

03062
11
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *GLT1* (GOGAT)
MEDIADA POR EL COMPLEJO ADA/GCN5 EN *Saccharomyces
cerevisiae*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A:
BIÓLOGO SIMÓN GUZMÁN LEÓN

México D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

268526



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS:

A mis queridos Padres; Hermanitas, Hermanos y Sobrinos por que son imprescindibles...

A la Dra. Alicia González Manjarrez por ser el activador principal. Con mi admiración...Gracias

A la Dra. Lourdes Valenzuela Sanchez por su entusiasta Ayuda y Apoyo.

A ti mi estimadisima Agri...

AGRADECIMIENTOS :

Al donativo D.G.A.P.A. número IN204695.

A la D.G.A.P.A. por la beca otorgada para realizar este proyecto correspondiente a mis estudios de Maestría en IBB.

A mi comité tutorial: Dra. Alicia González Manjarrez, Dr. Roberto Coria Ortega y al Dr. Diego González Halphen.

A los miembros del Jurado: Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Susana Brom Klanner, Dr. Jorge Luis Folch Mallol y al Dr. Diego González Halphen.

Porsupuesto a cada uno de los co-activadores de la Fundación 301-Ote.
A la técnico Cristina Aranda Fraustro.

A mis amigas y amigos por ser sencillamente eso... Ahh y al mismísimo, la mismísima y por los mismísimos...gracias AMIGO.

A Jorge Ramirez por sus comentarios siempre importantes.

Al Dr. Luis Manuel Teran J. y su equipo de colaboradores.

Al Dr. Luis Padilla N.

Al Dr. Francisco Navarrete

A los reguladores positivos: "la repre" y "el centauro".

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR UNAM, EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MOLECULAR, LABORATORIO 301-ORIENTE, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ.

INDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN	
I) Vías de Asimilación de Amonio y Biosíntesis de Glutamato en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
II) Control Transcripcional en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
III) Regulación de la Expresión de los Genes que Codifican para la Glutamato Sintasa en Micro- organismos y en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
IV) Control General de la Biosíntesis de Aminoácidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
V) Papel de la Remodelación de la Cromatina en la Regulación Transcripcional de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
ANTECEDENTES.....	17
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	
I) Cepas, Cruzas y Condiciones de Crecimiento en la Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
II) Plásmidos.....	22
III) Determinación de Actividades Enzimáticas.....	23
IV) Deprivación de Aminoácidos.....	25
V) Transformaciones.....	25
VI) Construcción de Mutantes "Null".....	26
VII) Secuenciación Nucleotídica.....	26

RESULTADOS Y DISCUSION	
I) Clonación y Caracterización del Gen <i>GCN5</i>	28
II) En condiciones de Deprivación de Aminoácidos (Inducción) la Expresión del Gen <i>HIS3</i> es Dependiente del Complejo ADA/ <i>GCN5</i> o <i>SAGA</i>	34
III) La Expresión Basal del Gen <i>GLT1</i> es Dependiente del Complejo ADA/ <i>GCN5</i> o <i>SAGA</i>	38
IV) ¿En qué Región del Promotor de <i>GLT1</i> Actúa el Complejo ADA/ <i>GCN5</i> o <i>SAGA</i> ?	
a) Papel del Complejo ADA/ <i>GCN5</i> o <i>SAGA</i> en una cepa <i>GDH1</i> ⁺	42
b) Papel de <i>ADA2</i> y <i>GCN5</i>	46
c) Papel de <i>ADA3</i>	46
d) Papel del complejo ADA/ <i>GCN5</i> o <i>SAGA</i> en una cepa <i>gdh1</i> ⁻	47
V) Existen Otros Elementos que Regulan la Expresión de <i>GLT1</i> .	
a) La mutación en el gen <i>X</i> , presente en la cepa 2523, afecta la expresión de <i>GLT1</i>	50
b) ¿En qué Región del Promotor de <i>GLT1</i> actúa el producto del gen <i>X</i> (<i>Xp</i>)?.....	52
c) Una copia adicional de <i>Gcn5p</i> no suple la falta de <i>Xp</i>	53
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	57

ABREVIATURAS :

GDH1: Gen que codifica para la enzima GDH1-NADP⁺ en levadura.

GDH3: Gen que codifica la enzima GDH3-NADP⁺ en levadura.

GLT1: Gen que codifica la enzima GOGAT en levadura.

GCN5: Gen que codifica la acetilasa Gcn5 (Gcn5p) en levadura.

ADA: Complejo multiproteico formado por el producto de los genes ADA1, ADA2, ADA3 y ADA5.

SAGA: Complejo multiproteico que incluye al producto de los genes ADA/GCN5 y al producto de los genes SPT.

GS : Enzima glutamino sintetasa codificada por el gen *GLN1* en levadura.

SPT7, SPT20: Supresores de inserciones Ty, de función coactivadora.

TFIIs: Complejo multiproteico. Factores generales de transcripción.

TAFs: Complejo multiproteico que al unir a TBP forman TFIID. Factores generales de transcripción.

TBP: Proteína que se une a la caja TATA.

INR: Secuencia regulatoria de inicio de transcripción.

UASs: Secuencias de activación transcripcional, localizadas río arriba del inicio de la transcripción.

URSs: Secuencias de represión transcripcional, localizadas río arriba del inicio de la transcripción.

SWI/SNF: Complejo multiproteico de función coactivadora en la transcripción.

RCS: Complejo multiproteico de función coactivadora en la transcripción.

Gln3p: Producto del gen *GLN3* que funciona como un activador transcripcional.

Gcn4p: Producto del gen *GCN4* que funciona como un activador transcripcional.

Zn₂Cys₄: Motivo estructural de unión al DNA, de algun activador transcripcional.

5-MT : 5-metil triptofano, un inhibidor de la síntesis de triptofano que provoca deprivación.

3-AT : 3-amino triazol, un inhibidor de la síntesis de histidina que provoca deprivación.

GCN : Control general nitrogenado que se expresa en deprivación de aminoácidos.

HIS3 : Gen involucrado en la síntesis de histidina en levadura.

H1...H4 : Complejo de histonas nucleares.

Ire1p: Proteína que es activa en el desplegamiento de las proteínas.

EMS : Etil metano sulfonato. Mutageno químico.

β-gal : β- galactosidasa.

RESUMEN :

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima GOGAT (codificada por el gen *GLT1*) participa en la biosíntesis de glutamato. La finalidad de este trabajo es tener mayor entendimiento con respecto a la regulación transcripcional del gen *GLT1*. Así en este trabajo se establece que la regulación transcripcional de *GLT1* está mediada por elementos que remodelan la estructura de la cromatina; es decir, *GLT1* constituye un buen ejemplo en el que la modificación en la estructura de la cromatina está directamente relacionada con la activación transcripcional.

Nuestros resultados demuestran que uno de los elementos reguladores de la expresión de *GLT1* es el producto del gen *GCN5*. El producto del gen *GCN5* se ha descrito como una proteína que acetila histonas nucleares. Sin embargo Gcn5p forma parte del complejo coactivador llamado ADA o SAGA. En este trabajo también demostramos que mutantes carentes de alguno (*ADA2* o *ADA3*) de los constituyentes del complejo ADA también disminuyen la expresión de *GLT1*. Por lo tanto la expresión de *GLT1* depende del complejo ADA/GCN5. Más aún, los resultados generados a partir del análisis de mutantes regulatorias, nos permitió identificar otro(s) elemento(s) que también modifica(n) considerablemente la expresión de *GLT1*; y que muy probablemente se trate de un sistema distinto al de *GCN5*.

Actualmente estamos realizando experimentos con el fin de determinar que otros elementos participan en este sistema.

INTRODUCCIÓN :

La levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo eucarionte que constituye un modelo biológico de estudio muy interesante, ya que ofrece muchas ventajas para la investigación: fácil aislamiento de mutantes, fases haploide y diploide estables, heterotálico (mat a y mat α), generación de 4 esporas en un saco como producto de un evento meiótico, tiempo de duplicación corto, alta tasa de recombinación homóloga, métodos sencillos de transformación, accesible para la clonación de genes y para el análisis molecular utilizando todas las técnicas modernas, genoma completamente secuenciado y con las bases de datos apropiadas (Sherman, F. 1991).

I Vías de Asimilación de Amonio y Biosíntesis de Glutamato en *Saccharomyces cerevisiae* :

Al igual que otros microorganismos, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar amonio como única fuente de nitrógeno. Así todos los constituyentes celulares que contienen nitrógeno pueden ser sintetizados a partir de intermediarios derivados de la degradación de una fuente principal de amonio y carbono. El amonio se asimila a través de la biosíntesis de glutamato y glutamina. En el caso de bacterias entéricas, y presumiblemente en levaduras, aproximadamente el 88% de todo el nitrógeno celular se deriva del grupo amino del glutamato y un 12% a partir del grupo amido de la glutamina (Reitzer and Magasanik, 1987). El amonio se transporta al interior de la célula por medio de la acción de permeasas específicas (Grenson, M. 1983). En el interior de la célula, el amonio es asimilado por acción de las siguientes enzimas:

Glutamato Deshidrogenasa 1-NADP⁺ (GDH1-NADP⁺), codificada por el gen *GDH1* (Roon y col. 1974, González y col. 1985).

Glutamato Deshidrogenasa 3-NADP⁺ (GDH3-NADP⁺), codificada por el gen *GDH3* (Avendaño y col. 1997).

Glutamino sintetasa (GS) dependiente de ATP, codificada por el gen *GLN1* (Mitchel, A.P. 1985).

La enzima GS forma parte de un ciclo, en el cual también participa la enzima Glutamato Sintasa (GOGAT), codificada por el gen *GLT1* (Cogoni y col. 1995). El resultado del funcionamiento de este ciclo es la síntesis neta de una molécula de glutamato. Así la levadura *S. cerevisiae*, constituye el primer ejemplo de un microorganismo, que posee tres vías para la asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato (Figura 1).

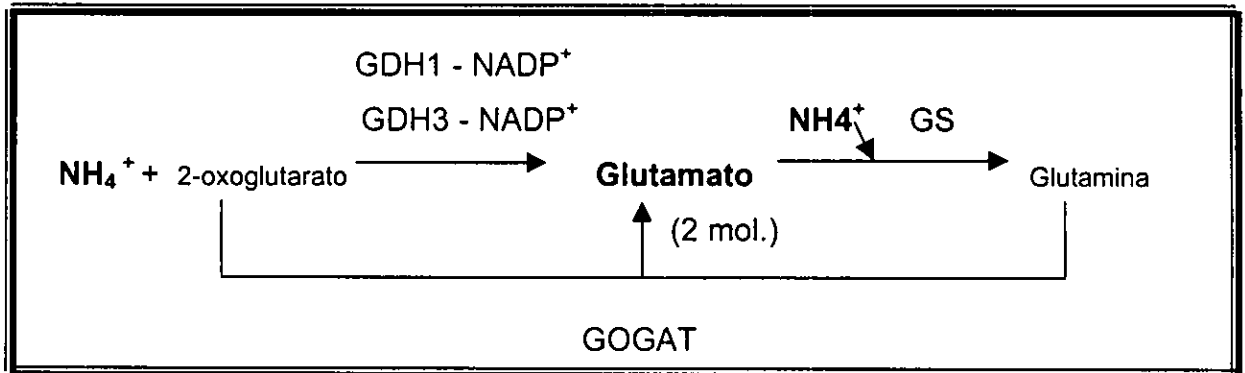


Fig1.- Vías de asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato reportadas en la levadura *S. cerevisiae*.

Nuestro grupo de investigación ha estado interesado en estudiar el significado fisiológico que representa tener tres vías para la síntesis del mismo compuesto (glutamato). Por supuesto que para atender este punto, se tiene que encontrar en que situación fisiológica es más importante una vía que otra y por otro lado

realizar estudios tanto de la regulación de la expresión genética de *GDH1*, *GDH3* y *GLT1*, así como de la regulación postranscripcional.

A continuación se presenta, un panorama general de los elementos que participan en la regulación a nivel transcripcional en *Saccharomyces cerevisiae*.

II Control Transcripcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El complejo de inicio para la síntesis de RNA mensajero en eucariotes esta formado por la holoenzima (RNA-polimerasa II asociada al mediador) y por los factores generales TFIIs (TFII A, TFII B, TFII D, TFII E, TFII F, TFII H). El factor general TFIID esta formado por las proteínas TAFs y la proteína TBP, ésta última reconoce una secuencia específica en el promotor, denominada caja TATA. El ensamble del complejo de iniciación de la transcripción comienza al unirse TBP a la caja TATA, seguido de los TFIIs y de la holoenzima (Roeder, 1966). En algunos promotores eucariotes existe una secuencia denominada INR, dentro de la cual se inicia la transcripción (McNeil y Smith, 1986).

En los promotores de *S. cerevisiae*, la caja TATA se puede localizar en la región comprendida entre los nucleotidos -40 y -120 localizados "río arriba" respecto al sitio de inicio de la transcripción. La secuencia consenso de la caja TATA es 5'-TATAAA-3' (Harbury y Struhl, 1989).

Los reguladores de la transcripción en *S. cerevisiae* se unen a secuencias de activación (UASs) o de represión (URSs) que pueden estar a cientos o miles de bases de distancia de la caja TATA y del inicio de la transcripción. Se ha propuesto que los activadores y represores que se unen a estas secuencias actúan tanto en el reclutamiento de TBP a la caja TATA, como en el reclutamiento de la holoenzima (Stargell y Struhl, 1996). Existen otros elementos, denominados coactivadores, que no se unen al DNA, pero que facilitan la unión de los activadores al mismo. Algunos de estos coactivadores forman complejos multiproteicos como por ejemplo los complejos ADA-GCN5, SAGA, SWI-SNF y el RSC, que se encargan de remodelar la estructura de la

cromatina y por lo tanto facilitan la unión tanto de los elementos basales, como de la RNA polimerasa y de los activadores transcripcionales.

En general las proteínas reguladoras se unen a secuencias específicas en el DNA (elementos cis), activando o reprimiendo la transcripción en respuesta a señales reguladoras. Los dominios de unión al DNA de las proteínas reguladoras pueden contener predominantemente, tres tipo de motivos estructurales: hélice-vuelta-hélice, dedo de zinc y cremallera de leucina.

III Regulación de la Expresión de los Genes que Codifican para la Glutamato Sintasa en Microorganismos y en *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación de los genes que codifican para GOGAT ha sido estudiada en *Klebsiella aerogenes* y *Bacillus subtilis*. En *K. aerogenes*, Senior y col. (1975), han demostrado que el papel de la vía GS-GOGAT es el de asimilar amonio y biosintetizar glutamato bajo condiciones en las que el amonio es limitante.

En otros microorganismos como *Neurospora crassa* la enzima GOGAT es utilizada para incorporar el amonio y biosintetizar glutamato en limitación de nitrógeno (Hummelt and Mora, 1980).

La GOGAT de *B. subtilis*, consta de dos subunidades de 158 KD y 54 KD, que están codificadas por los genes *GltA* y *GltB* respectivamente. La actividad enzimática aumenta en presencia de amonio, y baja cuando hay glutamato en el medio de cultivo. Estas variaciones en las actividades enzimáticas se deben a cambios en la tasa de síntesis de los mensajeros y a los niveles, de los transcritos de *GltA* y *GltB*. También se sabe que la expresión de *GltA* esta regulada por un tercer gen llamado *GltC*, que codifica para un activador positivo que regula su propia expresión. *GltC* se encuentra codificado río arriba y en dirección opuesta a los genes *GltA* y *GltB*. El modelo propone que en presencia de glutamato el producto de *GltC* se une a los sitios, dentro de las regiones de los promotores *GltA/GltC*, de tal forma que se limita el inicio de la transcripción desde los mismos, así se mantiene una concentración intracelular baja pero

constante tanto del transcrito como del producto. Bajo condiciones limitantes de glutamato, ocurre un cambio conformacional en el producto de *GltC*, el cual estimula la unión de la RNA polimerasa al promotor de *GltA*, aumentando así la transcripción de los genes de la GOGAT (Bohannon y col. 1989).

En *E. coli* se ha encontrado que los genes estructurales (*gltB* y *gltD*) codifican para cada una de las dos subunidades de la enzima GOGAT. Así mismo se ha encontrado que *GltB* y *GltD* se encuentran formando un operon junto con un tercer gen regulatorio (*GltF*); el cual está implicado en la represión mediada por glutamato, reprimiendo así la expresión del operon *gltBDF*. Además de estos resultados también se ha reportado que el operon *gltBDF* está regulado transcripcionalmente por la proteína de respuesta a leucina (Lrp), (Castaño y col. 1988, Castaño y col. 1992, Ernsting y col. 1993)

En lo referente a la regulación del gen *GLT1*, que codifica la enzima GOGAT, en la levadura *S. cerevisiae*, Valenzuela y col. 1998, llevaron a cabo un cuidadoso estudio del promotor del mismo, preparando una colección de deleciones en el extremo 5' fusionadas a la β -galactosidasa (β -gal), de tal manera que se pudo analizar el papel de las diferentes regiones del promotor de *GLT1* en la regulación transcripcional. Estas construcciones se introdujeron en mutantes alteradas en los genes que codifican para algunos de los activadores transcripcionales implicados en la regulación del metabolismo nitrogenado. Este análisis llevo a las siguientes conclusiones con respecto a la regulación transcripcional de *GLT1*:

- a) Bajo condiciones de exceso de glutamato, la expresión de *GLT1* se gobierna por la represión, mediada por glutamato, y por la activación mediada por los activadores Gln3p y Gcn4p.
- b) Bajo condiciones de derrepresión, la expresión de *GLT1* probablemente se regule por acción de tres activadores transcripcionales (Gln3p, Gcn4p y una proteína regulatoria con un dedo de Zn₂-Cys₄).
- c) En condiciones de privación de aminoácidos, la expresión de *GLT1* se regula moderadamente por Gcn4p.

Con relación al papel de la GOGAT en la biosíntesis de glutamato, se concluyó lo siguiente:

- a) Posiblemente la GOGAT tenga un papel importante en la biosíntesis de glutamato, cuando éste se encuentra en concentraciones limitantes.
- b) La GOGAT podría constituir una vía auxiliar, que proporcionara una síntesis baja pero continua de glutamato, aún en la presencia de GDH1-NADP⁺.

IV Control General de la Biosíntesis de Aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* sintetiza los 20 aminoácidos que constituyen a las proteínas, de tal manera que por mutaciones en los genes que biosintetizan esos aminoácidos se generan cepas auxótrofas incapaces de sintetizar el aminoácido en cuestión. También se pueden generar auxotrofías fenotípicas, esto ocurre, cuando una levadura silvestre se cultiva en presencia de inhibidores de alguna(s) de las enzimas que participan en la biosíntesis de algún aminoácido en particular; en este caso, el inhibidor impide la síntesis del aminoácido y la cepa se comporta como un auxótrofo, es decir es incapaz de crecer en presencia del inhibidor, a menos que se le agregue el aminoácido pertinente. Cuando un auxótrofo genético o fenotípico se cultiva en ausencia del aminoácido que requiere, se genera una privación por él mismo. Los inhibidores más utilizados son el 5-metil triptofano (5-MT), que impide la biosíntesis de triptofano; y el 3-amino 1,2,4, triazol (3-AT) que impide la biosíntesis de histidina. Cuando las células se privan de algún aminoácido, se desencadena un sistema de respuesta global llamado GCN (control general nitrogenado), que resulta en un aumento en la transcripción de muchos de los genes cuyos productos participan en la biosíntesis de aminoácidos. El mediador más importante de este circuito es el producto del gen *GCN4* (Gcn4p). Gcn4p es un activador transcripcional que contiene un motivo estructural de unión a DNA conocido como cremallera de leucinas (motivo de unión al DNA) (O'Neil y col. 1991). La acción de Gcn4p requiere de la presencia del complejo multiproteico ADA-GCN5 que remodela la

estructura de la cromatina y permite la unión de Gcn4p a las secuencias específicas de los genes regulados bajo este sistema. En este sentido, el estudio de mutantes carentes de Gcn5p, ha mostrado que la inducción, *GCN4*-dependiente, de la transcripción del gen *HIS3* (que biosintetiza histidina) no ocurre en mutantes *gcn5* (Geogakopoulos y Thireos, 1992).

V Papel de la Remodelación de la Cromatina en la Regulación Transcripcional en *Saccharomyces cerevisiae*.

En células eucariontes, la transcripción ocurre sobre un molde de DNA que se encuentra en un medio ambiente cromatínico represor. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado, que la unión al DNA de los activadores transcripcionales y de la maquinaria transcripcional basal es muchas veces obstruída por las barreras que se generan debido a la presencia de nucleosomas (Felsenfeld, G. 1996). Sin embargo, la existencia de factores proteicos capaces de remodelar la cromatina, alterando o reestructurando nucleosomas en las regiones cercanas a los promotores, permiten la unión al DNA de los factores necesarios para la transcripción (Kingston y col. 1996). Otro mecanismo que permite contender con la presencia de la estructura cromatínica, consiste en la modificación postraduccional de las histonas (Wolffe y col. 1996). Entre las modificaciones covalentes de las histonas, una de las más importantes es la acetilación reversible de residuos de lisina, localizados en el dominio amino terminal de estas proteínas (Brownell y col. 1996a). Aún cuando se ha planteado la existencia de una correlación entre la regulación transcripcional y la acetilación de histonas (Hebbes y col. 1994), hasta hace poco tiempo, no existían datos experimentales que demostraran una relación causa-efecto entre la acetilación de histonas y la activación genética. El descubrimiento reciente de enzimas capaces de acetilar y desacetilar histonas y por tanto de mantener un balance en la acetilación de estas proteínas (Hampsey, M. 1997), han ofrecido la posibilidad de analizar este asunto con mayor atención.

El gen *GCN5* de *S. cerevisiae*, codifica para un coactivador transcripcional, que se requiere para la transcripción de una serie de genes (Georgakopoulos y col. 1992). Recientemente se demostró que el producto de *GCN5* y de los genes equivalentes en una variedad de organismos desde *Tetrahymena* (Brownell y col. 1996b) hasta humanos (Candau y col. 1996b), poseen actividad intrínseca de acetiltransferasa de histonas (HAT) (Brownell y Allis 1995). La acetilación se lleva a cabo en los residuos ϵ -amino de las lisinas que se encuentran en los extremos flexibles amino terminal de las histonas, reduciendo la carga positiva para debilitar la interacción DNA-histona. Esta alteración postraduccional que sufren las histonas modifica la estructura de la cromatina permitiendo en última instancia la activación transcripcional (Lee y col. 1993, Vettese-Dadey y col. 1996).

Gcn5p es una proteína modular que presenta cuatro dominios de acetilación (llamados I,II,III y IV) y un dominio hacia el carboxilo terminal que se llama bromodominio y del cual aún se desconoce su función. De los cuatro dominios de acetilación el dominio II y III (presumiblemente están involucrados en la unión del acetil-CoA) parecen ser los más importantes ya que cuando se llevaron a cabo sustituciones de los residuos de aminoácidos conservados, por alaninas, prácticamente se perdió la actividad HAT *in vitro*. Así mismo, se afectó la activación transcripcional *in vivo* en activadores de fusión, por lo tanto estos experimentos establecen que la acetilación de histonas está directamente relacionada con la activación transcripcional. Un efecto similar se observó cuando en el dominio I de acetilación se substituyó una histidina altamente conservada (Wang y col. 1997). Por lo tanto los sitios HAT I, II y III están involucrados tanto en la actividad enzimática como en la especificidad del sustrato, mientras que el dominio IV puede tener un papel regulatorio (Wang y col. 1998).

Gcn5p es la primer acetiltransferasa nuclear que se ha encontrado. Esta funciona dentro de dos complejos multienzimáticos. El complejo ADA-GCN5 y el complejo SAGA. El complejo ADA/GCN5 descrito hasta este momento está constituido por el producto de los genes *ADA1*, *ADA2*, *ADA3*, *ADA5* y *GCN5*

(Horiuchi y col. 1997; Berger y col. 1992; Piña y col. 1993; Marcus y col. 1996; Georgakopoulos y Thireos 1992; y Marcus y col. 1994) (ver figura 2). El complejo SAGA está constituido por el producto de los genes ADA (incluyendo la acetilasa) y además por los genes *SPT7* y *SPT20* (Grant y col. 1997). Ambos complejos interaccionan con activadores transcripcionales específicos al igual que con la maquinaria basal de transcripción. El papel de Gcn5p dentro de los complejos sería el de la acetilación de las histonas. Existen reportes que indican que la actividad de transacetilasa de Gcn5p es crítica para la activación transcripcional dirigida a ciertos genes. La evidencia experimental más importante es la siguiente:

- a) Mutantes en *GCN5* que conservan la capacidad de activar la transcripción de genes blanco mantienen simultáneamente la capacidad de acetilar histonas *in vivo*,
- b) mutaciones en *GCN5* que resultan en una capacidad reducida para acetilar histonas, simultáneamente muestran una capacidad reducida para activar la transcripción de genes blanco y
- c) promotores de dos diferentes genes solamente presentaron nucleosomas hiperacetilados cuando la expresión de estos genes estaba activada por alelos funcionales de *GCN5* (Kuo y col. 1997).

Estos datos indican, por un lado, que Gcn5p está involucrado en una vía de activación génica a través de la acetilación específica de las histonas y por otro, que la actividad de acetiltransferasa de Gcn5p es esencial para llevar a cabo la activación.

Aún cuando es claro que Gcn5p es una acetiltransferasa de histonas, que es requerida por los activadores transcripcionales para facilitar su entrada al DNA nucleosomado y conectarse con la maquinaria basal de transcripción, lo que aún no se resuelve es si esta es la única acetiltransferasa cuyo blanco es el DNA nucleosomado o bien hay otros complejos que puedan llevar a cabo esta función. Por otro lado, también se ha establecido que el gen *GCN5* no es esencial en levadura y su producto (Gcn5p) participa en la expresión de un número pequeño de genes. Estas observaciones pudieran poner en duda la

universalidad de la activación génica a través de la acetilación de histonas. A este respecto, y como ya se ha mencionado anteriormente, en la literatura se ha descrito que Gcn5p puede estar formando parte de otros complejos coactivadores como puede ser el complejo SAGA, en donde además de las proteínas Ada y Gcn5 se encuentran las proteínas Spt7 y Spt20, (Spt20 es idéntico a Ada5) que fueron aisladas como supresoras de inserciones de elementos Ty. La masa molecular del complejo SAGA es de 2 MD, mientras que la del complejo ADA/GCN5 es de 800 KD; más aún, estudios genéticos demuestran que SAGA contiene funciones involucradas en la activación transcripcional distintas de aquellas mediadas por los grupos del complejo ADA/GCN5 (Wang y col. 1998).

También se han descrito otros complejos multiprotéicos como es el SWI/SNF en levadura, que está involucrado en modificar la estructura de la cromatina. Este complejo SWI/SNF es altamente conservado y está compuesto por 11 diferentes subunidades que presentan una masa molecular aparente de 2 MD. El análisis bioquímico de este complejo purificado de levadura y humano ha demostrado que utiliza la energía de hidrólisis del ATP para romper la estructura del nucleosoma y facilitar así la unión de los factores de transcripción al DNA. Resultó interesante que los genes *ADA3*, *ADA2* y *GCN5* resultaran idénticos a los genes *SWI7*, *SWI8* y *SWI9*; y más aún que las subunidades del complejo ADA/GCN5 fueran requeridas para la expresión de genes dependientes del complejo SWI/SNF como son *SUC2*, *HO*, *INO1*, etc.; similarmente genes que no requieren de la acción de SWI/SNF, como *LYS2*, *ADH1*, *PHO5* y *CLN3*, tampoco requirieron del complejo ADA/GCN5. Por otro lado los genes del complejo ADA/GCN5 no codifican subunidades estequiométricas del complejo SWI/SNF, aunque los genes muestren interacciones genéticas similares con los componentes de la cromatina. Cabe mencionar que dobles mutantes en cualquiera de los constituyentes del complejo ADA/GCN5 y en combinación con el gen *SWI1*, del complejo SWI/SNF, resultan en un fenotipo de letalidad, por lo cual se propone que el complejo ADA/GCN5 funciona de manera paralela con el complejo SWI/SNF para modificar la estructura de la cromatina. (Pollard y col.

1997). Existen otros reportes en levadura, donde se establece la purificación de tres complejos multiproteicos (llamados 1, 2 y 3) con actividad HAT, y de distinta masa molecular : 700 KD, 2 MD y 150 KD. El tamaño de estos tres complejos de acetiltransferasas es similar a aquellos de tres complejos que contienen NGG1/ADA3 y ADA2 (Saleh y col. 1997). Sin embargo, en los tres complejos se encontró a Gcn5p y a Ada3p. La actividad HAT que presenta cada complejo es sobre distinto sustrato, es decir cuando se utilizaron histonas libres, el complejo 1 acetiló preferentemente a la histona H4 y sólo un poco a H2A, mientras que los complejos 2 y 3 acetilan preferentemente la histona H3; en cambio cuando se utilizaron histonas nucleosomadas, el complejo 1 siguió acetilando H4, el complejo 2 acetiló H4 y el complejo 3 prácticamente no acetiló histonas ensambladas o nucleosomadas. Así, estos resultados sugieren que los sustratos fisiológicos de los complejos 2 y 3 pueden ser proteínas no-histonas, mientras que la actividad del complejo 1 dependiente de Gcn5p puede representar una verdadera enzima que modifica histonas nucleosomadas. (Pollard y col. 1997).

También en levaduras se ha reportado que Gcn5p interacciona con una proteína-quinasa (Ire1p) que está involucrada en la respuesta al desplegamiento de las proteínas, es decir activa genes que codifican para proteínas chaperonas, por tanto en ausencia de Gcn5p ya no se da esa respuesta de desplegamiento de proteínas al no establecerse la interacción de Gcn5p con la cinasa. Por supuesto el mecanismo por el cual se realiza dicha interacción y la respuesta de inducción de genes de chaperonas no está bien establecido (Welihinda y col. 1997).

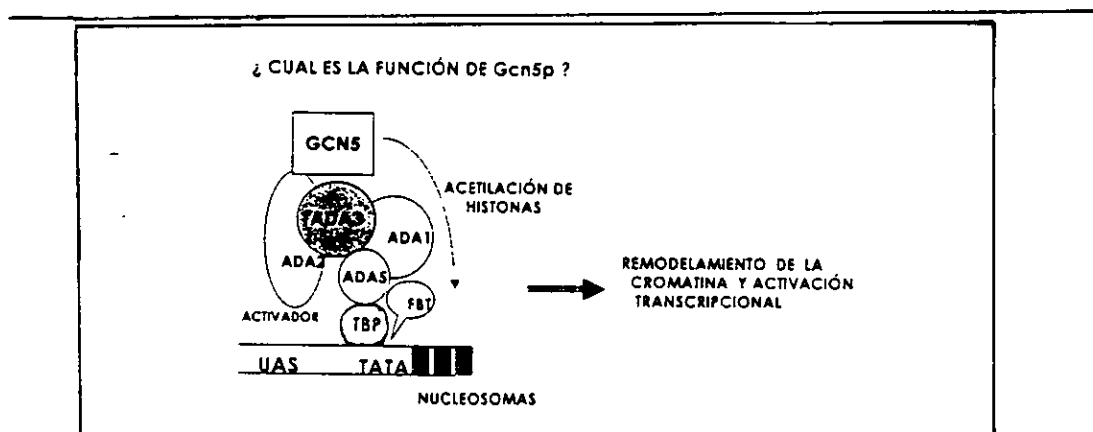


Fig. 2. Esquema que muestra como sería la interacción en el complejo ADA/GCN5.

ANTECEDENTES :

Desde hace algunos años, el laboratorio de la Dra. Alicia González Manjarrez, ha estado interesado en el estudio de las vías de la biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae*. Uno de los primeros enfoques que se utilizó, fué la obtención de mutantes alteradas en la actividad enzimática de GDH1-NADP⁺. Por medio de mutagénesis química con etil metano sulfonato (EMS), utilizando el protocolo descrito por Lacroute (Drillien and Lacroute, 1972), se obtuvieron mutantes monogénicas alteradas en el gen *GDH1* que por tanto carecían de la actividad de GDH1-NADP⁺ (Folch y col. 1989). El análisis fisiológico de una de ellas CN31 mostró que esta cepa, era capaz de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno utilizando para biosintetizar glutamato, la vía GS-GOGAT. A partir de esta cepa, nuevamente por mutagénesis química, se obtuvieron mutantes auxótrofas de glutamato (Folch y col. 1989). El análisis genético y fisiológico de una de ellas CN33, mostró que como era de esperarse, esta cepa era un auxotrofo de glutamato y que, por un lado, era portadora de la mutación en *GDH1* presente en la cepa padre CN31, y por tanto carecía de actividad de GDH1-NADP⁺ y por otro, carecía de la actividad de GOGAT (fenotipo *gogat*⁻). Así mismo, se encontró que el fenotipo *gogat*⁻ se debía a la presencia de dos mutaciones adicionales, denominadas *gus1* y *gus2* (Folch y col. 1989). Estos resultados llevaron a la formulación de dos hipótesis que pretendían explicar la razón de la necesidad de dos mutaciones para abatir la actividad enzimática de GOGAT:

- a) *S. cerevisiae* posee dos GOGAT's (*GUS1* y *GUS2*) y por tanto se requiere abolir la actividad de cada una de ellas para obtener mutantes completamente carentes de esta actividad enzimática.
- b) Las 2 mutaciones presentes en la cepa CN33 (*gus1* y *gus2*), afectaron dos sistemas regulatorios que determinan la expresión del o los genes que codifican para GOGAT.

Recientemente, se encontró que la levadura *S. cerevisiae* posee una sola enzima GOGAT, homotrimérica constituida por monómeros de 200 KDa, los

cuales son codificados por el gen (*GLT1*) (Cogoni y col. 1995). Así se descartó la hipótesis presentada en el inciso a). Esta evidencia, apoyó la segunda hipótesis que sugería que *gus1* y *gus2*, habían afectado genes regulatorios cuyo producto estaba involucrado en algún aspecto de la modulación de la expresión de *GLT1* o bien en la actividad enzimática de GOGAT.

Con el fin de analizar esta posibilidad, se intentó la clonación de *GUS1* y *GUS2*. La clonación del gen *GUS2* se llevó a cabo por complementación de una mutante *ura3⁻* derivada de la cepa CN33, denominada Romex0 (*mat⁻, gdh1⁻, ura3⁻, gus1⁻, gus2⁻*), con una biblioteca genómica de *S. cerevisiae*, construida en un vector centromérico. Se obtuvieron 14 transformantes, 9 de las cuales recuperaron la actividad enzimática de GOGAT. El análisis de los insertos presentes en cada una de las 9 cepas de levadura que habían recuperado la actividad de GOGAT, mostró que el gen que complementaba era *GCN5*. Como se explicó anteriormente, la cepa Romex 0 era portadora de mutaciones tanto en *GUS1* como en *GUS2*, sin embargo, nosotros sólo fuimos capaces de clonar uno de los dos (*GUS2*), que resultó ser *GCN5*, un gen que había sido descrito previamente (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

La mutante Romex0 se cruzo obteniéndose la segregante Romex1 (*gdh1⁻, ura3⁻, GUS1⁻, gus2⁻*) y la Romex2 (*gdh1⁻, ura3⁻, gus1⁻ y GUS2*). Las mutantes Romex1 y Romex2 presentaban una actividad disminuida de GOGAT, indicando, que la falta de *GUS1* o de *GUS2* resultaba en una disminución en la actividad de GOGAT y que solamente la alteración simultánea de *GUS1* y *GUS2* resultaba en una carencia completa de actividad de GOGAT. Como era de esperarse, la actividad disminuida de GOGAT que se observa en la mutante Romex1, se incrementa cuando ésta es transformada con un plásmido portador de *GCN5* (pCA). Estos resultados sugerían, que la disminución en actividad enzimática de GOGAT en las cepas portadoras de la mutación en *GCN5* pudiera deberse a una transcripción disminuida de *GLT1*. Sin embargo, el análisis tipo Northern no mostraba diferencias en la expresión de *GLT1* cuando se comparaba una cepa silvestre (*GCN5*) y una cepa *gcn5⁻*. En virtud de que el papel de Gcn5p como coactivador de la transcripción estaba ampliamente descrito, supusimos que

Gcn5p pudiera regular la transcripción de un segundo elemento, que a su vez regulara la actividad enzimática de GOGAT postranscripcionalmente (Figura 3). El propósito de este trabajo fué establecer en forma definitiva el papel de Gcn5p en la regulación de la transcripción de *GLT1*.

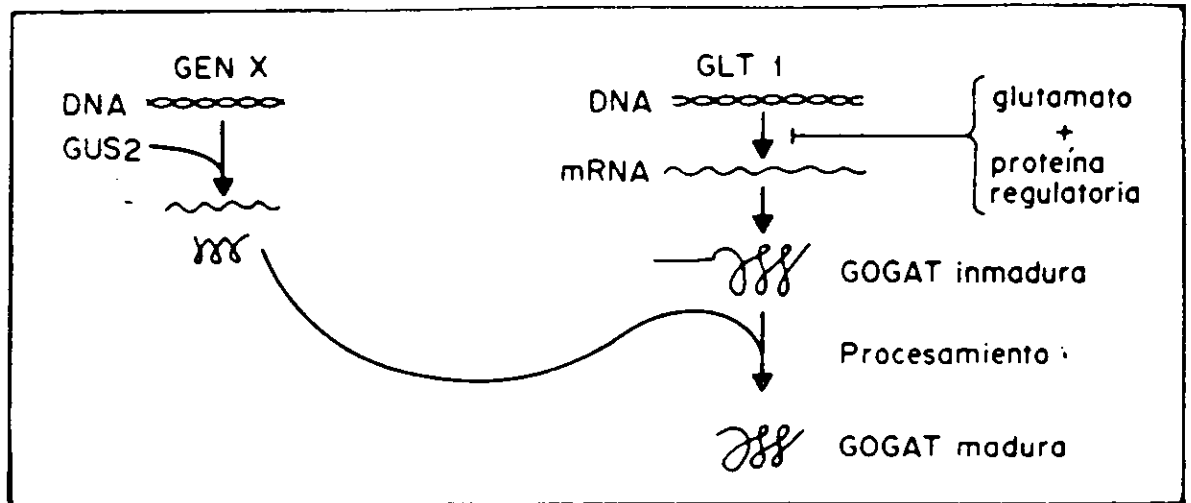


Fig.3. Modelo propuesto en donde Gus2p o Gcn5p regula la transcripción de un gen, cuyo producto regula la actividad enzimática de GOGAT pos-transcripcionalmente (Tomado de Alba,L.L.A.).

OBJETIVOS :

GLOBAL :

ESTUDIAR LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *GLT1* QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA GLUTAMATO SINTASA (GOGAT) EN LA LEVADURA *S. cerevisiae*.

ESPECÍFICO :

DETERMINAR EL PAPEL DEL COMPLEJO ADA/GCN5 EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *GLT1*.

MATERIALES Y MÉTODOS :

I Cepas, cruzas y condiciones de crecimiento :

La Tabla 1 describe las cepas generadas y utilizadas en este trabajo. La biblioteca genómica utilizada para la complementación fué la reportada por Rose y col. (1987), contenida en el vector YCp50 (*Amp^R*, *URA3*, *CEN4*, *ARS1*).

Tabla 1

Lista de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

CEPAS	GENOTIPO	REFERENCIAS
PSY316	<i>matα,GDH1,GDH3,ADA2,ADA3,GCN5,ura3,lis2,leu2-3,ade2-100,Δhis3-200.</i>	Berger y col. 1992
PSY316 <i>ada2</i> Δ	<i>matα,GDH1,GDH3,ada2,ADA3,GCN5,ura3,lis2,leu2-3,ade2-100, Δhis3-200.</i>	Berger y col. 1992
PSY316 <i>ada3</i> Δ	<i>matα,GDH1,GDH3,ADA2,ada3,GCN5,ura3,lis2,leu2-3,ade2-100, Δhis3-200.</i>	Koleske y col. 1992
PSY316 <i>gcn5</i> Δ	<i>matα,GDH1,GDH3,ADA2,ADA3,gcn5,ura3,lis2,leu2-3,ade2-100, Δhis3-200.</i>	Koleske y col. 1992
PSY316 <i>gdh1</i> Δ	<i>matα,GDH3,ADA2,ADA3,GCN5,URA3::gdh1,lis2,leu2-3,ade2-100,Δhis3-200.</i>	Este trabajo
PSY316 <i>ada3</i> Δ <i>gdh1</i> Δ	<i>matα,GDH3,ADA2,ada3,GCN5,URA3::gdh1,lis2,leu2-3,ade2-100,Δhis3-200.</i>	Este trabajo
PSY316 <i>gcn5</i> Δ <i>gdh1</i> Δ	<i>matα,GDH3,ADA2,ADA3,gcn5,URA3::gdh1,lis2,leu2-3,ade2-100,Δhis3-200.</i>	Este trabajo
Romex1	<i>matα,gdh1,GDH3,GLT1,gcn5,x',ura3,lis2</i>	González y col. 1992
DAN1	<i>mat a,gdh1,GDH3,GLT1,GCN5,X,ura3,leu2</i>	Avendaño y col. 1997
Romex1 X DAN1	<i>gdh1/gdh1, ura3/ura3, Leu2/leu2, lis2/LIS2, gcn5/GCN5, x/X, GDH3/GDH3, GLT1/GLT1.</i>	Este trabajo
24-	<i>gdh1,GDH3,GLT1,GCN5,X,ura3,leu2</i>	Este trabajo
2523	<i>gdh1,GDH3,GLT1,GCN5,x,ura3,leu2</i>	Este trabajo
DAN <i>gcn5</i> Δ	<i>mat a,gdh1,GDH3,GLT1,URA3::gcn5,leu2</i>	Este trabajo
CLA1	<i>matα.GDH1,GDH3,GLT1,ura3,leu2</i>	Avendaño y col. 1997
MAR1	<i>gdh1::URA3,GDH3,GLT1,leu2</i>	Avendaño y col. 1997

El crecimiento de la levadura ya sea en medio sólido o en líquido se llevo a cabo utilizando Medio Mínimo (MM) que contiene sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de Laboratorios Difco. Como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio a una concentración final de 38 mM, o bien glutamato a 7.3 mM (medio llamado SN-Glu). Como fuente de carbono se utilizó glucosa a una concentración final del 2% (p/v). Los aminoácidos requeridos para complementar la auxotrofia de las cepas se adicionaron al medio de cultivo a una concentración final de 0.01% (p/v), excepto la leucina que se utilizó a una concentración final de 500 µg/ml.

Para fines de precultivo y para las cepas que así lo permitieron se utilizó medio rico (YPD) que contiene extracto de levadura (1%), peptona de caseína (2%) y glucosa (2%). Para el crecimiento en medio sólido se añadió agar al 2%.

La incubación de las levaduras ya sea en medio sólido o líquido fue a 30°C. Los medios líquidos se agitaron a una velocidad constante de 250 r.p.m. y el crecimiento se cuantificó por la turbidez del medio, leyendo la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro LKB.

La propagación de los plásmidos se realizó en la cepa de *Escherichia coli* TB1 (F-,araΔ,rpsL,φ80dlacZΔM15,hsdR17-r_K⁻ m_K⁺-). El crecimiento bacteriano fué en medio LB en presencia de ampicilina: 1% de bactotripton, 0.5% de extracto de levadura y 1 % de cloruro de sodio. La concentración del antibiótico ampicilina, para seleccionar aquellas bacterias portadoras de los plásmidos, fué de 100 µg/ml. Los plásmidos fueron purificados usando el protocolo de QUIAGEN tip 500 para maxipreparaciones (QUIAGEN, Cat. No. 12163).

El medio de esporulación para levadura fué sólido y contiene acetato de potasio al 1%, extracto de levadura al 0.1% y glucosa al 0.05%.

II Plásmidos :

Se utilizaron plásmidos con el origen de replicación del plásmido 2µ, como también plásmidos monocopia centroméricos con origen de replicación tipo ARS.

Las construcciones que contienen el promotor completo de *GLT1* así como las deleciones de éste mismo se prepararon en el plásmido YEp363 y se denominó serie pLOU, y complementan la auxotrofia por leucina (Valenzuela y col. 1998). El plásmido pSIM1 se preparó a partir del plásmido YEp353 (complementa la auxotrofia por uracilo) y es una fusión de LacZ con el promotor completo de *GLT1*.

El plásmido centromérico pCA reportado por Alba, L.L.A. (1995), contiene los genes de levadura *URA3* y *GCN5* y el vector original es el YCp50 reportado por Rose y col. (1987).

El plásmido centromérico YCp87 contiene el promotor del gen *HIS3* fusionado a la secuencia nucleotídica de la β -galactosidasa y complementa la auxotrofia por leucina (gen de levadura *LEU2*). Este plásmido fué reportado por Hope y Struhl (1986) y donado a nuestro laboratorio por Kevin Struhl.

El plásmido que tiene interrumpida la secuencia del gen *GCN5* por el gen *URA3* también de levadura fué obtenido de Guarente y se denominó pSP72 (pGCN5KO) (Georgakopoulos, 1992).

El plásmido pLV2 fué reportado por Avendaño y col. (1997) y contiene los genes de levadura *URA3* y *GDH1* y el vector original es el Ylp5.

III Determinación de actividades enzimáticas :

Los ensayos enzimáticos "*in vitro*" se llevaron a cabo en extractos preparados a partir de cultivos con una densidad óptica (D.O._{600nm}) máxima de 0.8. Los cultivos se colectaron y se resuspendieron las células en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM; y usando perlas de vidrio y vórtex se llevo a cabo el rompimiento celular en tubos de ensayo dando 6 ciclos de 1 min. c/u. Todo esto se llevó a cabo a 4°C.

La actividad enzimática de GOGAT se determinó por el método descrito por Roon y cols. (1974). La concentración de los sustratos en la mezcla de reacción (1 ml) fueron: 2-oxoglutarato 5 mM, glutamina 5 mM y NADH 0.16 mM, disueltos en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.0. Como un control de actividad se utilizó azaserina 5 mM que es un inhibidor competitivo específico de

enzimas amidotransferasas (Hummelt y Mora, 1980). La actividad específica está referida como nanomolas de NADH oxidado, leído a 340 nm, por minuto por miligramo de proteína.

La actividad específica de GDH-NADP⁺ se determinó por el método de Doherty (1970). La concentración de los sustratos en la mezcla de reacción (1 ml) fueron: 2-oxoglutarato 3 mM, cloruro de amonio 50 mM y NADPH 0.14 mM; disueltos en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.8. Se utilizaron dos controles, uno de ellos sin 2-oxoglutarato y otro sin cloruro de amonio. La actividad específica se determinó como micromolas de NADPH oxidado, leído a 340 nm, por minuto y por miligramo de proteína.

La actividad enzimática de β -galactosidasa (β -gal) se determinó por el método de Miller (1992). Los cultivos de levadura para medir esta actividad enzimática se crecieron hasta una D.O._{600nm} de 0.8 (fase de crecimiento exponencial). Estas determinaciones se realizaron a 28°C y por triplicado. La mezcla de reacción (1.2 ml) contenía : 0.9 ml. de amortiguador Z (60 mM de Na₂HPO₄·H₂O, 40 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM de KCl, 1mM de MgSO₄·7H₂O y 100 mM de DTT; a un pH de 7.0), alícuotas de extracto celular de 5 μ l-200 μ l y se aforó a 1 ml con amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.0 y EDTA 1 mM. Esta mezcla se dejó reposar por 5 min. a 28°C y posteriormente se añadieron 0.2 ml del sustrato o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) a una concentración de 4 mg/ml disueltos en amortiguador Z sin DTT; se mezcló perfectamente y se dió inicio a la reacción, la cual se paró a diferentes tiempos con 0.5 ml de Na₂CO₃ 1M. Finalmente las reacciones se leyeron a una D.O. de 420 nm y la actividad específica se refirió como nanomolas de ONPG hidrolizado por minuto por miligramo de proteína (Rose and Botstein 1983).

La determinación de proteínas de los extractos celulares se llevo a cabo por el método descrito por Lowry y col. (1950), usando albúmina sérica bovina como estándar.

En general para todas y cada una de las cuantificaciones de actividades enzimáticas se realizaron al menos tres experimentos independientes por lo que se reportan promedios de dichas actividades y en donde la desviación estándar no fué mayor del 15%.

IV Deprivación de aminoácidos :

Las cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en MM en presencia o en ausencia del análogo de aminoácido. Las condiciones de crecimiento en presencia del análogo las llamamos condiciones de deprivación (o de inducción) y las condiciones de crecimiento en ausencia del análogo, condiciones basales (o de no-inducción). En este trabajo se utilizaron dos análogos de aminoácido : El 5-Metil-Triptofano (5-MT) a una concentración final en el medio de crecimiento, de 1.2 mM y que provoca deprivación celular por triptofano; también se utilizó el 3-1,2,4-Aminotriazol (3-AT) a una concentración final en el medio de crecimiento de 10 mM y que provoca deprivación celular por histidina. Para estos experimentos se creció un precultivo de MM + requerimientos auxotróficos para cada una de las cepas en ausencia del análogo, hasta una D.O._{600nm} de 0.8; posteriormente se colectaron las células y se inocularon cultivos de MM + requerimientos auxotróficos, uno conteniendo el análogo y otro en su ausencia, inoculando a una D.O._{600nm} de 0.4 y 0.2 respectivamente. Así los cultivos se incubaron durante 6 horas a 30°C y 250 r.p.m. Finalmente se colectaron los cultivos usando centrifugación y resuspendiendo en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.5, y EDTA 1 mM. Los paquetes celulares se almacenaron a -20°C.

V Transformaciones :

Los plásmidos pLOU1, pLOU4, pLOU9, pLOU12, pLOU17, y pSIM1 tienen el origen de replicación 2 μ y se utilizaron para transformar las cepas de *S. cerevisiae* reportadas en este trabajo, usando una concentración de 0.2 μ g-1 μ g.

El método utilizado de transformación fué el de acetato de litio reportado por Ito y col. (1983).

Las transformantes protótrofas para uracilo o leucina, según sea el caso, se obtuvieron en MM + los requerimientos auxotróficos, en ausencia del aminoácido de selección (uracilo o leucina).

Las bacterias se transformaron por el método de electroporación reportado por Dower y col. (1988) usando concentraciones de DNA transformante de 20-100 ng. Las transformantes se seleccionaron como resistentes a la presencia de ampicilina en placas de LB.

VI Construcción de mutantes “null”.

Para la interrupción completa del gen *GCN5* se utilizó el plásmido reportado, y facilitado a nuestro laboratorio, por L. Guarente llamado pGCN5KO, el cual se digirió con *XhoI/SalI*, liberando una banda de aproximadamente 4.5 Kb que contiene el gen completo de *URA3* flanqueado por el gen *GCN5*, es decir está interrumpida la secuencia de este último gen. La cantidad de DNA transformante que se utilizó fué de 1 µg.

Para la interrupción del gen *GDH1* se usó el plásmido reportado por Avendaño y col. (1997) denominado pLV2; él cual fué digerido con *Bgl II* que tiene un sitio único en la secuencia del gen *GDH1*; así se linearizó dicho plásmido obteniendo una banda de 6 Kb, con la cual se transformó a la levadura usando una concentración de 0.8 µg.

VII Secuenciación nucleotídica :

Se llevó a cabo la secuencia del gen *GCN5* de la cepa Romex1 para confirmar la posición de la mutación usando el protocolo de Secuensa. Utilizando esta misma técnica se realizó la secuencia del gen *GCN5* de la cepa 2523 y del plásmido pSIM1.

Dichas secuencias no se muestran en este trabajo y se llevaron a cabo por la técnico Cristina Aranda F.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN :

I Clonación y caracterización de *GCN5* :

Como se explicó en ANTECEDENTES, la mutante Romex 1, es portadora de la mutación *gus2 [gdh1,GDH3,GLT1,gus2 (gcn5),ura3,lys2]* (Tabla1). El análisis fisiológico inicial de esta mutante, nos permitió determinar el fenotipo que se describe a continuación :

- a) Auxótrofo parcial de glutamato.
- b) Actividad enzimática de GOGAT disminuída (que correspondería a un 30% de la actividad encontrada en una cepa silvestre).
- c) Actividad enzimática nula de GDH3-NADP⁺
- d) Sensible a la presencia del 3-amino triazol (3-AT^S).

Utilizando una biblioteca genómica de la levadura *S. cerevisiae*, construida en un vector centromérico, se complementó la auxotrofia parcial por glutamato, presente en la Romex1, seleccionándose protótrofas para glutamato. Como ya se mencionó en ANTECEDENTES, el análisis molecular de los plásmidos que complementaron el fenotipo de la mutante Romex1, mostró que el gen *GUS2/GCN5*, fué el responsable de la complementación. El gen *GUS2/GCN5*, que de ahora en adelante denominaremos *GCN5*, se subclonó y al plásmido portador del mismo se llamo pCA.

El fenotipo de la cepa complementada Romex 1/pCA (*GCN5*) resultó ser el siguiente:

- a) Protótrofa para glutamato
- b) Actividad enzimática de GOGAT igual a la de una cepa silvestre (Tabla 2).
- c) Actividad enzimática silvestre de GDH3-NADP⁺ (Tabla 2).
- d) Mayor resistencia a la presencia del 3-AT que la observada en la mutante Romex 1.

Tabla 2. Actividad específica de GDH1-NADP⁺,GDH3-NADP⁺ y GOGAT en diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

C E P A S	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmol/min/mg)		
	GDH1	GDH3	GOGAT
CN30 (<i>gdh1,GDH3,GLT1,GCN5,ura3</i>)	0.0	8.0	52.0
Romex1 (<i>gdh1,GDH3, GLT1,gcn5,ura3</i>)	0.0	0.0	15.0
Romex1/YCp50 (<i>gdh1,GDH3, GLT1,gcn5,ura3/URA3</i>)	0.0	0.0	15.0
Romex1/pCA (<i>gdh1,GDH3,GLT1,gcn5,ura3/URA3,GCN5</i>)	0.0	8.0	48.0

El hecho de que en presencia de *GCN5* la cepa Romex1 adquiriera fenotipo silvestre sugería que esta cepa era portadora de una mutación en *GCN5*. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se secuenció el gen *GCN5* presente en la cepa Romex1. Como se puede observar en la figura 4A, la secuencia del gen *GCN5* de la cepa Romex1 confirmó que efectivamente, esta cepa presentaba una alteración en este gen. Estos datos indican, que una alteración en *GCN5* resulta en una actividad de GOGAT y GDH3 disminuídas y sugieren que la expresión de estos genes esta regulada por *GCN5*. Como se mencionó en la INTRODUCCIÓN, el papel de Gcn5p como coactivador transcripcional está bien documentado. Así mismo el hecho de que la expresión de *GLT1* esté regulada por *GCN4* (Valenzuela y col. 1998), confirma la posibilidad de que la falta de Gcn5p pudiera afectar la expresión de *GLT1*, ya que se ha demostrado que la activación transcripcional mediada por Gcn4p es *GCN5*-dependiente.

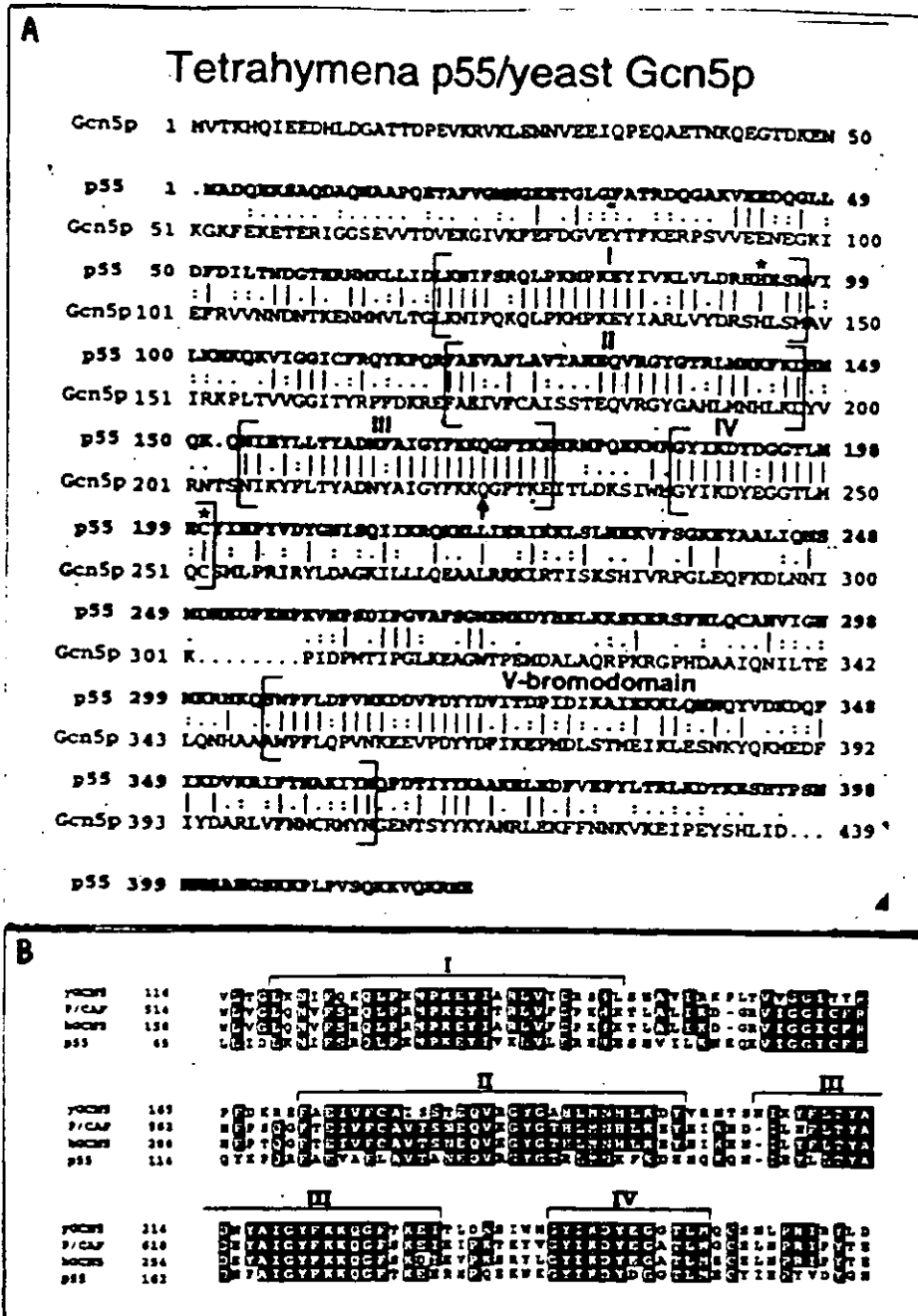


Fig. 4.- A) Comparación entre las proteínas p55 de *Tetrahymena* y Gcn5p de *S. cerevisiae*, observándose un alto grado de conservación entre ellas (Brownell y col. 1996b). La flecha indica la posición de la mutación presente en el gen *GCN5* de la cepa Romex1. Esta delección provoca el corrimiento del marco de lectura generando codones de paro. B) El mayor grado de identidad entre las proteínas de la familia de Gcn5p se encuentra en los dominios de acetilación HAT (Wang y col.1998).

Aún cuando el análisis de la mutante Romex1 sugiere que Gcn5p pudiera estar regulando la expresión tanto de *GLT1* como de *GDH3*, éste trabajo se ocupó únicamente de estudiar el efecto de la falta de *GCN5* sobre la transcripción del gen *GLT1*.

Con el fin de estudiar el efecto de Gcn5p sobre la transcripción de *GLT1*, se realizó un análisis tipo Northern, utilizando RNA total obtenido a partir de la cepas Romex1, Romex1/YCp50 y Romex1/pCA; y usando como sonda un fragmento de *GLT1* reportado anteriormente por Cogoni y col. (1995). El resultado de este análisis mostró que la cantidad de RNA-m de *GLT1* era similar en las tres cepas utilizadas, sugiriendo que la falta de *GCN5* no había alterado la transcripción de *GLT1* (datos no mostrados). Dado que el papel de Gcn5p como coactivador de la transcripción estaba perfectamente caracterizado, los resultados obtenidos con el análisis tipo Northern se interpretaron de la siguiente manera:

- a) Gcn5p regula la transcripción de un segundo gen, cuyo producto regula la actividad de GOGAT pos-transcripcionalmente.
- b) Gcn5p sí participa en la regulación de la expresión de *GLT1*, pero dado que el RNA-m de *GLT1* es de alto peso molecular (8Kb), éste se degrada durante la extracción de RNA total y por tanto el efecto de Gcn5p sobre la transcripción de *GLT1* no se aprecia utilizando análisis tipo Northern.

Con el fin de analizar de manera cuantitativa la expresión de *GLT1*, se utilizaron plásmidos conteniendo el promotor completo de *GLT1* fusionado a LacZ, lo que permitiría utilizar la actividad enzimática de β -galactosidasa como reportera de la actividad transcripcional de *GLT1*:

- a) El plásmido pLOU1 es una construcción reportada por Valenzuela y col. (1998), que contiene la fusión del gen LacZ con el promotor completo de *GLT1*, y como marcador *LEU2*.

b) El plásmido pSIM1 contiene la fusión del gen LacZ con el promotor completo de *GLT1*, y como marcador *URA3*, construido como se describe en MATERIALES Y MÉTODOS.

Como cepas silvestres para *GCN5*, se utilizaron la PSY316/pLOU1 (*GDH1, GLT1, GCN5, LEU2*) y la PSY316 *gdh1Δ*/pLOU1 (*gdh1, GLT1, GCN5, LEU2*). La razón de utilizar estas dos cepas es que se ha descrito (Valenzuela y col. 1998), que la expresión de *GLT1* se derreprime en cepas carentes de *GDH1*. Así mismo, conviene recordar que la mutante Romex1, portadora de la mutación fuera de fase en *GCN5* era *gdh1*. A partir de las cepas PSY316 *GDH1*/pLOU1 y PSY316 *gdh1Δ*/pLOU1 se generaron derivadas *gcn5Δ*, por interrupción génica de *GCN5*, obteniéndose la PSY316 *GDH1 gcn5Δ* /pLOU1 y la PSY316 *gdh1Δ gcn5Δ* /pLOU1 (ver MATERIALES Y MÉTODOS). La cepa Romex1, portadora de una mutación fuera de fase en *GCN5*, se transformó con el plásmido pSIM1, obteniéndose la cepa Romex1/pSIM1.

Tabla 3. Actividad específica de β-galactosidasa y GOGAT en cepas *GCN5* y *gcn5Δ*

CEPAS	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmol/min/mg)	
	β-Gal	GOGAT
PSY316 <i>GDH1</i> /pLOU1 (<i>GDH1, GLT1, GCN5, LEU2</i>)	1235	25
PSY316 <i>GDH1 gcn5Δ</i> / pLOU1 (<i>GDH1, GLT1, LEU2</i>)	221	17
24/pLOU1 (<i>gdh1, GLT1, GCN5, LEU2</i>)	4062	50
PSY316 <i>gdh1Δ gcn5Δ</i> /pLOU1 (<i>GLT1, LEU2</i>)	1103	28
Romex1/pSIM1 (<i>gdh1, GLT1, gcn5, URA3</i>)	180	10

La Tabla 3 muestra que tal y como se había reportado anteriormente, la actividad transcripcional de *GLT1* es tres veces mayor en una cepa *gdh1* que en una cepa *GDH1*. Con respecto al papel de *GCN5* en la transcripción de *GLT1* los resultados presentados en la Tabla 3 nos permiten concluir lo siguiente :

- a) En un fondo genético *GDH1* la falta de *GCN5* resulta en una disminución de un 80% en la transcripción de *GLT1* (1235 vs 221); lo cual no resulta en una disminución proporcional de la actividad enzimática de GOGAT (25 vs 17, que corresponde al 32%).
- b) En el fondo genético mutante *gdh1*, la falta de *GCN5* resulta en una disminución de un 73% de la transcripción de *GLT1* (4062 vs 1103), lo cual no resulta en una disminución proporcional en la actividad enzimática de GOGAT (50 vs 28, lo que representa un 44%). Estos resultados claramente demuestran que Gcn5p tiene un papel importante en la transcripción de *GLT1*.
- c) En la cepa Romex1, la transcripción de *GLT1* está severamente disminuída correspondiendo a un 4% de la encontrada en una cepa *gdh1 GCN5*. En un fondo genético *gdh1*, la sola mutación "null" en *GCN5* (*gcn5Δ*) disminuye la transcripción de *GLT1* en un 70%, dejando un 30% de transcripción *GCN5*-independiente. Estos resultados indican que la transcripción disminuída de *GLT1* en la cepa Romex1 no es atribuible a la sola falta de *GCN5* y por lo tanto sugiere que la cepa Romex1 es portadora de una mutación(es) adicional(es) que afecta(n) la transcripción de *GLT1*. Esta(s) segunda(s) mutación(s) aunada(s) a la detectada en *GCN5* resulta(n) en una actividad enzimática de GOGAT severamente reducida en la cepa Romex1.
- d) Los resultados de la Tabla 3 también muestran que la transcripción de *GLT1* puede reducirse hasta un 70%, sin que esto resulte en una disminución proporcional de la actividad de GOGAT, lo que sugiere que no todo el transcrito de *GLT1* resulta en una producción de la enzima activa y que por lo tanto existe un sistema de regulación pos-transcripcional. Aunque tampoco se puede descartar un mecanismo de regulación traduccional.

Los resultados hasta ahora presentados demuestran por un lado, que *GCN5* regula la expresión de *GLT1*, y por otro, que la cepa Romex1 es portadora de otra(s) mutación(es) que afecta(n) la expresión de *GLT1*.

Como ya se mencionó en la INTRODUCCIÓN *Gcn5p* forma parte de complejos multiproteicos, como es el complejo *ADA/GCN5* en donde se incluyen los productos de los genes *ADA1, ADA2, ADA3* y *ADA5*. Por lo tanto se decidió analizar el efecto de la falta de *Ada2p* y *Ada3p* sobre la expresión de *GLT1*. La expresión del gen *HIS3* se utilizó como control, ya que existen reportes que demuestran que *HIS3* está regulado por el circuito GCN y por tanto, por *GCN4* y *GCN5* (Hinnebush, 1992; Georgakopoulos y Thireos, 1992; Filetici y col. 1998).

II En Condiciones de Deprivación de Aminoácidos (Inducción), la Expresión del gen *HIS3* es Dependiente del Complejo *ADA/GCN5* o *SAGA*.

El gen *HIS3* codifica para la enzima histidil deshidrogenasa, que forma parte de la vía de biosíntesis del aminoácido histidina. La regulación transcripcional de *HIS3* ha sido ampliamente estudiada en *S. cerevisiae* (Struhl, 1982; Struhl, 1985; Hinnebush, A. 1992), encontrándose que en condiciones de deprivación de aminoácidos, la expresión de *HIS3* puede llegar a aumentar de ocho a diez veces. Así mismo se ha encontrado, que este incremento en la expresión depende de *Gcn4p* (Struhl y Davis 1981, Struhl 1986) y *Gcn5p* (Georgakopoulos y Thireos 1992). Por esto, consideramos que la expresión de *HIS3* en diferentes mutantes del complejo *ADA/GCN5* podría ser utilizada como control de la respuesta GCN.

Como se mencionó en la INTRODUCCION, la deprivación de aminoácidos se puede generar creciendo a la levadura en presencia de un inhibidor que bloquee la vía de síntesis de algún aminoácido, por ejemplo el 5-Metil Triptofano (5-MT) que inhibe la síntesis de triptofano, o bien el 3-1,2,4,-Amino Triazol (3-AT) que inhibe la síntesis de histidina. Entonces estos inhibidores provocan deprivación por triptofano e histidina, respectivamente.

Las siguientes cepas (obsequiadas por L. Guarente) se transformaron con el plásmido monocopia YCp87, que contiene el promotor de *HIS3* fusionado a la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína β -galactosidasa, y el gen *LEU2* como marcador genético seleccionable :

PSY316 *GDH1,ADA2,ADA3,GCN5* (silvestre),

PSY316 *GDH1 ada2 Δ ,ADA3,GCN5*,

PSY316 *GDH1,ADA2,ada3 Δ ,GCN5* y

PSY316 *GDH1,ADA2,ADA3,gcn5 Δ* .

Las cepas transformadas con el plásmido YCp87, se cultivaron en MM, en presencia o ausencia del inhibidor 5-MT; las células se cosecharon, se prepararon extractos y se determinó la actividad de β -gal.

Como se observa en la Tabla 4, los extractos preparados a partir de cultivos de la cepa silvestre **PSY316** presentan una actividad de β -gal. 8 veces mayor cuando las células se cultivan en presencia del inhibidor 5-MT, que cuando se cultivan en ausencia de este compuesto. La actividad de β -gal. determinada en extractos preparados a partir de los paquetes celulares de las mutantes *ada2 Δ* , *ada3 Δ* y *gcn5 Δ* cultivadas en presencia de 5-MT fué igual a la encontrada en extractos preparados en ausencia de este compuesto. Estos resultados claramente demuestran que la expresión inducida de *HIS3*, por privación, depende del complejo ADA/GCN5 o SAGA. Así mismo los resultados presentados en la Tabla 4, muestran que la expresión basal de *HIS3* (en ausencia de 5-MT) es independiente del complejo ADA/GCN5.

Tabla 4. Actividad específica de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *HIS3* en cepas *GDH1* alteradas en el complejo ADA/GCN5

CEPAS <i>GDH1</i>							
PSY316 / YCp87		<i>ada2</i> Δ / YCp87		<i>ada3</i> Δ / YCp87		<i>gcn5</i> Δ / YCp87	
MM	MM+5MT ²	MM	MM+5MT	MM	MM+5MT	MM	MM+5MT
2.45	19.87	3.15	3.52	2.40	1.88	1.46	3.03
(8 x)							

¹La actividad de β -gal se refirió como nmol/min/mg y el error estándar fué <15%.

²La concentración final del inhibidor 5-MT fué 1.5 mM.

A partir de las cepas arriba descritas, se obtuvieron mutantes en el gen *GDH1* ($\Delta gdh1$). Vale la pena mencionar que la combinación, *ada2* Δ *gdh1* Δ , no se logró obtener aún cuando el protocolo para interrumpir *GDH1* en la cepa *ada2* Δ se llevó a cabo varias veces. La Tabla 5 presenta las actividades enzimáticas de *GDH1*-NADP⁺ determinadas en la cepa silvestre *GDH1* y en las derivadas *gdh1*⁻. Esta nueva colección de cepas mutantes en *gdh1* se transformaron con el plásmido YCp87, con la finalidad de cuantificar la transcripción de *HIS3* en cepas *gdh1*⁻, a través de determinar la actividad enzimática de β -gal. Así, estas mutantes se cultivaron en presencia o en ausencia del 5-MT, se cosecharon, se prepararon extractos y se determinó la actividad específica de β -gal.

En la Tabla 6 se observa que la cepa *gdh1* Δ ,*ADA2*,*ADA3*,*GCN5* presenta un incremento de dos veces en la actividad de β -gal. cuando la cepa se cultiva en presencia de 5-MT, cuando se compara a la actividad de β -gal. obtenida en

Tabla 5. Actividad específica de GDH1-NADP⁺.

MUTANTES EN EL GEN <i>gdh1</i> Δ		
CEPAS	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmol/ min /mg)	
	GDH1-NADP ⁺	GOGAT
PSY316 (<i>GDH1,ADA2,ADA3,GCN5,GLT1</i>)	310.0	18.0
PSY316 <i>gdh1</i>Δ (<i>gdh1</i> Δ, <i>ADA2,ADA3,GCN5,GLT1</i>)	3.0	29.0
<i>ada3</i>Δ <i>gdh1</i>Δ (<i>gdh1</i> Δ, <i>ADA2,ada3</i> Δ, <i>GCN5,GLT1</i>)	1.0	7.0
<i>gcn5</i>Δ <i>gdh1</i>Δ (<i>gdh1</i> Δ, <i>ADA2,ADA3,gcn5</i> Δ, <i>GLT1</i>)	1.2	25

ausencia de 5-MT. Este resultado sugiere, que las mutantes carentes de *GDH1* no pueden responder de manera eficiente a la señal de deprivación debido a que presentan una poza menor de glutamato o bien que se requiera de una cierta cantidad de glutamato para responder a la deprivación. Así mismo los resultados presentados en la Tabla 6 confirman lo observado con respecto a las cepas de fondo genético *GDH1*, en el sentido de que por un lado la inducción de la transcripción de *HIS3* en condiciones de deprivación de aminoácidos es dependiente del complejo ADA/GCN5, mientras que la transcripción basal de *HIS3* es independiente del mencionado complejo.

Tabla 6. Actividad específica de β -gal¹ a partir del promotor de *HIS3* en cepas *gdh1*.

CEPAS <i>gdh1</i> Δ					
PSY316 / Ycp87		<i>ada3</i> Δ / YCp87		<i>gcn5</i> Δ / YCp87	
MM	MM+5MT ²	MM	MM+5MT	MM	MM+5MT
5.1	9.5	3.0	3.77	3.96	4.70
(2 x)					

¹.-La actividad específica de β -gal se expresa como nmol/min/mg.

².-El inhibidor 5-MT se utilizó a una concentración final de 1.2 mM.

III La Expresión Basal del gen *GLT1* es Dependiente del Complejo ADA/GCN5 o SAGA.

Con el fin de estudiar el efecto del complejo ADA/GCN5 (o SAGA) sobre la transcripción de *GLT1*, la colección de cepas *GDH1* obtenidas de L. Guarente y que se describieron en el inciso anterior se transformaron con el plásmido pLOU1, que contiene el promotor completo del gen *GLT1* fusionado a la β -galactosidasa y el gen *LEU2* como marcador seleccionable.

Las cepas pertinentes se cultivaron en MM, en presencia y en ausencia de 5-MT; se cosecharon, se prepararon extractos y se determinó la actividad enzimática de β -gal. Los resultados se muestran en la Tabla 7. La cepa silvestre PSY316 presentó una transcripción de *GLT1* que sólo aumentó dos veces en la condición deprivada (en presencia de 5-MT) con respecto a la condición basal (en ausencia de 5-MT). Así mismo, este ligero incremento no se observó en las mutantes *ada2* Δ , *ada3* Δ y *gcn5* Δ . Lo que resultó más interesante fué que a diferencia de lo encontrado para el gen *HIS3*, la transcripción basal de *GLT1* resultó fuertemente dependiente del complejo ADA/GCN5 (o SAGA). Dado que en ausencia ya sea de *ADA2*, *ADA3* o *GCN5* la transcripción (basal) de *GLT1*

disminuye considerablemente; no fué posible determinar el efecto de la falta de *ADA2*, *ADA3* o *GCN5* sobre la transcripción que ocurre en presencia de 5-MT.

Tabla 7. Actividad específica de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *GLT1* en cepas *GDH1*.

CEPAS <i>GDH1</i>							
PSY316 / pLOU1		<i>ada2</i> Δ / pLOU1		<i>ada3</i> Δ / pLOU1		<i>gcn5</i> Δ / pLOU1	
MM	MM+5MT ²	MM	MM+5MT	MM	MM+5MT	MM	MM+5M
1200	2500	258	174	89	165	205	222
(2 x)							

¹.-La actividad específica de β -gal está referida como nmol/min/mg.

².-La concentración final del 5-MT fué de 1.5 mM.

La colección de cepas mutantes en el gen *GDH1*, también se transformaron con el plásmido pLOU1. Las cepas pertinentes se cultivaron en presencia y en ausencia de 5-MT, se prepararon extractos y se cuantificó la actividad enzimática de β -galactosidasa. Los resultados se presentan en la Tabla 8. Tal y como se había reportado previamente por Valenzuela y col. (1998), se observó, que la expresión de *GLT1* es mayor en mutantes carentes de *gdh1* que en cepas que sí presentan esta actividad enzimática (Tabla 7 y Tabla 8). Con relación al efecto de la privación sobre la expresión de *GLT1*, encontramos, que en la cepa *gdh1* Δ ,*ADA2*,*ADA3*,*GCN5* la actividad de β -gal detectada en extractos obtenidos de cultivos incubados en presencia del 5-MT es igual a la detectada en ausencia del mismo análogo. Este resultado nuevamente sugiere que mutantes *gdh1*⁻ no son capaces de responder a la privación. Por otro lado se encontró que al igual que lo observado para las cepas *GDH1*, la falta de *ADA3* o *GCN5* resultó en una disminución importante en la actividad de β -gal, determinada en extractos obtenidos de cultivos preparados en condiciones basales, confirmando, que a diferencia de lo que ocurre con la expresión de

HIS3, la expresión basal de *GLT1* resultó dependiente del complejo ADA/GCN5 o SAGA. Nuevamente fué imposible determinar el efecto de la falta de los componentes del complejo ADA/GCN5 o SAGA sobre la expresión inducida de *GLT1*.

Tabla 8. Actividad de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *GLT1* en cepas *gdh1* Δ

CEPAS <i>gdh1</i> Δ					
PSY316 /pLOU1		<i>ada3</i> Δ /pLOU1		<i>gcn5</i> Δ /pLOU1	
MM	MM+5MT ²	MM	MM+5MT	MM	MM+5MT
3560	3350	239	142	1103	887

¹.- La actividad específica de β -gal está referida como nmol/min/mg.

².- La concentración final utilizada del 5-MT fué de 1.5 mM.

Los resultados hasta aquí presentados, sugieren que el glutamato pudiera jugar un papel en la respuesta a deprivación de aminoácidos, ya que en mutantes *gdh1*⁻, que poseen una poza intracelular de glutamato menor a la encontrada en una cepa *GDH1*⁺, tanto la transcripción de *HIS3* como la de *GLT1* prácticamente no responden a la presencia de análogos de aminoácidos. Con el fin de analizar este punto con más detalle, se prepararon extractos de cultivos de una cepa *GDH1*⁺ y de una cepa *gdh1*⁻ crecidos en presencia y en ausencia de 3-AT y de amonio o glutamato como fuentes de nitrógeno y se determinó la actividad enzimática de β -galactosidasa dirigida por el promotor del gen *HIS3*.

La Tabla 9 muestra que la actividad de β -gal determinada en extractos de cepas *GDH1*⁺ cultivados en amonio y en presencia de 3-AT, es 7 veces mayor a la detectada en ausencia de 3-AT; en tanto que, cuando se utilizaron extractos de una cepa *gdh1*⁻ el incremento en actividad de β -gal fué solamente de 2 veces.

Cuando se adicionó glutamato al medio de cultivo, los extractos obtenidos de la cepa *gdh1⁻*, crecidos en glutamato en presencia del 3-AT, presentaron una actividad 4 veces mayor que la detectada en ausencia de 3-AT; indicando así, que en presencia de glutamato la expresión de *HIS3* respondía mejor a la privación. Por otro lado, cuando la cepa *GDH1⁺* se cultivo en presencia de glutamato, la respuesta de *HIS3* en presencia de 3-AT fué solamente dos veces mayor a la encontrada en ausencia de 3-AT.

Tabla 9. Actividad específica de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *HIS3*.

FUENTE DE NITRÓGENO Y CONDICIÓN DE CRECIMIENTO	CEPAS	
	CLA1 / YCp87 (<i>GDH1⁺</i>)	MAR1/ YCp87 (<i>gdh1Δ</i>)
AMONIO	5.20	8.70
AMONIO + 3-AT²	35.40	19.00
GLUTAMATO	8.03	10.50
GLUTAMATO + 3-AT	16.00	37.70

¹.- La actividad específica de β -gal está referida como nmol/min/mg.

².- La concentración final del 3-AT fué de 10 mM.

Estos resultados indican, que existe una concentración óptima de glutamato, por arriba y por abajo de la cual, la respuesta a privación disminuye. Este punto es de particular interés, ya que el glutamato es el precursor de prácticamente todos los aminoácidos y la poza intracelular de glutamato podría resultar en una señal que definiera el "status" de abundancia o carencia del precursor. ¿ Qué sentido tendría desatar una respuesta a la privación cuando la concentración del precursor es muy baja?. Así mismo el exceso de glutamato pudiera constituir una señal de abundancia, que frenaría de algún modo la señal de privación.

IV ¿En qué Región del Promotor de *GLT1* Actúa el Complejo ADA/GCN5 o SAGA?

a) Papel del complejo ADA/GCN5 o SAGA en la expresión de *GLT1*, en una cepa *GDH1*⁺:

Los resultados presentados en el inciso anterior demuestran claramente que el complejo ADA/GCN5 participa en la transcripción del gen *GLT1*. Como se presentó en INTRODUCCIÓN, este complejo participa en la remodelación de la cromatina, modificando la organización nucleosomal de manera que se facilite la entrada de los activadores transcripcionales (Filetici y col. 1996). También se ha demostrado que existen activadores transcripcionales sensibles a la estructura nucleosomal, de tal manera que en mutantes carentes de *GCN5*, la acción de estos activadores se debilita notablemente, este es el caso del producto de *GCN4* (Gcn4p). Así mismo, otro grupo de activadores transcripcionales, por ejemplo *GAL4*, son insensibles a la estructura nucleosomal y por tanto su capacidad para activar la transcripción no se afecta en mutantes que presentan alteraciones en los complejos que se ocupan de la remodelación cromatínica (Filetici y col. 1996). El análisis del promotor de *GLT1* (Valenzuela y col. 1998), mostró que los principales reguladores del mismo eran: Gcn4p, Gln3 y un activador putativo del tipo Zn₂Cys₄. Así mismo se encontraron los elementos cis correspondientes en el promotor de *GLT1* (figura 4). Para el activador del tipo Zn₂Cys₄, se localizó una caja palindrómica perfecta alrededor del nucleótido -435 (ver figura 5).

Con el fin de determinar la(s) región(es) del promotor en donde podría estar actuando el complejo ADA/GCN5, se transformó una colección de cepas *GDH1+* portadoras de mutaciones "null" en *ADA2*, *ADA3* o *GCN5* con una serie de construcciones portadoras de diversas regiones del promotor de *GLT1* fusionadas a LacZ. Estas construcciones contienen el promotor completo de *GLT1* (pLOU1) o diversas deleciones 5' del mismo promotor (ver Tabla 10).

Tabla 10.- Actividad específica de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *GLT1*.

CONSTRUCCIÓN	DERIVADOS <i>GDH1</i>			
	Silvestre	<i>ada2</i> Δ	<i>ada3</i> Δ	<i>gcn5</i> Δ
<p>-608</p> <p>pLOU1</p>	1232.0	317.0	97.0	165.0
<p>-435</p> <p>pLOU4</p>	3057.0	975.0	89.0	1280.0
<p>-330</p> <p>pLOU9</p>	480.0	119.0	23.0	241.0
<p>-206</p> <p>pLOU12</p>	514.0	547.0	157.0	1467.0
<p>-35</p> <p>pLOU17</p>	3558.0	4971.0	730.0	8354.0

Los símbolos representan : Sitios potenciales de unión a Gcn4p (○); palíndrome (□); sitios de unión potenciales a Gln3p (◁, ▷); secuencias poly dA-dT (■); cajas TATA potenciales (●, ○); sitios de inicio de la transcripción (→, →); y regiones de represión potenciales río arriba (URR1, URR2).

¹.- La actividad de β -gal esta referida como nmol/min/mg.

La Tabla 10 muestra las actividades de β -galactosidasa determinadas en las diferentes cepas. Cuando se determinó la actividad de β -gal en cepas portadoras del promotor completo (renglón 1, tabla 10), se encontró que la falta de *ADA2*, *ADA3* o *GCN5* resultaba en una disminución importante de la actividad de β -gal cuando se comparaba con una cepa silvestre. La actividad de β -gal detectada en la cepa silvestre portadora de la construcción pLOU4 (renglón 2, tabla 10), resultó 2.5 veces mayor a la encontrada en la cepa silvestre transformada con pLOU1. Esto era de esperarse, ya que pLOU4 carece de la región represora URR1 (figura 4) (Valenzuela y col. 1998). La actividad de β -gal determinada a partir de pLOU4 en la cepa carente de *ADA3*, resultó 34 veces menor a la encontrada en la cepa silvestre y la encontrada en las mutantes *ada2* Δ y *gcn5* Δ resultó 2.3 veces menor a la encontrada en la cepa silvestre. La actividad de β -gal determinada a partir de pLOU9 en la cepa silvestre (renglón 3 carril 1), resultó 6 veces menor a la encontrada en la misma cepa con pLOU4. Esto se debe a que la construcción pLOU9 carece de una región activadora (Valenzuela y col. 1998). Nuevamente el efecto de la falta de *ADA3* resultó dramático (renglón 3 carril 3), en tanto que la falta de *ADA2* o *GCN5* (renglón 3 carriles 2 y 4) resultó en una disminución de actividad de β -gal de 2 a 4 veces. La actividad de β -gal determinada a partir del plásmido pLOU12 en la cepa silvestre resultó prácticamente igual a la determinada en la misma cepa portadora de pLOU9. La actividad de β -gal encontrada en la mutante *ada2* Δ con pLOU12 fué similar a la encontrada en la cepa silvestre, en tanto que la mutante *ada3* Δ nuevamente presentó una disminución evidente de actividad enzimática. Sorprendentemente, la actividad de β -gal encontrada en la mutante *gcn5* Δ portadora de pLOU12 se incrementó con respecto de la encontrada en la cepa silvestre/pLOU12. Finalmente, la actividad de β -gal detectada en la cepa silvestre portadora de pLOU17 resultó 3 veces mayor a la encontrada para la misma cepa con pLOU1, esto se debe a que pLOU17 carece de la región represora URR2 (Valenzuela y col. 1998). En este caso la falta de *ADA2* no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *GLT1*; la falta de *ADA3* la redujo 5 veces y

la falta de *GCN5* aumento al doble la expresión. Estos resultados sugieren lo siguiente:

b) Papel de ADA2 y GCN5

1) Nuestros datos muestran que el papel de *Ada2p* y *Gcn5p* es muy evidente en la expresión de *GLT1* dirigida por *pLOU1*. Esta construcción comprende 5 sitios de unión a *Gcn4p* (0). En éste sentido se podría suponer que el complejo ADA/GCN5 actúa remodelando la cromatina para facilitar la unión del activador *Gcn4p*. La construcción *pLOU4* carece del primer sitio de unión a *Gcn4p* (figura 4, Tabla 10, renglón 2), que es, de los cinco sitios de unión potenciales el que presenta la secuencia consenso (TGACTC) y por ello representa la de mayor afinidad a *Gcn4p* (Hinnebusch y Fink 1983; Tavernarakis y Thireos 1997), por lo tanto, la actividad transcripcional de este promotor dependería mayoritariamente de la acción de otros activadores (*Gln3p*, *Zn₂Cys₄*) (Valenzuela y col.1998) y menos de *GCN4*. Por eso la falta de *ADA2* o *GCN5* tiene un efecto menos dramático sobre la expresión de *GLT1*. Ahora bien, la construcción *pLOU9* carece de la región de acción de *Gln3* y *Zn₂Cys₄* (Valenzuela y col. 1998), conserva tres elementos de unión a *Gcn4p* y un fragmento importante de la región represora *URR2*. Por lo tanto en este caso, la transcripción dependería por un lado, del efecto represor de *URR2*, y por otro lado de la activación *GCN4*-dependiente, asistida por el remodelamiento de la estructura nucleosomal.

c) Papel de ADA3:

Nuestros datos sugieren que *ADA3* pudiera tener un papel dentro del complejo ADA/GCN5 o SAGA y otro por sí mismo.

- 1) En el caso de la transcripción dirigida por *pLOU1* y *pLOU9*, *ADA3* participaría como parte del complejo ADA/GCN5 o SAGA.
- 2) El hecho de que la falta de *ADA3* redujera severamente la expresión de *GLT1* en todas las construcciones indica que, como se ha sugerido anteriormente (vom Baur y col. 1998), el efecto de *Ada3p* por sí solo pudiera ser el reclutamiento de la RNA polimerasa y los factores basales de la

transcripción. En este sentido, la expresión dirigida por pLOU12 y pLOU17 que es independiente de Gcn4p y Gln3p (Valenzuela y col. 1998), dependería únicamente de los elementos basales.

- 3) El hecho de que la falta de Gcn5p resulta en un aumento de la transcripción dirigida por pLOU12 y pLOU17 sugiere que Gcn5p pudiera estar atrapando a ADA3 dentro de los complejos ADA o SAGA, limitando la concentración del mismo y por tanto en ausencia de Gcn5p la concentración de ADA3 pudiera incrementarse y por tanto la transcripción de *GLT1*.

Es conveniente señalar que Valenzuela y col. (1998) han demostrado, que en una cepa *GDH1*⁺, la transcripción de *GLT1* se encuentra reprimida por un mecanismo dependiente de glutamato.

d) Papel del complejo ADA/GCN5 o SAGA en la expresión de *GLT1* en una cepa *gdh1*⁻ :

Con el fin de analizar el papel de ADA/GCN5 o SAGA sobre la transcripción de *GLT1* en una condición de derrepresión, utilizando la estrategia descrita para la cepa *GDH1*⁺, se preparó una colección de cepas en un fondo genético *gdh1*⁻. La Tabla 11 presenta las actividades de β-galactosidasa detectadas en las diferentes cepas.

Al igual que para las derivadas *GDH1*⁺, la falta de ADA3, resultó en una disminución importante de la transcripción de *GLT1*, confirmando nuestras observaciones en la cepa *GDH1*⁺. Ahora bien, la falta de GCN5, redujo la transcripción pLOU1 y pLOU4 dependiente de manera similar a lo observado en la cepa *GDH1*⁺. La falta de GCN5 disminuyó notablemente la expresión de *GLT1* dependiente de pLOU9 indicando, como se mencionó anteriormente, que en esta construcción la expresión de *GLT1* depende mayoritariamente de Gcn4p y por ende de la remodelación nucleosomal. En el caso de pLOU12 y pLOU17, la falta de GCN5 no resultó en un incremento de la expresión de *GLT1*, sugiriendo que en una condición de derrepresión el papel de ADA3 no es tan importante.

Tabla 11.- Actividad específica¹ de β -galactosidasa a partir del promotor de *GLT1*

CONSTRUCCIÓN	DERIVADOS <i>gdh1</i>		
	Silvestre	<i>ada3</i> Δ	<i>gcn5</i> Δ
<p>pLOU1</p>	4062.0	199.0	1328.0
<p>pLOU4</p>	6570.0	349.0	2786.0
<p>pLOU9</p>	1183.0	32.0	66.5
<p>pLOU12</p>	2853.0	181.0	182.0
<p>pLOU17</p>	6770.0	917.0	2908.0

Los símbolos representan : Sitios potenciales de unión a Gcn4p (); palíndrome (); sitios de unión potenciales a Gln3p (); secuencias poly dA-dT (); cajas TATA potenciales (,); sitios de inicio de la transcripción (); y regiones de represión potenciales río arriba (URR1 , URR2).

¹.- La actividad de β -gal. esta referida como nmol/min/mg.

Por lo tanto se podría concluir que :

- 1) El complejo ADA/GCN5 o SAGA funcionan como coactivadores de la transcripción a través de remodelar la estructura nucleosomal (Marcus y col. 1994; Candau y col. 1996a ; Filetici y col. 1996; Candau y col. 1997) y por tanto facilitar el acceso del activador transcripcional codificado por *GCN4*.
- 2) *Ada3p* participa dentro de los complejos ADA/GCN5 y/o SAGA, y además de manera independiente.
- 3) La expresión de *GLT1* depende de la represión mediada por glutamato y de la capacidad de activación mediada por el complejo ADA/GCN5 o SAGA.

V Existen otros Elementos que Regulan la Expresión de *GLT1*.

Como se explicó en incisos anteriores, la caracterización de la mutante Romex1, sugería que el fenotipo de la misma se debía a la presencia de al menos dos mutaciones, una de las cuales había afectado al gen *GCN5*. En la INTRODUCCIÓN se explicó que el producto del gen *GCN4*, es un activador transcripcional, del sistema denominado GCN (Control General Nitrogenado), que regula la expresión de muchos genes cuyos productos participan en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1992). Por otro lado, se ha reportado, que mutantes alteradas en el circuito GCN son sensibles a análogos de aminoácidos, porque son incapaces de responder a la señal(es) de privación. Dado que *GCN5* forma parte del circuito GCN, las mutantes *gcn5* son sensibles a análogos de aminoácidos (por ejemplo 3-AT y 5-MT). Cuando se probó la sensibilidad a análogos de aminoácidos en la cepa Romex1, se encontró que esta cepa era sensible a análogos de aminoácidos, como era de esperarse. Con el fin de obtener segregantes portadoras de cada una de las mutaciones presentes en la cepa Romex1, esta mutante se cruzó con la cepa DAN1 (*Mat α ,gdh1,GDH3,GLT1,GCN5,ura3,leu2*). Los diploides se hicieron esporular y se sembraron en placas de cultivo con medio mínimo adicionado de uracilo y leucina. Como una primera aproximación, se seleccionaron segregantes resistentes o sensibles a 3-AT, suponiendo que la segunda mutación presente en Romex1 no participaba en el fenotipo de sensibilidad a análogos. Cien de las esporas que formaron colonias se sembraron en medio mínimo con uracilo y leucina, y también en medio mínimo con uracilo y leucina más 3-AT (10 mM); de tal manera que se seleccionaron segregantes resistentes y sensibles a la presencia del análogo 3-AT. Así se purificó una spora de cada tipo: la cepa 24 (3-AT^R) y la cepa 2523 (3-AT^S).

Considerando el razonamiento descrito en el párrafo anterior, supusimos que la cepa 2523 (3-AT^S) sería portadora de la mutación en *GCN5* presente en la cepa Romex1. Para corroborar esta suposición, se secuenció el gen *GCN5* de la cepa 2523; cuando se analizó la secuencia obtenida, se encontró que se trataba de un gen silvestre y que por lo tanto la segregante 2523 no era portadora de la

mutación en *GCN5*. Estos resultados sugerían que el fenotipo de sensibilidad a análogos de aminoácidos que presenta la cepa Romex1 se debía a la presencia de dos mutaciones, una en *GCN5* y otra en un gen hasta ahora desconocido que denominaremos gen X. Estos resultados constituyen un análisis genético preliminar de la cepa Romex1. Es evidente que para poder entender cuantos genes están implicados en el complejo fenotipo de la mutante Romex1, será necesario realizar un análisis genético formal por disección de tétradas.

En virtud de que se tenían las cepas 24 y 2523, se realizaron algunos experimentos con el fin de obtener información con respecto del fenotipo de las segregantes. Esta información podrá ser utilizada posteriormente para caracterizar con más detalle a las segregantes que en un futuro se obtengan por disección de tétradas.

a) La Mutación en el Gen X, presente en la Cepa 2523 Afecta la Expresión de *GLT1*.

Con el fin de determinar si la mutación(s) presente en la cepa 2523 afectaba la transcripción de *GLT1*, esta mutante se transformó con el plásmido pLOU1, que como ya se explicó anteriormente, contiene el promotor completo de *GLT1* fusionado a LacZ. También la cepa 24 se transformó con dicho plásmido. Las cepas pertinentes se crecieron en medio mínimo, se cosecharon los cultivos y se prepararon los extractos para medir la actividad enzimática de β -galactosidasa. Los resultados se presentan en la Tabla 12. La actividad de β -gal detectada en las cepas 2523/pLOU1 es de tan solo el 40% de la encontrada en la cepa 24/pLOU1. La Tabla 12 también muestra que cuando la actividad de β -gal se determinó en la cepa Romex1 transformada con el plásmido pSIM1, portador del promotor completo de *GLT1* fusionado a LacZ, (ver MATERIALES Y MÉTODOS) la actividad enzimática detectada fué 5% de la detectada en la cepa 24. Ahora bien, con el fin de determinar el efecto de la falta de *GCN5* sobre la expresión de *GLT1* se preparó una mutante "null" en *GCN5* (ver MATERIALES Y MÉTODOS), a partir de la cepa DAN1, generando la cepa DAN *gcn5* Δ . Posteriormente esta cepa se transformó con el plásmido pLOU1. La actividad de β -gal detectada en

esta mutante resultó ser el 25% de la detectada en la cepa 24/pLOU1. Estos resultados demuestran que la mutante Romex1 es portadora de al menos dos mutaciones, ya que esta cepa presenta una actividad transcripcional de *GLT1* severamente disminuída, en tanto que una mutación "null" en *GCN5*, o la mutación en *X* presente en la cepa 2523, afectan en mucho menor grado la transcripción de *GLT1*. Cuando se determinó la actividad de GOGAT en las cepas Romex1 y sus derivadas, se encontró que la actividad enzimática de GOGAT presenta una clara disminución en las cepas Romex1 y Romex 1/pSIM1, que son aquellas en las que la transcripción de *GLT1* está severamente disminuída.

Tabla 12. Actividad específica de β -galactosidasa a partir del promotor de *GLT1*.

CEPAS (Genotipo relevante)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmol/min/mg)	
	β -gal	GOGAT
DAN (<i>gdh1,GCN5,X,ura3,leu2</i>)	N.D.	31.0
Romex1 (<i>gdh1,gcn5,x,ura3</i>)	N.D.	15.0
Romex1/ pSIM1 (<i>gdh1,gcn5,x,URA3</i>)	188.0	13.5
24/ pLOU1 (<i>gdh1,GCN5,X,LEU2</i>)	3950.0	54.5
2523/ pLOU1 (<i>gdh1,GCN5,x,LEU2</i>)	1625.0	48.0
DAN <i>gcn5</i>Δ/pLOU1 (<i>gdh1,gcn5Δ,X,URA3,LEU2</i>)	956.0	28.0

b) ¿En qué Región del Promotor de *GLT1* Actúa el Producto del Gen X (Xp)?

Con el fin de determinar si existía una región particular del promotor de *GLT1* que pudiera ser el sitio de acción del producto del gen X, se transformó la mutante 2523 con una colección de plásmidos portadores de fusiones a LacZ de diferentes regiones del promotor de *GLT1*, desde el promotor completo hasta el fragmento más pequeño del promotor capaz de sostener actividad transcripcional (ver Tabla 13). Como se muestra en la Tabla 13, la mutante *x* presenta una actividad transcripcional de *GLT1* menor a la encontrada en una cepa silvestre para *GCN5* y *X*, en todas las construcciones utilizadas. Este resultado sugiere que el producto de *X* pudiera estar actuando, por si solo o dentro de complejos implicados en el funcionamiento de la maquinaria basal de transcripción.

Tabla 13. Actividad específica de β-galactosidasa¹ a partir del promotor de *GLT1*.

CONSTRUCCIÓN	SILVESTRE (<i>gdh1,GCN5,X</i>)	2523 (<i>gdh1,GCN5,x</i>)
<p>pLOU1</p>	4062	1809.0
<p>pLOU4</p>	6570	3414.4
<p>pLOU9</p>	1183	721.3
<p>pLOU12</p>	2853	1296.0
<p>pLOU17</p>	6770	4147.3

Los símbolos representan : Sitios potenciales de unión a Gcn4p (\square); palíndromo ($\square\square$); sitios de unión potenciales a Gln3p (\triangleleft , \triangle); secuencias poly dA-dT (\blacksquare); cajas TATA potenciales (\bullet , \circ); sitios de inicio de la transcripción (\rightarrow , \dashrightarrow); y regiones de represión potenciales río arriba (URR1 , URR2).

¹.- La actividad de β-gal esta referida como nmol/min/mg.

c) Una copia adicional de GCN5 no suple la falta de X.

Dado que la falta de Gcn5p y/o Xp resultan en fenotipos similares, uno se podría preguntar si una copia extra de GCN5 supliría la falta de X. Con el fin de analizar este punto, se prepararon cepas derivadas de la 2523 portadoras tanto de pLOU1 o pLOU4, como de un plásmido portador de una copia completa del gen GCN5 (plásmido pCA) (ver Tabla 13 y Tabla 2).

Tabla 14. Actividad específica de β -galactosidasa¹ a partir del promotor de *GLT1*.

CONSTRUCCIÓN	SILVESTRE (<i>gdh1,GCN5,X</i>)	2523 (<i>gdh1,GCN5,x</i>)
<p>-608</p> <p>pLOU1</p>	4062	1888.0
<p>-609</p> <p>pLOU1 + pCA (GCN5)</p>	N.D.	3026.0
<p>-435</p> <p>pLOU4</p>	6570	3777.0
<p>-435</p> <p>pLOU4 + pCA (GCN5)</p>	N.D.	3727.0

Los símbolos representan : Sitios potenciales de unión a Gcn4p (\square); palíndromo (\square); sitios de unión potenciales a Gln3p (\triangleleft , \triangle); secuencias poly dA-dT (\blacksquare); cajas TATA potenciales (\bullet , \cdot); sitios de inicio de la transcripción (\rightarrow , \dashrightarrow); y regiones de represión potenciales río arriba (URR1 , URR2).

¹.- La actividad de β -gal está referida como nmol/min/mg.

N.D. No Determinado.

La Tabla 14 muestra, que en mutantes portadoras de la mutación en *X* la presencia de una copia adicional de *GCN5* no restituye la expresión silvestre de *GLT1*. Esto indica que el papel de *X* en la actividad transcripcional de *GLT1* implica una vía diferente de aquella en la que participa *GCN5*. Es importante hacer notar que tanto la falta de *GCN5* como la de *X* repercute en la sensibilidad a análogos de aminoácidos. Esto resulta particularmente interesante, ya que sugiere que existe al menos una vía adicional a la de *GCN4* (*GCN*) que podría participar en la respuesta a privación de aminoácidos.

El análisis genético de la *Romex1*, que se ha presentado en este capítulo, constituye un primer esfuerzo, desde luego aún incompleto, que nos ha permitido obtener herramientas que utilizaremos más adelante para hacer un estudio de genética formal. Dentro de nuestras estrategias consideramos que las de mayor prioridad son :

- 1) Cruzar la cepa *Romex 1* con la cepa *DAN1* para llevar a cabo disección de tétradas. La segregación se analizará utilizando la sensibilidad y resistencia a la presencia del 3-AT y en las tétradas pertinentes, se determinará la actividad transcripcional de *GLT1* y la actividad enzimática de *GOGAT*.
- 2) Clonación por complementación del gen *X*.

CONCLUSIONES :

- La cepa Romex1 presenta una expresión de *GLT1* severamente disminuída debido a que contiene una mutación en el gen *GCN5* y al menos otra mutación en otro gen (gen *X*). La s3la mutación en *GCN5* o en *X* afecta la expresión de *GLT1* pero no a los mismos niveles obtenidos en la cepa Romex1.
- La mutación ya sea en *GCN5* o en *X* no afecta la actividad enzimática de GOGAT, aún cuando el transcrito de *GLT1* sí disminuye. Por lo tanto existe un sistema de regulación pos-traducciona1.
- La cepa 2523 (*gdh1⁻,GCN5⁺,x⁻*) presenta una expresión disminuída de *GLT1*, es sensible a la presencia del 3-AT y tiene un *GCN5* silvestre. Por lo tanto es portadora de una mutación (*x⁻*) que le confiere dicho fenotipo.
- La transcripción del gen *HIS3*, bajo condiciones de deprivación es dependiente de Gcn4p y del complejo ADA/GCN5; mientras que bajo condiciones de no-deprivación, no es dependiente ni de Gcn4p ni del complejo ADA/GCN5.
- Una cepa *gdh1⁻* crecida bajo condiciones de deprivación es incapaz de inducir la expresión del gen *HIS3*, sin embargo una cepa *GDH1⁺* responde adecuadamente. Además, cuando una cepa *gdh1⁻* se crece en presencia de glutamato y en condiciones de deprivación, la expresión inducida de *HIS3* se lleva a cabo normalmente. Por lo tanto estos resultados sugieren que existe un rango en la concentración de glutamato adecuado para la respuesta a deprivación.
- La transcripción basal del gen *GLT1* es fuertemente dependiente del complejo coactivador ADA/GCN5 o SAGA, ya que estaría remodelando la estructura de la cromatina facilitando así la unión del activador principal Gcn4p.
- La transcripción del gen *GLT1* es severamente dependiente de ADA3p. Así Ada3p puede tener dos funciones:
 - a) Formar parte del complejo ADA/GCN5 o SAGA, o bien
 - b) Funcionar de manera independiente.

PERSPECTIVAS DE ESTE TRABAJO :

Determinar el número de mutaciones presentes en la cepa Romex1.

En ausencia de Gcn5p existe una expresión residual de *GLT1* por lo que es muy importante determinar de quién depende.

Clonación del gen *X*.

Determinar con que activador transcripcional funciona el complejo ADA/GCN5 o SAGA para llevar a cabo la transcripción de *GLT1*.

Estudiar cual es la función del glutamato, como una molécula que forma parte del sistema de transducción de señales que participa en la respuesta a privación de aminoácidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS :

- Alba L.L.A.** (1995). Tesis doctoral: "Caracterización genética y fisiológica de un gen (*GUS2/GCN5*) que regula la actividad de glutamato sintasa (GOGAT) de *Saccharomyces cerevisiae*". Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Avendaño, A.,** A. DeLuna, H. Olivera, L. Valenzuela, and A. González. (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 5594-5597.
- Barlev, N.,** R. Candau, L. Wang, P. Darpino, N. Silverman, and S. Berger. (1995). Characterization of physical interaction of the putative transcriptional adaptor, *ADA2*, with acidic activation domains and TATA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 19337-19344.
- Berger, S.L.,** B. Piña, N. Silverman, G.A. Marcus, J. Agapite, J.L. Regier, S.J. Triezenberg, and L. Guarente. (1992). Genetic isolation of *ADA2*: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell*, **70**: 251-265.
- Bohannon, D.,** and A.L. Sonenshein. (1989). Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **171**: 4718-4727.
- Brownell, J.E.** and C.D. Allis. (1995). An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 6364-6368.
- Brownell, J.E.** and C.D. Allis. (1996a). Special HATs for special occasions: Linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**: 176-184.
- Brownell, J.,** J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. Edmondson, S. Roth and C.D. Allis. (1996b). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5 linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. **84**: 843-851.
- Candau, R.** and S. Berger. (1996a). Structural and functional analysis of yeast putative adaptors: Evidence for an adaptor complex *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**: 5237-5245.

- Candau, R.,** P. Moore, L. Wang, N. Barlev, C. Ying, C. Rosen, and S. Berger. (1996b). Identification of functionally conserved human homologues of the yeast adaptors ADA2 and GCN5. *mol. Cell. Biol.* **16**: 593-602.
- Candau, R.,** J. X. Zhou, C. D. Allis and S. Berger. (1997). Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function *in vivo*. *EMBO J.* **16**: 555-565.
- Castaño, I.,** F. Bastarrachea and A.A. Covarrubias. (1988). *gltBDF* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 821-827.
- Castaño, I.,** N. Flores, F. Valle, A.A. Covarrubias and F. Bolivar. (1992). *gltF*, a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen regulated gene expression. *Molec. Microbiol.* **6**: 2733-2741.
- Cogoni, C.,** L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballario, and A. González. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* **177**: 792-798.
- Doherty, D.** (1970). L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods of Enzymology.* **17**: 850-856.
- Dower, W. J.,** J. F. Miller and C. W. Ragsdale. (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Drillien, R.,** and F. Lacroute. (1972). Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* **109**: 203-209.
- Ernsting, B.R.,** J.W. Denninger, R.M. Blumenthal, and R.G. Matthews. (1993). Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: How is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine responsive regulatory protein?. *J. Bacteriol.* **175**: 7160-7169.
- Felsenfeld, G.** (1996). Chromatin unfolds. *Cell.* **86**: 13-19.
- Filetici, P.,** P. Martegani, L. Valenzuela, A. González and P. Ballario. (1996). Sequence of the *GLT1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the domain structure of yeast glutamate synthase. *Yeast*, **12**: 1359-1366.

- Filetici, P., C. Aranda, A. González and P. Ballario.** (1998). *GCN5*, a yeast transcriptional coactivator, induces chromatin reconfiguration of *HIS3* promoter *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**: 84-87.
- Folch, J.L., A. Antaramian, L. Rodríguez, A. Bravo, A. Brunner and A. González.** (1989). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* **171**: 6776-6781.
- Grant, P.A., L. Duggan, J. Cote, S.M. Roberts, J. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C.D. Allis, F. Winston, S.L. Berger, and J.L. Workman.** (1997). *yGCN5* function within multimeric ADA and SPT/ADA adaptor complexes to acetylate nucleosomal histones. *Genes & Dev.* **11**: 1640-1650.
- Georgakopoulos, T., and G. Thireos** (1992). Two distinct yeast transcriptional activators request the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* **11**: 4145-4152.
- González A., L. Rodríguez, H. Olivera and M. Soberón.** (1985). NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase activity is impaired in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that lack aconitase. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2565-2571.
- Gonzalez A., J. Membrillo-Hernández, H. Olivera, C. Aranda, G. Macino, and P. Ballario.** (1992). Cloning of yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (*GUS2*) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol. Microbiol.* **6**: 301-308.
- Grenson, M.** (1983). Study of the positive control of the general amino acid permease and other ammonia-sensitive uptake systems by the product of the *NPR1* gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **133**: 141
- Hampsey, M.** (1997). A SAGA of histone acetylation and gene expression. *Trends Genet.* **13**: 427-429
- Harbury, P.A.B. and K. Struhl.** (1989). Functional distinctions between yeast TATA elements. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 5298-5304.
- Hebbes, T. R., A. L. Clayton, A. W. Thorne, and Crane-Robinson.** (1994). *EMBO J.* **13**: 1823-1830.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Hinnebush, A. G.**, and G. R. Fink. (1983). Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**: 5374-5378.
- Hinnebush, A.G.** (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. pp 319-414. In Jones, E. W., J. R. Pringle and J. R. Broach (eds): "The Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Gene Expression. Vol II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. USA.
- Hope, I. A.**, and K. Struhl. (1986). Functional dissection of a eucaryotic transcriptional activator protein, *GCN4* of yeast. Cell. **46**: 885-894.
- Horiuchi, J.**, N. Silverman, G.A. Marcus, and L. Guarente. (1995). ADA3, a putative transcription adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. Mol. Cell. Biol. **15**: 1203-1209.
- Horiuchi, J.**, N. Silverman, B. Piña, G.A. Marcus, and L. Guarente. (1997). *ADA1*, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than *GCN5*, *ADA2*, or *ADA3*. Mol. Cell. Biol. **17**: 3220-3228.
- Hummelt, G.**, and J. Mora. (1980). Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **96**: 1688-1694.
- Ito, H.**, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. **153**: 163-168.
- Kingston, R. E.**, C. A. Bunker, and A.N. Imbalzano. (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. Genes & Dev. **10**: 905-920.
- Koleske, A.J.**, S. Buratowski., M. Nonet and R.A. Young. (1992). A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II, CTD and TFIID. Cell. **69**: 883-894.
- Kuo, M. H.**, J. Zhou, P. Jambeck, M.E.A. Churchill, and C. D. Allis. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. Genes & Dev. **12**: 627-639.

- Lee, D.Y.**, J. J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factors access to nucleosomal DNA. *Cell*. **72**: 73-84.
- Lowry, O.H.**, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin pHenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McNeil, J. B.** and M. Smith. (1986). Transcription initiation of *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome C gene. Multiple, independent T-A-T-A sequences. *J. Mol. Biol.* **187**:363-378.
- Marcus, G.A.**, N. Silverman, S. Berger, J. Horiuchi, and L. Guarente. (1994). Functional similarity and pPhysical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* **13**: 4807-4815.
- Marcus, G.A.**, J. Horiuchi, N. Silverman, and L. Guarente. (1996). ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, wich are involved in transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3197-3205.
- Miller, J. F.** (1992). "A short course in bacterial genetics". Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchel, A. P.** (1985). The *GLN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. *Genetics*, **111**: 243.
- O'Neil, K.T.**, J.D. Shuman, C. Ampe, and W.F. de-Grado. (1991). DNA-induced increase in the alpHa-helical content of C/EBP and *GCN4*. *Biochem.* **30**: 9030-9034.
- Piña, B.**, S. Berger, G.A. Marcus, N. Silverman, J. Agapite, and L. Guarente. (1993). *ADA3* a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of *ADA2*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5981-5989.
- Pollard, K.**, and C. Peterson. (1997). Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6212-6222.
- Reitzer, L. J.** and B. Magasanik. (1987). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine in *Escherichia coli* and *Salmonella tyPHimurium*. *Cellular and Molecular Biology* (ed. F.C. Neidhardt et al), p.302. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Roeder, R.G.** (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *TIBS*. **21**: 2028-2035.
- Rose, M.D., P. Novock, J.H. Thomas, D. Botstein, and G.R. Fink.** (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*. **60**: 237-243.
- Rose, M.D. and D. Botstein.** (1983). Construction and use of gene fusions lacZ (B-galactosidase) which are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 167.
- Roon, R.J., H.L. Even, F. Larimore.** (1974). Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **118**: 89-95.
- Saleh, A., V. Lang, R. Cook, and C. Brandl.** (1997). Identification of native complexes containing the yeast coactivator / repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J. Biol. Chem.* **9**: 5571-5578.
- Senior, P. J.** (1975). Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* **123**: 407-418.
- Sherman, F.** (1991). Getting Started with Yeast. *Methods in enzymology.* **194**: 3-38.
- Silverman, N., J. Agapite, and L. Guarente.** (1994). Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **91**: 11665-11668.
- Stargell, L.A. and K. Struhl.** (1996). Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet.* **12** : 311-315.
- Struhl, K., and R.W. Davis.** (1981). Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **152**: 535-552.
- Struhl, K.** (1982). Regulatory sites for *HIS3* expression in yeast. *Nature.* **300**: 284-287.
- Struhl, K.** (1985). Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region. *Nucleic Acids Res.* **13**: 8587-8601.

- Struhl, K.** (1986). Constitutive and inducible *Saccharomyces cerevisiae* promoters: evidences for two distinct molecular mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3847-3853.
- Tavernarakis N.,** and G. Thireos. (1997). The DNA target sequence influences the dependence of the yeast transcriptional activator Gcn4 on co-factors. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 766-769.
- Valenzuela, L.,** P. Ballario, C. Aranda, P. Filetici, and A. González. (1998). Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**: 3533-3540.
- Vettese-Dadey, M.,** R.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane-Robinson, C.D. Allis, and J.L. Workman. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**: 2508-2518.
- vom Baur, E.,** Hauber M., Um S.J., Benecke A., Chambon P. and Losson R. (1998). The yeast Ada complex mediates the ligand-dependent activation function AF-2 of retinoid X and estrogen receptors. *Genes Dev.* **12**: 1278-1289.
- Wang, L.,** C. Mizzen, C. Ying, R. Candau, N. Barlev, J. Brownell, C.D. Allis, and S.L. Berger. (1997). Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human *GCN5* and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 519-527.
- Wang, L.,** L. Liu, and S.L. Berger. (1998). Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in ADA and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes & Development.* **12**: 640-653.
- Welihinda, A.,** W. Tirasophon, S.R. Green, and R.J. Kaufman. (1996). Gene induction in response to unfolded protein in the endoplasmic reticulum is mediated through Ire1p kinase interaction with a transcriptional coactivator complex containing Ada5p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 4289-4294.
- Wolffe, A.P.** and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell.* **84**: 817-819.