YNB (*yeast nitrogen base without amino acids*, 0,67%) con glucosa 2% como fuente de carbono.

La concentración final de los antibióticos geneticina (G418) y nourseotricina (ClonNAT) fue 200 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

Para los precultivos de las cepas deficientes en la proteína Leu3, se agregó triptofano en una concentración final de 20 µg/ml.

En los diversos experimentos se empleó medio YNB (*yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate*, 0.17%) con glucosa 2% como fuente de carbono y prolina 10 mM o amonio 10 mM como fuentes de nitrógeno pobre o rica, respectivamente. La inducción de los distintos genes se realizó incubando a las células con cada uno de los inductores ensayados durante 30 minutos (GABA, 0,1 mM; leucina, 1,3 mM; oxalurato, 0,1 mM). Se eligió prolina como fuente pobre de nitrógeno porque se ha descrito que este aminoácido no es capaz de activar al sistema sensor SPS (Iraqi et al., 1999b).

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

## 1.2 Bacterias

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para el mantenimiento y amplificación de plásmidos. Para su crecimiento se empleó el medio LB (ver Apéndice), con el agregado o no de ampicilina en una concentración de 100  $\mu$ g/ml. El medio de cultivo sólido se preparó agregando agar 2%.

## 2. Plásmidos

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

**Tabla 2. Plásmidos utilizados.**

Nombre	Descripción	Referencia
YE <sub>p</sub> 357	Plásmido para realizar ensayos de genes reporteros (ver Apéndice).	(Myers et al., 1986)
YE <sub>p</sub> 357-UGA4	Contiene al promotor del gen <i>UGA4</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	(Correa García, 2000)
YE <sub>p</sub> 357-AGP1	Contiene al promotor del gen <i>AGP1</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis doctoral Sabrina Cardillo
YE <sub>p</sub> 357-BAP2	Contiene al promotor del gen <i>BAP2</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis doctoral Sabrina Cardillo
YE <sub>p</sub> 357-BAP3	Contiene al promotor del gen <i>BAP3</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YE <sub>p</sub> 357-LEU3	Contiene al promotor del gen <i>LEU3</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis de licenciatura Santiago Bertotti
pRS426	Plásmido para expresión de proteínas en levaduras bajo control de su promotor natural (ver Apéndice).	(Christianson et al., 1992)
pSBC-HA-DAL81	Contiene al gen <i>DAL81</i> fusionado al epítipo HA en su extremo N-terminal bajo el control del promotor <i>GPD</i> .	(Cardillo et al., 2011)
pMP-HA-UGA3	Contiene al gen <i>UGA3</i> fusionado a seis epítopos HA en su extremo N-terminal bajo el control de su promotor natural.	Este trabajo
pUG6	Plásmido para la construcción de cepas de delección (ver Apéndice).	(Guldener et al., 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 et al., 2005)
pOM20	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con nueve epítopos c-myc en el extremo N-terminal (ver Apéndice).	(Gauss et al., 2005)
pSH47	Contiene al gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor <i>GALI</i> (ver Apéndice).	(Guldener et al., 1996)
pFA6a-3HA-kanMX6	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con tres epítopos HA en el extremo C-terminal (ver	(Longtine et al., 1998)

	Apéndice).	
<b>pFA6a-13cMYC-kanMX6</b>	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con trece epítopes c-myc en el extremo C-terminal (ver Apéndice).	(Longtine et al., 1998)
<b>pAG25</b>	Plásmido para la construcción de cepas de delección (ver Apéndice).	(Goldstein and McCusker, 1999)
<b>pMB10</b>	Contiene al gen <i>STP1</i> regulado bajo su propio promotor y flanqueado por trece epítopes c-myc y seis HA en sus extremos N y C-terminal, respectivamente.	(Boban and Ljungdahl, 2007)

## 2.1 Construcción de plásmidos

### -Clonado de la región regulatoria del gen *BAP3*

Se clonó la región regulatoria del gen *BAP3* (-900 a +18, con respecto al codón de iniciación ATG) río arriba del gen *lacZ* en el plásmido YEp357 (Myers et al., 1986).

### -Clonado del gen de fusión HA-*UGA3* (pMP-HA-*UGA3*)

El plásmido pMP-HA-*UGA3* se construyó clonando el gen *UGA3* fusionado a seis epítopes HA. Dicha secuencia se amplificó a partir del ADN genómico de la cepa SBCY13 (*Mata ura3 6HA-UGA3*, Tabla 1) y se clonó en el plásmido pRS426 (Christianson et al., 1992).

#### 2.1.1 Extracción de ADN genómico

Células de un cultivo *overnight* en medio YPD se cosecharon por centrifugación y lavaron con 500 µl de agua destilada. Al *pellet* celular se le agregó 200 µl de *buffer* de lisis (ver Apéndice), 200 µl de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) y un volumen equivalente a 200 µl de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro). Se agitó con *vortex* durante 5 minutos a 4°C y se agregaron 200 µl de *buffer* TE (ver Apéndice). Luego de centrifugar, se tomó la fase acuosa y se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN genómico. Se centrifugó a máxima velocidad y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 200 µl de *buffer* TE.



### 2.1.2 Obtención de fragmentos de ADN a clonar

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *buffer* (Fermentas), dNTPs 0,2 mM, *primers* 0,5  $\mu$ M, *Taq Long Range* 1,25 unidades/50  $\mu$ l (Fermentas) y 0,5  $\mu$ g de ADN molde.

La región promotora del gen *BAP3* se amplificó utilizando los *primers* F-Eco-*BAP3* y R-Bam-*BAP3* y ADN genómico de la cepa  $\Sigma$ 1278b como molde.

El gen de fusión HA-*UGA3* se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa SBCY13. Se utilizaron los *primers* F-Eco-*UGA3* y R-Kpn-*UGA3*.

En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los *primers* empleados.

**Tabla 3. *Primers* utilizados para construcción y chequeo de plásmidos.**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
F-Eco- <i>BAP3</i>	CGCGGAATTCCACAATTGCCCGCGTACG
R-Bam- <i>BAP3</i>	CGCGGATCCTATAGGATCTGACATTAC
F-Eco- <i>UGA3</i>	CGCGGAATTCCCAGGAATCACATTTGCCCAAGA
R-Kpn- <i>UGA3</i>	CGCGGTACCCACTGGCACGTCGTATGCAGGA
pI-U	TGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
pI-D	TGGCGAAAGGGGGATGTGCT

### 2.1.3 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.

### 2.1.4 Extracción y purificación de plásmidos

La extracción y purificación de ADN plasmídico se realizó a partir de un cultivo *overnight* de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los distintos plásmidos en medio LB con ampicilina, utilizando el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 2.1.5 Reacciones de restricción

El producto de PCR purificado y los plásmidos YEp357 y pRS426 se sometieron a reacciones de restricción. Para esto, se incubó 1  $\mu$ g de ADN con las enzimas de restricción correspondientes en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Finalizada la digestión, las enzimas se inactivaron durante 20 minutos a 65°C y los productos de PCR y los plásmidos se digirieron, purificaron utilizando el *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) y cuantificaron en un gel de agarosa por comparación de intensidad de bandas con el marcador de masa *lambda* EcoRI/HindIII (Promega).

### **2.1.6 Reacciones de ligación**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl respetando una relación molar inserto:vector de 5:1. 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 de *E. coli* competentes.

### **2.1.7 Preparación de bacterias competentes**

Las células de *E. coli* DH5α se cultivaron *overnight* a 37°C en medio LB. Se inocularon 2 ml de este cultivo en 40 ml de medio 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> 50 mM y glicerol 15% y se guardaron a -80°C.

### **2.1.8 Transformación de bacterias**

En un tubo estéril se colocaron 100 µl de bacterias *E. coli* competentes y 20 µl 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 nuevamente a 4°C durante 5 minutos. Luego se agregó 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células se centrifugaron y sembraron en medio LB sólido con ampicilina 100 µg/ml. En este medio solo crecen aquellas bacterias que contienen al plásmido que posee la resistencia al antibiótico, seleccionándose así las células transformadas.

### **2.1.9 Screening de colonias**

Para verificar que las colonias de bacterias resistentes a ampicilina contenían al plásmido recombinante, se realizó PCR *colony*. Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *primers* 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM y Taq polimerasa 0,6 unidades/25 µl (Invitrogen). Como ADN molde se picó con un *tip* pequeño la colonia que se deseaba analizar.

Para verificar la inserción del fragmento del promotor del gen *BAP3* en el plásmido YEp357 se emplearon los *primers* pIU y pID (Tabla 3), complementarios a ambos lados del sitio múltiple de clonado del vector. El tamaño esperado del producto de PCR para el plásmido recombinante es de 1008 pares de bases, mientras que para el vector vacío es de 200 pares de bases.

Se utilizaron los *primers* F-*UGA3* prom y R-*UGA3* int (Tabla 4) para verificar la incorporación del fragmento HA-*UGA3* en el plásmido pRS426. Las colonias que habían incorporado el vector con dicho inserto debían presentar un producto de 672 pares de bases.

Las células de las colonias positivas se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio LB líquido con ampicilina conteniendo glicerol 15%.

### 2.1.10 Extracción y purificación de plásmidos

La extracción y purificación de ADN plasmídico se realizó a partir de 3 ml de un cultivo *overnight* de *E. coli* en medio LB con ampicilina. Las células se cosecharon por centrifugación y el *pellet* se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de solución I (ver Apéndice). Luego se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de solución II (ver Apéndice) y se agitó suavemente por inversión. Se incubó en hielo durante 15 minutos y se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de solución III (ver Apéndice). Se agitó suavemente e incubó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad y se transvasó el sobrenadante a un tubo *ependorff*. Se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó precipitando el ADN plasmídico durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabla 4. *Primers* para construcción y verificación de cepas**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
<b><i>Primers</i> para construcción de cepas por delección</b>	
F-ME	CGTACGCTGCAGGTCGAC
R-ME	ATCGATGAATTCGAGCTC
F- <i>leu3 loxp</i>	TGCAATTATGGAAGGAAGATCAGATTTTGTGGCGACTTCACACAGCTGAAGCTTCGTACGC
R- <i>leu3 loxp</i>	GGACTTTAAACCTTGGGATTGAACGCAAATTCATTCATTAAACATAGGCCACTAAGTGATCTG
F- <i>leu3</i>	TGCAATTATGGAAGGAAGATCAGATTTTGTGGCGACTTCACACGTACGCTGCAGGTCGAC
R- <i>leu3</i>	GGACTTTAAACCTTGGGATTGAACGCAAATTCATTCATTAAATCGATGAATTCGAGCTC
<b><i>Primers</i> para construcción de cepas con tags</b>	
F- <i>GAT1-Tag</i>	AAATGGGCAATCTGAGCCTGGATTGGTTGAATCTGAATTTACGGATCCCCGGGTTAATTAA

<b>R-<i>GAT1</i>-Tag</b>	TGGAGGCATAACGCACACTGAGCTTTTGATAAAATGTTGCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
<b>F-Tag-<i>DAL81</i></b>	TGTTTAGACGAGCGGCAGAACGACAGGCAGCCATACTATCAAATGTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
<b>R-Tag-<i>DAL81</i></b>	CATGCTTCGAATATTTCAATTCAGCTTCTCCACGCCATAATTGCGGCCGCATAGGCCACT
<b>F-Tag-<i>UGA3</i></b>	CATGTATGGATGCCAAGAAAACAAAGTTTTTTAAAGTGAGGTATGTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
<b>R-Tag-<i>UGA3</i></b>	CATGCTTCGAATATTTCAATTCAGCTTCTCCACGCCATAATTGCGGCCGCATAGGCCACT
<b>F-<i>STP1</i>-Tag</b>	CAATATTTGAATTTTTACAATGACAACCTTGGGTCACAATTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
<b>R-<i>STP1</i>-Tag</b>	TTCCAATATGATACCCCTTATTTTTATCCCGTGTTATATTTAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
<b>F-<i>UGA43</i>-Tag</b>	GAACTACACTCCAGAGCTTCAGTACAATCTCACCCACAACATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
<b>R-<i>UGA43</i>-Tag</b>	CCTGTTATATTTATACTGTCATGAACGCTACATCCTTTCTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
<b>Primers para verificación de mutantes</b>	
<b>F-<i>GAT1</i> int</b>	CTCAGGACATACCCATTCCG
<b>R-<i>GAT1</i> down</b>	GACATGGAAAGAAGCGAGTAC
<b>F-<i>DAL81</i> prom</b>	GGTAGAGCAGAAGCAGTCC
<b>R-<i>DAL81</i> int</b>	AGTATATTAGGATGGTCGTTTGC
<b>F-<i>UGA3</i> prom</b>	GTATAGGGTTGAACGGTAGGG
<b>R-<i>UGA3</i> int</b>	CAACTGGTGCTGTATATCTGC
<b>F-<i>LEU3</i> prom</b>	AGGTGCCGCCTAATTTATCG
<b>R-<i>LEU3</i> int</b>	ACTTCTGCTGACGACATTCC
<b>F-<i>STP1</i> int</b>	GCACAAGATAATCCTTCGTTCC
<b>R-<i>STP1</i> down</b>	TCGGCTTTCCAATATGATACCC
<b>F-<i>UGA43</i> int</b>	ACTACCTCTATCAGATCAACG
<b>R-<i>UGA43</i> down</b>	GCTCACATCTCATCAAAGTGC
<b>R-pYM-N</b>	TGTGATGTGAGAACTGTATCC
<b>F-kan int</b>	CATCCTATGGAAGTGCCTCG
<b>R-kan int</b>	GATAGATTGTCGCACCTGATTG

### 3. Transformación de levaduras con ADN plasmídico

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/AcLi 0,1 M y se incubaron en agitación durante 30 minutos. Luego, las células se cosecharon y resuspendieron en 500 µl de solución de TE/AcLi 0,1 M. A 50 µl de esta suspensión celular se le agregó 1 µg de ADN plasmídico y 50 µg de ADN de esperma de salmón. Se agitó bien y se incubó durante 30 minutos a 30°C. Luego se agregaron 350 µl de una solución de TE/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 and Woods, 2002). Las células se lavaron con 200 µl de TE y se sembraron en placas con medio mínimo sin uracilo.

#### **4. Construcción de cepas mutantes de levaduras**

Las cepas generadas en este trabajo se construyeron utilizando la técnica de delección de genes basada en PCR (Wach, 1996; Wach et al., 1994) o versiones modificadas de la misma (Gauss et al., 2005; Goldstein and McCusker, 1999; Guldener et al., 1996; Longtine et al., 1998). En la Tabla 4 se muestran las secuencias de los *primers* empleados en la construcción de mutantes.

##### **4.1 Obtención de fragmentos de ADN**

Las reacciones de PCR para amplificar los fragmentos de ADN conteniendo al marcador de selección deseado flanqueado por regiones de homología al gen blanco se realizaron en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *primers* 0,5 µM (Tabla 4), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 2,5 unidades/50 µl (Invitrogen) y 0,5 µg del ADN molde correspondiente. El programa utilizado fue: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 54°C y 2 minutos a 72°C y finalmente 5 minutos a 72°C.

##### **4.2 Precipitación de los fragmentos de PCR**

Se mezclaron 625 µl de etanol absoluto y 25 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,2 con 100 µl de producto de PCR. Se incubó 1 hora a -80°C y se centrifugó 30 minutos a máxima velocidad. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% y el *pellet* se resuspendió en 10 µl 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/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/AcLi 0,1 M. A 50 µl de suspensión celular se le agregó 1-2 µg 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/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 los antibióticos G418 o ClonNAT.

#### 4.4 Screening de colonias

Para verificar la correcta inserción de los marcadores de selección en el genoma de las distintas cepas se realizó PCR *colony*. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 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* pequeño y se utilizó como fuente de ADN molde. Para cada colonia a analizar se utilizaron dos pares de *primers* (Tabla 4), un par que amplifica un producto de PCR en la cepa *wild type* y otro par que genera un producto de PCR en la cepa mutante. El programa que se utiliza para llevar a cabo las reacciones de PCR *colony* fue: 5 minutos a 94°C, luego 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 54°C, 1 minuto a 72°C, y finalmente 5 minutos a 72°C.

Las colonias que resultaron positivas se estriaron de modo de obtener colonias aisladas y se volvió a verificar su genotipo por PCR *colony*. Las células positivas se guardaron a -80°C en medio YPD conteniendo glicerol 15%.

#### 4.5 Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre

Para escindir el módulo de selección, las células se transformaron con el plásmido pSH47 (Guldener et al., 1996) que contiene al gen de la recombinasa Cre bajo un promotor inducible por galactosa. Células transformadas, cultivadas en 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 por PCR *colony*.

#### 4.6 Cepas

##### Cepa MPY01 (*ura3 snf1Δ::natMX4*)

Para la construcción de la cepa MPY01 (*ura3 snf1Δ::natMX4*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and 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 CELY01 (*ura3 snf1Δ::KanMX4*). El reemplazo del módulo kanMX por natMX se verificó por la incapacidad de las células de crecer en medio conteniendo G418 y por su capacidad de crecer en medio conteniendo ClonNAT.

#### **Cepa MPY07 (*ura3 6HA-UGA3 9cMYC-DAL81*)**

Para la construcción de la cepa MPY07 (*ura3 6HA-UGA3 9cMYC-DAL81*) se utilizó el plásmido pOM20 (Gauss et al., 2005) como templado para la PCR y los *primers* F/R-Tag-*DAL81* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBCY13 (*ura3 6HA-UGA3*). Una vez obtenida la mutante *ura3 6HA-UGA3 9cMYC-loxP-kan-loxP-DAL81*, el marcador de selección se escindió 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-*DAL81* prom, R-*DAL81* int y R-kan int (Tabla 4).

#### **Cepa MPY09 (*ura3 leu3Δ::loxP*)**

Para la construcción de la cepa MPY09 (*ura3 leu3Δ::loxP*) se utilizó el plásmido pUG6 (Guldener et al., 1996) como templado para la PCR y los *primers* F/R-*leu3 loxP* (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 23344c (*ura3*). Una vez obtenida la mutante *ura3 leu3Δ::loxP-kan-loxP*, el marcador de selección se escindió por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre. Para verificar la correcta inserción y escisión del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-kan int (Tabla 4).

#### **Cepa MPY10 (*ura3 6HA-DAL81-9cMYC-UGA3*)**

Para la construcción de la cepa MPY10 (*ura3 6HA-DAL81 9cMYC-UGA3*) se utilizó el plásmido pOM20 (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 SBCY10 (*ura3 6HA-DAL81*). Una vez obtenida la mutante *ura3 6HA-DAL81 9cMYC-loxP-kan-loxP-UGA3*, el marcador de selección se escindió 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 4).

#### **Cepa MPY13 (*ura3 leu3Δ::loxP UGA43-3HA-kanMX6*)**

Para la construcción de la cepa MPY13 (*ura3 leu3Δ::loxP UGA43-3HA-kanMX6*) se utilizó el plásmido pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) como templado para

la PCR y los *primers* F/R-UGA43-Tag (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa MPY09 (*ura3 leu3Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-UGA43 int, R-UGA43 down y F-kan int (Tabla 4).

#### **Cepa MPY14 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ*)**

Para la construcción de la cepa MPY14 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 30505b (*ura3 gln3Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-LEU3 prom, R-LEU3 int y R-pYM-N (Tabla 4).

#### **Cepa MPY15 (*ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ*)**

Para la construcción de la cepa MPY15 (*ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 30078c (*ura3 uga43Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-LEU3 prom, R-LEU3 int y R-pYM-N (Tabla 4).

#### **Cepa MPY16 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ gat1Δ*)**

Para la construcción de la cepa MPY16 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gln3Δ gat1Δ*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 34411c (*ura3 gln3Δ gat1Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-LEU3 prom, R-LEU3 int y R-pYM-N (Tabla 4).

#### **Cepa MPY17 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gzf3Δ*)**

Para la construcción de esta cepa se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa SBS10 (*ura3 gzf3Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-LEU3 prom, R-LEU3 int y R-pYM-N (Tabla 4).



### **Cepa MPY18 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gat1Δ*)**

Para la construcción de la cepa MPY18 (*ura3 leu3Δ::natMX4 gat1Δ*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 32164b (*ura3 gat1Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-pYM-N (Tabla 4).

### **Cepa MPY19 (*ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ gzf3Δ*)**

Para la construcción de la cepa MPY19 (*ura3 leu3Δ::natMX4 uga43Δ gzf3Δ*) se utilizó el plásmido pAG25 (Goldstein and McCusker, 1999) como templado para la PCR y los *primers* F/R-leu3 (Tabla 4). El producto de PCR obtenido se utilizó para transformar la cepa 50000b (*ura3 uga43Δ gzf3Δ*). Para verificar la correcta inserción del marcador de selección se utilizaron los *primers* F-*LEU3* prom, R-*LEU3* int y R-pYM-N (Tabla 4).

## **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 0,8–1. Luego, se cosecharon por centrifugación, se transfirieron al mismo medio fresco en presencia o ausencia del inductor adecuado. Se agregó leucina 1,3 mM para determinar la actividad promotora de *AGP1*, *BAP2* y *BAP3*, y GABA 0,1 mM para determinar la actividad promotora de *UGA4*, y se incubó durante 30 minutos. Se cosecharon 10 ml de cada cultivo y 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 μl de SDS 0,1% y 30 μl de cloroformo. Los tubos se agitaron por 15 segundos para permeabilizar las células. Por último, se agregaron 200 μl 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 absorbancia a 420 nm. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (Miller, 1972), se calcula a partir de la siguiente fórmula:

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

donde  $\Delta t$  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 por lo menos 3 experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA seguido por la prueba de Duncan. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

## 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 los inductores de cada gen según el experimento. Se cosecharon 4 ml de cada cultivo, se lavó con 1 ml de agua destilada fría y se resuspendió en 750  $\mu$ l de *buffer* AE (ver Apéndice). Se agregaron 40  $\mu$ l de SDS 25% y 750  $\mu$ 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 15.000 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 15.000 x g durante 10 minutos. Se agregaron 70  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y 700  $\mu$ l de isopropanol a la fase acuosa, se mezcló y se centrifugó a 4°C a 15.000 x g durante 15 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* se dejó secar y se resuspendió en agua libre de nucleasas.

Las muestras de ARN se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a partir de la medición de la absorbancia a 260 nm y se conservaron a -80 °C. Para los análisis de expresión génica, se utilizaron solamente aquellas muestras que tenían una relación 260/280 mayor a 1,8.

Para evaluar su integridad, el ARN obtenido se desnaturalizó utilizando formamida y calor y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

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

### 5.2.2 *Retrotranscripción (generación de ADNc)*

La transcripción reversa se llevó a cabo en una mezcla conteniendo *buffer* (Fermentas), 5 µg de ARN, hexámeros al azar 5 µM, dNTPs 1 mM y 200 unidades de Transcriptasa Reversa RevertAid™ (Thermo Scientific). En primer lugar, la muestra de ARN, junto con los hexámeros al azar, se llevó a un volumen final de 12,5 µl 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 µl 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 (qPCR) se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, *primers* 0,5 µM, dNTPs 0,2 mM, *SYBR Green* 1:300.000 (Roche) y Taq polimerasa 0,6 unidades/25 µl (Invitrogen), utilizando un ciclador Stratagene Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies).

Como molde de ADN se utilizaron 5 µl de una dilución 1:10 de cada ADNc obtenido. Cada muestra se analizó por triplicado. Los *primers* para la qPCR (Tabla 5) se diseñaron usando el programa Beacon Designer 7.

Tabla 5. *Primers para PCR en tiempo real*

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Temperatura de hibridación (°C)
<b>Primers para RT-qPCR</b>		
R- <i>BAP2</i> RT-qPCR	ACCAAGATGTAACCAATTATTAGC	53
F- <i>BAP2</i> RT-qPCR	TAGAGGATGGCGTTGAGTC	53
F- <i>BAP3</i> RT-qPCR	TTCACAAGGTTAGGGTCATCC	53
R- <i>BAP3</i> RT-qPCR	ACCAACAAGAGAGCACACTAC	53
R- <i>AGP1</i> RT-qPCR	CGGCGTTAATGAAGTGTGG	53
F- <i>AGP1</i> RT-qPCR	ATCTTATTCTATTCTTGGCTACC	53
R- <i>DAL7</i> RT-qPCR	CAAGTTGGAGATGAAGAGTC	56
F- <i>DAL7</i> RT-qPCR	AACCGAACAAATCAGGAAC	56
F- <i>DUR3</i> RT-qPCR	CTGCCTGTGGGTGTTGTTG	53
R- <i>DUR3</i> RT-qPCR	CGTCTACTGGATGCCTCTTG	53
F- <i>UGA4</i> RT-qPCR	CTGCTGCTGTACATTAACC	58
R- <i>UGA4</i> RT-qPCR	AATACACATAACCACCACTGC	58
F- <i>UGA1</i> RT-qPCR	GTTCCACGGTAGATTGTTTGC	52
R- <i>UGA1</i> RT-qPCR	GTCATCCTCTTTACGGTTTGC	52
F- <i>UGA2</i> RT-qPCR	AAGCGATTGATGTTGCCTATG	52
R- <i>UGA2</i> RT-qPCR	GCGTATTTGATTTCTCCTTTAGC	52
F- <i>TBP</i> RT-qPCR	TATAACCCCAAGCGTTTTC	56
R- <i>TBP</i> RT-qPCR	GCCAGCTTTGAGTCATCCTC	56
<b>Primers para ChIP-qPCR</b>		
F- <i>DAL7</i> qPCR	AATCTCCGCTGAAGTTGC	56
R- <i>DAL7</i> qPCR	TTTCACGATGTACCTTATCCAAGA	56
F- <i>GAP1</i> qPCR	GACCTCATGCAGCAAAGTCA	56
R- <i>GAP1</i> qPCR	CCGTTGCTCCAGAAGATAA	56
F- <i>AGP1</i> qPCR	TTATACCTCGGCGGCTTC	56
R- <i>AGP1</i> qPCR	GCAAGATTTCTCCAAAGTCC	56
F- <i>BAP2</i> qPCR	AGGAGGCTACTGACTGCTGC	56
R- <i>BAP2</i> qPCR	GCTGACATATTTACCGTTGAAGG	56
F- <i>UGA1</i> qPCR	ACAATCTTTCCAATATCC	56
R- <i>UGA1</i> qPCR	TGTTCTATTATCTATCTCTTCC	56
F- <i>UGA2</i> qPCR	CGGCGTGGTGGTGATAAAGG	56
R- <i>UGA2</i> qPCR	TGATGGTGATGTGATGTGATGTGG	56
F- <i>UGA4</i> qPCR	AATCGCTTATCGCTTATCGTG	56
R- <i>UGA4</i> qPCR	GGAAGTACTGTTACTGTGCCAAG	56
F- <i>UGA4</i> UCqPCR	AGTCCAATACCTCTGTCCCTC	56
R- <i>UGA4</i> UCqPCR	AGCCGCAACTTCATTCTG	56

El programa utilizado en todos los casos fue el siguiente: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos correspondientes a la temperatura de hibridación de cada par de *primers* y 20 segundos a 72°C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un único producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Se evaluó la eficiencia de la reacción con cada par de *primers* 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 por lo menos 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA seguido por la prueba de Duncan. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

## **6. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)**

### **6.1 Fijación**

Las células provenientes de 100 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento y sometidas a los diferentes tratamientos, 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 5 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  $\mu$ l de *buffer* FA (ver Apéndice). Todos los lavados se realizaron a 4°C. Las células se guardaron a -80°C para su posterior uso.

### **6.2 Ruptura celular**

Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de *buffer* FA conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM. Las células se lisaron por ruptura mecánica en presencia de un volumen de perlas de vidrio (0,5 mm de

diámetro). 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 10.000 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.

### 6.3 *Sonicado*

La cromatina se fragmentó colocando el tubo en un baño de agua fría y sonicando con un sonicador (Bioruptor UCD200) durante 30 segundos a máxima intensidad. Luego, los extractos se centrifugaron a 10.000 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 intensidad y el tiempo de sonicado se pusieron a punto de manera tal que la mayoría de los fragmentos tuvieran aproximadamente 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%.

### 6.4 *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) y se incubaron en rotación por tres horas a 4°C. El extracto se separó de las bolitas y un 1% del extracto total 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. Luego de una incubación de tres horas en rotación a 4°C, los complejos inmunes se lavaron cuatro veces con *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM, cuatro veces con *buffer*

FA conteniendo NaCl 500 mM y PMSF 2 mM, cuatro veces con *buffer* de lavado (ver Apéndice) y dos veces con *buffer* TE. Las proteínas se eluyeron de las bolitas agregando 150  $\mu$ l 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 según el protocolo descrito por Rocha-Viegas et al. (Rocha-Viegas et al., 2014) y se resuspendió en un volumen final de 100  $\mu$ l con agua libre de nucleasas.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, *primers* 0,5  $\mu$ M, dNTPs 0,2 mM, SYBR Green 1:300.000 (Roche) y Taq polimerasa 0,6 unidades/25  $\mu$ l (Invitrogen), utilizando un ciclador Stratagene Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies). Como ADN molde se utilizaron 5  $\mu$ l de *Input* o 5  $\mu$ l de inmunoprecipitado (IP) o 5  $\mu$ 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 20 segundos a 94°C, 20 segundos correspondientes a la temperatura de hibridación de cada par de *primers* y 20 segundos a 72°C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un único producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Se evaluó la eficiencia de la reacción de cada par de *primers* 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 5) se diseñaron usando el programa Beacon Designer 7.

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

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD (desvío estándar) de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

## 7. Extracción de proteínas y Western blot

Células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se cosecharon de manera tal que el volumen 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 fueron lisadas con una solución de NaOH 1,85 N y  $\beta$ -mercaptoetanol 7,5%, incubando 10 minutos en hielo. Luego, las proteínas totales se obtuvieron por precipitación con ácido tricloroacético 8%. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 40  $\mu$ l de *loading buffer* (ver Apéndice) y las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se sembraron en un gel de poliacrilamida con SDS 8% o 10%. La electroforesis se realizó a 80 V hasta que el frente de corrida ingresara al gel separador y luego a 100 V.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) a 300 mA 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 1:1.000 de anticuerpo anti c-myc (clon 9E10, hecho en ratón, Covance) o con una dilución 1:1.000 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 1:3.000 de anticuerpo anti IgG de ratón o una dilución 1:3000 de anticuerpo anti IgG de rata, conjugado a la enzima peroxidasa de rabanito (hecho en cabra, Santa Cruz). Luego de lavar la membrana, se detectaron las especies inmuno-reactivas 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.

## **8. Co-inmunoprecipitación**

Células de un cultivo de 100 ml en fase exponencial de crecimiento fueron cosechadas, lavadas una vez en *buffer* TBS y resuspendidas en 400  $\mu$ L de *buffer* FA con PMSF 2mM. Se les agregó un volumen de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se procedió a la ruptura celular mediante agitación con *vortex* a 4°C, durante 30 minutos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 17.000 x g durante 30 minutos a 4°C. Se reservó 10%  $\mu$ l del extracto como *Input* y se inmunoprecipitaron 2 mg de proteínas con 2  $\mu$ g de anticuerpo anti HA (Santa Cruz F-7) toda la noche. A cada tubo se le agregaron 25  $\mu$ l de bolitas de agarosa unidas a proteína A/G (Santa Cruz) lavadas tres veces con *buffer* FA con PMSF 2mM. Luego de



una incubación de tres horas en rotación a 4°C, los complejos inmunes se lavaron 3 veces con *buffer* FA, se eluyeron por calentamiento a 100°C en 40 µl de *loading buffer* y se sembraron en un gel de poliacrilamida con SDS. Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) a 300 mA durante 90 minutos. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°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 1:1.000 de anticuerpo anti c-myc (clon 9E10, hecho en ratón, Covance). 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 1:5.000 de anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a la enzima peroxidasa de rabanita (hecho en cabra, Santa Cruz). Luego de lavar la membrana, se detectaron las especies inmuno-reactivas 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.



# **Resultados**



# Capítulo 1

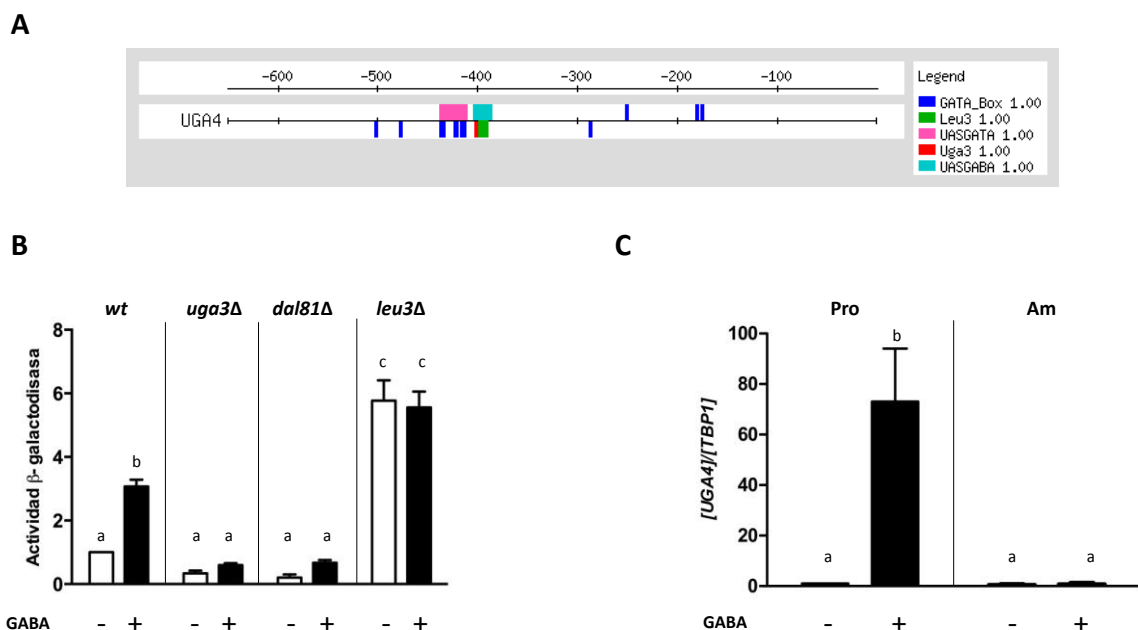
*Regulación transcripcional de los genes involucrados en el catabolismo del GABA: UGA4, UGA1 y UGA2*



Los genes del regulón *UGA*, *UGA1*, *UGA2* y *UGA4*, están sometidos a NCR y son inducibles por el GABA. El objetivo general de este capítulo es estudiar si existe una acción concertada entre factores de transcripción que actúan sobre distintos elementos UAS de estos genes y determinar este mecanismo molecular.

Analizamos la secuencia promotora de *UGA4* mediante el sitio web *Regulatory Sequence Analysis Tools* (RSAT, <http://fungi.rsat.eu/>) (Medina-Rivera et al., 2015) empleando las secuencias consenso de unión al ADN de distintos factores de transcripción obtenidas con las bases de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com/>) (Teixeira et al., 2014) y SCPD (<http://rulai.cshl.edu/SCPD/>) (Zhu and Zhang, 1999) (Figura 11A).

El gen *UGA4* posee dos elementos regulatorios bien definidos, UAS<sub>GABA</sub> y UAS<sub>GATA</sub>. El elemento UAS<sub>GABA</sub> cuya secuencia es 5'-AAAAACCGCCGGCGGCAAT-3', se encuentra ubicado entre las bases -404 y -386 respecto del codón de iniciación de la traducción ATG (Andre et al., 1995). Este elemento contiene secuencias consenso para las proteínas Uga3 (5'-SGCGGNWTT-3'), Dal81 (5'-CGGCN<sub>6</sub>GCCG-3') y Leu3 (5'-CCGGNNCCGG-3') (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011; Idicula et al., 2002; Talibi et al., 1995). El elemento UAS<sub>GATA</sub> se encuentra entre las bases -438 y -411 respecto del codón de iniciación de la traducción ATG y está formado por tres secuencias GATA, 5'-CTTATCGCTAATCGCTTATC GCTTATCG-3' (Andre et al., 1995; Coffman et al., 1997). Sobre el UAS<sub>GATA</sub> se pueden unir los factores de transcripción GATA que modulan la expresión de *UGA4* frente a variaciones en la calidad de las fuentes de nitrógeno y de carbono (Cardillo et al., 2012; Georis et al., 2009b; Levi et al., 2012). Además, el promotor de *UGA4* presenta otros múltiples sitios consenso de unión para los factores GATA (5'-GAT(A/T)A-3') ubicados a lo largo de la región promotora (Figura 11A) cuya función aún no ha sido establecida. Cabe mencionar que la secuencia de unión para Dal81 obtenida a partir de la base de datos YEASTRACT ingresada como *query pattern* en la página RSAT no fue reconocida por este programa.



**Figura 11. A) Esquema de la región promotora del gen *UGA4*.** Se muestran en azul los sitios de unión para los factores de transcripción de la familia GATA, en verde el sitio de unión para Leu3, en rosa el elemento UAS<sub>GATA</sub>, en rojo el sitio de unión para Uga3 y en celeste el elemento UAS<sub>GABA</sub>. **B) Participación de Uga3, Dal81 y Leu3 en la regulación de *UGA4*.** Células *wild type* (23344c), *uga3Δ* (26790a), *dal81Δ* (SBCY17) y *leu3Δ* (SBCY01), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Luego de 30 minutos de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. **C) Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión del gen *UGA4*.** Células *wild type* (23344c), crecidas en medio mínimo con prolina o amonio como fuentes de nitrógeno, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM durante 30 minutos. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA4* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media ± EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

En nuestro laboratorio habíamos demostrado que Uga3 interactúa con el promotor de *UGA4* en ausencia de GABA y que esa interacción disminuye en presencia del inductor (Cardillo et al., 2012; Levi et al., 2012). Por el contrario, Uga3 y Dal81 interactúan con *UGA4* solamente en presencia de GABA (Cardillo et al., 2010). En ausencia de Uga3 o de Dal81, Uga3 interactúa tanto en presencia como ausencia del inductor (Cardillo et al., 2012; Levi et al., 2012). Estos resultados constituyeron las primeras evidencias obtenidas en experimentos *in vivo* de que la acción de los factores de transcripción sobre el elemento UAS<sub>GATA</sub> depende de la unión de los factores que actúan sobre el elemento UAS<sub>GABA</sub> (Cardillo et al., 2012).

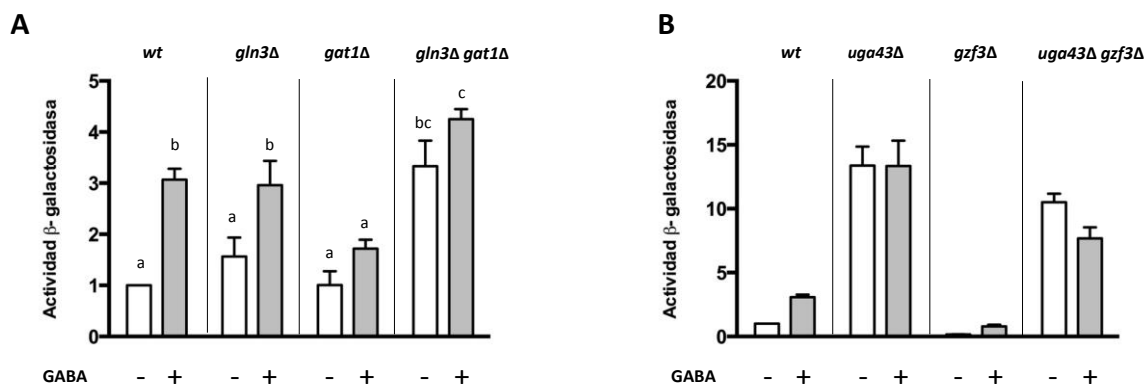


En primer lugar realizamos ensayos con el fin de confirmar la participación de los factores que podrían actuar sobre el  $UAS_{GABA}$ , Uga3, Dal81 y Leu3. Como ya había sido descrito, encontramos que la inducción por GABA del gen *UGA4* depende de Uga3 y Dal81 (Cardillo et al., 2011; Talibi et al., 1995) y que en células *leu3Δ* la expresión de *UGA4* es constitutiva (Figura 11B) (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011). El efecto negativo de Leu3 sobre la transcripción de *UGA4* ya había sido observado por de Boer y col. mediante estudios globales (Boer et al., 2005).

También confirmamos que la expresión del gen *UGA4* es sensible a NCR (Coffman et al., 1994; Coleman et al., 2001; Vissers et al., 1990), ya que se observa inducción de *UGA4* por GABA en células crecidas en la fuente pobre de nitrógeno, prolina pero no en la fuente rica, amonio (Figura 11C).

Existen reportes que indican que los factores GATA responsables del mecanismo de NCR no actúan de igual manera sobre todos los genes sensibles a nitrógeno (Cardillo et al., 2012; Coffman et al., 1996; Talibi et al., 1995). Por ello decidimos analizar la participación de cada uno de los factores GATA en la regulación de *UGA4* mediante el uso de mutantes.

La inducción de *UGA4* por GABA es similar en las cepas *wild type* y *gln3Δ*, mientras que en la cepa *gat1Δ* la expresión inducida de *UGA4* es menor (Figura 12A). Por lo tanto, Gat1 parece tener un papel predominante en la inducción de *UGA4*. En ausencia de ambos activadores transcripcionales Gln3 y Gat1, los niveles de expresión de *UGA4* son elevados aún en ausencia de inductor. Esto podría deberse a la ausencia de los represores Uga43 y Gzf3 debida a la autorregulación que existe entre los factores GATA. Es decir, al estar ausentes ambos activadores, los represores no se expresan.



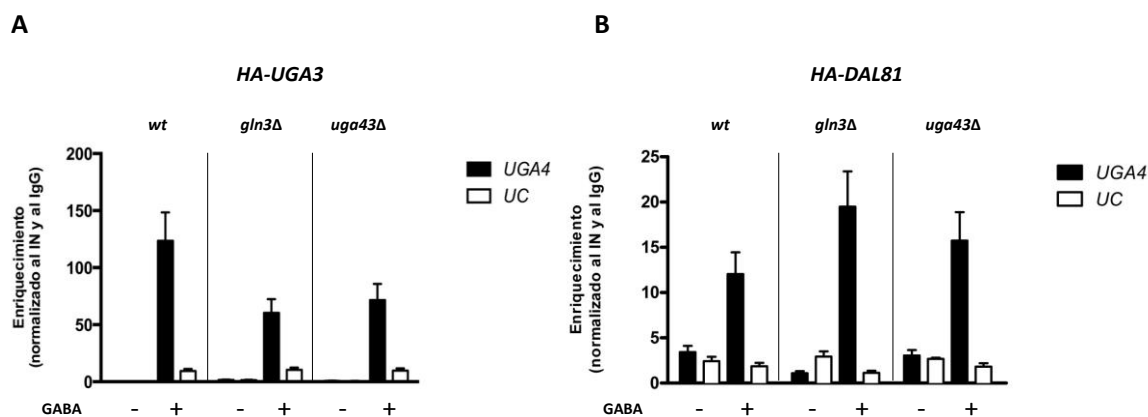
**Figura 12. Participación de los factores GATA positivos (A) y negativos (B) en la regulación de *UGA4*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b), *gat1Δ* (32164b), *gln3Δ gat1Δ* (34411c), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Luego de 30 minutos de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico de la Figura 12B se encuentra en el Apéndice.

En la Figura 12B se observa que en ausencia del represor GATA Uga43 la expresión de *UGA4* es elevada, tanto en presencia como en ausencia del inductor GABA. Esto demuestra que Uga43 es el responsable de la represión de *UGA4* en ausencia de inductor. Los altos niveles basales de *UGA4* podrían atribuirse a la actividad de los factores GATA positivos en la cepa *uga43Δ*. Por un lado, al encontrarse ausente Uga43, Gln3 y Gat1 no competirían con esta proteína por las secuencias blanco presentes en el promotor de *UGA4*. Por otro lado, la expresión de Gat1 aumenta significativamente en células *uga43Δ* (Georis et al., 2009b).

En ausencia del factor GATA negativo Gzf3, la expresión del gen *UGA4* disminuye significativamente (Figura 12B), lo que indica que Gzf3 no tiene una función equivalente a Uga43. Este resultado sugiere que Gzf3 no tendría un efecto negativo sobre *UGA4*; por el contrario, parecería actuar como un activador. Es probable que los cambios producidos por la delección de *GZF3* estén dados por un aumento en la expresión de Uga43 (Cooper, 2002). Sin embargo, en la doble mutante *uga43Δ gzf3Δ*, la expresión en presencia de GABA de *UGA4* es elevada, aunque es menor que la observada en la simple mutante *uga43Δ*. Es decir que el efecto positivo de Gzf3 no se produciría únicamente a través de cambios en la expresión de Uga43.

Probablemente se produzca a través de Gat1 ya que Georis y col. demostraron que en la mutante *gzf3Δ* la expresión y la actividad de Gat1 aumentan significativamente (Georis et al., 2009b).

Para intentar comprender el mecanismo de acción de los factores de transcripción GATA, decidimos estudiar si afectan la interacción de los factores de transcripción que actúan sobre el elemento  $UAS_{GABA}$ . Como se observa en la Figura 13A, no se detecta unión de Uga3 al promotor de *UGA4* en ausencia de inductor en las cepas *wild type*, *gln3Δ* y *uga43Δ*. En cambio, el agregado de GABA promueve la asociación de Uga3, independientemente de la cepa analizada aunque en ausencia de los factores GATA, Gln3 o Uga43, esta interacción disminuye (Figura 13A). La interacción de Dal81 con *UGA4* también es dependiente de GABA y no se ve modificada por la ausencia de Gln3 ni de Uga43 (Figura 13B).



**Figura 13. Efecto de Gln3 y Uga43 en la interacción de Uga3 y Dal81 con el promotor de *UGA4*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b) y *uga43Δ* (30078c), transformadas con el plásmido que expresa a HA-Uga3 (pMP-*HA-UGA3*) (A), o con el plásmido que expresa a Dal81 (pSBC-*HA-DAL81*) (B), y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de GABA 0,1 mM durante 30 minutos. Los ensayos de CHIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

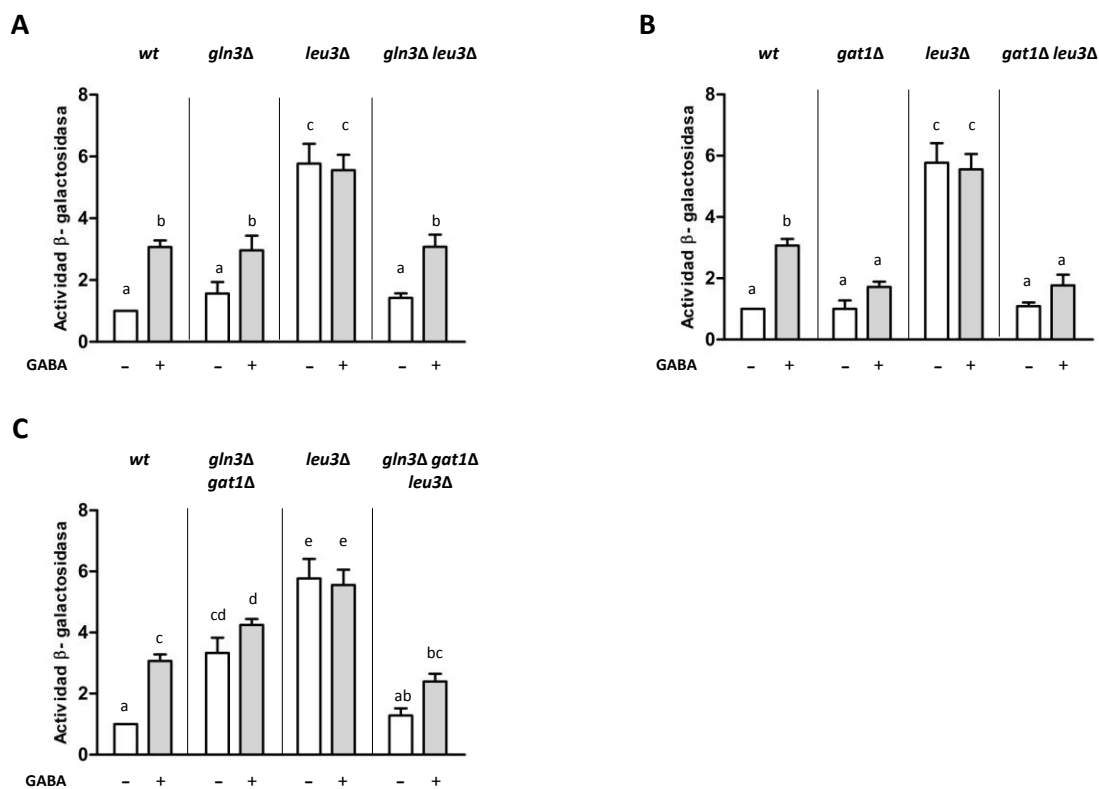
El factor de transcripción Leu3, al igual que Uga3 y Dal81, reconoce secuencias ricas en GC en los promotores de sus genes blanco (MacPherson et al., 2006). Si bien dentro del elemento  $UAS_{GABA}$  presente en el promotor del gen *UGA4* existe una

secuencia consenso para Leu3, no pudimos detectar interacción de Leu3 con dicho promotor (Cardillo et al., 2010). Sin embargo, ya sea directa o indirectamente, Leu3 regula fuertemente la expresión de *UGA4* (Figura 11B). Para intentar esclarecer el mecanismo de acción de Leu3 sobre *UGA4*, medimos la expresión de este gen en mutantes deficientes en los factores GATA y en Leu3.

Es interesante destacar que los niveles elevados de *UGA4* observados en la cepa *leu3Δ* en ausencia de inductor disminuyen en la cepa *gln3Δ leu3Δ* (Figura 14A), lo que indica que la expresión alta de *UGA4* observada en las células deficientes en Leu3 depende de Gln3 y que en este mecanismo Gat1 no podría reemplazar a Gln3.

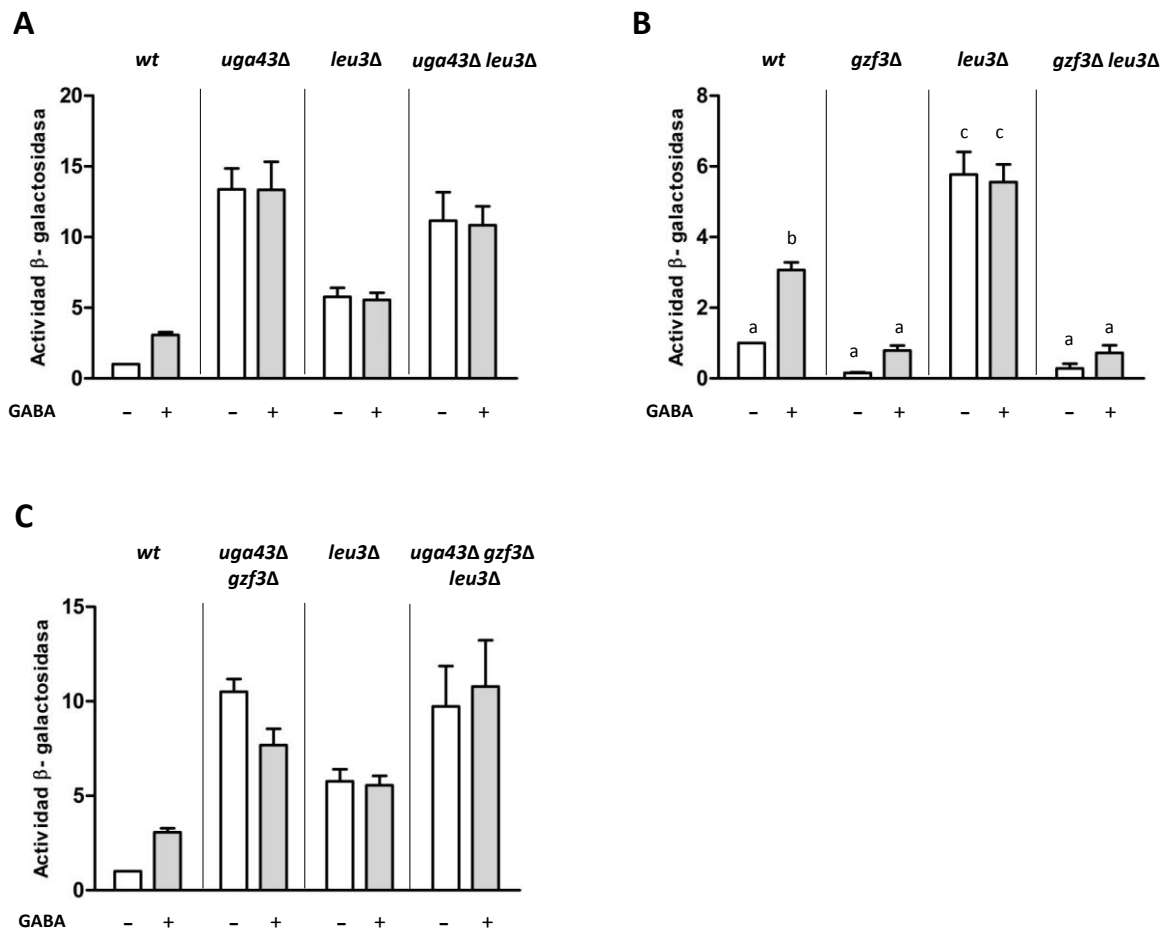
Al encontrarse ausentes Leu3 y Gat1, los niveles de expresión tanto en presencia como ausencia de inductor disminuyen respecto a la cepa *leu3Δ* (Figura 14B). Este resultado sugiere que Gat1 también es necesaria para la expresión basal elevada de *UGA4* observada en la cepa deficiente en Leu3 y que Gln3 no puede cumplir la misma función que Gat1.

De acuerdo con lo observado en la Figura 14A y B, la elevada expresión de *UGA4* en ausencia de Leu3 depende de ambos factores GATA positivos ya que los valores observados son similares en las cepas *gln3Δ leu3Δ*, *gat1Δ leu3Δ* y *gln3Δ gat1Δ leu3Δ* (Figura 14C). Ya habíamos observado que la expresión basal de *UGA4* en la cepa mutante en ambos factores GATA positivos es elevada, posiblemente a causa de la ausencia de los factores negativos. Sin embargo, en la triple mutante *gln3Δ gat1Δ leu3Δ* la expresión es menor, sugiriendo que, en ausencia de Uga43, Leu3 tendría una actividad positiva sobre la expresión de *UGA4*.



**Figura 14. Efecto de los activadores GATA y Leu3 sobre la expresión de *UGA4*.** Células *wild type* (23344c), *leu3 $\Delta$*  (SBCY01), *gln3 $\Delta$*  (30505b), *gat1 $\Delta$*  (32164b), *gln3 $\Delta$  gat1 $\Delta$*  (34411c), *gln3 $\Delta$  leu3 $\Delta$*  (MPY14), *gat1 $\Delta$  leu3 $\Delta$*  (MPY18), *gln3 $\Delta$  gat1 $\Delta$  leu3 $\Delta$*  (MPY16), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Luego de 30 minutos de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

La ausencia de Uga43 lleva a una elevada expresión de *UGA4* y es similar a la observada en células *uga43 $\Delta$  leu3 $\Delta$*  (Figura 15A) lo que sugiere que Leu3 no tiene efecto en ausencia de Uga43. Por otra parte, el efecto positivo de Gzf3 no depende de Leu3 (Figura 15B).

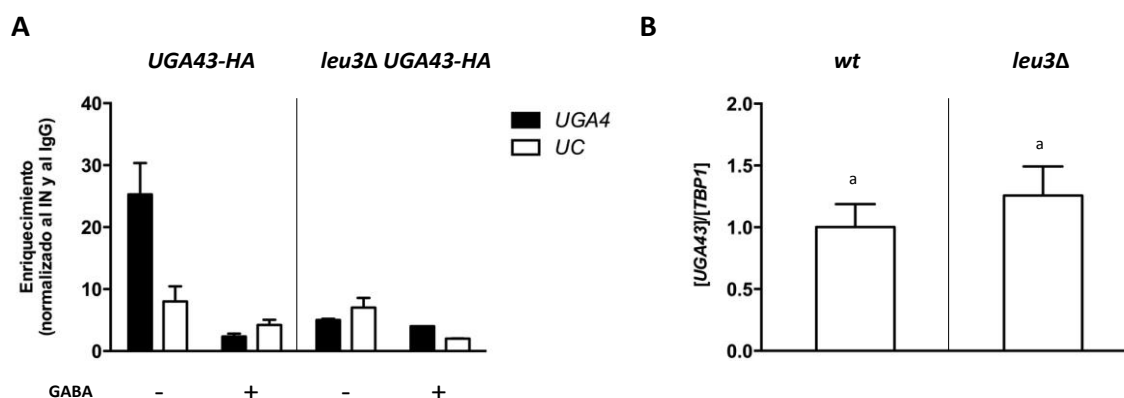


**Figura 15. Efecto de los factores represores GATA y Leu3 sobre la expresión de UGA4.** Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), *uga43Δ leu3Δ* (MPY15), *gzf3Δ leu3Δ* (MPY17), *uga43Δ gzf3Δ leu3Δ* (MPY19), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *UGA4-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de GABA 0,1 mM. Luego de 30 minutos de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir y representan la media ± EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico de las Figuras 15A y C se encuentra en el Apéndice.

Como Leu3 y Uga43 producen un efecto similar sobre la expresión de *UGA4*, analizamos la posibilidad de que Leu3 regule la interacción *in vivo* de Uga43 con el promotor de *UGA4*.

En la cepa *wild type* sin incubar con GABA se detecta interacción de Uga43 con el promotor de *UGA4*, mientras que en presencia de GABA esta interacción disminuye (Figura 16A, panel izquierdo). Estos resultados son similares a los ya descritos (Cardillo et al., 2012). Previamente, en nuestro laboratorio se había demostrado que

en ausencia de Uga3 o Dal81 la interacción de Uga43 con *UGA4* no disminuye al tratar a las células con GABA (Cardillo et al., 2012). En ausencia de Leu3, el reclutamiento de Uga43 al promotor de *UGA4* disminuye significativamente (Figura 16A, panel derecho), lo que permitiría explicar el aumento de la expresión basal de *UGA4* en la cepa *leu3Δ*. Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de una actividad concertada entre factores de transcripción que actúan sobre distintos elementos UAS.



**Figura 16. A) Efecto de Leu3 sobre la interacción de Uga43 con el promotor de *UGA4*.** Células *wild type* (SBCY41) y células *leu3Δ* (MPY13), que expresan a Uga43-HA, crecidas en medio mínimo, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de GABA 0,1 mM durante 30 minutos. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (barras negras), y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes. **B) Efecto de Leu3 sobre la expresión de Uga43.** Células *wild type* (23344c) y *leu3Δ* (MPY09) crecidas en medio mínimo se cosecharon y se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de *UGA43* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBPI*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Para descartar que la disminución en el reclutamiento de Uga43 en la cepa deficiente en Leu3 fuese porque la ausencia de este factor estuviera modificando la expresión de *UGA43*, analizamos esta expresión en células *wild type* y deficientes en Leu3. Los resultados que se muestran en la Figura 16B indican que la expresión de *UGA43* es independiente de Leu3. Por lo tanto, Leu3 modularía la interacción de Uga43 sobre las secuencias GATA presentes en el promotor de *UGA4*. Esto podría a su vez tener efecto sobre la interacción de los otros factores GATA o afectar el reclutamiento de Uga3 o Dal81 al elemento UAS<sub>GABA</sub>.

Para continuar analizando la relación entre los factores de transcripción estudiados hasta ahora, llevamos adelante estudios similares sobre la regulación de los otros dos genes que forman el regulón *UGA*, *UGA1* y *UGA2*, en la cual participan los mismos factores.

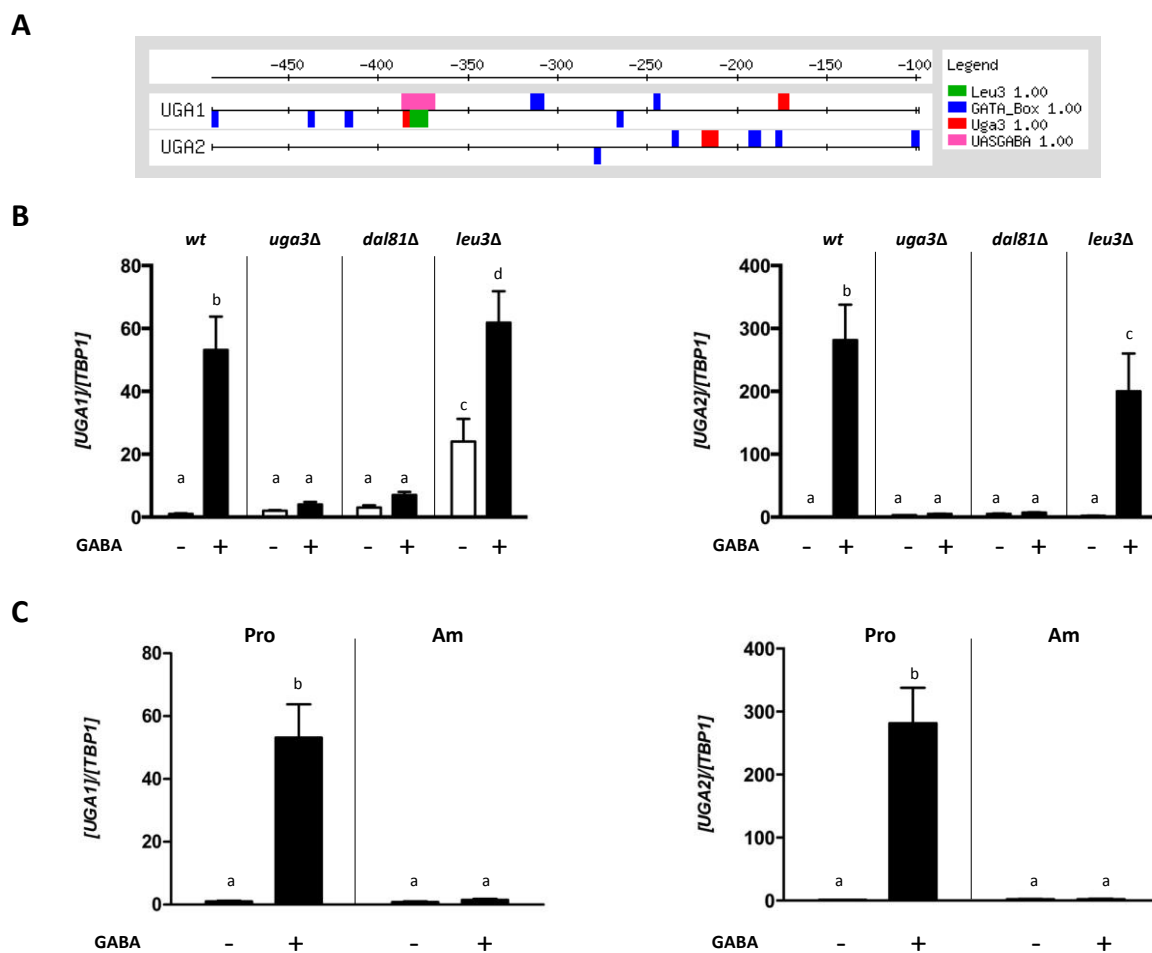
La región regulatoria del gen *UGA1* posee un elemento UAS<sub>GABA</sub> ubicado entre las bases -387 y -369 respecto del codón de iniciación de la traducción ATG y está formado por la secuencia 5'-AAAAGCCGCGGGCGGGATT-3' (Talibi et al., 1995) que se superpone con el sitio consenso de Leu3 (Figura 17A). Uga3, Dal81 y Leu3 participan en la regulación de *UGA1* (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011; Idicula et al., 2002).

*UGA1* también presenta múltiples sitios consenso de unión de los factores de transcripción de la familia GATA, sin embargo no forman un elemento UAS<sub>GATA</sub> como en el promotor de *UGA4*. Se ha descrito asociación positiva de Gln3 y de Gat1 y *UGA1* mediante ensayos de expresión (Coffman et al., 1996; Coffman et al., 1997; Shamji et al., 2000) y de CHIP (Cardillo et al., 2012; Georis et al., 2009b; Levi et al., 2012).

El gen *UGA2* presenta un sitio consenso para el factor Uga3 pero no posee el elemento UAS<sub>GABA</sub> encontrado en las regiones regulatorias de *UGA4* y *UGA1* y es el único gen del regulón que no contiene secuencias de unión para la proteína Leu3. Además, en la región regulatoria de *UGA2* hay varias secuencias consenso para los factores de transcripción de la familia GATA.

Al igual que ocurre con la regulación de *UGA4* (Figura 11B), la inducción por GABA de *UGA1* y *UGA2* depende de Uga3 y Dal81 (Figura 17B), a pesar de que *UGA2* no posee la secuencia consenso característica UAS<sub>GABA</sub>. Estos resultados ya habían sido observados (Cardillo et al., 2012; Talibi et al., 1995). En ausencia de Leu3 la expresión basal de *UGA1* es significativamente mayor que en la *wild type*, mientras que la de *UGA2* no varía en la mutante *leu3Δ* (Figura 17B). Esto coincide con el hecho de que *UGA2* no posee secuencias consenso de unión de Leu3 (Figura 17A).

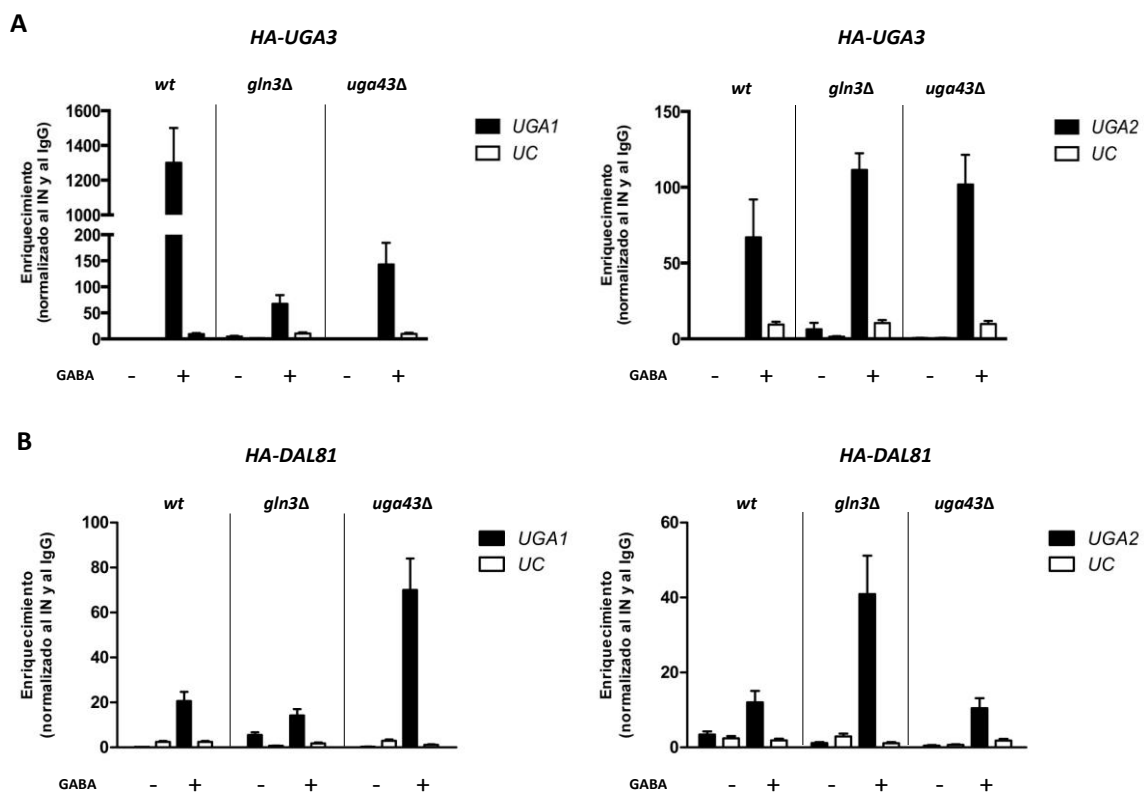




**Figura 17. A)** Esquema de la región promotora de los genes *UGA1* y *UGA2*. Se muestran en azul los sitios de unión para los factores de transcripción de la familia GATA, en verde el sitio de unión para Leu3, en rojo el sitio de unión para Uga3 y en rosa el elemento  $UAS_{GABA}$ . **B)** Participación de Uga3, Dal81 y Leu3 en la expresión de *UGA1* y de *UGA2*. Células *wild type* (23344c), *uga3Δ* (26790a), *dal81Δ* (SBCY17) y *leu3Δ* (SBCY01), se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de GABA 0,1mM durante 30 minutos. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. **C)** Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *UGA1* y *UGA2*. Células *wild type* (23344c), crecidas en medio mínimo con prolina o amonio como fuentes de nitrógeno, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de GABA 0,1mM durante 30 minutos. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de *UGA1* y *UGA2* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

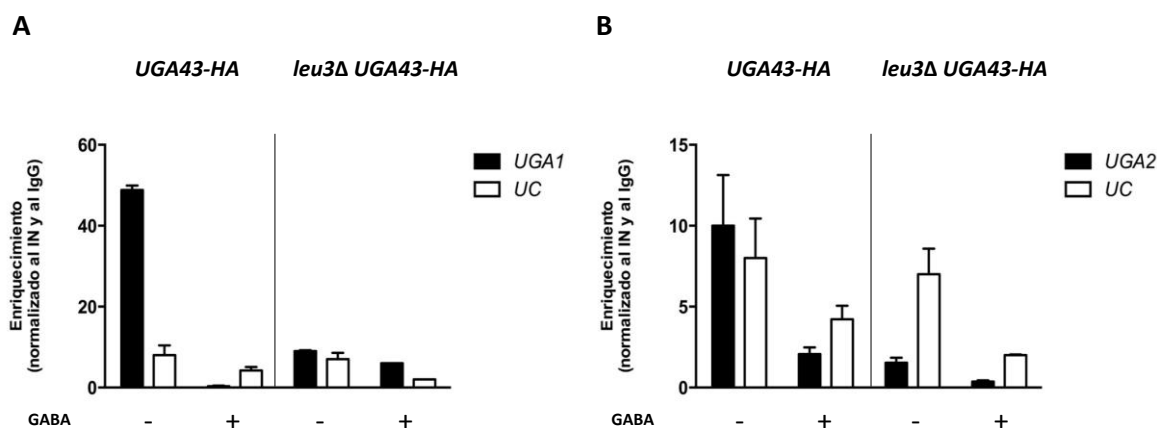
Tanto *UGA1* como *UGA2* están sujetos a NCR (Figura 17C) lo que indica que las secuencias GATA presentes en estos dos genes son funcionales a pesar de no conformar un elemento  $UAS_{GATA}$ .

De la misma manera que para el gen *UGA4*, nos propusimos estudiar el efecto de los factores GATA Gln3 y Uga43 sobre la interacción de los factores de transcripción Uga3 y Dal81 que actúan sobre los sitios de unión presentes en *UGA1* y *UGA2*. La interacción dependiente de GABA de Uga3 con *UGA1* sigue ocurriendo en ausencia de Gln3 o Uga43, aunque en menor medida, mientras que la interacción de Uga3 con *UGA2* es independiente de Gln3 y Uga43 (Figura 18A). Dal81 interactúa con *UGA1* de manera dependiente de GABA y esta interacción no se ve afectada por Gln3 y aumenta en ausencia de Uga43. Por su parte, Dal81 también interactúa con *UGA2* aunque en este caso Gln3 es el factor que afecta esta interacción mientras que Uga43 no tiene efecto (Figura 18B).



**Figura 18. Efecto de Gln3 y Uga43 sobre la interacción de Uga3 y de Dal81 con los promotores de *UGA1* y de *UGA2*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b) y *uga43Δ* (30078c), transformadas con el plásmido que expresa a Uga3 (pMP-*HA-UGA3*) (A), o con el plásmido que expresa a Dal81 (pSBC-*HA-DAL81*) (B), y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de GABA 0,1 mM durante 30 minutos. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA1*, *UGA2* y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (*Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

Dado que la actividad de Leu3 sobre la expresión de *UGA4* parece ser a través de la interacción de Uga43 (Figura 16), y que *UGA2*, a diferencia de *UGA1* y *UGA4*, no está regulado por Leu3 (Figura 17B), decidimos analizar el efecto de Leu3 sobre la unión de Uga43 con *UGA1* y hacerlo de manera comparativa con *UGA2*. De manera similar a lo observado al analizar el gen *UGA4* (Figura 16A), Uga43 interacciona con el promotor de *UGA1* en ausencia de GABA y esta interacción depende del factor de transcripción Leu3 (Figura 19A). En cambio, no se detecta unión de Uga43 sobre el promotor de *UGA2* (Figura 19B). Estos resultados son similares a los ya descritos (Cardillo et al., 2012) y están de acuerdo con el hecho de que Uga43 no altera la unión de Dal81 con *UGA2* (Figura 18B). De esta manera, el aumento en los niveles de expresión basal de *UGA4* y *UGA1* en la cepa *leu3Δ* (Figura 11B y Figura 17B), sería el resultado de la disminución en el reclutamiento de Uga43 a los promotores de *UGA4* y de *UGA1* (Figura 16A y Figura 19B). Dado que la interacción de Uga43 depende de Leu3, resulta esperable que Uga43 no se detecte unido a *UGA2*, gen que no solo carece de la secuencia consenso de unión de Leu3 sino que no está regulado por este factor de transcripción (Figura 17B). Aún queda por esclarecer por qué mecanismo, independiente de Uga43, se mantiene reprimido *UGA2* en ausencia de inductor.



**Figura 19. Efecto de Leu3 sobre la interacción de Uga43 con los promotores de *UGA1* y de *UGA2*.** Células *wild type* (SBCY41) y células *leu3Δ* (MPY13), que expresan a Uga43-HA, crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de GABA 0,1 mM durante 30 minutos. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA1* (A) (barras negras), una región del promotor de *UGA2* (B) (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

## ***Discusión***

El objetivo de este capítulo fue estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de los genes que forman el regulón *UGA*, *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*, y el mecanismo de *cross-talk* que existe entre los factores de transcripción que actúan sobre los elementos regulatorios que existen en estos genes.

Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que Uga3 y Dal81 interactúan con los promotores de estos genes y que se necesitan mutuamente para dicha interacción (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2012). Además, se demostró que Uga43 y Gln3 son reclutados a los promotores de estos genes (Cardillo et al., 2012; Levi et al., 2012) y que Dal81 y Uga3 afectan el reclutamiento de Uga43 a los promotores de *UGA4* y *UGA1* (Cardillo et al., 2012; Levi et al., 2012). Esto constituyó la primera evidencia de un mecanismo de acción concertada entre los factores GATA que actúan sobre el elemento UAS<sub>GATA</sub>, de respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno, y Dal81 y Uga3 que actúan sobre el elemento UAS<sub>GABA</sub>, de respuesta a inductor.

Los genes *UGA1*, *UGA2* y *UGA4* presentan similitudes en su regulación por lo que conforman el regulón *UGA*. Sin embargo, también presentan diferencias: el factor de transcripción Leu3 regula negativamente a *UGA4* y *UGA1* mientras que no participa en la regulación de *UGA2* (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011).

Cuando evaluamos la participación de los factores de transcripción GATA sobre la regulación de *UGA4*, encontramos que la ausencia de Gln3 no afecta a la inducción. Este resultado se contrapone con los obtenidos por André y col. quienes describieron que la expresión de *UGA4* depende de Gln3 (Andre et al., 1995). Por otra parte, Coffman y col. demostraron que la expresión dependiente de GABA de *UGA1* es independiente de Gln3 (Coffman et al., 1995). Además, nuestros resultados de ChIP demostraron que la interacción de Dal81 y Uga3 con los promotores de los genes *UGA* es independiente de la presencia de Gln3. Por otro lado, la ausencia de Gln3 no impide el crecimiento en presencia del GABA como fuente de nitrógeno (Staschke et al., 2010).

Dado que tanto Gln3 como Gat1 son los activadores GATA podemos inferir que la expresión de *UGA4* en la cepa *gln3Δ* se debe a la actividad de Gat1. Esto se confirmó al observar que la expresión de *UGA4* en ausencia de Gat1 disminuye significativamente. Por lo tanto, Gat1 cumple una función muy importante en la

activación de la transcripción de *UGA4*. Otros autores ya habían sugerido un papel central para Gat1 en la regulación de la expresión de otros genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno (Coffman et al., 1996; Coffman et al., 1997; Georis et al., 2009b; Springael and Penninckx, 2003).

En este trabajo confirmamos que Uga43 es responsable de reprimir la transcripción de *UGA4* en ausencia de inductor (Andre et al., 1993; Georis et al., 2009b; Talibi et al., 1995; Vissers et al., 1989). El aumento en la expresión de *UGA4* al encontrarse ausente Uga43 podría deberse a que Gln3 y Gat1 se pueden unir al promotor, dando lugar a la elevada expresión basal de este gen. Esto se apoya en evidencias previas que mostraron que en ausencia de Uga43, los niveles de Gat1 y su reclutamiento al promotor de *UGA4* aumentan en ausencia de inductor (Georis et al., 2009b).

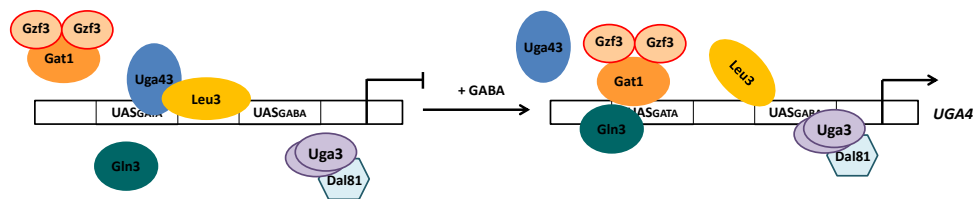
Se ha propuesto que los represores transcripcionales GATA presentan actividades diferentes según el medio de crecimiento: Uga43 reprime la transcripción en presencia de fuentes pobres de nitrógeno, mientras que Gzf3 ejerce su función en fuentes ricas (Cunningham et al., 2000; Soussi-Boudekou et al., 1997). Nuestros resultados demuestran que Gzf3 tiene un efecto sobre la expresión de *UGA4* en presencia de una fuente pobre de nitrógeno como prolina y que ese efecto es positivo, ya que en ausencia de Gzf3 *UGA4* no se expresa. Este hallazgo tiene antecedentes: se ha demostrado que la expresión de los genes *GAP1* y *DAL5*, ambos altamente sensibles a NCR, disminuye en ausencia de Gzf3 (Coffman et al., 1997; Georis et al., 2009a; Georis et al., 2008; Magasanik and Kaiser, 2002). También, Georis y col. postularon que en prolina como fuente de nitrógeno, el factor Gzf3 podría activar diversos genes o ser necesario para estabilizar complejos activadores cuando se une a determinados promotores (Georis et al., 2009b) ya que es capaz de formar dímeros a través del dominio *leucine zipper* (Georis et al., 2009b; Svetlov, 1998). Es más, se ha demostrado que Gzf3 es responsable de secuestrar a Gat1 en el núcleo (Georis et al., 2009b). Entonces, la expresión de *UGA4* en la cepa *gzf3Δ* es muy baja probablemente debido a que en estas condiciones Gat1 no se une al promotor, aumentando así la asociación de Uga43 y quizás también de Leu3.

El hecho de que en ausencia de Uga43 y Gzf3 los niveles de expresión de *UGA4* sean elevados podría deberse a que Gln3 se une libremente, en ausencia de sus

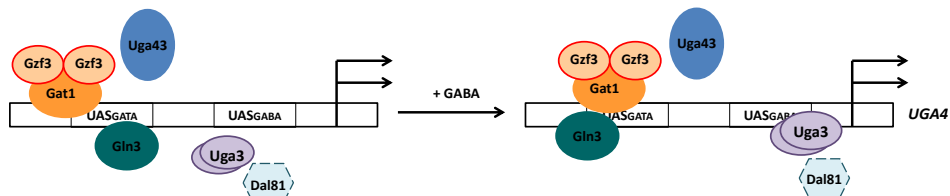
posibles competidores, a sus secuencias blanco presentes en *UGA4*. La deficiencia de Uga43 es epistática sobre Gzf3.

En nuestro laboratorio ya se había demostrado que Gln3 se une al promotor de *UGA4* solamente cuando también se unen Uga3 y Dal81 (Cardillo et al., 2012). Teniendo en cuenta este antecedente, lo demostrado por Georis y col. (Georis et al., 2009b) y los resultados aquí presentados, podemos inferir un mecanismo de regulación (Figura 20). En ausencia de inductor, Uga43 interactúa con los promotores de *UGA4* y de *UGA1*; al agregar el inductor GABA, Uga3 y Dal81 son reclutados al promotor y al mismo tiempo Gln3 y Gat1 desplazan a Uga43, dando lugar a la inducción. En cambio, como en ausencia de Leu3, Uga43 no interactúa con los promotores de *UGA4* y *UGA1*, Gln3 y Gat1 no necesitarían la unión de Uga3 y Dal81 para interactuar con sus secuencias blanco, dando lugar a una elevada expresión aún en ausencia de inductor. En ausencia de Uga43, Leu3 no modifica negativamente la transcripción. Esto indica que, si bien tanto Uga43 como Leu3 tienen un efecto represor de la transcripción de *UGA4* y *UGA1*, Uga43 es el factor que reprime mientras que Leu3 interviene en la estabilidad de su interacción. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que Uga43 no se une al promotor de *UGA2*, gen que no presenta sitio consenso de unión de Leu3 ni se encuentra regulado por este factor. Sería importante demostrar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación la interacción física de Leu3 con Uga43.

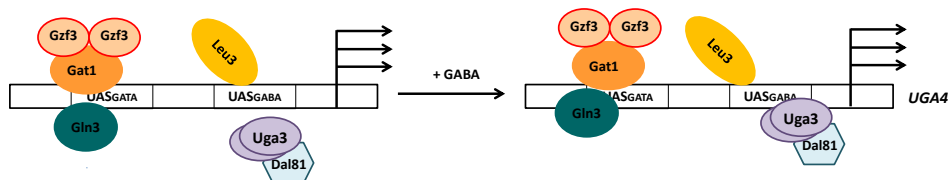
*wild type*



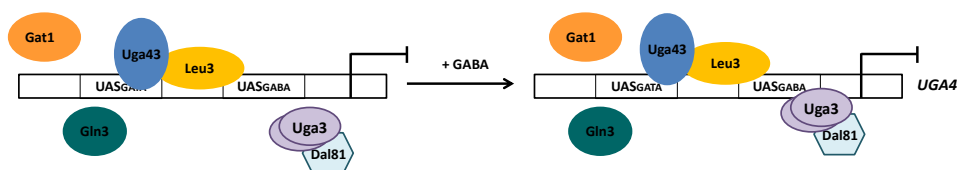
*leu3Δ*



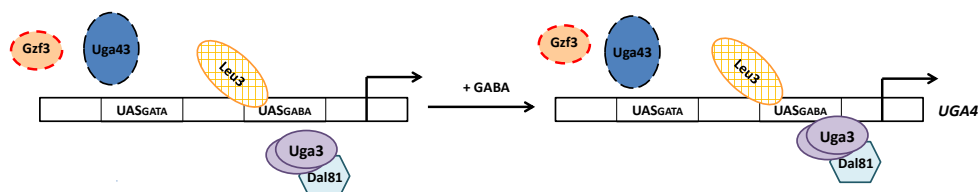
*uga43Δ*



*gzf3Δ*



*gln3Δ gat1Δ*



*gln3Δ gat1Δ leu3Δ*

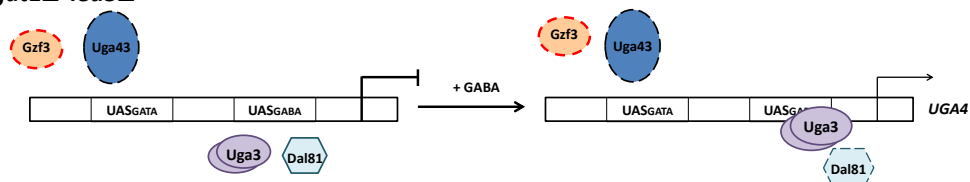


Figura 20. Representación esquemática de la participación de los factores Gln3, Gat1, Uga43, Gzf3, Dal81, Uga3 y Leu3 en la regulación transcripcional del gen *UGA4*.





## Capítulo 2

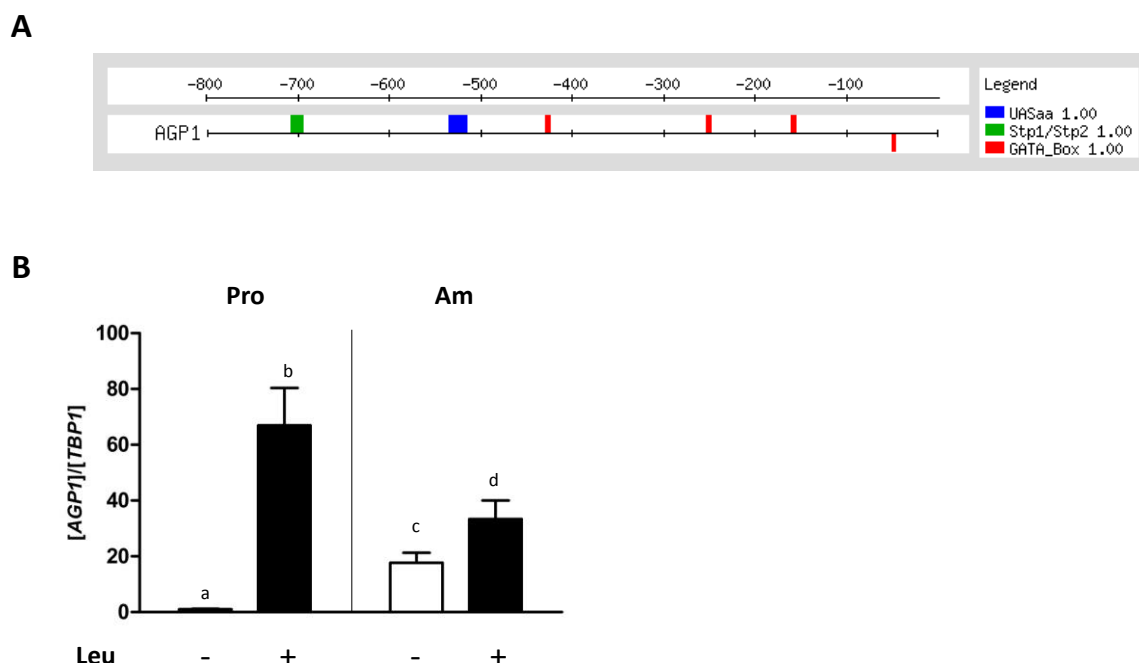
*Regulación transcripcional del gen de la permeasa general de aminoácidos AGP1*



En este capítulo nos centramos en el estudio de la regulación transcripcional del gen de la permeasa general de aminoácidos *AGP1*. En la regulación de esta permeasa están involucrados distintos factores de transcripción, los cuales actúan sobre sus secuencias blanco frente a señales extracelulares específicas, activando o inhibiendo su transcripción.

El análisis *in silico* de la región regulatoria de *AGP1* reveló cuatro sitios de reconocimiento de los factores de transcripción GATA (Figura 21A). La presencia de estos sitios nos llevó a estudiar cómo la calidad de la fuente de nitrógeno afecta a la expresión de *AGP1*. Para ello, se utilizaron células crecidas en medios con amonio y prolina, como fuentes de nitrógeno rica y pobre, respectivamente, y se incubaron en presencia o ausencia del inductor leucina, el cual está descrito como un fuerte activador del gen en estudio (Forsberg et al., 2001a).

La inducción por leucina de *AGP1* se observa solamente en células crecidas en prolina (Figura 21B). En cambio, en amonio, aunque la expresión basal es mayor a la observada en prolina, la inducción es significativamente menor. Este resultado es el esperado ya que este gen fue previamente descrito como sujeto a NCR (Abdel-Sater et al., 2004b; Regenberg et al., 1999).

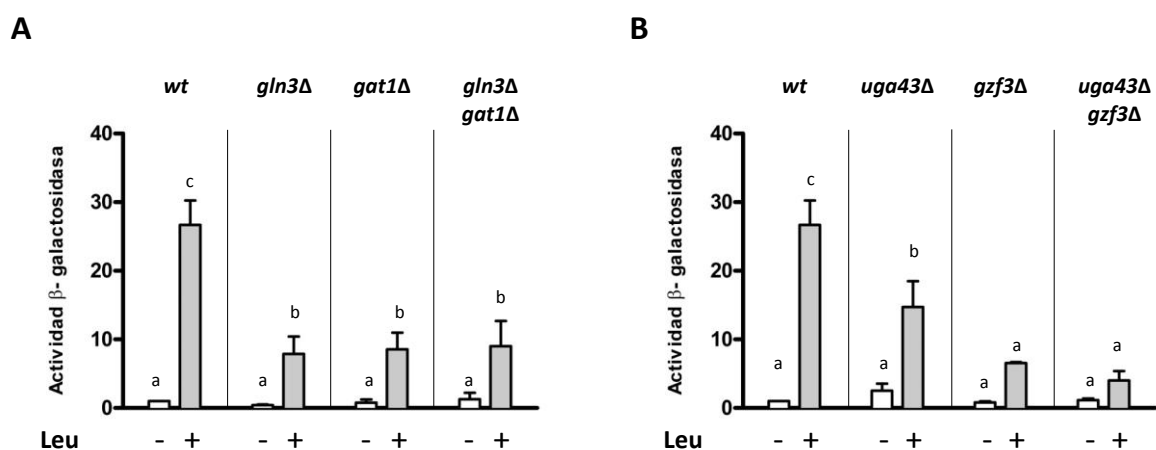


**Figura 21. A) Esquema de la región promotora del gen *AGP1*.** Se muestran en azul el elemento UAS<sub>AA</sub>, en verde el sitio de unión para Stp1/2 y en rojo los sitios de unión para los factores GATA. **B) Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *AGP1*.** Células *wild type* (23344c), crecidas en medio mínimo con prolina o amonio como fuentes de nitrógeno, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no

(barras blancas) de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de *AGP1* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Abdel-Sater y col. describieron la participación de Gln3 en la regulación transcripcional de *AGP1*, el cual actuaría amplificando la respuesta a los aminoácidos extracelulares (Abdel-Sater et al., 2004b). Con el fin de evaluar la participación de los otros miembros de la familia GATA, Gat1, Uga43 y Gzf3, sobre la expresión de *AGP1*, realizamos ensayos de  $\beta$ -galactosidasa en cepas deficientes en estos factores de transcripción.

La ausencia de Gln3 y/o Gat1 produce una drástica disminución de la inducción de *AGP1* (Figura 22A). Esto sugiere que la actividad de Gln3 y Gat1 sobre *AGP1* no es redundante.



**Figura 22. Participación de los factores GATA positivos (A) y negativos (B) en la regulación de *AGP1*.** Células *wild type* (23344c), *gln3*Δ (30505b), *gat1*Δ (32164b), *gln3*Δ *gat1*Δ (34411c), *uga43*Δ (30078c), *gzf3*Δ (SBS10), *uga43*Δ *gzf3*Δ (50000b), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* y cultivadas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

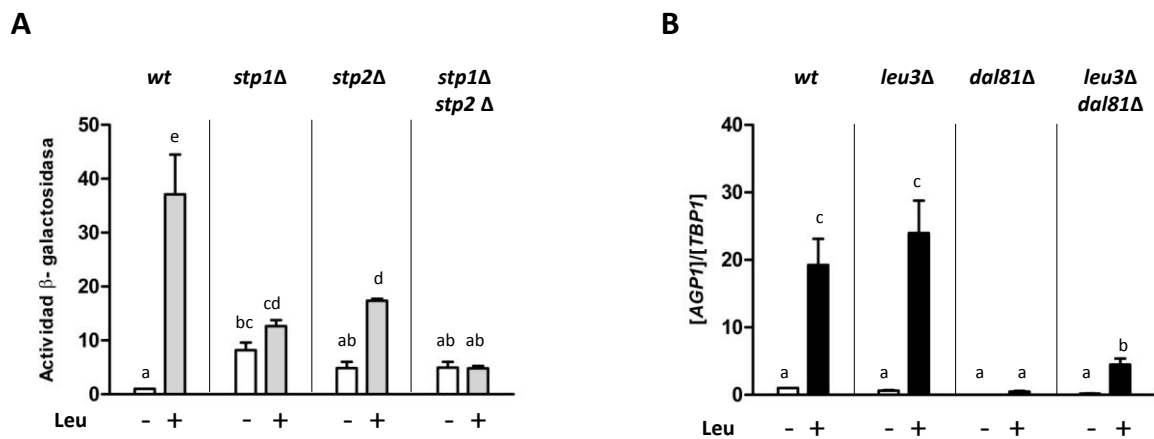
Analizamos también el efecto de los factores GATA previamente descriptos como negativos, Uga43 y Gzf3, sobre la expresión de *AGP1* (Figura 22B). La ausencia de estos factores afecta negativamente esta expresión. Es decir que estos factores

producen un efecto positivo sobre *AGP1*, siendo el de *Uga43* un efecto más leve que el de *Gzf3*. El efecto positivo de *Gzf3* sobre la expresión es similar a su efecto sobre la expresión de *UGA4* (Figura 12). Georis y col. postularon la posible formación de hetero-complejos entre *Gzf3* y *Gat1* (Georis et al., 2009b). De esta manera, la interacción de *Gat1* con sus secuencias blanco dependería de *Gzf3*. Esto podría explicar el efecto positivo de *Gzf3* sobre la transcripción de *AGP1*. Cabe aclarar que Abdel-Sater y col. (Abdel-Sater et al., 2004b) no detectaron efecto de *Uga43*, ni de *Gzf3* ni de *Gat1* sobre la expresión de *AGP1*. Estas diferencias probablemente se deban a la fuente pobre de nitrógeno (urea) y/o a la construcción promotor-gen reportero por ellos utilizadas.

El elemento  $UAS_{AA}$  (5'-AGGGTGCCGTCTAAGCGGCAC-3') de *AGP1* (Figura 21A) está conformado por secuencias CGG de reconocimiento para *Stp1/2*. Además se ha descrito la participación de *Dal81* en la regulación transcripcional de *AGP1* y se propuso que lo haría también a través del mismo  $UAS_{AA}$  (Abdel-Sater et al., 2004b; Boban and Ljungdahl, 2007; Iraqui et al., 1999b; Wielemans et al., 2010). Estos antecedentes nos llevaron a profundizar el estudio de la participación de *Dal81*, *Stp1* y *Stp2* en la expresión de *AGP1*. Si bien el promotor de *AGP1* no presenta sitios característicos de unión de *Leu3*, decidimos analizar su efecto sobre la regulación de *AGP1*. Esto se basa en que *Leu3* tiene un claro efecto en la expresión de *UGA4* aunque no se lo detecte unido y que *Leu3* modifica la actividad de *Dal81* (Cardillo et al., 2010).

La inducción de *AGP1* depende de *Stp1* y también, en contra de lo observado previamente (Abdel-Sater et al., 2004b), depende de *Stp2* (Figura 23A).

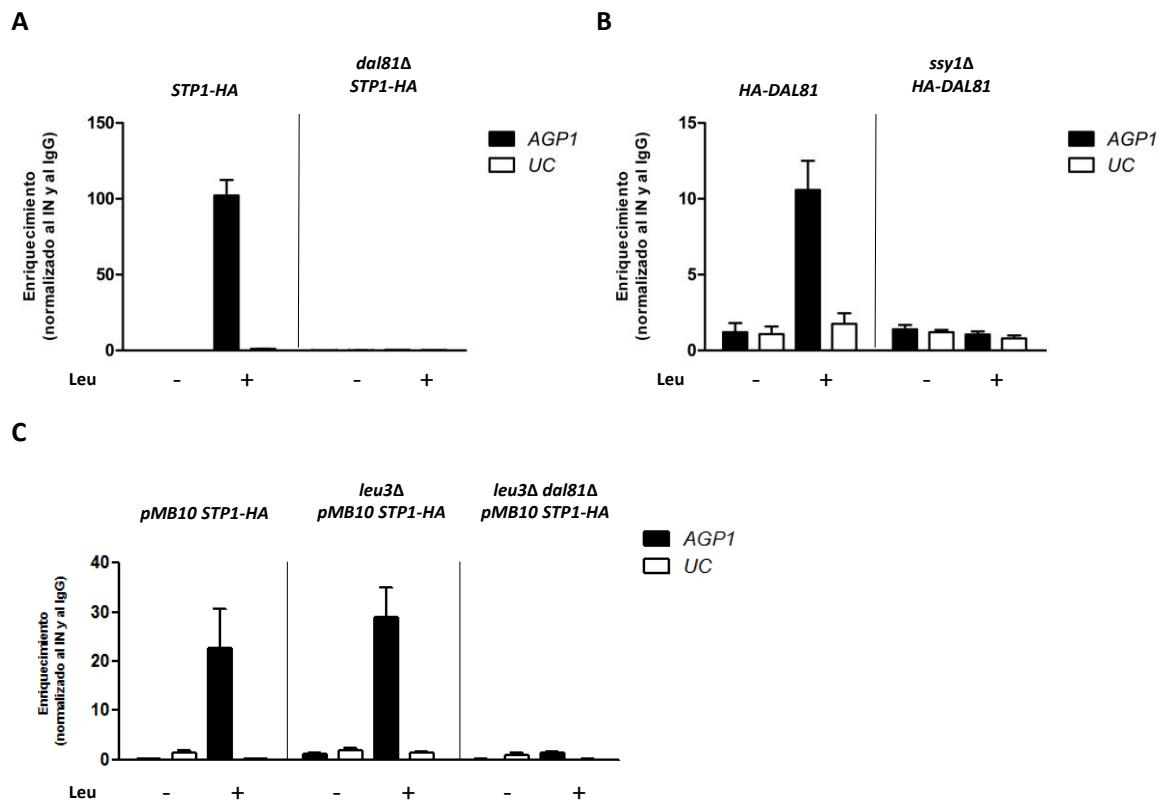
La inducción de *AGP1* en la cepa *leu3Δ* es similar a la determinada en la cepa *wild type*, indicando que *Leu3* no participa en la regulación de *AGP1*. En cambio, la ausencia de *Dal81* provoca una drástica disminución de la expresión de *AGP1*. Este resultado era el esperado por lo propuesto previamente por otros autores (Abdel-Sater et al., 2004b; Boban and Ljungdahl, 2007; Iraqui et al., 1999b; Wielemans et al., 2010).



**Figura 23. A) Participación de Stp1 y Stp2 en la expresión de AGP1.** Células *wild type* (23344c), *stp1Δ* (KW18), *stp2Δ* (KW21) y *stp1Δ stp2Δ* (KW23), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. **B) Participación de Leu3 y Dal81 en la expresión de AGP1.** Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *dal81Δ* (SBCY17) y *leu3Δ dal81Δ* (SBCY20), crecidas en medio mínimo con prolina se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de *AGP1* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media ± EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

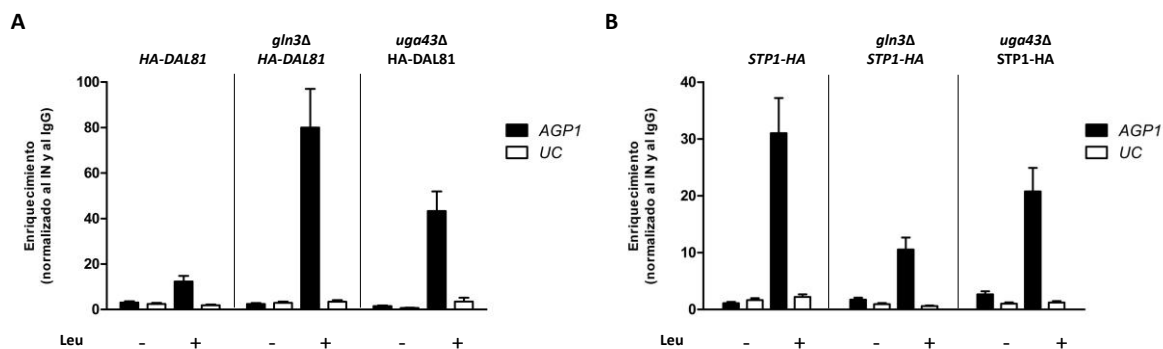
Mediante ensayos de ChIP demostramos que el efecto de Stp1 sobre la inducción de *AGP1* es consecuencia de su interacción (Figura 24A), probablemente a través del  $UAS_{AA}$ . Esta interacción solamente ocurre luego de la incubación de las células con leucina. En la mutante *dal81Δ*, Stp1 no se une al promotor de *AGP1*, lo que confirma las evidencias previas de que Dal81 contribuye al reclutamiento de Stp1 sobre *AGP1* (Boban and Ljungdahl, 2007). Además, Dal81, al igual que Stp1, se une a *AGP1* de manera dependiente de leucina (Figura 24B). Esta interacción también depende de Stp1, ya que en la cepa *ssy1Δ*, en la que los factores Stp1/2 no se activan, no se detecta interacción de Dal81 con *AGP1*. De esta manera, demostramos que la interacción de Dal81 y Stp1 con *AGP1* solo ocurre simultáneamente, de manera similar a lo observado para Dal81 y Uga3 con *UGA4* (Cardillo et al., 2012).

Por otra parte, como esperábamos por la falta de efecto de Leu3 sobre la expresión de *AGP1* (Figura 23B), este factor de transcripción no altera la interacción de Stp1 con *AGP1* (Figura 24C).



**Figura 24. Interacción de Stp1 y Dal81 con el promotor de *AGP1*.** **A)** Células *wild type* (DEBY01) y células *dal81Δ* (DEBY02) que expresan a Stp1-HA, **B)** células *wild type* (SBCY10) y células *ssy1Δ* (SBCY24) que expresan a HA-Dal81 y **C)** células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01) y células *leu3Δ dal81Δ* (SBCY20) transformadas con el plásmido pMB10 que expresa a la proteína de fusión Stp1-HA, crecidas en medio mínimo, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante una hora. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *AGP1* o una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (*Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

Luego, analizamos si la interacción de Dal81 y Stp1 a la región regulatoria de *AGP1* depende de los factores GATA Gln3 y Uga43. Dal81 se une a *AGP1* aún en ausencia de Gln3 y Uga43 (Figura 25A). Es más, estos factores GATA parecen tener un efecto negativo sobre la interacción de Dal81. Por otro lado, Stp1 se sigue detectando unido aún en las cepas *uga43Δ* y *gln3Δ* aunque la interacción parece ser menor en esta última cepa (Figura 25B). Considerando que demostramos que ambos factores Dal81 y Stp1 dependen uno del otro para su interacción, estos resultados parecen contradictorios.



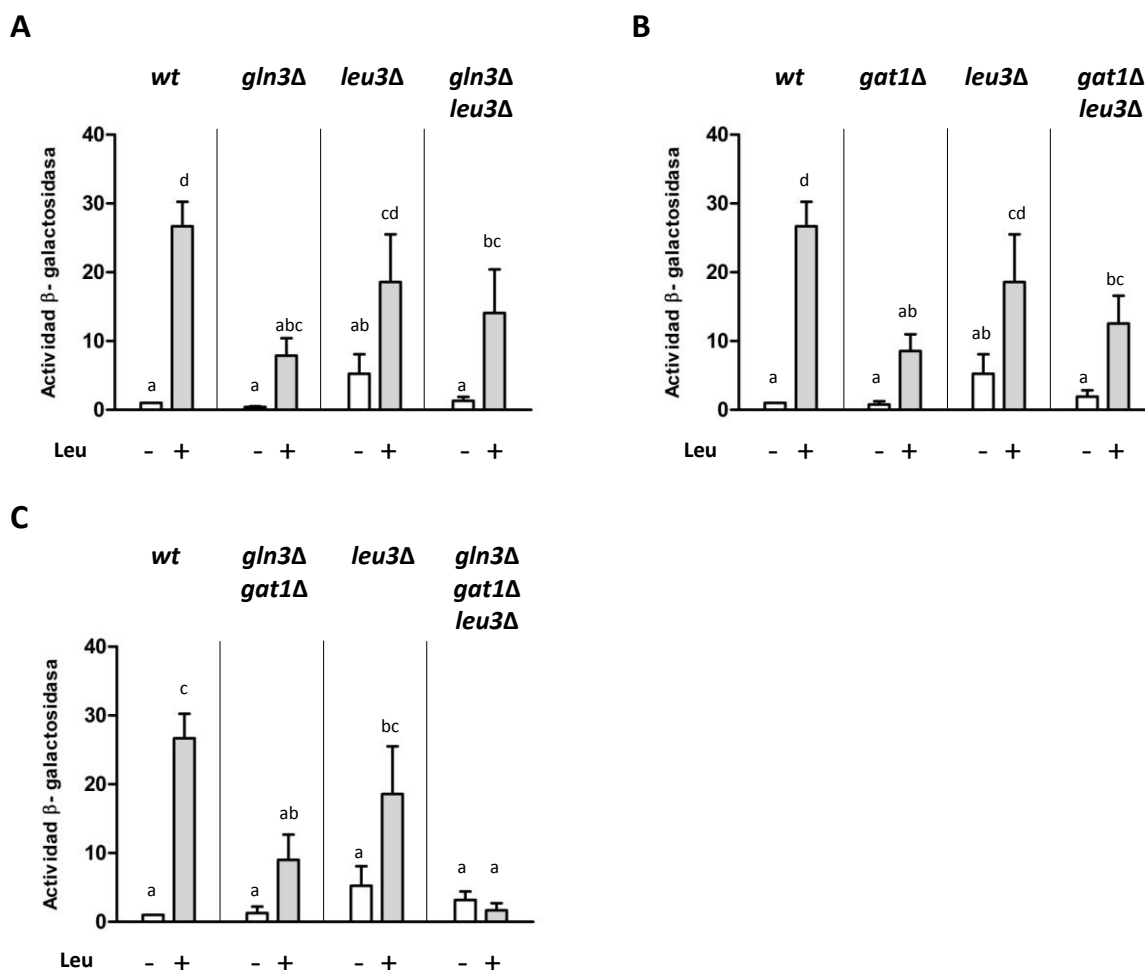
**Figura 25. Efecto de Gln3 y Uga43 sobre la interacción de Dal81 y de Stp1 con el promotor de *AGP1*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b) y *uga43Δ* (30078c), transformadas con el plásmido que expresa a HA-Dal81 (pSBC-*HA-DAL81*) (A) o que expresa a Stp1-HA (pMB10-*STP1-HA*) (B), y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *AGP1* (barras negras) y una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

En la mutante *leu3Δ* la expresión de *DAL81* es muy baja y no se detecta interacción de Dal81 sobre *UGA4* (Cardillo et al., 2010). Dal81 es esencial para la expresión de *AGP1* (Figura 23B) y para la interacción de Stp1 con este gen (Figura 24A). Sin embargo, en la cepa *leu3Δ*, Stp1 sigue interactuando con *AGP1* (Figura 24C) y la expresión de *AGP1* es similar a la de la cepa *wild type* y significativamente mayor que en la *dal81Δ* (Figura 23B). Por otra parte, los resultados obtenidos al analizar la regulación de *UGA4*, sugirieron que la interacción de Uga43 sobre *UGA4* depende de Leu3 (Figura 16). Por estos antecedentes, decidimos continuar analizando la participación de Leu3 en la regulación de *AGP1*.

Para cumplir con este objetivo, analizamos mediante ensayos del gen reportero *LacZ*, la expresión de *AGP1* en mutantes deficientes en los factores GATA y en Leu3. La expresión de *AGP1* en la cepa *wild type* aumenta al incubar a las células con leucina y además la ausencia de Leu3 produce una inducción similar a la de la cepa *wild type* (Figura 26). Sin embargo, mediante este tipo de ensayo, se detecta una expresión basal en la cepa *leu3Δ* mayor que en la *wild type*, a diferencia de los resultados obtenidos por RT-qPCR (Figura 23B).

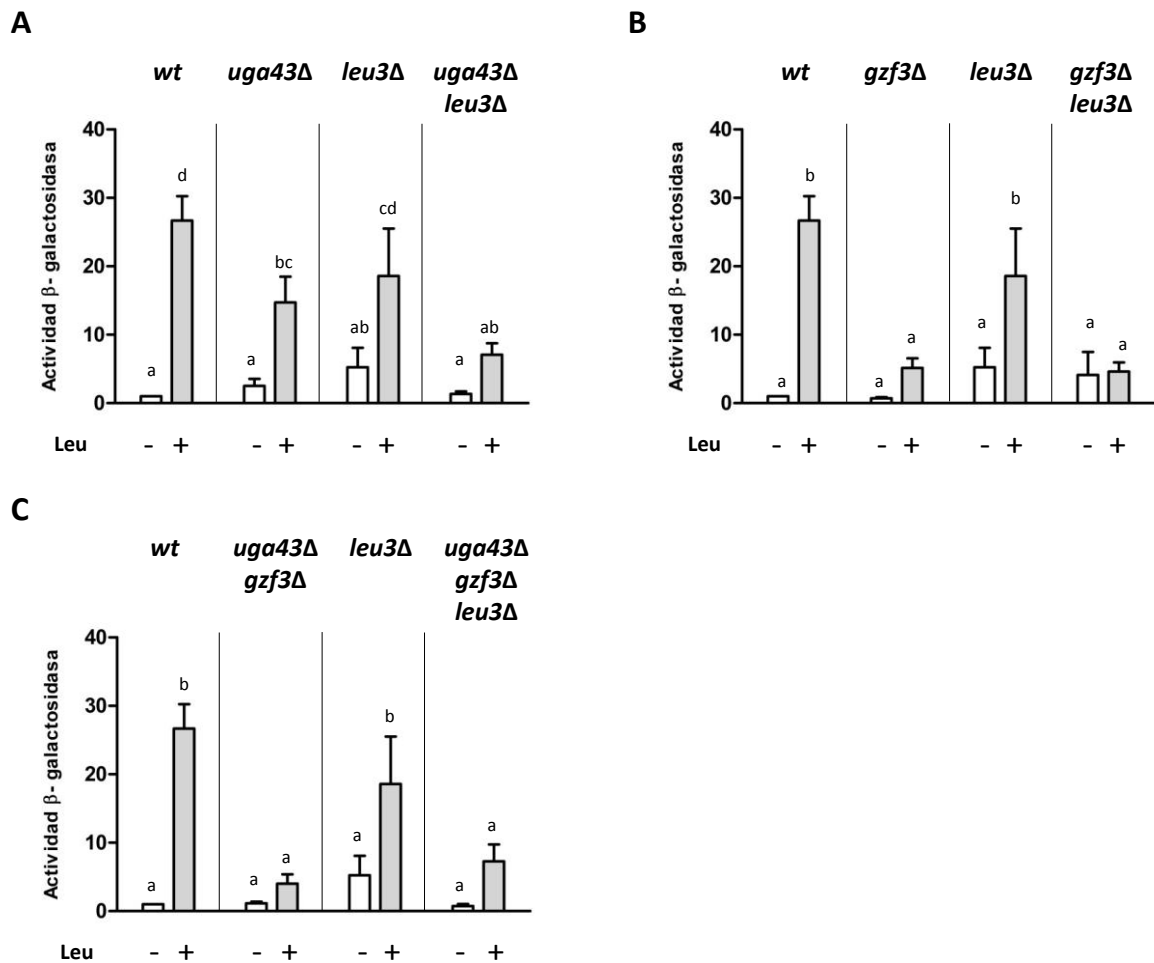


Leu3 no tiene efecto sobre la expresión de *AGP1* aún cuando Gln3 y Gat1 están ausentes (Figura 26C).



**Figura 26. Efecto de los factores GATA positivos y Leu3 sobre la expresión de *AGP1*.** Células wild type (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *gln3Δ* (30505b), *gat1Δ* (32164b), *gln3Δ gat1Δ* (34411c), *gln3Δ leu3Δ* (MPY14), *gat1Δ leu3Δ* (MPY18), *gln3Δ gat1Δ leu3Δ* (MPY16), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* y cultivadas en medio mínimo, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

La inducción de *AGP1* en la cepa *leu3Δ*, al igual que en la *wild type*, depende de los factores GATA Uga43 y Gzf3, ya que no se detecta inducción en las dobles mutantes (Figura 27A y B), así como tampoco en la triple mutante (Figura 27C).



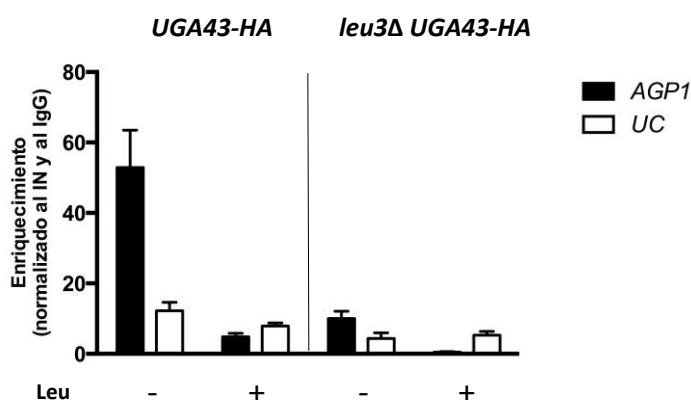
**Figura 27. Efecto de los factores GATA negativos y Leu3 sobre la expresión de *AGP1*.** Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), *uga43Δ leu3Δ* (MPY15), *gzf3Δ leu3Δ* (MPY17), *uga43Δ gzf3Δ leu3Δ* (MPY19), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* y cultivadas en medio mínimo, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media ± EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Hasta donde tenemos conocimiento, Uga43 siempre se describió como un factor negativo sobre la expresión de los genes sujetos a NCR. Sin embargo, nuestros resultados muestran que Uga43 no tiene efecto negativo sobre la expresión de *AGP1*. Por este motivo, decidimos comprobar si este factor de transcripción interacciona con la región regulatoria de *AGP1*.

Llamativamente, Uga43 es reclutado al promotor de *AGP1* en ausencia de leucina y esta interacción disminuye en presencia de inductor (Figura 28). Por otra parte, al igual que lo que ya observamos para *UGA4*, la interacción de Uga43 depende de Leu3.

Sin embargo, Leu3 regula a *UGA4* pero no a *AGP1*. Esto se debe a que el efecto de Uga43 es distinto sobre ambos genes. Uga43 reprime la expresión de *UGA4* en ausencia de inductor lo que produce una expresión basal muy baja que aumenta significativamente en las mutantes *uga43Δ* y *leu3Δ*. En cambio, Uga43 no es responsable de la baja expresión basal de *AGP1*, por lo tanto su ausencia o la de Leu3 no producen un efecto significativo sobre la expresión. Aún no hemos esclarecido el mecanismo, independiente de Uga43, por el cual la expresión basal de *AGP1* se mantiene baja ni cuál es la función de Uga43 en la regulación de *AGP1*.

Estos resultados sugieren que el efecto de Leu3 como facilitador de la unión de Uga43 al ADN podría ser un mecanismo general de los genes sensibles al nitrógeno.

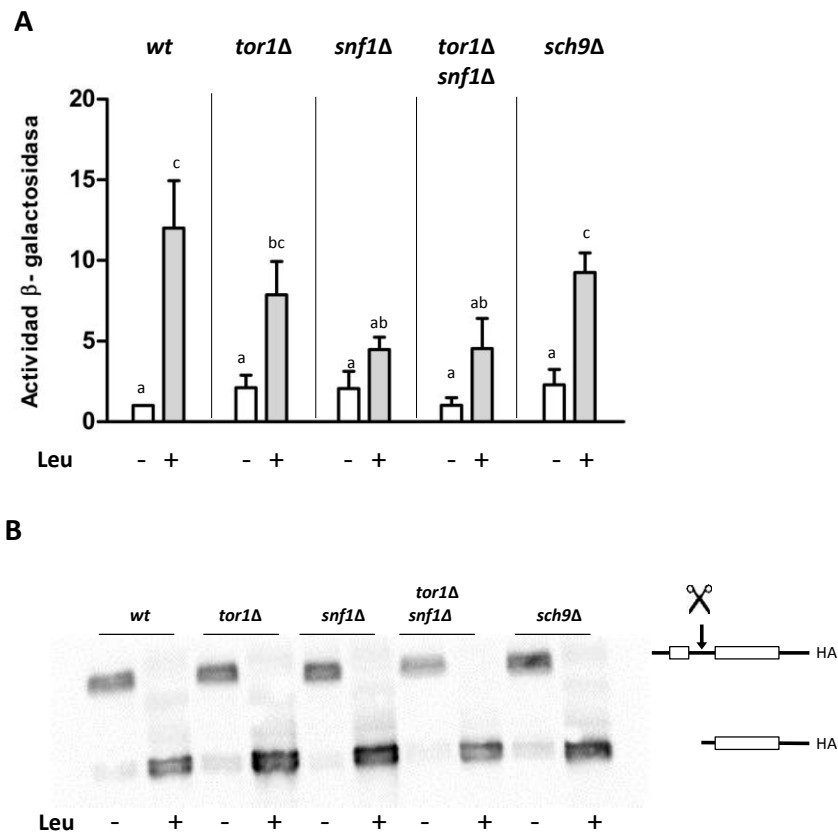


**Figura 28. Interacción de Uga43 con el promotor de *AGP1*.** Células *wild type* (SBCY41) y células *leu3Δ* (MPY13) que expresan a Uga43-HA, cultivadas en medio mínimo, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *AGP1* (barras negras), o una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

Para intentar lograr una mejor comprensión del mecanismo de NCR al que está sujeto *AGP1*, teniendo en cuenta que NCR es el proceso que lleva a la ausencia de activación transcripcional, que la actividad de los factores GATA positivos, Gln3 y Gat1, depende de su grado de fosforilación (Beck and Hall, 1999; Kulkarni et al., 2006), y que a su vez este proceso depende de la actividad de las quinasas TORC1, Snf1 y Sch9, analizamos su participación en la expresión de *AGP1*.

Comparando la expresión de *AGP1* en mutantes deficientes en las quinasas TORC1, Snf1 y Sch9, encontramos que esta expresión solamente se modifica en las células deficientes en Snf1, siendo significativamente menor que en la *wild type*.

Para descartar que el efecto de Snf1 sobre la expresión de *AGP1* esté mediado por cambios en el procesamiento/activación de Stp1, analizamos el clivado de este factor y encontramos que ninguna de las tres quinasas estudiadas tiene efecto sobre este proceso (Figura 29B).



**Figura 29. Efecto de las quinasas Tor1, Snf1 y Sch9 sobre la expresión de *AGP1*.** **A)** Células *wild type* (23344c), *tor1* $\Delta$  (TOY01), *snf1* $\Delta$  (MPY01), *tor1* $\Delta$  *snf1* $\Delta$  (CELY02), y *sch9* $\Delta$  (CRY01), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1*-lacZ y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ). **B)** Efecto de las quinasas Tor1, Snf1 y Sch9 sobre el procesamiento de Stp1. Células *wild type* (23344c), *tor1* $\Delta$  (TOY01), *snf1* $\Delta$  (MPY01), *tor1* $\Delta$  *snf1* $\Delta$  (CELY02), y *sch9* $\Delta$  (CRY01), transformadas con el plásmido pMB10 y cultivadas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora incubación, las células se cosecharon, se extrajeron proteínas y se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 10%.

## *Discusión*

En este capítulo estudiamos la regulación transcripcional del gen de la permeasa *AGP1*, involucrada en la incorporación de un amplio espectro de aminoácidos (Iraqi et al., 1999b; Schreve et al., 1998). La expresión de *AGP1* se encuentra bajo el control del sistema SPS.

Encontramos que *AGP1* es sensible a NCR de acuerdo con lo reportado por otros grupos (Abdel-Sater et al., 2004b; Regenberg et al., 1999; Schreve et al., 1998). Cuando estudiamos la participación de cada uno de los miembros de la familia GATA sobre la expresión de *AGP1* encontramos que tanto Gln3 como Gat1 son esenciales para lograr la máxima inducción y la ausencia de un factor no puede ser compensada por la presencia del otro. Resultados similares fueron obtenidos por Schreve y col. quienes describieron además que la participación de Gln3 y Gat1 sobre la expresión de *AGP1* depende del medio de crecimiento que se utilice (Schreve et al., 1998). Esto podría justificar el hecho de que Abdel-Sater y col. hayan descrito solamente a Gln3 como la responsable de amplificar la expresión de *AGP1* en urea como fuente de nitrógeno (Abdel-Sater et al., 2004b).

El factor GATA Uga43 tiene un efecto positivo sobre la expresión de *AGP1*. Esto resulta contradictorio ya que Uga43 reprime la expresión de *GAT1* y además compite con Gat1 por la unión a genes blanco, como *GAP1* (Georis et al., 2009b). Iraqi y col., al estudiar la regulación por aminoácidos aromáticos del gen *ARO9*, gen sensible a NCR y dependiente de inductor (Iraqi et al., 1999a), también observaron un efecto positivo de Uga43. Llamativamente, Uga43 se une a *AGP1* en ausencia de inductor, mientras que en su presencia, cuando tiene efecto positivo, no lo detectamos unido. Es decir que detectamos la unión en las condiciones en las que no detectamos su efecto. Por otra parte, de manera equivalente a lo observado al analizar la regulación del gen *UGA4*, la interacción de Uga43 con *AGP1* depende de Leu3.

De manera similar a lo observado al analizar la regulación del gen *UGA4*, en ausencia de Gzf3 los niveles de expresión de *AGP1* son menores a los de la cepa *wild type* y a los de la cepa deficiente en Uga43. Los resultados obtenidos en este capítulo y en el anterior refuerzan la propuesta de Georis y col. (Georis et al., 2009b), de que Gzf3 podría tener un efecto positivo en la expresión de diversos genes sometidos a NCR. A pesar de que se ha planteado que Gzf3 ejerce su acción en presencia de fuentes ricas de nitrógeno, nuestros resultados demuestran que Gzf3 regula la

expresión de *AGP1* en prolina; por lo tanto sería interesante estudiar el reclutamiento de Gzf3 a este promotor en estas condiciones.

Como ya fue descrito por otros autores (Abdel-Sater et al., 2004b; Boban and Ljungdahl, 2007; Iraqui et al., 1999b; Wielemans et al., 2010) encontramos que Dal81, Stp1 y Stp2 promueven la inducción de *AGP1*. En este trabajo demostramos que Dal81 interactúa con *AGP1* en respuesta a leucina y que esta interacción depende de Stp1. También demostramos que la interacción de Stp1 depende de Dal81. De esta manera encontramos un mecanismo similar de respuesta a inductor para dos pares de factores diferentes: Dal81-Uga3 actuando sobre los genes *UGA* y Dal81-Stp1 sobre *AGP1*.

Por otro lado, Gln3 y Uga43 no impiden la interacción de Stp1 ni de Dal81 con *AGP1* por lo que, para este gen, aún no hemos encontrado evidencias de una acción concertada entre los factores que actúan en respuesta a diferentes estímulos.

Por último, nuestros resultados demuestran que la quinasa Snf1 está involucrada en la regulación por leucina de *AGP1* a pesar de que la máxima actividad de Snf1 ocurriría en condiciones de baja glucosa (Hedbacker and Carlson, 2008). Estudios previos en nuestro laboratorio, no evidenciaron cambios en el estado de fosforilación de Gln3 ni en su localización en nuestras condiciones de trabajo (Levi et al., 2012). Consultando la base de datos *Phosphogrid* (<http://www.phosphogrid.org/>) (Sadowski et al., 2013), encontramos que los factores de transcripción Stp1, Stp2, Leu3 o Dal81 presentan sitios que podrían ser blancos de fosforilación de quinasas tales como *Casein kinase I* (CKI), MAPK, *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK-3) *Casein Kinase II* (CKII) y PKA. Teniendo en cuenta estos datos, la quinasa Snf1 podría estar actuando de manera indirecta sobre estos factores modulando su actividad.

## Capítulo 3

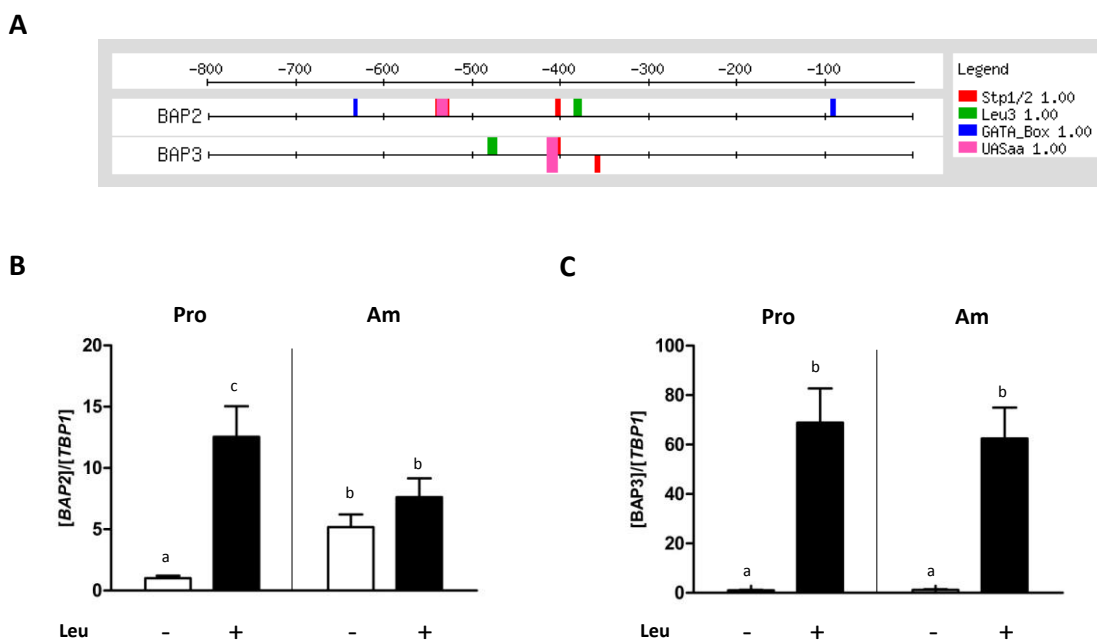
*Regulación transcripcional de los genes de las permeasas de aminoácidos ramificados BAP2 y BAP3*





En este capítulo estudiaremos la regulación de los genes de las permeasas de aminoácidos ramificados, *BAP2* y *BAP3*. Esta regulación involucra varios de los factores de transcripción que regulan a los genes *UGA* y *AGP1*.

La región regulatoria de *BAP2* presenta dos sitios de reconocimiento para los factores de transcripción GATA a diferencia de *BAP3* que carece de este tipo de secuencias (Figura 30A).



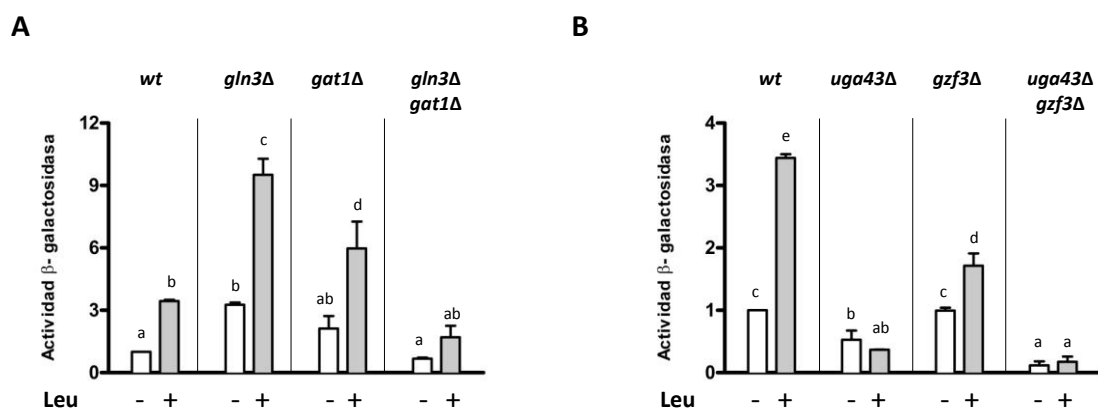
**Figura 30. A) Esquema de la región promotora de *BAP2* y de *BAP3*.** Se muestran en rojo los sitios de unión para Stp1/2, en verde el sitio de unión para Leu3, en azul los sitios de unión para los factores GATA y en rosa el elemento. **B y C) Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de los genes *BAP2* y *BAP3*.** Células *wild type* (23344c), cultivadas en medio mínimo con prolina o amonio como fuentes pobre y rica de nitrógeno, respectivamente, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los valores de *BAP2* (**B**) y *BAP3* (**C**) se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Estudiamos el efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *BAP2* y *BAP3*. En prolina la expresión de *BAP2* es absolutamente dependiente de inductor, mientras que en amonio la expresión basal es mayor que en prolina y no se detecta inducción por leucina (Figura 30B).

La expresión de *BAP3* en presencia de inductor no varía con la fuente de nitrógeno utilizada (Figura 30C), lo que está de acuerdo con la ausencia de sitios GATA en su región promotora. Además, la expresión de *BAP3* es estrictamente dependiente del inductor, ya que los niveles basales tanto en amonio como en prolina son muy bajos, a diferencia de lo observado para *BAP2* (Figura 30B) y *AGP1* (Figura 21B).

Teniendo en cuenta que hay autores que demostraron que *BAP2* (Forsberg et al., 2001a) está regulado por NCR mientras que otros publicaron lo contrario (Kodama et al., 2002; Nielsen et al., 2001), analizamos el efecto de los factores de transcripción GATA sobre *BAP2*. Paralelamente realizamos los mismos ensayos sobre *BAP3*, gen no sometido a NCR.

En cepas deficientes en Gln3 o en Gat1, la expresión basal de *BAP2* así como también su inducción aumentan significativamente (Figura 31A). Esto sugiere que en ausencia de uno de los dos factores positivos, el otro estaría activando la transcripción; sin embargo, esto no justifica que los valores aumenten. De acuerdo con esto, en ausencia de los dos activadores al mismo tiempo la expresión de *BAP2* disminuye, aunque es llamativo que la expresión resulta similar a la observada en la cepa *wild type*.

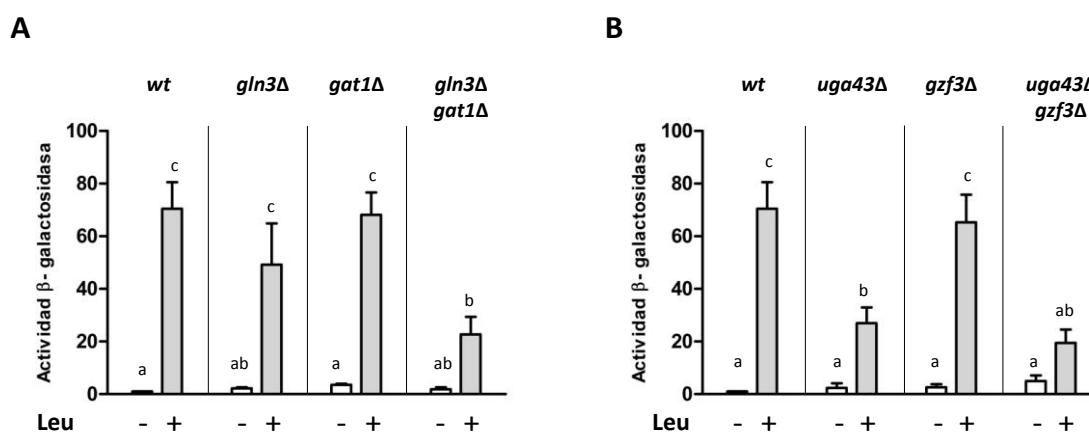


**Figura 31. Participación de los factores GATA positivos (A) y negativos (B) en la regulación de *BAP2*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b), *gat1Δ* (32164b), *gln3Δ gat1Δ* (34411c), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP2-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

La mutación *uga43Δ* produce un efecto negativo en la expresión de *BAP2* (Figura 31B) aunque no pudimos detectar interacción de Uga43 con *BAP2* en ninguna de las condiciones ensayadas (resultados no presentados). En ausencia de Gzf3 la expresión basal es similar a la de la cepa *wild type* mientras que la inducción es menor. Al encontrarse ausentes ambos represores, la expresión de *BAP2* disminuye hasta niveles comparables al basal. Estos resultados demuestran que la expresión de *BAP2* en prolina depende de la presencia de Uga43 y de Gzf3.

A pesar de que *BAP3* no presenta sitios GATA en su región promotora y como de los experimentos anteriores pudimos concluir que de alguna manera los miembros de esta familia influyen en la expresión de *AGP1* y *BAP2*, posiblemente de manera indirecta, modificando la interacción con el ADN de aquellos factores de transcripción que actúan a través del elemento  $UAS_{AA}$ , decidimos estudiar la influencia de los factores de transcripción GATA en la expresión de *BAP3*, ya que estas permeasas podrían compartir un mecanismo regulatorio.

Las mutaciones *gln3Δ* y *gat1Δ* no producen un efecto significativo sobre la expresión de *BAP3* (Figura 32A). Sin embargo, la ausencia de ambos factores resulta en una disminución de la inducción. Por otra parte, Uga43 produce un efecto positivo en la expresión de *BAP3* mientras que Gzf3 no parece participar en esta regulación (Figura 32B). Los bajos valores de inducción detectados en la cepa *gln3Δ gat1Δ*, similares a los de la cepa *uga43Δ*, probablemente sean consecuencia de que en la doble mutante prácticamente no se expresa *UGA43* (Luzzani et al., 2007).

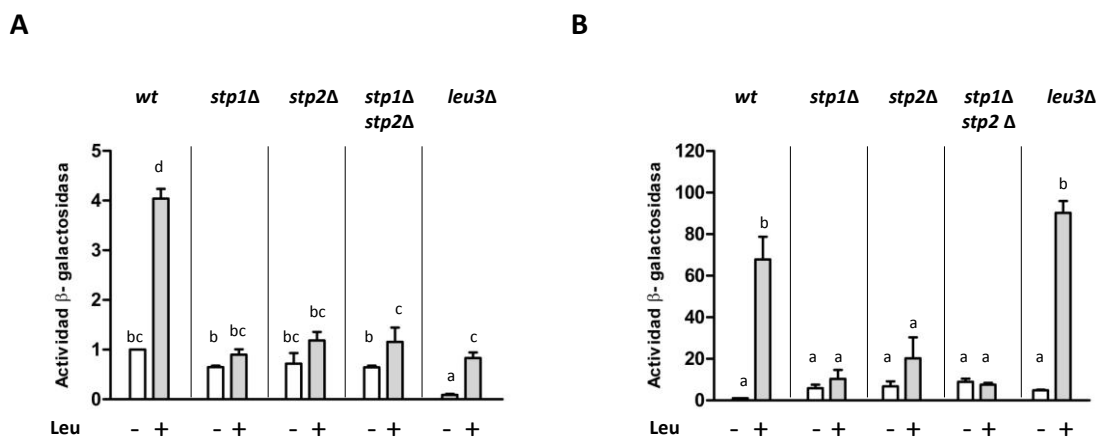


**Figura 32. Participación de los factores GATA positivos (A) y negativos (B) en la regulación de *BAP3*.** Células *wild type* (23344c), *gln3Δ* (30505b), *gat1Δ* (32164b), *gln3Δ gat1Δ* (34411c), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP3-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina

1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de 3 por lo menos experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

También analizamos la participación de Stp1, Stp2 y Leu3 en la regulación de *BAP2* y *BAP3* ya que ambos poseen en sus regiones regulatorias sitios consenso de unión para estos factores (Figura 30A).

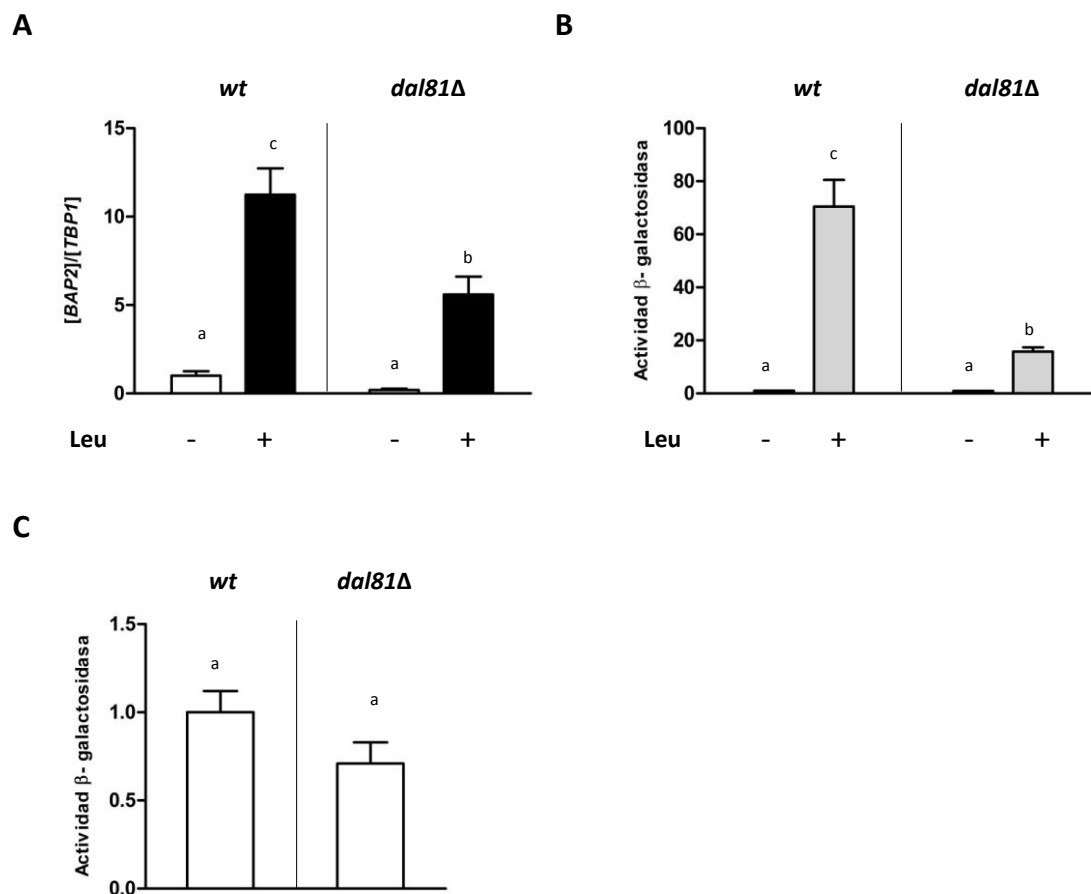
La expresión de *BAP2* y de *BAP3* depende de los factores Stp1 y Stp2 (Figura 33). Esto ya había sido demostrado por otros autores (De Boer et al., 1998; de Boer et al., 2000; Nielsen et al., 2001). También confirmamos que Leu3 regula la expresión de *BAP2* (Figura 33A), siendo esencial para su inducción (Nielsen et al., 2001) mientras que no participa en la regulación de *BAP3* (Figura 33B). De Boer y col. (De Boer et al., 1998) propusieron un efecto represor de Leu3 en ausencia de inductor. Nuestros resultados no apoyan esta propuesta.



**Figura 33. Participación de Stp1, Stp2 y Leu3 en la expresión de *BAP2* (A) y de *BAP3* (B).** Células *wild type* (23344c), *stp1* $\Delta$  (KW18), *stp2* $\Delta$  (KW21), *stp1* $\Delta$  *stp2* $\Delta$  (KW23) y *leu3* $\Delta$  (SBCY01) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP2-lacZ* o *BAP3-lacZ*, crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

En la simple mutante *dal81* $\Delta$  la inducción por leucina de *BAP2* es menor a la de la cepa *wild type* (Figura 34A) como mostraron Bernard y André (Bernard and Andre, 2001a). Dal81 regula positivamente la expresión de *BAP3* (Figura 34B). Hasta donde

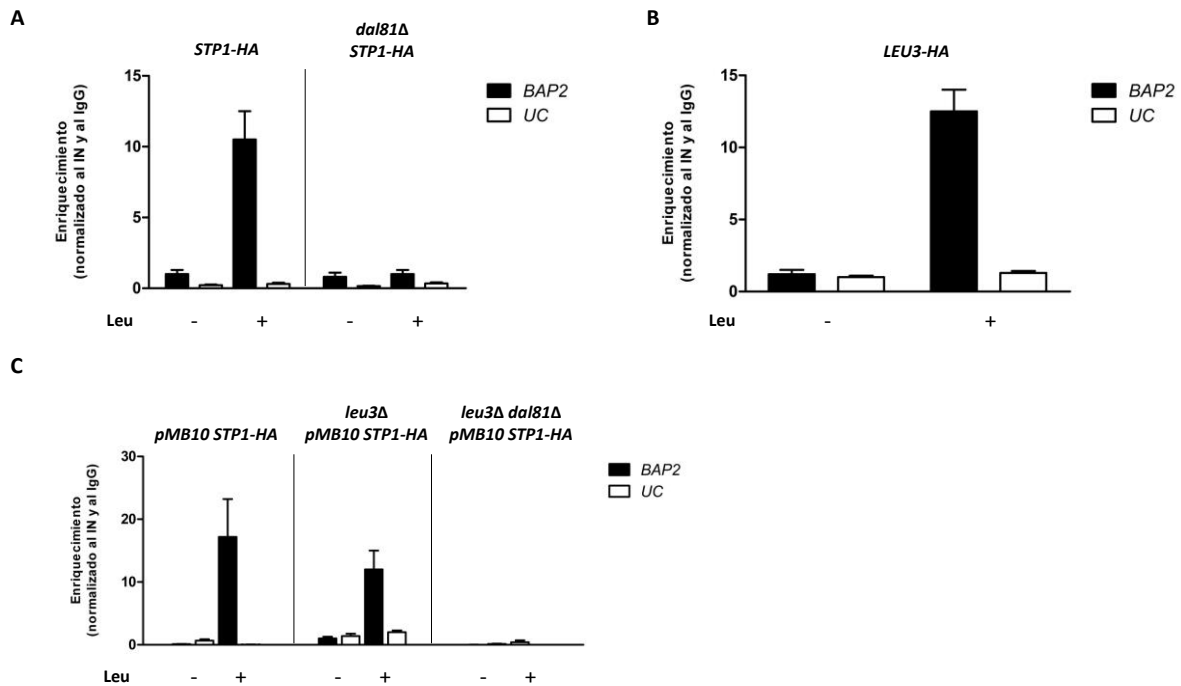
se tiene información, no hay antecedentes publicados de la participación de Dal81 en la regulación de *BAP3*.



**Figura 34. A) Participación de Dal81 en la expresión del gen *BAP2*.** Células *wild type* (23344c), y *dal81Δ* (SBCY17) crecidas en medio mínimo con prolina se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3mM durante 1 hora. Se midieron los niveles de ARNm mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión de *BAP2* se normalizaron con respecto al gen de expresión constitutiva *TBP1*. **B) Participación de Dal81 en la expresión del gen *BAP3*.** Células *wild type* (23344c), y *dal81Δ* (SBCY17), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP3-lacZ*, crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras grises) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. **C) Efecto de Dal81 sobre la expresión de *LEU3*.** Células *wild type* (23344c), y *dal81Δ* (SBCY17), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *LEU3-lacZ*, crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la cepa *wild type* sin inducir y representan la media ± EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

El hecho de que ni *BAP2* ni *BAP3* posean secuencias consenso de unión de Dal81 sugiere que su efecto probablemente sea indirecto. Como Leu3 participa de la inducción de *BAP2*, analizamos la posibilidad de que Dal81 estuviera afectando la

expresión de *LEU3*. Luego de descartar esa posibilidad (Figura 34C), estudiamos si el efecto de Dal81 es a través de cambios en la interacción de Stp1 al promotor de *BAP2*. Stp1 interacciona con *BAP2* solamente en presencia del inductor leucina y esta interacción depende de Dal81 (Figura 35A). De la misma manera que describimos en el capítulo anterior para *AGP1* (Figura 24), Stp1 requiere la presencia de Dal81 para su interacción con el gen blanco. Sin embargo, en este caso no pudimos detectar interacción de Dal81 con *BAP2* (resultados no presentados).



**Figura 35. A) Efecto de Dal81 sobre la interacción de Stp1 con *BAP2*.** Células *wild type* (DEBY01) y células *dal81Δ* que expresan a Stp1-HA (DEBY02) cultivadas en medio mínimo, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante 1 hora. **B) Interacción de Leu3 sobre el promotor de *BAP2*.** Células *wild type* que expresan a Leu3-HA (SBCY02) crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante 1 hora. **C) Efecto de Leu3 sobre la interacción de Stp1 con *BAP2*.** Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01) y *leu3Δ dal81Δ* (SBCY20) transformadas con el plásmido pMB10 que expresa a la proteína de fusión Stp1-HA, crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon e incubaron en presencia o ausencia de leucina 1,3 mM durante 1 hora. Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *BAP2* (barras negras), o una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (*Unbound Control*, UC, barras blancas). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes.

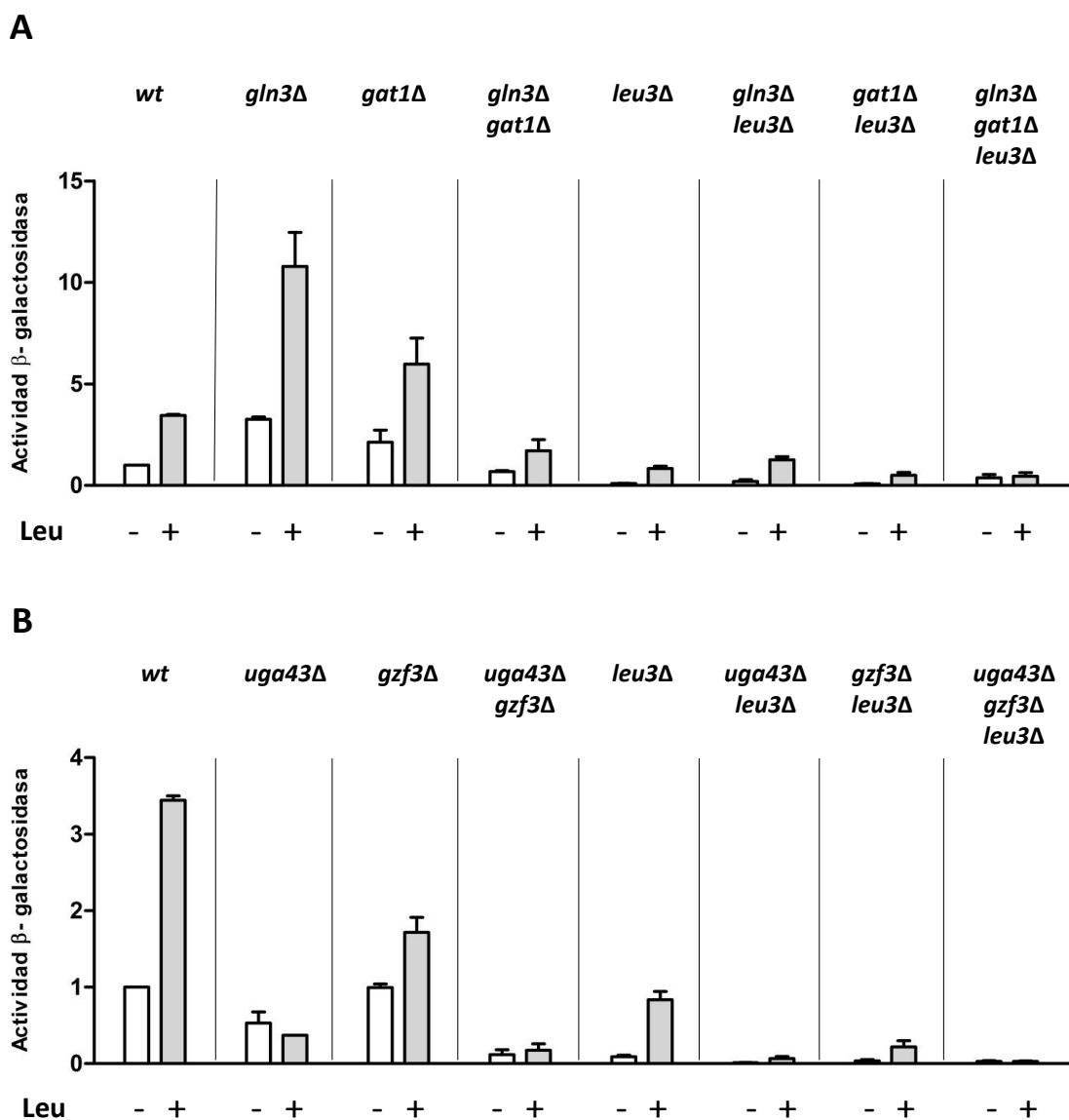
Leu3, el otro factor necesario para la inducción de *BAP2*, interacciona con este gen (Figura 35B) aunque no es necesario para la interacción de Stp1 (Figura 35C). Al

---

igual que en la cepa *dal81Δ*, en la doble mutante *dal81Δ leu3Δ* no se detecta interacción de Stp1 con *BAP2*.

Ya que los factores GATA tienen cierto efecto sobre la expresión de *BAP2* y que Leu3 es esencial para la inducción, decidimos estudiar si los mecanismos de acción de estos factores, que actúan sobre secuencias de ADN diferentes, están relacionados.

La elevada expresión de *BAP2* en ausencia de Gln3 o Gat1 depende de Leu3 ya que disminuye significativamente en las cepas *gln3Δ leu3Δ* y *gat1Δ leu3Δ* (Figura 36A). Por otra parte, el efecto positivo de Leu3 es independiente del efecto de los factores Uga43 y Gzf3, ya que la expresión observada en las cepas *uga43Δ* y *gzf3Δ* disminuye aún más cuando también está ausente Leu3 (Figura 36B). Esto, junto con el hecho de que no detectamos unión entre Uga43 y *BAP2* (resultados no presentados), sugiere que el efecto positivo de Uga43 sobre *BAP2* no estaría mediado por Leu3 a diferencia de lo propuesto para la regulación de *AGP1*.



**Figura 36.** Efecto de los factores GATA positivos (A), negativos (B) y Leu3 sobre la expresión de *BAP2*. Células *wild type* (23344c), *leu3Δ* (SBCY01), *gln3Δ* (30505b), *gat1Δ* (32164b), *gln3Δ gat1Δ* (34411c), *gln3Δ leu3Δ* (MPY14), *gat1Δ leu3Δ* (MPY18), *gln3Δ gat1Δ leu3Δ* (MPY16), *uga43Δ* (30078c), *gzf3Δ* (SBS10), *uga43Δ gzf3Δ* (50000b), *uga43Δ leu3Δ* (MPY15), *gzf3Δ leu3Δ* (MPY17), *uga43Δ gzf3Δ leu3Δ* (MPY19), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP2-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico de las Figuras 36A y B se encuentran en el Apéndice.

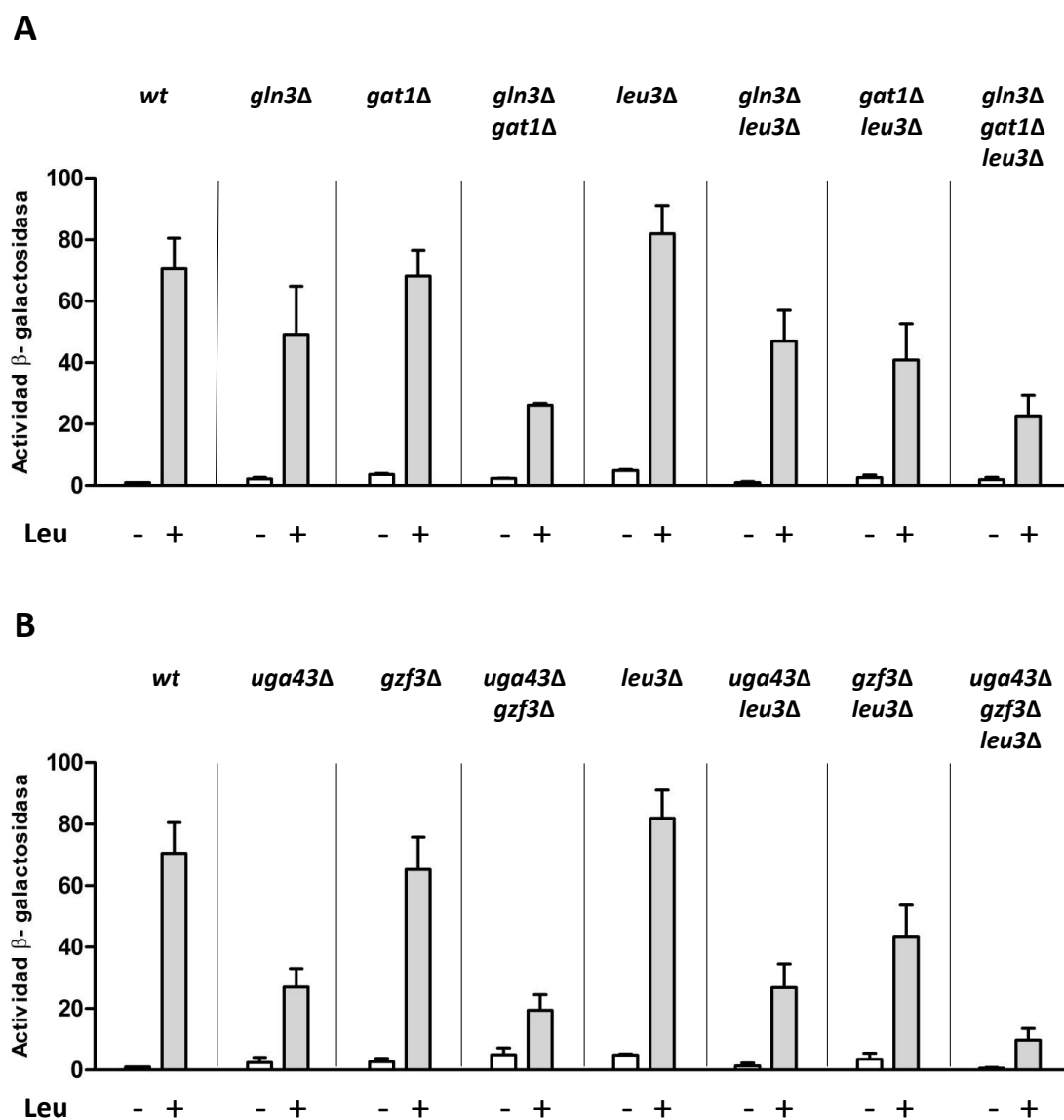
A pesar de que el promotor de *BAP3* no presenta sitios consenso de unión para los factores GATA, Uga43 regula la expresión de *BAP3* (Figura 32B). *BAP3* presenta un sitio de reconocimiento donde podría interactuar Leu3 (Figura 30A), aunque no detectamos efecto de este factor sobre la expresión (Figura 33B). Además, en la



regulación de *AGP1*, la actividad de Uga43 depende de Leu3 (Figura 28). Por todo esto, decidimos analizar la expresión de *BAP3* en ausencia de los factores GATA y Leu3.

Como ya vimos, Leu3 no tiene efecto sobre *BAP3*. Cuando no están presentes Gln3 y/o Gat1, Leu3 tampoco participa de esta regulación. A su vez, Gln3 y Gat1, que no actúan sobre *BAP3*, siguen sin hacerlo en ausencia de Leu3 (Figura 37A).

El efecto de Uga43 sobre *BAP3* es independiente de Leu3 (Figura 37B), de manera similar a lo observado para *BAP2* (Figura 36B).



**Figura 37. Efecto de los factores GATA positivos (A), negativos (B) y Leu3 sobre la expresión de *BAP3*.** Células *wild type* (23344c), *leu3*Δ (SBCY01), *gln3*Δ (30505b), *gat1*Δ (32164b), *gln3*Δ *gat1*Δ (34411c), *gln3*Δ *leu3*Δ (MPY14), *gat1*Δ *leu3*Δ (MPY18), *gln3*Δ *gat1*Δ *leu3*Δ (MPY16), *uga43*Δ (30078c), *gzf3*Δ (SBS10), *uga43*Δ *gzf3*Δ (50000b), *uga43*Δ *leu3*Δ (MPY15), *gzf3*Δ *leu3*Δ (MPY17), *uga43*Δ *gzf3*Δ *leu3*Δ (MPY19), transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP3-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al

mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, las células se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico de las Figuras 37A y B se encuentran en el Apéndice.

## Discusión

El objetivo general de este capítulo fue dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de los genes de las permeasas *BAP2* y *BAP3*.

La región regulatoria de *BAP2* posee sitios 5'-GAT(T/A)A-3', de reconocimiento para los factores GATA, mientras que *BAP3* no posee dichas secuencias, lo que justifica el hecho de que *BAP3* no sea sensible a NCR. En cambio, encontramos que *BAP2* está sometida a NCR. Varios grupos describieron que la expresión de *BAP2* no depende de la fuente de nitrógeno analizada, (Didion et al., 1996; Grauslund et al., 1995; Nielsen et al., 2001). Probablemente esto se deba a que en estos trabajos se emplearon cepas del *background* genético S288C, en el cual el amonio no se comporta como una fuente rica de nitrógeno si se la analiza desde el punto de vista de la respuesta transcripcional (Magasanik and Kaiser, 2002). *BAP2* presenta un perfil de expresión similar al observado en *AGP1*, esto es: ambas son sensibles a NCR e inducibles por leucina.

Uga43 regula positivamente la expresión de *BAP2* y de *BAP3*, de manera similar a lo descrito al analizar la regulación de *AGP1*. Sin embargo, en el caso de *BAP2* y *BAP3* esta regulación parece ser indirecta ya que no se detecta interacción entre Uga43 y *BAP2* y además *BAP3* no tiene secuencias GATA.

Los factores Stp1 y Stp2 son los efectores finales de la vía SPS (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Tanto *BAP2* como *BAP3* presentan sitios de unión para Stp1/2. A diferencia de lo observado por Nielsen y col. (Nielsen et al., 2001), quienes describieron que Stp1 puede sustituir a Stp2 en la expresión de *BAP2*, nuestros resultados demuestran que tanto Stp1 como Stp2 son indispensables para la expresión de *BAP2* y de *BAP3*. Esta aparente contradicción podría atribuirse nuevamente al *background* genético y a las condiciones de crecimiento utilizados. Por otra parte, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por de Boer y col., quienes demostraron que la ausencia de Stp1 y/o Stp2 produce una importante disminución en la expresión de *BAP3* (de Boer et al., 2000).

Stp1 interactúa con el promotor de *BAP2* de manera dependiente de Dal81, al igual que lo observado para *AGP1*. Esto explica que, a pesar de que no pudimos detectar interacción entre Dal81 y *BAP2*, no ocurre inducción de *BAP2* en una cepa *dal81Δ*.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Nielsen y col. (Nielsen et al., 2001) encontramos que la expresión de *BAP2* depende fuertemente de la presencia de Leu3. Este efecto podría ser indirecto y deberse a que en la cepa *leu3Δ* la expresión de Dal81 es muy baja (Cardillo et al., 2010). Sin embargo, probablemente también haya un efecto directo ya que demostramos que Leu3 interacciona de manera dependiente de leucina con *BAP2*. Como la unión de Stp1 depende de Dal81, y Stp1 sigue interactuando con sus secuencias blanco en ausencia de Leu3, el efecto indirecto no parece probable.

En conclusión, la regulación transcripcional de *BAP2* y *BAP3* presenta diferencias y similitudes. A pesar de que no poseen secuencias de unión para Dal81, la expresión de ambas permeasas depende fuertemente de la presencia de Dal81. Por otro lado la expresión de estas permeasas necesita la acción concertada de Stp1 y de Stp2 sobre el elemento  $UAS_{AA}$ . Leu3 demostró actuar como un activador de la expresión de *BAP2*, mientras que no posee efecto en la expresión de *BAP3*. Por otro lado, los factores GATA actúan de manera diferencial en la expresión de *BAP2* y *BAP3*.

## Capítulo 4

*Papel central de Dal81 en la regulación del catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno*



Cuando las células de *S. cerevisiae* se encuentran en un medio que contiene varias fuentes de nitrógeno de diferente calidad, utilizan estas fuentes de un modo selectivo.

Dal81 es un factor de transcripción involucrado en la regulación de genes que permiten la incorporación y el metabolismo de fuentes alternativas de nitrógeno como GABA, leucina y alantoína. El grupo de André (Abdel-Sater et al., 2004b) fue el primero en proponer la existencia de una jerarquía en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno, mediada por Dal81. En nuestro laboratorio encontramos que el reclutamiento de Dal81, dependiente de GABA, a los promotores *UGA* disminuye en presencia de leucina (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2011). Estos fueron los primeros resultados que apoyaron la hipótesis del grupo de André.

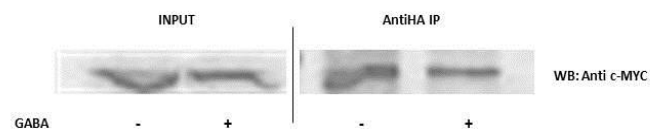
En base a estos antecedentes, nos propusimos estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la utilización jerarquizada de fuentes pobres de nitrógeno tales como GABA, leucina y alofanato.

En los procesos estudiados hasta ahora, Dal81 actúa en forma conjunta con otro factor de transcripción específico del inductor de cada vía: Uga3 en la inducción por GABA de los genes del regulón *UGA* (Andre, 1990; Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2012), Stp1 en la inducción por aminoácidos de permeasas como Agp1 y Bap2 (Abdel-Sater et al., 2004b; Bernard and Andre, 2001a; Boban and Ljungdahl, 2007; Iraqui et al., 1999b), y Dal82 en la inducción por alofanato de los genes *DUR* y *DAL* (Andre and Jauniaux, 1990a; Jacobs et al., 1980; Olive et al., 1991).

Si bien Dal81 posee un dominio de dedos de zinc  $Zn(II)_2-Cys_6$  de unión al ADN (MacPherson et al., 2006), dicho dominio no es requerido para que Dal81 cumpla su función en la inducción por alofanato del gen *DUR1/2* (Bricmont et al., 1991) ni en la inducción por GABA de los genes *UGA* (Cardillo et al., 2012). Mediante ensayos de doble híbrido se demostró interacción entre los factores de transcripción Dal82 y Dal81, y se propuso que Dal82 sería el puente entre Dal81 y el ADN (Scott et al., 2000). Boban y col. encontraron que Dal81 facilita la interacción de Stp1 al promotor de *AGP1* (Boban and Ljungdahl, 2007) y en este trabajo de tesis demostramos que Stp1 y Dal81 se necesitan mutuamente para interactuar con el elemento  $UAS_{AA}$  presente en dicho promotor. En nuestro laboratorio demostramos, por ensayos de ChIP, que Uga3 y Dal81 se necesitan mutuamente para interactuar con los promotores *UGA* y presentamos evidencias de que Uga3 actuaría como puente entre Dal81 y el ADN (Cardillo et al., 2012). Con el objetivo de determinar si Uga3 y Dal81 se encuentran

asociados físicamente, como fue descrito para Dal82 y Dal81, se hicieron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, previamente se construyeron cepas que expresan a Uga3 y a Dal81 fusionadas a epítopes diferentes.

Como se observa en la Figura 38, luego de la inmunoprecipitación de Dal81 se detecta a Uga3 tanto en células pre-incubadas con GABA como en células no tratadas. Este resultado, si bien fue llamativo ya que previamente habíamos demostrado que Uga3 y Dal81 son reclutados a los promotores *UGA* de manera dependiente de GABA (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2012), demuestra la interacción de Uga3 con Dal81 aún en ausencia de GABA. Resultados similares se obtuvieron con la cepa *6HA-UGA3-9-cMYC-DAL81* (MPY07).



**Figura 38. Uga3 y Dal81 se encuentran asociados físicamente.** Células de la cepa MPY10 (*HA-DAL81 c-MYC-UGA3*), crecidas en medio mínimo con prolina como fuente de nitrógeno, se incubaron o no durante 30 minutos con GABA 0,1mM. Luego, las células se lisaron y 1 mg de proteínas totales se inmunoprecipitaron con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-HA. Los inmunocomplejos se analizaron mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-c-Myc. Como *input*, se utilizó un 10% del extracto proteico total.

Teniendo en cuenta los resultados recién descriptos, nos propusimos evaluar el rol de Dal81 en la activación jerarquizada de distintas vías inducibles de utilización de fuentes pobres de nitrógeno.

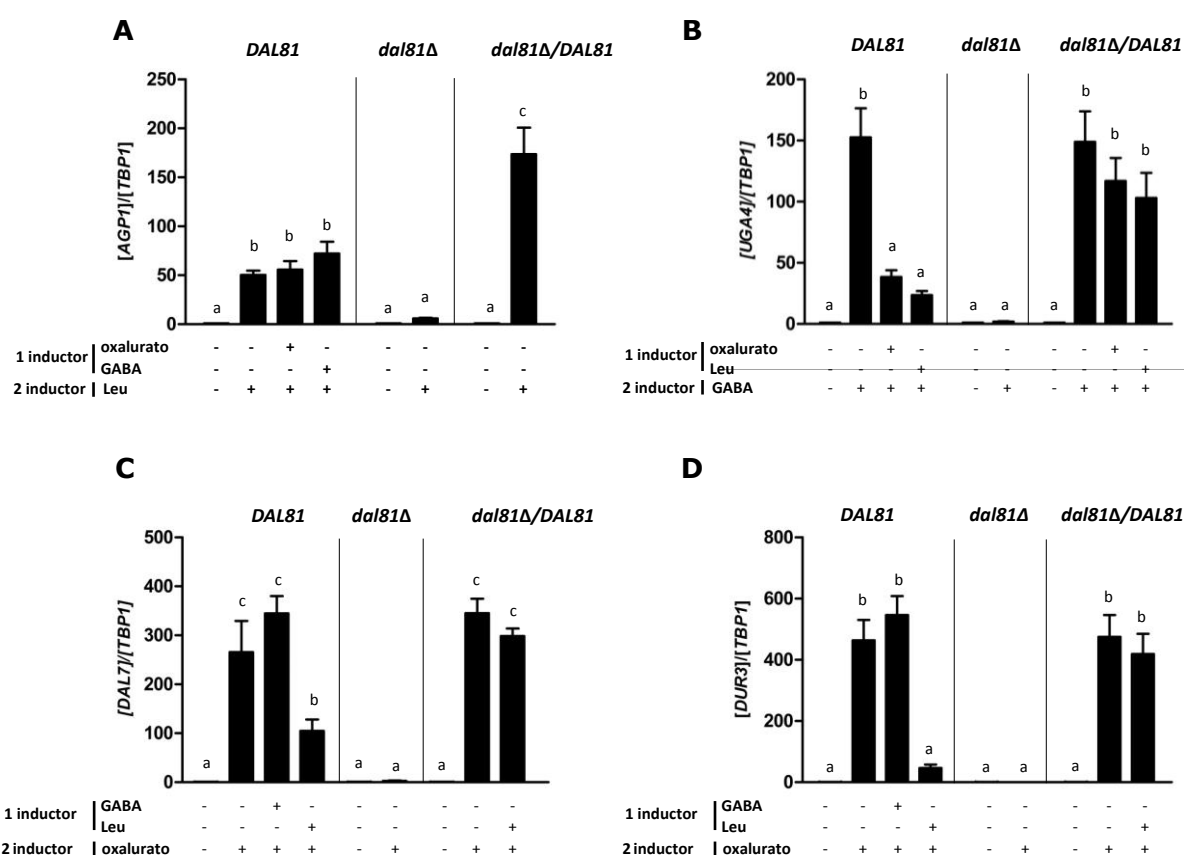
En primer lugar, analizamos cómo distintos inductores como GABA, leucina u oxalurato modifican la expresión de genes regulados por Dal81: *AGP1*, *UGA4*, *DAL7* y *DUR3*. Para ello, se incubaron células en presencia de uno o dos inductores y se midió expresión de dichos genes mediante RT-qPCR. La inducción del gen *AGP1* por leucina no es afectada al pre-incubar a las células con GABA u oxalurato (Figura 39A, panel izquierdo). Por otro lado, la inducción del gen *UGA4* por GABA disminuye al agregar leucina u oxalurato (Figura 39B, panel izquierdo); mientras que la presencia de leucina, pero no de GABA, disminuye la inducción por oxalurato de los genes *DAL7* y *DUR3* (Figuras 39C y D, paneles izquierdos). Estos resultados indican que existe una jerarquía en la expresión de genes que determinan el uso de las tres fuentes pobres de



nitrógeno analizadas: en primer lugar las células utilizarían leucina, luego alantoína y por último, GABA.

Por otra parte, confirmamos que la inducción de los genes *AGP1*, *UGA4*, *DAL7* y *DUR3* depende de Dal81 (Figura 39, paneles medios), ya que la expresión de estos genes es muy baja en la cepa *dal81Δ*.

También analizamos la expresión de los genes *AGP1*, *UGA4*, *DAL7* y *DUR3* en células que expresan a Dal81 bajo el control del promotor fuerte y constitutivo *GPD1*, de tal manera que la cantidad de la proteína Dal81 no fuera limitante. En la Figura 39 (paneles derechos) se observa que la expresión inducida por GABA de *UGA4* no disminuye al incubar a las células con leucina u oxalurato y tampoco disminuye la expresión de *DAL7* o *DUR3* al incubar a las células con leucina. De esta manera, demostramos que en presencia de un exceso de Dal81 la utilización de leucina, alantoína y GABA no ocurre de manera secuencial.



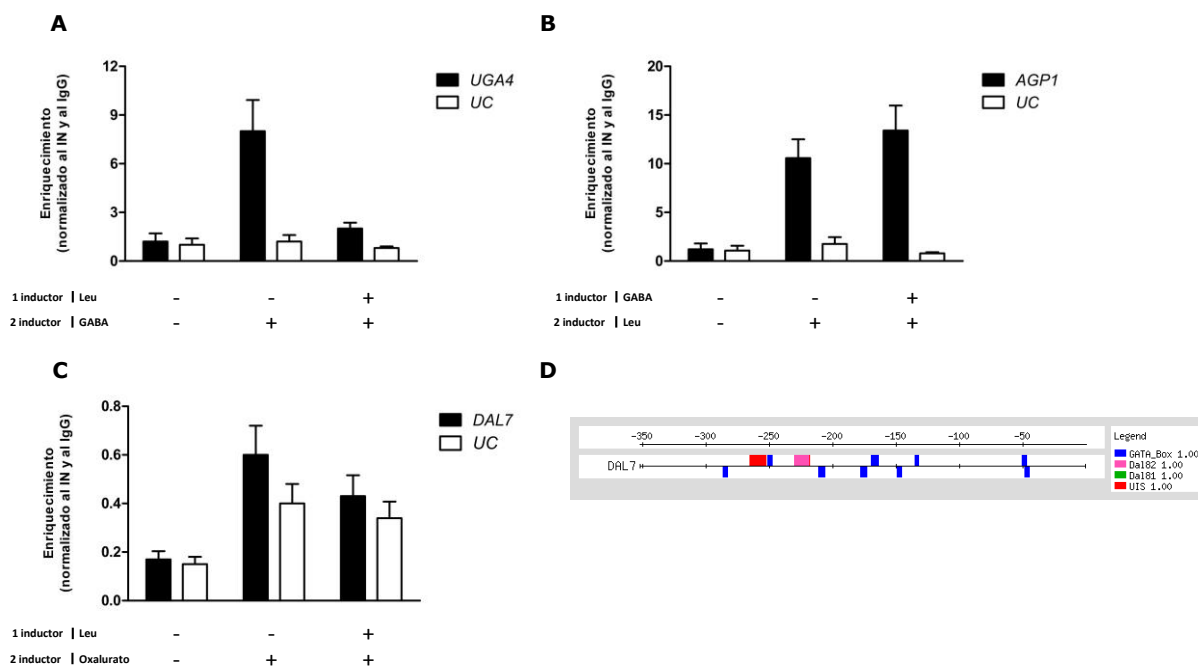
**Figura 39. Papel de Dal81 en la jerarquía en el uso de fuentes pobres de nitrógeno.** Se midieron los niveles de ARNm de los genes *AGP1*, *UGA4*, *DAL7* y *DUR3* en células *wild type* (23344c), *dal81Δ* (SBCY17) y en células *dal81Δ* (SBCY17) transformadas con el plásmido pSBC-*HA-DAL81* que sobreexpresa a Dal81. Las células cultivadas en medio mínimo se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de los inductores indicados. Cada inductor

se incubó durante 30 minutos. Se midieron niveles de ARNm mediante *RT-qPCR*. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los niveles de expresión del gen constitutivo *TBP1*. Los resultados se expresan relativos a la condición sin inducir en la cepa *wild type* y representan la media  $\pm$  EE de por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados apoyan la propuesta de que Dal81 sería responsable del uso jerarquizado de fuentes pobres de nitrógeno. La disponibilidad de Dal81 determinaría que se produzca la inducción de determinados genes y no de otros cuando en el medio de cultivo se encuentran presentes más de una fuente pobre de nitrógeno.

Además, analizamos la interacción de Dal81 con las regiones promotoras de los genes *UGA4*, *AGP1* y *DAL7* en presencia de uno o más inductores. Los resultados mostrados en la Figura 40 confirman que Dal81 interactúa con los promotores de *UGA4* y de *AGP1*, al incubar a las células con GABA y leucina, respectivamente (Figura 40A y B). Al pre-incubar a las células con GABA, la interacción de Dal81 con el promotor de *AGP1* no varía (Figura 40B), mientras que la pre-incubación con leucina produce una disminución de la interacción de Dal81 con el promotor de *UGA4* (Figura 40A).

Por otro parte, no pudimos detectar reclutamiento de Dal81 al promotor de *DAL7* en ninguna de las condiciones de crecimiento analizadas (Figura 40C). La secuencia regulatoria de *DAL7*, analizada usando las bases de datos Yeasttract (Teixeira et al., 2006), SCPD (Zhu and Zhang, 1999) y la página RSAT (Medina-Rivera et al., 2015), posee sitios de unión para los factores de transcripción de la familia GATA y dos elementos conocidos como *Upstream Induction Sequence* (UIS), que responden a inductor y que son sitios de reconocimiento para Dal82 (Figura 40D). Uno de ellos se encuentra ubicado -265 a -253 respecto al codón ATG de inicio de la traducción y presenta la secuencia 5'-GAAAGTTGCGGTG-3', mientras que el otro elemento UIS se encuentra localizado desde -230 a -218 respecto al codón ATG y presenta la secuencia 5'-GAAAATTGCGTT-3', que además de un sitio de reconocimiento para Dal82, posee un sitio de reconocimiento para Dal81 (Dorrington and Cooper, 1993; van Vuuren et al., 1991).



**Figura 40. Interacción del factor de transcripción Dal81 con los promotores de *UGA4*, de *AGP1* y de *DAL7*.** Células que expresan la proteína de fusión HA-Dal81 (SBCY10) crecidas en medio mínimo con prolina se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de los distintos inductores. La incubación con cada inductor fue de 30 minutos. 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* (A), *AGP1* (B) o de *DAL7* (C) (barras negras) o una región ubicada 2,5 kb río abajo del promotor de *UGA4* (barras blancas, *Unbound Control*, UC). El inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al *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  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD de triplicados dentro de uno de dos experimentos independientes. (D) Esquema de la región promotora de *DAL7*. En rojo se muestra el *upstream induction sequence* (UIS), en rosa el sitio de unión para Dal82, en verde el sitio de unión para Dal81 y en azul los sitios de unión para los factores de transcripción de la familia GATA.

## ***Discusión***

Los resultados de este capítulo demuestran que los genes del metabolismo de algunas fuentes pobres de nitrógeno se expresan en un determinado orden lo cual resultaría en una jerarquía en la utilización de esas fuentes pobres de nitrógeno. Los genes involucrados en la utilización de la leucina se encuentran en un orden jerárquico superior a aquellos involucrados en la utilización del alofanato y, por último, estarían aquellos involucrados en la utilización del GABA. También demostramos Dal81 que tiene un papel fundamental en el establecimiento de esta jerarquía aunque probablemente no sea el único factor que la establece.

El hecho de que al sobreexpresar a Dal81 la jerarquía observada se pierda corrobora nuestra hipótesis de su papel central en este mecanismo. Sin embargo, no se puede descartar que Dal81 sufra modificaciones post-traduccionales que lleven a que en determinadas condiciones de crecimiento se favorezca la expresión de determinados genes por encima de otros, y por lo tanto es necesario realizar otro tipo de experimentos para evaluar esta posibilidad.

Debido a problemas experimentales, no pudimos detectar la interacción de Dal81 con el promotor de *DAL7*, sin embargo se ha descrito que Dal82 interactúa con Dal81 a través de un dominio del tipo *coiled-coil*, y que Gln3 y el complejo SAGA participan en la respuesta a oxalurato de *DAL7*, de manera tal que la presencia de este complejo podría interferir con la detección de Dal81 en nuestras condiciones de trabajo (Dorrington and Cooper, 1993).

El tiempo de duplicación de las células en medio mínimo con leucina como única fuente de nitrógeno es el doble del de las células crecidas en GABA como única fuente (resultados no mostrados obtenidos luego de analizar las curvas de crecimiento en la página <http://www.doubling-time.com/compute.php>). Otros autores obtuvieron valores de tiempos de generación similares al comparar crecimiento en GABA y alantoína (Gutierrez et al., 2013). Comúnmente se asume que las fuentes ricas de nitrógeno permiten velocidades de crecimiento mayores. Esto se cumple cuando se compara entre fuentes ricas y pobres. Sin embargo, no se cumple cuando se compara entre fuentes pobres de nitrógeno, si es que la jerarquía en el uso de las fuentes (primero leucina, luego alantoína y por último GABA) es la misma que la esperada según la expresión de los genes (primero *AGP1*, luego *DAL7* y por último *UGA4*). Probablemente, la leucina es utilizada antes que las otras fuentes pobres, que permiten

una tasa de crecimiento mayor, debido a su importancia como aminoácido cetogénico que provee energía a las células y a su alta frecuencia en la composición proteica.



## **Conclusiones generales**





## ***Conclusiones generales***

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene la capacidad de sensar y de responder a la disponibilidad de nutrientes presentes en el medio de crecimiento. Nutrientes como los aminoácidos son utilizados por las células como compuestos que proveen de nitrógeno y energía, como unidades para la síntesis de moléculas más complejas, y además son moléculas señales capaces de transmitir la información del entorno al interior celular. Para ello, las células cuentan con un sistema sensor localizado en la membrana plasmática capaz de transmitir la señal extracelular al núcleo y producir cambios en los patrones de expresión génica (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Zaman et al., 2008)

En este trabajo de tesis estudiamos la regulación transcripcional de genes que codifican para permeasas involucradas en el catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno como el GABA, la leucina y el alofanato. Estos genes están regulados por al menos dos mecanismos complementarios: uno dependiente de la calidad de la fuente de nitrógeno en el cual intervienen los factores GATA, y el otro dependiente de inductor en el cual intervienen factores como Uga3, Stp1/2 y Dal82.

También analizamos el papel que desempeña el factor de transcripción Dal81 en la activación jerarquizada de genes involucrados en el catabolismo de dichas fuentes.

En el Capítulo 1 nos centramos en profundizar el estudio de la regulación transcripcional de los genes *UGA*, *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*, involucrados en el catabolismo del GABA. Demostramos que cada factor GATA tiene una función diferente en la regulación transcripcional de *UGA4*. Los activadores Gln3 y Gat1 no tienen igual importancia en esta regulación, siendo Gat1 el que cumple un rol predominante. Por su parte, Gzf3 y Uga43 tienen funciones diferentes. Gzf3 produce un efecto positivo en la expresión dependiente de GABA de *UGA4*. Basándonos en nuestros resultados y los obtenidos por otros autores (Georis et al., 2009b), proponemos que Gzf3 estaría contribuyendo a la interacción de Gat1 con el promotor *UGA4*. En cambio, Uga43 actúa como un represor. Este resultado confirma lo descrito por otros autores respecto del papel represor de Uga43 sobre los genes sensibles a NCR (Georis et al., 2009b; Talibi et al., 1995). En el organismo modelo *Aspergillus nidulans* se demostró que en ausencia del represor de la familia GATA AreB, análogo a Uga43 y Gzf3 (Scazzocchio, 2000), se produce un aumento en la expresión basal del gen que codifica para la enzima formaminidasa en células ayunadas de

nitrógeno (Wong et al., 2009); resultado similar al observado para *UGA4* en células deficientes en Uga43. Al agregar GABA, Uga43 es desplazado por Gat1 y Gln3. Este mecanismo de competencia entre los factores GATA también se demostró en *A. nidulans*: AreA, el activador GATA presente en este organismo, y AreB, compiten por los sitios GATA presentes en genes sensibles a NCR (Conlon et al., 2001).

Además, demostramos que Uga43 necesita de Leu3 para mantener bajos los niveles de expresión de *UGA4* y de *UGA1* en ausencia de inductor. Así, aportamos una nueva evidencia que demuestra el mecanismo de acción concertada entre factores transcripción que actúan sobre sitios regulatorios diferentes. Esta evidencia se suma a nuestro resultado previo donde demostramos que Uga3 y Dal81 afectan el reclutamiento de Uga43 a los promotores *UGA* (Cardillo et al., 2012). También se ha propuesto que en *A. nidulans* la actividad de AreA está modulada por los análogos a Dal81, TamA, y a Leu3, LeuB, (Davis et al., 1996; Downes et al., 2013; Polotnianka et al., 2004; Small et al., 2001). Por otra parte demostramos que la interacción de Dal81 y Uga3 con los sitios putativos de unión presentes en los genes *UGA* es independiente de la presencia de Gln3 y Uga43.

Por lo tanto, podemos proponer que Dal81 y Uga3 al ser reclutados a los promotores de *UGA4* y de *UGA1* en presencia de GABA podrían alterar la conformación de Leu3, lo que se traduciría en una disminución en la estabilidad de la interacción de Uga43 sobre sus promotores, dando lugar a que Gln3 y Gat1 desplacen a Uga43. Este mecanismo concertado de acción entre distintos factores permitirá la expresión de los genes *UGA*. El mecanismo por el cual el agregado de GABA lleva al reclutamiento inicial de Dal81 y Uga3 sigue siendo un enigma que debe ser esclarecido.

En el Capítulo 2 demostramos que el gen *AGP1* se encuentra regulado por los miembros de la familia GATA. Tanto Gln3 como Gat1 son esenciales para la expresión de este gen en presencia de leucina, mientras que tanto Uga43 como Gzf3 tienen un efecto positivo en su expresión. Uga43 que interacciona con *AGP1* en ausencia de inductor, no estaría involucrado en la baja expresión de *AGP1* en nuestras condiciones de trabajo. Por otra parte, si bien Leu3 no tiene efecto sobre la expresión de *AGP1*, sí afecta el reclutamiento de Uga43 sobre este gen. Más estudios son necesarios para establecer el mecanismo de acción de estos factores sobre la expresión de *AGP1*.

También demostramos que Stp1 y Dal81 interactúan con *AGP1* y se necesitan mutuamente para cumplir su función, de la misma manera que Uga3 y Dal81 para el gen *UGA4* (Cardillo et al., 2010; Cardillo et al., 2012).

A pesar de haber surgido de un ancestro común y presentar similitudes, los genes de las permeasas *BAP2* y *BAP3* están sujetos a mecanismos de regulación diferentes. *BAP3* no se encuentra sometida a NCR, mientras que *BAP2* presenta un perfil de expresión similar al observado para *AGP1*. Además Leu3 actúa como un activador sobre *BAP2* uniéndose a su promotor y no participa en la regulación de *BAP3*.

Demostramos también que la expresión de *BAP2* y de *BAP3* requiere de la acción concertada de Stp1, Stp2 y Dal81.

Por otro lado, los factores GATA actúan de manera diferencial en la expresión de *BAP2* y de *BAP3*. Uga43 tiene un efecto positivo en la expresión de *BAP2* y de *BAP3* de la misma manera que lo observado para Gzf3 sobre *UGA4* y para Uga43 y Gzf3 sobre *AGP1*.

Estos resultados abren un nuevo concepto en la regulación de los genes sensibles al nitrógeno: aparentemente Uga43 y Gzf3 no actuarían siempre como represores, sino que según el gen y las condiciones de crecimiento pueden tener un efecto positivo en la expresión de ciertos genes, probablemente a través de la interacción con otras proteínas involucradas en la vía de señalización activada por la presencia de aminoácidos extracelulares.

Por último, en el Capítulo 4 demostramos que Dal81 tiene un papel central en la expresión de genes que responden a fuentes pobres de nitrógeno. El hecho de que un mismo factor de transcripción sea compartido por distintas vías involucradas en el catabolismo de fuentes pobres nitrógeno permite a la levadura controlar al máximo su metabolismo, de manera tal que aquellos genes involucrados en la utilización de fuentes nitrogenadas que le permitan una mayor tasa de crecimiento se expresen preferencialmente sobre aquellos que le otorgan una tasa de crecimiento menor.

Por lo tanto, los resultados de esta tesis que contribuyen al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes que codifican para permeasas de aminoácidos, tienen una aplicación directa en la utilización de *S. cerevisiae* en procesos biotecnológicos, ya que permitirían optimizar las condiciones

para lograr un mejor aprovechamiento de los componentes del medio de crecimiento o para favorecer la producción de determinados metabolitos.

# Apéndice



**Medios de cultivo****YPD**

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%

**LB**

Extracto de levadura	0,5%
Peptona	1%
NaCl	1%

**Buffers****Buffer de lisis**

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

**Buffer TE**

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

**Solución I**

Tris-HCl pH 8	25 mM
EDTA pH 8	10 mM

**Solución II**

SDS	1%
NaOH	0,2 M

**Solución III**

KAcO	150 mM
AcOH	11,5%

**Buffer Z**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mM
KCl	10 Mm
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β-mercaptoetanol	50 mM
pH 7.0	

**Buffer AE**

NaAc pH 5,2	50 mM
EDTA	10 mM

**Buffer TBS**

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

**Buffer FA (ChIP)**

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

**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%

**Loading buffer**

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

**Solución A**

Tris-HCl pH 8	0,1 M
Luminol	0,045%
Ácido p-cumárico	0,066%

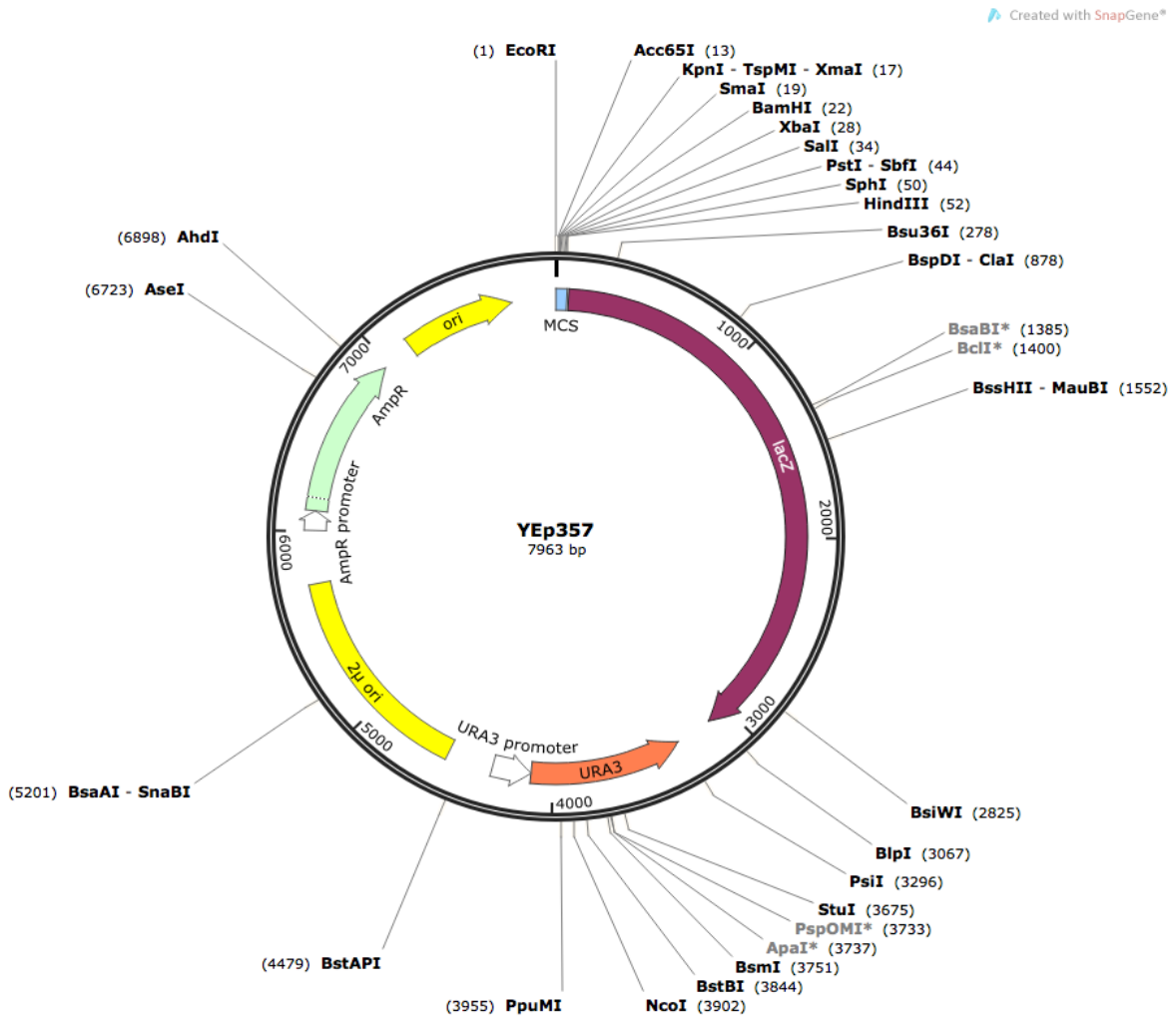
**Solución B**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,18%
Tris-HCl pH 8	0,1 M



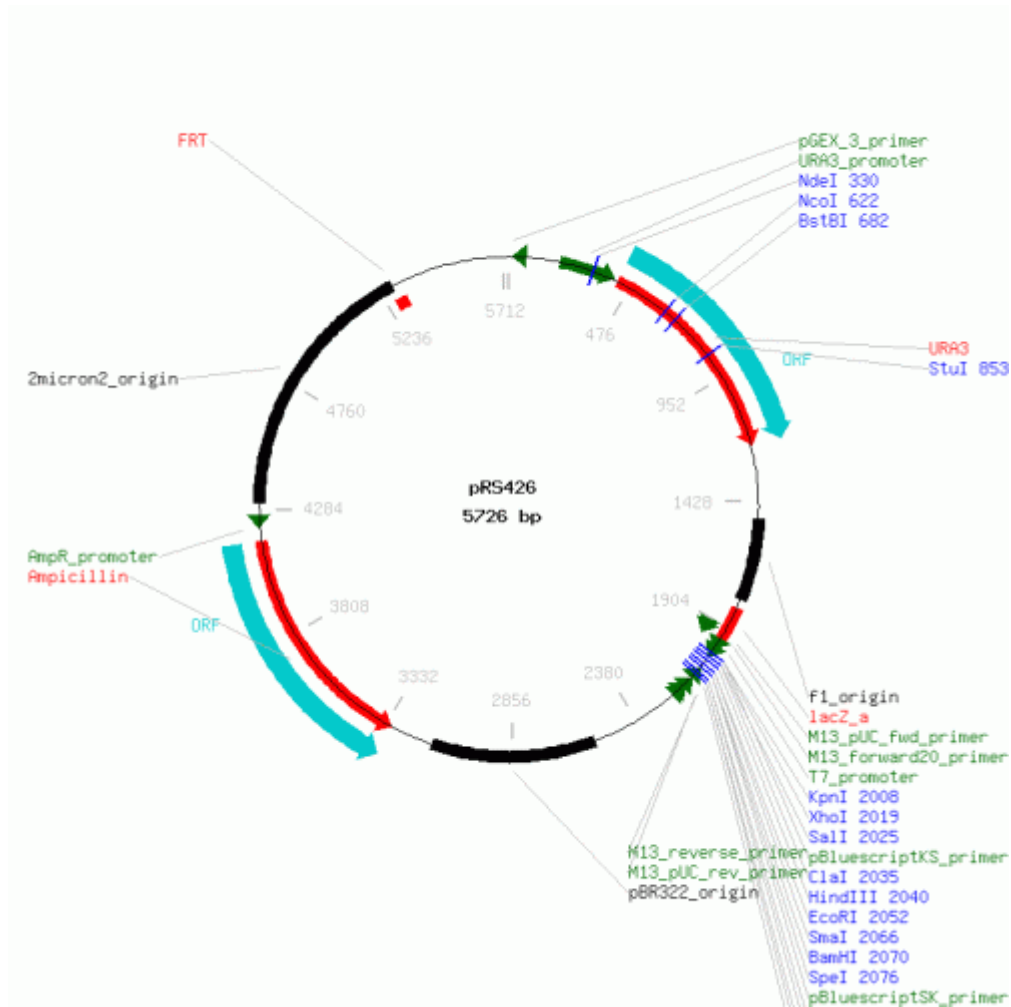
Plásmidos

YEp357



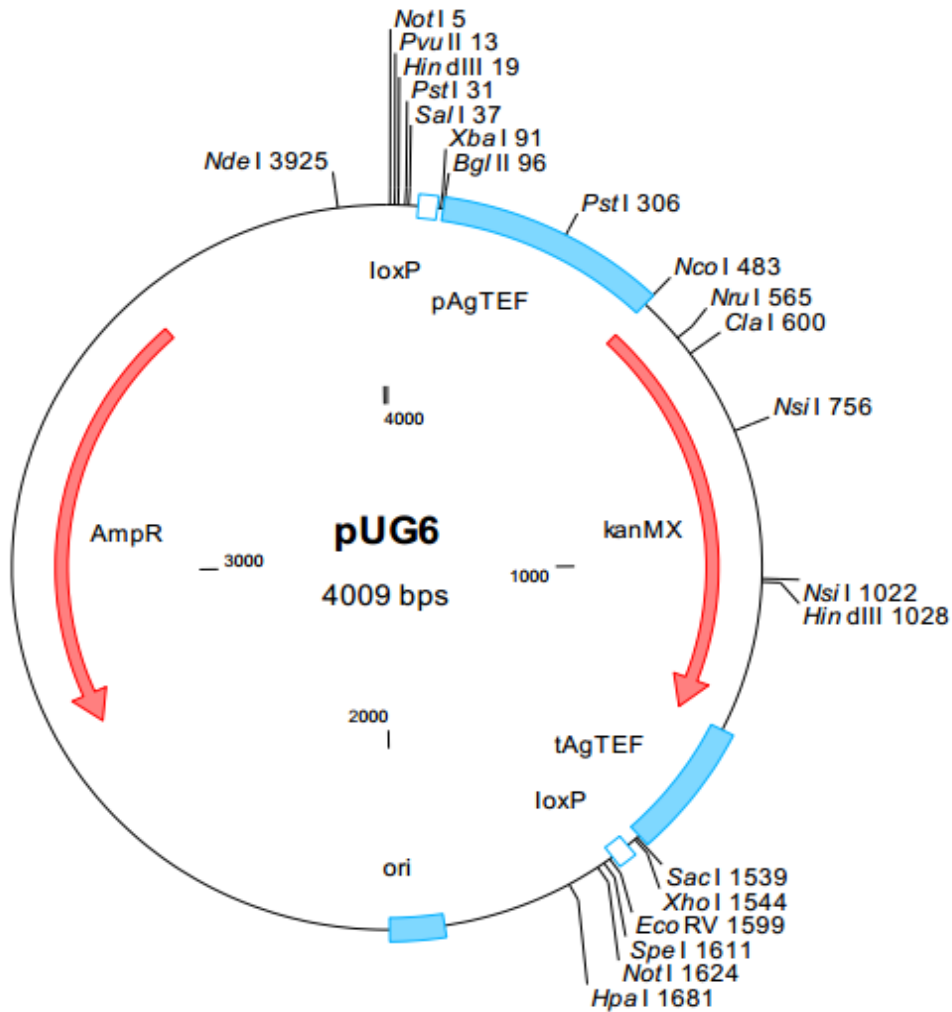
El plásmido YEp357 contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras 2 $\mu$ . También posee los genes *AmpR* y *URA3* que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente. Río abajo del sitio múltiple de clonado se encuentra el gen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

*pRS426*



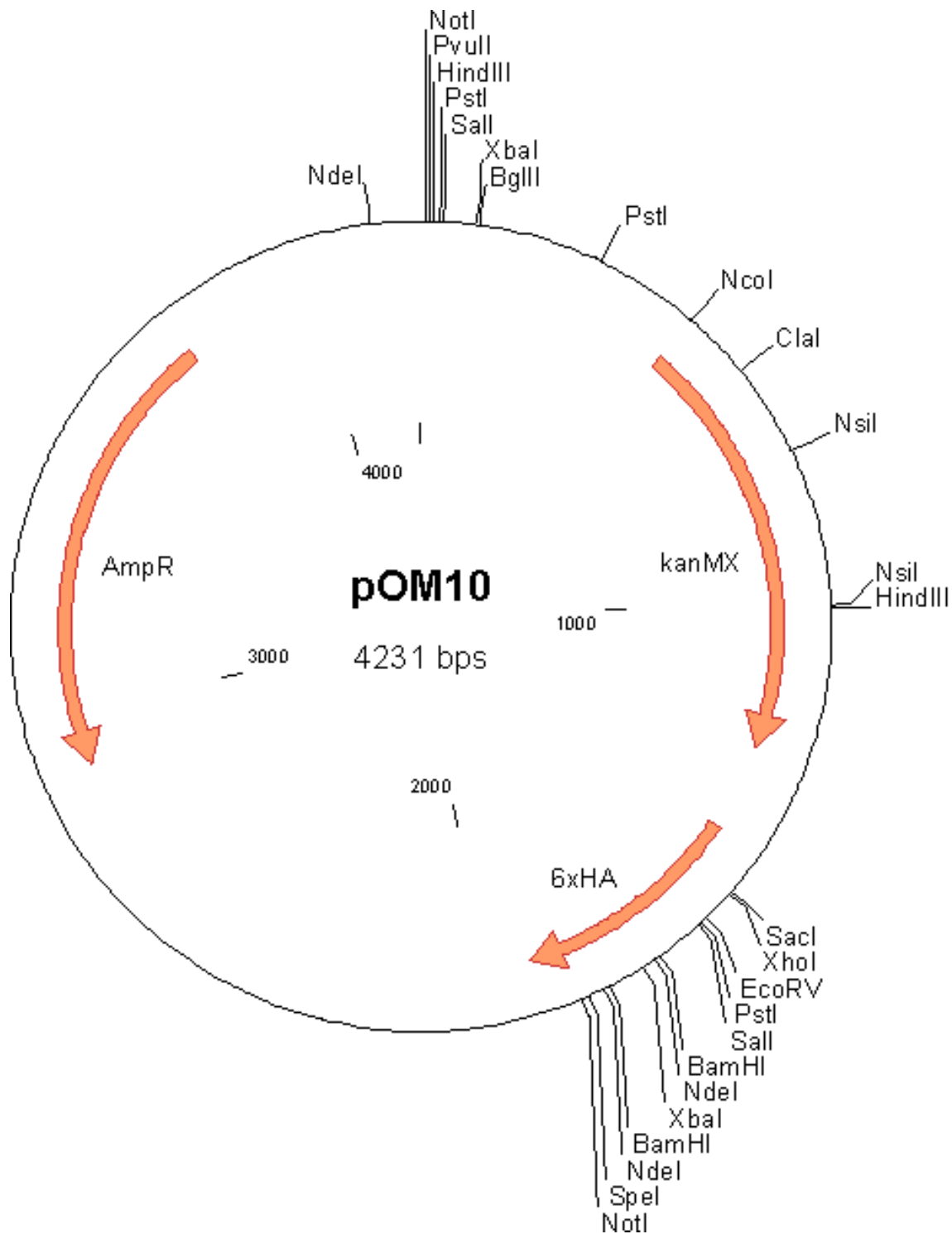
El plásmido pRS426 contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras 2 $\mu$ . También posee los genes AmpR y *URA3* que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente.

*pUG6*

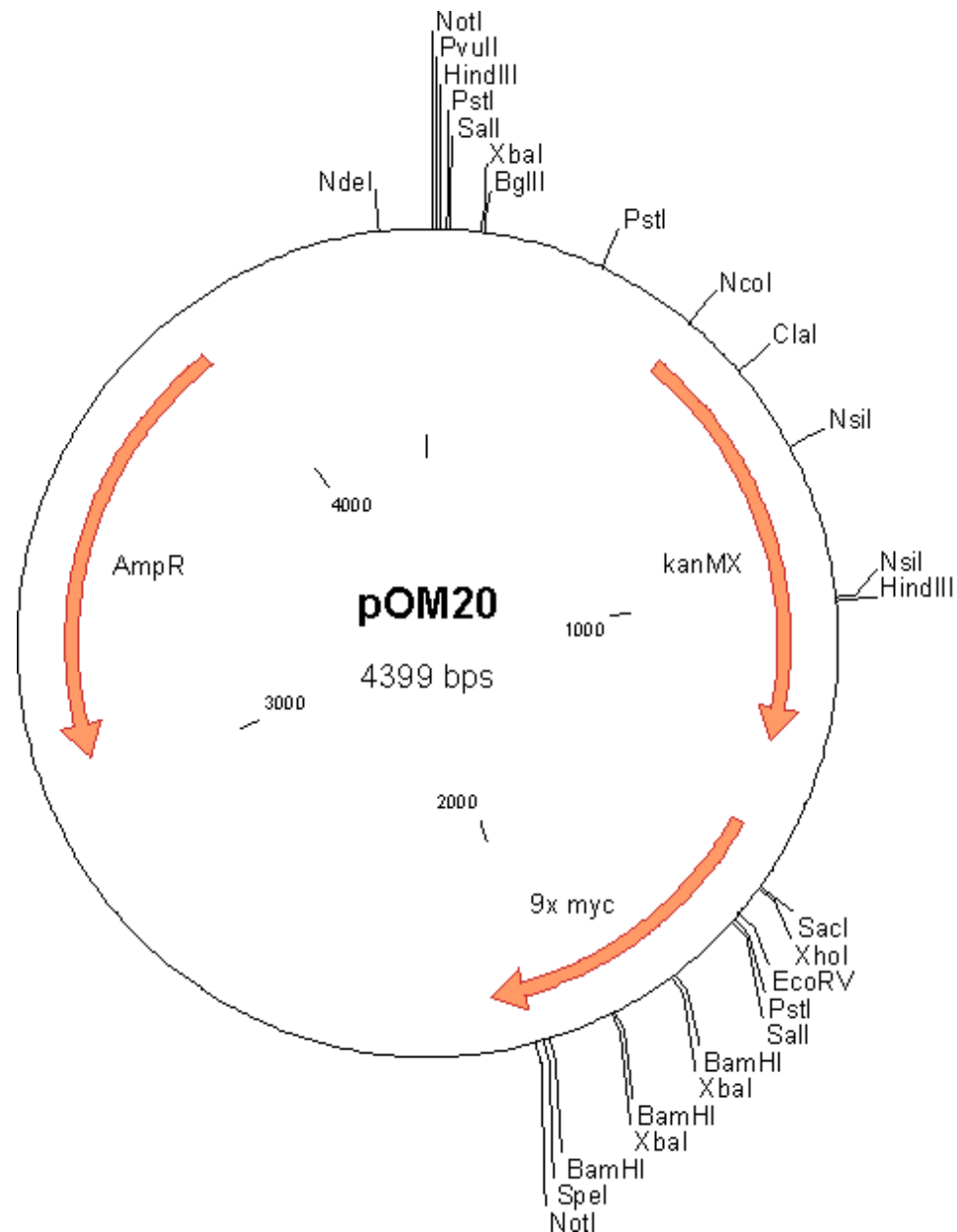


El plásmido pUG6 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen AmpR de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el gen kanMX que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras flanqueado por secuencias loxP.

*pOM10*

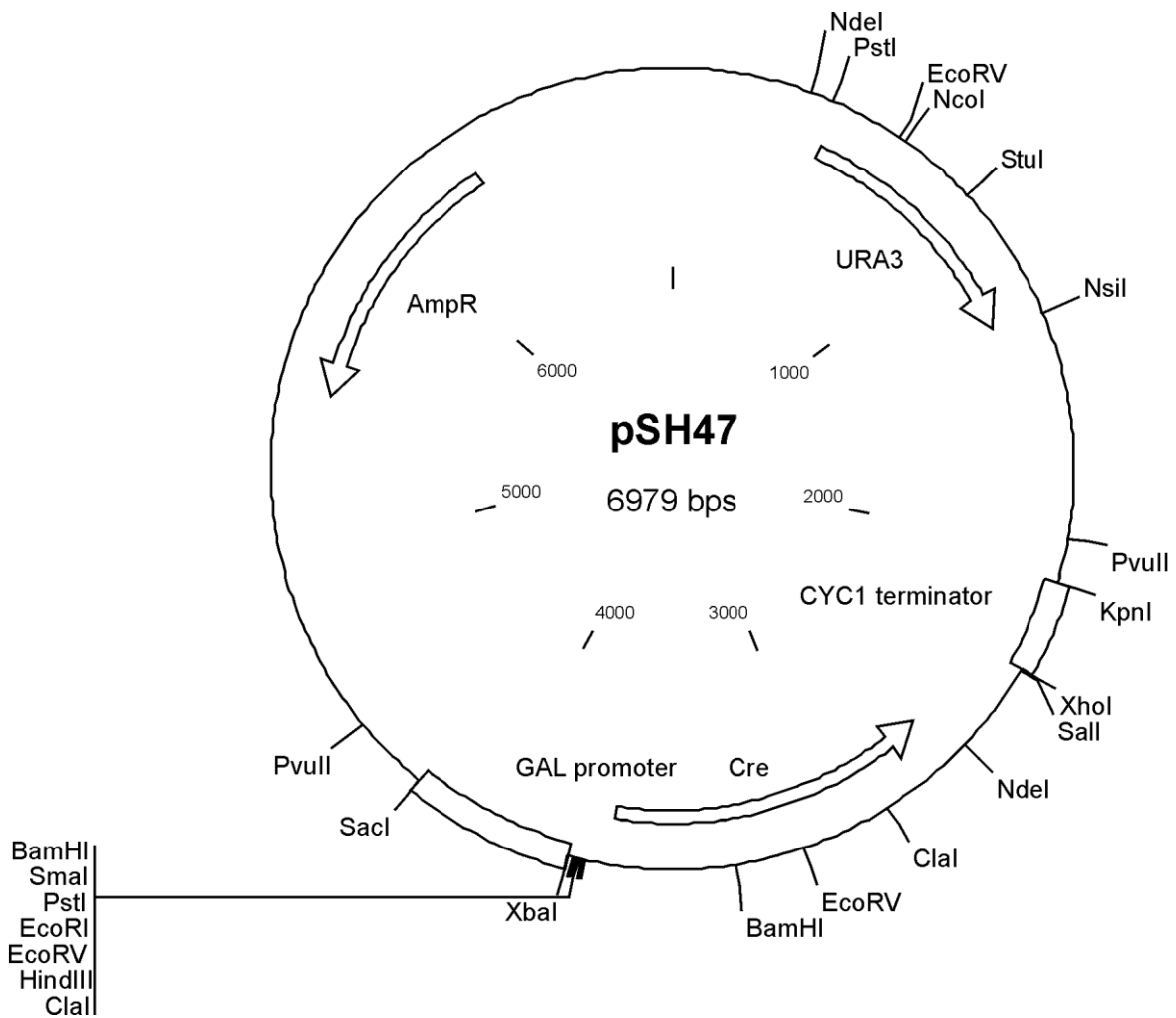


El plásmido pOM10 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen *AmpR* de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras flanqueado por secuencias *loxP* río abajo de seis epítopos HA en *tandem*.

*pOM20*

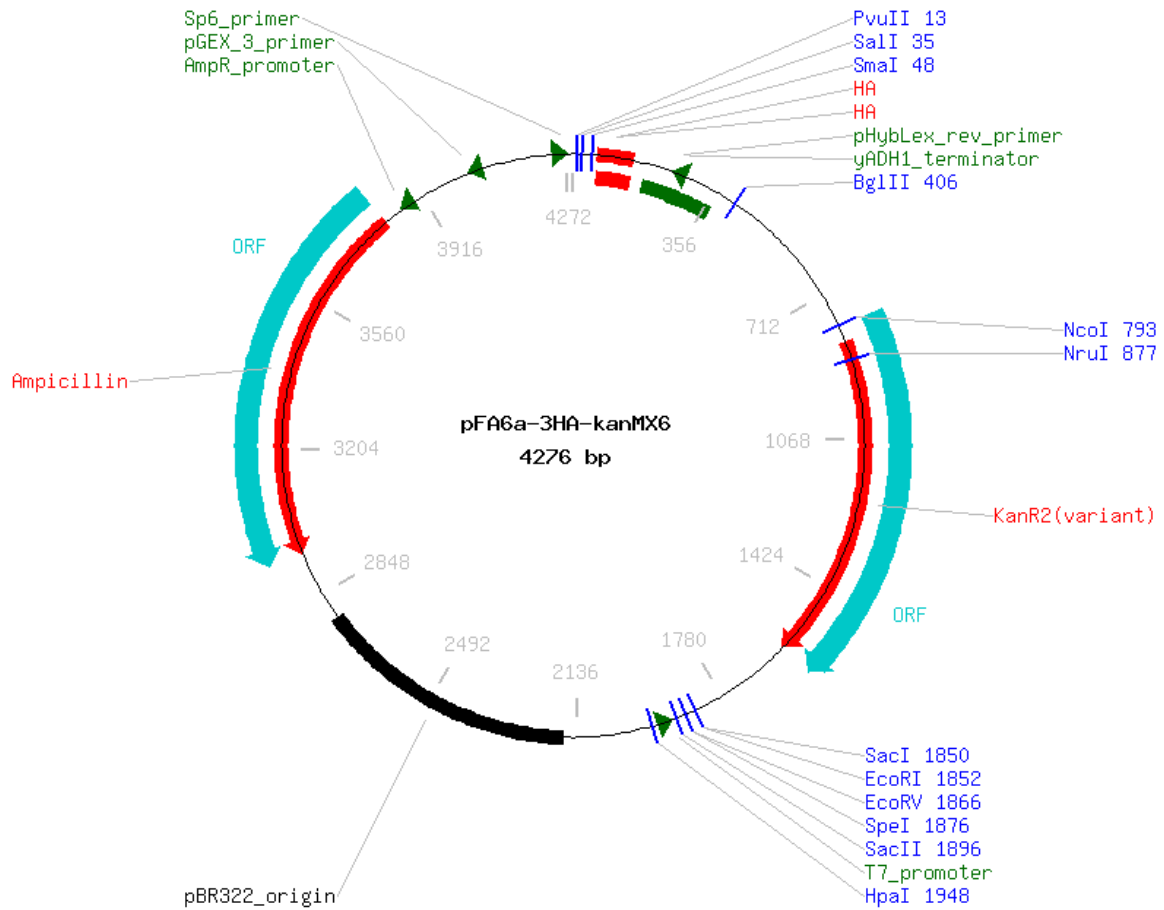
El plásmido pOM20 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen *AmpR* de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Este plásmido contiene el módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418) en levaduras flanqueado por secuencias *loxP* y abajo de 9 epítopes *myc* en tandem.

*pSH47*



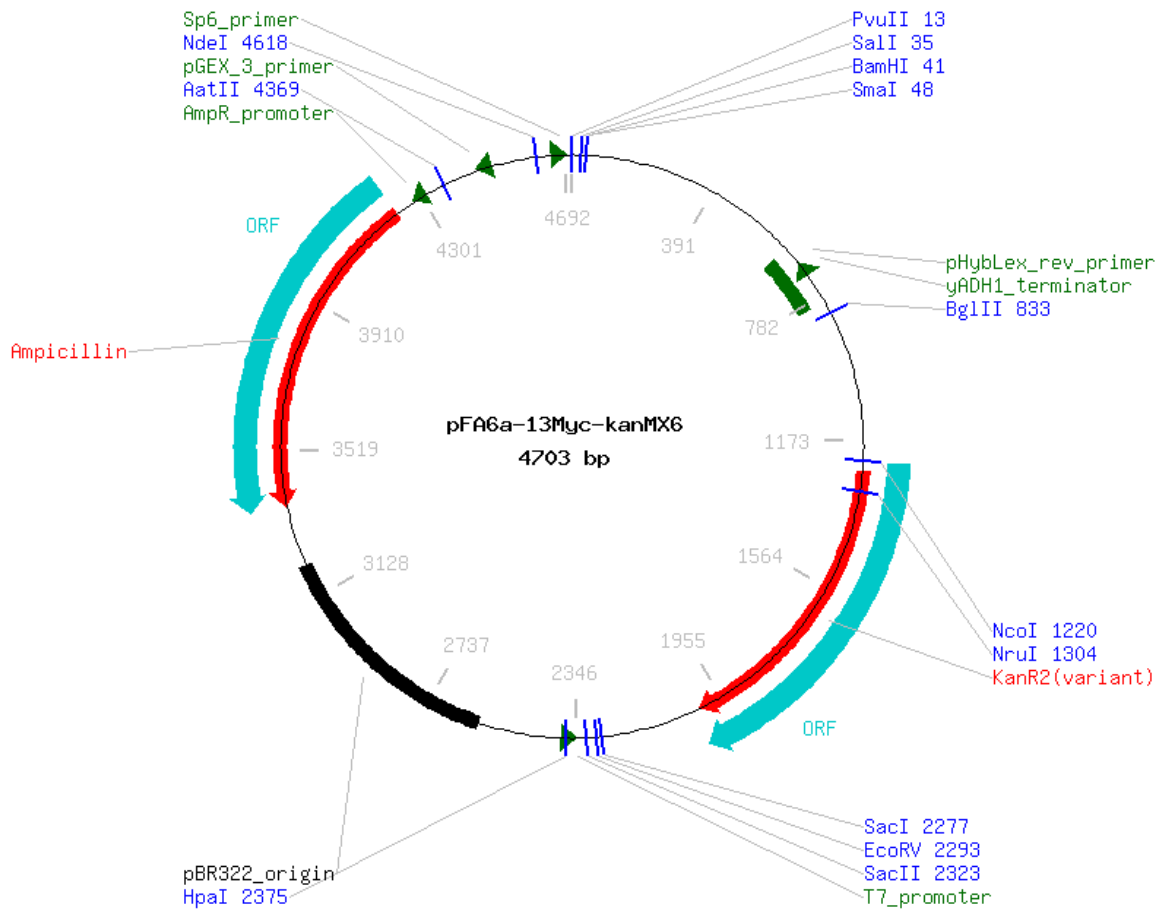
El plásmido *pSH47* contiene un origen de replicación bacteriano y un origen de replicación de levaduras. También posee los genes *AmpR* y *URA3* que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente. Este plásmido contiene un gen que codifica para la recombinasa Cre río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

*pFA6a-3HA-kanMX6*



El plásmido *pFA6a-3HA-kanMX6* contiene un origen de replicación bacteriano y el gen *AmpR* 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) para levaduras.

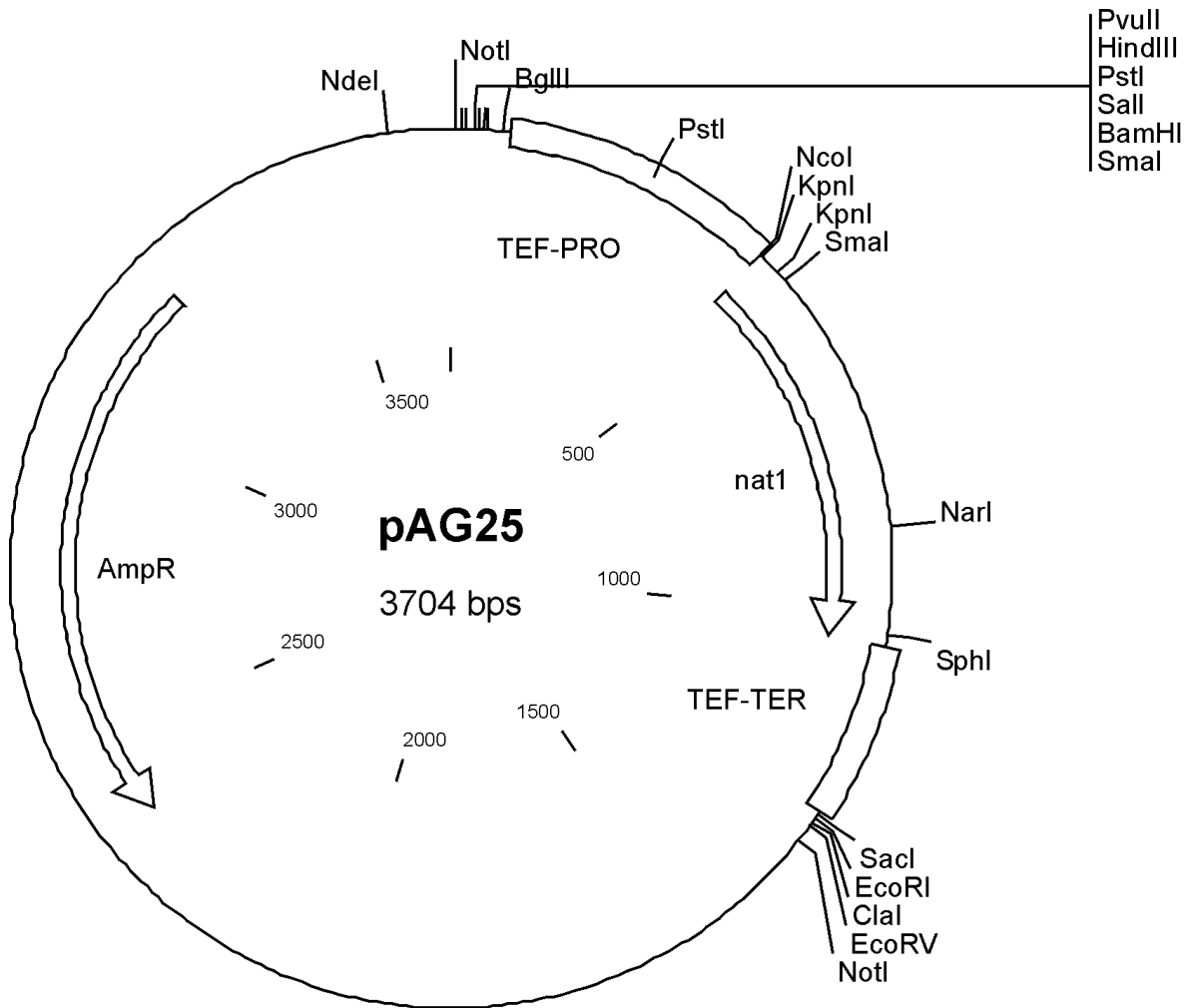
*pFA6a-13MYC-kanMX6*



El plásmido *pFA6a-13MYC-kanMX6* contiene un origen de replicación bacteriano y el gen *AmpR* de resistencia a ampicilina, los cuales permiten la replicación del plásmido en bacterias y la selección de transformantes, respectivamente. Posee trece epítopes MYC en tandem río arriba del módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418) para levaduras.



pAG25



El plásmido pAG25 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen AmpR 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) para levaduras.

## Análisis estadístico

### Análisis estadístico Figura 12B

#### Análisis de la cepa *wild type*

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	6	0,96	0,95	12,68

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,43	1	6,43	96,51	0,0006
Columnal	6,43	1	6,43	96,51	0,0006
Error	0,27	4	0,07		
Total	6,69	5			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0666 gl: 4

Columnal	Medias	n	E.E.
Wt pro	1,00	3	0,15 A
Wt + GABA	3,07	3	0,15 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis de todos los genotipos y las condiciones

##### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	24	0,94	0,91	26,75

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	677,16	7	96,74	34,74	<0,0001
Columnal	677,16	7	96,74	34,74	<0,0001
Error	44,55	16	2,78		
Total	721,71	23			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 2,7844 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
gzf3pro	0,16	3	0,96 A
gzf3GABA	0,79	3	0,96 A
Wt pro	1,00	3	0,96 A
Wt + GABA	3,07	3	0,96 A
uga43 gzf3GABA	7,68	3	0,96 B
uga43 gzf3pro	10,50	3	0,96 B C
uga43 GABA	13,34	3	0,96 C
uga43 pro	13,37	3	0,96 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Análisis estadístico de las Figuras 15A y C

### Análisis de las cepas *wild type* y *leu3Δ*

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	12	0,92	0,89	18,80

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	46,03	3	15,34	29,28	0,0001
Columna1	46,03	3	15,34	29,28	0,0001
Error	4,19	8	0,52		
Total	50,22	11			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,5241 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
Wt pro	1,00	3	0,42 A
Wt + GABA	3,07	3	0,42 B
leu3 + GABA	5,56	3	0,42 C
leu3 pro	5,77	3	0,42 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Análisis de todos los genotipos y las condiciones

### Figura 15A

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	24	0,86	0,80	27,26

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	478,90	7	68,41	14,34	<0,0001
Columna1	478,90	7	68,41	14,34	<0,0001
Error	76,34	16	4,77		
Total	555,25	23			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,7715 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
Wt pro	1,00	3	1,26 A
Wt + GABA	3,07	3	1,26 A B
leu3 GABA	5,56	3	1,26 B
leu3 pro	5,77	3	1,26 B
uga43 leu3GABA	10,85	3	1,26 C
uga43 leu3pro	11,15	3	1,26 C
uga43 GABA	13,34	3	1,26 C
uga43 pro	13,37	3	1,26 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Figura 15C

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	24	0,78	0,69	31,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	267,23	7	38,18	8,16	0,0003
Columnal	267,23	7	38,18	8,16	0,0003
Error	74,81	16	4,68		
Total	342,04	23			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 4,6758 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
Wt pro	1,00	3	1,25 A
Wt + GABA	3,07	3	1,25 A B
leu3 GABA	5,56	3	1,25 B C
leu3 pro	5,77	3	1,25 B C
uga43 gzf3 GABA	7,68	3	1,25 C D
uga43 gzf3 leu3 pro	9,73	3	1,25 D
uga43 gzf3 pro	10,50	3	1,25 D
uga43 gzf3 leu3 GABA	10,78	3	1,25 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis estadístico de las Figuras 36A y B

Análisis de las cepas *wild type* y *leu3Δ*

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	12	1,00	0,99	8,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19,07	3	6,36	539,73	<0,0001
Columnal	19,07	3	6,36	539,73	<0,0001
Error	0,09	8	0,01		
Total	19,16	11			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0118 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
leu3 pro	0,09	3	0,06 A
leu3 Leu	0,83	3	0,06 B
Wt pro	1,00	3	0,06 B
Wt + Leu	3,44	3	0,06 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis de todos los genotipos y las condiciones

Figura 36A

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	48	0,92	0,88	48,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	358,49	15	23,90	24,00	<0,0001
Columna1	358,49	15	23,90	24,00	<0,0001
Error	31,86	32	1,00		
Total	390,35	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,9956 gl: 32

Columna1	Medias	n	E.E.
gat1 leu3 pro	0,07	3	0,58 A
leu3 pro	0,09	3	0,58 A
gln3 leu3 pro	0,20	3	0,58 A B
gln3 gat1 leu3 pro	0,37	3	0,58 A B
gat1 leu3 Leu	0,43	3	0,58 A B
gln3 gat1 leu3 Leu	0,46	3	0,58 A B
gln3 gat1 1pro	0,68	3	0,58 A B
leu3 Leu	0,83	3	0,58 A B
Wt pro	1,00	3	0,58 A B
gln3 leu3 Leu	1,26	3	0,58 A B
gln3 gat1 1Leu	1,71	3	0,58 A B C
gat1pro	2,12	3	0,58 B C
gln3 pro	3,26	3	0,58 C
Wt + Leu	3,44	3	0,58 C
gat1Leu	5,97	3	0,58 D
gln3 Leu	10,79	3	0,58 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figura 36B

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	48	0,98	0,98	22,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36,50	15	2,43	134,03	<0,0001
Columna1	36,50	15	2,43	134,03	<0,0001
Error	0,58	32	0,02		
Total	37,08	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0182 gl: 32

Columna1	Medias	n	E.E.
uga43 leu3 pro	0,01	3	0,08 A
uga43 gzf3 leu3 Leu	0,03	3	0,08 A
uga43 gzf3 leu3 pro	0,03	3	0,08 A
gzf3 leu3 pro	0,03	3	0,08 A
uga43 leu3 Leu	0,07	3	0,08 A
leu3 pro	0,09	3	0,08 A
uga43 gzf3 1pro	0,12	3	0,08 A
uga43 gzf3 1Leu	0,18	3	0,08 A B
gzf3 leu3 Leu	0,22	3	0,08 A B
uga43 Leu	0,37	3	0,08 B C
uga43 pro	0,53	3	0,08 C
leu3 Leu	0,83	3	0,08 D
gzf3pro	0,99	3	0,08 D
Wt pro	1,00	3	0,08 D
gzf3Leu	1,72	3	0,08 E
Wt + Leu	3,44	3	0,08 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis estadístico de las Figuras 37A y B

Análisis de las cepas *wild type* y *gln3Δ gat1Δ*

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Columna3	12	0,94	0,92	34,90	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9473,39	3	3157,80	41,75	<0,0001
Columna1	9473,39	3	3157,80	41,75	<0,0001
Error	605,01	8	75,63		
Total	10078,40	11			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 75,6268 gl: 8

Columna1	Medias	n	E.E.
Wt pro	1,00	3	5,02 A
gln3 gat1 lpro	2,34	3	5,02 A
gln3 gat1 lLeu	25,86	3	5,02 B
Wt + Leu	70,47	3	5,02 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Análisis de todos los genotipos y las condiciones

Figura 37A

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Columna3	48	0,92	0,89	37,45	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37686,56	15	2512,44	25,26	<0,0001
Columna1	37686,56	15	2512,44	25,26	<0,0001
Error	3183,37	32	99,48		
Total	40869,92	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 99,4802 gl: 32

Columna1	Medias	n	E.E.
gln3 leu3 pro	0,94	3	5,76 A
Wt pro	1,00	3	5,76 A
gln3 gat1 leu3 pro	1,90	3	5,76 A
gln3 pro	2,17	3	5,76 A
gln3 gat1 lpro	2,35	3	5,76 A
gat1 leu3 pro	2,59	3	5,76 A
gat1pro	3,58	3	5,76 A
leu3 pro	4,84	3	5,76 A
gln3 gat1 leu3 Leu	22,67	3	5,76 B
gln3 gat1 lLeu	26,22	3	5,76 B C
gat1 leu3 Leu	40,76	3	5,76 C D
gln3 leu3 Leu	46,98	3	5,76 D
gln3 Leu	49,63	3	5,76 D
gat1Leu	68,12	3	5,76 E
Wt + Leu	70,47	3	5,76 E
leu3 Leu	81,94	3	5,76 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Figura 37B

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	48	0,91	0,87	44,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34447,62	15	2296,51	22,40	<0,0001
Columna1	34447,62	15	2296,51	22,40	<0,0001
Error	3280,51	32	102,52		
Total	37728,13	47			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 102,5160 gl: 32

Columnal	Medias	n	E.E.
uga43 gzf3 leu3 pro	0,55	3	5,85 A
Wt pro	1,00	3	5,85 A
uga43 leu3 pro	1,33	3	5,85 A
uga43 pro	2,39	3	5,85 A
gzf3pro	2,65	3	5,85 A
gzf3 leu3 pro	3,54	3	5,85 A
leu3 pro	4,84	3	5,85 A
uga43 gzf3 1pro	4,97	3	5,85 A
uga43 gzf3 leu3 Leu	9,71	3	5,85 A B
uga43 gzf3 1Leu	19,43	3	5,85 A B
uga43 leu3 Leu	26,80	3	5,85 B C
uga43 Leu	26,94	3	5,85 B C
gzf3 leu3 Leu	43,48	3	5,85 C
gzf3Leu	65,27	3	5,85 D
Wt + Leu	70,47	3	5,85 D
leu3 Leu	81,94	3	5,85 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)





# **Bibliografía**



---

**Bibliografía**

Abdel-Sater, F., El Bakkoury, M., Urrestarazu, A., Vissers, S., and Andre, B. (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. *Molecular and cellular biology* *24*, 9771-9785.

Abdel-Sater, F., Iraqui, I., Urrestarazu, A., and Andre, B. (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.

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., Hein, C., Grenson, M., and Jauniaux, J.C. (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., and Jauniaux, J.C. (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., and Jauniaux, J.C. (1990b). Nucleotide sequence of the yeast UGA1 gene encoding GABA transaminase. *Nucleic Acids Res* *18*, 3049.

Andre, B., Talibi, D., Soussi Boudekou, S., Hein, C., Vissers, S., and Coornaert, D. (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., Heessen, S., and Ljungdahl, P.O. (2006). Regulation of transcription factor latency by receptor-activated proteolysis. *Genes Dev* *20*, 1563-1568.

Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O. (2002). Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes Dev* *16*, 3158-3172.

Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O. (2004). The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Molecular and cellular biology* *24*, 7503-7513.

Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* *402*, 689-692.

Bechet, J., Grenson, M., and Wiame, J.M. (1970). Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* *12*, 31-39.

Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., and Guillamon, J.M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS yeast research* *4*, 625-632.

Bermudez Moretti, M., Correa Garcia, S., Ramos, E.H., and Batlle, A. (1995). GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* *41*, 843-849.

Bermudez Moretti, M., Perullini, A.M., Batlle, A., and Correa Garcia, S. (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., and Andre, B. (2001a). Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *41*, 489-502.

Bernard, F., and Andre, B. (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., Choi, J.H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T.F., and Zheng, X.F. (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *The Journal of biological chemistry* 275, 35727-35733.

Bertram, P.G., Choi, J.H., Carvalho, J., Chan, T.F., Ai, W., and Zheng, X.F.S. (2002). Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology* 22, 1246-1252.

Boban, M., and Ljungdahl, P.O. (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., Zargari, A., Andreasson, C., Heessen, S., Thyberg, J., and Ljungdahl, P.O. (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., Daran, J.M., Almering, M.J., de Winde, J.H., and Pronk, J.T. (2005). Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS yeast research* 5, 885-897.

Borodina, I., and Nielsen, J. (2014). Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnology journal* 9, 609-620.

Botstein, D. (1997). GENETICS: Yeast as a Model Organism. *Science* 277, 1259-1260.

Botstein, D., and Fink, G.R. (2011). Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189, 695-704.

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., Daugherty, J.R., and Cooper, T.G. (1991). The DAL81 gene product is required for induced expression of two differently regulated nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 11, 1161-1166.

Cardillo, S.B., Bermudez Moretti, M., and Correa Garcia, S. (2010). Uga3 and Uga35/Dal81 transcription factors regulate UGA4 transcription in response to gamma-aminobutyric acid and leucine. *Eukaryot Cell* 9, 1262-1271.

Cardillo, S.B., Correa Garcia, S., and Bermudez Moretti, M. (2011). Common features and differences in the expression of the three genes forming the UGA regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 410, 885-889.

Cardillo, S.B., Levi, C.E., Bermudez Moretti, M., and Correa Garcia, S. (2012). Interplay between the transcription factors acting on the GATA- and GABA-responsive elements of *Saccharomyces cerevisiae* UGA promoters. *Microbiology* 158, 925-935.

Coffman, J.A., el Berry, H.M., and Cooper, T.G. (1994). The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 176, 7476-7483.

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

Coffman, J.A., Rai, R., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T.G. (1996). Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in

transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 16, 847-858.

Coffman, J.A., Rai, R., Loprete, D.M., Cunningham, T., Svetlov, V., and Cooper, T.G. (1997). Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 179, 3416-3429.

Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J., and Moye-Rowley, W.S. (2001). Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 276, 244-250.

Conlon, H., Zadra, I., Haas, H., Arst, H.N., Jones, M.G., and Caddick, M.X. (2001). The *Aspergillus nidulans* GATA transcription factor gene *areB* encodes at least three proteins and features three classes of mutation. *Molecular microbiology* 40, 361-375.

Cooper, T.G. (1996). Regulation of Allantoin Catabolism in *Saccharomyces cerevisiae* (Springer).

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

Cooper, T.G., Ferguson D., Rai R., and N., B. (1990). The *GLN3* gene product is required for transcriptional activation of allantoin system gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 172 1014-1018.

Cooper, T.G., Lam, C., and Turoscy, V. (1980). Structural analysis of the *dur* loci in *S. cerevisiae*: two domains of a single multifunctional gene. *Genetics* 94, 555-580.

Coornaert, D., Vissers, S., and Andre, B. (1991). The pleiotropic *UGA35(DURL)* regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequence and identity with the *DAL81* gene. *Gene* 97, 163-171.

Coornaert, D., Vissers, S., Andre, B., and Grenson, M. (1992). The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. *Curr Genet* 21, 301-307.

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., Bermudez Moretti, M., Ramos, E., and Batlle, A. (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., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J.R., Coffman, J.A., and Cooper, T.G. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when *Gln3p* is excluded from the nucleus by overproduction of *Ure2p*. *The Journal of biological chemistry* 275, 17611-17618.

Cox, K.H., Tate, J.J., and Cooper, T.G. (2002). Cytoplasmic compartmentation of *Gln3* during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 277, 37559-37566.

Crepin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., and Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and environmental microbiology* 78, 8102-8111.

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

in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. *Molecular and cellular biology* *11*, 6205-6215.

Cunningham, T.S., and Cooper, T.G. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* DAL80 repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URSGATA). *Journal of bacteriology* *175*, 5851-5861.

Cunningham, T.S., Dorrington, R.A., and Cooper, T.G. (1994). The UGA4 UASNTR site required for GLN3-dependent transcriptional activation also mediates DAL80-responsive regulation and DAL80 protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* *176*, 4718-4725.

Cunningham, T.S., Rai, R., and Cooper, T.G. (2000). The level of DAL80 expression down-regulates GATA factor-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* *182*, 6584-6591.

Cunningham, T.S., Svetlov, V.V., Rai, R., Smart, W., and Cooper, T.G. (1996). G1n3p is capable of binding to UAS(NTR) elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* *178*, 3470-3479.

Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* *110*, 119-122.

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

Davis, M.A., Small, A.J., Kourambas, S., and Hynes, M.J. (1996). The *tamA* gene of *Aspergillus nidulans* contains a putative zinc cluster motif which is not required for gene function. *Journal of bacteriology* *178*, 3406-3409.

De Boer, M., Bebelman, J.P., Goncalves, P.M., Maat, J., Van Heerikhuizen, H., and Planta, R.J. (1998). Regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *30*, 603-613.

de Boer, M., Nielsen, P.S., Bebelman, J.P., Heerikhuizen, H., Andersen, H.A., and Planta, R.J. (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.

Dhakal, R., Bajpai, V.K., and Baek, K.H. (2012). Production of gaba (gamma - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* *43*, 1230-1241.

Di Como, C.J., and Arndt, K.T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* *10*, 1904-1916.

Dickinson, J.R. (2000). Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Methods in enzymology* *324*, 80-92.

Didion, T., Grausland, M., Kielland-Brandt, C., and Andersen, H.A. (1996). Amino acids induce expression of BAP2, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* *178*, 2025-2029.

Didion, T., Regenber, B., Jorgensen, M.U., Kielland-Brandt, M.C., and Andersen, H.A. (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., and Cooper, T.G. (1993). The DAL82 protein of *Saccharomyces cerevisiae* binds to the DAL upstream induction sequence (UIS). *Nucleic Acids Research* *21*, 3777-3784.

- Downes, D.J., Davis, M.A., Kreutzberger, S.D., Taig, B.L., and Todd, R.B. (2013). Regulation of the NADP-glutamate dehydrogenase gene *gdhA* in *Aspergillus nidulans* by the Zn(II)2Cys6 transcription factor LeuB. *Microbiology* *159*, 2467-2480.
- ElBerry, H.M., Majumdar, M.L., Cunningham, T.S., Sumrada, R.A., and Cooper, T.G. (1993). Regulation of the urea active transporter gene (*DUR3*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *175*, 4688-4698.
- Forsberg, H., Gilstring, C.F., Zargari, A., Martinez, P., and Ljungdahl, P.O. (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., Hammar, M., Andreasson, C., Moliner, A., and Ljungdahl, P.O. (2001b). Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *158*, 973-988.
- Franssens, V., Bynens, T., Van den Brande, J., Vandermeeren, K., Verduyck, M., and Winderickx, J. (2013). The benefits of humanized yeast models to study Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* *2013*, 760629.
- Friden, P., and Schimmel, P. (1988a). LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Molecular and cellular biology* *8*, 2690-2697.
- Friden, P., and Schimmel, P. (1988b). LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Molecular and Cellular Biology* *8*, 2690-2697.
- Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T., and Spang, A. (2005). New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *22*, 1-12.
- Georis, I., Feller, A., Tate, J.J., Cooper, T.G., and Dubois, E. (2009a). Nitrogen catabolite repression-sensitive transcription as a readout of Tor pathway regulation: the genetic background, reporter gene and GATA factor assayed determine the outcomes. *Genetics* *181*, 861-874.
- Georis, I., Feller, A., Vierendeels, F., and Dubois, E. (2009b). The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Molecular and cellular biology* *29*, 3803-3815.
- Georis, I., Tate, J.J., Cooper, T.G., and Dubois, E. (2008). Tor pathway control of the nitrogen-responsive *DAL5* gene bifurcates at the level of Gln3 and Gat1 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* *350*, 87-96.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., and Andre, B. (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* *27*, 3065-3086.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 1541-1553.
- Gonzalez, A., Shimobayashi, M., Eisenberg, T., Merle, D.A., Pendl, T., Hall, M.N., and Moustafa, T. (2015). TORC1 promotes phosphorylation of ribosomal protein S6 via the AGC kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* *10*, e0120250.

Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M.C., and Andersen, H.A. (1995). BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1269, 275-280.

Grenson, M. (1987a). 4-Aminobutyric acid (GABA) uptake in Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino acid permease, the proline permease and a GABA specific permease integrated into the GABA-catabolic pathway. *Life Sci Adv Biochem* 6, 35-39.

Grenson, M. (1987b). 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.

Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519-2524.

Guo, H., and Kohlhaw, G.B. (1996). Regulation of transcription in mammalian cells by yeast Leu3p and externally supplied inducer. *FEBS Letters* 390, 191-195.

Gutierrez, A., Beltran, G., Warringer, J., and Guillamon, J.M. (2013). Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PLoS one* 8, e67166.

Hartig, A., Simon, M.M., Schuster, T., Daugherty, J.R., Yoo, H.S., and Cooper, T.G. (1992). Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S.cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 20, 5677-5686.

Hazelwood, L.A., Daran, J.M., van Maris, A.J., Pronk, J.T., and Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology* 74, 2259-2266.

Hedbacker, K., and Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* 13, 2408-2420.

Hellauer, K., Rochon, M.H., and Turcotte, B. (1996). A novel DNA binding motif for yeast zinc cluster proteins: the Leu3p and Pdr3p transcriptional activators recognize everted repeats. *Molecular and Cellular Biology* 16, 6096-6102.

Hu, Y., Cooper, T.G., and Kohlhaw, G.B. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of GDH1, a key gene in nitrogen assimilation. *Molecular and cellular biology* 15, 52-57.

Idicula, A.M. (2002). Binding and Transcriptional Activation by Uga3p, a Zinc Binuclear Cluster Protein of *Saccharomyces cerevisiae*: Redefining the UAS<sub>GABA</sub> and the Uga3p Binding Site. . In Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology (Rhodes University).

Idicula, A.M., Blatch, G.L., Cooper, T.G., and Dorrington, R.A. (2002). Binding and activation by the zinc cluster transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. Redefining the UAS<sub>GABA</sub> and its interaction with Uga3p. *The Journal of biological chemistry* 277, 45977-45983.

Iraqui, I., Vissers, S., Andre, B., and Urrestarazu, A. (1999a). Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 19, 3360-3371.

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., de Craene, J.O., Boles, E., Urrestarazu, A., and Andre, B. (1999b). 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. *Molecular and cellular biology* 19, 989-1001.

Jacobs, P., Jauniaux, J.C., and Grenson, M. (1980). A cis-dominant regulatory mutation linked to the argB-argC gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 139, 691-704.



- Jiang, Y., and Broach, J.R. (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *The EMBO journal* 18, 2782-2792.
- Jorgensen, M.U., Gjermansen, C., Andersen, H.A., and Kielland-Brandt, M.C. (1997). STP1, a gene involved in pre-tRNA processing in yeast, is important for amino-acid uptake and transcription of the permease gene BAP2. *Curr Genet* 31, 241-247.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one* 6, e16015.
- Klasson, H., Fink, G.R., and Ljungdahl, P.O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Molecular and cellular biology* 19, 5405-5416.
- Klebl, F., Wolf, M., and Sauer, N. (2003). A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo*L.), and by *Arabidopsis thaliana*  $\delta$ -TIP or  $\gamma$ -TIP. *FEBS Letters* 547, 69-74.
- Kodama, Y., Omura, F., Takahashi, K., Shirahige, K., and Ashikari, T. (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. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 67, 1-15, table of contents.
- Krogerus, K., and Gibson, B.R. (2013). Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 6919-6930.
- Kulkarni, A., Buford, T.D., Rai, R., and Cooper, T.G. (2006). Differing responses of Gat1 and Gln3 phosphorylation and localization to rapamycin and methionine sulfoximine treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 6, 218-229.
- Laity, J.H., Lee, B.M., and Wright, P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 39-46.
- Levi, C.E., Cardillo, S.B., Bertotti, S., Rios, C., Correa Garcia, S., and Moretti, M.B. (2012). GABA induction of the *Saccharomyces cerevisiae* UGA4 gene depends on the quality of the carbon source: role of the key transcription factors acting in this process. *Biochemical and biophysical research communications* 421, 572-577.
- Liu, Z., Thornton, J., Spirek, M., and Butow, R.A. (2008). Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Molecular and cellular biology* 28, 551-563.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) 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.
- Ljungdahl, P.O., and Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 885-929.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Luzzani, C., Cardillo, S.B., Bermudez Moretti, M., and Correa Garcia, S. (2007). New insights into the regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* UGA4 gene: two parallel pathways participate in carbon-regulated transcription. *Microbiology* 153, 3677-3684.

Lynch, C.J., and Adams, S.H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews Endocrinology* 10, 723-736.

MacPherson, S., Larochelle, M., and Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 583-604.

Magasanik, B. (2005). The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16537-16538.

Magasanik, B., and Kaiser, C.A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1-18.

Mamane, Y., Hellauer, K., Rochon, M.H., and Turcotte, B. (1998). A Linker Region of the Yeast Zinc Cluster Protein Leu3p Specifies Binding to Everted Repeat DNA. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18556-18561.

Medina-Rivera, A., Defrance, M., Sand, O., Herrmann, C., Castro-Mondragon, J.A., Delerce, J., Jaeger, S., Blanchet, C., Vincens, P., Caron, C., *et al.* (2015). RSAT 2015: Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res* 43, W50-56.

Miller, J.H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 403.

Morschhauser, J. (2011). Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*. *International journal of medical microbiology : IJMM* 301, 390-394.

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

Naseeb, S., and Delneri, D. (2012). Impact of chromosomal inversions on the yeast DAL cluster. *PloS one* 7, e42022.

Nielsen, P.S., van den Hazel, B., Didion, T., de Boer, M., Jorgensen, M., Planta, R.J., Kielland-Brandt, M.C., and Andersen, H.A. (2001). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* amino acid permease gene BAP2. *Mol Gen Genet* 264, 613-622.

Noel, J., and Turcotte, B. (1998). Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *The Journal of biological chemistry* 273, 17463-17468.

Olive, M.G., Daugherty, J.R., and Cooper, T.G. (1991). DAL82, a second gene required for induction of allantoin system gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 173, 255-261.

Omnus, D.J., and Ljungdahl, P.O. (2013). Rts1-protein phosphatase 2A antagonizes Ptr3-mediated activation of the signaling protease Ssy5 by casein kinase I. *Molecular biology of the cell* 24, 1480-1492.

Omnus, D.J., Pfirrmann, T., Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O. (2011). A phosphodegron controls nutrient-induced proteasomal activation of the signaling protease Ssy5. *Molecular biology of the cell* 22, 2754-2765.

Park, J.H., and Lee, S.Y. (2010). Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Applied microbiology and biotechnology* 85, 491-506.

Pfirrmann, T., Heessen, S., Omnus, D.J., Andreasson, C., and Ljungdahl, P.O. (2010). The prodomain of Ssy5 protease controls receptor-activated proteolysis of transcription factor Stp1. *Molecular and cellular biology* 30, 3299-3309.

- Polotnianka, R., Monahan, B.J., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2004). TamA interacts with LeuB, the homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Leu3p, to regulate *gdhA* expression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 272, 452-459.
- Poulou, M., Bell, D., Bozonelos, K., Alexiou, M., Gavalas, A., Lovell-Badge, R., and Remboutsika, E. (2010). Development of a chromosomally integrated metabolite-inducible Leu3p-alpha-IPM "off-on" gene switch. *PLoS one* 5, e12488.
- Poulsen, P., Wu, B., Gaber, R.F., Ottow, K., Andersen, H.A., and Kielland-Brandt, M.C. (2005). Amino acid sensing by Ssy1. *Biochem Soc Trans* 33, 261-264.
- Ramos, F., el Guezar, M., Grenson, M., and Wiame, J.M. (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.
- Regenberg, B., During-Olsen, L., Kielland-Brandt, M.C., and Holmberg, S. (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 36, 317-328.
- Rocha-Viegas, L., Villa, R., Gutierrez, A., Iriando, O., Shiekhattar, R., and Di Croce, L. (2014). Role of UTX in retinoic acid receptor-mediated gene regulation in leukemia. *Mol Cell Biol* 34, 3765-3775.
- Rohde, J.R., and Cardenas, M.E. (2003). The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology* 23, 629-635.
- Sadowski, I., Breitreutz, B.J., Stark, C., Su, T.C., Dahabieh, M., Raithatha, S., Bernhard, W., Oughtred, R., Dolinski, K., Barreto, K., *et al.* (2013). The PhosphoGRID *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphorylation site database: version 2.0 update. *Database : the journal of biological databases and curation* 2013, bat026.
- Scazzocchio, C. (2000). The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* 3, 126-131.
- Scott, S., Abul-Hamd, A.T., and Cooper, T.G. (2000). Roles of the Dal82p domains in allophanate/oxalurate-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 275, 30886-30893.
- Scherens, B., Feller, A., Vierendeels, F., Messenguy, F., and Dubois, E. (2006). Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS yeast research* 6, 777-791.
- Schmidt, A., Hall, M.N., and Koller, A. (1994). Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Molecular and Cellular Biology* 14, 6597-6606.
- Schreve, J., Sin, J., and Garrett, J. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine. *J Bacteriol* 180, 2556-2556.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G., and Schreiber, S.L. (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr Biol* 10, 1574-1581.
- Shelest, E. (2008). Transcription factors in fungi. *FEMS microbiology letters* 286, 145-151.
- Small, A.J., Todd, R.B., Zanker, M.C., Delimitrou, S., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2001). Functional analysis of TamA, a coactivator of nitrogen-regulated gene expression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 265, 636-646.

Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., Urrestarazu, A., Jauniaux, J.C., and Andre, B. (1997). Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 23, 1157-1168.

Springael, J.Y., and Penninckx, M.J. (2003). Nitrogen-source regulation of yeast gamma-glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3. *The Biochemical journal* 371, 589-595.

Stanbrough, M., Rowen, D.W., and Magasanik, B. (1995). Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9450-9454.

Staschke, K.A., Dey, S., Zaborske, J.M., Palam, L.R., McClintick, J.N., Pan, T., Edenberg, H.J., and Wek, R.C. (2010). Integration of general amino acid control and target of rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. *The Journal of biological chemistry* 285, 16893-16911.

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

Talibi, D., Grenson, M., and Andre, B. (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., Liu, X., and Clarke, N.D. (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., and Cooper, T.G. (2007). Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. *The Journal of biological chemistry* 282, 18467-18480.

Tate, J.J., and Cooper, T.G. (2013). Five conditions commonly used to down-regulate tor complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes. *The Journal of biological chemistry* 288, 27243-27262.

Tate, J.J., Georis, I., Dubois, E., and Cooper, T.G. (2010). Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 285, 17880-17895.

Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sa-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 34, D446-451.

Teixeira, M.C., Monteiro, P.T., Guerreiro, J.F., Goncalves, J.P., Mira, N.P., dos Santos, S.C., Cabrito, T.R., Palma, M., Costa, C., Francisco, A.P., *et al.* (2014). The YEASTRACT database: an upgraded information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 42, D161-166.

Todd, R.B., Zhou, M., Ohm, R.A., Leeggangers, H.A., Visser, L., and de Vries, R.P. (2014). Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. *BMC genomics* 15, 214.

Uemura, T., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2007). Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 282, 7733-7741.

- Uemura, T., Tomonari, Y., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2004). Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 315, 1082-1087.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., *et al.* (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* 26, 663-674.
- van Vuuren, H.J., Daugherty, J.R., Rai, R., and Cooper, T.G. (1991). Upstream induction sequence, the cis-acting element required for response to the allantoin pathway inducer and enhancement of operation of the nitrogen-regulated upstream activation sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173, 7186-7195.
- Vieira, E.D., Andrietta Mda, G., and Andrietta, S.R. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 44, 551-558.
- Vissers, S., Andre, B., Muyldermans, F., and Grenson, M. (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., Andre, B., Muyldermans, F., and Grenson, M. (1990). Induction of the 4-aminobutyrate and urea-catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Specific and common transcriptional regulators. *Eur J Biochem* 187, 611-616.
- 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., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Wang, S.S., and Hopper, A.K. (1988). Isolation of a yeast gene involved in species-specific pre-tRNA processing. *Molecular and Cellular Biology* 8, 5140-5149.
- Wang, S.S., Stanford, D.R., Silvers, C.D., and Hopper, A.K. (1992). STP1, a gene involved in pre-tRNA processing, encodes a nuclear protein containing zinc finger motifs. *Molecular and Cellular Biology* 12, 2633-2643.
- Wielemans, K., Jean, C., Vissers, S., and Andre, B. (2010). Amino acid signaling in yeast: post-genome duplication divergence of the Stp1 and Stp2 transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 285, 855-865.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L., and Pabo, C.O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29, 183-212.
- Wong, K.H., Hynes, M.J., Todd, R.B., and Davis, M.A. (2009). Deletion and overexpression of the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreB reveals unexpected pleiotropy. *Microbiology* 155, 3868-3880.
- Workman, J.J., Chen, H., and Larabee, R.N. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* TORC1 Controls Histone Acetylation by Signaling Through the Sit4/PP6 Phosphatase to Regulate Sirtuin Deacetylase Nuclear Accumulation. *Genetics* 203, 1733-1746.
- Wu, B., Ottow, K., Poulsen, P., Gaber, R.F., Albers, E., and Kielland-Brandt, M.C. (2006). Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. *J Cell Biol* 173, 327-331.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.

Yoo, H.S., Genbauffe, F.S., and Cooper, T.G. (1985). Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the DAL gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 5, 2279-2288.

Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27-81.

Zargari, A., Boban, M., Heessen, S., Andreasson, C., Thyberg, J., and Ljungdahl, P.O. (2007). Inner nuclear membrane proteins Asi1, Asi2, and Asi3 function in concert to maintain the latent properties of transcription factors Stp1 and Stp2. *The Journal of biological chemistry* 282, 594-605.

Zhou, K.M., and Kohlhaw, G.B. (1990). Transcriptional activator LEU3 of yeast. Mapping of the transcriptional activation function and significance of activation domain tryptophans. *The Journal of biological chemistry* 265, 17409-17412.

Zhu, J., and Zhang, M.Q. (1999). SCPD: a promoter database of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* 15, 607-611.



