



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

Metabolismo del nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*: mecanismos moleculares que determinan la jerarquía en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno.

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

**SEBASTIAN ANIBAL MUÑOZ**

Directora de Tesis: Dra. Mariana Bermúdez Moretti  
Consejera de estudios: Dra. Silvia Graciela Rossi

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, Mayo de 2022

METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN *Saccharomyces cerevisiae*: MECANISMOS MOLECULARES QUE DETERMINAN LA JERARQUÍA EN LA UTILIZACIÓN DE FUENTES POBRES DE NITRÓGENO.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de nitrógeno. En presencia de fuentes ricas de nitrógeno los genes de las vías de utilización de las fuentes pobres no se expresan. Dicho mecanismo es conocido como *Nitrogen Catabolite Repression* (NCR). Últimamente se han obtenido evidencias de que también hay una jerarquía dentro del uso de las fuentes pobres. El factor de transcripción Dal81 participa en la regulación de genes involucrados en varias vías de utilización de fuentes pobres de nitrógeno. Para activar la transcripción dependiente del factor Dal81 de cada gen (o grupo de genes), también es necesaria la participación de otro factor (específico de inductor) que sería el responsable de la especificidad de la respuesta. Así, para el catabolismo de fuentes pobres de nitrógeno, como alantoína y leucina, son necesarios el factor de transcripción pleiotrópico Dal81 y otro factor específico de cada fuente (Dal82 y Stp1/Stp2) para que se produzca la activación transcripcional de los genes que codifican para permeasas tales como Dur3, Agp1, Bap2 y Bap3. Por otra parte, para que ocurra la inducción de los genes de la utilización del GABA en respuesta a este compuesto, Dal81 actúa en conjunto con el factor de transcripción específico Uga3. La existencia de un factor de transcripción compartido entre estas vías inducibles, podría permitir una activación jerarquizada de las mismas y la regulación de otros procesos biológicos sincrónicos, cuando varias de las fuentes de nitrógeno antes mencionadas se encuentran disponibles simultáneamente.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales se determina la regulación coordinada de genes involucrados en el uso de fuentes de nitrógeno pobres.

En este trabajo, demostramos que Uga3, conocido hasta ahora como un factor específico de la vía del GABA, regula al gen *BAP2*, responsable de la incorporación de aminoácidos ramificados a las células. Encontramos también que Uga3, además de afectar la utilización de GABA y leucina, promueve la tolerancia a estrés térmico y oxidativo. Además, mediante co-inmunoprecipitación de diferentes factores de transcripción, encontramos que Dal81 se encuentra unido al factor de transcripción Uga3 aún en ausencia de GABA y de manera independiente de la secuencia  $UAS_{GABA}$  de los genes *UGA*. Por otra parte, también detectamos una interacción independiente de inductor entre Leu3 y Uga3.

Mediante el análisis global del proteoma de células deficientes en *UGA3*, identificamos 17 proteínas sobre-representadas en esta mutante, mientras que otras 50 se encuentran sub-representadas. A través de análisis *in silico* de las 67 proteínas expresadas diferencialmente, encontramos que 8 de ellas participan del metabolismo de fuentes pobres de nitrógeno o son permeasas de aminoácidos. Demostramos que Arg5,6, está regulado por Uga3 a nivel de su transcripción, y que la represión por

arginina de este gen depende de Uga3. Sin embargo, no detectamos interacción entre Uga3 y la región regulatoria de *ARG5,6*.

Por último, demostramos que la ausencia de Uga3, así como también la de Dal81, también produce cambios significativos en el contenido de varios aminoácidos. Encontramos correlaciones entre estas modificaciones y la expresión diferencial de proteínas asociadas al metabolismo de fuentes de nitrógeno y permeasas. La mutante *uga3* tiene un alto contenido de arginina intracelular. Se sabe que la acumulación intracelular de arginina promueve la tolerancia a estrés por etanol, por lo que podría relacionarse al menos parcialmente, con los efectos de tolerancia a estrés observados. Sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo, no encontramos cambios significativos en la tolerancia a etanol entre esta mutante y la cepa *wild type*.

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae*, metabolismo del nitrógeno, factores de transcripción, Dal81, Uga3, permeasas, aminoácido

## NITROGEN METABOLISM IN *Saccharomyces cerevisiae*: MOLECULAR MECHANISMS THAT DETERMINE THE HIERARCHY IN THE USE OF POOR NITROGEN SOURCES

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to use a wide variety of compounds as nitrogen source. When rich nitrogen sources are available, genes for poor sources utilization pathways are not expressed. This mechanism is known as Nitrogen Catabolite Repression (NCR). Lately there has been evidence that there is also a hierarchy within the use of poor sources. Dal81 transcription factor participates in the regulation of several genes involved in different poor nitrogen sources pathways. To activate each gene (or group of genes) Dal81-dependent transcription, another factor (inducer-specific), which would be responsible for the specificity of response, is also necessary. Thus, to catabolize poor nitrogen sources such as allantoin and leucine, the pleiotropic transcription factor Dal81 and another factor specific of each source (Dal82 and Stp1 / Stp2, respectively) are necessary. These factors transcriptionally activate genes that encode permeases such as Dur3, Agp1, Bap2 and Bap3. On the other hand, the induction of genes of GABA utilization depends on Dal81 in conjunction with the specific transcription factor Uga3. The fact that these inducible pathways are regulated by a common transcription factor could allow their hierarchical activation, and the regulation of other synchronous biological processes, when several of the above-mentioned nitrogen sources are simultaneously available.

The aim of this work was to study the molecular mechanisms through which the coordinated regulation of genes involved in the use of poor nitrogen sources is determined.

In this work, we show that Uga3, known until now as a specific factor of the GABA pathway, regulates the *BAP2* gene, responsible for the incorporation of branched-chain amino acids into cells. We also found that Uga3, in addition to affecting the utilization of GABA and leucine, promotes tolerance to thermal and oxidative stress. Furthermore, by co-immunoprecipitation of different transcription factors, we found that Dal81 is bound to the Uga3 transcription factor even in the absence of GABA and independently of the UAS<sub>GABA</sub> sequence of the *UGA* genes. On the other hand, we also detected an inducer-independent interaction between Leu3 and Uga3.

By global analysis of the proteome of *UGA3*-deficient cells, we identified 17 proteins overrepresented in this mutant, while another 50 were underrepresented. Through *in silico* analysis of the 67 differentially expressed proteins, we found that 8 of them participate in the metabolism of poor nitrogen sources or are amino acid permeases. We also found that *ARG5,6* is regulated by Uga3 at the level of its transcription, and that the arginine repression of this gene depends on Uga3. However, we did not detect interaction between Uga3 and the regulatory region of *ARG5,6*.

Finally, we show that the absence of Uga3, as well as that of Dal81, also produces significant changes in the content of several amino acids. We found correlations between these modifications and the differential expression of proteins associated with

the metabolism of nitrogen sources and permeases. The *uga3* mutant has a high intracellular arginine content. It is known that the intracellular accumulation of arginine promotes tolerance to ethanol stress, so it could be related, at least partially, to the stress tolerance effects observed. However, under our working conditions, we did not find significant changes in ethanol tolerance between this mutant and the wild type strain.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, nitrogen metabolism, transcription factors, Dal81, Uga3, permeases, amino acids

*Como argentino, forjado en todos mis niveles académicos en instituciones educativas públicas, expreso mi mayor gratitud y respeto a todos los agentes estatales, académicos y sociales que sostienen, ejercen y defienden la educación pública gratuita, universal y laica.*

*Sostengamos éste ideal confiando en que además de ser una herramienta de avance para el desarrollo y mejoramiento de la vida y las tecnologías, es también una de las herramientas que en su justa y apropiada instrucción, genera equidad social y acompaña al ser humano en la insondable búsqueda de sentido a su propia existencia...*

*Sebastian Anibal Muñoz*

## ÍNDICE

TRABAJOS PUBLICADOS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
2. Metabolismo del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i> .....	13
3. Sensado de compuestos nitrogenados.....	16
3.1. Sensado de aminoácidos extracelulares: el sensor SPS.....	16
3.2. Sensado de aminoácidos intracelulares: la vía TOR.....	19
4. Fuentes de nitrógeno pobres.....	20
4.1. Ácido $\gamma$ -amibutírico.....	23
4.2. Aminoácidos ramificados.....	26
5. Factores de transcripción.....	28
6. Jerarquía de las fuentes de nitrógeno.....	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
Hipótesis.....	36
Objetivo general.....	36
Objetivos particulares.....	36
MATERIALES Y METODOS.....	37
1. Cepas.....	38
1.1. Levaduras.....	38
1.2. Bacterias.....	38
2. Medios de cultivo.....	39
3. Plásmidos.....	40
4. Extracción de ADN genómico.....	41
5. Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	41
6. Transformación de bacterias con plásmidos.....	42
6.1. Preparación de bacterias competentes.....	42
6.2. Transformación de bacterias.....	42
7. Transformación de levaduras con plásmidos.....	42
8. Construcción de cepas mutantes de levaduras que expresan proteínas de fusión.....	43
8.1. Obtención de fragmentos de ADN.....	44
8.2. Precipitación de los fragmentos de PCR.....	44
8.3. Transformación de levaduras.....	45
8.4. <i>Screening</i> de colonias.....	45
8.5. Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre.....	45
9. Western blot.....	46
9.1. Extracción de proteínas.....	46
9.2. Extracción de proteínas e inmunoprecipitación.....	47
9.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado de la membrana.....	48
10. Análisis de proteomas.....	48
10.1. Extracción de proteínas totales.....	48
10.2. Espectrometría de masas y análisis de datos.....	49
10.2.1 Análisis <i>in silico</i> .....	50
11. Determinación de la concentración de aminoácidos intracelulares.....	51
11.1. Cuantificación de glutamina y glutamato mediante electroforesis capilar zonal.....	51

11.2. Determinación de aminoácidos mediante resonancia magnética nuclear.....	52
12. Ensayos de expresión.....	53
12.1. Ensayo de gen reportero lacZ.....	53
12.2. Medición de los niveles de ARN mensajero.....	54
12.2.1. Extracción de ARN.....	54
12.2.2. Retrotranscripción.....	54
12.2.3. Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real.....	55
13. Inmunoprecipitación de la cromatina.....	56
13.1. Tratamientos.....	56
13.2. Fijación.....	56
13.3. Ruptura celular.....	57
13.4. Sonicado.....	57
13.5. Inmunoprecipitación.....	57
13.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	59
CAPÍTULO I Regulación de los genes de las permeasas de leucina.....	61
Discusión.....	69
CAPITULO II Interacción entre factores de transcripción que participan en la regulación de genes de la utilización de fuentes pobres de nitrógeno.....	73
Discusión.....	86
CAPITULO II Interacción entre factores de transcripción que participan en la regulación de genes de la utilización de fuentes pobres de nitrógeno.....	89
Discusión.....	115
DISCUSIÓN GENERAL.....	119
APÉNDICE.....	125
REFERENCIAS.....	141



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

Novel function of transcription factor Uga3 as an activator of branched-chain amino acids permease BAP2 gene expression. Muñoz, Sebastian Anibal; Gulias, Juan Facundo; Valencia Guillen, Jenniffer; Correa García, Susana Raquel; Bermúdez Moretti, Mariana (Society for General Microbiology, 2019-10)

ABREVIATURAS

AcLi: Acetato de litio

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BAAs: *Branched Amino Acids*

BSA: seroalbúmina bovina

cMyc: etiqueta de proteína polipeptídica derivada del producto del gen *c-MYC*

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

G418: geneticina

GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico

HA: hemoaglutinina

lacZ: gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa

NCR: represión catabólica por nitrógeno

ONPG: orto-nitrofenilgalactopiranosido

PBS: buffer salino con fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa PEG: Polietilenglicol

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RNAse: enzima que degrada ácido ribonucleico

SDS: duodecil sulfato de sodio

SPS: sensor de aminoácidos

Taq: *Thermus aquaticus*

UAS: secuencia activadora ubicada río arriba de la TATA Box

# INTRODUCCIÓN

### 1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo perteneciente al grupo de los comúnmente denominados hongos (reino Fungi). Filogenéticamente se clasifica dentro del dominio *Eukarya*, *phylum Ascomycetes*, clase *Hemiascomycetes* y se agrupa con otras levaduras dentro del Orden *Saccharomycetales*. Se caracteriza por ser un hongo unicelular ovalado o esférico de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , que presenta un ciclo biológico haploide y diploide, con la particularidad de dividirse mediante un proceso de división celular asimétrico, denominado gemación. En la naturaleza, prospera típicamente en hábitats ricos en azúcares tales como flores, frutos y jugo de frutas; también en el suelo, hojas, cortezas y el tracto intestinal de animales de sangre caliente. En el laboratorio es fácilmente cultivable, creciendo a 30°C con tiempos de duplicación entre 90 y 140 minutos. Su genoma, de más de 13 millones de pares de bases, está completamente secuenciado. El ADN nuclear está organizado en 16 cromosomas que presentan 6275 marcos abiertos de lectura (Schneiter 2004).

Este microorganismo no patogénico se caracteriza además por poseer un 60% de genes con homología con genes humanos (Botstein (1997)) y el 25% de los genes humanos relacionados con enfermedades presentan homología con genes de *S. cerevisiae* (Bassett, et al. 1996). En consecuencia, y sumado a la facilidad de manipulación de las células de levadura, *S. cerevisiae* resulta un organismo eucariota modelo para el estudio de procesos tales como envejecimiento, regulación de la expresión génica, transducción de señales, metabolismo, apoptosis, ciclo celular y trastornos neurodegenerativos (Karathia, et al. 2011).

Además de estas características, su tolerancia al pH bajo y a otros inhibidores de la fermentación, *S. cerevisiae* es también ampliamente utilizada en la industria para la producción de enzimas, biocombustibles (etanol, farneseno) y compuestos farmacéuticos (resveratrol). También es utilizada para la producción de alimentos panificados y en la industria vitivinícola y de cervecería (Borodina and Nielsen 2014).

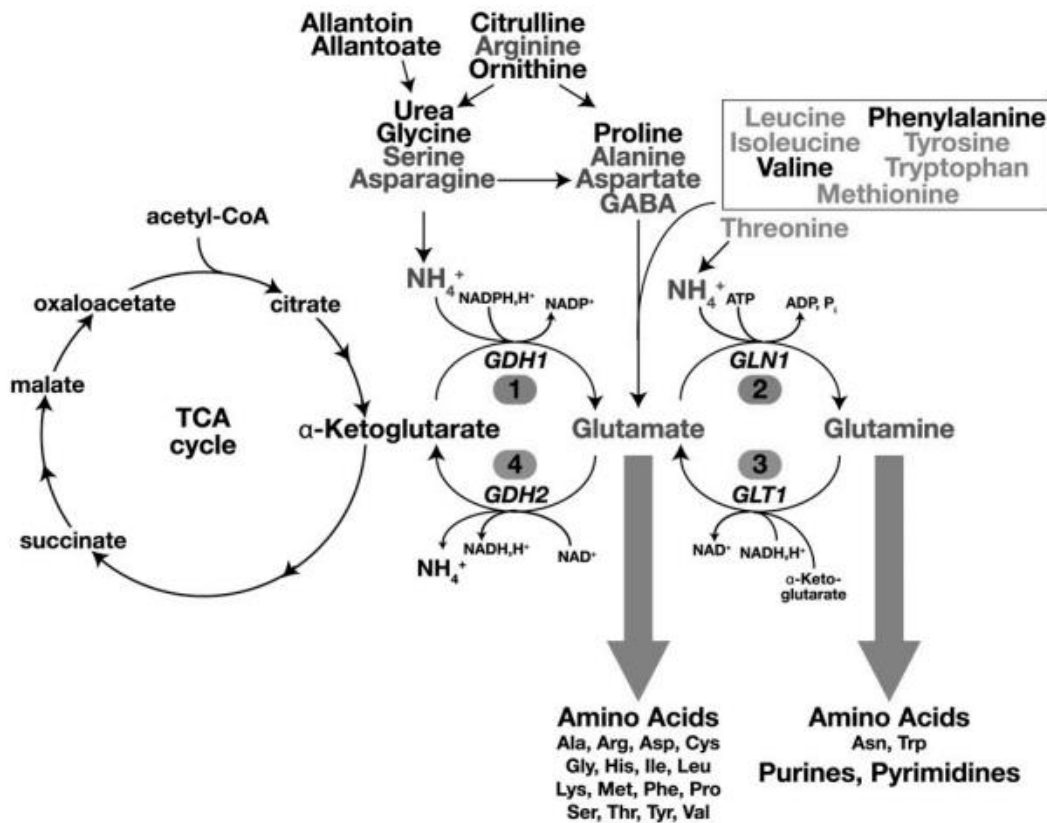
*Saccharomyces*, al igual que otros microorganismos unicelulares, ha evolucionado hacia la optimización en el uso de los nutrientes accesibles y su adaptación a deficiencias nutricionales de manera de maximizar su supervivencia. Así, las células de levadura tienen la capacidad de evaluar la cantidad y la naturaleza de nutrientes disponibles y de modificar sus programas transcripcionales metabólicos y de desarrollo en respuesta a esa evaluación (Zaman, et al. 2008). El estudio y comprensión de los mecanismos de sentido y metabolismo de nutrientes son esenciales para el mejoramiento y el diseño de procesos industriales que involucran el uso de levaduras.

## 2. Metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*

El carbono y el nitrógeno son nutrientes esenciales para todas las formas de vida. El metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno son fundamentales para la producción de los componentes celulares y por su aporte al metabolismo energético (Zhang, et al. 2018).

Las células de levaduras pueden transportar y utilizar una amplia variedad de compuestos nitrogenados, como amonio, aminoácidos, bases nitrogenadas y derivados de purinas (Cooper 1982). Cada fuente de nitrógeno contribuye de forma diferente al crecimiento celular. Las levaduras han desarrollado distintos mecanismos de detección y de regulación (activación y represión) que le posibilitan seleccionar el uso de la mejor fuente disponible en el medio (ter Schure, et al. 2000).

En el hábitat natural de la levadura *S. cerevisiae* existe una gran variedad de fuentes de nitrógeno disponibles. Sin embargo, no todas las fuentes de nitrógeno son capaces de favorecer el crecimiento de la misma manera. El crecimiento en fuentes ricas de nitrógeno permite alcanzar rendimientos mayores que los obtenidos cuando las células crecen en presencia de una fuente pobre. Fuentes ricas de nitrógeno son por ejemplo amonio, glutamina y asparagina mientras que prolina y urea, entre otras, se clasifican como fuentes pobres. Para poder utilizar estas moléculas como fuente de nitrógeno, las células necesitan convertirlas en glutamato y amonio, compuestos que luego pueden combinarse para formar glutamina. Ambos aminoácidos, glutamato y glutamina, sirven como compuestos donores de nitrógeno para la síntesis de todos los componentes celulares que contienen nitrógeno. La interconversión entre amonio, glutamato y glutamina juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno y se denomina metabolismo central del nitrógeno (CNM: Central Nitrogen Metabolism) (ter Schure, et al. 2000) (Figura 1). El 85% del nitrógeno celular se obtiene a partir del glutamato, mientras que el 15% restante proviene de la glutamina (Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012; Magasanik and Kaiser 2002).

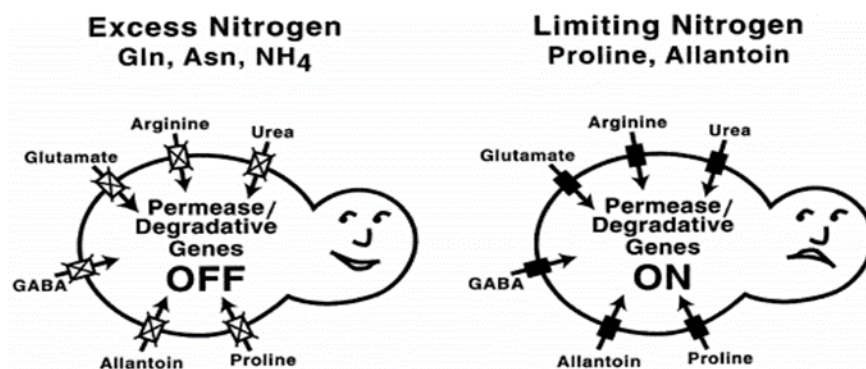


**Figura 1. Diagrama de las principales vías involucradas en el metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae*.** Los compuestos nitrogenados se sintetizan a partir de glutamato o glutamina, productos del catabolismo de las fuentes de nitrógeno disponibles. Las reacciones 1 y 2 catalizadas por las enzimas 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).

La regulación del metabolismo del nitrógeno está dada por un conjunto de procesos interconectados, como el sistema sensor de señalización Ssy1-Ptr3-Ssy5 (sistema SPS) (Forsberg, et al. 2001a), la vía de TOR (*Target Of Rapamycin*) (Conrad, et al. 2014), la represión catabólica por nitrógeno (NCR) (Hofman-Bang 1999), el sistema general de control de aminoácidos (GAAC) (Hinnebusch and Natarajan 2002) y otros mecanismos relacionados. Todas estas vías regulatorias comprenden un sistema complicado y sofisticado para mediar el flujo de nitrógeno que se origina en su detección, continúa con su transporte, y sigue hacia el catabolismo (Zhang, et al. 2018).

La represión catabólica por nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*) en las levaduras es un mecanismo global de control transcripcional que permite hacer un uso selectivo de las fuentes de nitrógeno. En presencia de una fuente rica como glutamina o amonio, se produce la represión de los genes sensibles a NCR (o genes NCR),

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 (Figura 2). El uso selectivo de una fuente de nitrógeno, además de asegurar la mayor tasa de crecimiento, tiene importancia 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). También tiene relevancia 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).

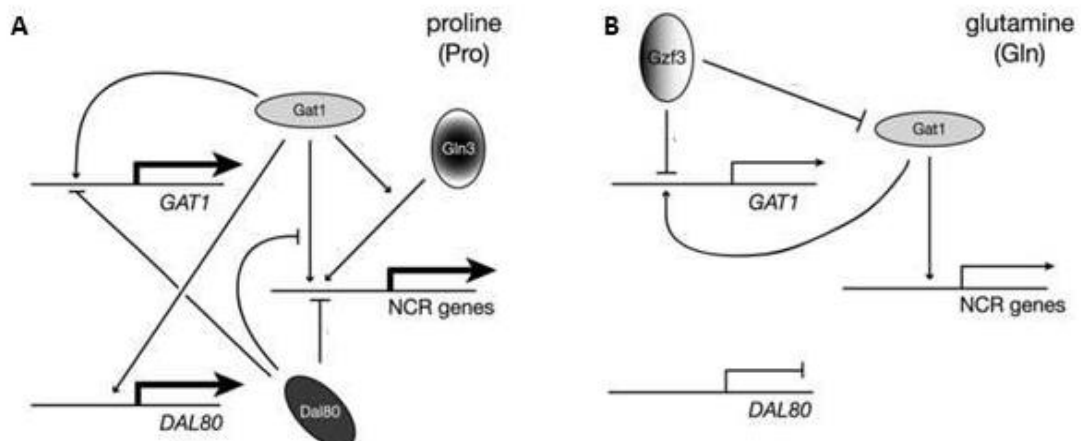


**Figura 2. Esquema de los procesos que llevan a la utilización de fuentes pobres de nitrógeno en presencia o ausencia de fuentes ricas.** En condiciones de exceso de nitrógeno, la transcripción de genes que codifican para las proteínas necesarias para el transporte y degradación de fuentes pobres de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

En el mecanismo 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, Dal80/Uga43 y Gzf3/Deh1/Nil2. A excepción de Gln3, que se expresa constitutivamente y puede activar la expresión de los genes NCR en forma independiente, la expresión de los genes de los factores GATA está regulada por los otros miembros de esta familia (Figura 3A). Esto incluye la regulación autógena de Gat1, Dal80 y Gzf3 (Cooper 2002; Georis, et al. 2009; Georis, et al. 2015).

En presencia de una fuente rica de nitrógeno, Gln3 y Gat1 están fosforiladas (por acción del complejo TORC1) y se localizan en el citoplasma (estando también Gln3 unida a Ure2), reprimiéndose así la expresión de los genes del catabolismo de fuentes pobres. En esta condición la expresión de Dal80 está reprimida y Gzf3 reprime la expresión de Gat1 (Figura 3B) (Beck and Hall 1999; Cox, et al. 2000; Cox, et al. 2002; Georis, et al. 2008).

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, activándolos. Uno de los blancos de Gat1 es DAL80. La acción de Dal80 es relevante ya que modula la expresión de otros genes NCR cuando se encuentran presentes múltiples fuentes de nitrógeno (Cunningham, et al. 2000; Georis, et al. 2009; Scherens, et al. 2006; Soussi-Boudekou, et al. 1997) (Figura 3A).



**Figura 3. Esquema de la autoregulación de los factores GATA y la regulación sobre la expresión 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. 2009).

### 3. Sensado de compuestos nitrogenados

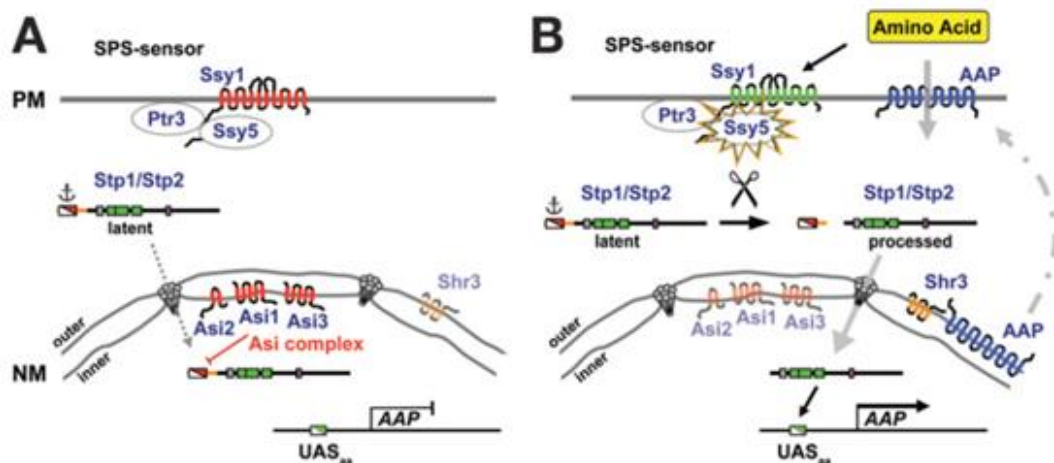
Las células de levadura crecen en diferentes entornos con diversas fuentes de nitrógeno. Por lo tanto, la detección de fuentes de nitrógeno es esencial para que las células reconfiguren el metabolismo celular para un crecimiento y una proliferación óptimos (Rodkaer and Faergeman 2014). Dos vías reguladoras principales son responsables de la detección de fuentes de nitrógeno en el medio ambiente: el sistema sensor SPS y la vía TOR. El sistema sensor SPS es responsable de la detección de aminoácidos extracelulares, mientras que la vía TOR está principalmente involucrada en la detección de aminoácidos intracelulares (Zhang, et al. 2018).

#### 3.1. Sensado de aminoácidos extracelulares: el sensor SPS

Mediante el sensor SPS, *S. cerevisiae* es capaz de sensar la presencia de aminoácidos extracelulares e inducir la expresión de los genes necesarios para su incorporación y catabolismo. Este sensor se localiza en la membrana celular y consiste en un complejo proteico compuesto por las proteínas Ssy1, Ptr3 y Ssy5 (Forsberg, et al. 2001a). Los



efectores finales de este sistema son los factores de transcripción Stp1 y Stp2. En ausencia de inductor, Stp1 y Stp2 permanecen en estado latente en el citoplasma (Figura 4A). Cuando el sensor detecta la presencia de aminoácidos extracelulares, ambos factores de transcripción son clivados en su extremo N-terminal (Andreasson and Ljungdahl 2002; Andreasson and Ljungdahl 2004) y 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 4B). El factor de transcripción pleiotrópico Dal81, facilita la unión de los factores de transcripción Stp1 y Stp2 a sus genes blanco (Zhang, et al. 2018). 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. 1999; Schmidt, et al. 1994). Estos genes codifican para permeasas responsables de la incorporación de aminoácidos.



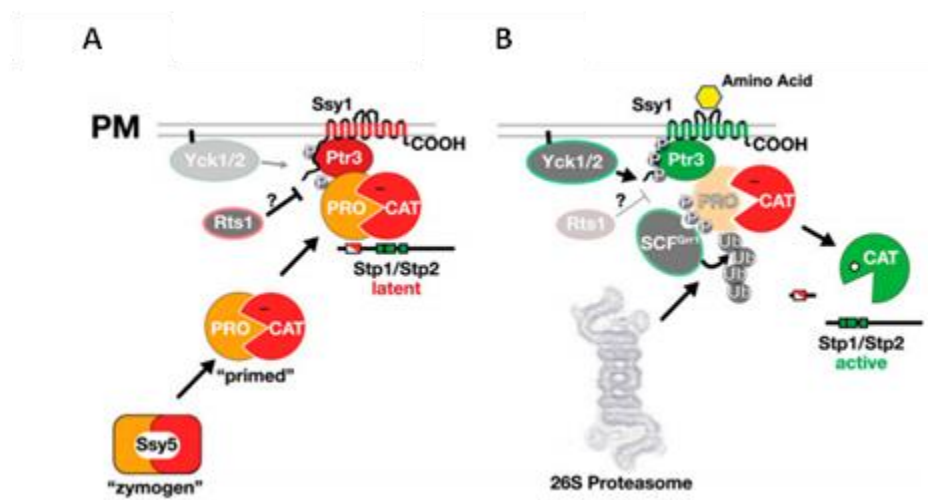
**Figura 4. Sensado de aminoácidos extracelulares por el complejo SPS. (A)** Estado inactivo del sensor SPS en ausencia de estímulo. **(B)** Activación de la vía SPS en presencia de aminoácidos extracelulares. PM membrana plasmática, AAP permeasas de aminoácidos (Ljungdahl 2009).

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. 1999; 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 andamiaje 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, *Receptor Activated Proteolysis*), 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 5A). En presencia de aminoácidos extracelulares (Figura 5B), Ssy1 se estabiliza en una conformación que facilita la fosforilación del prodominio N-terminal de Ssy5 (Omnus, et al. 2011; Pfirmann, 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, 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 5. 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).

Ptr3, el componente menos estudiado de este sensor, 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).

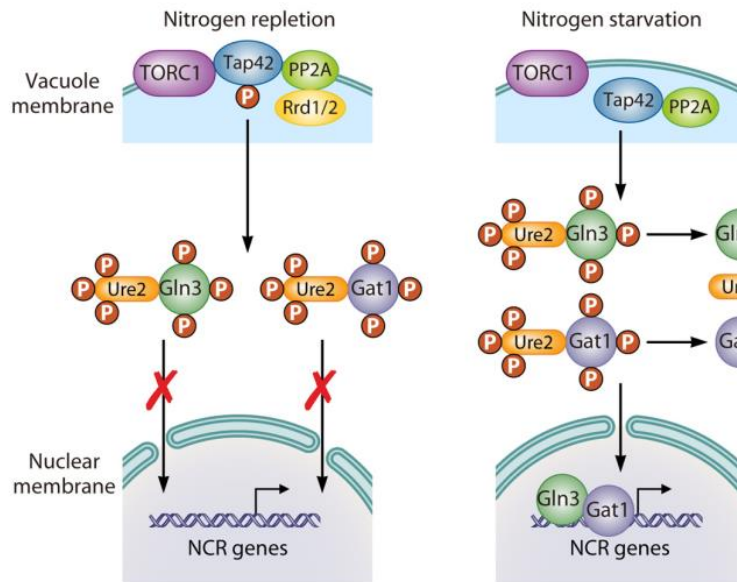
Las proteínas del complejo Asi (Asi1, Asi2 y Asi3), localizadas en la membrana nuclear interna, constituyen un mecanismo de control de este sistema sensor. En ausencia de aminoácidos extracelulares, Stp1 y Stp2 sin clivar pueden escapar al mecanismo de retención citoplasmática mediado por Ssy5 y entrar 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 4) (Boban, et al. 2006; Zargari, et al. 2007).

### 3.2. Sensado de aminoácidos intracelulares: 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 y se encuentra en todos los eucariotas, habiendo demostrado ser esencial en la reprogramación del metabolismo celular para un crecimiento óptimo en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Kim and Guan 2011; Loewith and Hall 2011). 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, en la regulación de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas y en el catabolismo de nitrógeno. El tratamiento con rapamicina produce un efecto similar, aunque no idéntico, al del ayuno de nutrientes, observándose disminución en la síntesis proteica, inducción de autofagia e ingreso al estado G0 (Rohde and Cardenas 2003; Workman, et al. 2016). TORC2 es insensible a rapamicina y participa en la división celular y otros procesos esenciales (Tate and Cooper 2013; Zaman, et al. 2008).

Se ha propuesto que la vía TOR regula directamente al mecanismo de NCR mediante de la retención citoplasmática de Gln3 mediada por Ure2, debido al funcionamiento del complejo Tap42-fosfatasa (Beck and Hall 1999; Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012). El complejo Tap42-fosfatasa, es uno de los efectores de la vía TOR, que en particular controla los genes sensibles a NCR (Figura 6) (Zhang, et al. 2018). Frente a 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; 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, en condiciones de ayuno 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 (factor positivo GATA) 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).



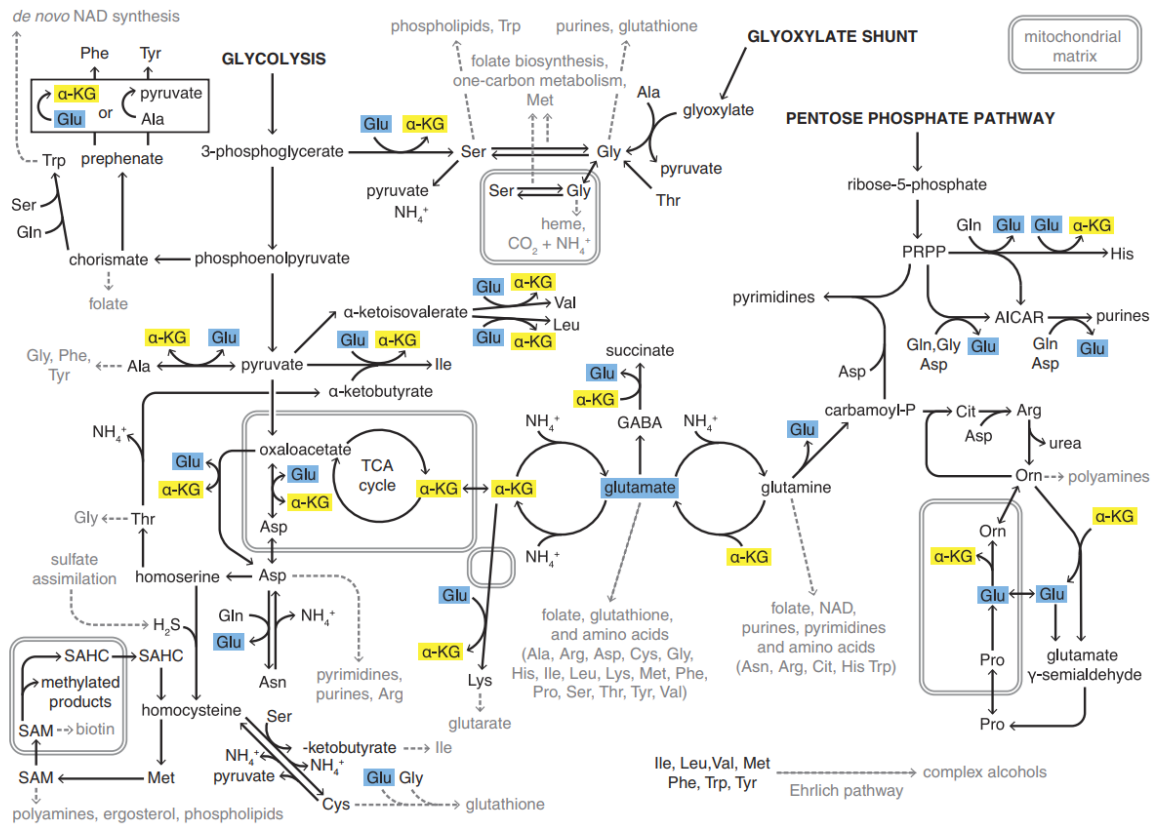
**Figura 6. Regulación de la expresión de genes sensibles a NCR a través de la vía TORC1.** En condiciones de un exceso de nitrógeno, el complejo TORC1 se encuentra activo y los factores GATA Gat1 y Gln3 se encuentran en el citoplasma asociados a la proteína Ure2. En condiciones de ayuno de nitrógeno, TORC1 se encuentra inactivo y la fosfatasa PP2A asociada a Tap42 desfosforila a estos factores GATA que translocan al núcleo y transcriben genes sensibles a NCR (Zhang, et al. 2018).

El sentido de nitrógeno intracelular realizado por TORC1 y la posterior regulación de los factores GATA positivos Gat1 y Gln3 no interfieren con la vía de señalización disparada por aminoácidos extracelulares a través del sensor SPS (Abdel-Sater, et al. 2004b). Sin embargo, la localización nuclear de Stp1 y la consecuente transcripción de sus genes blanco dependen de la adecuada funcionalidad de la vía TORC1 evidenciando que ambas vías de señalización no son totalmente independientes (Shin, et al. 2009).

#### 4. Fuentes de nitrógeno pobres

Como mencionamos anteriormente *S. cerevisiae* puede utilizar como fuente de nitrógeno una amplia variedad de compuestos, entre ellos los aminoácidos proteinogénicos y otros metabolitos análogos, como la citrulina, ornitina o ácido gamma-aminobutírico (GABA). Los aminoácidos participan de varias vías metabólicas, incluyendo la síntesis de NAD<sup>+</sup>, glutatión, nucleótidos, poliaminas y fosfolípidos. Las levaduras tienen la capacidad de sintetizarlos *de novo* o importarlos desde el medio

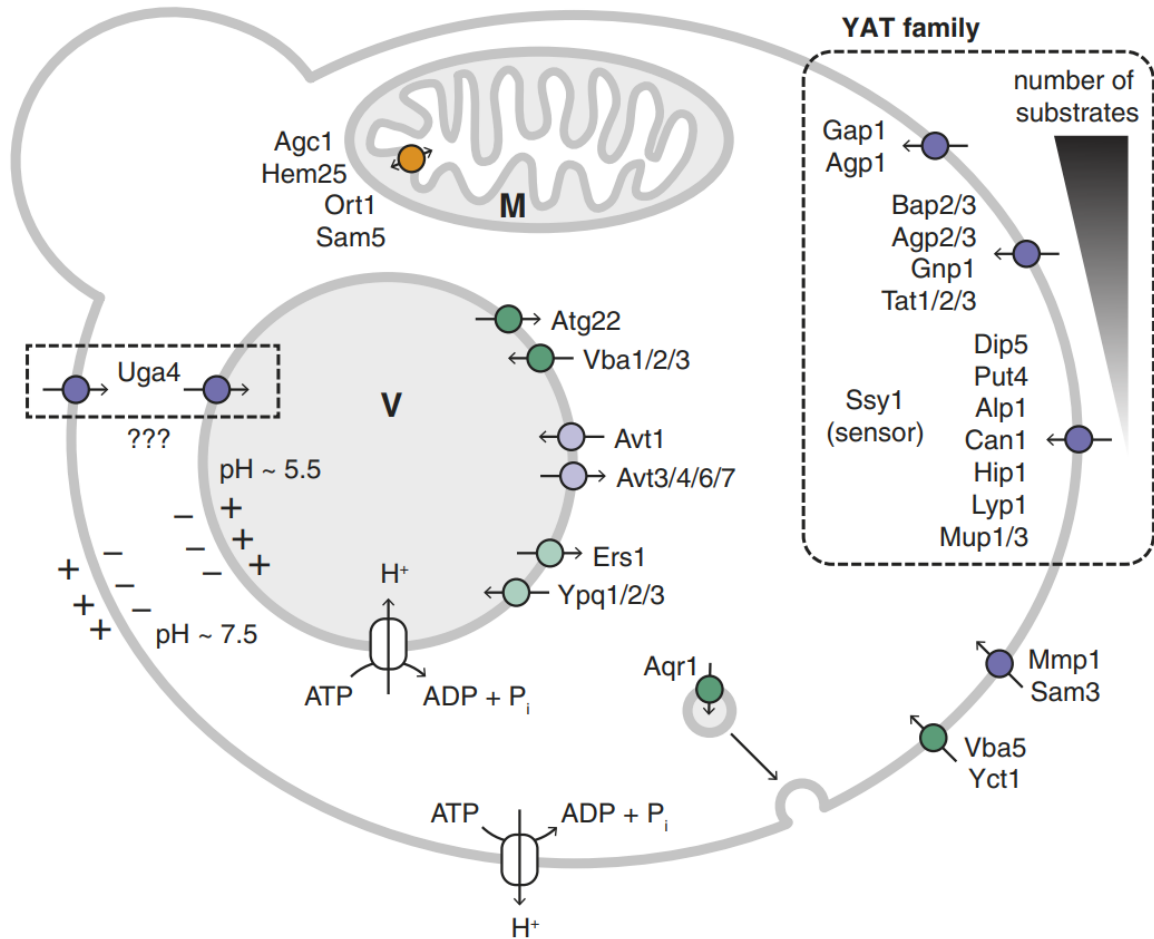
extracelular con un menor costo energético. Una vez dentro de la célula, los aminoácidos son activamente transportados desde y hasta, la vacuola y la mitocondria (Figura7) (Bianchi, et al. 2019).



**Figura 7. Diagrama general de las vías metabólicas que involucran aminoácidos.** Los recuadros con doble línea indican reacciones que se sabe o se predice que ocurren en la matriz mitocondrial. Los aminoácidos proteínogénicos están indicados por su código de tres letras. Otras abreviaturas: α-KG, alfa-cetoglutarato; AICAR, amino imidazol carboxamida ribonucleótido; Cit, citrulina; GABA, ácido gama-aminobutírico; Orn, ornitina; PRPP, fosforibosil-pirofosfato (Bianchi, et al. 2019).

Contextualizando la complejidad de la regulación metabólica, hay que tener en cuenta además el flujo dinámico y compartimentalizado de los metabolitos en la célula. Por ejemplo, entre el 80% y el 90% del *pool* de histidina, lisina y arginina se localiza en vacuola; mientras que una fracción similar de glutamato y aspartato, se localiza en el citoplasma. En el mismo sentido, en la mitocondria se acumulan metabolitos propios de las vías metabólicas que transcurren completamente allí como el TCA; o de vías que están físicamente divididas como la síntesis de arginina, cuyas enzimas específicas están en la matriz mitocondrial o en el citoplasma (Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012; Majd, et al. 2018; Tone, et al. 2015). Esta dinámica en el flujo de aminoácidos pone de manifiesto la existencia de distintas permeasas y la relevancia del funcionamiento del

sistema de transporte de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 8) (Bianchi, et al. 2019).



**Figura 8. Sistemas de transporte en membranas, importantes para el metabolismo y compartimentalización de aminoácidos.** Las permeasas de aminoácidos localizadas en membrana plasmática (AAP= Amino Acids Permeases o YAT=Yeast Amino Acids Transporters) se presentan con su rango de especificidad, esquemáticamente graficado en el gradiente del triángulo coloreado. M: mitocondria; V: vacuola (Bianchi, et al. 2019).

La mayoría de los aminoácidos presentes en el medio externo son detectados por el complejo SPS, sensor acoplado a la membrana. A través los factores de transcripción Stp1, Stp2 y Dal81, SPS activa la transcripción de los genes de varias permeasas de aminoácidos (Abdel-Sater, et al. 2004b; Andreasson and Ljungdahl 2004). Dependiendo del compuesto nitrogenado, se activarán entonces controles transcripcionales sobre los genes que participan en vías catabólicas y de transporte, pudiendo ejercerse estos controles sobre algunos genes específicos para el catabolismo de una fuente en particular, o sobre varios genes, a través del mecanismo NCR (Cooper 2002).

Más de 500 genes se encuentran regulados por la fuente de nitrógeno (Godard, et al. 2007). Si bien en general se puede asociar el tiempo de generación con la fuerza de la represión por NCR, esta correlación no es perfecta.

En la combinación de los mecanismos regulatorios que dependen de la calidad de la fuente de nitrógeno surge una jerarquía en la utilización de una fuente u otra. Como desarrollaremos más adelante, el factor de transcripción Dal81 participa en la regulación de genes involucrados en varias vías de utilización de fuentes pobres de nitrógeno, como GABA (genes *UGA*) (Coornaert, et al. 1992; Vissers, et al. 1990), urea, alantoína (genes *DUR* y *DAL*) (Cooper, et al. 1980; Jacobs, et al. 1980) y aminoácidos (gen *AGP1*) (Abdel-Sater, et al. 2004b). La existencia de un factor de transcripción compartido entre estas vías inducibles podría permitir una activación jerarquizada de las mismas cuando varias de las fuentes de nitrógeno antes mencionadas se encuentran disponibles simultáneamente.

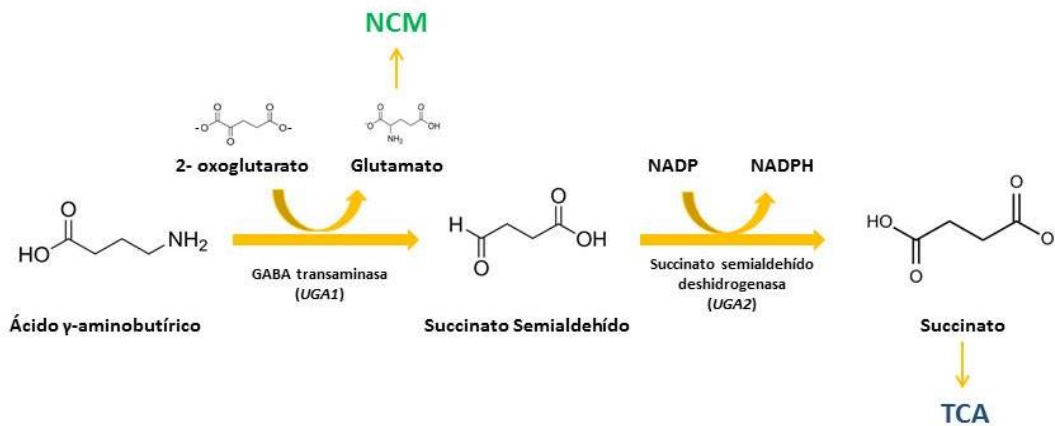
#### 4.1. Ácido $\gamma$ -aminobutírico

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 puede estar 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 tricarboxílicos en forma de 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 1987; 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 a las células de putrescina (Uemura, et al. 2004).

Una vez dentro de la célula, el GABA reacciona con el 2-oxoglutarato. 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 1990; Ramos, et al. 1985). El SSA, que es tóxico para la célula, es oxidado rápidamente a succinato por la enzima succinato semialdehído

deshidrogenasa (SSDH), producto del gen *UGA2* (Figura 9) (Ramos, et al. 1985). Los genes *UGA4*, *UGA1* y *UGA2*, involucrados en la incorporación y el catabolismo del GABA, conforman el regulón *UGA*.



**Figura 9. Esquema de las reacciones del catabolismo del GABA.** NCM, metabolismo central del nitrógeno; TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

La expresión del gen *UGA4* es inducible por su sustrato, el GABA 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 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  $UAS_{GABA}$  y es un palíndromo perfecto formado por la secuencia 5'-CCGCCGCGG-3' (Idicula, et al. 2002; Idicula 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



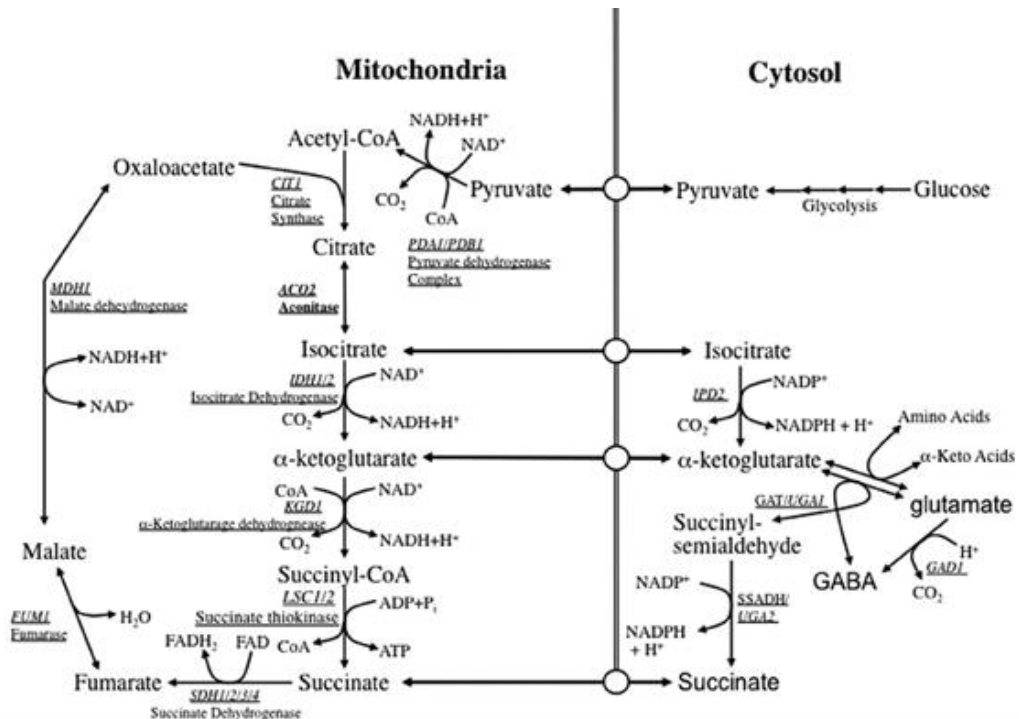
Uga3 se une a la región regulatoria de *UGA1* y *UGA4* de manera independiente del GABA (Idicula, et al. 2002). Además, en ausencia de Uga3 no se detecta interacción de Dal81 con los promotores de los genes del regulón *UGA*. Esto sugiere que la interacción de Dal81 con estos promotores se realizaría 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).

Leu3 es otro factor de transcripción que interviene en la regulación transcripcional de los genes del *UGA*. Este factor de transcripción controla la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de los aminoácidos ramificados (Friden and Schimmel 1988b; 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, y a pesar de que la secuencia  $UAS_{GABA}$  de *UGA4* 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*, sensibles a NCR, presentan secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción GATA. La región regulatoria de *UGA4* presenta un sitio denominado  $UAS_{GATA}$ , formado por nueve repeticiones de la secuencia 5'-GATA(A/T)-3', ubicado 28 pares de bases río arriba del elemento  $UAS_{GABA}$ , 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 Dal80 solo se une a los promotores de *UGA4* y *UGA1*. La interacción de Dal80 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.

Por otro lado, se relaciona la acumulación de GABA y los metabolitos intermedios de la vía metabólica del GABA *shunt* como el NADPH, con la tolerancia al estrés térmico y oxidativo (Cao, et al. 2013; Coleman, et al. 2001). El diagrama de la Figura 10 ilustra cómo el GABA *shunt* saltea a las enzimas alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y succinato

tiouquinasa, reduciendo la producción de NADH mitocondrial e incrementando la de NADPH citosólico.



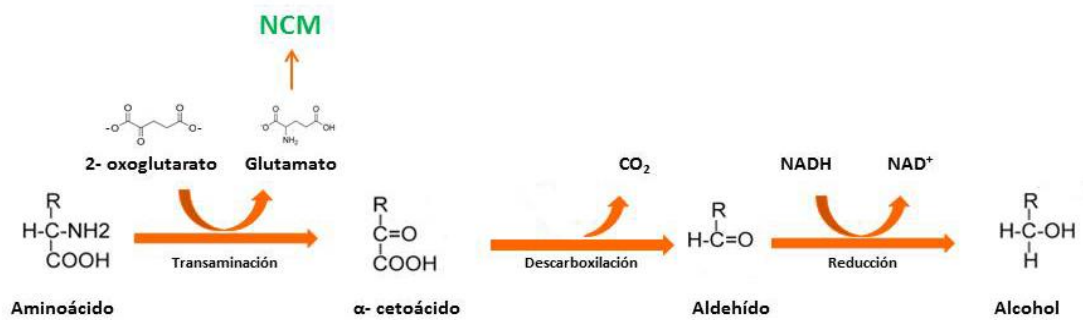
**Figura 10. Diagrama metabólico del GABA shunt.** Se muestran el ciclo TCA en la mitocondria y el GABA shunt en el citosol incluyendo las enzimas citosólicas glutamato descarboxilasa (*GAD1*), GABA transaminasa (*UGA1*) y succinato semialdehído deshidrogenasa (*UGA2*), las cuales componen el GABA shunt. (Cao, et al. 2013)

#### 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, presentan efectos beneficiosos para el hombre 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 reduce para dar un alcohol o un éster (Figura 11). Estos últimos compuestos son responsables de las características organolépticas en productos como vinos o cervezas (Dickinson 2000; Hazelwood, et al. 2008).



**Figura 11. 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 la permeasa general de aminoácidos Gap1 (Grauslund, et al. 1995). Su expresión es altamente inducible por la presencia de BAAs, 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 *in vivo* e *in vitro* que ambos factores de transcripción pueden unirse entre las bases -590 a -526 con respecto al codón de iniciación de la traducción 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 de la traducción 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). Su expresión depende de los factores de transcripción Stp1 y Stp2 (de Boer, et al. 2000). En su región regulatoria, *BAP3* posee 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, aunque se ha postulado 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 y es transportadora de un amplio rango de sustratos. Está involucrada en el transporte de asparagina, glutamina, BAAs y otros aminoácidos, aunque no transporta 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 de Stp2 (Forsberg, et al. 2001a; Iraqui, et al. 1999; 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* depende de Dal81 (Boban and Ljungdahl 2007). El UAS<sub>AA</sub> en la región regulatoria de *AGP1* consiste en dos copias invertidas de 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).

## 5. Factores de transcripción

Las proteínas capaces de coordinar al zinc, también llamadas proteínas con dedos de zinc, se unen al ADN regulando una variedad de procesos involucrados en la supervivencia, proliferación y diversidad en un determinado nicho ecológico, como por ejemplo metabolismo de aminoácidos, respiración, gluconeogénesis, regulación del ciclo celular, remodelado de la cromatina, entre otros (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 presentan (MacPherson, et al. 2006).

La clase I comprende las proteínas del tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), 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 en 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> (C<sub>4</sub>), 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. 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. Los factores GATA de *S. cerevisiae* Gln3, Gat1, Dal80 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 de unión (Mamane, et al. 1998). La proteína más estudiada 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, tales como Stp1 (Abdel-Sater, et al. 2004b; Boban and Ljungdahl 2007; Iraqui, et al. 1999), Uga3 (Cardillo, et al. 2010; Coornaert, et al. 1991) o Dal82 (Bricmont, et al. 1991; Scott, et al. 2000).

Dal81 posee un dominio de dedos de zinc de tipo C<sub>6</sub> (Zn(II)<sub>2</sub>-Cys<sub>6</sub>) entre los residuos 150 y 179. 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). Además, 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).

Por otra parte, Dal81 presenta dos motivos de poliglutamina (residuos 73 a 94 y 227 a 237). Analizando la función de estos dominios, 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 simultáneamente 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). Su dominio de dedos de zinc se encuentra entre los residuos 17 y 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 también en dominios de activación de otras proteínas con *clusters* de zinc (Andre 1990).

Si bien inicialmente Leu3 fue descrito como un factor de transcripción esencial en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de BAAs (Friden and Schimmel 1988b), se ha demostrado que es un regulador transcripcional global (Boer, et al. 2005; Tang, et al. 2006). Leu3 reconoce las repeticiones CGG evertidas con un espaciado de 4 pares de bases 5'-CCGGN<sub>4</sub>CCGG-3' (Friden and Schimmel 1988a; 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).

El factor de transcripción Leu3, junto con Gcn4, están involucrados en la vía de control general de aminoácidos (General Amino Acid Control, GAAC) la cual regula el inicio de la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos cuando éstos son requeridos por la célula. Gcn4 es un factor de transcripción tipo cierre de leucinas (basic leucine zipper domain, bZip domain) que opera como un regulador maestro de decenas de genes tanto de manera directa como indirecta relacionados con las vías de biosíntesis de todos los aminoácidos excepto cisteína (Hinnebusch and Natarajan 2002). La expresión de Gcn4 está regulada a nivel de la traducción. En presencia de aminoácidos los complejos de pre-iniciación de la traducción (Pre-Initiation Complex, PIC) y las subunidades ribosomales 40S se ubican en cuatro uORFs presentes en la región 5'UTR del ARNm de *GCN4* impidiendo su traducción; en condiciones de ayuno de aminoácidos hay una menor abundancia de PIC, entonces solo se reconoce al verdadero ORF del ARNm de *GCN4* aumentando así su traducción (Zhang, et al. 2018). Gcn4 regula sus genes blanco mediante su interacción con secuencias consenso 5'-GA[C/G]TCA-3', denominadas UAS<sub>GCRE</sub> para inducir la transcripción (Oliphant, et al. 1989). Estas

secuencias están presentes en casi todos los promotores de genes encargados de la biosíntesis de BAAs, entre ellos Leu3 (Kohlhaw 2003; Natarajan, et al. 2001).

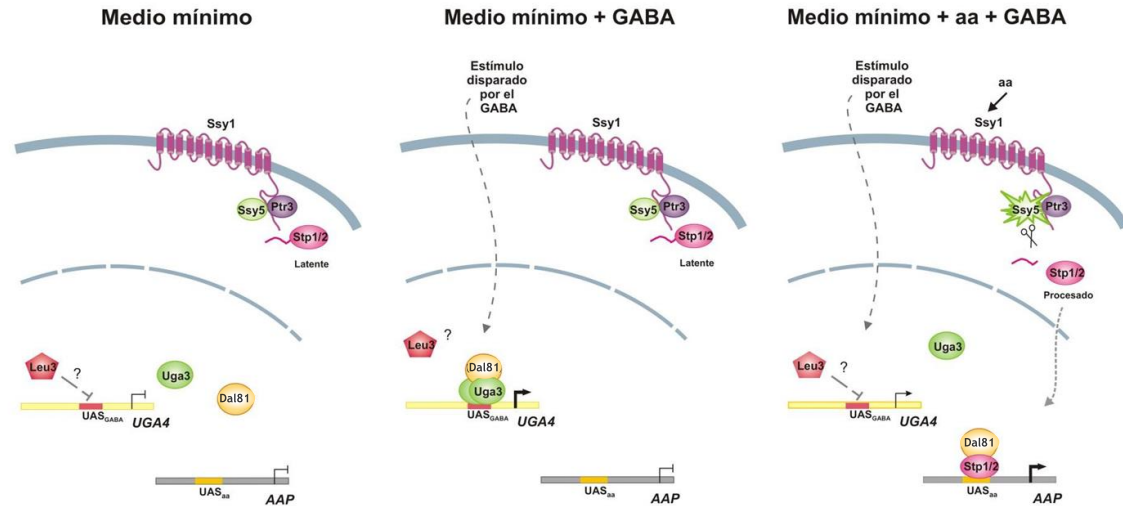
## 6. Jerarquía de las fuentes de nitrógeno

El análisis de las secuencias demuestra que tanto factores de transcripción globales como específicos se unen a los promotores de genes que codifican transportadores y enzimas catabólicas específicas de los compuestos nitrogenados. Sin embargo, poco se sabe acerca de la naturaleza y el tipo de interacción entre los factores globales y los específicos de cada vía metabólica. Por otra parte, aunque se ha propuesto la existencia de un patrón jerarquizado en la utilización de las fuentes no preferidas (pobres) de nitrógeno cuando varias de ellas están presentes en el medio de crecimiento, no se ha establecido aún el mecanismo de esta regulación.

Abdel-Sater y colaboradores reportaron que el agregado de aminoácidos a células creciendo con urea como fuente de nitrógeno induce la transcripción de genes regulados por aminoácidos a través del sistema sensor de aminoácidos SPS e inhibe la expresión de los genes *DUR* involucrados en la utilización de urea como fuente de nitrógeno (Abdel-Sater, et al. 2004b). Es decir, que la inducción por urea de los genes *DUR* se ve impedida cuando la de genes inducibles por aminoácidos se ve favorecida. Estos autores fueron los primeros en proponer una jerarquía en la utilización de las distintas fuentes pobres de nitrógeno y sugirieron a Dal81 como factor central en la determinación de esta jerarquía.

Por otra parte, también la regulación de *UGA4*, resumida en la Figura 12, evidencia la jerarquía en el uso de GABA y leucina poniendo en relevancia a Dal81 en este proceso. 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 a 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).





**Figura 12. Representación esquemática de la regulación del gen *UGA4* por aminoácidos.** En presencia de GABA, los factores de transcripción *Uga3* y *Dal81* son reclutados al elemento *UAS<sub>GABA</sub>* del promotor de *UGA4* y ocurre la inducción de dicho gen. En esas condiciones, el sensor de aminoácidos SPS se encuentra en estado de reposo y los factores *Stp1* y *Stp2* no activados se encuentran en el citoplasma. Luego del agregado de aminoácidos al medio, ocurre la activación del sensor SPS, los factores *Stp1* y *Stp2* son procesados, translocan al núcleo y activan la transcripción de sus genes blanco. Esta activación de la transcripción depende del factor de transcripción *Dal81*, el cual probablemente esté siendo reclutado a los promotores de dichos genes. En estas condiciones, el agregado de GABA es incapaz de inducir el reclutamiento del factor *Dal81*, y en consecuencia de *Uga3*, al promotor de *UGA4*, efecto que se ve reflejado en una menor inducción de dicho gen. AAP=genes de permeasas de aminoácidos.

La existencia de un factor de transcripción compartido entre estas vías inducibles podría permitir una activación ordenada de las mismas cuando varias de las fuentes de nitrógeno antes mencionadas se encuentran disponibles simultáneamente. Esto ubica a *Dal81* como un candidato principal a ser responsable de esta regulación coordinada. Sin embargo, otros factores de transcripción, como por ejemplo *Leu3*, también podrían estar determinando esta jerarquía.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **Hipótesis**

La expresión de genes de los metabolismos de diferentes fuentes de nitrógeno pobres ocurre de manera ordenada y coordinada. Esta regulación concertada depende de factores de transcripción comunes a las diferentes vías y responsables de la inducción de cada gen o grupo de genes.

## **Objetivo general**

Dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales genes que participan del metabolismo de diferentes fuentes de nitrógeno se activan jerárquicamente.

## **Objetivos particulares**

- Estudiar la regulación de la inducción por leucina de la transcripción de los genes de permeasas de leucina con el fin de establecer cuáles factores de transcripción podrían participar del establecimiento de la jerarquía.
- Realizar una búsqueda de nuevos factores de transcripción que interactúen con Dal81 o con Uga3, y determinar bajo qué condiciones esta interacción ocurre.
- Estudiar las posibles interacciones que ocurren entre distintos factores de transcripción y analizar bajo qué condiciones ocurren.
- Análisis de los proteomas de mutantes deficientes en Dal81 y Uga3 para buscar otros procesos regulados por estos factores de transcripción.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Cepas

### 1.1. Levaduras

Las cepas de levadura *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo (TABLA 1), son isogénicas con la cepa prototrófica  $\Sigma 1278b$  (Bechet, et al. 1970) cuyo genotipo es *MAT $\alpha$* . La elección de este *background* genético tuvo varios motivos; en primer lugar, la cepa  $\Sigma 1278$  es la cepa de referencia en gran parte de los estudios que guiaron a establecer el concepto de NCR (Andre, et al. 1995; Godard, et al. 2007), así como también los mecanismos de regulación de los genes *UGA* (Andre 1990; Andre, et al. 1993; Andre and Jauniaux 1990; Bermudez Moretti, et al. 1995; Correa Garcia, et al. 1997; Correa García 2000; Luzzani, et al. 2007) y los mecanismos de acción y activación del sensor SPS (Abdel-Sater, et al. 2004a; Abdel-Sater, et al. 2004b; Bermudez Moretti, et al. 2005; Bernard and Andre 2001a; Iraqui, et al. 1999; Wielemans, et al. 2010). Más aún, la cepa  $\Sigma 1278$  presenta diferencias con respecto a la cepa S288c, cuyo genoma fue secuenciado, en cuanto a la sensibilidad a NCR de los genes que codifican para enzimas y transportadores involucrados en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno (Godard, et al. 2007). Además, la mayoría de las colecciones de cepas disponibles en la actualidad están construidas en *backgrounds* genéticos que poseen un gran número de auxotrofías y es debido a esto que no pudieron ser utilizadas para este trabajo ya que la mayor parte de los aminoácidos utilizados para suplementar los medios para el crecimiento de las cepas auxotróficas son capaces de inducir señales mediadas por el sensor SPS.

### 1.2. Bacterias

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para mantenimiento y amplificación de todos los plásmidos.

Tabla 1. Genotipo de las cepas de levadura utilizadas.

Cepa	Genotipo	Parental	Referencia
Σ1278b	<i>Mata</i>	-	(Bechet, et al. 1970)
23344c	<i>Mata ura3</i>	-	(Grenson 1987)
26790a	<i>Mata ura3 uga3Δ</i>	-	(Talibi, et al. 1995)
30995b	<i>Mata ura3 ssy1Δ::kanMX2</i>	-	(Bernard and Andre 2001b)(b)
DEBY01	<i>Mata ura3 STP1-3HA-KanMX6</i>	-	(Palavecino, et al. 2015a)
KW018	<i>Mata ura3 stp1Δ</i>	-	(Wielemans, et al. 2010)
KW021	<i>Mata ura3 stp2Δ</i>	-	(Wielemans, et al. 2010)
KW022	<i>Mata ura3 stp1Δ stp2Δ</i>	-	(Wielemans, et al. 2010)
SBCY01	<i>Mata ura3 leu3Δ::kanMX4</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY02	<i>Mata ura3 LEU3-3HA-kanMX6</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY03	<i>Mata ura3 gcn4Δ::kanMX4</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY04	<i>Mata ura3 leu4Δ::loxp</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY09	<i>Mata ura3 6HA-LEU3</i>	-	Tesis doctoral Cardillo S.
SBCY10	<i>Mata ura3 6HA-UGA35</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY13	<i>Mata ura3 6HA-UGA3</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY17	<i>Mata ura3 uga35Δ::natMX4</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY20	<i>Mata ura3 uga35Δ::natMX4 leu3Δ::kanMX4</i>	-	(Cardillo, et al. 2010)
SBCY30	<i>Mata ura3 UGA4::UAS<sub>GABAdel</sub></i>	-	Tesis doctoral Cardillo S.
SBCY36	<i>Mata ura3 UGA4::UAS<sub>GABAdel</sub> 6HA-UGA35</i>	-	Tesis doctoral Cardillo S.
SAMY01	<i>Mata ura3 6HA-DAL81 LoxP9Cmyc-Dal82 + pSH47</i>	SBCY10	Este trabajo
SAMY02	<i>Mata ura3 LoxP9Cmyc-Dal82+ pSH47</i>	23344c	Este trabajo
SAMY03	<i>Mata ura3 LoxP9Cmyc-Uga3+ pSH47</i>	23344c	Este trabajo
SAMY04	<i>Mata ura3 Stp1-13cMyc-KanMx6</i>	23344c	Este trabajo
SAMY05	<i>Mata ura3 6HA-DAL81 LOXP- 9cMyc Leu3 + pSH47</i>	SBCY10	Este trabajo
SAMY06	<i>Mata ura3 6HA-LEU3- Dal80 13cMyc-KanMx6</i>	SBCY09	Este trabajo
SAMY07	<i>Mata ura3 UGA4::UAS<sub>GABADEL</sub> LOXP- 9cMyc Uga3 + pSH47</i>	SBCY30	Este trabajo
SAMY08	<i>Mata ura3 6HA-DAL 81 UGA4::UAS<sub>GABADEL</sub> LOXP- 9cMyc Uga3+pSH47</i>	SBCY36	Este trabajo
SAMY09	<i>Mata ura3 LOXP- 9cMyc Dal81 + pSH47</i>	23344c	Este trabajo
SAMY10	<i>Mata ura3 6HA-LEU3 LOXP- 9cMycUga3 + pSH47</i>	SBCY09	Este trabajo
SAMY11	<i>Mata ura3 Dal80 13cMyc-KanMx6</i>	23344c	Este trabajo
SAMY12	<i>Mata ura3 6HA-DAL81 Stp1-13cMyc-KanMx6</i>	SBCY10	Este trabajo
SAMY13	<i>Mata ura3 6HA-DAL81 Stp2-13cMyc-KanMx6</i>	SBCY10	Este trabajo
SAMY14	<i>Mata ura3 6HA-LEU3- STP1-13cMyc-KanMx6</i>	SBCY09	Este trabajo

## 2. Medios de cultivo

Se utilizó YPD (ver Apéndice) como medio de mantenimiento de las cepas sin transformar 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.

El medio de cultivo utilizado en los experimentos fue YNB (*yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulphate*, 0.17%) con glucosa 2% como fuente de carbono y prolina 10 mM como fuente de nitrógeno. Se eligió prolina como fuente de nitrógeno porque se ha descrito que en presencia de este aminoácido el sistema sensor SPS permanece inactivo (Iraqui, et al. 1999). La inducción de los distintos genes se realizó incubando las células con cada uno de los inductores específicos para cada vía, durante

60 minutos, en las siguientes concentraciones finales: GABA 0,1 mM, leucina 1,3 mM, oxalurato 0,1 mM y arginina 5 mM.

El antibiótico geneticina (G418) se agregó en concentración final de 200 µg/ml.

Para el crecimiento de *E. coli* se empleó el medio rico LB (ver Apéndice), con el agregado o no de ampicilina en una concentración final de 100 µg/ml.

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

### 3. Plásmidos

En la Tabla 2 se detallan los plásmidos utilizados.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

Nombre	Descripción	Referencia
YEp357	Plásmido para realizar ensayos de genes reporteros (ver Apéndice).	(Myers, et al. 1986)
YEp357-UGA4	Contiene al promotor del gen <i>UGA4</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	(Correa García 2000)
YEp357-AGP1	Contiene al promotor del gen <i>AGP1</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis doctoral Cardillo S.
YEp357-BAP2	Contiene al promotor del gen <i>BAP2</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis doctoral Cardillo S.
YEp357-BAP3	Contiene al promotor del gen <i>BAP3</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis doctoral Palavecino M.
YEp357-LEU3	Contiene al promotor del gen <i>LEU3</i> clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	Tesis de licenciatura Bertotti S.
pOM20	Plásmido para la construcción de cepas que expresan proteínas de fusión con nueve epítopes 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>GAL1</i> (ver Apéndice).	(Guldener, et al. 1996)
pFA6a-13cMYC-kanMX6	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)
p072	Plásmido que expresa el promotor de <i>KAR2</i> , (reportero de la respuesta a proteínas mal plegadas) clonado río arriba del gen reportero <i>lacZ</i> .	(Mori, 1992)



#### 4. 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 agregaron 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, a la fase acuosa se le 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% frío, se dejó secar y se resuspendió en 200 µl de *buffer* TE.

#### 5. Extracción y purificación de ADN plasmídico

Células de *E. coli* provenientes de 3ml de cultivo *overnight* en medio LB con ampicilina se resuspendieron en 100 µl de solución I (ver Apéndice). Luego se agregaron 200 µl de solución II (ver Apéndice) y se agitó suavemente por inversión. Se incubó en hielo durante 15 minutos y se agregó 150 µl de solución III (ver Apéndice). Se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad y al sobrenadante se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó durante 30 minutos a -20°C. Se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% frío, se dejó secar y se resuspendió en 40 µl de H<sub>2</sub>O.

## 6. Transformación de bacterias con plásmidos

### 6.1. Preparación de bacterias competentes

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  se cultivaron *overnight* a 37°C en medio LB. Se inocularon 2 ml de este cultivo en 40 ml de LB y se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en 16 ml de 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.

### 6.2. Transformación de bacterias

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

## 7. Transformación de levaduras con plásmidos

Se sembró 1 ml de un cultivo *overnight* en 50 ml de medio YPD y se incubó con agitación a 30°C. Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4, las células se cosecharon, se lavaron con 20 ml de agua estéril, se resuspendieron en 12,5 ml de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M y se incubaron en agitación por 30 minutos. Luego, las células se cosecharon y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de solución de TE 1X/AcLi 0,1 M. A 50  $\mu$ l de la suspensión celular se les agregó 1 $\mu$ g de ADN plasmídico y 10  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón. Se agitó bien y se incubó durante 30 minutos a 30°C. Luego se agregaron 350  $\mu$ l

de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M/PEG 40% y se incubó 1 hora a 30°C. Pasado este tiempo se realizó un shock térmico a 42°C durante 5 minutos (Gietz & Woods, 2002). Las células se lavaron con 200 µl de TE 1X y se plaquearon en medio mínimo sin el agregado de uracilo.

## 8. Construcción de cepas mutantes de levaduras que expresan proteínas de fusión

En este trabajo se generaron cepas que expresan proteínas de fusión con el epítipo c-Myc. Algunas se construyeron sobre una cepa parental que expresaba también, otra proteína de fusión con el epítipo HA .

Para la construcción de las cepas con el epítipo c-Myc en el extremo amino-terminal se utilizó una adaptación de la técnica de inserción de epítopes en genes cromosomales (Gauss, et al. 2005). Para ello, se amplificó por PCR el módulo de selección/epítipo *LoxP-kanMX6-LoxP-9cMyc* utilizando como templado el plásmido pOM20 (Tabla 2). Se utilizaron *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo *kanMX6-9cMyc* y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al extremo 5' del gen a modificar. Utilizando esta técnica, es necesario escindir el módulo de selección *KanMX6* que se encuentra flanqueado por secuencias *LoxP*, mediante recombinación mediada por la recombinasa Cre.

Para la construcción de las cepas con el epítipo c-Myc en el extremo carboxilo-terminal se utilizó la técnica para inserción de *tags* desarrollada por (Longtine, et al. 1998). Se amplificó por PCR el módulo de epítipo/selección *13cMyc-kanMX6* utilizando como templado el plásmido pFA6a-13cMyc-kanMX6 (Tabla 2). Se utilizaron *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18 - 19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo *13cMyc-kanMX6* y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al extremo 3' del gen a modificar.

En el Capítulo II de este trabajo de tesis se detalla la estrategia utilizada para la construcción de cada cepa.

### 8.1. Obtención de fragmentos de ADN

Mediante reacciones de PCR se amplificaron fragmentos de ADN conteniendo al marcador de selección y epítotope c-Myc deseado, flanqueados por regiones de homología al gen blanco. Las reacciones se realizaron en una mezcla conteniendo *buffer* (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *primers* 0,5 µM (Tabla 3), dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 2,5 unidades/50 µl (Invitrogen) y como templado 0,5 µg del plásmido pOM20 (Gauss, et al. 2005) o pFA6a-13cMyc-kanMX6 (Longtine, et al. 1998).

**Tabla 3. Primers utilizados para la construcción de cepas**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
<b>F-Tag-LEU3</b>	AAAAATCGCTTCGTAACATTAATACAAATTCCTTTTGAATTATGTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
<b>R-Tag-LEU3</b>	TTCACTCCGGACTGTGAAGTCGCCACAAAATCTGATCTTCCTTCGCGGCCGCATAGGCCACT
<b>F-Tag-UGA3</b>	CATGTATGGATGCCAAGAAAACAAAGTTTTTAAAGTGAGGTATGTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
<b>R-Tag-UGA3</b>	CATGCTTCGAATATTTCAATTTAGCTTCTCCACGCCATAATTGCGGCCGCATAGGCCACT
<b>F-tagN-DAL82</b>	GGTTTAACGATACTTTGAAAGGTTTAGCGGAGCCAACCATAATGTGCAGGTCGACAACCCTTAAT
<b>R-tagN-DAL82</b>	TATCAGTAGTCGTAGAAGCAGCTCCACAGGATCCACCGATTCATCGCGGCCGCATAGGCCACT
<b>F-STP1-HA</b>	CAATATTTGAATTTTTACAATGACAACCTTTGGGTCACAATTTGCGATCCCCGGGTTAATTAA
<b>R-STP1-HA</b>	TTCCAATATGATACCTTATTTTTATCCCGTGTATATTTAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
<b>F-STP2-HA</b>	TTATCTGGCCCTTTACAAAAAGCTTATGGGATAGAATTTGCGATCCCCGGGTTAATTAA
<b>R-STP2-HA</b>	TAAAGCACCGCTAAAAATAATATATTGCTACAAAAATGATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC

En *itálicas*, secuencias homólogas al gen a modificar. En **negritas**, secuencias homólogas al a las secuencias adyacentes al módulo de selección/epítotope.

### 8.2. Precipitación de los fragmentos de PCR

Se mezclaron 625 µl de etanol 96% 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 17.000 x g. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70% frío y el *pellet* se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada.

### 8.3. Transformación de levaduras

Se sembró 1 ml de un cultivo *overnight* en 50 ml de medio YPD y se incubó con agitación a 30°C. Una vez alcanzada la densidad óptica de 0,4 a 600 nm, las células se cosecharon, se lavaron con 20 ml de agua estéril, se resuspendieron en 12,5 ml de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M y se incubaron con agitación a 30°C por 30 minutos. Luego, las células se cosecharon y se resuspendieron en 500 µl de solución de TE 1X/AcLi 0,1 M. A 60 µl de esta suspensión celular se le agregó 5 µl de fragmento lineal producto de PCR y 50 µg de ADN de espermatozoos de salmón. Se agitó y se incubó durante 30 minutos a 30°C. Luego se agregaron 350 µl de una solución de TE 1X/AcLi 0,1 M/PEG 40% y se incubó 1 hora a 30°C. Pasado este tiempo, se realizó un *shock* térmico a 42°C durante 15 minutos. Las células se lavaron con 500 µl de YPD, se resuspendieron en 1 ml de YPD y se dejaron recuperando a 30°C durante 4 horas. Luego, las células se sembraron en placas de YPD conteniendo G418 (200 µg/ml).

### 8.4. Screening de colonias

La correcta inserción de los fragmentos lineales en las distintas cepas se verificó mediante 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* y se utilizó como fuente de ADN molde. Para cada colonia a analizar se utilizaron dos pares de *primers* (Tabla 4). Las colonias que resultaron positivas se estiraron de modo de obtener colonias aisladas, se volvió a verificar su genotipo por PCR y se guardaron a -80°C en medio YPD conteniendo glicerol 15%.

### 8.5. Escisión de módulos de selección mediada por la recombinasa Cre

En la construcción de las cepas con el tag fusionado al extremo N-terminal (Gauss, et al. 2005), fue necesario escindir el módulo de selección (el cual se encuentra flanqueado por secuencias LoxP) para obtener una proteína de fusión funcional. Luego de verificar la inserción del módulo de selección, las células se transformaron con el plásmido pSH47

(Tabla 2) (Guldener, et al. 1996) (ver Apéndice), que contiene al gen de la recombinasa Cre bajo un promotor inducible por galactosa. Células transformadas con este plásmido provenientes de medio selectivo, se transfirieron a medio mínimo conteniendo galactosa 2% y se incubaron durante 6 horas en agitación a 30°C. Luego se estiraron 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. Se corroboró la correcta escisión del módulo de selección por PCR *colony*, utilizando los *primers* mostrados en la (Tabla 4).

**Tabla 4. *Primers* utilizados para el *screening* de cepas**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
F-kan_ <i>LEU3</i>	CATCCTATGGAAGTGCCTCG
F- <i>LEU3</i> promotor	AGGTGCCGCCTAATTTATCG
R- <i>LEU3</i> interno	ACTTCTGCTGACGACATTCC
F- <i>UGA3</i> promotor	GTATAGGGTTGAACGGTAGGG
R- <i>UGA3</i> interno	CAACTGGTGCTGTATATCTGC
F- <i>DAL82</i> prom	CTTGATAAGTTCTTCACATCCTCG
R- <i>DAL82</i> int2	GCATATGGTTTCAGATGAGGTTTG
Forward F- <i>STP1</i> int	GCACAAGATAATCCTTCGTTCC
Reverse R- <i>STP1</i> down	TCGGCTTTCCAATATGATACCC
F- <i>STP2</i> -int	ACAGAAACAAATAAGTCATACCC
R- <i>STP2</i> - down	GAATTGAACCATCCTTAGTATCC

## 9. Western Blot

### 9.1. Extracción de proteínas

Células de un cultivo en medio mínimo en fase exponencial de crecimiento (densidad óptica a 600 nm de 0,8 – 1,0) se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no, GABA 0,1 mM, ácido oxalúrico 0,1 mM o leucina 1,3 mM y se incubaron durante una hora. De cada muestra se cosechó un volumen tal que multiplicado por la densidad óptica del cultivo diera 3. Para la extracción de proteínas, se siguió el protocolo descrito

por Liu y col. (Liu, et al. 2008). Las células se lisaron con una solución de NaOH 1,85 N y  $\beta$ -mercaptoetanol 7,5%, incubando 10 minutos en hielo. Luego, las proteínas totales se obtuvieron por precipitación con ácido tricloroacético 8%. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet 140  $\mu$ l de *buffer* Tris-HCl 0.5 M pH 7,5. Las proteínas totales se cuantificaron mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976).

## 9.2. Extracción de proteínas e inmunoprecipitación

Para detectar la posible formación de complejos entre factores de transcripción, se decidió inmunoprecipitar el complejo utilizando el protocolo propuesto por Lambert et al. 2009, el cual se puso a punto con algunas adaptaciones. Células en fase exponencial de crecimiento provenientes de 300 ml de cultivo en medio mínimo (densidad óptica a 600 nm de 0,8 – 1,0), se cosecharon, se transfirieron al mismo medio fresco con el inductor indicado en cada caso y se incubaron durante media hora. Luego se realizó un *crosslinking* incubando durante 20 minutos con formaldehído 0,05%. Se agregó glicina 125 mM y se incubó durante 5 minutos. Luego, se cosecharon las células, se lavaron con 4 ml de *buffer* TBS (ver Apéndice). Se alicuotaron en 6 tubos eppendorfs de 2 ml y las células se cosecharon nuevamente. Luego se resuspendieron en cada tubo con 400  $\mu$ l de *buffer* FA (ver Apéndice) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2mM final y un volumen equivalente de perlas de vidrio. Se agitó en vortex durante 40 minutos a 4°C. A continuación se recuperó el lisado celular de todos los tubos, perforando el fondo de cada uno y centrifugándolos, dentro de un tubo falcon de 15 ml. El volumen recuperado se clarificó, centrifugando a 4°C durante 10 minutos a 5000 rpm o 1800 rfc. Se recuperó el sobrenadante y se conservaron 50  $\mu$ l de éste para utilizar como input. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford 1976) y se mezclaron 100 mg de proteínas totales con 12,5  $\mu$ l de Dynabeads Protein G (Invitrogen) las cuales habían sido incubadas *overnight* con anticuerpo anti HA (Santa Cruz F-7) y lavadas dos veces con 500  $\mu$ l de *buffer* FA baja sal. La mezcla se incubó en rotación *overnight* a 4°C. Se lavaron los inmunocomplejos con 500  $\mu$ l de *buffer* de lavado y finalmente se incorporaron 60  $\mu$ l de *elution buffer* (ver Apéndice) y se incubó durante 20 minutos a 65°C. Se recuperó el sobrenadante y las muestras y los inputs se craquearon con SDS loading *buffer* (ver Apéndice) durante 5 min a 95°C.

### 9.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado de la membrana

Las muestras correspondientes a los extractos de proteínas se resolvieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida 12,5% . Las electroforesis se realizaron a 80 V hasta que el frente de corrida ingresara al gel separador y luego, a 130 V.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a 300 mA durante 80 minutos a una membrana de nitrocelulosa. 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 realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente con PBS conteniendo Tween 20 0,1%. A continuación, las membranas se incubaron con agitación a 4°C *overnight* con un anticuerpo (dilución 1:1000) contra el tag a detectar ( anti c-Myc (9E10 Hibridoma, hecho en ratón) o anti HA (Sigma, hecho en rata). Luego, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, a temperatura ambiente, con PBS conteniendo Tween 20 0,1%. A continuación, las membranas se incubaron durante 3 horas con una dilución 1:3000 anti IgG de ratón o rata, según correspondiera, conjugado a la enzima peroxidasa de rabanita (Santa Cruz).

Luego se lavaron la membranas y las especies inmuno-reacticas se detectaron por quimioluminiscencia incubando con una mezcla de partes iguales de solución A (ver Apéndice) y solución B (ver Apéndice) y las imágenes se obtuvieron utilizando el analizador de Amersham Imager 600 (General Electric).

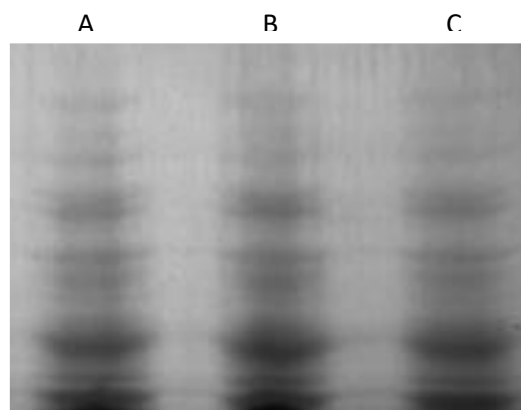
## 10. Análisis de proteomas

### 10.1. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas, se siguió el protocolo descrito en el punto 9.1. Se cosecharon las células de 3 cultivos independientes en 3 ml de medio mínimo con una densidad óptica a 600 nm de 0,8 - 1,0. Cada triplicado se dividió en dos muestras de 140µg de proteínas totales cada una. Todas las muestras se trataron con loading *buffer*



con SDS (ver Apéndice) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Una mitad de cada triplicado se resolvió mediante SDS-PAGE 10%. Para verificar que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de proteínas, los geles se incubaron durante 30 – 45 minutos con la solución de tinción conteniendo el colorante Coomassie Blue R250 (ver Apéndice). Luego se realizaron lavados con una solución decolorante (ver Apéndice) hasta que se visualizaron bandas. Utilizando el analizador de imágenes Amersham Imager 600-General Electric y el programa Image-J se corroboró que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de proteínas (Figura 13). A continuación se sembró la otra mitad de cada triplicado, también en un gel de bisacrilamida 10% con SDS, pero dejando migrar al frente de corrida sólo 1 cm dentro del gel de separación. Se cortó un taco de gel con un área de 1,2 cm<sup>2</sup> correspondiente a cada calle desde el frente de corrida hasta el comienzo del gel separador.



**Figura 13. Verificación de la concentración de proteínas en los triplicados.** Ejemplo de la observación del gel de poliacrilamida 12,5% luego de la tinción con colorante Coomassie del gel en el que se resolvieron los triplicados de una muestra.

## 10.2. Espectrometría de masas y análisis de datos

El estudio de proteomas se llevó a cabo en el servicio del Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM). Se eluyeron las proteínas de cada taco de gel y se les realizó una digestión con tripsina. Los péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas acoplado a HPLC (tecnología Orbitrap QExactive acoplado a nano-HPLC-ThermoScientific). La ionización de las muestras se realizó mediante Electrospray. Los espectros de masa se analizaron con el software Proteome

Discoverer, comparando contra el proteoma de *S. cerevisiae*. Además, se cuantificó la abundancia de cada proteína basándose en el cálculo de área para cada una. Para ello, se calculó un área para cada proteína, mediante un algoritmo del software. Estos datos se exportaron a Excel, donde se normalizaron manualmente las áreas de cada proteína identificada. Las áreas normalizadas se compararon estadísticamente con el software Perseus versión: 1.5.8.5. (Tyanova, et al. 2016). Se consideró que una proteína se expresa diferencialmente en una condición si presentaba un cambio relativo igual o mayor a dos en su nivel de expresión, con un valor de p menor a 0,05 con test T de Student.

### **10.2.1. Análisis *in silico***

Para el análisis del proteoma y para generar una interpretación del sentido biológico, utilizamos distintas plataformas de dominio libre.

Para determinar qué procesos biológicos (términos *Gene Ontology*) estaban representados en el proteoma diferencial, utilizamos los softwares PANTHER classification system (Mi, et al. 2017) y GOrilla (Eden, et al. 2009). Para determinar que procesos metabólicos y/o vías metabólicas se encontraban representadas comparando las proteínas totales versus las proteínas expresadas diferencialmente, utilizamos el software g:Profiler (Raudvere, et al. 2019). Para determinar que procesos metabólicos y/o vías metabólicas, se encontraban representadas en las proteínas expresadas diferencialmente, como así también asociaciones funcionales entre las mismas, utilizamos los softwares STRING (Szklarczyk, et al. 2019) y DAVID (Huang da, et al. 2009). Por último, para el análisis de las vías metabólicas en las que participaban las proteínas expresadas diferencialmente utilizamos la plataforma KEGG (Kanehisa and Goto 2000).

## 11. Determinación de la concentración de aminoácidos intracelulares

### 11.1. Cuantificación de glutamina y glutamato mediante electroforesis capilar zonal

Realizamos la determinación de las concentraciones de glutamina y glutamato utilizando la técnica de electroforesis capilar zonal llevada a cabo por el Servicio de Análisis por Electroforesis Capilar del departamento de Química Biológica (FCEyN-UBA), en el equipo Beckman P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, con detector PDA (Detector de arreglo de diodos) con registro entre 190 y 600 nm. Se pusieron a punto las variables de la corrida electroforética, fijando las siguientes condiciones de trabajo para el análisis de las muestras:  $\lambda = 214$  nm, CAPILAR: 27 cm de largo x 50  $\mu$ m de diámetro, *buffer* ECZ (ver Apéndice). Se analizó un volumen de muestra equivalente a un tiempo de inyección de 1 segundo a una presión de 0,5 psi. Como derivatizante se utilizó Fluorescamina 25 mg/ml en acetona. La electroforesis se realizó a una temperatura de 20°C aplicando un voltaje de 16 kV y una corriente de 150  $\mu$ A. El tiempo de corrida fue de 10 minutos.

En primer lugar, realizamos curvas de calibración de glutamina y glutamato cubriendo el rango de concentraciones entre 0,3 mM a 10 mM.

Las muestras se prepararon utilizando una adaptación del método de extracción de metabolitos que emplea etanol *bufferado* caliente (Gonzalez, et al. 1997). Para ello, se cosecharon células en fase exponencial de crecimiento provenientes de un cultivo de 200 ml de medio mínimo con una DO a 600 nm de 0,8 – 1,0. Se lavó el pellet con 20 ml agua bidestilada, se cosechó y se guardó a -20°C. Para realizar la extracción, se descongeló cada *pellet* y se resuspendió en 21 ml de etanol absoluto *bufferado* con 2ml de HEPES 1M pH7,5 y se incubó tres minutos a 80°C. Luego se enfrió durante 3 minutos en hielo. Se evaporó en rotavapor a 45°C 5 mBar. Luego se resuspendió el extracto en 1 ml de agua mQ filtrada con filtro de 0,2  $\mu$ m. Por último, se clarificó el extracto centrifugando 10 minutos a 5000 rpm a 4°C. Inmediatamente se prepararon las muestras mezclando 50  $\mu$ l del extracto clarificado (sobrenadante) o solución patrón de aminoácido, con 50  $\mu$ l de *buffer* borato y 5  $\mu$ l de solución de Fluorescamina.

## 11.2. Determinación de aminoácidos por resonancia magnética nuclear

Para cada cepa a analizar se cosecharon 4 cultivos independientes en medio mínimo con una DO=1. Las células se lavaron y se les agregó 400  $\mu$ l de una solución de etanol 80% y un volumen de bolitas de vidrio (0,5 mm). Las células se lisaron por ruptura mecánica agitando en vortex a 4°C durante 40 minutos. Luego se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 5000 rpm. Se recuperaron 300  $\mu$ l del sobrenadante, se centrifugó nuevamente a 4°C durante 5 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante recuperado se evaporó a 25°C y 5 mBar. Las muestras se conservaron a -20°C hasta ser analizadas mediante RMN.

Las determinaciones se realizaron con el servicio del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Fundación Instituto Leloir. Allí se realizaron experimentos 1D de espectrometría de RMN. Los espectros 1D de <sup>1</sup>H-RMN fueron adquiridos usando una secuencia de pulsos 1D NOESY estándar de Bruker que usa presaturación de agua durante el periodo de relajación y tiempo de mixing, y gradientes. Todos los datos de RMN fueron procesados inicialmente usando NMRPipe (Delaglio, et al. 1995) y convertidos con Matlab a un formato compatible para su posterior procesamiento y análisis. Los espectros fueron referenciados a la señal del DSS, alineados, corregidos por línea de base y finalmente normalizados (método PQN).

Para la asignación de metabolitos se realizaron experimentos bidimensionales <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H TOCSY y <sup>1</sup>H<sup>13</sup>C HSQC. La identificación de las resonancias correspondientes a cada metabolito en estos espectros se complementó con la información de las bases de datos COLMAR (<http://spin.ccic.ohio-state.edu/index.php/query/index>) y HMDB (<http://www.hmdb.ca/>).

Con el fin de identificar las diferencias globales entre los grupos se utilizó el servidor Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). Se evaluó la significancia mediante ANOVA de una vía (paramétrica) y post-test de Fisher, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante lineal por cuadrados mínimos parciales (PLS-DA) como método de clasificación supervisado. La concentración absoluta

de cada metabolito fue estimada (mM) utilizando como referencia al estándar interno DSS.

## 12. Ensayos de expresión

### 12.1. Ensayo del gen reportero lacZ

Células transformadas crecieron en medio mínimo a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6 – 0,9. Luego, se cosecharon por centrifugación, se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no leucina 1,3 mM o GABA 0,1 mM, se incubaron por 1 hora y luego se cosecharon. 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  $\beta$ -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  $\mu$ l de SDS 0,1% y 30  $\mu$ l de cloroformo. Los tubos se agitaron por 15 segundos para permeabilizar las células. Por último, se agregaron 200  $\mu$ l de ONPG (orto- nitrofenilgalactopiranosido) 4 mg/ml y se incubó a 30°C hasta la aparición de producto coloreado. La reacción se detuvo agregando 0,5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. El ONPG es un sustrato incoloro que, por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se hidroliza dando orto-nitrofenol como uno de los productos. Este compuesto es de color amarillo y se cuantifica por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 420 nm. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (Miller, 1972), se calcula a partir de la siguiente fórmula:

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

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.

## 12.2 Medición de los niveles de ARN mensajero

### 12.2.1. Extracción de ARN

Se cosecharon 4 ml de cultivos en medio mínimo en fase exponencial de crecimiento. Cuando se indica, estas células se transfirieron al mismo medio fresco, con el agregado o no de arginina 5 mM y luego de 1 hora, se cosecharon. Cada *pellet* se lavó con 1 ml de agua destilada fría y se resuspendió en 565  $\mu$ l de *buffer* AE (ver Apéndice). Se agregaron 565  $\mu$ 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 17.000 x g a 4°C durante 15 minutos. Se agregó 1 ml de cloroformo a la fase acuosa, se mezcló y se centrifugó a 4°C a 17.000 x g durante 10 minutos. Se agregaron 70  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 700  $\mu$ l de isopropanol a la fase acuosa, se mezcló y se centrifugó en frío a 17.000 x g durante 40 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 17.000 x g durante 20 minutos a 4°C, se dejó secar y se resuspendió en 75  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Los extractos se almacenaron a -80°C. La concentración del ARN obtenido se calculó como  $[\mu\text{g de ARN}/\mu\text{l de solución} = \text{A}_{260} \times 40 \times \text{Fdil}/1000]$ . Para evaluar su integridad, el ARN obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

### 12.2.2. Retrotranscripción

Se tomó una alícuota de extracto de ARN, y se incubó con DNAsa RQ1 (Promega) durante 60 minutos a 37°C, para eliminar restos de ADN genómico. Se detuvo la reacción agregando RQ1 *stop solution* (Promega) e incubando a 65°C durante 10 minutos.

Para realizar la retrotranscripción se siguieron las instrucciones del kit Genbiotech. Brevemente, se colocaron 5 $\mu$ g de ARN y 1  $\mu$ l de Random primers 0,5  $\mu$ M y se llevó a un volumen final de 13  $\mu$ l. Se incubó a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar al ARN.

Para evitar la renaturalización, la muestra se colocó inmediatamente en hielo. Se agregaron 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM, 4  $\mu\text{l}$  de RT *buffer* 5X, 1,25  $\mu\text{l}$  de *buffer* inhibidor de ribonucleasas y 1  $\mu\text{l}$  de enzima RT Easyscript en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ . Se incubó 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 72°C para obtener el ADN copia (ADNc).

### 12.2.3. Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo FastStart Universal SYBR Green Master Mix 1:300.000 (Roche) y *primers* 0,5  $\mu\text{M}$  (Tabla 5). Se utilizó un ciclador BIOER Linegene 9660. Como molde se utilizaron 0,5  $\mu\text{l}$  de cada ADNc obtenido. Cada muestra se analizó por triplicado. Los *primers* para la qPCR se diseñaron usando el programa Beacon Designer 7. El programa utilizado consistió en 5 minutos a 94°C, luego 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un solo producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Las tres réplicas se promediaron y se normalizaron los valores obtenidos para cada gen con el valor obtenido para el control interno *TBP1*. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EE (error estándar) de al menos 3 experimentos independientes.

Tabla 5. Primers para PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia (5' a 3')
<b>Primers para qPCR</b>	
<b>Fw-GLT1</b>	ACTGTGCGCGTAGAATGGAA
<b>Rv-GLT1</b>	ATTCAGGACCCACGAAACCC
<b>Fw-VBA1</b>	TGGCTCATTAAAGCCTGGTGG
<b>Rv-VBA1</b>	ACCGCTGAGCTCAAACAGAA
<b>Fw-ALT1</b>	AACGAGTTTTATCCCGCCGA
<b>Rv-ALT1</b>	GCACCTCTAACGGCGTACTT
<b>Fw-GAP1</b>	GTTACCCACGTACGCTACCA
<b>Rv-GAP1</b>	GCAAGCCAAAACAACGCAAC
<b>Fw-DAL5</b>	CGGCGGTCATGGGATTAAGA
<b>Rv-DAL5</b>	TGTACCGGGCCTAGGTTTCAT
<b>Fw-LYS2</b>	GGGCTCACTGGTGGATATGG
<b>Rv-LYS2</b>	AAGAACCATTGGCAGAGGCA
<b>Fw-GDH2</b>	AGCTAACGGCACAACCTTCA
<b>Rv-GDH2</b>	GAGTTTGGTCTACCACCGCA
<b>Fw-ARG5,6</b>	CGCTTCCTGCTTGGCATTTT
<b>Rv-ARG5,6</b>	TACGGCCATTGTGTGCTCAT
<b>Fw-TBP1</b>	TATAACCCCAAGCGTTTTGC
<b>Rv-TBP1</b>	GCCAGCTTTGAGTCATCCTC

### 13. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

#### 13.1. Tratamientos

Células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio mínimo (100 ml de cultivo con una densidad óptica a 600 nm de 0,8 por cada condición ensayada) se transfirieron al mismo medio fresco conteniendo o no leucina 1,3 mM, arginina 5 mM o GABA 0,1 mM y se incubaron 1 hora.

#### 13.2. Fijación

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



### 13.3. 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. Se agregó un volumen de bolitas de vidrio (0,5 mm) y las células se lisaron por ruptura mecánica. Para esto se realizaron cuatro pulsos de agitación con vortex de 10 minutos cada uno a 4°C con intervalos en hielo. El extracto se separó de las bolitas de vidrio perforando el tubo en su parte inferior con una aguja caliente, colocando el mismo dentro de un tubo Falcon de 15 ml y centrifugando a 3500 rpm durante un minuto a 4°C. Luego se transfirió el extracto a un tubo Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 17.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles se descartó y el precipitado conteniendo la cromatina se resuspendió en 800  $\mu$ l de *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM.

### 13.4. Sonicado

La cromatina se fragmentó colocando el tubo en hielo y sonicando 10 veces durante 10 segundos a una amplitud de 15% con intervalos de 15 segundos en hielo entre cada pulso. Luego, los extractos se centrifugaron a 17.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se centrifugó nuevamente a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se guardó a -80°C.

La amplitud y el tiempo de sonicado se pusieron a punto de manera de que la mayoría de los fragmentos fueran de 500 pares de bases. Para controlar el tamaño de los fragmentos se mezclaron 30  $\mu$ l de extracto con 1  $\mu$ l de SDS 10% y 0,75  $\mu$ l 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%.

### 13.5. Inmunoprecipitación

Los extractos se descongelaron en hielo y las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada condición se utilizaron 2 mg de proteínas y se ajustó el volumen a 1,6 ml con *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM. A dichos extractos se les agregaron 10  $\mu$ l de bolitas magnéticas acopladas a proteína G (Dynabeads) lavadas tres veces con PBS-BSA 5 mg/ml y se incubaron por tres horas en

rotación a 4°C. El extracto se separó de las bolitas. Un 1% del extracto se reservó para utilizar como control antes de la Inmunoprecipitación o Input (IN). El resto se dividió en dos tubos: a uno se le agregaron 4 µg de anticuerpo anti HA (Santa Cruz F-7) y al otro, 4 µg de IgG de ratón no específica (Santa Cruz), y se incubó durante toda la noche en rotación a 4°C. A cada tubo se le agregaron 25 µl de bolitas magnéticas acopladas a proteína G lavadas tres veces con PBS-BSA 5 mg/ml. Luego de una incubación de tres horas en rotación a 4°C, los complejos inmunes se lavaron cinco veces con *buffer* FA conteniendo PMSF 2 mM, cuatro veces con *buffer* FA conteniendo NaCl 500 mM y PMSF 2 mM, cinco veces con *buffer* de lavado (ver Apéndice) y dos veces con *buffer* TE (ver Apéndice). Las proteínas se eluyeron de las bolitas agregando 150 µl de *buffer* de elución (ver Apéndice) y se incubó 15 minutos a 65°C. El *crosslinking* se revirtió por incubación a 65°C durante toda la noche en presencia de proteinasa K (0,25 mg/ml).

Luego, para la extracción del ADN se utilizó fenol:cloroformo. Se mezcló el volumen recuperado con *buffer* de elución (Tris-HCl pH 8.5 10 mM) hasta un volumen de 200 µl y después se agregó igual volumen de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (tubo 1). Se agitó en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Se conservaron 180 µl de la fase acuosa superior que se trasvasó a un nuevo tubo (tubo 2). Al tubo 1 se le adicionó nuevamente 200 µl de *buffer* de elución (Tris-HCl pH 8.5 10 mM). Se agitó en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Se conservó la fase acuosa superior y se trasvasó al tubo 2. El contenido del tubo 2 se mezcló con igual volumen de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos. Se conservó la fase acuosa superior y se trasvasó a un nuevo tubo (tubo 3). Para la precipitación se mezcló el contenido del tubo 3 con NH<sub>4</sub>OAc hasta una concentración final de 0,75 M y con 20 µg de glicógeno. A esta mezcla se le agregó 2,5 veces su volumen de etanol 100% y se incubó a -20°C durante 2 horas. Luego se centrifugó 20 minutos a 4°C a máxima velocidad. Se conservó el *pellet*, y se lavó con 300 µl de una solución de etanol 80%. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 4°C a máxima velocidad. El lavado se repitió tres veces. Luego se descartó del último lavado y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante dos minutos. Por último, se resuspendió en 70 µl de agua miliQ.

### 13.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en una mezcla conteniendo FastStart Universal SYBR Green Master Mix 1:300.000 (Roche) y *primers* 0,5  $\mu$ M (Tabla 6). Se utilizó un ciclador BIOER Linegene 9660. Como ADN molde se utilizaron 2  $\mu$ l de Input o 5  $\mu$ l de inmunoprecipitado (IP) o 5  $\mu$ l del control de IgG. Cada muestra se analizó por triplicado. Los *primers* para la qPCR se diseñaron usando el programa Beacon Designer 7. El programa utilizado consistió en 5 minutos a 94°C; luego 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C. Se efectuaron lecturas de la fluorescencia luego de cada ciclo. Se cuantificó realizando un cociente de intensidades de fluorescencia entre los productos del gen de interés y del control interno *TBP1*. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  EE (error estándar) de al menos 3 experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura. El programa utilizado en todos los casos fue el siguiente: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, efectuándose una lectura de fluorescencia luego de cada ciclo. Se corroboró la presencia de un solo producto de PCR por análisis de la curva de *melting*. Para cada par de *primers* se evaluó la eficiencia de la reacción realizando una curva de calibración con diluciones seriadas al medio de una muestra de Input, debiendo cumplir con una eficiencia cercana a 2. Los *primers* para la PCR cuantitativa (Tabla 6) se diseñaron usando el programa Beacon Designer 7.

El inmunoprecipitado (IP) se normalizó con el Input (IN) y los resultados se presentan como las veces de cambio de unión a la región en estudio y con la media  $\pm$  SD (desvío estándar) de 3 o más experimentos independientes según se indica en cada caso en la leyenda de cada figura.

**Tabla 6. *Primers* para PCR en tiempo real.**

Nombre	Secuencia (5' a 3')
F-BAP2-qPCR	AGGAGGCTACTGACACTGC
R-BAP2-qPCR	GCTGACATATTTACCGTTGAAGG
F-TBP1-qPCR	TATAACCCCAAGCGTTTTGC
R-TBP1-qPCR	GCCAGCTTTGAGTCATCCTC
F-ARG5,6-qPCR	CTGTGGCCGAATGGTGGA
R-ARG5,6-qPCR	GGATAGCGAACAACAACACGC
F-UGA4-qPCR	AATCGCTTATCGCTTATCGTG
R-UGA4-qPCR	GGAAGTACTGTGCCAAG



## **CAPÍTULO I**

### **Regulación de los genes de las permeasas de leucina**

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. Así, las fuentes de nitrógeno se clasifican en dos categorías: fuentes preferidas, también llamadas ricas porque permiten una alta tasa de crecimiento, y fuentes no preferidas, o pobres, por la baja tasa de crecimiento.

Por su parte, los genes del metabolismo de las 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. Por ejemplo, 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. Dal81 es un factor de transcripción involucrado en la regulación de genes que permiten la incorporación y el metabolismo de fuentes pobres 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 se demostró que Dal81 tiene un papel fundamental en el establecimiento de esta jerarquía (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2011; Palavecino, et al. 2015b). Sin embargo, probablemente no sea el único factor que la determina.

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

El aminoácido leucina puede ser incorporado a las células mediante las permeasas Gap1, Bap2, Bap3 y Agp1.

Gap1 media la incorporación de todos los L-aminoácidos, compuestos relacionados como ornitina y citrulina, algunos D-aminoácidos, análogos tóxicos de aminoácidos y las poliaminas putrescina y espermidina (Andreasson and Ljungdahl 2004; Jauniaux and Grenson 1990; Regenbergh and Hansen 2000; Stanbrough, et al. 1995; Uemura, et al. 2005; Uemura, et al. 2004). El gen *GAP1* está sujeto a una regulación por nitrógeno compleja, ya que ocurre a nivel transcripcional por NCR (Jauniaux and Grenson 1990;

Stanbrough, et al. 1995), pero también a nivel de la localización y la degradación de la permeasa (Roberg, et al. 1997; Springael and Andre 1998; Stanbrough, et al. 1995).

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. 1999; Wielemans, et al. 2010).

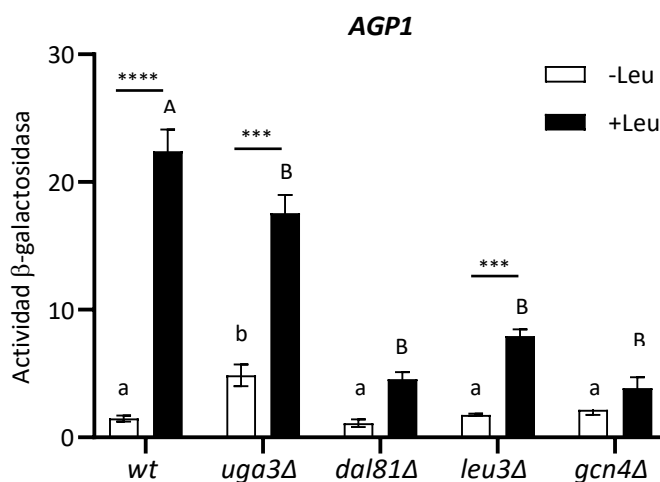
Los genes homólogos *BAP2* y *BAP3* codifican permeasas de aminoácidos ramificados de alta afinidad. Su transcripción es inducida por aminoácidos como leucina y fenilalanina y están bajo el control del sistema sensor SPS (Didion, et al. 1998).

El objetivo de este capítulo es estudiar cómo ocurre la inducción por leucina de la transcripción de *AGP1*, *BAP2* y *BAP3* con el fin de establecer cuáles factores de transcripción podrían participar del establecimiento de la jerarquía.

Células deficientes en los factores de transcripción Dal81, Uga3, Leu3 o Gcn4 fueron transformadas con plásmidos que tienen al gen reportero *lacZ* bajo las regiones regulatorias de *AGP1*, *BAP2* o *BAP3*. Las células se incubaron o no con leucina durante 1 hora y luego se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Se decidió analizar el efecto de estos cuatro factores de transcripción sobre la inducción por leucina ya que todos ellos, aunque de manera distinta, participan de la inducción por GABA de los genes *UGA*.

En primer lugar, analizamos la regulación del gen de la permeasa general de aminoácidos *AGP1* y su respuesta a la presencia de leucina. En contexto *wild type*, la expresión del gen *AGP1* aumenta significativamente cuando las células son pre-incubadas con leucina (Figura 14). En células que carecen del factor de transcripción Uga3, la expresión de *AGP1* también aumenta significativamente luego del agregado de leucina, presentando un perfil de regulación similar al de la cepa *wild type*, aunque el valor de inducción medido es significativamente menor en la mutante que en la *wild type*. Además, mientras que el aumento por la inducción con leucina en la *wild type* es de 20 veces, en la mutante es de menos de 4 veces. En cambio, la expresión determinada tanto antes como luego de la incubación con leucina en células *dal81* $\Delta$ , alcanza valores

mucho menores a los determinados en la cepa *wild type*. Es decir que, como ya había sido propuesto (Palavecino, et al. 2015b), Dal81 participa de la regulación de *AGP1* actuando positivamente sobre su expresión; el efecto de Uga3, si lo hay, es más moderado.



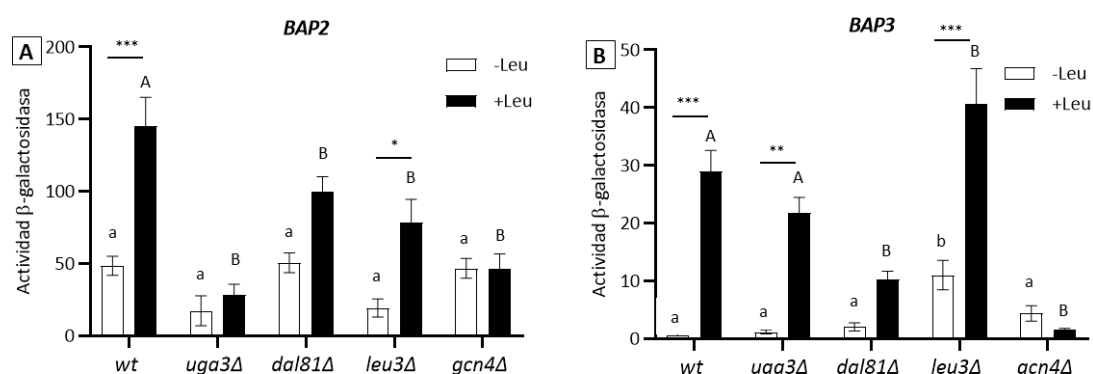
**Figura 14. Efecto de los factores de transcripción Uga3, Dal81, Leu3 y Gcn4 sobre la expresión de *AGP1*.** Células *wild type* (23344c), *uga3Δ* (26790a), *dal81Δ* (SBCY17), *leu3Δ* (SBCY01) y *gcn4Δ* (SBCY03) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *AGP1-lacZ* y crecidas en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan en unidades Miller y representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de 4 experimentos independientes. Mediante código de letras se indica el análisis estadístico por test de Tukey (ver apéndice); se compararon las medias de las cepas mutantes con la media de la cepa *wild type*, en la condición control o con el agregado de leucina. Las barras de igual condición, con letras distintas, son significativamente diferentes entre sí.

La región regulatoria de *AGP1* no presenta sitios consenso de unión de Leu3; sin embargo, la inducción por leucina disminuye significativamente en ausencia de este factor de transcripción. Por otra parte, en células deficientes en el factor de transcripción Gcn4, también se observa una disminución significativa en la expresión de *AGP1* luego de la incubación con leucina.

La expresión del gen de la permeasa de aminoácidos ramificados *BAP2* aumenta significativamente en células *wild type* cuando las células son pre-incubadas con leucina (Figura 15A). La ausencia de cualquiera de los cuatro factores de transcripción analizados no modifica la expresión basal de *BAP2*. En cambio, el nivel de inducción en las cepas mutantes, es en todos los casos significativamente menor que en la *wild type*.



En las células deficientes en Uga3 o Gcn4 el nivel de expresión no se modifica por la incubación con leucina. Es decir que Gcn4 y Uga3 resultan esenciales para la inducción del gen *BAP2*. En cambio, en la mutante *leu3Δ*, aunque en menor medida que en la *wild type*, la inducción por leucina sigue ocurriendo. El aumento de actividad por el agregado de leucina medido en las células *dal81Δ* no es significativo. Estos resultados, obtenidos para las cepas *leu3Δ* y *dal81Δ*, confirman resultados de reportes previos (Nielsen, et al. 2001; Palavecino, et al. 2015b).

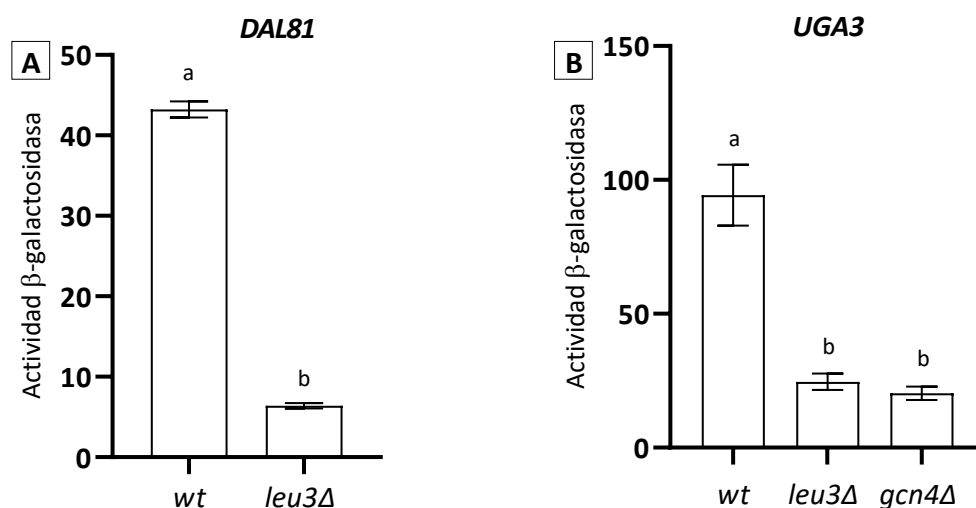


**Figura 15. Efecto de los factores de transcripción Uga3, Dal81, Leu3 y Gcn4 sobre la expresión de BAP2 y BAP3.** Células *wild type* (23344c), *uga3Δ* (26790a), *dal81Δ* (SBCY17), *leu3Δ* (SBCY01) y *gcn4Δ* (SBCY03) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *BAP2-lacZ* (A) o *BAP3-lacZ* (B) 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, se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan en unidades Miller y representan la media ± SEM (error estándar de la media) de 4 experimentos independientes. Mediante código de letras se indica el análisis estadístico por test de Tukey (ver apéndice); se compararon las medias de las cepas mutantes con la media de la cepa *wild type*, en la condición control o con el agregado de leucina. Las barras de igual condición, con letras distintas, son significativamente diferentes entre sí.

La expresión *BAP3* aumenta significativamente cuando las células son pre-incubadas con leucina (Figura 15B). Los valores de actividad medidos en células tratadas con leucina, sólo disminuyen significativamente en las cepas *dal81Δ* y *gcn4Δ*. Es decir que, de los cuatro factores de transcripción analizados, sólo Dal81 y Gcn4 participan en la inducción por leucina. Resulta llamativo que en la cepa deficiente en el factor de transcripción Leu3, la expresión de *BAP3* es significativamente mayor que en la *wild type* en ambas condiciones ensayadas, indicando que Leu3 tiene un efecto negativo sobre la expresión de *BAP3*.

La expresión de Leu3 se encuentra bajo el control general de aminoácidos (GAAC) (Zhou, et al. 1987) y su expresión es regulada positivamente por Gcn4 (Harbison, et al. 2004;

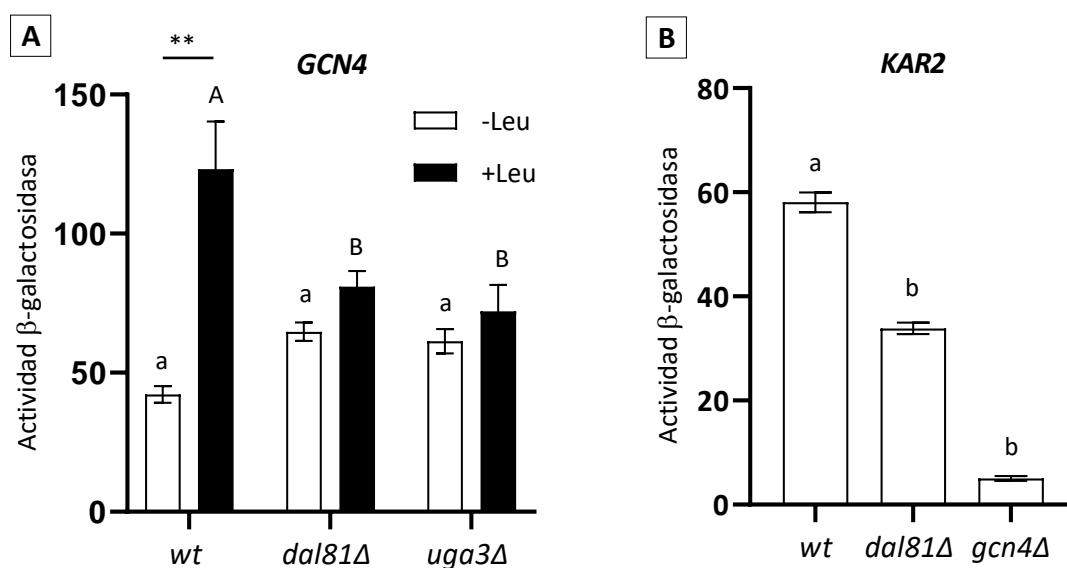
Kohlhaw 2003; Natarajan, et al. 2001). También se ha sugerido que *GCN4* es un blanco directo de Leu3, es decir que entre ambos factores existe una mutua retroalimentación positiva (Tang, et al. 2006). Por otra parte, hay un efecto indirecto de Leu3, a través de Dal81, sobre el gen *UGA4* (Cardillo, et al. 2010). Mediante ensayo de genes reporteros realizados de manera similar a los anteriormente descritos, observamos que la expresión de *DAL81* disminuye significativamente en ausencia de Leu3 (Figura 16A). También encontramos que la expresión de *LEU3* es menor en células deficientes en Dal81 o Gcn4 que en células *wild type* (Figura 16B). Por lo tanto, Leu3 regula positivamente la expresión de *DAL81* y de *UGA3*, y Gcn4 regula la expresión de *UGA3*.



**Figura 16. Efecto de los factores de transcripción Leu3 y Gcn4 sobre la expresión de *DAL81* y *UGA3*.** Células *wild type* (23344c), *dal81 $\Delta$*  (SBCY17), *leu3 $\Delta$*  (SBCY01) y *gcn4 $\Delta$*  (SBCY03) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *DAL81-lacZ* (A) y *UGA3-lacZ* (B) crecieron en medio mínimo con prolina, se cosecharon y se midió la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados se expresan en unidades Miller y representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de 4 experimentos independientes. Mediante código de letras se indica el análisis estadístico por test Tukey (ver apéndice); se compararon las medias de las cepas mutantes con la media de la cepa *wild type*, en la condición control o con el agregado de leucina. Las barras de igual condición, con letras distintas, son significativamente diferentes entre sí.

En segundo lugar, cuando analizamos la expresión de *GCN4* (Figura 17), observamos que en el contexto *wild type*, se produce un aumento significativo de casi tres veces en su expresión, luego de la incubación con leucina; mientras que en células deficientes en Dal81 y Uga3, la expresión de *GCN4* disminuye casi a la mitad. Por lo que, la expresión de *GCN4* en ausencia de Dal81 y de Uga3 no responde a la presencia de leucina.

Si bien la expresión de *GCN4* en presencia de leucina disminuye significativamente en células *dal81Δ* y *uga3Δ*, el nivel de actividad de beta-galactosidasa medido sigue siendo elevado. Para evaluar si esta disminución en la expresión de *GCN4* es suficiente para tener un impacto sobre los genes a los que regula, analizamos la expresión de *KAR2* (Figura 17B), un gen dependiente de Gcn4, que se utiliza como un reportero de la respuesta a proteínas mal plegadas, pero no está relacionado con el metabolismo de las fuentes de nitrógeno. Como apreciamos en la Figura 17B, en células *wild type* *KAR2* se expresa cuando se induce (con DTT) el plegamiento incorrecto de proteínas, pero la expresión es casi despreciable en ausencia de Gcn4. En células deficientes en Dal81, la expresión de *KAR2* también disminuye significativamente. Esto sugiere que la disminución en la expresión de *GCN4* observada en las mutantes *dal81Δ* y *uga3Δ*, aunque no es total, es suficiente para generar cambios en la expresión de los genes blanco de Gcn4.



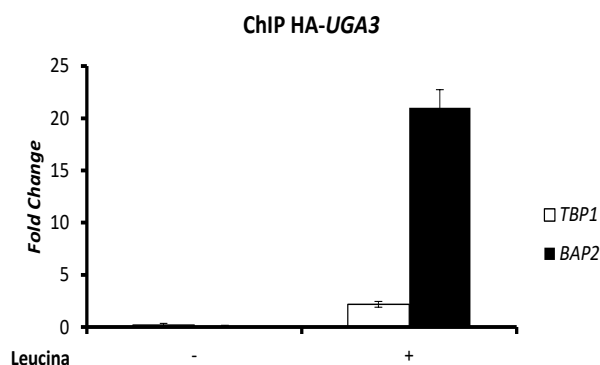
**Figura 17. Efecto de los factores de transcripción Dal81 y Uga3 sobre la expresión *GCN4*.** (A) Células *wild type* (23344c), *dal81Δ* (SBCY17) y *leu3Δ* (SBCY01) transformadas con el plásmido que contiene la construcción *GCN4-lacZ* crecieron en medio mínimo con prolina, se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado (barras negras) o no (barras blancas) de leucina 1,3 mM. Luego de 1 hora de incubación, se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. (B) Células *wild type* (23344c), *dal81Δ* (SBCY17) y *gcn4Δ* (SBCY03), transformadas con el plásmido p072 que contiene la construcción *UPRE<sub>KAR2</sub>-lacZ* y crecidas en medio mínimo, fueron incubadas con leucina 1,3 mM y luego durante 1 hora más con DTT para inducir la respuesta a proteínas mal plegadas. Luego, se midió la actividad de la enzima β-galactosidasa. Los resultados se expresan en unidades Miller y representan la media ± SEM (error estándar de la media) de 4 experimentos independientes. Mediante código de letras se indica el análisis estadístico por test de Tukey (ver apéndice); se compararon las medias de las cepas mutantes con la media de la cepa

*wild type*, en la condición control o con el agregado de leucina. Las barras de igual condición, con letras distintas, son significativamente diferentes entre sí.

En síntesis, encontramos que los genes *BAP2*, *BAP3* y *AGP1* son regulados por varios factores de transcripción y que los efectos regulatorios observados por parte de algunos factores de transcripción, probablemente sean indirectos y estén ocasionados por cambios en la expresión de otros factores, que sí actúan de manera directa sobre la expresión de estas permeasas.

El efecto regulatorio de Uga3 sobre *BAP2* encontrado en este trabajo resultó muy llamativo, ya que Uga3 era conocido como un factor de transcripción específico de los genes de la utilización del GABA, *UGA*. Vimos que en ausencia de Uga3 también disminuye la expresión de *GCN4* y que Gcn4 regula la expresión de *BAP2*. Es decir que el efecto de Uga3 sobre *BAP2* podría ser indirecto.

Con el objetivo de establecer si Uga3 regula a *BAP2* por interacción con su promotor, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Células que expresan la proteína de fusión de HA-Uga3, se trataron o no con leucina y se realizó el ensayo de ChIP tal como se describió en la sección ``materiales y métodos''. Como se observa en la Figura 18, detectamos que el factor de transcripción Uga3 se une a la región regulatoria del gen *BAP2*, sólo en presencia de leucina. Estos resultados confirman una acción directa del factor de transcripción Uga3 sobre el gen *BAP2* de una manera dependiente de leucina. Por lo tanto, el conjunto de hallazgos nos demuestra que Uga3 es un activador de *BAP2* y que su actividad es consecuencia de su unión directa al promotor de *BAP2*.



**Figura 18. Análisis de la interacción del factor de transcripción Uga3 y el promotor de *BAP2*.** Células que expresan la proteína de fusión HA-Uga3 (SBCY13), fueron crecidas en medio mínimo y fueron incubadas (+) o no (-) con leucina 1.3 mM durante una hora. Se inmunoprecipitó la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpo anti HA. Los ensayos de qPCR se realizaron con primers específicos que amplifican la región promotora de *BAP2* (barras negras) y la región promotora del gen *TBP1* (barras blancas). El último se usó como control negativo. Los resultados se expresaron como las veces de cambio de unión al promotor de *BAP2* y representan la media más el desvío estándar de tres experimentos independientes.

## Discusión

Dal81 es un regulador positivo general de los genes implicados en la utilización de nitrógeno relacionada con el metabolismo de GABA, urea, leucina y alantoína (Coornaert, et al. 1991; Vissers, et al. 1990); además, Dal81 está involucrado en la vía del sensor SPS de aminoácidos (Abdel-Sater, et al. 2004b; Boban and Ljungdahl 2007; Iraqui, et al. 1999). En todos estos procesos de inducción, Dal81 actúa junto a una proteína inductora específica; este factor específico es Uga3 en la inducción de GABA de genes *UGA* (Andre 1990; Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2012), Dal82 en la inducción de alofanato de genes *DUR* y *DAL* (Andre and Jauniaux 1990), y Stp1 en amino inducción ácida de genes de permeasas de aminoácidos como *BAP2*, *BAP3* y *AGP1* (Abdel-Sater, et al. 2004b; Boban and Ljungdahl 2007; Iraqui, et al. 1999). Palavecino y col. demostraron que el factor de transcripción Dal81 es central en la regulación que conduce a la expresión jerárquica de los genes *AGP1*, *DUR* y *UGA* y, en consecuencia, en la utilización de leucina, alantoína y GABA (Palavecino, et al. 2015b). Sin embargo, *BAP2*, el gen de una de las permeasas de leucina, parece no estar incluido en esta regulación jerárquica ya que la regulación de *BAP2* por Dal81 ocurre a través de un mecanismo indirecto (Palavecino, et al. 2015b).

Cuando analizamos la expresión de *AGP1*, encontramos que la inducción por leucina disminuye en ausencia de los cuatro factores de transcripción analizados, Uga3, Dal81, Leu3 y Gcn4, aunque sólo en ausencia de Dal81 y Gcn4 la inducción es indetectable.

*GCN4* codifica una proteína eucariótica altamente conservada que funciona como un factor de transcripción global de la red de control general de aminoácidos (GAAC) necesaria para aumentar la biosíntesis de precursores de la traducción, como proteínas ribosomales, aminoácidos y purinas. La vía regulatoria GAAC es inducida no solo por ayuno de aminoácidos, sino también por otros tipos de estrés ambientales, como la limitación de disponibilidad de glucosa, la radiación UV o salinidad elevada. Los *targets* de Gcn4 incluyen genes de biosíntesis de aminoácidos y factores de respuesta al estrés, incluidos los componentes de la respuesta de la proteína desplegada (McCormick, et al. 2011). Por todo esto era esperable que *AGP1* estuviera bajo la regulación positiva de Gcn4. De hecho, mediante perfiles de expresión globales se había demostrado que *AGP1*, así como también *BAP2*, son inducibles en respuesta al ayuno de histidina mediante tratamiento con 3-aminotriazol (3AT), inhibidor competitivo de His3, de manera dependiente de Gcn4 (Natarajan, et al. 2001).

La disminución en los niveles de inducción de *AGP1* por la deficiencia en *LEU3*, probablemente se deba a que en estas condiciones disminuye la expresión de *GCN4* (Tang, et al. 2006) y también de *DAL81*. Por otra parte, la ausencia de Uga3 podría provocar una disminución en los niveles inducidos de *AGP1* por una menor expresión de Gcn4.

En condiciones normales de crecimiento, *GCN4* se expresa en un nivel basal bajo, pero se des-reprime en respuesta al ayuno de cualquier aminoácido individual o de una aminoacil-ARNt sintetasa defectuosa (McCormick, et al. 2011). Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas en nuestro trabajo, el agregado de leucina a los cultivos aumentó significativamente su expresión.

*BAP2* no se encuentra bajo la regulación NCR por lo que su expresión es elevada en presencia de fuentes ricas de nitrógeno; cuando la fuente de nitrógeno disponible es pobre, (por ejemplo, prolina) su expresión es menor, pero inducible por leucina (datos no mostrados). En este trabajo vimos que esta inducción depende de Dal81, Uga3 y

Gcn4. Como ya mencionamos, Palavecino y col ya habían demostrado que Dal81 participa de la regulación de *BAP2*; aunque no detectaron interacción entre este factor de transcripción y este gen, demostraron que la unión de Stp1 a la región regulatoria de *BAP2* depende de Dal81 (Palavecino, et al. 2015b).

En ausencia de Leu3, aunque en menor medida que en el contexto *wild type*, la presencia de leucina induce la expresión de *BAP2*. Este resultado está de acuerdo con los resultados obtenidos por Nielsen y col. (Nielsen, et al. 2001). 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 en nuestro laboratorio se demostró que Leu3 interacciona con *BAP2* de manera dependiente de leucina.

En este trabajo demostramos que el factor de transcripción Uga3, que había sido descrito como regulador exclusivo de los genes del regulón *UGA*, regula positivamente a *BAP2* y que esta regulación está mediada por la interacción entre la proteína y la región regulatoria del gen *BAP2* en respuesta a la incubación con leucina. Mediante estudios globales, Venters y colaboradores (Venters, et al. 2011), habían propuesto una posible interacción entre el factor de transcripción Uga3 y los genes *BAP2* y *BAP3*.

Si bien se había propuesto que *BAP2* podría ser regulado por Gcn4 por estudios de análisis de secuencias (Maclsaac, et al. 2006) y se sabía que la expresión de *BAP2* responde a 3AT de manera dependiente de Gcn4 (Natarajan, et al. 2001), en este trabajo demostramos por primera vez que Gcn4 es esencial para que ocurra la inducción de *BAP2* por leucina.

La regulación de *BAP3* no depende de Uga3, a diferencia de lo observado para su gen parálogo *BAP2*. Cabe aclarar que Venters y colaboradores (Venters, et al. 2011) propusieron una posible interacción entre el factor de transcripción Uga3 y *BAP3* mediante análisis globales de secuencias; sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo Uga3 no participa de la regulación de ese gen. La inducción de *BAP3* también depende de Gcn4. La expresión disminuida de Gcn4 en ausencia de Uga3 no produjo una disminución en los niveles de inducción de *BAP3*. Es decir que, si bien esa disminución en los niveles de Gcn4 parecen tener un efecto a nivel de la expresión de

*KAR2*, esto no sería general para todos sus genes blanco, por lo que no podemos descartar que el efecto de Uga3 sobre *AGP1* sea independiente de Gcn4.

Sabemos que el factor de transcripción Dal81 es necesario para que ocurra una expresión jerárquica ordenada entre los genes de las permeasas de la leucina y del GABA. El hecho de que la actividad de Dal81 y Uga3 sobre la expresión de los genes *UGA* es interdependiente (Cardillo, et al. 2012), junto con el hallazgo de la inducción de *BAP2* depende de Uga3, nos lleva a proponer que la jerarquía en el uso de las fuentes pobres leucina y GABA también podría depender del factor Uga3.



## **CAPÍTULO II**

**Interacción entre factores de transcripción que participan en la  
regulación de genes de la utilización de fuentes pobres de  
nitrógeno**

Como mencionamos anteriormente, Dal81 participa en varios procesos de inducción actuando junto a otra proteína inductora específica de cada vía. Cabe mencionar como ejemplo, que en el caso de la inducción por aminoácidos del gen *AGP1*, se ha sugerido que la interacción del factor Dal81 sería a través de la misma región a través de la cual interactúa Stp1, sugiriendo que dicha interacción podría ser a través de Stp1 (Boban and Ljungdahl 2007). Por otra parte, Scott y colaboradores sugirieron que Dal82/DurM sería el puente entre Dal81 y los promotores de los genes *DUR* y *DAL* (Scott, et al. 2000). El factor de transcripción Leu3 es un regulador transcripcional global (Boer, et al. 2005; Tang, et al. 2006), que inicialmente fue descrito como un factor de transcripción esencial en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados y otros como *BAP2* (Friden and Schimmel 1988b). Basados en nuestro hallazgo de que la inducción de la permeasa *BAP2* depende del factor Uga3, y sumado a que Dal81 participa en la expresión jerárquica ordenada entre los genes de las permeasas de la leucina y del GABA, propusimos que la jerarquía en el uso de las fuentes pobres también podría depender del factor Uga3.

El objetivo de este capítulo fue realizar una búsqueda de nuevos factores de transcripción que interactúen con Dal81 y con Uga3, y determinar bajo qué condiciones esta interacción ocurre, con el fin de entender el mecanismo molecular que lleva a la jerarquía en el uso de ciertas fuentes pobres.

Para ello, la estrategia elegida fue la de inmunoprecipitar los factores de transcripción Uga3 y Dal81, a partir de células incubadas o no con posibles inductores de las vías de utilización de fuentes pobres de nitrógeno, y luego analizar por espectrometría de masas qué proteínas co-inmunoprecipitaron por encontrarse unidas al factor de transcripción en cuestión. Una vez identificadas las proteínas interactoras específicas, se realizaría un análisis *in silico* para determinar en qué vías participan. Luego, se estudiaría mediante el uso de las mutantes correspondientes, la participación de Dal81 y de Uga3 en la regulación de estos nuevos genes blanco.

Para poner a punto el protocolo comenzamos trabajando con una cepa que expresa Dal81 como proteína de fusión al epítopo HA, bajo su promotor y en su contexto natural (SBCY10) (Cardillo, et al. 2010).

Nos basamos en el protocolo propuesto por Lambert y col. (Lambert, et al. 2009) con varias modificaciones. Para la purificación y el análisis de proteínas unidas a la cromatina y las redes de interacción de las proteínas asociadas estos autores propusieron un método que consiste en una adaptación de la inmunoprecipitación de la cromatina. Así, este método consiste en la ruptura del ADN por sonicación, una clarificación suave, y una purificación por afinidad de los complejos proteína-ADN, de manera de obtener una cantidad de proteína asociada a cromatina suficiente para analizar por espectrometría de masa.

Comenzamos trabajando con una cepa que expresa Dal81 como proteína de fusión al epítopo HA, bajo su promotor y en su contexto natural (SBCY10) (Cardillo, et al. 2010). Las células se trataron o no con GABA o leucina, para asegurarnos que Dal81 estuviera asociado a otras proteínas (Uga3, Stp1, por ejemplo). Luego de llevar adelante el *crosslinking*, lisamos las células con perlas de vidrio para obtener el extracto de proteínas totales. Luego, aplicamos en el extracto pulsos de ultrasonido para fragmentar la cromatina e inmunoprecipitamos los complejos con bolitas magnéticas acopladas a proteína G (DynaBeads) acopladas a anticuerpo anti HA. Luego se trató el inmunoprecipitado con tripsina y se analizó la muestra mediante espectrometría de masas con tecnología Orbitrap (QExactive acoplado a nano-HPLC- ThermoScientific) en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM). En cada caso, siempre se realizó en paralelo el mismo protocolo utilizando células que no expresan la proteína de fusión a HA.

Mediante espectrometría de masas logramos detectar la presencia de péptidos de confianza media. Entre estos, se detectó uno que exhibió patrones de fragmentación confiables para ser indicativo de la presencia de Dal81 (Figura 19).

Accession	Description	Coverage	Peptides	PSMs
Dal81	With intermedium sequences	1,029963	1	4

Confidence	Sequence	Modifications	ProteinGroups	Proteins
Medium	TLQVDSGSAAR	-	1	1

Peptide Summary

Sequence: TLQVDSGSAAR, Charge: +2, Monoisotopic m/z: 552.78644 Da (+0.61 mmu/+1.11 ppm), MH+: 1104.56560 Da, RT: 15.4082 min, Identified with: Sequest HT (v1.17); XCorr:1.70, Ions matched by search engine: 0/0  
 Fragment match tolerance used for search: 0.05 Da  
 Fragments used for search: b; b-H<sub>2</sub>O; b-NH<sub>3</sub>; y; y-H<sub>2</sub>O; y-NH<sub>3</sub>

Fragment Matches

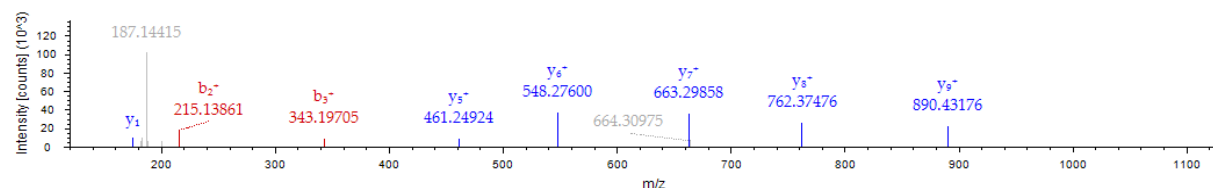
Value Type: Theo. Mass [Da]

Ion Series: Neutral Losses Precursor Ions

#1	b <sup>+</sup>	b <sup>2+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>2+</sup>	#2
1	102.05496	51.53112	T			11
2	215.13902	108.07315	L	1003.51670	502.26199	10
3	343.19760	172.10244	Q	890.43263	445.71996	9
4	442.26601	221.63664	V	762.37406	381.69067	8
5	557.29295	279.15011	D	663.30564	332.15646	7
6	644.32498	322.66613	S	548.27870	274.64299	6
7	701.34645	351.17686	G	461.24667	231.12697	5
8	788.37847	394.69288	S	404.22521	202.61624	4
9	859.41559	430.21143	A	317.19318	159.10023	3
10	930.45270	465.72999	A	246.15607	123.58167	2
11			R	175.11895	88.06311	1

Fragment Spectrum

SR02.raw #3820 RT: 15.4082 min  
 FTMS, 552.7865@hcd27.00, z=+2, Mono m/z=552.78644 Da, MH+=1104.56560 Da, Match Tol.=0.05 Da



**Figura 19. Detección de Dal81 por espectroscopía de masa en el inmunoprecipitado.** Se extrajeron proteínas de células que expresan 6HA-DAL81 (SBCY10). Luego se realizó una inmunoprecipitación utilizando Dynabeads acopladas a un anticuerpo anti-HA y por último una digestión con tripsina. La digestión se realizó directamente *in situ* sin eluir los inmunocomplejos. Antes de la digestión no se realizó reducción ni alquilación. Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas acoplada a nano-HPLC. Los espectros de masa fueron analizados con el *software Proteome Discoverer*, contra el proteoma de *S. cerevisiae* y contra la secuencia de 6HA-Dal81. Se muestra uno de los cuatro espectros de fragmentación obtenidos para el péptido indicativo de Dal81.

Si bien pudimos identificar y confirmar la presencia de Dal81 con un amplio rango de confianza, estos ensayos no nos permitieron detectar otros péptidos indicativos de Dal81 ni tampoco péptidos indicativos de otras proteínas que pudiesen estar asociadas a Dal81. La cantidad de proteína resultante de la inmunoprecipitación no resultaba suficiente para su identificación mediante espectrometría de masas. Este inconveniente quizás pueda explicarse teniendo en cuenta el bajo nivel de expresión que en general presentan los factores de transcripción. Otro de los inconvenientes en la utilización de este protocolo, fue la gran cantidad de péptidos de IgG detectados, provenientes del

sistema de inmunoprecipitación, cuya presencia comprometía la sensibilidad analítica de la técnica de espectrometría de masas.

Por este motivo, resolvimos cambiar de abordaje experimental. Decidimos entonces evaluar la interacción de Dal81 y de Uga3 con factores de transcripción candidatos a actuar en conjunto con ellos y estudiar las condiciones en las que ocurre esa interacción.

Comenzamos este estudio con los siguientes candidatos: Dal80, Dal82, Leu3, Stp1, Stp2.

Para llevar a cabo los experimentos planteados para este nuevo abordaje fue necesario construir cepas mutantes que expresaran pares de factores como proteínas de fusión a dos epítopes diferentes. Para determinar la interacción, utilizamos la técnica de co-inmunoprecipitación seguida de Western blot. Para ello, inmunoprecipitamos utilizando un anticuerpo contra uno de los dos epítopes y revelamos el Western blot con un anticuerpo contra el otro epítope.

El análisis funcional de genes de *S. cerevisiae* tuvo un gran avance gracias al desarrollo de técnicas que permiten etiquetar genes por recombinación homóloga en el genoma de dicho organismo de forma rápida y sencilla (Sheff and Thorn 2004). El procedimiento habitual consta en clonar fragmentos del gen de interés flanqueando a un determinado marcador de selección y/o la etiqueta necesaria. Debido a la elevada frecuencia de recombinación en la levadura *S. cerevisiae*, ha sido posible reducir estas regiones flanqueantes a secuencias de 35-40 pares de bases, permitiendo la construcción de módulos de recombinación utilizando la técnica de PCR. Luego de transformar a las células con esta construcción, ocurre recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes, evento que resulta en la integración del fragmento diseñado que se utilizó para la transformación (Baudin, et al. 1993; Manivasakam, et al. 1995).

Existe un gran número de marcadores de selección, incluyendo marcadores de auxotrofia o marcadores de resistencia a drogas. La obtención de mutantes se facilita cuando se utilizan marcadores heterólogos ya que se disminuye la recombinación del marcador con el genoma de la célula huésped. Los módulos de recombinación diseñados, generalmente cuentan con numerosos marcadores de selección heterólogos, como por ejemplo marcadores basados en el gen *kanr* de *Escherichia coli* (confiere resistencia a geneticina o G418) y el gen *his5+* de *Schizosaccharomyces pombe*

(complementa la mutación *his3* de *S. cerevisiae*) (Goldstein and McCusker 1999; Longtine, et al. 1998; Wach 1996; Wach, et al. 1994). También se han desarrollado sistemas para rescatar los marcadores de selección lo que permite reutilizarlos en un subsiguiente proceso de mutagénesis. Estos sistemas incluyen marcadores de selección flanqueados por secuencias con repeticiones directas (Alani, et al. 1987; Langle-Rouault and Jacobs 1995; Wach, et al. 1994) o flanqueados por secuencias *loxP* donde el marcador se escinde por recombinación homóloga mediada por la recombinasa Cre (Gueldener, et al. 2002; Guldener, et al. 1996). Por otra parte, existe un gran número de módulos para generar proteínas de fusión, los cuales incluyen epítopes para inmunohistoquímica, purificación de proteínas, microscopía de fluorescencia, etc. (Gauss, et al. 2005; Janke, et al. 2004; Longtine, et al. 1998). El hecho de que los epítopes se introduzcan directamente por recombinación homóloga en el genoma permite modificar a los genes blanco en su contexto natural sin perturbar su regulación natural (Sheff and Thorn 2004). El uso de esta técnica permite la expresión de proteínas en niveles endógenos y evita los problemas asociados al uso de proteínas de fusión expresadas en plásmidos que podrían generar patrones no homogéneos de expresión en una población celular (Gauss, et al. 2005).

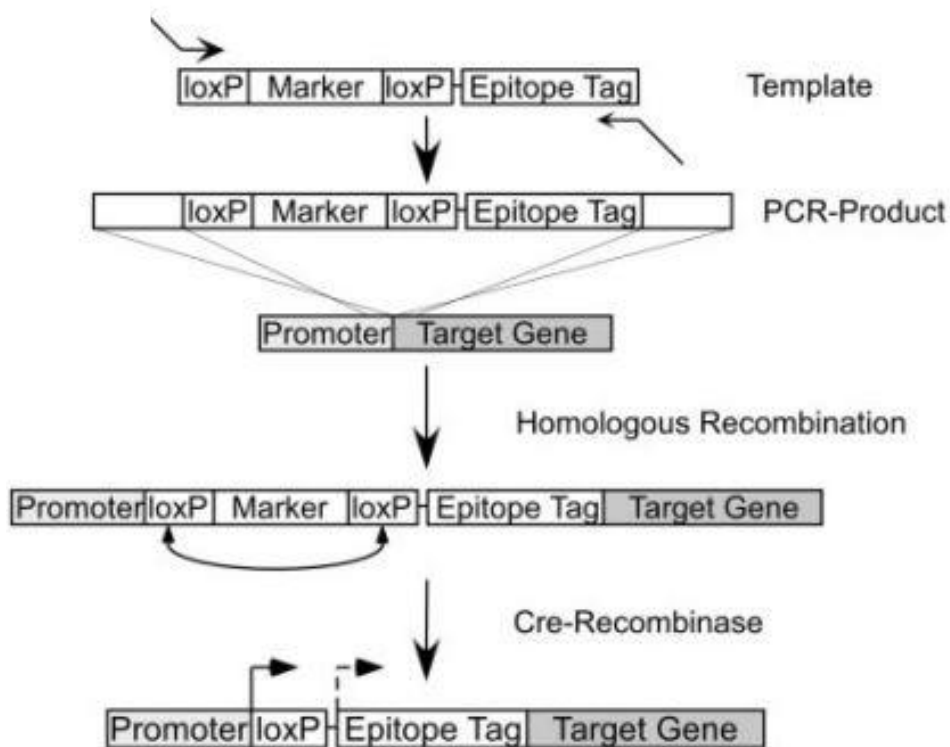
### **Preparación de cepas que expresan proteínas de fusión con el epítope c-Myc en el extremo N-terminal**

La construcción de cepas con doble etiqueta se realizó a partir de cepas con Dal81 sin etiqueta o etiquetado con el epítope 6HA en el extremo N-terminal. Así, las cepas parentales utilizadas fueron SBCY10 (*Mata ura3 6HA-DAL81*), SBCY30 (*Mata ura3 UGA4::UAS<sub>GABA</sub>del*), SBCY36 (*Mata ura3 UGA4::UAS<sub>GABA</sub>del 6HA-DAL81*) (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2012). Las cepas SBCY30 y SBCY36 además carecen de la región UAS<sub>GABA</sub> en la región regulatoria de *UGA4*, sitio de unión de Dal81 y Uga3 y necesaria para la inducción de ese gen. También utilizamos como parental, la cepa que expresa Leu3 fusionada a 6HA en el extremo N-terminal denominada SBCY09 (*Mata ura3 6HA-LEU3*) (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2012).

De esta manera, utilizando una adaptación de la técnica de inserción de epítopes en genes cromosomales (Gauss, et al. 2005) esquematizada en la Figura 20, generamos cepas que expresan proteínas de fusión con cMyc en su extremo amino terminal. Para ello, utilizamos el plásmido pOM20 como templado. Dicho plásmido contiene al gen de resistencia a antibiótico, *kanMX6*, flanqueado por secuencias *loxP* y 9 epítopes Myc en tandem. Los *primers* fueron diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18-19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo de selección o a los 9 epítopes Myc y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas a la región 3' del gen al cual se desea agregar el tag. Se generó por PCR un fragmento que contiene la secuencia *loxP-kanMX6-loxP-9cMyc* flanqueada por dos regiones de homología al gen de interés (*Dal81*, *DAL82*, *UGA3* y *LEU3*) con el que transformamos la cepa parental correspondiente.

Luego de seleccionar transformantes en placas con G418, realizamos el *screening* para verificar la correcta inserción del fragmento *loxP-kanMX6-loxP-9cMyc*. Esto se llevó a cabo mediante PCR colony utilizando dos pares de *primers*. Un par de primers hibridan en una región río arriba y río abajo del sitio de recombinación esperado; de esta manera, el tamaño del producto de PCR varía según haya inserto o no. Del otro par, uno hibrida río abajo del sitio de recombinación esperado y el otro es complementario a una región del *cassette KanMX6*, de modo que sólo se espera producto de PCR cuando la inserción ocurrió en el sitio esperado. Luego, transformamos con el plásmido pSH47 (Guldener, et al. 1996) el cual contiene el gen que codifica para la recombinasa Cre río abajo del promotor inducible por galactosa *GAL1*. La correcta escisión del marcador de resistencia al antibiótico se verificó por ensayo de réplica en placa, evaluando la incapacidad de crecimiento en medio conteniendo G418y luego corroboramos la escisión por PCR utilizando los mismos pares de *primers* que se usaron para el *screening*.

La escisión del marcador de resistencia es necesario para obtener una proteína de fusión funcional.



**Figura 20. Esquema de la técnica utilizada para la inserción del epítipo cMyc en el extremo N terminal.** La fusión de un epítipo en el extremo N-terminal del gen de interés conservando su posición original en el genoma posibilita obtener una proteína fusionada al epítipo (cMyc en nuestro caso) en su extremo N-terminal y bajo el control de su promotor natural (Gauss, et al. 2005).

En la Tabla 7 se muestra el listado de las cepas generadas y se indica la cepa parental utilizada en cada caso.

**Tabla 7. Cepas preparadas con la fusión del epítipo 9cMyc en el extremo N-terminal y sus respectivas cepas parentales.**

CEPA	GENOTIPO*	CEPA PARENTAL	GENOTIPO PARENTAL*
SAMY01	6HA-DAL81 <i>LoxP</i> -9cMYC-DAL82	SBCY10	6HA-DAL81
SAMY02	<i>LoxP</i> 9-cMYC-DAL82	23344	<i>sin tag</i>
SAMY03	<i>LoxP</i> -9cMYC-UGA3	23344	<i>sin tag</i>
SAMY05	6HA-DAL81 <i>LOXP</i> 9-cMYC-LEU3	SBCY10	6HA-DAL81
SAMY07	UGA4:: <i>UAS</i> <sub>GABA</sub> Δ <i>LOXP</i> - 9cMycUga3	SBCY30	UGA4:: <i>UAS</i> <sub>GABA</sub> Δ <i>sin tag</i>
SAMY08	6HA-DAL 81 UGA4:: <i>UAS</i> <sub>GABA</sub> Δ <i>LOXP</i> - 9cMYC UGA3	SBCY36	6HA-DAL 81 UGA4:: <i>UAS</i> <sub>GABA</sub> Δ
SAMY09	<i>LOXP</i> - 9cMyc DAL81	23344	<i>sin tag</i>
SAMY10	6HA-LEU3 <i>LOXP</i> - 9cMyc UGA3	SBCY09	6HA-LEU3

(\*) Todas las cepas poseen el fondo genético *Mata ura3*



### **Preparación de cepas que expresan proteínas de fusión con el epítoto Myc en el extremo C-terminal**

Los factores de transcripción Stp1 y Stp2 participan como efectores río abajo del sensor SPS en la vía de sensado de aminoácidos. Los genes *STP1* y *STP2* se generaron a partir de la duplicación completa del genoma en una levadura ancestral y divergieron funcionalmente durante la evolución (Wielemans, et al. 2010); tienen funciones que se solapan y son parcialmente redundantes (Andreasson and Ljungdahl 2002; de Boer, et al. 2000). Ambos factores son sintetizados en el citoplasma como proteínas latentes con un dominio N-terminal de 10 kDa crucial para su actividad (Andreasson, et al. 2006). En ausencia de aminoácidos, Stp1 y Stp2 se encuentran en el citoplasma. Cuando se agregan aminoácidos al medio de cultivo, estos factores son activados por remoción endoproteolítica de sus dominios N-terminales y translocan al núcleo donde se unen a secuencias conocidas como *UAS<sub>aa</sub>* presentes en algunos promotores. Por este motivo, para generar cepas que expresaran Stp1 o Stp2 fusionadas a epítotos se utilizó la técnica desarrollada para inserción de tags (Longtine, et al. 1998) en el extremo C-terminal. Para ello amplificamos por PCR el módulo del tag/selección *13cMyc-kanMX6* utilizando como templado el plásmido pFA6a-13cMyc-kanMX6 (Longtine, et al. 1998) y *primers* diseñados de tal manera que en sus extremos 3' poseen 18-19 nucleótidos complementarios a secuencias adyacentes al módulo *kanMX6* y en sus extremos 5' poseen secuencias de aproximadamente 40 bases homólogas al extremo 3' de los genes *STP1* y *STP2*. Con dicho módulo transformamos las cepas a modificar.

En la Tabla 8 se muestra el listado de las cepas generadas y se indica la cepa parental utilizada en cada caso.

**Tabla 8. Cepas preparadas con la fusión del epítipo 9cMyc en el extremo C-terminal y sus respectivas cepas parentales.**

CEPA	GENOTIPO*	CEPA PARENTAL	GENOTIPO PARENTAL*
SAMY04	<i>STP1-13cMYC-KanMx6</i>	23344	<i>Sin tag</i>
SAMY06	<i>6HA-LEU3 DAL80-13cMYC-KanMx6</i>	SBCY09	<i>6HA-LEU3</i>
SAMY11	<i>DAL80 13cMYC-KanMx6</i>	23344	<i>Sin tag</i>
SAMY12	<i>6HA-DAL81 STP1-13cMYC-KanMx6</i>	SBCY10	<i>6HA-DAL81</i>
SAMY13	<i>6HA-DAL81 STP2-13cMYC-KanMx6</i>	SBCY10	<i>6HA-DAL81</i>
SAMY14	<i>6HA-LEU3 STP1-13cMYC-KanMx6</i>	SBCY09	<i>6HA-LEU3</i>

(\*) Todas las cepas poseen el fondo genético *Mata ura3*

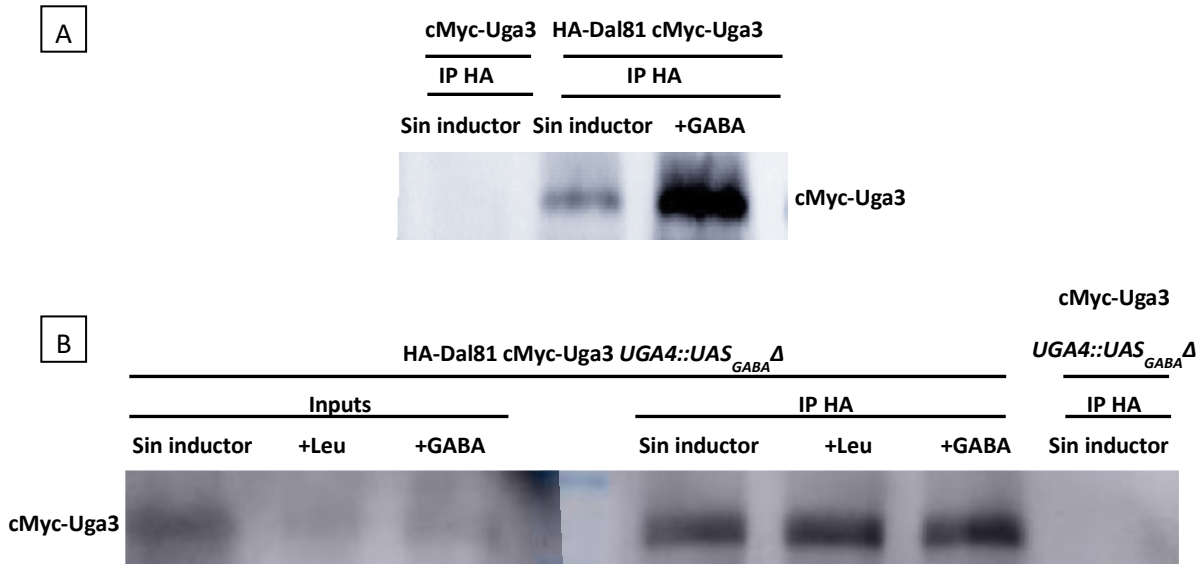
### **Análisis de interacciones entre Dal81, Uga3 y otros factores de transcripción**

En términos generales, para determinar las interacciones entre los factores de transcripción etiquetados y poder evaluar bajo qué condiciones ocurrirían, las células de cada cepa se trataron o no con el aminoácido específico que induce la activación de la vía en la que participa cada factor. Luego realizamos el *crosslinking* y extrajimos proteínas totales. Inmunoprecipitamos los complejos del extracto utilizando bolitas magnéticas acopladas a proteína G (DynaBeads) y anticuerpo anti HA. Luego, eluímos los inmunocomplejos y los analizamos mediante Western blot revelando con anticuerpo anti cMyc. Siempre se realizó en paralelo el mismo protocolo utilizando células que no expresan la proteína de fusión a HA como control de especificidad.

Como punto de partida decidimos analizar si ocurría alguna interacción entre Dal81 y Uga3. Para ello, utilizamos la cepa MPY07 (*Mata ura3 6HA-UGA3-9cMYC-DAL81*) previamente desarrollada en nuestro grupo de trabajo (Palavecino-Ruiz, et al. 2017) y la cepa SAMY09 (*Mata ura3 LOXP- 9cMyc DAL81*) como control de especificidad. Como mencionamos anteriormente, Uga3 y Dal81 actúan en conjunto en la inducción por GABA de los genes *UGA*. Por lo tanto, crecimos células de cada cepa hasta fase exponencial y tratamos la mitad de cada cultivo con GABA. Extrajimos proteínas totales y luego inmunoprecipitamos con DynaBeads y anticuerpo anti HA.

Como se observa en la Figura 21A, luego de la inmunoprecipitación de Dal81 se detecta a Uga3 tanto en células pre-incubadas con GABA como en células no tratadas. Es decir que

ambos factores se encuentran asociados físicamente aún en ausencia de inductor. Este resultado resulta muy llamativo ya que como hemos mostrado, ambos factores actúan de manera independiente sobre otros genes.

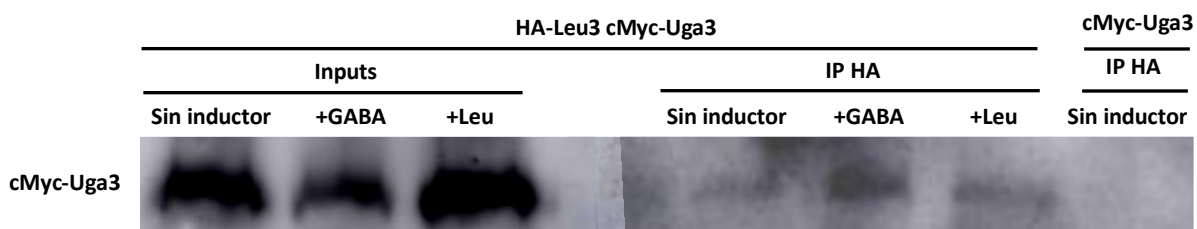


**Figura 21. Interacción entre los factores de transcripción Dal81 y Uga3.** (A) Se cosecharon células *9cMYC-DAL81 6HA-UGA3* (MPY07) o *9cMYC-DAL81* (SAMY09) provenientes de cultivos en medio mínimo con prolina 10 mM (DO = 0,1). Se incubaron o no con GABA 0,1mM durante una hora. (B) Se cosecharon células *UGA4::UAS<sub>GABA</sub>Δ 9cMYC-Uga3* (SAMY07) y *6HA-DAL81 UGA4::UAS<sub>GABA</sub>Δ 9cMYC-UGA3* (SAMY08) provenientes de cultivos en medio mínimo con prolina 10 mM (DO = 0,1). Se incubaron o no con leucina 1,3mM o GABA 0,1mM durante una hora. A continuación, se realizó la lisis celular y extracción de proteínas. Luego se inmunoprecipitaron los complejos con anticuerpo anti HA y se analizaron mediante Western blot revelando con anticuerpo anti cMyc. Inputs: extracto de proteínas totales. IP HA: Inmunoprecipitados con DynaBeads y anticuerpo anti HA. A fines simplificados, de todos los controles de especificidad realizados con la cepa con sólo la etiqueta cMyc, sólo se muestra el de la condición sin inductor.

Para analizar si la asociación que detectamos entre Uga3 y Dal81 (Figura 1A) estaba ocurriendo por estar ambos unidos a la misma región del ADN. Decidimos hacer un ensayo similar, pero en una cepa que carece de la secuencia de unión al ADN de estos factores. Para ello utilizamos las cepas SAMY07 (*UGA4::UAS<sub>GABA</sub>Δ 9cMyc-Uga3*) y SAMY08 (*6HA-DAL81 UGA4::UAS<sub>GABA</sub>Δ 9cMYC-UGA3*). Previamente utilizando las cepas SBCY30 y SBCY36, parentales de las cepas SAMY07 y SAMY08 respectivamente, que carecen del elemento *UAS<sub>GABA</sub>* en el promotor de *UGA4*, se había demostrado que ni Dal81 ni Uga3 se pueden unir a este promotor en ausencia del elemento *UAS<sub>GABA</sub>* (Cardillo, et al. 2010). La cepa SAMY07 se utilizó como un control de especificidad y las células de la cepa SAMY08 se trataron con GABA y con leucina. Como observamos en la Figura 21B, Uga3 co-

inmunoprecipita con Dal81 en las tres condiciones ensayadas (con el inductor GABA, con el inductor leucina y sin inductor). Es decir que la interacción entre estos dos factores de transcripción ocurre antes del agregado del inductor y de manera independiente de su unión al ADN blanco.

Por otro lado, en el Capítulo I mostramos que Uga3 regula positivamente la expresión de *BAP2* interactuando con su promotor. Además, la expresión de *BAP2* es inducible por leucina y depende del factor de transcripción Leu3 (Nielsen, et al. 2001) y ambos factores reconocen las mismas secuencias consenso de unión al DNA (Noel and Turcotte 1998). Por todo esto decidimos analizar la posible interacción entre Uga3 y Leu3. Para ello, utilizamos las cepas SAMY03 (*LOXP-9cMyc-UGA3*) y SAMY10 (*6HA-LEU3 LOXP-9cMyc-UGA3*). La cepa SAMY03 se utilizó como control de especificidad. Las células se trataron o no con leucina y con GABA. Como observamos en la Figura 22, luego de inmunoprecipitar a Leu3, detectamos a Uga3 en las tres condiciones.



**Figura 22. Interacciones entre factores de transcripción Uga3 y Leu3.** Se cosecharon células *LOXP-9cMYC-UGA3* (SAMY03) y *6HA-LEU3 LOXP-9cMYC-UGA3* (SAMY10) provenientes de cultivos en medio mínimo con prolina 10 mM (DO = 0,1). Se incubaron o no con leucina 1,3mM o GABA 0,1mM durante una hora. A continuación, se realizó la lisis celular y extracción de proteínas. Luego se inmunoprecipitaron los complejos con anticuerpo anti HA y se analizaron mediante Western blot revelando con anticuerpo anti c-Myc. Inputs: extracto de proteínas totales. IP HA: Inmunoprecipitados con DynaBeads y anticuerpo anti HA. A fines simplificados, de todos los controles de especificidad realizados con la cepa con sólo la etiqueta cMyc, sólo se presenta el de la condición sin inductor.

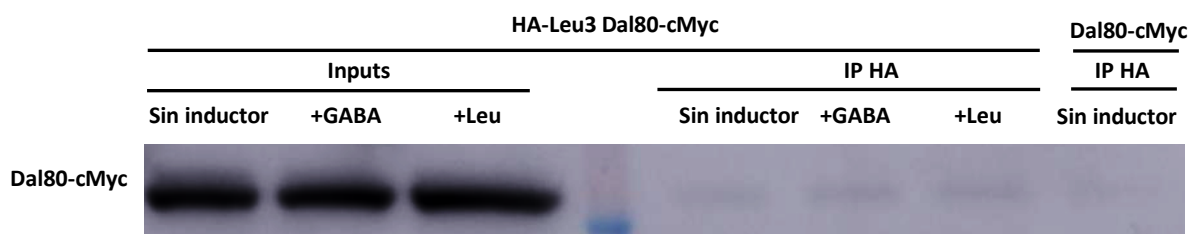
Como mostramos al comienzo, construimos las cepas necesarias para analizar si existen interacciones entre Dal81 y otros factores de transcripción, pero hasta el momento por diversos motivos relacionados a la técnica utilizada, no pudimos detectarlas.

Para estudiar la posible interacción entre Dal81 y Dal82 (regulador positivo de los genes inducibles por alofanato) propuesta previamente por Scott y colaboradores (Scott, et al. 2000), preparamos las cepas SAMY01 (*6HA-DAL81 LoxP-9cMYC-DAL82*) y SAMY02 (*LoxP-*

9cMYC-DAL82). Las células se trataron o no con el análogo oxalurato, un inductor gratuito específico de los genes de vía de la alantoína regulados por Dal82 (Cooper, et al. 1979). Lamentablemente, nunca pudimos detectar la presencia de cMyc-Dal82 mediante *western blot* de extractos de proteínas totales. Esto posiblemente se deba a la poca expresión de Dal82 ya que la selección y el screening de estas cepas habían sido exitosos. Por este motivo, no pudimos evaluar la interacción entre Dal81 y Dal82.

El mismo inconveniente ocurrió con la detección de cMYC-Stp1 y cMYC-Stp2 de extractos de proteínas totales de células de las cepas SAMY04, SAMY12 y SAMY13. Por lo tanto, tampoco se logró analizar las interacciones entre Dal81 y Stp1 o Dal81 y Stp2.

Dal80 depende de Leu3 para interactuar con sus secuencias blanco y este mecanismo es responsable de la expresión basal de *UGA4* (Palavecino-Ruiz, et al. 2017). Por este motivo, también estudiamos las posibles interacciones entre Leu3 y Dal80. Para ello, utilizamos la cepa SAMY06 (*6HA-LEU3 DAL80-13cMYC-KanMx6*) y la cepa SAMY11 (*DAL80-13cMYC-KanMx6*), como control de especificidad.



**Figura 23. Interacciones entre factores de transcripción Dal80 y Leu3.** Se cosecharon células *DAL80-13cMyc* (SAMY11) y *6HA-LEU3 DAL80-13cMyc* (SAMY06) provenientes de cultivos en medio mínimo con prolina 10 mM (DO = 0,1). Se incubaron o no con leucina 1,3mM o GABA 0,1mM durante una hora. A continuación, se realizó la lisis celular y extracción de proteínas. Luego se inmunoprecipitaron los complejos con anticuerpo anti HA y se analizaron mediante Western blot revelando con anticuerpo anti c-Myc. Inputs: extracto de proteínas totales. IP HA: Inmunoprecipitados con DynaBeads y anticuerpo anti HA. A fines simplificados, de todos los controles de especificidad realizados con la cepa con sólo la etiqueta cMyc, sólo se presenta el de la condición sin inductor.

En la Figura 23 se pueden apreciar bandas tenues que parecen indicar cierta interacción entre ambos factores. Sin embargo, también se observa una banda, aunque más tenue aún, en la calle del control de especificidad. Es decir que cMyc-Dal80 inmunoprecipita de

forma inespecífica en nuestro sistema. Por lo tanto, no podemos afirmar ni descartar una interacción entre Dal80 y Leu3.

### **Discusión**

El objetivo de este capítulo fue realizar una búsqueda de nuevos factores de transcripción que interactúen con Dal81 y con Uga3, como así también estudiar en qué condiciones ocurren estas interacciones. Hallar factores hasta ahora no descriptos que interactuaran con Uga3 o Dal81 nos llevaría a encontrar nuevos genes o vías regulados por estos factores. A su vez, estos genes también podrían estar regulados de manera de expresarse de forma concertada con los de la utilización del GABA, la leucina y la alantoína. Este objetivo no pudo cumplirse ya que con la metodología utilizada no logramos detectar proteínas nuevas, ni tampoco las esperadas. Por este motivo, nos propusimos estudiar interacciones de Uga3 y Dal81 con factores de transcripción que ya habían sido propuestos como posibles interactores. El abordaje que decidimos utilizar para ese estudio, fue el de co-inmunoprecipitar los complejos formados, lo que suscitó en la necesidad de construir cepas que nos con etiquetas en esos factores de transcripción. Utilizando los desarrollos de Gauss y Longtine (Gauss, et al. 2005; Longtine, et al. 1998), construimos 14 cepas nuevas para llevar a cabo dichos estudios.

En este trabajo demostramos que la interacción entre Dal81 y Uga3 detectada en presencia de GABA no desaparece al agregar leucina y, llamativamente, que esta interacción también ocurre en ausencia de GABA.

Uga3 y Dal81 son necesarios para la inducción por GABA de los genes *UGA*. Es más, Uga3 y Dal81 interactúan *in vivo* con los promotores de los genes *UGA* solamente en presencia de GABA y, además, sólo se detecta esta interacción si se expresan ambos factores (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2011; Cardillo, et al. 2012). Por este motivo, esperábamos detectar la interacción por co-inmunoprecipitación en las células tratadas con GABA, pero no en las células sin tratar.

Además de participar en el proceso de inducción de los genes *UGA*, el factor Dal81 participa en otros procesos de inducción de genes blanco de la señal disparada por el sensor SPS (Abdel-Sater, et al. 2004b; Boban and Ljungdahl 2007) en respuesta a la

presencia de diferentes aminoácidos, entre ellos, leucina. El agregado de alguno de estos aminoácidos inhibe la inducción de *UGA4* (Cardillo, et al. 2011). Por otra parte, en ausencia de los factores de transcripción Stp1 y Stp2, así como de cualquiera de los componentes del sistema SPS, el efecto negativo de la leucina sobre el gen *UGA4* disminuye (Palavecino, et al. 2015a). El efecto inhibitorio de la leucina sobre la inducción de *UGA4* no se produce en células que sobreexpresan Dal81 (Cardillo, et al. 2011). Esto sugiere que el efecto de la leucina podría deberse a una menor disponibilidad del factor Dal81 para que ocurra la inducción por GABA de este gen. Por todo esto, esperábamos que al pre-incubar las células con leucina, disminuyera la interacción entre Dal81 y Uga3. Sin embargo, no detectamos cambios en esa interacción.

Por otro lado, sabemos que Leu3 regula negativamente a *UGA4*, aunque no se conoce aún el mecanismo molecular de esta regulación (Palavecino-Ruiz, et al. 2017). Además, como vimos en el Capítulo I, la ausencia de este factor de transcripción impide llegar a los niveles máximos de inducción de *BAP2*. Por otra parte, sabemos que Uga3 es esencial para la inducción por leucina de *BAP2* (Capítulo I) y por GABA de *UGA4* (Cardillo, et al. 2012). Nuestros estudios de co-inmunoprecipitación mostraron cierto grado de interacción entre estos dos factores de transcripción, tanto antes como después de la incubación con los inductores GABA y leucina. Uga3 y Leu3, así como también Dal81, son factores de transcripción tipo III. Es decir que contienen dominios de unión al ADN formados por seis residuos de cisteína (C<sub>6</sub>) unidos a dos átomos de zinc, por lo que se llaman *clusters* binucleados de zinc. Estas proteínas con *clusters* de zinc reconocen elementos relacionados que contienen secuencias de tres nucleótidos en forma simple o repetida y en forma simétrica o asimétrica. Estos tripletes generalmente son CGG, aunque se han reportado variantes. Las proteínas con *clusters* de zinc pueden unirse como monómeros, como homodímeros o como heterodímeros a tripletes CGG orientados en repeticiones directas, invertidas o evertidas (MacPherson, et al. 2006). Estas características sugerían una posible interacción entre Leu3 y Uga3. Cuando Uga3 se une al promotor de *UGA4*, activa su transcripción (Cardillo, et al. 2012) mientras que, en estas condiciones, Leu3, que no se ha detectado unido a *UGA4*, tiene un efecto negativo sobre su transcripción. Si Uga3 interactúa tanto con Dal81 como con Leu3, podría ocurrir que, al agregar leucina, se favorezca la unión de los dímeros Uga3-Leu3 a *BAP2* y Dal81-Stp1 a *AGP1*. Esto llevaría a que, aún en presencia de GABA, haya menos proteínas Uga3 y Dal81 formando el heterodímero Uga3-Dal81, lo que lleva a que la inducción de los

genes *UGA* sea menor. Entonces, la expresión de cada gen dependería del balance entre las cantidades de cada tipo de heterodímero. En la mutante deficiente en *LEU3*, la expresión de *UGA4* es significativamente más elevada que en la *wild type*. Esto podría explicarse por una mayor cantidad del heterodímero Uga3-Dal81 que activa a los genes *UGA*, ante la imposibilidad de que se forme el dímero Uga3-Leu3.

Estos resultados nos permitieron avanzar un poco más en el conocimiento de los mecanismos moleculares que determinan el orden en el cual expresan los genes responsables del uso de fuentes pobres de nitrógeno.



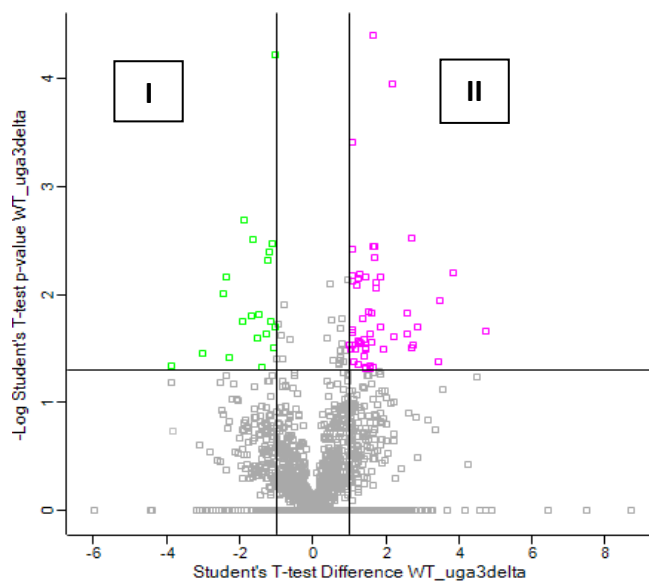
## **CAPÍTULO III**

**Búsqueda de nuevos procesos regulados por Uga3 y Dal81**

Para hacer un análisis más global acerca del impacto de Uga3 y Dal81 sobre la expresión, decidimos comparar la expresión proteica en células deficientes en estos factores de transcripción con respecto a la expresión en células *wild type*. Con este objetivo realizamos un análisis de proteomas en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM).

Para ello, analizamos cultivos independientes de las cepas *wild type*, *dal81Δ* y *uga3Δ* mediante espectrometría de masas con tecnología Orbitrap (QExactive acoplado a nano-HPLC - ThermoScientific). Los espectros de masa obtenidos para cada muestra fueron analizados con el software Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific™), comparando contra el proteoma de *S. cerevisiae* cepa ATCC 204508 S288c. En esta comparación, se analizan los péptidos totales detectados y se identifican las proteínas presentes en las muestras. Luego, para cada proteína identificada en base a péptidos detectados con confianza alta y con patrones de fragmentación confiables, se realizó una cuantificación basada en el cálculo de áreas, utilizando los algoritmos del programa Proteome Discoverer. Las áreas de cada proteína identificada se normalizaron manualmente y los resultados se compararon utilizando el programa Perseus versión 1.5.8.5. (Tyanova, et al. 2016).

En primer lugar, analizamos los cambios en la expresión proteica que se generan cuando las células carecen de Uga3. Analizando entonces los perfiles proteómicos de células deficientes en *UGA3* y células *wild type* detectamos la presencia de 1750 proteínas con péptidos de confianza alta y con patrones de fragmentación confiables. Al comparar las áreas normalizadas, determinamos la expresión diferencial de 67 proteínas ( $p < 0,05$ ) (Figura 24). Entre las proteínas con expresión significativamente diferente entre las muestras de células *uga3Δ* y *wild type*, 17 estaban sobre-representadas en la mutante (cuadrante I), mientras que 50 estaban sub-representadas (cuadrante II).



**Figura 24. Expresión relativa de proteínas en la cepa *uga3Δ* respecto de la *wild type*, utilizando prolina como fuente de nitrógeno.** Volcano Plot obtenido de la comparación estadística de las áreas normalizadas de cada proteína en la cepa *wild type* vs *uga3Δ*. Los puntos ubicados en los cuadrantes I y II representan proteínas presentes en ambas cepas, pero con un cambio relativo *wild type* vs *uga3Δ* de por lo menos 2 ( $p < 0,05$ ).

Realizamos una búsqueda bibliográfica manual para establecer la identidad y función de cada una de estas 67 proteínas. La información se resume en las tablas 8 y 9.

**Tabla 8. Resultados del análisis comparativo de proteomas. Proteínas sub-representadas en la mutante *uga3Δ*.**

	IDs	Nombre standard	Descripción
1.	P40319	ELO3	Fatty acid elongase involved in very long-chain fatty acid biosynthesis, sphingolipid biosynthesis and late endosome to vacuole transport via the multivesicular body sorting pathway; localizes to the endoplasmic reticulum
2.	Q12213	RPL7B	Subunit of the cytosolic large ribosomal subunit; involved in maturation of the large subunit rRNA, biogenesis of the ribosomal large subunit, and translation
3.	Q12680	GLT1	Glutamate synthase [NADH]; oxidoreductase activity, cellular amino acid metabolic process
4.	Q03102		Uncharacterized membrane protein YML131W; UNKNOWN
5.	P09436	ILS1	Cytosolic isoleucyl-tRNA synthetase that catalyzes isoleucyl-tRNA aminoacylation through the coupling of isoleucine to isoleucyl-tRNA

6.	P06105	SCP160	mRNA binding protein involved in mRNA localization, chromatin silencing at silent mating type cassette and telomere, chromosome segregation and pheromone dependent signal transduction; localizes to cytoplasm, endoplasmic reticulum membrane and polysome
7.	Q04301	VBA1	Vacuolar basic amino acid transporter
8.	Q04951	SCW10	endomembrane system, hydrolase activity, hydrolase activity, acting on glycosyl bonds, conjugation
9.	P39676	YHB1	Flavoheмоprotein; oxidoreductase activity, response to chemical, response to oxidative stress
10.	Q12068	GRE2	Genes de Respuesta a Estres NADPH-dependent methylglyoxal reductase; oxidoreductase activity, lipid metabolic process
11.	P40086	COX15	Cytochrome c oxidase assembly protein; membrane, mitochondrial envelope, oxidoreductase activity, cofactor metabolic process
12.	P32558	SPT16	Subunit of the FACT, the primosome and the replication fork protection complexes; binds to histones and nucleosomes; involved in regulation of transcription, DNA replication and DNA replication independent nucleosome organization
13.	Q03246	MRPS17	Component of the small subunit of the mitochondrial ribosome, which mediates translation in the mitochondrion
14.	P33201	MRT4	Ribosome assembly factor RNA binding, rRNA binding, RNA catabolic process, organelle assembly, rRNA processing, ribosomal large subunit biogenesis, ribosome assembly
15.	P15625	FRS2	ligase activity, cellular amino acid metabolic process, tRNA aminoacylation for protein translation
16.	P30665	MCM4	Component of the MCM mini-chromosome maintenance complex
17.	P52893	ALT1	Probable alanine aminotransferase, mitochondrial
18.	P32500	NDC1	Structural component of the nuclear pore complex;
19.	P19145	GAP1	General amino-acid permease Transmembrane amino acid transporter of broad specificity, involved in uptake of extracellular amino acids; integral to plasma membrane
20.	P31539	HSP104	Heat shock protein 104 Adenosine-binding protein chaperone involved protein folding, unfolding and refolding, cellular heat acclimation, and the inheritance of oxidatively modified proteins during replicative cell aging
21.	Q06685	VIP1	Bifunctional cytosolic inositol hexakisphosphate kinase involved in inositol phosphate biosynthesis and inositol pyrophosphate (PP-IP) dephosphorylation of IP7
22.	P39730	FUN12	Eukaryotic translation initiation factor 5B Protein and ribosome binding GTPase involved in the formation of the cytoplasmic translation initiation complex and maturation of SSU-rRNA; involved in regulation of translational initiation; localizes to the cytosolic small ribosomal subunit and eukaryotic 48S pre initiation complex
23.	P15365	DAL5	Allantoate permease An allantoate transmembrane and dipeptide transporter; localizes to plasma membrane

24.	P16521	YEF3	Translation elongation factor and ATPase involved in translational elongation and termination
25.	P32861	UGP1	Uridylyltransferase activity involved in biosynthesis of beta-glucans, glycogen, and trehalose
26.	P36775	PIM1	ATPase activity, hydrolase activity, peptidase activity, protein complex biogenesis, proteolysis involved in cellular protein catabolic process
27.	P53912		Uncharacterized protein YNL134C oxidoreductase activity
28.	Q12159	YRA1	RNA-binding protein and ATP-dependent RNA helicase inhibitor; involved in mRNA export from the nucleus and transcription-coupled nucleotide-excision repair
29.	P35184	SQT1	Protein chaperone involved in biogenesis and assembly of the large ribosomal subunit
30.	P07702	LYS2	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase involved in lysine biosynthesis
31.	P53297	PBP1	mRNA binding protein; functions as a negative regulator of mRNA polyadenylation, and as a positive regulator of HO translation; involved in stress granule assembly and the maintenance of rDNA
32.	P39935	TIF4631	Translation initiation factor involved in translational initiation, stress granule assembly, and ribosomal large subunit biogenesis
33.	P53235		YGR054W RNA binding, mRNA binding, translation factor activity, RNA binding, translational initiation
34.	Q03940	RVB1	ATP dependent DNA helicase subunit of the nuclear Ino80 complex involved in chromatin remodeling, snoRNP assembly and regulation of transcription from RNA Pol II
35.	P47075	VTC4	Calmodulin- and inositol hexakisphosphate-binding polyphosphate kinase involved in vacuolar transport, vacuole fusion, microautophagy and polyphosphate biosynthesis; localizes to endoplasmic reticulum and vacuolar membranes
36.	P35723	YET1	Protein whose biological role is unknown; localizes to the endoplasmic reticulum
37.	P36122	BCH2	endomembrane system, molecular function, Golgi vesicle transport, carbohydrate metabolic process, cell wall organization or biogenesis
38.	P40482	SEC24	endomembrane system, membrane, Golgi vesicle transport, protein complex biogenesis, vesicle organization
39.	P22147	XRN1	Chromatin-binding 5'->3' exoribonuclease that activates transcription initiation and elongation by RNA polymerase II; involved in nuclear mRNA catabolism and decay of nonfunctional rRNAs; role in processing of both rRNA and snoRNA; negative regulator of autophagy; localizes to the nucleus, cytoplasmic stress granules and mRNA P-bodies
40.	P33327	GDH2	NAD-specific glutamate dehydrogenase Mitochondrial glutamate dehydrogenase involved in nitrogen metabolism
41.	Q03640	TCB3	cell cortex, cellular bud, endomembrane system, lipid binding, lipid metabolic process

42.	P01123	YPT1	SNARE-binding GTPase involved in vesicle budding and docking, vesicle-mediated transport, endocytic recycling, macroautophagy, SNARE complex disassembly, and pre-mRNA catabolism; localizes to Golgi and ER membranes, pre-autophagosomal structures, and cytoplasmic vesicles
43.	Q12743	DFM1	endomembrane system, membrane, molecular function, proteolysis involved in cellular protein catabolic process, response to chemical, signaling
44.	Q03690	CLU1	Cytoplasmic RNA-binding protein of unknown biological role; localizes to stress granules
45.	P32379	PUP2	Subunit of 20S proteasome essential to pre-messenger RNA (mRNA) splicing; contributes to formation of catalytic spliceosome for second transesterification step
46.	P40991	NOP2	Ribosomal RNA (rRNA) (cytosine-C5-)-methyltransferase; contributes to the maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA), rRNA base methylation, and 66S preribosome assembly
47.	P54860	UFD2	Ubiquitin-ubiquitin ligase involved in the ubiquitin-dependent ERAD pathway for protein catabolism
48.	P22146	GAS1	1,3-beta-glucanosyltransferase, catalyzes splitting and linking of (1->3)-beta-D-glucan molecules that leads to elongation of (1->3)-beta-D-glucan chains; involved in cell wall organization
49.	P38069	MNN2	endomembrane system, transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups, carbohydrate metabolic process, protein glycosylation
50.	P38689	PRS3	Subunit of a PRPP synthetase complex, which synthesizes 5-phosphoribose 1-diphosphate and is important for cell wall integrity

**Tabla 9. Resultados del análisis comparativo de proteomas. Proteínas sobre-representadas en la mutante *uga3Δ*.**

	IDS	Nombre standard	Descripción
1.	P51996	YPT32	Endomembrane system, membrane, mitochondrial envelope, GTPase activity, hydrolase activity, Golgi vesicle transport, endosomal transport, exocytosis
2.	P25694	CDC48	ATPase, a component of several multiprotein ATPase complexes involved in the release of polyubiquitinated proteins; part of the ER-associated ubiquitin-dependent protein degradation system, stress-induced homeostatically regulated protein degradation (SHRED) pathway
3.	P32599	SAC6	Actin filament binding protein involved in actin filament organization and formin-nucleated actin cable assembly
4.	P34237	COY1	Protein whose molecular function is unknown; involved in vesicular transport within Golgi; localizes to the Golgi membrane
5.	P32939	YPT7	GTPase involved in vacuole inheritance, regulation of non-autophagic vacuole fusion, retrograde (endosome to Golgi) transport, endocytosis, and the CVT pathway; also involved in macroautophagy and piecemeal microautophagy of the nucleus

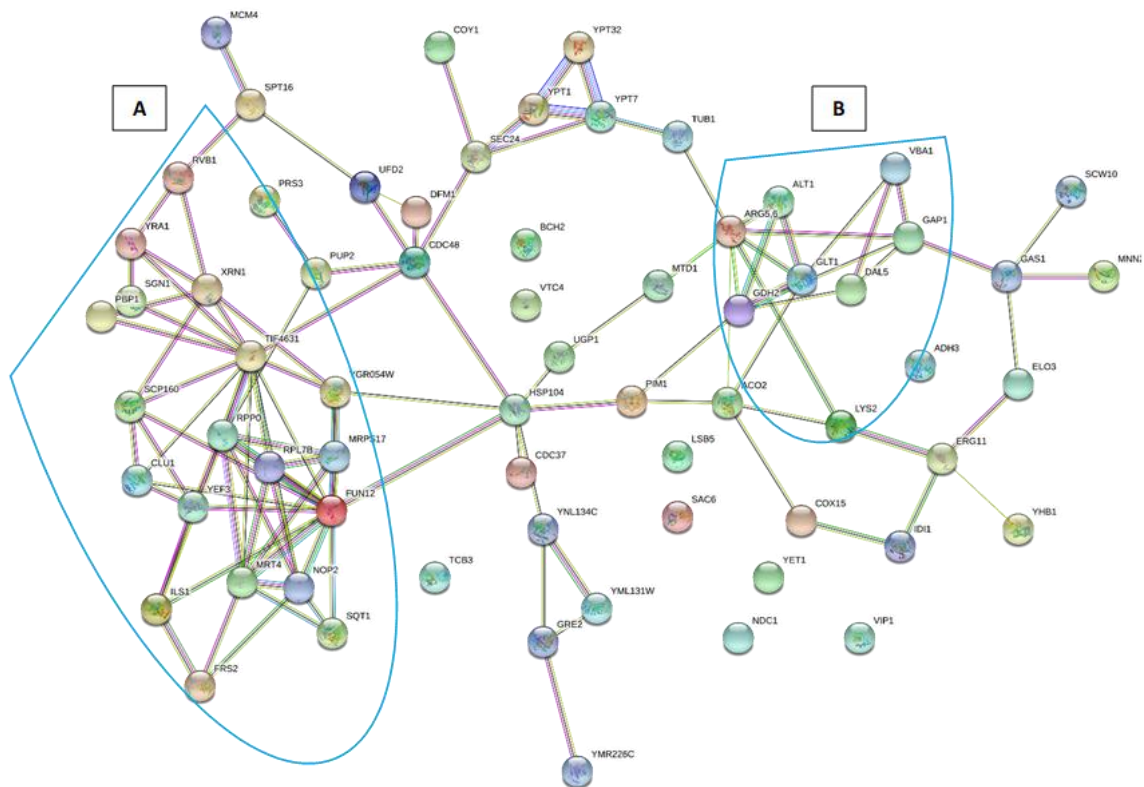
6.	P10614	ERG11	Lanosterol 14-alpha-demethylase; catalyzes the demethylation of lanosterol during the biosynthesis of ergosterol; localizes to the endoplasmic reticulum
7.	P39533	ACO2	Putative mitochondrial aconitase isozyme; similarity to Aco1p, an aconitase required for the TCA cycle
8.	P09733	TUB1	Tubulin complex subunit; involved in homologous chromosome segregation, mitotic sister chromatid segregation, and microtubule-mediated transport of the nucleus
9.	Q01217	ARG5,6	Acetylglutamate kinase and N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase involved in arginine, ornithine biosynthesis and regulation of transcription; localized to the mitochondrial matrix
10.	P07246	ADH3	Mitochondrial NAD-dependent alcohol dehydrogenase involved in NADH oxidation
11.	P06101	CDC37	Essential Hsp90p co-chaperone; necessary for passage through the START phase of the cell cycle; stabilizes protein kinase nascent chains and participates along with Hsp90p in their folding
12.	P25369	LSB5	Protein involved in membrane-trafficking events at plasma membrane
13.	P05317	RPP0	Large ribosomal subunit rRNA-binding constituent of the cytosolic large ribosomal subunit; involved in assembly of the large ribosomal subunit and translation
14.	P15496	IDI1	Isomerase activity, lipid metabolic process
15.	Q05016		YMR226C NADP(+)-dependent serine dehydrogenase and carbonyl reductase; acts on serine, L-allo-threonine, and other 3-hydroxy acids
16.	Q02046	MTD1	NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase; plays a catalytic role in oxidation of cytoplasmic one-carbon units
17.	P40561	SGN1	Cytoplasmic RNA-binding protein; contains an RNA recognition motif (RRM); may have a role in mRNA translation

Como se desprende de la observación de las tablas, la ausencia de Uga3 genera cambios en la expresión de proteínas con una importante diversidad de funciones. Utilizando también el software PANTHER *classification system* (Mi, et al. 2017) pudimos establecer que 20 de las 67 proteínas expresadas diferencialmente se agrupan en la categoría de procesos metabólicos de compuestos nitrogenados. De estas proteínas, se destacan 8 cuya función se asocia muy directamente al metabolismo de aminoácidos. Estas proteínas son Vba1 (transportador vacuolar de aminoácidos básicos), Gap1 (permeasa general de aminoácidos) y Dal5 (permeasa de alantoato), Glt1 (glutamato sintasa), Alt1 (alanina aminotransferasa), Lys2 (L-2-aminodipato reductasa), Gdh2 (glutamato deshidrogenasa específica de NAD) y Arg5,6 (N-acetilglutamato quinasa y N-acetil-gama-glutamyl-fosfato reductasa). De estas 8 proteínas, solo Arg5,6 aumenta en la mutante deficiente en Uga3 mientras que la cantidad de las otras 7 es menor.

Para profundizar en la comprensión del perfil funcional de las 67 proteínas que se expresaron diferencialmente en la mutante *uga3Δ* respecto de la *wild type*, utilizamos también la plataforma STRING (Szklarczyk, et al. 2019).

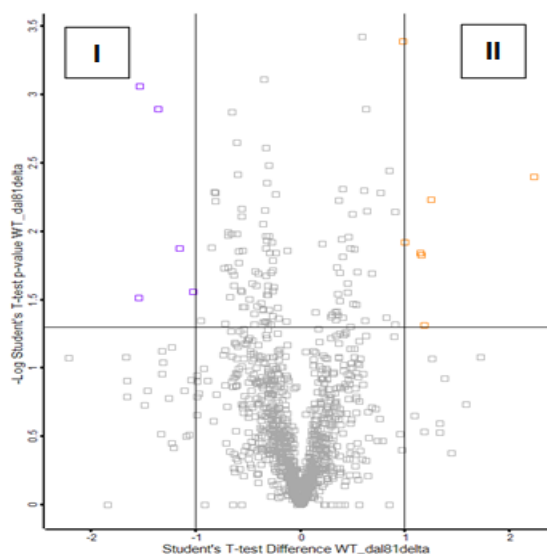
STRING es un algoritmo que apunta a generar redes globales comprensibles y objetivas que clasifiquen y agrupen proteínas mediante las interacciones directas (físicas) o indirectas (funcionales) que existen entre ellas, utilizando sistemas de clasificación como *Gene Ontology*, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes And Genomes*) y otros datos provenientes de *textmining*, bases de datos de interacciones proteína-proteína, co-expresión, *neighborhood*, fusión de genes y co-ocurrencia. Mediante este análisis detectamos asociaciones funcionales entre 61 proteínas con significancia estadística ya que la cantidad de interacciones es mayor que la predicha para un set al azar de 67 proteínas (Figura 25); esto significa que 61, de las 67 proteínas, están relacionadas biológicamente. En la red observamos dos agrupamientos de proteínas, indicados como A y B (Figura 25). Las proteínas del agrupamiento A son proteínas de unión a RNA y ribonucleoproteínas. En B aparecen claramente agrupadas las 8 proteínas que ya habíamos identificado que participan del metabolismo (Arg5,6, Lys2, Glt1, Gdh2 y Lys2) y transporte de aminoácidos (Vba1, Gap1 y Dal5).





**Figura 25. Red de interacciones entre las proteínas expresadas diferencialmente entre células *wild type* y *uga3Δ*.** A: Agrupamiento de ribonucleoproteínas, B: Agrupamiento de proteínas que participan en el metabolismo de fuentes de nitrógeno y permeasas de aminoácidos. Las redes de interacción entre proteínas se obtienen mediante la plataforma web STRING (<https://string-db.org/>).

Realizamos un estudio similar al anterior, ahora comparando la expresión proteica en células *wild type* con las células deficientes en el factor de transcripción Dal81. En este estudio se detectó la presencia de 1239 proteínas con péptidos de confianza alta y con patrones de fragmentación confiable. En este caso, la cantidad de proteínas expresadas diferencialmente con respecto a la *wild type* fue mucho menor que en el caso de la mutante *uga3Δ*. La ausencia de Dal81 produjo un aumento de la cantidad de 5 proteínas (cuadrante I) y una disminución de 7 (cuadrante II) (Figura 26). En las Tablas 10 y 11 se enumeran estas proteínas con expresión diferencial y sus funciones.



**Figura 26. Expresión relativa de proteínas en la cepa *dal81Δ* respecto de la *wild type*, utilizando prolina como fuente de nitrógeno.** Volcano Plot obtenido de la comparación estadística de las áreas normalizadas de cada proteína en la cepa *wild type* vs *dal81Δ*. Los puntos ubicados en los cuadrantes I y II representan proteínas presentes en ambas cepas, pero con un cambio relativo *wild type* vs *dal81Δ* de por lo menos 2 ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 10. Resultados del análisis comparativo de proteomas. Proteínas sub-representadas en la mutante *dal81Δ*.**

	MAPPED ID	Standard name	Description
1.	P33327	GDH2	NAD(+)-dependent glutamate dehydrogenase; degrades glutamate to ammonia and alpha-ketoglutarate; expression sensitive to nitrogen catabolite repression and intracellular ammonia levels; genetically interacts with GDH3 by suppressing stress-induced apoptosis
2.	P00410	COX2	Subunit II of cytochrome c oxidase (Complex IV); Complex IV is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain; one of three mitochondrially-encoded subunits
3.	P43574	GAT1	Transcriptional activator of nitrogen catabolite repression genes; contains a GATA-1-type zinc finger DNA-binding motif; activity and localization regulated by nitrogen limitation and Ure2p; GAT1 encodes a transcriptional activator that is involved in the positive regulation of genes subject to nitrogen catabolite repression (NCR)
4.	P32621	GDA1	Guanosine diphosphatase located in the Golgi; involved in the transport of GDP-mannose into the Golgi lumen, converting GDP to GMP after mannose is transferred to substrates; null mutants are defective in sporulation and pre-meiotic S phase entry.

5.	Q05567	DPL1	Dihydrosphingosine phosphate lyase; regulates intracellular levels of sphingolipid long-chain base phosphates (LCBPs), degrades phosphorylated long chain bases, prefers C16 dihydrosphingosine-1-phosphate as a substrate
6.	P38821	APE4	Cytoplasmic aspartyl aminopeptidase with possible vacuole function; Cvt pathway cargo protein; cleaves unblocked N-terminal acidic amino acids from peptide substrates; forms a 12-subunit homo-oligomer; M18 metalloprotease family
7.	P17649	UGA1	Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase; also known as 4-aminobutyrate aminotransferase; involved in the 4-aminobutyrate and glutamate degradation pathways

**Tabla 11. Resultados del análisis comparativo de proteomas. Proteínas sobre-representadas en la mutante *dal81Δ*.**

	MAPPED IDS	Standard name	Description
1.	P14120	RPL30	Ribosomal Protein of the Large subunitRibosomal 60S subunit protein L30; involved in pre-rRNA processing in the nucleolus; autoregulates splicing of its transcript; homologous to mammalian ribosomal protein L30, no bacterial homolog
2.	P54780	RPL15B	Ribosomal 60S subunit protein L15B; binds to 5.8 S rRNA; homologous to mammalian ribosomal protein L15, no bacterial homolog; RPL15B has a paralog, RPL15A, that arose from the whole genome duplication; relocalizes from nucleus to nucleolus upon DNA replication stress.
3.	P32459	DAL3	Ureidoglycolate lyase; converts ureidoglycolate to glyoxylate and urea in the third step of allantoin degradation; expression is sensitive to nitrogen catabolite repression.
4.	P13856	RSR1	Ras-type GTPase; required for bud site selection during both axial and bipolar budding, for morphological changes in response to mating pheromone, and for efficient cell fusion; recruits Cdc24p to the incipient bud site, activating its guanyl-nucleotide exchange factor activity and the Rho-like GTPase.
5.	P00447	SOD2	Mitochondrial manganese superoxide dismutase; protects cells against oxygen toxicity and oxidative stress; human mitochondrial SOD2 can complement a yeast null mutant and human cytoplasmic SOD1 can also complement when targeted to the mitochondrial matrix

Como se desprende del análisis de las tablas 10 y 11, de las 12 proteínas que modifican su expresión en esta mutante, 4 están relacionadas con el metabolismo de aminoácidos: Gdh2 (glutamato deshidrogenasa específica de NAD), Uga1 (GABA aminotransferasa), Gat1 (factor de transcripción de la familia GATA que participa en la regulación por nitrógeno) y Dal3 (ureidoglicolato hidrolasa). Sólo esta última se encuentra sobre-representada en el proteoma de la mutante respecto a la *wild type*, mientras que las otras 3, están sub-representadas.

En este caso, mediante el uso del algoritmo STRING, no pudimos detectar asociaciones funcionales con significancia estadística entre las proteínas de expresión diferencial, ya que la cantidad de interacciones era menor a la predicha para un set al azar de 12 proteínas; aunque no podemos descartar que sea porque no están relacionadas biológicamente, esto probablemente se deba a que estas 12 proteínas representan un conjunto demasiado pequeño para este análisis.

Llamativamente, la única proteína común representada diferencialmente en el proteoma de ambas mutantes en comparación con el de la *wild type* es Gdh2.

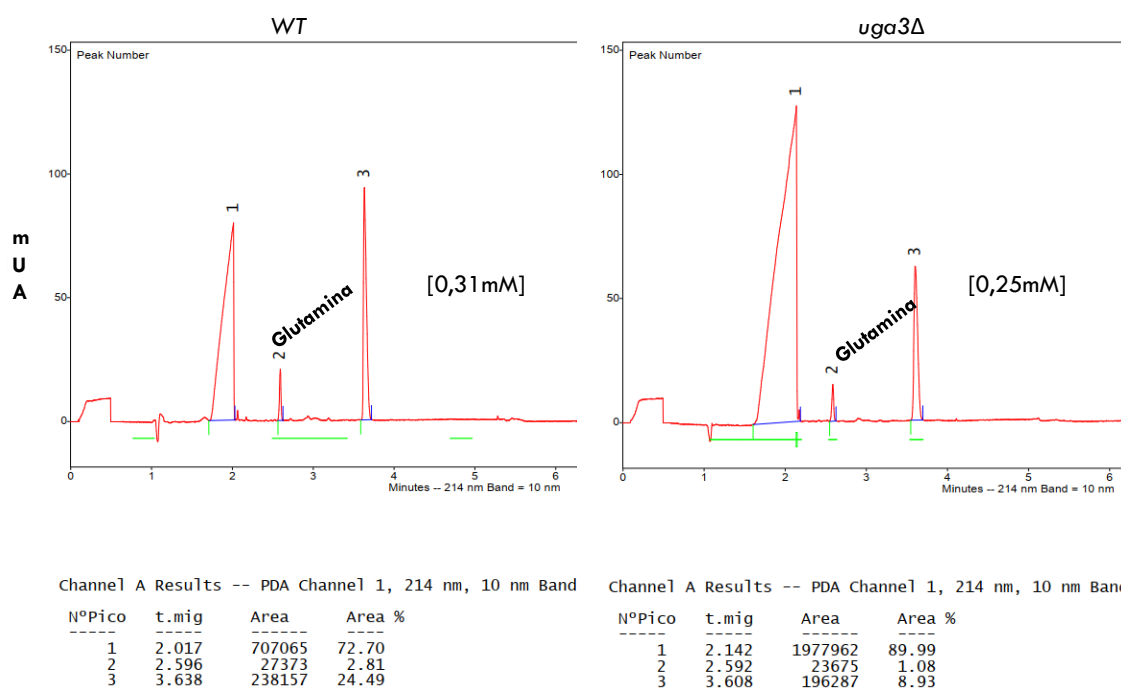
Para evaluar el posible efecto de la expresión diferencial de las proteínas que participan en vías de síntesis o degradación de aminoácidos, decidimos estudiar el contenido de aminoácidos intracelulares en la cepa *wild type* y en las mutantes *uga3Δ* y *dal81Δ*.

Todos los caminos de utilización de fuentes de nitrógeno convergen en un conjunto común de reacciones que llevan a la síntesis de glutamato y glutamina (Magasanik and Kaiser 2002).

El glutamato y la glutamina son dos de los aminoácidos más abundantes en las células y su contenido intracelular es clave en la regulación del uso de casi todas las fuentes de nitrógeno, ya que todo el nitrógeno incorporado por las células se incorpora a glutamina o glutamato para luego formar parte de las macromoléculas nitrogenadas. Gdh2, sub-representada en las cepas *uga3Δ* y *dal81Δ*, y Glt1, sub-representada en la cepa *uga3Δ*, son dos proteínas involucradas en el metabolismo central del nitrógeno (Figura 1). Por este motivo, en primer lugar, decidimos determinar el contenido intracelular de estos dos aminoácidos centrales, glutamina y glutamato. Para su cuantificación, utilizamos la técnica de electroforesis capilar zonal.

En primer lugar, debimos poner a punto la técnica de extracción y determinación del contenido de glutamina y glutamato y realizar curvas de calibración de estos dos aminoácidos. Muestras de las cepas *wild type* y *uga3Δ* se prepararon utilizando una adaptación del método de extracción de metabolitos que emplea etanol *bufferado* caliente (Gonzalez, et al. 1997). Las muestras se derivatizaron con fluorescamina y se analizaron mediante electroforesis capilar (Servicio de Análisis por Electroforesis Capilar del Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA). Luego, se calcularon las

concentraciones intracelulares de glutamina y glutamato a partir de los electroferogramas obtenidos.



**Figura 27. Cuantificación de glutamina y glutamato mediante electroforesis capilar zonal.** Células *wild type* (23344c) y *uga3Δ* (26970a) se resuspendieron en 21 ml de etanol 90% equilibrado con 2ml de HEPES 1M pH7,5 a 80°C. Se incubaron 3 min y luego 3 min en hielo. El extracto se evaporó a 45°C y 5 mBar y se resuspendió en 1 ml de agua. Por último, se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4°C. Una alícuota del sobrenadante se derivatizó con fluoescamina. Luego, se analizó mediante electroforesis capilar.

En la Figura 27 se muestran los perfiles y resultados de uno de los experimentos a modo de ejemplo. Como se puede ver, la diferencia en la concentración de glutamina entre la cepa *wild type* y la mutante *uga3Δ* no resultó significativa. En nuestras muestras y con esta metodología no logramos detectar glutamato, aunque según bibliografía, las concentraciones intracelulares de estos dos aminoácidos son del mismo orden (Mulleder, et al. 2016).

Por este motivo, debimos elegir otra metodología. Decidimos entonces cuantificar los aminoácidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Para ello, analizamos 4 cultivos independientes de cada cepa. Luego de realizar extracciones con metanol, las determinaciones se realizaron con el servicio del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Fundación Instituto Leloir mediante espectrometría de RMN 1D (Delaglio,

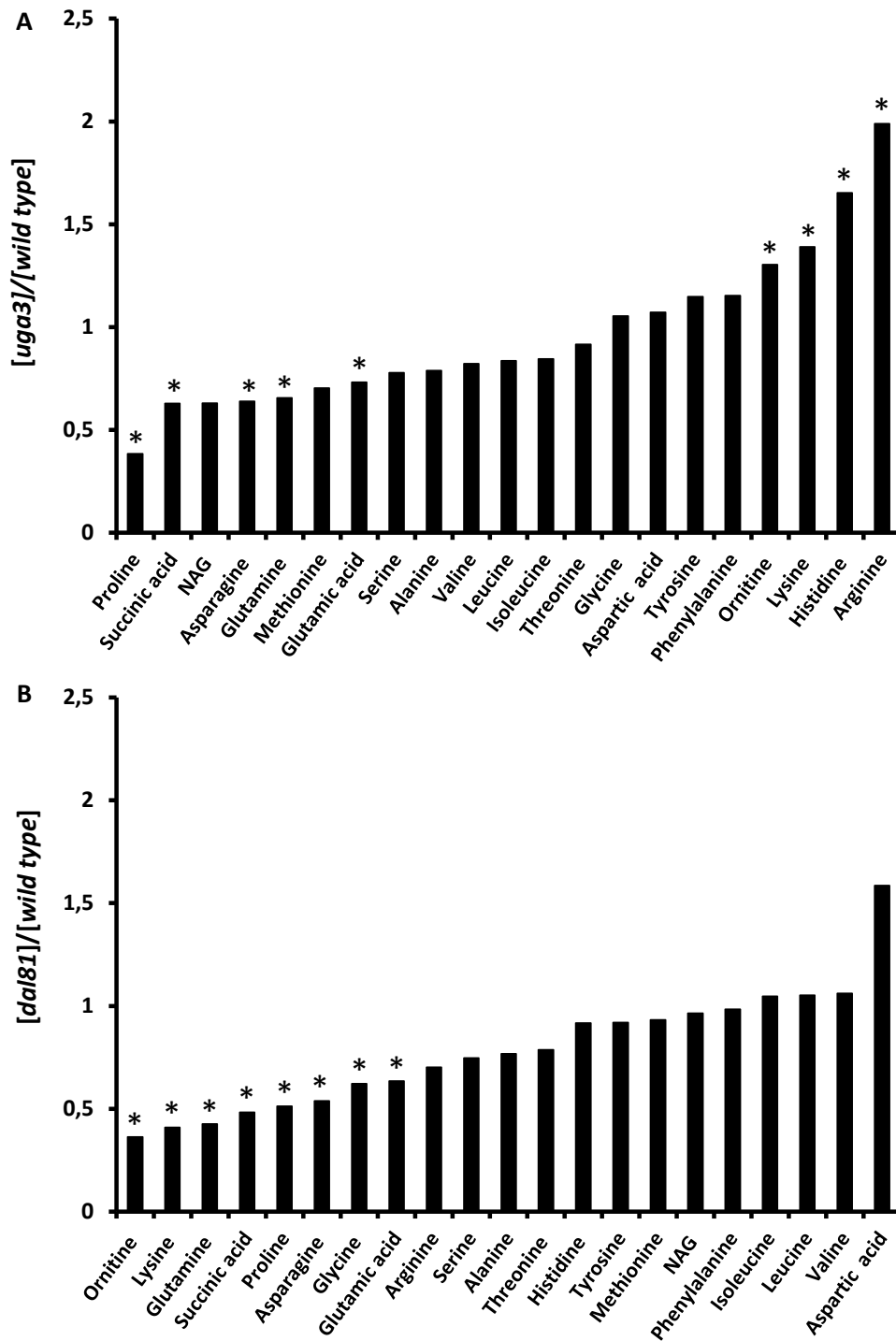
et al. 1995). La identificación de las resonancias correspondientes a cada metabolito en estos espectros (asignados mediante experimentos bidimensionales  $^1\text{H}^1\text{H}$  TOCSY y  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  HSQC), se complementó con información de las bases de datos COLMAR (<http://spin.ccic.ohio-state.edu/index.php/query/index>) y HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), permitiéndonos identificar prolina, asparagina, glutamina, glutamato, serina, alanina, treonina, glicina, aspartato, ornitina, lisina, histidina, arginina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y valina y otros metabolitos como N acetilglucosamina y succinato. Las diferencias globales entre los grupos se detectaron usando Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). La concentración absoluta de cada metabolito fue estimada (mM) utilizando Dextrán Sulfato de Sodio como estándar interno.

Estudios previos habían demostrado que glutamina y glutamato son los aminoácidos más abundantes (Mulleder, et al. 2016). Sin embargo, estos estudios fueron realizados con células crecidas con amonio como fuente de nitrógeno, mientras que en este trabajo las células crecieron utilizando prolina. Probablemente es por esto que en nuestros ensayos, el aminoácido más abundante en la cepa *wild type* fue prolina, con una concentración intracelular de 6,5 mM. Le siguen en abundancia glutamato y glutamina (5,0 y 2,2 mM, respectivamente).

Como podemos observar en Figura 28A, la ausencia de Uga3 genera cambios significativos en el contenido de varios compuestos. Detectamos una disminución significativa en la concentración de prolina, seguida de ácido succínico, asparagina, glutamina y glutamato. Asimismo, detectamos un aumento significativo en la concentración de los aminoácidos ornitina, lisina, histidina y arginina, siendo la de arginina el doble respecto a la cepa *wild type*. En esta misma cepa, también observamos un aumento en la expresión de *ARG5,6* y de la proteína Arg5,6, que participa en la biosíntesis de arginina, lo que podría explicar el aumento en la concentración de arginina.

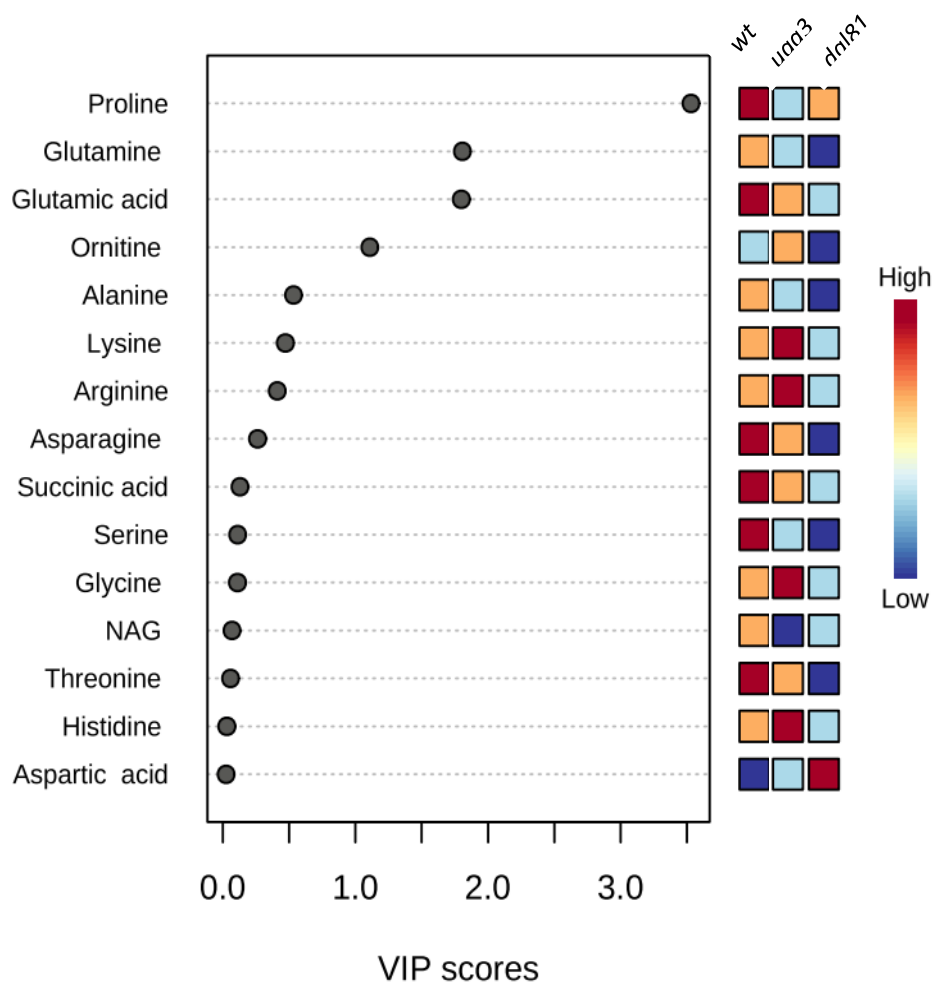
Por otro lado, como se muestra en la Figura 28B, la ausencia de Dal81 genera una disminución significativa en la concentración de la ornitina, lisina, glutamina, ácido succínico, prolina, asparagina, glicina y glutamato.

Se evaluó también la significancia mediante ANOVA de una vía (paramétrica) y luego de un test de Fisher, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis discriminante lineal por cuadrados mínimos parciales (PLS-DA) como método de clasificación supervisado (Figura 29). En esta Figura se representa la relación entre las concentraciones relativas de cada metabolito identificado por PLS-DA en la cepa deficiente en Uga3 o Dal81, respecto a la cepa *wild type*. El análisis de discriminante lineal por cuadrados mínimos nos informa que las variables ornitina, glutamato, glutamina y prolina, sirven para discriminar entre las tres cepas.



**Figura 28. Contenido relativo de aminoácidos y otros metabolitos intracelulares.** Se calculó la relación entre la concentración media de cada metabolito entre las cepas *uga3Δ/wild type* (A) y *dal81Δ/wild type* (B). \* Metabolitos con diferencias estadísticamente significativas mediante Anova seguido de test de Tuckey (ver anexo). NAG= N-acetylglucosamine.





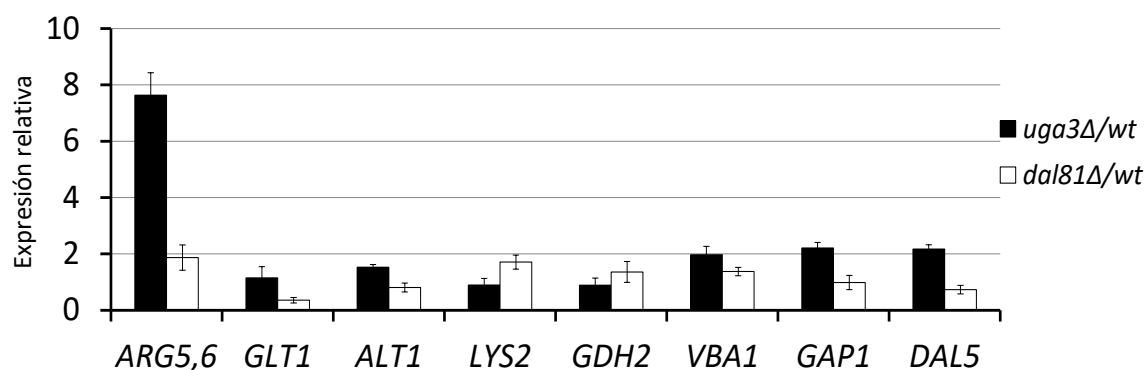
**Figura 29. Características identificadas mediante análisis discriminante lineal por cuadrados mínimos parciales (PLS-DA).** Los recuadros coloreados a la derecha indican la concentración relativa de cada metabolito en cada grupo estudiado. VIP (Variable Importance in Projection) scores: suma ponderada de los cuadrados de PLS teniendo en cuenta la variación de Y en cada dimensión. VIP scores iguales o mayores a 1 denotan una importancia relativa de esa variable en el modelo de comparación.

En vista de los cambios en el contenido de aminoácidos que la ausencia de Uga3 provoca, decidimos continuar este estudio focalizándonos en las 8 proteínas de expresión diferencial en esta mutante con funciones en el metabolismo y transporte de aminoácidos. Tres de estas proteínas son permeasas: Dal5 (permeasa de alantoato), Vba1 (permeasa de aminoácidos básicos localizada en vacuola) y Gap1 (permeasa de todos los L-aminoácidos, algunos D-aminoácidos, análogos tóxicos y poliaminas). Las otras 5 son las enzimas Glt1 (glutamato sintasa dependiente de NADH), que cataliza la síntesis de glutamato a partir de glutamina y  $\alpha$ -cetoglutarato (Figura 1); Lys2 (alfa-aminodipato reductasa), que cataliza el quinto paso de la biosíntesis de lisina que consiste en la reducción de alfa-aminoadipato a alfa-aminoadipato 6-semialdehído; Alt1 (alanina

aminotransferasa), que participa en la biosíntesis y catabolismo de alanina; Arg5,6 (N-acetilglutamato kinasa y N-acetil-gama-glutamil-fosfato reductasa), que catalizan el segundo y el tercer paso de la biosíntesis de arginina; y Gdh2 (glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>) que cataliza la degradación de glutamato generando amonio y alfa-cetoglutarato (Figura 1).

Siendo Uga3 y Dal81 factores de transcripción, pensamos que la variación en la cantidad de estas proteínas debido a su ausencia podría deberse a cambios en la expresión de los genes que las codifican. Por este motivo, decidimos evaluar la cantidad de RNA mensajero de los 8 genes elegidos. Para ello, extrajimos RNA total de cultivos de células *wild type*, *uga3Δ* y *dal81Δ*, preparamos el cDNA y realizamos PCR cuantitativa con *primers* para cada una de los genes. Los resultados se muestran en la Figura 30.

Mediante los ensayos de RT-qPCR, encontramos que la expresión de *ARG5,6* aumenta significativamente en la mutante *uga3Δ* respecto a la cepa *wild type*. Esto correlaciona con la cantidad aumentada de la proteína en esta mutante respecto a la *wild type* observada con el análisis de proteomas.



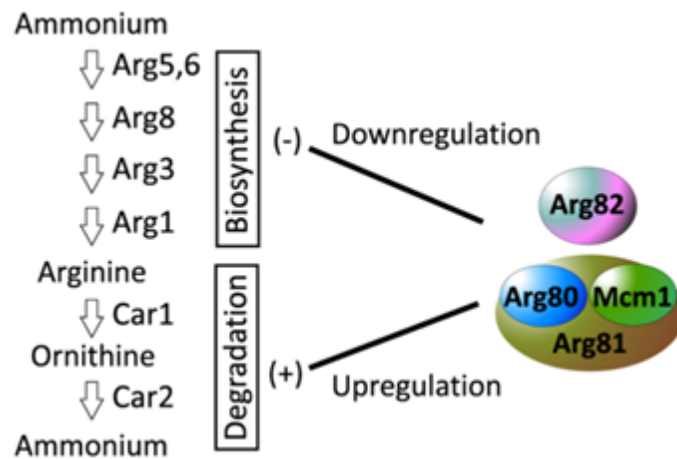
**Figura 30. Efecto de la ausencia de los factores de transcripción Uga3 y Dal81 sobre la expresión de genes que participan en el metabolismo del nitrógeno.** Cultivos de células *wild type* (23344c), *uga3Δ* (26970a) y *dal81Δ* (SBCY17) se cosecharon y se extrajo el RNA total. Se realizaron reacciones de retrotranscripción, seguidas de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR). Los niveles de expresión de cada gen se normalizaron con el gen de expresión constitutiva *TBP1*. Los resultados se graficaron como la expresión relativa de cada gen en cada cepa mutante respecto a la *wild type* (*uga3Δ*: barras negras; *dal81Δ*: barras blancas).

En la cepa *uga3Δ*, la expresión de los genes *GLT1*, *ALT1*, *LYS2* y *GDH2* es similar a la observada en la cepa *wild type*. Es decir que, en estos casos, no encontramos una correlación entre la expresión transcripcional y la cantidad de proteína detectada en análisis de proteomas. Más aún, la expresión de *VBA1*, *GAP1* y *DAL5* no sólo no es menor en la mutante que en la *wild type* sino que, aunque la diferencia no resulta estadísticamente significativa, parece ser mayor.

Tampoco detectamos una disminución en la expresión de *GDH2* en la mutante *dal81Δ*, lo que hubiera correlacionado con el resultado del análisis de proteomas. Es más, en este análisis no había aparecido la proteína Glt1 en el listado de las proteínas sub-representadas en la mutante *dal81Δ* y sin embargo, la expresión del gen es significativamente menor. Los niveles de expresión de *ALT1*, *LYS2*, *BVA1*, *GAP1* y *DAL5* en esta mutante son similares a los detectados en la cepa *wild type*, lo que correlaciona con el resultado del análisis de proteomas.

Teniendo en cuenta el efecto que genera la ausencia de Uga3, observado como el aumento en la cantidad de Arg5,6 y en la expresión de *ARG5,6*, sumado al elevado contenido intracelular de arginina, decidimos estudiar la regulación de *ARG5,6* por Uga3.

La regulación de la expresión funcional de los genes de la vía metabólica de arginina es compleja. En resumen, el amonio es un precursor en la biosíntesis de arginina. Cuando en el medio de crecimiento hay arginina, la levadura es capaz de incorporarla mediante la permeasa de arginina Can1 (Hoffmann 1985) y luego puede compartimentalizarla en la vacuola mediante el transportador Vba2 (Shimazu, et al. 2005) o puede utilizarla como fuente de nitrógeno, reprimiendo su síntesis y activando su degradación (Figura 31). Ambos procesos están regulados por un complejo transcripcional formado por Arg81, Mc1 y Arg80, cuya conformación es estabilizada mediante la unión de Arg82 (Bosch and Saiardi 2012).



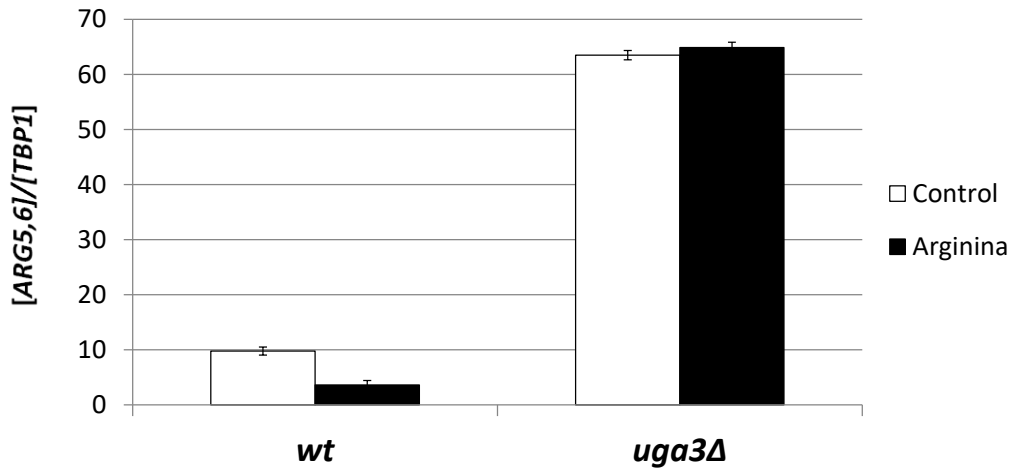
**Figura 31. Esquema de la vía metabólica de arginina en *S. cerevisiae*.** La regulación de la expresión de los genes sensibles a arginina está mediada por el complejo multimérico ArgR/Mcm1, conformado por Arg80, Arg 81, Arg82 y Mcm1 (Bosch and Saiardi 2012).

El catabolismo de la arginina, que consiste en la degradación de arginina a prolina, ocurre en el citosol (Brandriss and Falvey 1992); mientras que los primeros cinco pasos de la síntesis de arginina ocurren en la mitocondria y resultan en la síntesis de ornitina (Abadjieva, et al. 2001).

En *S. cerevisiae* el locus *ARG5/ARG6* codifica para un transcripto que es traducido dando un único producto proteico que luego es procesado en la mitocondria dando dos enzimas físicamente separables que se mantienen juntas formando un complejo junto con otra proteína, Arg2. La N-acetil glutamato quinasa (Arg6) y la N-acetil gama-glutamil fosfato reductasa (Arg5) catalizan el segundo y tercer paso de la biosíntesis de arginina (Boonchird, et al. 1991; de Cima, et al. 2012). La transcripción de *ARG5,6* (y otros genes como *ARG1*, *ARG3*, *ARG4* y *ARG8*) es reprimida por arginina a través del complejo ArgR/Mcm1 (Ljungdahl and Daignan-Fornier 2012; Messenguy and Dubois 2003).

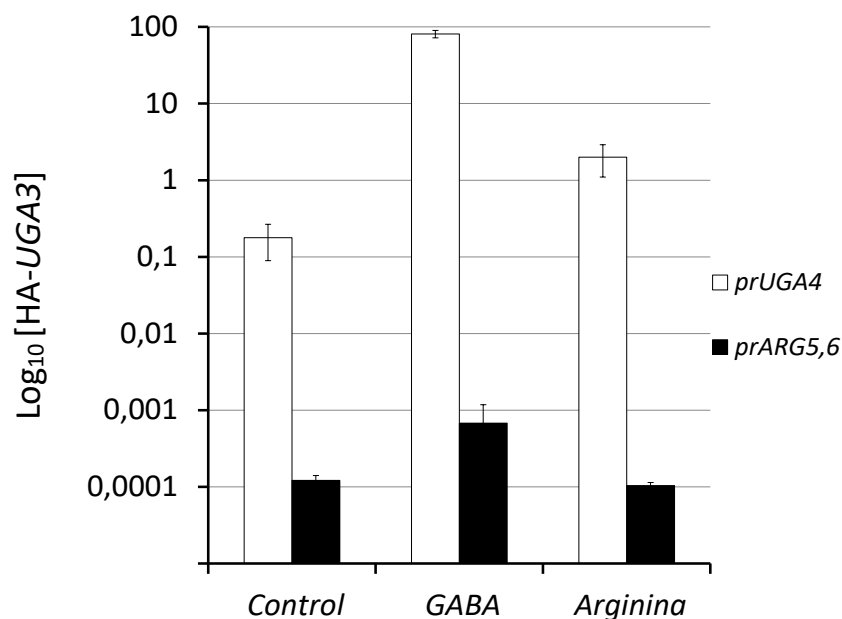
Mediante RT-qPCR, analizamos si Uga3 tiene efecto en la respuesta a la arginina de *ARG5,6* (Figura 32). En el contexto *wild type*, verificamos que la expresión de *ARG5,6* disminuye significativamente luego de la incubación con arginina. Por el contrario, la expresión de *ARG5,6* en la cepa deficiente en Uga3, no se ve reprimida cuando se trata las células con arginina. Además, en la misma cepa, el nivel de *ARG5,6* en ausencia y presencia de arginina es mayor que en la cepa *wild type*, de acuerdo con nuestras

observaciones previas. Es decir que el factor de transcripción Uga3 interviene en la regulación de la vía biosintética de arginina a nivel de *ARG5,6*.



**Figura 32. Efecto de la ausencia de los factores de transcripción Uga3 sobre la represión por arginina del gen *ARG5,6*.** Cultivos de células wild type (23344c) y *uga3Δ* (26970a) se incubaron (barras negras) o no (barras blancas) con arginina 5mM durante una hora. Luego se cosecharon y se extrajo el RNA total. Se realizaron reacciones de retrotranscripción, seguidas de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR). Los niveles de expresión de *ARG5,6* se normalizaron con el gen de expresión constitutiva TBP1. Los resultados se graficaron como las veces de cambio de expresión de *ARG5,6* respecto a TBP, en la cepa mutante y en la *wild type*.

Con el objetivo de determinar si la acción del factor Uga3 sobre la expresión del gen *ARG5,6* es directa a través de su interacción con el promotor de este gen, realizamos ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) seguidos de qPCR. Para esto fue necesario utilizar una cepa que expresa la proteína Uga3 fusionada en su extremo N-terminal al epítotope HA. *Primers* que amplifican una parte de la región regulatoria de *UGA4* y la condición de agregado de GABA se utilizaron como control positivo del ChIP. Como muestra la Figura 33, no pudimos detectar interacción entre Uga3 y el promotor de *ARG5,6* en ninguna de las condiciones ensayadas. Esto sugiere que el factor de transcripción Uga3 regularía la expresión de *ARG5,6* de manera indirecta.



**Figura 33. Análisis de la interacción del factor de transcripción Uga3 con el promotor de ARG5,6.** Células que expresan la proteína HA-Uga3 (SBCY13) provenientes de medio mínimo (MM) se cosecharon y transfirieron al mismo medio fresco con el agregado o no de arginina 5mM o de GABA 0,1 mM y se incubaron durante 1 hora. Los ensayos de CHIP se llevaron a cabo usando anticuerpos contra el epítipo HA. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando *primers* que amplifican una región del promotor de *UGA4* (F/R-UGA4qPCR) (barras blancas) (control positivo), una región del promotor de *ARG5,6* (barras negras). El primero se usó como control. Los resultados se expresaron como las veces de cambio de unión al promotor de *UGA4* o *ARG5,6* y representan la media más el desvío estándar de tres experimentos independientes.

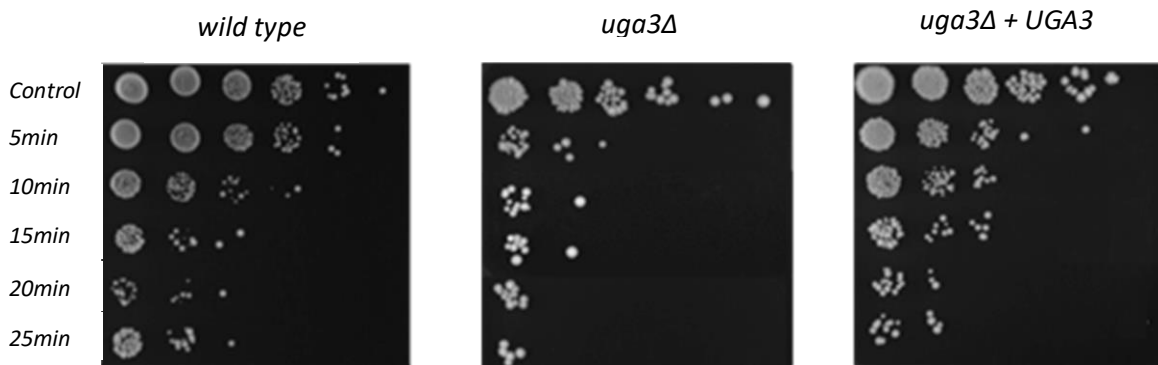
La relación entre la acumulación de aminoácidos y la tolerancia a ciertos procesos de estrés está ampliamente documentada. En particular, se ha propuesto que la acumulación de arginina y prolina en la vacuola podrían tener funciones fisiológicas en mecanismos de tolerancia a estrés (Bach, et al. 2009). El efecto protector de la prolina se debe a que puede estabilizar proteínas y membranas e inhibir la agregación de proteínas durante los procesos de plegamiento de proteínas (Rudolph and Crowe 1985; Takagi, et al. 2016).

Por otro lado, la arginina, que está relacionada al metabolismo de prolina, presenta múltiples funciones tanto *in vitro* como *in vivo*. La arginina puede inhibir la agregación inducida por calor de los intermediarios proteicos plegados parcialmente y también suprimir las interacciones proteína-proteína y proteína-superficie durante los procesos de re-plegamiento y purificación (Arakawa, et al. 2007; Ghosh, et al. 2009; Schneider, et al. 2011). Además, la arginina ha sido ampliamente utilizada como excipiente en la

biofarmacéutica basada en proteínas. También se sabe que el agregado de arginina al medio de cultivo provee una protección significativa a células de *Escherichia coli* contra el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. Igualmente, se ha demostrado que incrementa la tolerancia a estrés osmótico de *Candida glabrata* (Bearson, et al. 2009; Xu, et al. 2011). En *S. cerevisiae*, la acumulación de arginina en vacuola incrementa la tolerancia al congelamiento tanto en condiciones de laboratorio como en productos industrializados como fermentos de masa madre congelados (Morita, et al. 2002; Shima, et al. 2003). Por último, también se demostró el efecto protector de la acumulación de arginina contra el estrés por etanol; este efecto se logra debido a la baja producción de especies reactivas del oxígeno lo que lleva al mantenimiento de la integridad de la pared y la membrana citoplasmática, estabilizando la morfología y función de las organelas (Cheng, et al. 2016).

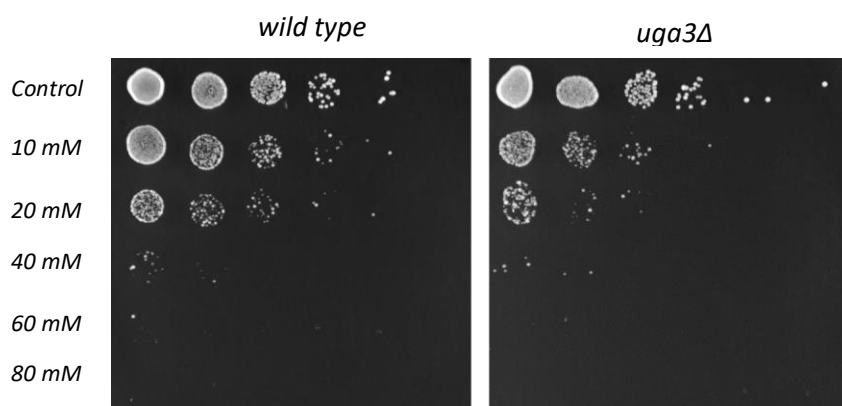
En base a todo esto, decidimos evaluar si la ausencia de Uga3 modifica el *fitness* celular frente a distintos tipos de estrés.

Comenzamos analizando el impacto de la inducción de estrés térmico a 50°C. Par ello, células en fase exponencial se incubaron durante distintos tiempos a 50°C y luego se sembraron 2 µl de diluciones seriadas al décimo de estos cultivos en placas conteniendo medio rico MM. Se puede observar que con sólo 5 minutos de incubación a 50°C la viabilidad disminuyó en por lo menos tres órdenes de magnitud (Figura 34). Cuando la cepa deficiente vuelve a expresar Uga3, vemos nuevamente un perfil de viabilidad similar al de la *wild type*. Es decir, que Uga3 promueve la tolerancia al estrés térmico.



**Figura 34. Análisis de la tolerancia a estrés térmico en células deficientes en Uga3.** Cepas *wild type* (23344), *uga3Δ* (26970) y *uga3Δ* transformada con un plásmido que expresa *UGA3*, provenientes de cultivos en medio mínimo en fase exponencial, fueron incubadas a 50°C durante distintos tiempos (5, 10, 15, 20, 25 minutos). Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo que se sembraron en placas con MM. Foto representativa correspondiente a una de tres repeticiones

Para estudiar la respuesta al estrés oxidativo, las células se incubaron durante 1 hora a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Luego se realizó un procedimiento similar al anterior. En este caso también observamos que en ausencia de Uga3 la viabilidad disminuye levemente luego del tratamiento (Figura 35); la condición en la cual este efecto es más notorio es el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. Este resultado nos indica que Uga3 promueve la tolerancia estrés oxidativo.

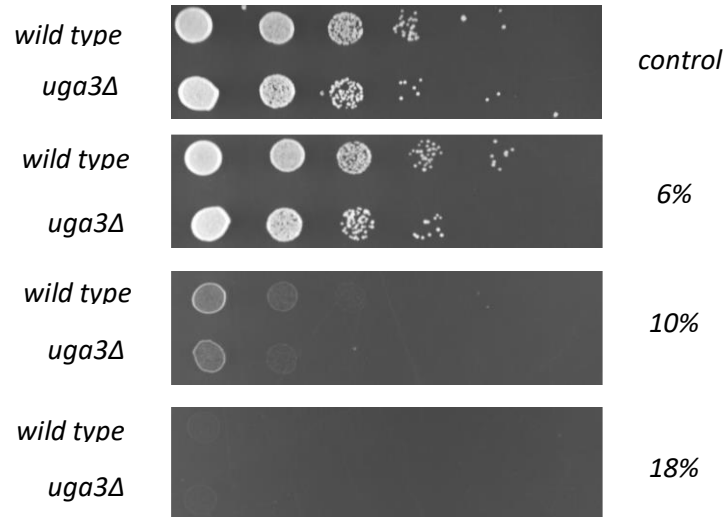


**Figura 35. Análisis de la tolerancia a estrés oxidativo en células deficientes en Uga3.** Cepas *wild type* (23344) y *uga3Δ* (26970) provenientes de cultivos en medio mínimo en fase exponencial fueron incubadas durante 1 hora con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10, 20, 40, 60, 80 mM). Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo que se sembraron en placas con MM. Fotos representativas correspondientes a una de cuatro repeticiones.

También estudiamos la tolerancia frente a estrés por etanol. Para ello, en este caso, sembramos diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial en placas de medio

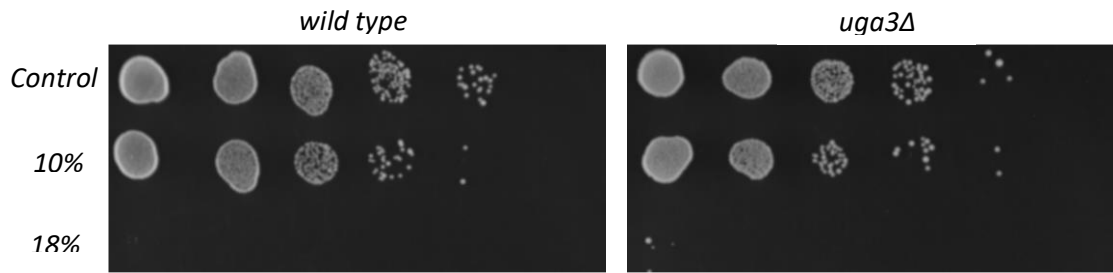


mínimo conteniendo etanol en distintas concentraciones. Los resultados se muestran en la Figura 36. Mediante este método, no se evidenciaron cambios en la tolerancia a este tipo de estrés por la deficiencia en Uga3.



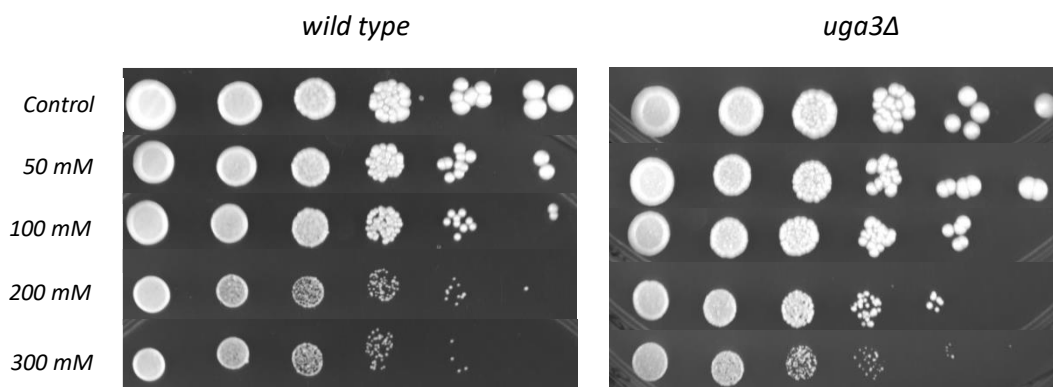
**Figura 36. Análisis de la tolerancia a estrés por etanol en placa en células deficientes en Uga3.** Se cosecharon células *wild type* (23344c) y *uga3Δ* (26790a) provenientes de cultivos en medio mínimo en fase exponencial. Se lavaron y se resuspendieron en agua. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo que se sembraron en placas con medio mínimo conteniendo etanol en las concentraciones indicadas (6%, 10% y 18%). Se comparó su crecimiento a las 48hs. Fotos representativas correspondientes a una de tres repeticiones.

Realizamos otro ensayo de tolerancia a estrés por etanol, en este caso en medio líquido. Para ello, a cultivos crecidos hasta fase exponencial se les agregaron diferentes cantidades de etanol y se incubaron durante 4 horas antes de hacer las diluciones seriadas al décimo. Otra vez, la viabilidad luego del tratamiento fue similar en ambas cepas (Figura 37).



**Figura 37. Análisis de la tolerancia a estrés por etanol en medio líquido en células deficientes en Uga3.** Células *wild type* (23344c) y *uga3Δ* (26790a) en cultivos en medio mínimo en fase exponencial, se trataron con etanol en las concentraciones mencionadas (10% y 18%) durante 4 horas. Luego se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas con medio mínimo. Se comparó su crecimiento a las 48hs. Fotos representativas correspondientes a una de tres repeticiones.

Por último, analizamos la tolerancia de células deficientes en Uga3 al estrés osmótico inducido por distintas concentraciones de cloruro de sodio. La viabilidad del cultivo *uga3Δ* frente a diferentes concentraciones de NaCl parece ser similar a la del *wild type* (Figura 38), es decir que Uga3 no modificaría la tolerancia al estrés osmótico.



**Figura 38. Análisis de la tolerancia a estrés osmótico en células deficientes en Uga3.** Se cosecharon células *wild type* (23344c) y *uga3Δ* (26790a) provenientes de un cultivo en medio mínimo en fase exponencial. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo que se sembraron en placas con medio mínimo y las concentraciones indicadas de NaCl (50, 100, 200 y 300 mM). Se comparó su crecimiento a las 48hs. Fotos representativas correspondientes a una de cuatro repeticiones.

En resumen, con estos ensayos mostramos que Uga3 promueve la tolerancia al estrés térmico y oxidativo, pero no parece tener efecto sobre los otros tipos de estrés analizados. Si bien la acumulación de arginina en las células protege frente a estrés por etanol, así como también oxidativo (Cheng, et al. 2016), y la ausencia de Uga3 aumenta

el contenido de arginina intracelular, nosotros no detectamos un aumento en la resistencia a estrés por etanol en la cepa *uga3Δ*.

## Discusión

Siguiendo la hipótesis de que Uga3 participa de otros procesos regulatorios que van más allá de la inducción por GABA de los genes *UGA*, comparamos el proteoma de células *wild type* con el de células deficientes en este factor de transcripción a fin de conocer cuáles son esos procesos. Realizamos un análisis similar para Dal81, factor de transcripción pleiotrópico, cuya participación en la regulación de genes de varias fuentes pobres, además de su acción sobre los genes *UGA*, ya era conocida.

Llamativamente, la ausencia de Dal81 produce cambios significativos en solamente 12 proteínas, mientras que en ausencia de Uga3, se detectaron 67 proteínas de expresión diferencial. Además, se detectó solo una proteína con expresión diferencial en ambas mutantes, Gdh2.

Los genes *UGA* (*UGA1*, *UGA2* y *UGA4*) son inducibles por GABA y esta inducción depende de la acción de Dal81 y Uga3 (Cardillo, et al. 2012). Si bien ambos factores actúan positivamente sobre la expresión de estos tres genes, sólo Uga1 se detectó menos representada en la mutante *dal81Δ*; mientras que en la mutante *uga3Δ*, la cantidad de ninguna de las tres proteínas (Uga2, Uga2 y Uga4) varió con respecto a la cantidad detectada en la *wild type*. Esto se explica porque en la condición de crecimiento en la que se llevaron adelante los ensayos de estudio de proteomas, la expresión basal de los genes *UGA* es baja y sólo en presencia de GABA ambos factores de transcripción interactúan con los promotores induciendo su transcripción (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2012). De la misma manera, tampoco Bap2 y Agp1 aparecen como proteínas de expresión diferencial en las mutantes *uga3Δ* y *dal81Δ*, respectivamente, ya que las células en las que analizamos los proteomas, no habían sido incubadas con leucina.

De las 67 proteínas de expresión diferencial en la cepa deficiente en Uga3, cinco participan directamente en vías biosintéticas de aminoácidos (Alt1, Lys2, Arg5,6, Glt1 y Gdh2) y tres son permeasas de aminoácidos (Vba1, Gap1 y Dal5).

Dado que Uga3 es un factor de transcripción, resultaba de alguna manera esperable que cambios en el contenido de proteínas fueran el resultado de cambios a nivel de la transcripción. Por este motivo, analizamos la expresión mediante RT-qPCR de estos 8 genes. Sin embargo, sólo para *ARG5,6* encontramos la correlación esperada. Esta falta de correlación entre la expresión transcripcional y la expresión proteica analizada a nivel global, no descarta, aunque tampoco confirma, los resultados del análisis de proteomas. Si bien los estudios de expresión diferencial de ARNm suponen implícitamente que los cambios en la expresión de ARNm tienen significado biológico, muy probablemente mediado por los cambios correspondientes en los niveles de proteína, estudios sobre la correspondencia ARNm-proteína han mostrado una correlación notoriamente pobre entre los niveles de expresión del ARNm y la proteína. De hecho, hay publicaciones que indican que la correlación entre los niveles de expresión de ARNm y proteína es de alrededor del 40% en muchos estudios (Koussounadis, et al. 2015). La discrepancia se suele atribuir a otros niveles de regulación entre la transcripción y el producto proteico (de Sousa Abreu, et al. 2009; Vogel and Marcotte 2012). Sin embargo, la expresión de ARNm y, en particular, las diferencias significativas en la expresión de ARNm entre condiciones, se usa comúnmente para el descubrimiento biológico.

Vba1 es la principal permeasa responsable de la incorporación de los aminoácidos básicos, arginina, lisina e histidina, a la vacuola (Shimazu, et al. 2005). Si bien en nuestro trabajo determinamos la concentración intracelular total de cada aminoácido, sin discriminar por localización, podemos especular que cambios en la compartimentalización del pool de cada aminoácido también podría impactar sobre el metabolismo del nitrógeno.

Alt1 participa de la biosíntesis y del catabolismo de la alanina; se ha visto que células deficientes en Alt1 acumulan alanina intracelular (Yu, et al. 2013). En nuestras condiciones experimentales, la disminución en la cantidad de Alt1 detectada en la mutante *uga3*, no sólo no generó una acumulación de alanina en estas células, sino que la concentración de este aminoácido mostró una ligera disminución.

Lys2 cataliza el quinto paso de la vía biosintética de la lisina. Si bien esta proteína está sub-representada en la cepa deficiente en Uga3, en estas células detectamos mayor contenido de lisina. Cabe aclarar que Lys2 está regulada post-traduccionalmente por

fosfopanteteinilación mediada por Lys5 (Sinha and Bhattacharjee 1971), por lo que en este caso está claro que la cantidad de proteína detectada por espectrometría de masa no necesariamente está relacionada con su actividad.

Glt1 y Gdh2 son dos de las enzimas que conforman el metabolismo central del nitrógeno (NCM), vía que como ya se mencionó es responsable del balance glutamina/glutamato y la asimilación del nitrógeno. Glt1 (glutamina 2-oxo-glutarato amino transferasa, GOGAT), que cataliza la síntesis de glutamato a partir de glutamina y alfa-cetoglutarato, constituye junto con la glutamina sintasa Gln1 (GS) un pathway secundario para la síntesis de glutamato conocido como GS-GOGAT (Cueto-Rojas 2016). A través de la actividad enzimática de Gdh2 la degradación del glutamato provee los niveles adecuados de amonio en las células de levadura (Mara, et al. 2018). De hecho, el catabolismo del glutamato por la vía GDH es la vía principal de generación de amonio in vivo. Se ha reportado que el grupo amino del glutamato es la fuente del 80% del nitrógeno celular, mientras que el 20% restante proviene del grupo amida de la glutamina (Magasanik and Kaiser 2002). Así, cambios en la concentración intracelular de glutamato y glutamina, así como en el balance glutamina/glutamato, tiene gran impacto en gran parte del metabolismo (Fayyad-Kazan, et al. 2016). La concentración de estos dos aminoácidos centrales disminuye significativamente cuando las células carecen de Uga3 o Dal81; también disminuye la concentración de prolina, que en nuestra condición experimental es la fuente del nitrógeno que ingresará al metabolismo central para la síntesis de glutamina y glutamato.

Las enzimas que componen el complejo proteico Arg5,6 catalizan la segunda y tercera reacción en la biosíntesis de arginina. Esta proteína está sobre-representada en la mutante *uga3Δ* y, en concordancia, también encontramos una mayor concentración intracelular de arginina en estas células. La expresión del gen *ARG5,6*, que codifica a Arg5,6, es reprimida por arginina (Boonchird, et al. 1991). En este trabajo, encontramos que la expresión génica de *ARG5,6* es mayor en células *uga3Δ* que en células wild type, lo que correlaciona con una mayor cantidad de la proteína Arg5,6. Además, encontramos que en ausencia de Uga3 esta expresión no responde a la presencia de arginina, lo que explica por qué hay una elevada expresión a pesar de la acumulación intracelular elevada de arginina. Estos resultados demuestran que, a pesar de que no

detectamos una interacción directa con la región regulatoria del gen ARG5,6, Uga3 participa en la regulación de la vía biosintética de la arginina. Cabe aclarar que se ha demostrado que Arg5,6, además de su función enzimática mitocondrial, se asocia a loci tanto nucleares como mitocondriales regulando su transcripción (Hall, et al. 2004). Esto podría llevar a una amplificación del efecto regulatorio de Uga3 a otros procesos.

Por último, ya que la ausencia de Uga3 modifica el perfil de acumulación de aminoácidos intracelulares y que diferentes aminoácidos tienen gran impacto sobre la tolerancia a estrés, analizamos el efecto de Uga3 sobre diferentes tipos de estrés. Encontramos que Uga3 promueve la resistencia a estrés térmico, pero no genera cambios en la tolerancia al resto de los tipos de estrés ensayados.

En términos de protección frente a estrés, la prolina es el aminoácido natural más estudiado. A pesar de que su síntesis no se induce en respuesta a estrés, células de *S. cerevisiae* que acumulan prolina son más resistentes a congelamiento, deshidratación, estrés oxidativo, osmótico o estrés por etanol (Mat Nanyan and Takagi 2020; Takagi 2008; Tsolmonbaatar, et al. 2016). La concentración de prolina intracelular en la mutante deficiente en Uga3 es menor que en la *wild type*, posiblemente debido a la menor expresión de la permeasa Gap1, que en las condiciones de crecimiento utilizadas en nuestro trabajo es la principal encargada de la incorporación de este aminoácido. El hecho de que al mismo tiempo que se acumula arginina disminuye prolina podría ser la causa de que no detectemos el esperado efecto protector de la acumulación de arginina en células *uga3Δ*.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

Para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales, las células microbianas regulan ampliamente la duplicación del ADN, la remodelación de la cromatina, la transcripción, la traducción y el metabolismo (Zaman, et al. 2008). El metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno son fundamentales para la producción de componentes celulares y el suministro de energía al metabolismo. Las fuentes de nitrógeno son esenciales para la vida y su metabolismo se regula con precisión. En los procesos de biotecnología industrial, las fuentes de nitrógeno juegan un papel esencial en la producción de diversos productos, por ejemplo, antibióticos (Haas and Marzluf 1995; Li, et al. 2013; Niehaus, et al. 2013; Studt, et al. 2012; Wiemann, et al. 2009), aminoácidos (Brosnan and Brosnan 2013) y enzimas (Yasumura, et al. 2008).

Dado que *S. cerevisiae* es uno de los organismos modelo eucariotas más investigados, la comprensión de los mecanismos de regulación del metabolismo de los compuestos nitrogenados en este organismo también podría proporcionar pistas útiles para la investigación del metabolismo del nitrógeno en otros microorganismos eucariotas similares e incluso en organismos superiores (Feyder, et al. 2015).

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. Es decir, utilizan las fuentes en un determinado orden. Diferentes mecanismos moleculares determinan que esto ocurra. El mecanismo más conocido es el NCR, por el cual las células no incorporan ni utilizan las fuentes más pobres cuando fuentes ricas se encuentran disponibles. Se ha visto que también hay una jerarquía que organiza el orden en el uso de fuentes pobres (Abdel-Sater, et al. 2004b; Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2011).

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. Estudios preliminares propusieron a este factor de transcripción pleiotrópico como el principal candidato a determinar la jerarquía entre esas fuentes pobres (Abdel-Sater, et al. 2004b), propuesta que luego fue verificada (Cardillo, et al. 2010; Cardillo, et al. 2011). Se sabe, entonces, que 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. Si bien se demostró que Dal81 tiene un papel fundamental en el establecimiento de esta jerarquía, probablemente no sea el único factor que la establece.

En base a estos antecedentes, nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la utilización jerarquizada de fuentes pobres de nitrógeno.

En primer lugar, encontramos que Uga3, además de su conocida función como factor de transcripción específico para los genes *UGA*, también participa en la regulación de *BAP2*. El hecho de regular más de una vía, nos lleva a proponerlo como candidato a participar en la determinación del orden en que se expresan estos genes.

Sabemos que la expresión de los genes de las permeasas de leucina, GABA y alantoína se expresan de manera coordinada. También los factores de transcripción Dal81, Leu3 y Uga3 están involucrados en la inducción de estos genes. Probablemente, permeasas de otras fuentes pobres estén reguladas por este mecanismo. Como Dal81 actúa sobre diferentes genes en conjunto con factores específicos de cada gen (o cada vía), decidimos buscar con qué factores de transcripción interactúa luego del estímulo con diferentes fuentes pobres. Conocer estos factores nos hubiera permitido conocer qué otros genes podrían estar compartiendo la regulación jerarquizada. Sin embargo, por dificultades experimentales, este objetivo no pudo ser cumplido.

Analizamos entonces la regulación de las interacciones entre determinados factores de transcripción. Demostramos que la interacción de Dal81 con Uga3, así como también la de Uga3 con Leu3 y probablemente otros (por ejemplo, Dal81-Stp1), ocurre independientemente de la presencia de cualquiera de los inductores ensayados (GABA y leucina). Este hallazgo nos lleva a proponer que en la célula coexisten en un determinado equilibrio los diferentes tipos de heterodímeros. El agregado de un inductor debe producir algún cambio en el dímero correspondiente, que hace que ahora pueda interactuar con la región regulatoria de su gen blanco. Por ejemplo, al agregar leucina, Dal81-Stp1 se uniría al gen *AGP1*; el regreso al equilibrio en la distribución de heterodímeros, llevaría a una menor cantidad de Dal81-Uga3, entre otros, lo que llevaría a una reducción en la capacidad de inducir los genes *UGA* por GABA.

Con el fin de buscar qué otras vías están reguladas por Dal81 y por Uga3, realizamos un análisis de proteomas. Analizamos el efecto de estos factores de transcripción sobre la abundancia de cada proteína.

Para cualquier organismo, saber qué proteínas se expresan y en qué cantidad es crucial para comprender los mecanismos celulares moleculares y funcionales, particularmente a nivel de todo el sistema. Una aplicación de cualquier dato de abundancia absoluta de proteoma es determinar y comprender mejor la contribución del control transcripcional y traduccional sobre la abundancia de proteínas. Durante años, los investigadores han estado intentando, hasta ahora con poco éxito, establecer un modelo adecuado que les permita inferir directamente las concentraciones de proteínas celulares a partir de datos transcriptómicos que están ampliamente disponibles. Para arrojar más luz sobre este tema, Ho et al. aplicaron sus algoritmos para fusionar varios conjuntos de datos de perfil ribosómico y ARNm existentes para generar mapas de consenso global con niveles absolutos para estos tipos de datos y los compararon con su mapa de proteoma (Ho, et al. 2018). Descubrieron que tanto el ARNm como los datos de perfiles ribosómicos solo podían explicar alrededor de la mitad de las variaciones de proteínas observadas. Curiosamente, el perfil de ribosomas fue solo ligeramente mejor para predecir los niveles de proteínas que los niveles de ARNm, lo cual es sorprendente dado que los datos de perfiles de ribosomas reflejan directamente la tasa de síntesis de proteínas.

Pudimos determinar que llamativamente, la ausencia de Dal81 produce cambios significativos en solamente 12 proteínas, mientras que en ausencia de Uga3, se detectaron 67 proteínas de expresión diferencial. Además, observamos que Gdh2 es la única proteína con expresión diferencial en ambas mutantes.

En un análisis más profundo de las 67 proteínas de expresión diferencial en la cepa deficiente en Uga3, encontramos que cinco de ellas participan directamente en vías metabólicas de aminoácidos (Alt1, Lys2, Arg5,6, Glt1 y Gdh2) y otras tres son permeasas de aminoácidos (Vba1, Gap1 y Dal5). Los cambios en la abundancia de estas proteínas, podrían generar cambios en los balances entre síntesis, transporte o acumulación de aminoácidos. Así como en la mutante *uga3Δ* la proteína Arg5,6 está sobre-representada, vimos que también su ARN mensajero se encuentra en mayor cantidad. En este trabajo demostramos que la represión por arginina de la expresión génica de *ARG5,6*

(Boonchird, et al. 1991) se encuentra impedida si el factor de transcripción Uga3 no está presente. Sin embargo, no detectamos interacción de Uga3 con el promotor de *ARG5,6*. Es decir que Uga3 participa y es esencial en la regulación negativa de la vía biosintética de la arginina.


Como una proporción relativamente importante de las proteínas de expresión diferencial de ambas mutantes participan de vías metabólicas de aminoácidos, analizamos el pool de cada aminoácido en las tres cepas, *uga3Δ*, *dal81Δ* y *wild type*. La concentración intracelular de glutamato y glutamina disminuye significativamente cuando las células carecen de Uga3 o Dal81. También disminuye la concentración de prolina, que en nuestra condición experimental es la fuente del nitrógeno que ingresará al metabolismo central para la síntesis de glutamina y glutamato. En ausencia de Uga3 el pool de arginina es significativamente mayor que en la cepa *wild type*. Esto tiene sentido ya que en esta mutante la vía biosintética de arginina no se encuentra reprimida por el producto final.

Cabe destacar que así como el perfil del contenido de aminoácidos puede ser indicativo de las vías metabólicas alteradas, en nuestro trabajo cuantificamos aminoácidos intracelulares, sin discriminar su compartimentalización. Cambios en la compartimentalización de cada tipo de aminoácido también podría tener un impacto en las células. La vacuola de *S. cerevisiae* juega un papel importante en el almacenamiento de nutrientes. La arginina, en particular, se acumula en la vacuola de las células ricas en nitrógeno y se moviliza al citosol frente a su escasez. Es decir que los principales sistemas de importación y exportación de arginina de la vacuola están inversamente regulados por el nitrógeno (Cools, et al. 2020). En la cepa *uga3Δ*, una de las permeasas responsables del transporte de la arginina hacia el interior de la vacuola se encuentra sub-representada. Por lo tanto, aunque habrá que hacer nuevos ensayos para confirmarlo, podemos suponer que no sólo la cantidad sino también la compartimentalización de la arginina se encuentran alteradas en esta mutante.

En este trabajo de tesis hemos profundizado en el estudio de la regulación coordinada de genes de fuentes pobres de nitrógeno. Encontramos que Uga3 no es un factor de transcripción que regula sólo a los tres genes del metabolismo del GABA, sino que tiene efecto sobre gran cantidad de vías metabólicas lo que genera cambios en el contenido

de aminoácidos, la tolerancia a diferentes tipos de estrés y probablemente, otras funciones celulares. El hallazgo de que Uga3 regula a ARG5,6 nos lleva a pensar que la arginina podría ser otra de las fuentes pobres que se utilizan por las células de *S. cerevisiae* de manera ordenada.

Comprender el meticuloso proceso mediante el cual se regula el metabolismo del nitrógeno en *S. cerevisiae* no solo podría facilitar la investigación sobre los mecanismos de regulación global y la ingeniería metabólica de la levadura, sino que también podría proporcionar información importante e inspiración para futuros estudios de otros microorganismos comunes y células eucariotas superiores.



Muñoz, Sebastian Anibal  
Doctorando



Bermúdez-Moretti, Mariana  
Directora de Tesis

## 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	40 mM
KCl	10 Mm
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
β-mercaptoetanol	50 mM
pH 7.0	

**Buffer ECZ**

B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> 10H <sub>2</sub> O	50 mM
SDS	30 mM
18-crown-6-eter	20 mM
pH 9,06	

**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**

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**

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**

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

**Solución de tinción**

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

**Solución decolorante**

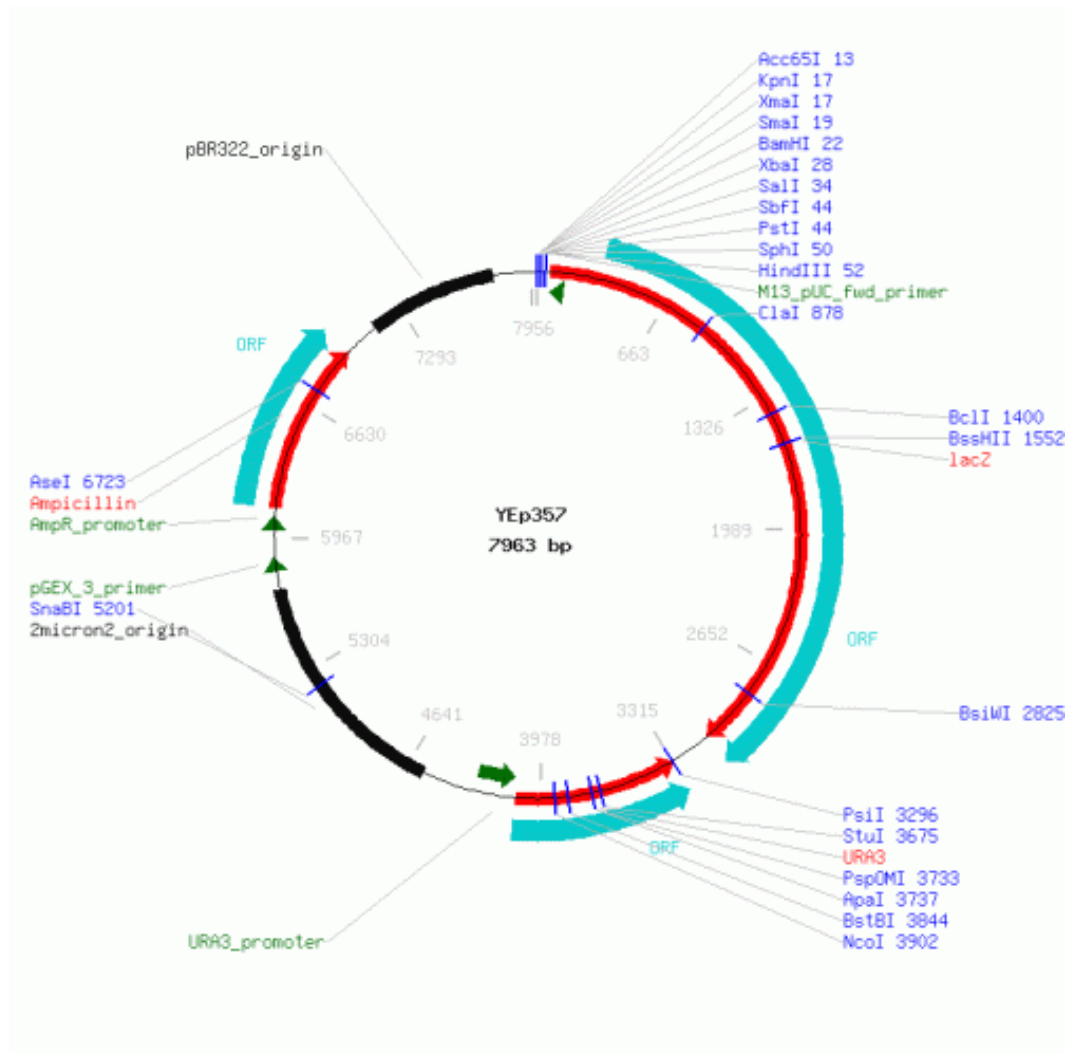
Metanol	45%
Ácido acético	7%





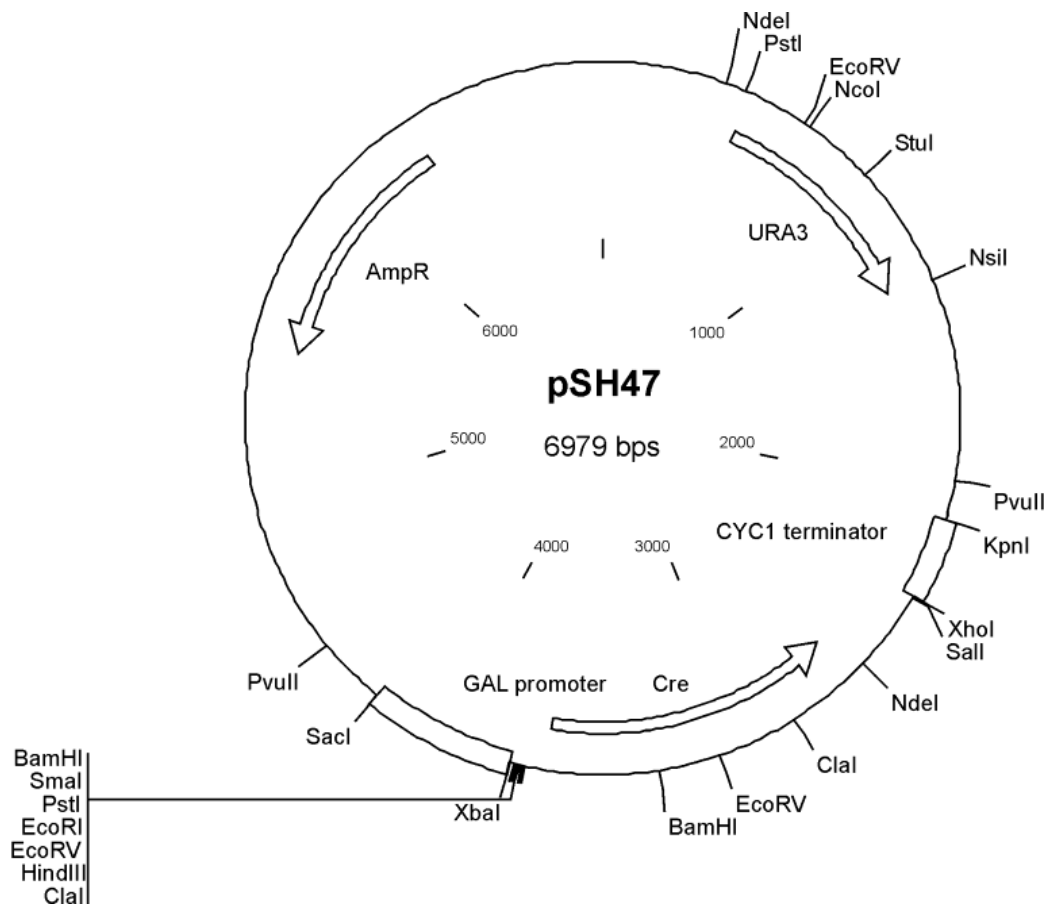
***Plásmidos:***

YEp357



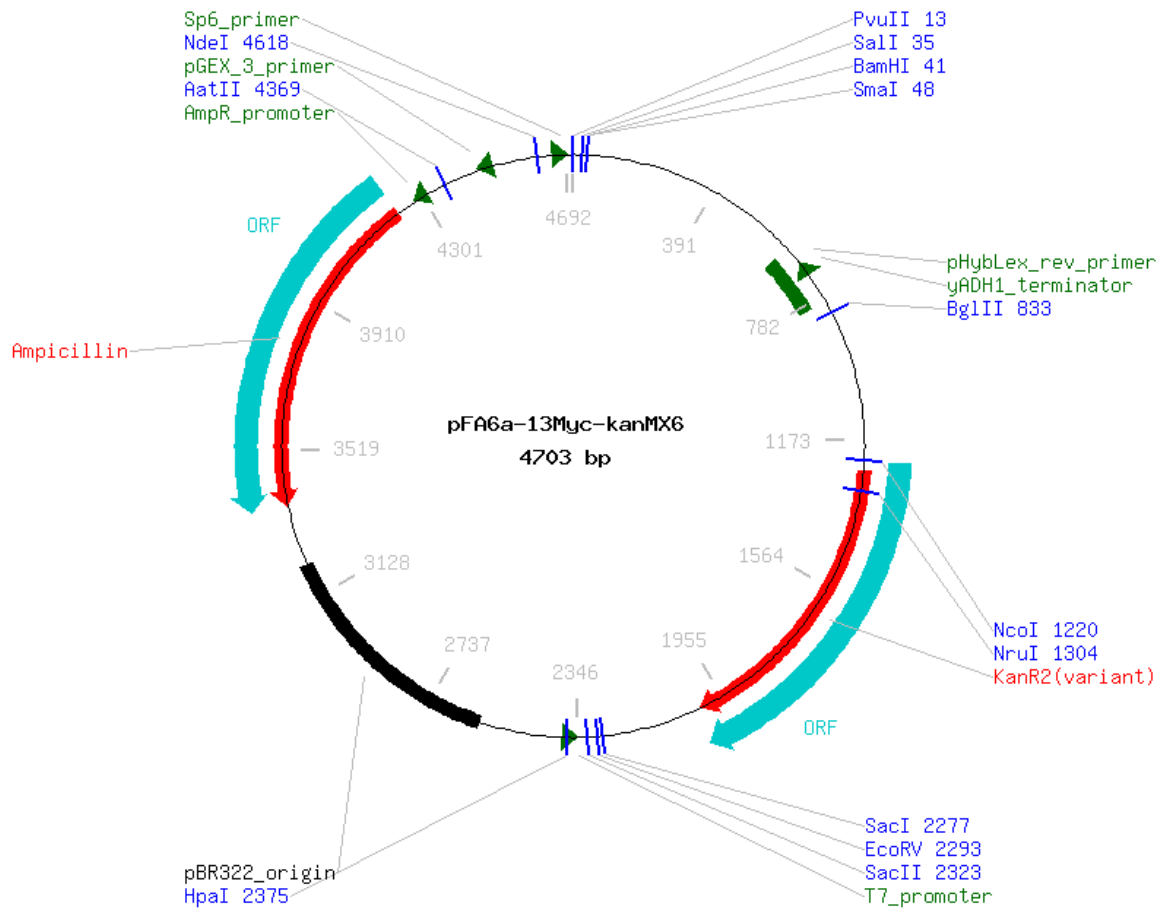
El plásmido YEp357 contiene un origen de replicación bacteriano y el origen de replicación de levaduras 2μ. También posee los genes Amp<sup>R</sup> y URA3 que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras respectivamente. Róo abajo del sitio múltiple de clonado se encuentra el gen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

pSH47



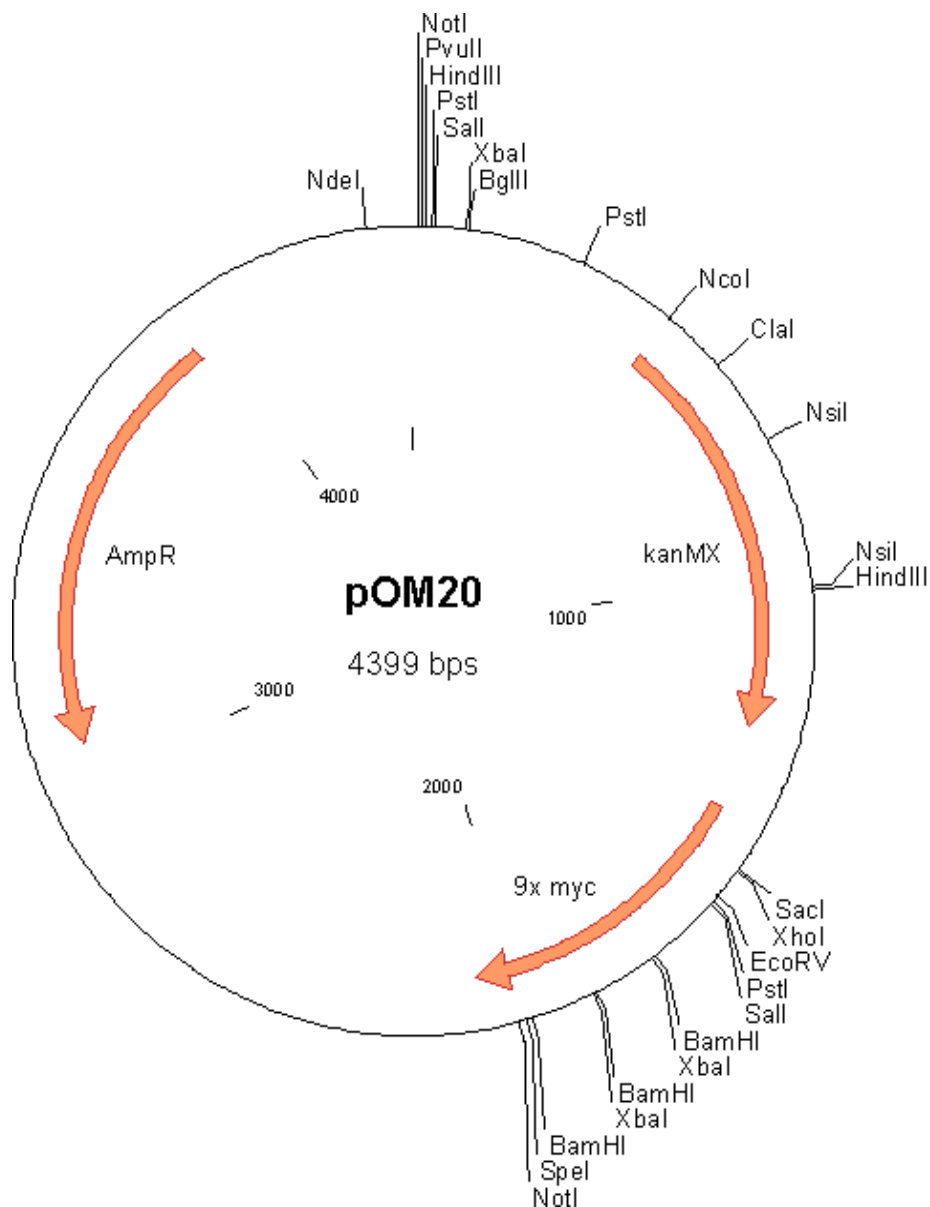
El plásmido pSH47 contiene un origen de replicación bacteriano y un origen de replicación de levaduras. También posee los genes Amp<sup>R</sup> y URA3 que permiten la selección de transformantes en bacterias y levaduras, respectivamente. Este plásmido contiene un gen que codifica para la recombinasa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

## pFA6a-13MYC-kanMX6



El plásmido pFA6a-13MYC-kanMX6 contiene un origen de replicación bacteriano y el gen Amp<sup>R</sup> 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.

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 río abajo de 9 epítopes myc en tandem.

**Análisis estadísticos**

Figura 14

Within each column,  
compare rows (simple  
effects within columns)

Number of families	2				
Number of comparisons per family	10				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>-leu</b>					
wt vs. uga3Δ	-3,394	-7,131 to 0,3418	No	ns	0,0891
wt vs. dal81Δ	0,3719	-3,364 to 4,108	No	ns	0,9984
wt vs. leu3Δ	-0,2953	-4,032 to 3,441	No	ns	0,9994
wt vs. gcn4Δ	-0,6913	-4,428 to 3,045	No	ns	0,9827
uga3Δ vs. dal81Δ	3,766	0,03009 to 7,503	Yes	*	0,0474
uga3Δ vs. leu3Δ	3,099	-0,6371 to 6,835	No	ns	0,1414
uga3Δ vs. gcn4Δ	2,703	-1,033 to 6,439	No	ns	0,2470
dal81Δ vs. leu3Δ	-0,6672	-4,403 to 3,069	No	ns	0,9849
dal81Δ vs. gcn4Δ	-1,063	-4,799 to 2,673	No	ns	0,9206
leu3Δ vs. gcn4Δ	-0,3960	-4,132 to 3,340	No	ns	0,9979
<b>+leu</b>					
wt vs. uga3Δ	5,475	1,738 to 9,211	Yes	**	0,0017
wt vs. dal81Δ	17,86	14,13 to 21,60	Yes	****	<0,0001
wt vs. leu3Δ	14,48	10,75 to 18,22	Yes	****	<0,0001
wt vs. gcn4Δ	18,56	14,82 to 22,29	Yes	****	<0,0001
uga3Δ vs. dal81Δ	12,39	8,653 to 16,13	Yes	****	<0,0001
uga3Δ vs. leu3Δ	9,010	5,274 to 12,75	Yes	****	<0,0001
uga3Δ vs. gcn4Δ	13,08	9,345 to 16,82	Yes	****	<0,0001
dal81Δ vs. leu3Δ	-3,379	-7,115 to 0,3572	No	ns	0,0913
dal81Δ vs. gcn4Δ	0,6924	-3,044 to 4,429	No	ns	0,9826
leu3Δ vs. gcn4Δ	4,071	0,3352 to 7,808	Yes	*	0,0274

Figura 15 A

Within each column, compare rows (simple effects within columns)

Number of families 2  
 Number of comparisons per family 10  
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>-leu</b>					
Wild type vs. <i>uga3</i>	31,19	-10,32 to 72,69	No	ns	0,2148
Wild type vs. <i>dal81</i>	-2,032	-43,53 to 39,47	No	ns	>0,9999
Wild type vs. <i>leu3</i>	29,15	-12,35 to 70,65	No	ns	0,2734
Wild type vs. <i>gcn4Δ</i>	1,757	-39,74 to 43,26	No	ns	>0,9999
<i>uga3</i> vs. <i>dal81</i>	-33,22	-74,72 to 8,283	No	ns	0,1660
<i>uga3</i> vs. <i>leu3</i>	-2,035	-43,54 to 39,47	No	ns	>0,9999
<i>uga3</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	-29,43	-70,93 to 12,07	No	ns	0,2648
<i>dal81</i> vs. <i>leu3</i>	31,18	-10,32 to 72,68	No	ns	0,2149
<i>dal81</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	3,789	-37,71 to 45,29	No	ns	0,9989
<i>leu3</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	-27,39	-68,89 to 14,11	No	ns	0,3317
<b>+leu</b>					
Wild type vs. <i>uga3</i>	116,5	74,97 to 158,0	Yes	****	<0,0001
Wild type vs. <i>dal81</i>	46,97	5,465 to 88,47	Yes	*	0,0204
Wild type vs. <i>leu3</i>	66,36	24,85 to 107,9	Yes	***	0,0006
Wild type vs. <i>gcn4Δ</i>	98,59	57,09 to 140,1	Yes	****	<0,0001
<i>uga3</i> vs. <i>dal81</i>	-69,51	-111,0 to -28,01	Yes	***	0,0003
<i>uga3</i> vs. <i>leu3</i>	-50,12	-91,62 to -8,619	Yes	*	0,0118
<i>uga3</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	-17,89	-59,39 to 23,61	No	ns	0,7226
<i>dal81</i> vs. <i>leu3</i>	19,39	-22,11 to 60,89	No	ns	0,6599
<i>dal81</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	51,62	10,12 to 93,12	Yes	**	0,0091
<i>leu3</i> vs. <i>gcn4Δ</i>	32,23	-9,268 to 73,73	No	ns	0,1885

Figura 15 B



Within each column, compare rows  
(simple effects within columns)

Number of families 2  
 Number of comparisons per family 10  
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>-leu</b>				
wt vs. uga3Δ	-0,6604	-15,23 to 13,91	No ns	>0,9999
wt vs. dal81Δ	-0,9956	-15,57 to 13,58	No ns	0,9996
wt vs. leu3Δ	-9,121	-23,69 to 5,451	No ns	0,3627
wt vs. gcn4Δ	-2,969	-17,54 to 11,60	No ns	0,9719
uga3Δ vs. dal81Δ	-0,3352	-14,91 to 14,24	No ns	>0,9999
uga3Δ vs. leu3Δ	-8,461	-23,03 to 6,111	No ns	0,4350
uga3Δ vs. gcn4Δ	-2,308	-16,88 to 12,26	No ns	0,9889
dal81Δ vs. leu3Δ	-8,126	-22,70 to 6,446	No ns	0,4741
dal81Δ vs. gcn4Δ	-1,973	-16,55 to 12,60	No ns	0,9939
leu3Δ vs. gcn4Δ	6,153	-8,419 to 20,72	No ns	0,7155
<b>+leu</b>				
wt vs. uga3Δ	7,267	-7,305 to 21,84	No ns	0,5788
wt vs. dal81Δ	19,07	4,498 to 33,64	Yes **	0,0068
wt vs. leu3Δ	-12,48	-27,05 to 2,095	No ns	0,1162
wt vs. gcn4Δ	28,50	13,93 to 43,08	Yes ****	<0,0001
uga3Δ vs. dal81Δ	11,80	-2,769 to 26,37	No ns	0,1497
uga3Δ vs. leu3Δ	-19,74	-34,32 to -5,172	Yes **	0,0050
uga3Δ vs. gcn4Δ	21,24	6,664 to 35,81	Yes **	0,0025
dal81Δ vs. leu3Δ	-31,55	-46,12 to -16,97	Yes ****	<0,0001
dal81Δ vs. gcn4Δ	9,433	-5,139 to 24,01	No ns	0,3310
leu3Δ vs. gcn4Δ	40,98	26,41 to 55,55	Yes ****	<0,0001

Figura 16 A

Table Analyzed	Transpose of Row stats of Transpose of Row stats of DAL81:Transposed Data
Column B	leu3Δ
vs.	vs,
Column A	wt
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=35,32, df=6
How big is the difference?	
Mean of column A	43,23
Mean of column B	6,400
Difference between means (B - A) ± SEM	-36,83 ± 1,043
95% confidence interval	-39,38 to -34,27
R squared (eta squared)	0,9952
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	8,221, 3, 3
P value	0,1172
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	4
Sample size, column B	4

Figura 16 B

Table Analyzed	Transpose of Row stats of Transpose of Row stats of DAL81:Transposed Data
----------------	---

Column B	leu3Δ
vs.	vs,
Column A	wt
Unpaired t test	
P value	<0,0001
P value summary	****
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=35,32, df=6
How big is the difference?	
Mean of column A	43,23
Mean of column B	6,400
Difference between means (B - A) ±	
SEM	-36,83 ± 1,043
95% confidence interval	-39,38 to -34,27
R squared (eta squared)	0,9952
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	8,221, 3, 3
P value	0,1172
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
Data analyzed	
Sample size, column A	4
Sample size, column B	4

Figura 17 A

Compare cell means regardless of rows and columns

Number of families 1  
 Number of comparisons per family 15  
 Alpha 0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
<b>wt :-Leu vs. wt :+Leu</b>	<b>-81,01</b>	<b>-120,2 to -41,86</b>	<b>Yes</b>	<b>****</b>	<b>&lt;0,0001</b>
wt :-Leu vs. dal81Δ :-Leu	-22,55	-61,70 to 16,60	No	ns	0,4721
wt :-Leu vs. dal81Δ :+Leu	-38,75	-77,89 to 0,4020	No	ns	0,0533
wt :-Leu vs. uga3Δ :-Leu	-19,12	-58,27 to 20,03	No	ns	0,6377
wt :-Leu vs. uga3Δ :+Leu	-29,82	-68,97 to 9,327	No	ns	0,2008
wt :+Leu vs. dal81Δ :-Leu	58,46	19,31 to 97,61	Yes	**	0,0019
wt :+Leu vs. dal81Δ :+Leu	42,27	3,118 to 81,42	Yes	*	0,0301
wt :+Leu vs. uga3Δ :-Leu	61,90	22,75 to 101,0	Yes	**	0,0011
wt :+Leu vs. uga3Δ :+Leu	51,19	12,04 to 90,34	Yes	**	0,0066
dal81Δ :-Leu vs. dal81Δ :+Leu	-16,19	-55,34 to 22,95	No	ns	0,7736
dal81Δ :-Leu vs. uga3Δ :-Leu	3,435	-35,71 to 42,58	No	ns	0,9997
dal81Δ :-Leu vs. uga3Δ :+Leu	-7,270	-46,42 to 31,88	No	ns	0,9904
dal81Δ :+Leu vs. uga3Δ :-Leu	19,63	-19,52 to 58,78	No	ns	0,6127
dal81Δ :+Leu vs. uga3Δ :+Leu	8,924	-30,22 to 48,07	No	ns	0,9763
uga3Δ :-Leu vs. uga3Δ :+Leu	-10,70	-49,85 to 28,44	No	ns	0,9492

Figura 17 B

Number of families 1

Number of comparisons per family

2

Alpha

0,05

Dunnett's multiple comparisons test

Mean

Diff, 95,00% CI of diff, Significant?

Summary

Adjusted P Value

A-?

wt vs. dal81Δ

26,20

25,03 to 27,37

Yes

\*\*\*\*

<0,0001

B dal81Δ

wt vs. gcn4Δ

55,80

54,63 to 56,97

Yes

\*\*\*\*

<0,0001

C gcn4Δ

Test details

Mean 1

Mean 2

Mean Diff, SE of diff,

n1

n2

q

DF

wt vs. dal81Δ

60,73

34,53

26,20

0,4489

4

4

58,36

9

wt vs. gcn4Δ

60,73

4,925

55,80

0,4489

4

4

124,3

9



## REFERENCIAS

Abadjieva, A., et al.

- 2001 A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase. *J Biol Chem* 276(46):42869-80.

Abdel-Sater, F., et al.

- 2004a Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Mol Cell Biol* 24(22):9771-85.

Abdel-Sater, F., et al.

- 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(4):1727-39.

Alani, E., L. Cao, and N. Kleckner

- 1987 A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* 116(4):541-5.

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(2):269-76.

Andre, B., et al.

- 1993 Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 237(1-2):17-25.

Andre, B., and J. C. Jauniaux

- 1990 Nucleotide sequence of the yeast UGA1 gene encoding GABA transaminase. *Nucleic Acids Res* 18(10):3049.

Andre, B., et al.

- 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(4):558-64.

Andreasson, C., S. Heessen, and P. O. Ljungdahl

- 2006 Regulation of transcription factor latency by receptor-activated proteolysis. *Genes Dev* 20(12):1563-8.

Andreasson, C., and P. O. Ljungdahl



2002 Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes Dev* 16(24):3158-72.

—

2004 The N-terminal regulatory domain of Stp1p is modular and, fused to an artificial transcription factor, confers full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor control. *Mol Cell Biol* 24(17):7503-13.

Arakawa, T., et al.

2007 Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem* 127(1-2):1-8.

Bach, B., et al.

2009 New insights into  $\gamma$ -aminobutyric acid catabolism: Evidence for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 75(13):4231-9.

Bassett, D. E., Jr., M. S. Boguski, and P. Hieter

1996 Yeast genes and human disease. *Nature* 379(6566):589-90.

Baudin, A., et al.

1993 A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21(14):3329-30.

Bearson, B. L., I. S. Lee, and T. A. Casey

2009 *Escherichia coli* O157 : H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge. *Microbiology (Reading)* 155(Pt 3):805-812.

Beck, T., and M. N. Hall

1999 The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402(6762):689-92.

Bechet, J., M. Greenson, and J. M. Wiame

1970 Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 12(1):31-9.

Beltran, G., et al.

2004 Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res* 4(6):625-32.

Bermudez Moretti, M., et al.

1995 GABA uptake in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41(6):843-9.

Bermudez Moretti, M., et al.

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(2):137-40.

Bernard, F., and B. Andre

2001a Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 41(2):489-502.

—

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(2-3):81-5.

Bertram, P. G., et al.

2000 Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* 275(46):35727-33.

Bertram, P. G., et al.

2002 Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology* 22(4):1246-1252.

Bianchi, F., et al.

2019 Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 83(4).

Boban, M., and P. O. Ljungdahl

2007 Dal81 enhances Stp1- and Stp2-dependent transcription necessitating negative modulation by inner nuclear membrane protein Asi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 176(4):2087-97.

Boban, M., et al.

2006 Asi1 is an inner nuclear membrane protein that restricts promoter access of two latent transcription factors. *J Cell Biol* 173(5):695-707.

Boer, V. M., et al.

2005 Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res* 5(10):885-97.

Boonchird, C., F. Messenguy, and E. Dubois

1991 Determination of amino acid sequences involved in the processing of the ARG5/ARG6 precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 199(2):325-35.

Borodina, I., and J. Nielsen

2014 Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J* 9(5):609-20.

Bosch, D., and A. Saiardi

2012 Arginine transcriptional response does not require inositol phosphate synthesis. *J Biol Chem* 287(45):38347-55.

Botstein, D.

1997 GENETICS: Yeast as a Model Organism. *Science* 277(5330):1259-1260.

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* 72:248-54.

Brandriss, M. C., and D. A. Falvey

1992 Proline biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the PRO3 gene, which encodes delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase. *J Bacteriol* 174(15):5176.

Bricmont, P. A., J. R. Daugherty, and T. G. Cooper

1991 The DAL81 gene product is required for induced expression of two differently regulated nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11(2):1161-6.

Brosnan, J. T., and M. E. Brosnan

2013 Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 45(3):413-8.

Cao, J., et al.

2013 GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. *Yeast* 30(4):129-44.

Cardillo, S. B., M. Bermudez Moretti, and S. Correa Garcia

2010 Uga3 and Uga35/Dal81 transcription factors regulate UGA4 transcription in response to gamma-aminobutyric acid and leucine. *Eukaryot Cell* 9(8):1262-71.

Cardillo, S. B., S. Correa Garcia, and M. Bermudez Moretti

- 2011 Common features and differences in the expression of the three genes forming the UGA regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 410(4):885-9.

Cardillo, S. B., et al.

- 2012 Interplay between the transcription factors acting on the GATA- and GABA-responsive elements of *Saccharomyces cerevisiae* UGA promoters. *Microbiology* 158(Pt 4):925-35.

Coffman, J. A., et al.

- 1996 Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16(3):847-58.

Coffman, J. A., et al.

- 1997 Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179(11):3416-29.

Coleman, S. T., et al.

- 2001 Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276(1):244-50.

Conrad, M., et al.

- 2014 Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 38(2):254-99.

Cools, M., et al.

- 2020 Nitrogen coordinated import and export of arginine across the yeast vacuolar membrane. *PLoS Genet* 16(8):e1008966.

Cooper, T.

- 1982 Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Monograph Archive:39-99.

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(3):223-38.

Cooper, T. G., C. Lam, and V. Turoscy

- 1980 Structural analysis of the *dur* loci in *S. cerevisiae*: two domains of a single multifunctional gene. *Genetics* 94(3):555-80.

Cooper, T. G., J. McKelvey, and R. Sumrada

1979 Oxalurate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 139(3):917-23.

Coornaert, D., S. Vissers, and B. Andre

1991 The pleiotropic UGA35(DURL) regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequence and identity with the DAL81 gene. *Gene* 97(2):163-71.

Coornaert, D., et al.

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(4-5):301-7.

Correa Garcia, S., et al.

1997 Carbon and nitrogen sources regulate delta-aminolevulinic acid and gamma-aminobutyric acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Biochem Cell Biol* 29(8-9):1097-101.

Correa García, Susana, 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(2):219-224.

Cox, K. H., et al.

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. *J Biol Chem* 275(23):17611-8.

Cox, K. H., J. J. Tate, and T. G. Cooper

2002 Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277(40):37559-66.

Crepin, L., et al.

2012 Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Appl Environ Microbiol* 78(22):8102-11.

Cunningham, T. S., R. A. Dorrington, and T. G. Cooper

1994 The UGA4 UASNTR site required for GLN3-dependent transcriptional activation also mediates DAL80-responsive regulation and DAL80 protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176(15):4718-25.

Cunningham, T. S., R. Rai, and T. G. Cooper

2000 The level of DAL80 expression down-regulates GATA factor-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182(23):6584-91.

Cunningham, T. S., et al.

1996 G1n3p is capable of binding to UAS(NTR) elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178(12):3470-9.

Cheng, Y., et al.

2016 Protective Effects of Arginine on *Saccharomyces cerevisiae* Against Ethanol Stress. *Sci Rep* 6:31311.

De Boer, M., et al.

1998 Regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 30(3):603-13.

de Boer, M., et al.

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(4):974-81.

de Cima, S., et al.

2012 Insight on an arginine synthesis metabolon from the tetrameric structure of yeast acetylglutamate kinase. *PLoS One* 7(4):e34734.

de Sousa Abreu, R., et al.

2009 Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5(12):1512-26.

Delaglio, F., et al.

1995 NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6(3):277-93.

Dhakal, R., V. K. Bajpai, and K. H. Baek

2012 Production of gaba (gamma - Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz J Microbiol* 43(4):1230-41.

Di Como, C. J., and K. T. Arndt

1996 Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* 10(15):1904-1916.

Dickinson, J. R.

2000 Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Methods Enzymol* 324:80-92.

Didion, T., et al.

1996 Amino acids induce expression of BAP2, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178(7):2025-9.

Didion, T., et al.

1998 The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acid and peptide transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 27(3):643-50.

Eden, E., et al.

2009 GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:48.

Fayyad-Kazan, M., et al.

2016 Yeast nitrogen catabolite repression is sustained by signals distinct from glutamine and glutamate reservoirs. *Mol Microbiol* 99(2):360-79.

Feyder, S., et al.

2015 Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci* 16(1):1509-25.

Forsberg, H., et al.

2001a The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol Microbiol* 42(1):215-28.

Forsberg, H., et al.

2001b Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158(3):973-88.

Friden, P., and P. Schimmel

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(7):2690-2697.

—

1988b LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol Cell Biol* 8(7):2690-7.

Gauss, R., et al.

- 2005 New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22(1):1-12.
- Georis, I., et al.
- 2009 The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol Cell Biol* 29(13):3803-15.
- Georis, I., et al.
- 2008 Tor pathway control of the nitrogen-responsive DAL5 gene bifurcates at the level of Gln3 and Gat1 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.
- Georis, I., et al.
- 2015 Premature termination of GAT1 transcription explains paradoxical negative correlation between nitrogen-responsive mRNA, but constitutive low-level protein production. *RNA Biol* 12(8):824-37.
- Ghosh, R., S. Sharma, and K. Chattopadhyay
- 2009 Effect of arginine on protein aggregation studied by fluorescence correlation spectroscopy and other biophysical methods. *Biochemistry* 48(5):1135-43.
- Godard, P., et al.
- 2007 Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27(8):3065-86.
- Goldstein, A. L., and J. H. McCusker
- 1999 Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15(14):1541-53.
- Gonzalez, B., J. Francois, and M. Renaud
- 1997 A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13(14):1347-55.
- Grauslund, M., et al.
- 1995 BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1269(3):275-80.
- Grenson, M.
- 1987 4-aminobutyric acid (GABA) uptake in Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the general amino-acid permease, the proline permease and GABA-specific integrated into the GABA-catabolic pathway. *Biochem.* 6:35-39.
- Gueldener, U., et al.



- 2002 A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30(6):e23.

Guldener, U., et al.

- 1996 A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24(13):2519-24.

Guo, Hui, and Gunter B. Kohlhaw

- 1996 Regulation of transcription in mammalian cells by yeast Leu3p and externally supplied inducer. *FEBS Letters* 390(2):191-195.

Haas, H., and G. A. Marzluf

- 1995 NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. *Curr Genet* 28(2):177-83.

Hall, D. A., et al.

- 2004 Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* 306(5695):482-4.

Harbison, C. T., et al.

- 2004 Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431(7004):99-104.

Hazelwood, L. A., et al.

- 2008 The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74(8):2259-66.

Hellauer, K., M. H. Rochon, and B. Turcotte

- 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(11):6096-6102.

Hinnebusch, A. G., and K. Natarajan

- 2002 Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* 1(1):22-32.

Ho, B., A. Baryshnikova, and G. W. Brown

- 2018 Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst* 6(2):192-205 e3.

Hoffmann, W.

1985 Molecular characterization of the CAN1 locus in *Saccharomyces cerevisiae*. A transmembrane protein without N-terminal hydrophobic signal sequence. *J Biol Chem* 260(21):11831-7.

Hofman-Bang, J.

1999 Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* 12(1):35-73.

Hu, Y., T. G. Cooper, and G. B. Kohlhaw

1995 The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of GDH1, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol Cell Biol* 15(1):52-7.

Huang da, W., B. T. Sherman, and R. A. Lempicki

2009 Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4(1):44-57.

Idicula, A. M., et al.

2002 Binding and activation by the zinc cluster transcription factors of *Saccharomyces cerevisiae*. Redefining the UAS<sub>GABA</sub> and its interaction with Uga3p. *J Biol Chem* 277(48):45977-83.

Idicula, Anu Mary

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. , Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Rhodes University.

Iraqi, I., et al.

1999 Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol Cell Biol* 19(2):989-1001.

Jacobs, P., J. C. Jauniaux, and M. Grenson

1980 A cis-dominant regulatory mutation linked to the argB-argC gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 139(4):691-704.

Janke, C., et al.

2004 A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21(11):947-62.

Jauniaux, J. C., and M. Grenson

1990 GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur J Biochem* 190(1):39-44.

Jiang, Y., and J. R. Broach

1999 Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J* 18(10):2782-92.

Jorgensen, M. U., et al.

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(3):241-7.

Kanehisa, M., and S. Goto

2000 KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28(1):27-30.

Karathia, H., et al.

2011 *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One* 6(2):e16015.

Kim, J., and K. L. Guan

2011 Amino acid signaling in TOR activation. *Annu Rev Biochem* 80:1001-32.

Klasson, H., G. R. Fink, and P. O. Ljungdahl

1999 Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 19(8):5405-16.

Kohlhaw, G. B.

2003 Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(1):1-15, table of contents.

Koussounadis, A., et al.

2015 Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Sci Rep* 5:10775.

Krogerus, K., and B. R. Gibson

2013 Influence of valine and other amino acids on total diacetyl and 2,3-pentanedione levels during fermentation of brewer's wort. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(15):6919-30.

Laity, John H., Brian M. Lee, and Peter E. Wright

- 2001 Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11(1):39-46.
- Lambert, J. P., et al.
- 2009 A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Mol Cell Proteomics* 8(4):870-82.
- Langle-Rouault, F., and E. Jacobs
- 1995 A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recycable selectable marker. *Nucleic Acids Res* 23(15):3079-81.
- Levi, C. E., et al.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 421(3):572-7.
- Li, J., Y. Pan, and G. Liu
- 2013 Disruption of the nitrogen regulatory gene *AcareA* in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of cephalosporin production and repression of nitrogen metabolism. *Fungal Genet Biol* 61:69-79.
- Liu, Z., et al.
- 2008 Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Mol Cell Biol* 28(2):551-63.
- Ljungdahl, P. O.
- 2009 Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 1):242-7.
- Ljungdahl, P. O., and B. Daignan-Fornier
- 2012 Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(3):885-929.
- Loewith, R., and M. N. Hall
- 2011 Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189(4):1177-201.
- Longtine, M. S., et al.
- 1998 Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(10):953-61.
- Luzzani, C., et al.

2007 New insights into the regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* UGA4 gene: two parallel pathways participate in carbon-regulated transcription. *Microbiology* 153(Pt 11):3677-84.

Lynch, C. J., and S. H. Adams

2014 Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 10(12):723-36.

Maclsaac, K. D., et al.

2006 An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* 7:113.

MacPherson, S., M. Larochelle, and B. Turcotte

2006 A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(3):583-604.

Magasanik, B., and C. A. Kaiser

2002 Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290(1-2):1-18.

Majd, H., et al.

2018 Screening of candidate substrates and coupling ions of transporters by thermostability shift assays. *Elife* 7.

Mamane, Y., et al.

1998 A Linker Region of the Yeast Zinc Cluster Protein Leu3p Specifies Binding to Everted Repeat DNA. *Journal of Biological Chemistry* 273(29):18556-18561.

Manivasakam, P., et al.

1995 Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23(14):2799-800.

Mara, P., et al.

2018 The pleiotropic effects of the glutamate dehydrogenase (GDH) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 17(1):170.

Mat Nanyan, N. S. B., and H. Takagi

2020 Proline Homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: How Does the Stress-Responsive Transcription Factor Msn2 Play a Role? *Front Genet* 11:438.

McCormick, M. A., S. Y. Tsai, and B. K. Kennedy

2011 TOR and ageing: a complex pathway for a complex process. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561):17-27.

Messenguy, F., and E. Dubois

- 2003 Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316:1-21.

Mi, H., et al.

- 2017 PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 45(D1):D183-D189.

Morita, Y., S. Nakamori, and H. Takagi

- 2002 Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 94(5):390-4.

Morschhauser, J.

- 2011 Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol* 301(5):390-4.

Mulleder, M., et al.

- 2016 Functional Metabolomics Describes the Yeast Biosynthetic Regulome. *Cell* 167(2):553-565 e12.

Myers, A. M., et al.

- 1986 Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* 45(3):299-310.

Natarajan, K., et al.

- 2001 Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21(13):4347-68.

Niehaus, E. M., et al.

- 2013 Genetic manipulation of the *Fusarium fujikuroi* fusarin gene cluster yields insight into the complex regulation and fusarin biosynthetic pathway. *Chem Biol* 20(8):1055-66.

Nielsen, P. S., et al.

- 2001 Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* amino acid permease gene BAP2. *Mol Gen Genet* 264(5):613-22.

Noel, J., and B. Turcotte

- 1998 Zinc cluster proteins Leu3p and Uga3p recognize highly related but distinct DNA targets. *J Biol Chem* 273(28):17463-8.

Oliphant, A. R., C. J. Brandl, and K. Struhl

- 1989 Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. *Mol Cell Biol* 9(7):2944-9.

Omnus, D. J., and P. O. Ljungdahl

- 2013 Rts1-protein phosphatase 2A antagonizes Ptr3-mediated activation of the signaling protease Ssy5 by casein kinase I. *Mol Biol Cell* 24(9):1480-92.

Omnus, D. J., et al.

- 2011 A phosphodegron controls nutrient-induced proteasomal activation of the signaling protease Ssy5. *Mol Biol Cell* 22(15):2754-65.

Palavecino-Ruiz, M., M. Bermudez-Moretti, and S. Correa-Garcia

- 2017 Unravelling the transcriptional regulation of *Saccharomyces cerevisiae* UGA genes: the dual role of transcription factor Leu3. *Microbiology* 163(11):1692-1701.

Palavecino, M. D., S. R. Correa-Garcia, and M. Bermudez-Moretti

- 2015a Genes of Different Catabolic Pathways Are Coordinately Regulated by Dal81 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Amino Acids* 2015:484702.

Palavecino, Marcos D., et al.

- 2015b Genes of Different Catabolic Pathways Are Coordinately Regulated by Dal81 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Amino Acids* 2015:8.

Park, J. H., and S. Y. Lee

- 2010 Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(3):491-506.

Pfaffmann, T., et al.

- 2010 The prodomain of Ssy5 protease controls receptor-activated proteolysis of transcription factor Stp1. *Mol Cell Biol* 30(13):3299-309.

Poulou, M., et al.

- 2010 Development of a chromosomally integrated metabolite-inducible Leu3p-alpha-IPM "off-on" gene switch. *PLoS One* 5(8):e12488.

Poulsen, P., et al.

- 2005 Amino acid sensing by Ssy1. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 1):261-4.

Ramos, F., et al.

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(2):401-4.

Raudvere, U., et al.

2019 g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47(W1):W191-W198.

Regenberg, B., and J. Hansen

2000 GAP1, a novel selection and counter-selection marker for multiple gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16(12):1111-9.

Roberg, K. J., N. Rowley, and C. A. Kaiser

1997 Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 137(7):1469-82.

Rodkaer, S. V., and N. J. Faergeman

2014 Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 14(5):683-96.

Rohde, J. R., and M. E. Cardenas

2003 The Tor Pathway Regulates Gene Expression by Linking Nutrient Sensing to Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology* 23(2):629-635.

Rudolph, A. S., and J. H. Crowe

1985 Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22(4):367-77.

Scott, S., A. T. Abul-Hamd, and T. G. Cooper

2000 Roles of the Dal82p domains in allophanate/oxalurate-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(40):30886-93.

Scherens, B., et al.

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 Res* 6(5):777-91.

Schmidt, A., M. N. Hall, and A. Koller

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(10):6597-6606.

Schneider, C. P., D. Shukla, and B. L. Trout



- 2011 Effects of solute-solute interactions on protein stability studied using various counterions and dendrimers. PLoS One 6(11):e27665.

Schneiter, Roger

- 2004 Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast, 2004.

Schreve, J.L.; , J.K.; Sin, and J.M. Garrett

- 1998 The *Saccharomyces cerevisiae* YCC5 (YCL025c) gene encodes an amino acid permease, Agp1, which transports asparagine and glutamine.

. J Bacteriol 180(9):2556-2556.

Sheff, M. A., and K. S. Thorn

- 2004 Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 21(8):661-70.

Shelest, E.

- 2008 Transcription factors in fungi. FEMS Microbiol Lett 286(2):145-51.

Shima, J., et al.

- 2003 Disruption of the CAR1 gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 69(1):715-8.

Shimazu, M., et al.

- 2005 A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 280(6):4851-7.

Shin, C. S., S. Y. Kim, and W. K. Huh

- 2009 TORC1 controls degradation of the transcription factor Stp1, a key effector of the SPS amino-acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Sci 122(Pt 12):2089-99.

Sinha, A. K., and J. K. Bhattacharjee

- 1971 Lysine biosynthesis in *Saccharomyces*. Conversion of  $\epsilon$ -aminoadipate into  $\epsilon$ -aminoadipic  $\epsilon$ -semialdehyde. Biochem J 125(3):743-9.

Soussi-Boudekou, S., et al.

- 1997 Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol 23(6):1157-68.

Springael, J. Y., and B. Andre

1998 Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9(6):1253-63.

Stanbrough, M., D. W. Rowen, and B. Magasanik

1995 Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21):9450-4.

Studt, L., et al.

2012 Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4468-80.

Szklarczyk, D., et al.

2019 STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47(D1):D607-D613.

Takagi, H.

2008 Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(2):211-23.

Takagi, H., J. Taguchi, and T. Kaino

2016 Proline accumulation protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase from ethanol stress by reducing reactive oxygen species levels. *Yeast* 33(8):355-63.

Talibi, D., M. Grenson, and B. Andre

1995 Cis- and trans-acting elements determining induction of the genes of the gamma-aminobutyrate (GABA) utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 23(4):550-7.

Tang, L., X. Liu, and N. D. Clarke

2006 Inferring direct regulatory targets from expression and genome location analyses: a comparison of transcription factor deletion and overexpression. *BMC Genomics* 7:215.

Tate, J. J., and T. G. Cooper

2007 Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. *J Biol Chem* 282(25):18467-80.

—

2013 Five conditions commonly used to down-regulate tor complex 1 generate different physiological situations exhibiting distinct requirements and outcomes. *J Biol Chem* 288(38):27243-62.

Tate, J. J., et al.

2010 Distinct phosphatase requirements and GATA factor responses to nitrogen catabolite repression and rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285(23):17880-95.

ter Schure, E. G., N. A. van Riel, and C. T. Verrips

2000 The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 24(1):67-83.

Todd, R. B., et al.

2014 Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. *BMC Genomics* 15:214.

Tone, J., et al.

2015 A vacuolar membrane protein Avt7p is involved in transport of amino acid and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 79(2):190-5.

Tsolmonbaatar, A., et al.

2016 Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses. *Int J Food Microbiol* 238:233-240.

Tyanova, S., et al.

2016 The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13(9):731-40.

Uemura, T., K. Kashiwagi, and K. Igarashi

2005 Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 328(4):1028-33.

Uemura, T., et al.

2004 Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 315(4):1082-7.

Venters, B. J., et al.

2011 A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell* 41(4):480-92.

Vissers, S., et al.

1990 Induction of the 4-aminobutyrate and urea-catabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Specific and common transcriptional regulators. *Eur J Biochem* 187(3):611-6.

Vogel, C., and E. M. Marcotte

- 2012 Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13(4):227-32.

Wach, A.

- 1996 PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 12(3):259-65.

Wach, A., et al.

- 1994 New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10(13):1793-808.

Wang, S. S., and A. K. Hopper

- 1988 Isolation of a yeast gene involved in species-specific pre-tRNA processing. *Molecular and Cellular Biology* 8(12):5140-5149.

Wang, S. S., et al.

- 1992 STP1, a gene involved in pre-tRNA processing, encodes a nuclear protein containing zinc finger motifs. *Molecular and Cellular Biology* 12(6):2633-2643.

Wielemans, K., et al.

- 2010 Amino acid signaling in yeast: post-genome duplication divergence of the Stp1 and Stp2 transcription factors. *J Biol Chem* 285(2):855-65.

Wiemann, P., et al.

- 2009 Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol* 72(4):931-46.

Wolfe, S. A., L. Nekludova, and C. O. Pabo

- 2000 DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:183-212.

Workman, J. J., H. Chen, and R. N. Larabee

- 2016 *Saccharomyces cerevisiae* TORC1 Controls Histone Acetylation by Signaling Through the Sit4/PP6 Phosphatase to Regulate Sirtuin Deacetylase Nuclear Accumulation. *Genetics* 203(4):1733-46.

Wu, B., et al.

- 2006 Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. *J Cell Biol* 173(3):327-31.

Wullschleger, S., R. Loewith, and M. N. Hall

2006 TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471-84.

Xu, Sha, et al.

2011 Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochemistry* 46(6):1230-1235.

Yasumura, A., S. Abe, and T. Tanaka

2008 Involvement of nitrogen regulation in *Bacillus subtilis* degU expression. *J Bacteriol* 190(15):5162-71.

Yu, S. L., et al.

2013 Alanine-metabolizing enzyme Alt1 is critical in determining yeast life span, as revealed by combined metabolomic and genetic studies. *J Proteome Res* 12(4):1619-27.

Zaman, S., et al.

2008 How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42:27-81.

Zargari, A., et al.

2007 Inner nuclear membrane proteins Asi1, Asi2, and Asi3 function in concert to maintain the latent properties of transcription factors Stp1 and Stp2. *J Biol Chem* 282(1):594-605.

Zhang, W., et al.

2018 Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 82(1).

Zhou, K., et al.

1987 Structure of yeast regulatory gene LEU3 and evidence that LEU3 itself is under general amino acid control. *Nucleic Acids Res* 15(13):5261-73.

Zhou, K. M., and G. B. Kohlhaw

1990 Transcriptional activator LEU3 of yeast. Mapping of the transcriptional activation function and significance of activation domain tryptophans. *J Biol Chem* 265(29):17409-12.