



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE
LOS PARÁLOGOS *BAT1* Y *BAT2* DE
Saccharomyces cerevisiae.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :
HERNÁNDEZ LORENZO FABIOLA

Tutor: DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ



MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2009



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dra. Alicia González Manjarrez en el laboratorio de 301 oriente, en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Dr. Gabriel del Río Guerra	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica en el laboratorio de la Quím., Cristina Aranda.

Se utilizaron los servicios de síntesis de oligonucleótidos y lectura de las membranas radiactivas en el Typhon, que provee la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Vocal	Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología
Secretario	Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Suplente	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular
Suplente	Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular

INDICE

Resumen	3
Introducción	4
1 El genoma de <i>S. cerevisiae</i> es un tetraploide degenerado	4
2 Expresión génica de los parálogos	5
3 Evolución de la transcripción	6
4 Modelo de estudio: Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (VIL)	8
5 Antecedentes: los parálogos <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	12
6 Planteamiento del problema	18
7 Hipótesis	19
8 Objetivos	20
9 Resultados y discusión	21
9.1 La expresión de <i>BAT1</i> predomina en condiciones biosintéticas mientras que <i>BAT2</i> en catabólicas	21
9.2 <i>BAT1</i> se reprime por sus productos finales V, I y L, donde la L juega un papel clave en la represión	22
9.3 La expresión de <i>BAT2</i> depende de la calidad de la fuente de nitrógeno	25
10 Los parálogos <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> se regulan por los factores transcripcionales <i>GCN4</i> , <i>LEU3</i> y <i>GLN3</i>	28
10.1 <i>BAT1</i> se activa basalmente por <i>GCN4</i>	28
10.2 <i>BAT2</i> se regula por <i>GLN3</i> y es un gen sujeto a NCR	29
11 Regulaciones atípicas de <i>GLN3</i> y <i>GCN4</i> sobre la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> respectivamente	32
12 <i>LEU3</i> regula de manera contrastante a <i>BAT1</i> y a <i>BAT2</i>	34
13 Regulación epigenética de <i>BAT2</i>	39
14 Conclusiones y perspectivas: Modelo divergente de expresión de las aminotransferasas <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	40
15 Metodología	45
i) Predicción de los elementos <i>cis</i> en el promotor de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> .	45
ii) Cepas de levadura	45
iii) Medios de cultivo	47
iv) Construcción del plásmido YEp363	47
v) Transformación de levadura por acetato de litio	49
vi) Ensayo de β -galactosidasa	50
vii) Cuantificación de proteína por Lowry	51
viii) Extracción de RNA total de levadura	52
ix) Síntesis de sondas radiactivas	53
x) Hibridación tipo Northern Blot	53
Referencias	56

RESUMEN

En el metabolismo de la levadura *S. cerevisiae* se propone que los parálogos se conservan porque modulan los flujos metabólicos, con funciones redundantes o subespecializados, como resultado de los cambios en su expresión y en sus actividades enzimáticas. Los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* codifican para aminotransferasas de los aminoácidos: valina, isoleucina y leucina, las cuales catalizan la reacción reversible: el último paso de la biosíntesis de estos aminoácidos y la primera de su degradación.

El patrón de expresión indica su tendencia metabólica: *BAT1* es principalmente biosintético mientras que *BAT2* es principalmente catabólico. La regulación está dada por la represión de uno de los parálogos y permite que en un momento fisiológico específico se exprese únicamente *BAT1* durante la biosíntesis (un medio que contiene glutamina), mientras que se exprese únicamente *BAT2* durante la degradación cuando el medio contiene valina, isoleucina y leucina.

La regulación diferencial consiste en lo siguiente: La presencia de los productos finales valina, isoleucina y leucina reprime la expresión de *BAT1* como resultado de un represor no-identificado dependiente de *LEU3* pero también *LEU3* es el responsable de la mayor expresión de *BAT1* en glutamina. Por otro lado, la expresión de *BAT2* se reprime por glutamina como fuente represora de nitrógeno y se expresa en fuentes no-represoras (GABA, P, V, I y L) dependiente de *GLN3* como represión catabólica nitrogenada. Así el cambio de expresión dirige el flujo metabólico en estas dos condiciones, ya que por los sustratos dirigen la dirección de la reacción, y esta particular expresión expone su carácter de subfuncionalización fisiológica a través su expresión.

Paradójicamente, los parálogos *BAT1* y *BAT2* responden de manera diferente a los mismos factores transcripcionales (*GCN4*, *LEU3* y *GLN3*), por lo que aún faltaría por determinar la participación de otros factores transcripcionales que produzcan el patrón de expresión contrastante entre los parálogos. Para comparar posteriormente si los elementos *cis* del gen tipo-ancestral a *BAT1* y a *BAT2* se haya subdividido como lo indica la hipótesis evolutiva de los parálogos.

INTRODUCCIÓN

1 El genoma de *S. cerevisiae* es un tetraploide degenerado

El genoma de la levadura *S. cerevisiae* presenta regiones duplicadas que conservan la sintenia y contienen entre 27 a 81 genes, por lo que se plantea que un ancestro de su linaje sufrió una duplicación durante el cretácico en un período posterior a su divergencia del linaje de *Kluyveromyces waltii* (Wolfe y Shields, 1997). Después de la duplicación genómica, prosiguió la pérdida del ~84% de las copias de los genes (figura 1) y conservó únicamente un ~16% de los genes parálogos en 16 cromosomas, que representan ~506 parejas de parálogos de un total de ~6000 genes (Kellis et al., 2004). Los parálogos conservados tienden a estar involucrados en respuestas a estrés y en el metabolismo de los carbohidratos, mientras que hay pocos implicados en procesos centrales como el ciclo celular y la meiosis. De acuerdo a la bases de datos del GO (Gene Ontology), los parálogos rara vez divergen con respecto a la función bioquímica de las proteínas para las cuales codifican (Wapinski et al., 2007); no obstante las diferencias podrían presentarse en la regulación alostérica como el caso de los parálogos Gdh1p/Gdh3p y Lys20p/Lys21p (DeLuna et al., 2001; Quezada et al., 2008; Goodey y Benkovic, 2008).

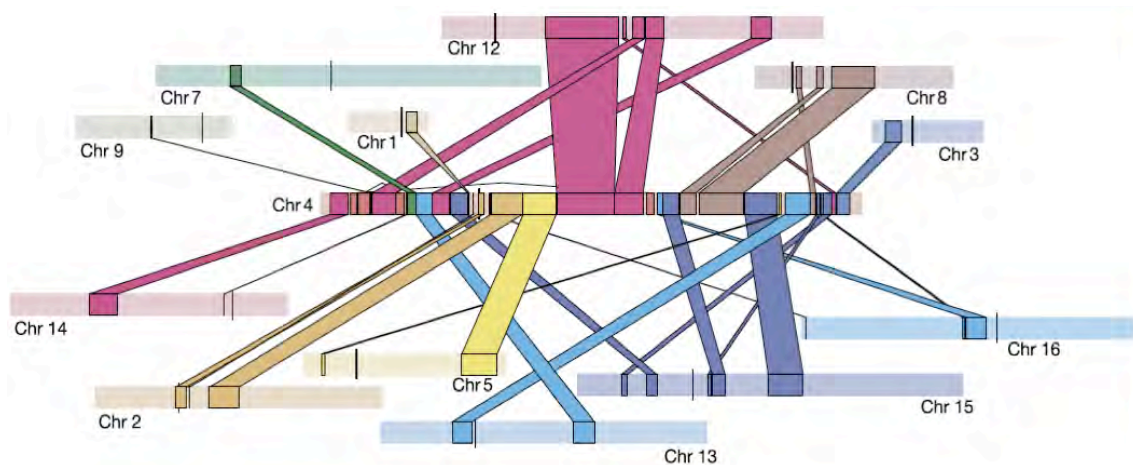


Figura 1. Organización genómica del cromosoma 4 de *S. cerevisiae*. Las regiones cromosómicas en colores se encuentran duplicadas en otros cromosomas. Las regiones duplicadas conservan el orden y la orientación de los genes (Tomada de Kellis et al., 2004).

Finalmente Wolfe y Shields (1997) postulan que la adaptación al metabolismo fermentativo–respiratorio de los Hemiascomycota (*Saccharomyces sensu stricto*), se vió favorecida por la duplicación del genoma completo y por el surgimiento de las angiospermas, que proveyeron de un nuevo nicho para las levaduras (frutos ricos en azúcar).

2 Expresión génica de los parálogos

La expresión de la pareja de parálogos conservados puede ser por doble dosis génica o bien por divergencia del patrón de expresión, como consecuencia del beneficio adaptativo que le confiere al organismo (Papp *et al.*, 2003; Wapinski *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). El proceso de cambio en la expresión génica se justifica por la “hipótesis del balance genético” (Papp *et al.*, 2003), que sugiere que la “presencia” de dos proteínas similares, pueda modificar el balance estequiométrico de los complejos proteicos. Pero que esta divergencia de expresión, “influenciada” por el balance estequiométrico, es posible dada la flexibilidad de los elementos *cis* (REF).

Por otro lado, la región codificante puede permanecer sin cambios o bien puede subfuncionalizarse (subdivisión de funciones) o neofuncionalizarse (Force *et al.*, 2005; Hittinger y Carroll, 2007).

Respecto a la expresión transcripcional de los genes duplicados, varios estudios de microarreglos muestran que la mayoría de los genes duplicados (70%) presentan un patrón de expresión diferencial y generalmente son genes involucrados en el estrés (Li *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2005; Ha *et al.* 2007). La regulación se modifica a través de la reorganización de sus módulos regulatorios, de esta manera se expresan nuevos módulos de genes (Conant y Wolfe, 2006; Wapinski *et al.*, 2007). De esta manera la célula se vuelve más robusta ya que los parálogos no solamente le confieren la posibilidad de adaptarse, sino también la modularización de la regulación puede evitar efectos pleotrópicos (Ha *et al.*, 2007; López-Maury *et al.*, 2008; Wapinski *et al.*, 2007).

De acuerdo a los experimentos Knock-outs, otra característica de los parálogos es la capacidad suplir la función de la pareja ausente al menos en algunas condiciones fisiológicas; lo que sugiere que existe una redundancia funcional, sin embargo no se ha podido establecer la relación de expresión entre una pareja de parálogos durante el respaldo (Conant y Wagner, 2004; Ihmels *et al.*, 2007; Dean *et al.*, 2008; DeLuna *et al.*, 2008).

3 Evolución de la transcripción

La transcripción tiene propiedades particulares que le han permitido a los organismos la adaptación en varios aspectos: controlar finamente los procesos metabólicos (Ihmels *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007) y de diferenciación celular, adecuarse a condiciones de estrés (López-Maury *et al.*, 2008) y generar nuevas formas fenotípicas en los organismos pluricelulares (Prud'homme *et al.*, 2007; Wray, 2007).

La transcripción ocurre cuando las proteínas (elementos *trans*) de unión a DNA reconocen las secuencias de los elementos (*cis*) de DNA en cada uno de los promotores y enhancers de los genes produciendo una cantidad determinada de transcrito. Cuando el factor transcripcional (*trans*) se une a su sitio (*cis*) en el promotor, éste es capaz de reclutar la maquinaria general de la transcripción al sitio de inicio de la transcripción. Cuando se trata de un factor (*trans*) represor que reconoce secuencias represoras y/o silenciadoras, se reclutando la maquinaria de silenciamiento cromatínico (Farnham *et al.*, 2009).

Los elementos *cis* y *trans* tienen una gran plasticidad (Amoutzias *et al.*, 2008; Bilu y Barkai 2005), de tal manera que promueven la evolución de los módulos regulatorios pero mantienen la robustez funcional (Tuch *et al.*, 2008b). Se ha propuesto que el reordenamiento de los módulos regulatorios ocurre por la pérdida o ganancia de un factor transcripcional a un gen o grupo de genes (Doniger y Fay, 2007; Force *et al.*, 2005; Tuch *et al.*, 2008a). Al cambiar la concentración de algún factor transcripcional en alguna condición fisiológica, se establece una débil interacción entre el factor transcripcional que transcribe el gen. Gracias a esta interacción, el nuevo factor transcripcional se establece como nuevo regulador, ya que se beneficia de las mutaciones en el promotor, para conformar su elemento *cis* (figura 2). Los elementos *cis* se caracterizan por ser pequeños (4 a 15 nucleótidos) y degenerados (reconocimiento de aún menos nucleótidos) (Bilu y Barkai 2005; Borneman *et al.*, 2007; Tuch y Barkai, 2008a), de hecho Badis *et al.*, (2009) proponen que los factores transcripcionales son capaces de unir al menos dos motivos *cis* con alta afinidad, como lo demuestran algunos factores transcripcionales en ratón. Incluso la variabilidad de los elementos *cis*, tienen implicaciones en modular la producción de transcrito como ya lo muestran indicios en las regiones enhancers de células de humano, las cuales presentan eQTL (eQTL: expressive quantitative trait loci) y muestran una correlación con los niveles de transcrito de cada gen (Dimas *et al.*, 2009).

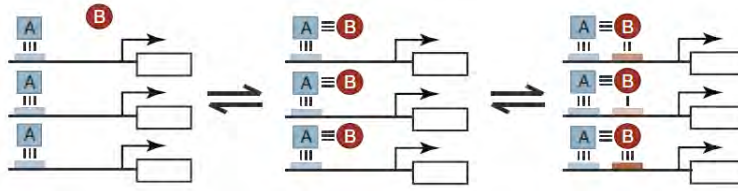


Figura 2. Reordenamiento de la regulación de un gen. Los factores transcripcionales se representan por A y B. Gracias a la interacción entre A y B, la mutación de un pequeño elemento *cis* se ve beneficiada. El proceso puede ser de ganancia o de la pérdida de un factor transcripcional (Figura tomada de Tuch *et al.*, 2008).

En las regiones regulatorias, no solo se unen los factores transcripcionales, sino también los nucleosomas. Los nucleosomas también tienen su secuencia preferencial (dinucleotido repetido cada ~10pb), y de acuerdo a su afinidad por la secuencia, compiten con el factor transcripcional por la unión al DNA. De esta forma se produce una determinada ocupación nucleosomal que permite que el factor transcripcional reclute la maquinaria transcripcional y se transcriba el gen en un determinado nivel de expresión o bien se requiera de remodelamiento nucleosomal para permitir la transcripción (Segal y Widom, 2009).

4 Modelo de estudio: Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (ML)

La biosíntesis de los tres aminoácidos de cadena ramificada: valina isoleucina y leucina, se lleva a cabo en una red metabólica interconectada. La ruta de la valina comparte todas sus enzimas (Ilv2p, Ilv5p e Ilv3p) con la ruta de la isoleucina, cuya ruta posee específicamente su primera enzima Ilv1p. Por otro lado el último intermediario (KIV: cetoisovalerato) de la valina, es al mismo tiempo el precursor inicial de la leucina (Kohlhaw, 2003) (figura 3).

Las rutas biosintéticas generalmente se controlan por el asa de retroalimentación negativa que produce su producto final, con la finalidad de evitar la producción innecesaria de enzima cuando las células se encuentran creciendo en un medio rico (Chin *et al.*, 2008; Moxley *et al.*, 2009). En las rutas de BCAAs, el producto final inhibe catalíticamente a su enzima inicial correspondiente: la valina inhibe a la Ilv2p, la isoleucina a la Ilv1p y la leucina a la dos isoformas de Leu4p (corta y larga), y a su parólogo Leu9p (83% de identidad) (Kohlhaw, 2003). En particular, los estudios de concentración de metabolitos de la ruta de V, I y L, sugieren que estos regulan fuertemente la vía biosintética (Moxley *et al.*, 2009).

La ruta biosintética de V, I y L también se regula transcripcionalmente por Leu3p. El factor transcripcional Leu3p se une al DNA como homodímero y pertenece a los factores transcripcionales que unen dos átomos de zinc Zn_2Cys_6 , y que es capaz de unir una mitad evertida (polaridad opuesta e invertida) de CCG, así que el elemento *cis* que reconoce es 5'-CCGGN2CCGG-3', con cuatro pares de bases de espacio (Fitzgerald *et al.*, 2006).

Existe una comunicación entre Leu3p y el intermediario α -IPM, ya que cuando interaccionan, Leu3p puede activar a sus genes blancos, es decir que el α -IPM es su co-activador que promueve la exposición de su dominio activador (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1997). Los experimentos *in vitro*, indican que cuando el α -IPM no se encuentra unido a Leu3p, el dominio de activación se enmascara y Leu3p actúa como represor. Por lo que se propone que el cambio de represor a activador de Leu3p, ocurre por la unión α -IPM, aunque es posible que el enmascaramiento y la represión sean dos procesos distintos (Wang *et al.*, 1997).

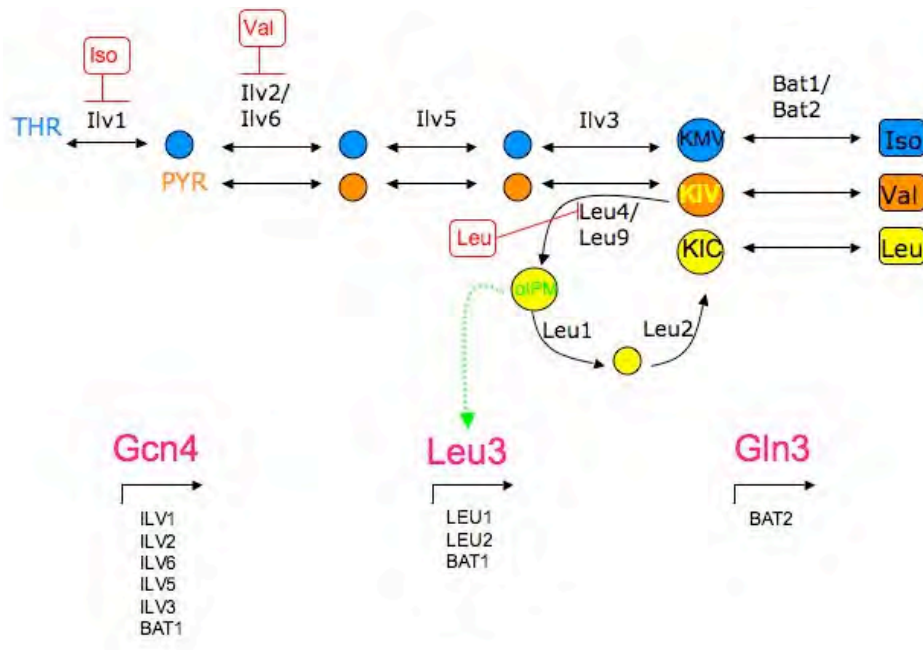


Figura 3. Ruta de biosíntesis de BCAAs. Los precursores treonina (THR), piruvato (PYR) y cetovaleurato (KIV), están en letras de colores que corresponden a la isoleucina (azul), valina (anaranjado) y leucina (amarillo). Los genes de la vía marcan las reacciones enzimáticas. La inhibición catalítica por producto final se indica con los cuadros en rojo. La regulación específica de BCAAs se lleva a cabo por *LEU3* que requiere del coactivador (parte de un intermediario de la ruta: α -IPM) (figura modificada de Kolhaw, 2003). Por la reacción de aminotrasferasa los cetooácidos se convierten en el aminoácidos: Cetometilvalerato (KMV), cetovaleurato (KIV) y cetoisocaproato (KIC) derivan en isoleucina (Iso), valina (Val) y leucina (Leu).

La poza de leucina se biosintetiza de manera oscilatoria, debido a su relación estrecha que tiene su primer intermediario con el factor transcripcional Leu3p (Sze *et al.*, 1992). De esta manera ante la privación de leucina, la respuesta biosintética de leucina se modula en velocidad y magnitud, para que la poza de leucina no decaiga totalmente y se recupere rápidamente (Chin *et al.*, 2008).

Gcn4p es otro factor que activa la transcripción de estos genes biosintéticos de la ruta de V, I y L. Gcn4p activa varias rutas biosintéticas de aminoácidos a través de su respuesta GCAA (General control of amino acids) (Hinnebusch, 2005; Natarajan *et al.*, 2001). González A., *et al.*, (datos no publicados) proponen que el programa transcripcional de *GCN4* esta acoplado al programa de represión catabólica por nitrógeno (NCR: Nitrogen catabolism repression), comandado por *GLN3* a través de la interacción de estos dos factores transcripcionales (Godard *et al.*, 2007; Sosa *et al.*, 2003). Así que resulta interesante la coordinación para producir o degradar aminoácidos, donde se requiere de la conjunción de los programas globales del control de los recursos de nitrógeno, para coordinar la biosíntesis o catabolismo de los aminoácidos.

Dado que los aminoácidos también son fuente de nitrógeno, los genes que participan en su degradación están regulados por el programa global NCR. Los aminoácidos como fuente de nitrógeno, varían en calidad dependiendo de los pasos de incorporación hacia el metabolismo central del nitrógeno con la finalidad de suministrar glutamina o amonio al metabolismo central del nitrógeno (Godard *et al.*, 2007).

De acuerdo con ello, al agregar glutamina a las células que crecen bajo una fuente de nitrógeno de menor calidad, ocurre la represión de un conjunto grande de genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno así como de la inducción de la biogénesis de ribosomas y genes de proteínas ribosomales. La glutamina reprime al promover la interacción entre el prion Ure2p y el activador Gln3p, pueda permanecer en el citoplasma (Kulkarni *et al.*, 2001; Carvalho y Zheng, 2003). Así que la represión catabólica por nitrógeno (NCR) lo hace a través de la desrepresión. En cambio cuando las células crecen en una fuente alternativa a la glutamina, comienza la autofagia y se inducen las permeasas de aminoácidos incluyendo la permeasa general *GAP1* (Godard *et al.*, 2007).

5 Antecedentes: los parálogos *BAT1* y *BAT2*

BAT1 y *BAT2* son parálogos, que se originaron durante la duplicación completa del genoma hace aproximadamente 100 millones de años (Kellis *et al.*, 2004). Dichos parálogos codifican para dos aminotransferasas de los aminoácidos de cadena ramificada: V: valina, I: isoleucina y L: leucina. Estas enzimas son capaces de tomar tres sustratos o productos para llevar a cabo la reacción para los tres aminoácidos V, I y L, es decir que son enzimas multiméricas). La reacción que catalizan es una transaminación reversible, la cual consiste en el último paso de la biosíntesis como también el primero de la catabólisis de los aminoácidos V, I y L. Respecto a los sustratos o productos que utilizan durante la reacción biosintética son el amonio y el α -cetoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs), mientras que los productos de la catabólisis son derivados de amonio y ceto-ácidos ramificados.

Cabe mencionar que la reversibilidad ocurre cuando la concentración de los metabolitos se encuentra cerca de la K_m , y puede darse un flujo metabólico eficiente. En *Escherichia coli*, los metabolitos dentro de la célula, como la glucosa, el glicerol o el acetato se encuentran en los ordenes de 300 mM y otros pocos metabolitos en el orden molar. De esta manera, la K_m es generalmente muy baja con respecto a la concentración intracelular de los metabolitos, por lo que se asegura una irreversibilidad funcional que no tiene que ver con la función enzimática sino con la concentración de los metabolitos (Bennett *et al.*, 2009).

Cuando se degrada las fuentes V, I y L, no únicamente son fuentes pobres de nitrógeno, sino que también se producen derivados de carbono, como los alcoholes fusel (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005), por lo que la levadura sostiene un crecimiento lento. Algunos aminoácidos como la leucina, la tirosina, la fenilalanina y la metionina se metabolizan a través de la ruta Ehrlich. Los ácidos fusel de la leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y el triptofano son exportados al exterior de la célula a través del transportador *PDR12*, tipo ABC (Hazelwood *et al.*, 2006).

Se sabe que *Bat2p* es esencial para la producción de los alcoholes fusel, bajo una fuente de etanol, no-fermentable (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005). Los alcoholes fusel son componentes importantes para el sabor del vino. Se observó que la tasa de producción de 3-metil-1-butanol en etanol de la mutante *bat1* Δ decreció en comparación con la cepa silvestre; sin embargo efectos realmente drásticos de la producción de los alcoholes fusel se encuentran en la cepa *bat2* Δ . Aunque la doble mutante *bat1* Δ /*bat2* Δ se detecta producción del 3-metil-1-butanol en glucosa, en etanol no se observa ya producción. Y de acuerdo con la expresión por microarreglos, se observa que *BAT2* se sobre-transcribe en etanol como fuente de carbono.

La ruta Ehrlich involucra tres actividades enzimáticas: inicia la transaminación por las BCATs a su correspondiente oxoácido. El amonio se une al 2-oxoglutarato y entonces el glutamato formado subsecuentemente sirve como donador de nitrógeno para todos los componentes de la célula que requieran nitrógeno. Le sigue que los oxoácidos ramificados sean convertidos a aldehídos ramificados a través de una reacción de descarboxilación (ter Schure *et al.*, 1998). Finalmente el aldehído ramificado se reduce a su correspondiente alcohol fusel por la alcohol deshidrogenasa (Dickinson y Norte, 1993). Así que la leucina degenera en 3-metil-1-butanol (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005), mientras que la valina degenera en isobutil alcohol (Dickinson *et al.*, 1998). La transaminación de la valina, arroja el alfa-cetoisovalerato y éste puede llegar a resultar alcohol isobutil a través de dos vías: la primera es a través del alfa-cetoisovalerato ramificado a isobutil-CoA, la segunda ruta es a través de la piruvato descarboxilasa. Existen diferencias en el catabolismo de la leucina y la valina con respecto a su producción de alcoholes fusel, ya que el catabolismo de la leucina a isoamil alcohol es a través de la descarboxilasa *YDL080C*. Mientras que ninguna isoenzima de la piruvato descarboxilasa es suficiente para la formación del alcohol isobutil a partir de la valina.

Dentro de esta ruta triple biosintética, existen dos nodos ocupados por parálogos: *LEU4/LEU9* y *BAT1/BAT2* (Kellis *et al.*, 2004). Este estudio se enfoca únicamente en la regulación transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2*, ya que resulta interesante que presenten diferencias fisiológicas, y se hayan subfuncionalizado.

Los estudios de Maritrini Colón González basados en la comparación de las velocidades de crecimiento bajo diferentes condiciones fisiológicas, dan luz sobre la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2*. Usando dos tipos de fuente de nitrógeno NH_4 y VIL (amonio fomentará la biosíntesis de V, I y L, pero cuando éstos se usan como fuente de nitrógeno es necesario catabolizarlos), y las mutantes: *bat1* Δ , *bat2* Δ , *bat1,2* Δ ; descubre que *BAT1* y *BAT2* son las únicas en biosintetizar V, I y L (*bat1,2* Δ no crece en NH_4), pero que durante el catabolismo, si bien son las principales no son las únicas (*bat1,2* Δ crece con una velocidad reducida del 70% en VIL).

Otras transaminasas potenciales de utilizar la V, I y L se sobretranscriben en fondos genéticos *bat1* Δ , *bat2* Δ o la doble *bat1* Δ /*bat2* Δ . Así que existen otras transaminasas que hacen de respaldo, en glucosa es *BNA3/YJL060W*, mientras que en etanol lo hace la *AAT1/YKL106W* y *HIS5/JL116W*. El gen *BNA3* codifica para una aminotransferasa de Kynurenina y tiene sitios de regulación para *MET31* (biosíntesis de metionina), el gen *AAT1* codifica para una aminotransferasa de aspartato mitocondrial y cataliza la conversión del oxaloacetato al aspartato y también participa en la biosíntesis de la asparagina, además presenta sitios regulatorios para *PHO2*, donde podría estar también involucrado en el metabolismo del fosfato. Finalmente el gen *HIS5* codifica para una aminotransferasa de histidil-fosfato, y cataliza

el séptimo paso de la biosíntesis de histidina, además responde a la respuesta de privación de aminoácidos GCAA por *GCN4* (Schoondermarkt-Stolk *et al.*, 2006)

A más detalle encuentra que la *BAT1* por si sola, es capaz de contender con el metabolismo biosintético pero no con el catabólico (*bat2Δ* sin fenotipo en amonio, pero reduce su crecimiento en 35% en VIL). Pero de manera sorprendente, ocurre lo inverso con *BAT2* (*bat1Δ* sin fenotipo en VIL, pero reduce su crecimiento en 30% en NH₄). Lo que sugiere una subdivisión en el metabolismo biosintético y catabólico de los aminoácidos VIL, a través de la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2*.

Como parte de este trabajo, y obtener información sobre los posibles elementos *cis* regulatorios de los promotores de *BAT1* y *BAT2*, utilizamos las bases del Fraenkel Lab (Maclsaac *et al.*, 2006), que conjuntan información bioinformática sobre la predicción de los elementos *cis*, así como de datos experimentales de CHIP (co-immunoprecipitación de cromatina). Asimismo se hizo un alineamiento entre las especies de *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*) para identificar las regiones conservadas en el promotor y poder inferir con mayor sustento la funcionalidad de algún motivos *cis*.

BAT1 comparte su región intergénica (VIII: 516485..517532) con *SET5* que comprende 1050 pares de bases en el cromosoma ocho. Los motivos conservados entre las *Saccharomyces sensu stricto*, del promotor de *BAT1* son los sitios de unión a *LEU3* (activador de la ruta V, I y L), *GCN4* (activador general de GCAA), *GLN3* (activador de NCR) y *TBP* (figura 4). Estos elementos *cis* son interesantes porque corresponde a los factores transcripcionales involucrados en el metabolismo de los aminoácidos.

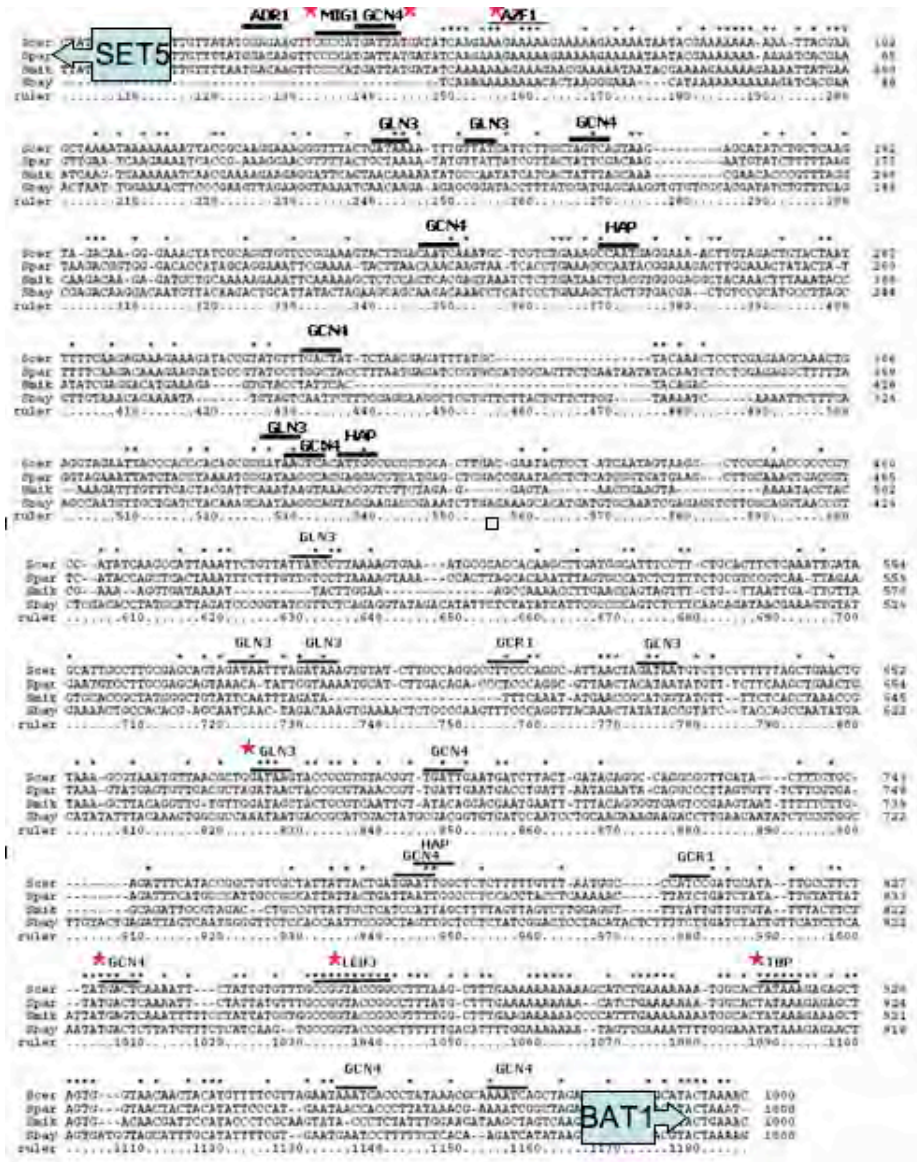


Figura 4. Alineamiento de la región promotora de *BAT1*. Esta región promotora la comparte el gen *BAT1* y *SET5* y se indica con una flecha azul la dirección de su transcripción. En el alineamiento se usaron las secuencias de las *Saccharomyces sensu stricto*. Los nombres de los posibles sitios *cis*, se encuentran subrayados en la imagen, y aquellos que tiene una estrella roja se refieren a los sitios conservados entre las *S. sensu stricto*.

La región intergénica de *BAT2* es de 481 pares de bases (X:705188..705668) y se encuentra en el cromosoma 10. Los sitios conservados entre las *Saccharomyces sensu stricto* son los siguientes: *HAP2* (metabolismo respiratorio), *PUT3* (metabolismo de prolina), *LEU3* (regulador de la ruta V, I y L), *GLN3* (activador de NCR), *YRR1* (resistencia a drogas), *ABF1* (factor estructural del DNA), *STP1* (activador de las permeasa de V, I y L) y *TPB*. Aquellos sitios de unión que no están conservados pero son igualmente interesantes son lo siguientes: *NRG1* y *MOT3* (represores en glucosa),

ADRI (activador en fuentes no-fermentables), RTG3 (activador de la respuesta retrógrada) y cuatro sitios para GCN4 (activador de GCAA) (figura 5).

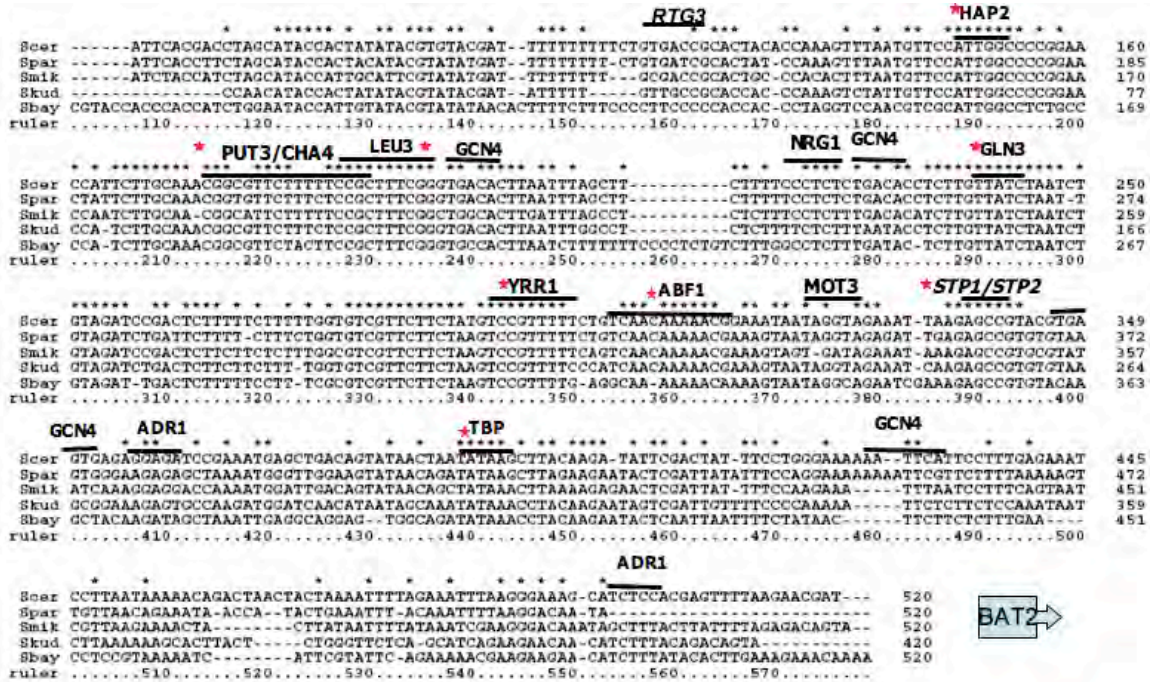


Figura 5. Alineamiento de la región intergénica de *BAT2*. Las secuencias utilizadas corresponden a las *S. sensu stricto*. La fecha azul indica la dirección de la transcripción de *BAT2* y los elementos *cis* se encuentran subrayados en los conservados muestran una estrella roja.

Como parte de su tesis de maestría, Javier Montalvo Arredondo presenta los sitios regulatorios para *S. Kluyverii*, que es una levadura que no sufrió la duplicación de su genoma, y son los siguientes: *ABF1*, *ASH1*, *PUT3*, *FKH2*, *GCN4*, *LEU3*, *MOT3*, *NRG1*, *RTG3*, *STB5*, *TEC1* y *YRR1*. La mayoría de los sitios *cis* predichos para el UAS_{BAT2} en *S. cerevisiae*, se encuentran en el UAS_{BAT} de *S. Kluyverii*, lo que sugiere que *BAT2* haya conservado la expresión del gen ancestral para *BAT1* y *BAT2*.

6 Planteamiento del problema

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* codifican para dos aminotransferasas de los aminoácidos de cadena ramificada (V, I y L), compartimentalizados en la mitocondria y en el citosol respectivamente. La reacción es reversible y por lo tanto son capaces de catalizar tanto el último paso de la biosíntesis como el primero de la catabólisis de V, I y L. Los sustratos

de la reacción biosintética son: el NH_4 y el α -cetoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs), mientras que los productos de la catabólisis son el NH_4 y los ceto-ácidos ramificados; por lo que la regulación transcripcional entre la biosíntesis y la catabólisis debe coordinarse entre el programa global de nitrógeno para su catabólisis y el programa local biosintético de la ruta de V, I y L.

Si bien, estos programas permiten degradar fuentes alternativas como son los aminoácidos, aún no queda claro como se coordinan con los programas biosintéticos, llevados a cabo por la respuesta global GCAA (Gcn4p) y las respuestas locales específicas de cada vía, como Leu3p para la biosíntesis de V, I y L (Boer *et al.*, 2005; Godard *et al.* 2007; Natarajan *et al.*, 2001; Sosa *et al.*, 2003).

Estudiar la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2* para la biosíntesis y catabólisis de los aminoácidos ramificados, representa un buen modelo para estudiar dicha coordinación regulatoria, como consecuencia de los cambios evolutivos de sus respectivos promotores. Este trabajo se enfoca particularmente en identificar la subfuncionalización a través de los cambios en las regiones regulatorias de los parálogos, sin embargo no se descarta que también puedan existir cambios en las propiedades cinéticas como resultado de la subfuncionalización en la región codificante.

7 Hipótesis

La diferencia de expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2* se debe a un reordenamiento de sus promotores como consecuencia de la pérdida y/o ganancia de factores transcripcionales, los cuales son la suma de los elementos *cis* ancestrales que se han divergido y complementado.

Y es posible que este patrón de regulación transcripcional sea resultado de la subdivisión funcional de la actividad biosintética y catabólica de *BAT1* y *BAT2* respectivamente.

8 Objetivos

Objetivo general:

Identificar los factores transcripcionales involucrados en la expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*.

Objetivos particulares:

- Caracterizar la expresión silvestre de *BAT1* y *BAT2* en fuentes de nitrógeno represoras y no-represoras.
- Caracterizar la expresión silvestre de *BAT1* y *BAT2* en presencia de su producto final V, I y L.
- Caracterizar la participación de *GLN3*, *LEU3* y *GCN4* en la expresión de *BAT1* y *BAT2* en las condiciones fisiológicas estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 La expresión de *BAT1* predomina en condiciones biosintéticas mientras que *BAT2* en catabólicas

Se caracterizó la expresión transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2* en la levadura *S. cerevisiae* en relación al metabolismo de V, I y L. Para ello se determinó la cantidad de transcrito de ambos genes, en cultivos crecidos en diferentes fuentes de nitrógeno por medio de dos técnicas: ensayos de β -galactosidasa y Northern Blot.

Cuando se usan los aminoácidos V, I y L como fuente de nitrógeno, se analiza el papel de Bat1p y Bat2p en el catabolismo de estos aminoácidos. Por otra parte cuando se utiliza una fuente de nitrógeno distinta a dichos aminoácidos (por ejemplo, Q: glutamina, NH_4 : amonio y GABA: ácido aminobutírico), se evidencia la participación de dichas enzimas en la biosíntesis de V, I y L. Aunque cabe mencionar que el uso de las fuentes alternativas de nitrógeno (excepto la Q), inducen la respuesta NCR para ajustar el estado metabólico de la célula, ante la escasez de compuestos nitrogenados (Hofman-Bang 1999).

Asimismo se determinó si la presencia de los aminoácidos V, I y L afectaban la transcripción de *BAT1* y *BAT2*, debido a la represión por producto final; para ello las células se crecieron en medios que contenían los tres aminoácidos juntos V, I y L ("VIL") o de manera individual V, I o L (Moxley *et al.*, 2009).

9.2 *BAT1* se reprime por sus productos finales V, I y L, donde la L juega un papel clave en la represión

Los niveles de expresión de *BAT1* que observamos por Northern Blot son los siguientes: mayor en Q (1.0), intermedia en NH_4 , GABA, V, L y P (0.5-0.7) y baja en isoleucina (0.3) (figura 6a). *BAT1* se expresa en prolina de manera intermedia (0.6), y únicamente se usó como control de otro aminoácido que además fuese fuente-no represora de nitrógeno (figura 6a). Cuando realizamos el experimento por β -galactosidasa (figura 6c), el nivel de expresión de *BAT1* se mantiene igual en Q, NH_4 y GABA; sin embargo desconocemos porque la expresión de *BAT1* en glutamina, varía en las dos técnicas usadas.

El nivel de expresión de *BATI* es similar tanto en fuentes de nitrógeno que promueven la biosíntesis de sus productos (GABA, NH_4 y P), como cuando es necesario catabolizarlos (V y L) siempre y cuando se encuentre de manera individual. Dado que el nivel de expresión de *BATI* es similar en estas dos condiciones metabólicas contrastantes promovidas por la fuente de nitrógeno, no es posible indicar una tendencia biosintética o catabólica. Sin embargo, si indica que la expresión de *BATI* es independiente de la calidad de la fuente de nitrógeno y aunado al hecho de que no se reprime en glutamina (observado en Northern Blot y β -galactosidasa), sugiere que *BATI* no es un gen sujeto a represión catabólica nitrogenada (NCR).

Las diferencias de expresión de los niveles de *BATI* observadas por Northern Blot, donde es mayor en glutamina (buena fuente de nitrógeno) y menor en isoleucina (fuente de no-represora de nitrógeno), podrían deberse al ajuste global de expresión que hace la célula dependiendo de la velocidad de crecimiento que sustentan estas dos fuentes de nitrógeno (Godard et al., 2007).

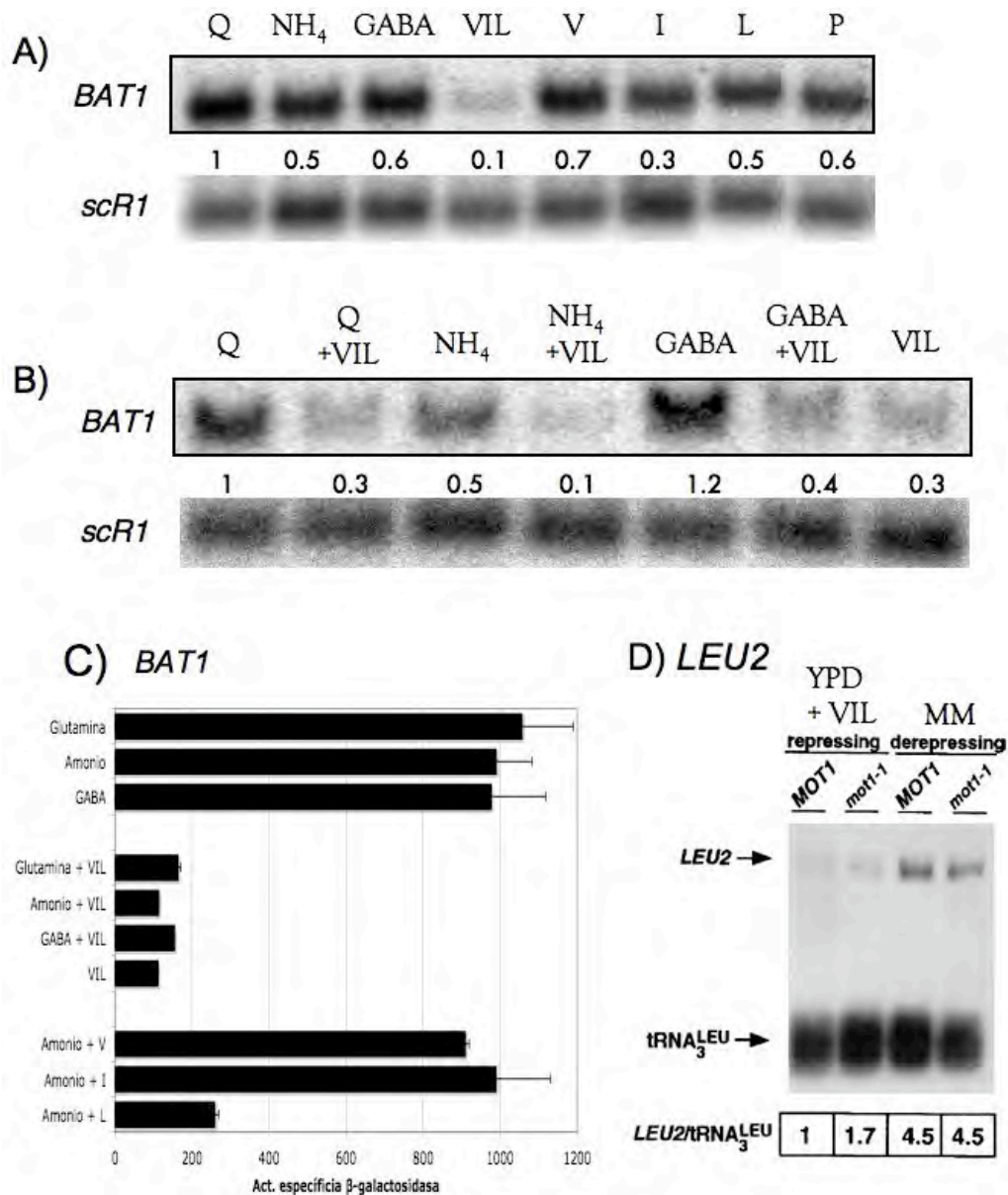


Figura 6. *BAT1* se regula negativamente por “VIL” y la L juega un papel clave en la represión. En el panel (A) se muestra la expresión de *BAT1* en diferentes fuentes de nitrógeno: Q: glutamina; NH₄:amonio; GABA: ácido aminobutífico, V: valina; I: isoleucina; L: leucina; y P: prolina (usado como control). En el panel (B) se combina la fuente de nitrógeno (Q, NH₄ y GABA) con “VIL”. En el panel (C) se muestra la expresión de *BAT1* en β-galactosidasa en las fuentes de nitrógeno (Q, NH₄ y GABA), a las cuales se le añadieron “VIL”. Asimismo a la fuente de nitrógeno amonio, se le agregó individualmente V, I o L. En el panel (D) se muestra la expresión de *LEU2* por Northern Blot en las condiciones de medio rico (YPD) con “VIL” y medio mínimo (MM) en la cepa silvestre y en la cepa mutante *mot1Δ* (Tomada de Wade y Jaening, 1996).

Cuando se encuentran presentes los tres aminoácidos que son los productos finales (V, I y L = "VIL"), la expresión de *BATI* se reprime drásticamente de 1.0 a 0.1 (figura 6a). Para identificar la primacía de dicha regulación negativa, se combinó con una fuente de nitrógeno (Q, NH₄, GABA) y VIL en el mismo medio de cultivo. Observamos que "VIL" sigue regulando negativamente a *BATI* bajo cualquiera de las fuentes de nitrógeno (figura 6b, c) así que para discernir entre los tres aminoácidos, se combinaron individualmente con el amonio y se observó que únicamente la leucina es capaz de disminuir de 1 a ¼ la expresión de *BATI* (figura 6c).

Es decir que es estrictamente necesario la presencia de los tres productos finales "VIL" para que la represión de la expresión de *BATI* sea efectiva, a pesar de que VIL sea a su vez fuente de nitrógeno o bien "VIL" se encuentre en combinación con otra fuente de nitrógeno. La leucina combinada con el amonio es capaz de reprimir a *BATI*, lo cual no sucede cuando la leucina se encuentra como única fuente de nitrógeno.

Así que la represión de *BATI* requiere de los tres aminoácidos "VIL" o a la L para reprimir, siempre y cuando la L no este como única fuente de nitrógeno. El hecho de que *BATI* sea reprimido por sus productos "VIL" y en especial por la leucina, sugiere que se regule por *LEU3*.

LEU2 codifica para la β -isopropilmalato deshidrogenasa y cataliza la penúltima reacción de la vía biosintética de la leucina. Se conoce que la expresión de *LEU2* es igualmente sensible a la represión por el producto "VIL", ya que se reprime de 4.5 a 1 de expresión (figura 6d). Wade y Jaening (1996) proponen que la represión por "VIL" depende parcialmente de *MOT1* (proteína asociada a la TATA-binding protein) (Sprouse *et al.*, 2009). La represión por "VIL" al parecer es dependiente de la conformación de Leu3p sin su coactivador α -IPM (i.e. en presencia de leucina), que promueve la interacción con la proteína represora como Mot1p (Fitzgerald *et al.*, 2006). La capacidad de interacción de Leu3p con otro factor transcripcional se ha propuesto a raíz de la mutante H50C, la cual disminuye la flexibilidad del asa que une al bicluster de zinc en el dominio de unión a DNA de Leu3p. La mutante H50C de Leu3p podría interferir en la interacción con otra proteína, ya que no afecta la afinidad de unión por el DNA, pero si elimina la actividad represora, más no activadora (Fitzgerald *et al.*, 2006). Lo cual indica que la represión por "VIL" involucre a un represor dependiente de *LEU3*, y concuerde con que la represión por producto final "VIL" de *BATI*, también la lleve a cabo la leucina.

El patrón de expresión de *BATI* corresponde a un gen biosintético, ya que se reprime por el producto "VIL" (Moxley *et al.*, 2009), además de no reprimirse por glutamina (NCR). Lo que sugiere que *BATI* posiblemente sea regulado por *GCN4*, factor encargado de activar varias rutas biosintéticas de aminoácidos (Hinnebusch, 2005) y por *LEU3* (Wade y Jaening, 1996; Fitzgerald *et al.*, 2006).

9.3 La expresión de *BAT2* depende de la calidad de la fuente de nitrógeno

El gen *BAT2* tiene su expresión más baja en Q (fuente represora de nitrógeno), y presenta una expresión variable en otras fuentes de nitrógeno no-represoras (GABA, V, I, L y P), indicando que su regulación sea por represión catabólica por nitrógeno (NCR).

Tomando como referencia la expresión de *BAT2* de 1.0 en GABA, observamos que el nivel de expresión en Q y NH_4 es de 0.1-0.3 (figura 7a,d), en I y P de 2.4, en L de 3.6 y en V de 5.0 (figura 7a). Esto indica que *BAT2* se sobre-transcribe en fuentes alternativas de nitrógeno, a pesar de que *BAT2* no necesariamente esté involucrado en el catabolismo de dichas fuentes de nitrógeno alternativas a la glutamina, pero muy probablemente sí al catabolismo de valina, isoleucina y leucina.

BAT2 no se regula por la represión por producto final "VIL", ya que *BAT2* muestra una expresión de 3.4 en Northern Blot y 1.52 en el ensayo de β -galactosidasa (figura 7a y d), lo que sugiere que la regulación de *BAT2* por nitrógeno sea principal en su nivel de expresión.

Para discernir si los aminoácidos tienen un efecto inductor independiente de la fuente de nitrógeno, se combinaron los aminoácidos "VIL" con alguna fuente de nitrógeno (Q, NH_4 , GABA). La expresión de *BAT2* se induce poco por "VIL" cuando se usa con Q o NH_4 ; ya que aumentan en una proporción de 1.7-2.3 en β -galactosidasa e incluso por Northern Blot no se observa inducción en glutamina (figura 7b,d). Sin embargo la inducción de "VIL" es más evidente en GABA, ya que induce la expresión de *BAT2* a 1.3 en β -galactosidasa y 5.4 en Northern Blot (figura 7b,d). Lo que indica que la inducción por "VIL" de la expresión de *BAT2* se favorece en fuentes no-represoras de nitrógeno, por lo que podría estar involucrado *GLN3*.

Para caracterizar si cada uno de los aminoácidos V, I y L son capaces de inducir la expresión de *BAT2*, se añadieron individualmente los aminoácidos V, I y L a las fuentes de NH_4 y GABA. Cada aminoácido induce de 2-3 veces la expresión de *BAT2* (figura 7c,d), lo que implica que ocurre a través de una misma vía.

Así que el patrón de expresión de *BAT2* responde a la calidad del nitrógeno y se induce por los aminoácidos indicando que tiene un perfil de expresión preferencialmente catabólico.

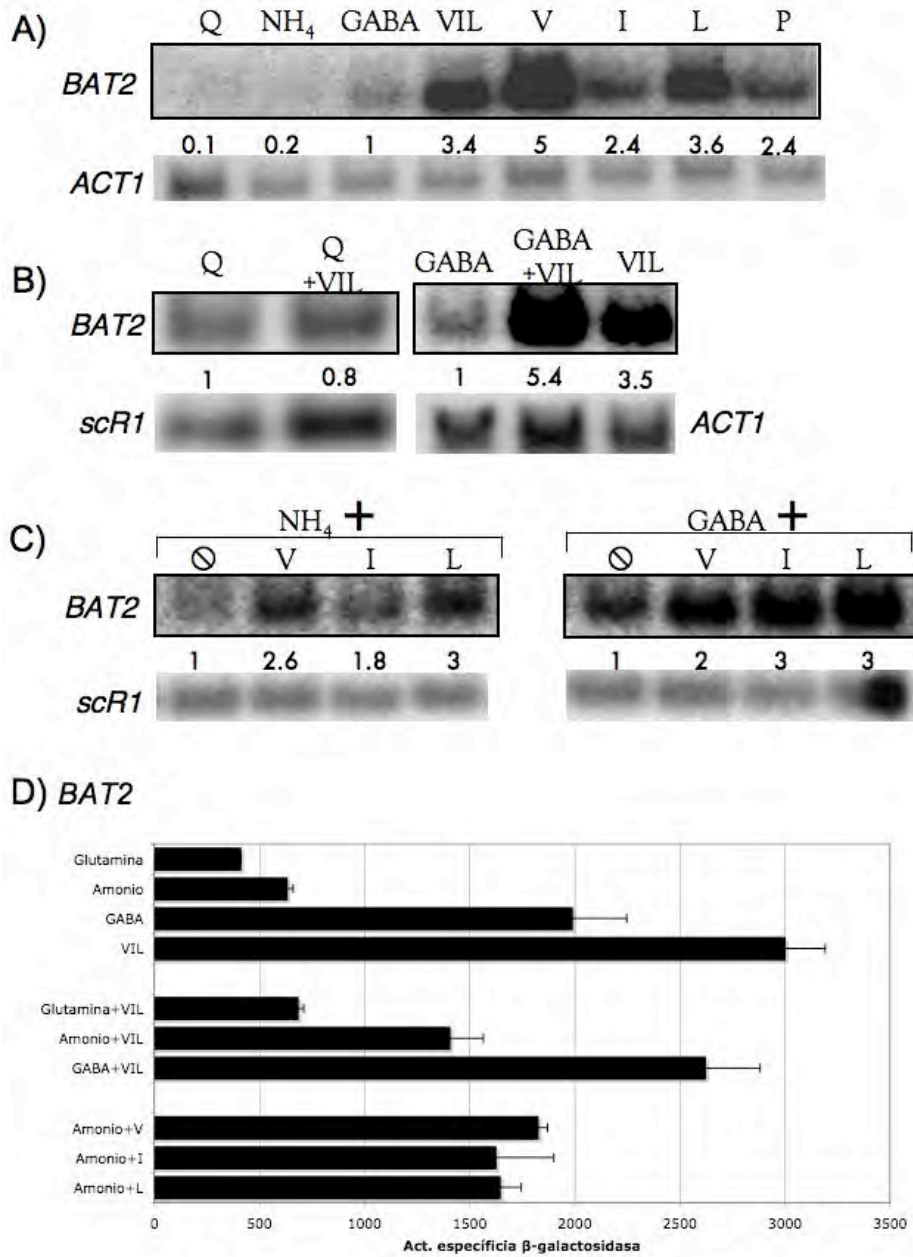


Figura 7. Expresión silvestre de *BAT2* por Northern Blot en diferentes fuentes de nitrógeno (A), o en combinación de nitrógeno (Q, NH₄, GABA) con “VIL” (B) o añadidos individualmente los aminoácidos V, I y L (C). En la gráfica (D) se muestra la expresión de *BAT2* por β -galactosidasa en las condiciones descritas anteriormente.

10 Los parálogos *BAT1* y *BAT2* se regulan por los factores transcripcionales *GCN4*, *LEU3* y *GLN3*

Para identificar a los factores transcripcionales que regulan a los parálogos *BAT1* y *BAT2* en las condiciones estudiadas, se midió la cantidad de transcrito en las mutantes nulas de los factores transcripcionales *GCN4*, *GLN3*, *LEU3*, así como del regulador negativo de *GLN3*, el prión *URE2*. Asimismo se verificó que los promotores de ambos parálogos tuvieran el elemento *cis* correspondiente a cada factor transcripcional.

10.1 *BAT1* se activa basalmente por *GCN4*

Para identificar la regulación por *GCN4* dependiente de la respuesta global por privación de aminoácidos, se trataron a las células con 3-aminotrizol (3AT), un análogo de un intermediario de la ruta biosintética de la histidina, que bloquea su biosíntesis e induce la respuesta GAAC a través de *GCN4* (Marton *et al.*, 1998).

La expresión de *BAT1* no se induce por 3AT (figura 8), pero si depende de manera basal de *GCN4*. El ensayo de β -galactosidasa muestra que la mutante *gcn4* Δ disminuye la expresión basal de *BAT1* de 1 a 0.2-0.3 en Q, pero de 1 a 0.7 en GABA. En la medición por Northern Blot, observamos la misma tendencia: la dependencia de *GCN4* en GABA es menor que en glutamina, ya que la mutante *gcn4* Δ disminuye de 1 a 0.8 en Q y L, pero en GABA no tiene efecto (figura 12a,b,c).

La expresión basal de *BAT1* depende de *GCN4* principalmente en Q y L, mientras que presenta una menor dependencia en GABA. Existe un elemento *cis* en el *UAS_{BAT1}*, en la posición -171 (5'-TGACTCA-3') que posiblemente sea funcional ya que está conservado en el promotor de *BAT1* de las *Saccharomyces sensu stricto*. Aunque también existen otros tres sitios no conservados en las posiciones -683, -305, -225 del *UAS_{BAT1}* de *S. cerevisiae* (figura 4). Es posible que *GCN4* se una al promotor de *BAT1* pero no se ha determinado, ni tampoco se ha determinado el la regulación diferencial de *GCN4* con respecto a la contribución a la expresión basal, pero no a la sobre-transcripción por privación de aminoácidos.

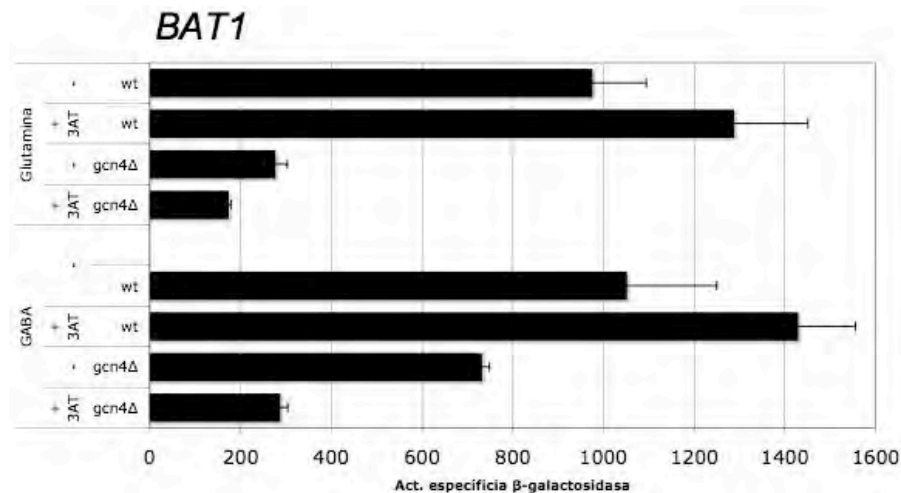


Figura 8. *BAT1* se activa basalmente por *GCN4*. La expresión de *BAT1* se midió en la cepa *gcn4Δ*, y en las células tratadas con 3AT que induce la respuesta GAAC (*GCN4*).

10.2 *BAT2* se regula por *GLN3* y es un gen sujeto a NCR

Si el patrón de expresión de *BAT2* corresponde a la de un gen sujeto a NCR, se esperaría que en un fondo genético *gln3Δ*, no aumentara su expresión cuando se usan fuentes de nitrógeno no-represoras, y por el contrario que en un fondo genético *ure2Δ*, en el cual se favorece la traslocación de Gln3p al núcleo, en la glutamina (una fuente represora) sea capaz de activar a *BAT2* (Carvalho y Zheng, 2003).

Cuando se analiza la expresión por β-galactosidasa (figura 9, 12a), se observa que efectivamente la expresión de *BAT2* se desreprime en Q en la *ure2Δ*, de 1 hasta 5-6, alcanzando un nivel similar a la expresión silvestre de *BAT2* en GABA. Incluso en GABA, la mutante *ure2Δ* desreprime a *BAT2* de 1 a 1.3 observado por β-galactosidasa, mientras que por Northern Blot la desrepresión es de 1 a 3.6 (figura 9 y 12b). Asimismo *GLN3* contribuye primordialmente a la expresión basal de *BAT2*, ya que en la mutante *gln3Δ* disminuye de 1 a 0.2 la expresión en Q y NH_4 (figura 9), y de 1 a 0.2-0.3 en GABA y leucina (figura 12b,c).

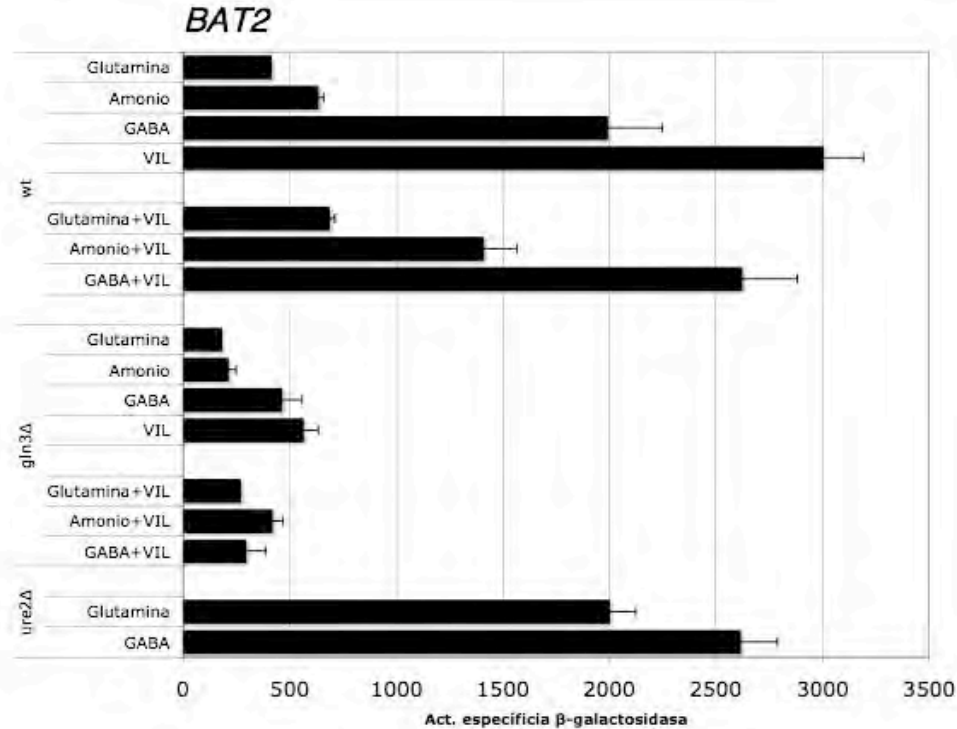


Figura 9. La expresión de *BAT2* depende de *GLN3* para su expresión en las diferentes fuentes de nitrógeno y en la inducción por “VIL”. Se midió la expresión de *BAT2* en las mutantes *gln3Δ* y *ure2Δ*.

Para determinar si la expresión de *BAT2* inducida por “VIL” es dependiente de *GLN3*, se analizó la expresión en β-galactosidasa de *BAT2* en distintas fuentes de nitrógeno combinadas con “VIL” (figura 7b y 9). Se observó que *gln3Δ* baja la expresión de *BAT2* de 1 a 0.2 tanto en “VIL” como en las fuentes de nitrógeno combinadas con “VIL”. Por lo tanto *GLN3* se requiere para la inducción, sin embargo no queda claro el mecanismo por el cual lo lleva a cabo, ya que hasta el momento no se ha reportado que *GLN3* sea capaz de monitorear aminoácidos para incorporarlos dentro de la célula.

La incorporación de los aminoácidos dentro de la célula se lleva a cabo por la permeasa general de aminoácidos *AGP1*, aunque también los aminoácidos V, I y L tienen sus permeasas específicas *BAP2* y *BAP3* (Peter *et al.*, 2006). Las permeasas *BAP2* y *BAP3* se regulan por los factores transcripcionales *STP1* y *STP2*, como parte del sistema de monitoreo de aminoácidos al exterior de la célula, *SPS* (Ljungdahl, 2009). Así que es posible que la inducción de la expresión de *BAT2* por los aminoácidos, se a través de *STP1*, ya que además de presentar un sitio *cis* potencialmente funcional en el UAS_{BAT2} (figura 5), también la unión de los sistemas de regulación del nitrógeno y de la incorporación de los aminoácidos hacia el interior de la célula, lo presenta el promotor de la permeasa *AGP1*, la cual se regula por *STP1*, *DAL80* y *GLN3* (Abdel-Sater *et al.*, 2004).

El hecho de que *BAT2* dependa fuertemente de *GLN3* (figura 9) y su expresión aumente en fuentes de nitrógeno alternativas a la glutamina (figura 7a, 9), sugiere que es un gen sujeto a NCR, lo cual concuerda con la desrepresión de *BAT2* por rapamicina, ya que esto estimula la entrada de *GLN3* al núcleo (Scherens *et al.*, 2006) así como su desrepresión en glutamina en la mutante *ure2Δ*. Ahora bien, la regulación de *GLN3* en el *UAS_{BAT2}*, sea a través del elemento *cis* 3'-GATAA-5' (posición -281) (figura 5), el cual es un sitio conservado entre las *Saccharomyces sensu stricto*, por lo que es potencialmente funcional.

11 Regulaciones atípicas de *GLN3* y *GCN4* sobre la expresión de *BAT1* y *BAT2* respectivamente

Con la finalidad de comparar la regulación de los factores transcripcionales *GCN4* y *GLN3* entre los parálogos *BAT1* y *BAT2*, y de esta manera verificar que durante su evolución hayan perdido o ganado la regulación de uno de los elementos *cis* correspondientes a dichos factores transcripcionales (Tuch *et al.*, 2008), se analizó la dependencia de *GCN4* sobre la expresión de *BAT2* y la dependencia de *GLN3* sobre la expresión de *BAT1*.

Dado que *BAT1* no se reprime por glutamina, no es un gen NCR y sin embargo cuando medimos su expresión en la mutante *gln3Δ*, su expresión basal disminuye de 1 a 0.5-0.7 en Q, NH₄ GABA y L, mientras que en la mutante *ure2Δ* se desreprime poco de 1 a 1.2-1.5 cuando las células se crecen en Q, NH₄ y GABA (figura 10a y 12a,b). Lo que sugiere que *GLN3* no es dispensable para dar un patrón de expresión NCR en *BAT1*. No obstante *GLN3* toma relevancia cuando *BAT1* se expresa en L, sin que el asa de retroalimentación negativa de L, tenga efecto represor sobre la expresión de *BAT1*.

Por otra parte, el tratamiento de 3AT no induce la expresión de *BAT2*, pero su expresión basal si depende de *GCN4*. La mutante *gcn4Δ* disminuye la expresión de *BAT2* de 1 a 0.2-0.3 en Q, NH₄, GABA (figura 10b y 12a,b) pero aumenta inesperadamente de 1 a 2 en leucina (figura 12c). El posible elemento funcional *cis* para la regulación de *Gcn4p* en el *UAS_{BAT2}*, es 5'-TGACTCA-3' aunque también presenta otros tres sitios no consenso pero conservados en las posiciones -323, -293, -174 (figura 5).

De esta manera identificamos dos patrones de expresión dependientes de *GCN4* y *GLN3*. A pesar de que ambos factores co-regulan basalmente a los parálogos *BAT1* y *BAT2*,

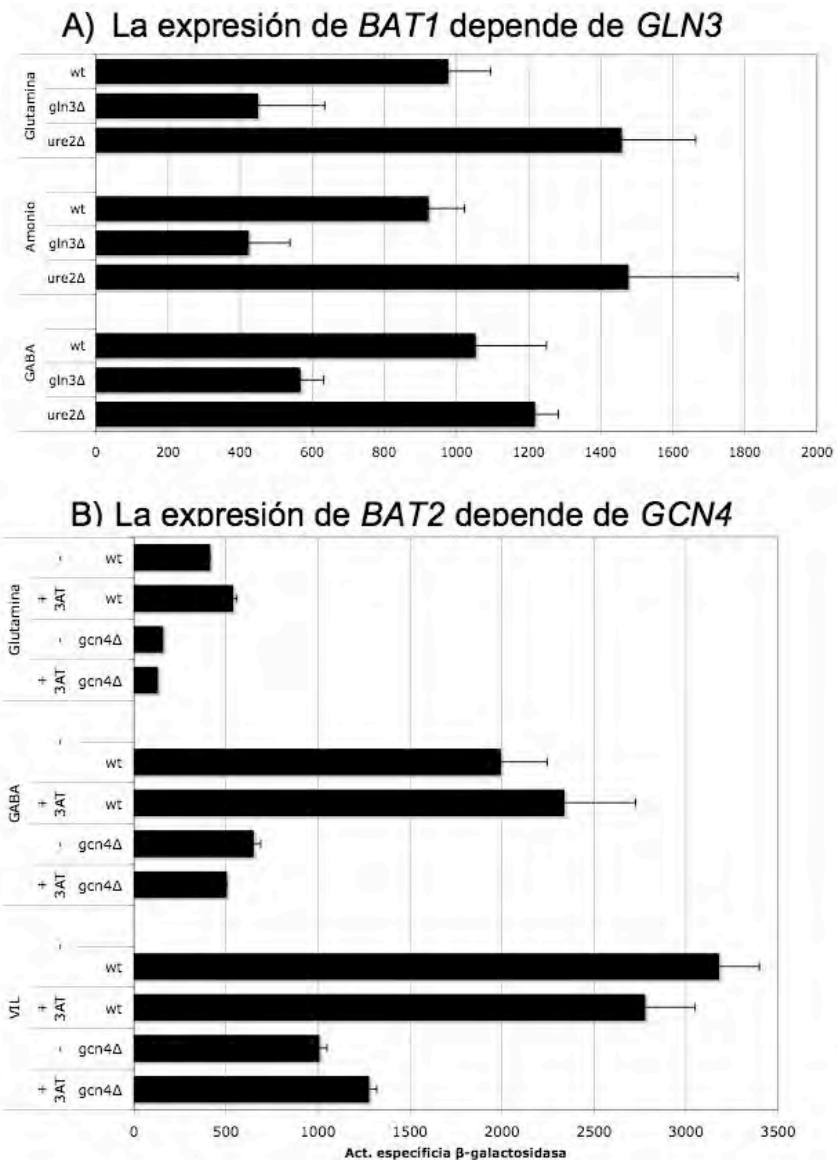


Figura 10. Regulación atípica de *GLN3* y *GCN4* sobre la expresión de *BAT1* (A) y *BAT2* (B) respectivamente. En la gráfica (A) se muestra la expresión de *BAT1* dependiente de *GLN3* y *URE2*. En la gráfica (B) se muestra la expresión de *BAT2* dependiente de *GCN4* a través de la mutante *gcn4Δ* y por el tratamiento de 3AT.

únicamente *BAT2* responde a la regulación por nitrógeno típica de *GLN3* (figura 9), y ninguno de los dos parálogos responde a la sobretranscripción por privación de aminoácidos típica de *GCN4* (figura 8 y 10b). Así que esta regulación basal atípica, ha sido ya reportada para dos genes involucrado en el metabolismo del nitrógeno: el gen *GLT1* que codifica para una glutamato sintasa (Ishida et al., 2006) y el gen *GDH1* que codifica para una glutamato deshidrogenasa (Riego et al., 2002). El estudio de estos genes, ha llevado a proponer a la Dra. Alicia González que dicha respuesta atípica la compone *GCN4* y *GLN3* como complejo transcripcional, que controla genes biosintéticos y catabólicos en

condiciones de fuentes de nitrógeno alternativas (Datos no publicados). Así que *BAT1* y *BAT2* se une a la lista de los genes regulados de esta menara, aunque ciertamente aún no defina su tendencia metabólica. Sin embargo la expresión de *BAT2*, a pesar de estar co-regulado por *GCN4* y *GLN3*, es capaz de depender de manera típica de *GLN3* por nitrógeno, como si este factor actuase de manera independiente y no como complejo junto a *GCN4*.

Por otro lado, la co-regulación de los parálogos *BAT1* y *BAT2* supone una redundancia funcional y que posiblemente su regulación ancestral no se subdividió por completo, contrario a lo que apunta Force *et al.*, (2005) en el modelo de subfuncionalización y complementación. De esta manera es posible que el respaldo funcional entre los parálogos (De Luna *et al.*, 2008; Ihmels *et al.*, 2007) sea gracias a que compartan uno o más elementos regulatorios ancestrales.

12 *LEU3* regula de manera contrastante a *BAT1* y a *BAT2*

El elemento *cis* de Leu3p fue caracterizado en el UAS_{LEU2} , (Liu *et al.*, 2006), y dicho motivo *cis* lo presentan también los UAS_{ILV2} , UAS_{ILV3} , UAS_{ILV5} , UAS_{LEU4} , UAS_{LEU9} , UAS_{LEU1} y UAS_{LEU2} correspondientes a los genes de la vía biosfética de V, I y L (figura 3, 11). Los experimentos de microarreglos de Boer *et al.*, (2005) demuestran que los genes anteriores se regulan por *LEU3*.

En el caso del UAS_{BAT1} , es el mismo sitio al de UAS_{LEU2} y se encuentra en la posición (-147): 5'-CCGGTACCGG-3' (figura 4), y se encuentra conservado entre las *Saccharomyces sensu stricto*. Por otra parte el elemento en el UAS_{BAT2} no es similar al del UAS_{LEU2} pero está conservado 5'-CCGCTTTCGG-3' (-334) (figura 5), sin embargo conserva las CCG evertidas necesarias para la interacción con Leu3p (Fitzgerald *et al.*, 2006). Esto sugiere que el elemento *cis* de *LEU3* en los promotores de *BAT1* y de *BAT2* son funcionales y por lo tanto que *LEU3* los regule directamente.

Al medir la expresión dependiente de *LEU3* en las condiciones de Q, GABA y L, observamos que la mutante *leu3Δ* disminuye la expresión de *BAT1* de 1 a 0.5-0.7 (figura 10). *LEU3* efectivamente activa a *BAT1*, lo que da pie a la búsqueda del represor en "VIL" dependiente de *LEU3*. De acuerdo a la estructura del UAS_{BAT1} , existe un sitio *cis* de *DIG1* contiguo al sitio de *LEU3* en el UAS_{BAT1} (figura 5), por lo que podría ser *DIG1*, un represor involucrado en la represión por feromonas (Bardwell *et al.*, 1998).

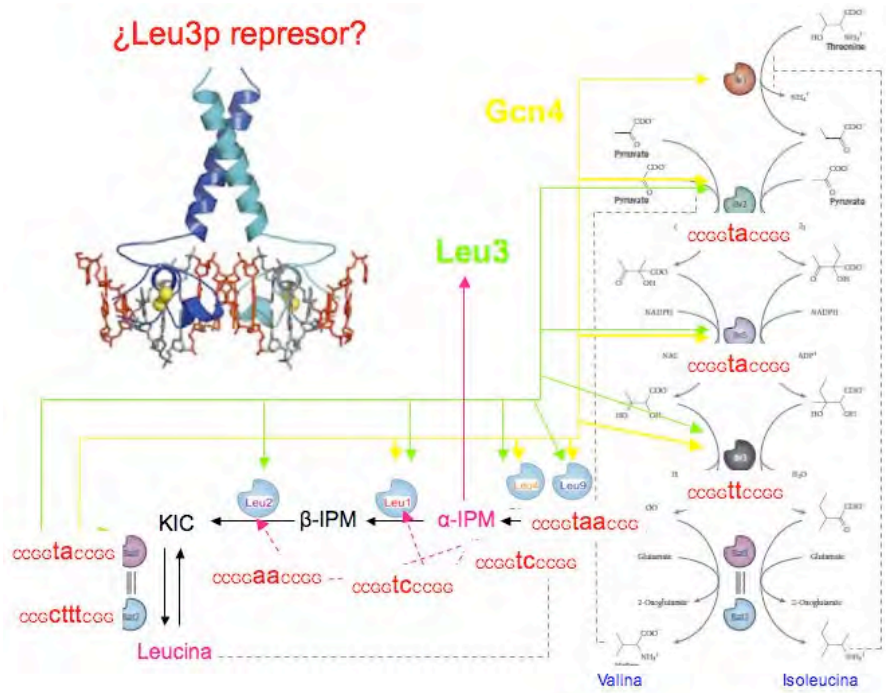


Figura 11. El elementos *cis* para Leu3p de cada uno de los genes de la vía biosintética de V, I y L están escritos en rojo. Las letras más grandes indican la diferencia entre ellos, pero es necesario que conserven la CCG invertida para su interacción con Leu3p (Boer *et al.*, 2005; Fitzgerald *et al.*, 2006).

Es interesante que la expresión de *BAT1* sea dependiente de *GLN3* cuando se usa la leucina como fuente de nitrógeno (figura 12c), es decir que *GLN3* permite la expresión de *BAT1* a pesar de que la leucina tenga un efecto antagónico sobre el papel activador de *LEU3*. Suceso que no ocurre, cuando la leucina se combina con amonio, y entonces la leucina si es capaz de reprimir la expresión de *BAT1* (figura 6c). A pesar de que la leucina induzca la conformación de Leu3p (sin coactivador), reclutadora presuntamente de un represor; no logra reprimir a *BAT1* en presencia de leucina como única fuente de nitrógeno, gracias a la activación dependiente de *GLN3*.

En búsqueda de la relación entre *LEU3* y *GLN3*, se midió la expresión de *BAT1* en la mutante *gln3Δ/leu3Δ* y se observó que se abate por completo su expresión tanto en glutamina como en GABA (figura 12a,b). Esto sugiere que ambos son activadores y contribuyen de manera independiente a la expresión de *BAT1*, por lo que aún desconocemos el mecanismo por el cual *GLN3* toma el control de la activación de *BAT1* en presencia de leucina como única fuente de nitrógeno.

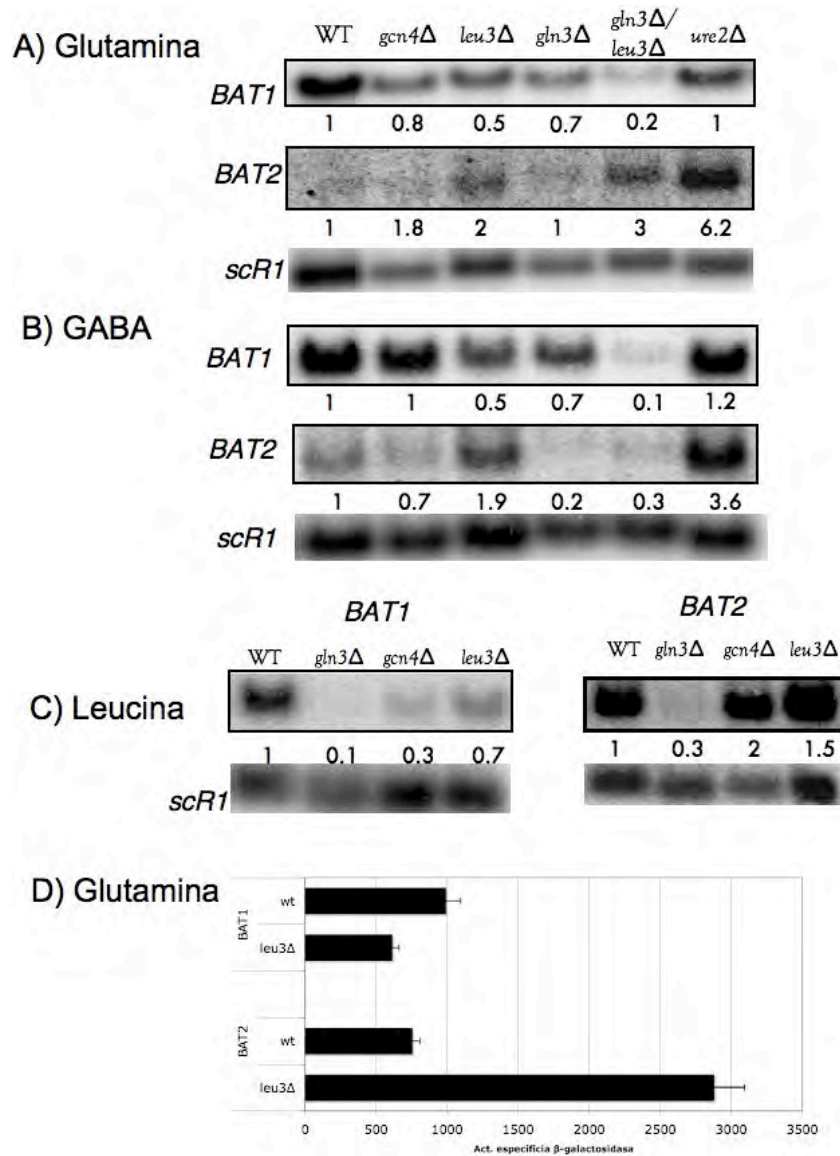


Figura 12. Expresión de *BAT1* y *BAT2* utilizando diferentes fuentes de nitrógeno: glutamina (A), GABA (B), leucina (C), en los fondos genéticos WT, *gcn4Δ*, *leu3Δ*, *gln3Δ*, *wre2Δ*, *gln3Δ/leu3Δ*. En el panel (D) se muestra la expresión de *BAT1* y *BAT2* dependientes de *LEU3* en el fondo de levadura BY4741, en la condición de glutamina.

Respecto a la expresión de *BAT2*, la mutante *leu3Δ* aumenta la expresión de 1 a 2 en Q, GABA y L (figura 12). Dicho efecto de desrepresión de *BAT2* por *leu3Δ*; es independiente del efecto represor "VIL" para *BAT1*. Observamos que la mutante *gln3Δ/leu3Δ* continua desreprimiendo a *BAT2* en glutamina, más no en GABA. En GABA es notorio que la mutante *gln3Δ* disminuye la expresión de *BAT2* de 1 a 0.2 y que la *gln3Δ/leu3Δ* la disminuye a los mismos niveles de 1 a 0.3 (figura 12b), es decir que el principal activador de *BAT2* en GABA, es *GLN3*, y que su mutación *gln3Δ*

por si sola es suficiente para abatir su expresión; por lo tanto la mutante *gln3Δ/leu3Δ* ya no muestra su efecto desrepresor en GABA; sugiriendo que el efecto desrepresor de *leu3Δ* sobre la expresión de *BAT2* es independiente de *GLN3*.

No obstante en glutamina continua mostrándose el efecto desrepresor en la *gln3Δ/leu3Δ*, lo que plantea que en glutamina exista un factor represor de *BAT2* dependiente de *LEU3* pero independiente de *GLN3* y del efecto represor del producto final "VIL". Boer *et al.*, (2005) encuentran que en la condición de limitación de amonio en la mutante *leu3Δ* desreprime a *BAT2*, *ILV2*, *ILV3*, *ILV6* y *LEU4* (figura 11), planteando que esto se debe a que la *leu3Δ* produce una fuerte privación de leucina que induce la respuesta biosintética global de aminoácidos por *GCN4*. Sin embargo esto es aún controversia, ya que Chin *et al.*, (2008) no encuentran relación entre la desrepresión de *leu3Δ* y la activación de la respuesta por *GCN4*.

Se conoce por experimentos de expresión global que *GCN4* regula a *LEU3* (Natarajan *et al.*, 2001), por lo que discernir entre la contribución independiente de cada uno de ellos es técnicamente difícil, a pesar de que la actividad de *LEU3* se regule por un co-activador. La expresión de *BAT2* se desreprime (de 1 a 1.5-2.0) en la mutante *gcn4Δ* únicamente en leucina a un nivel similar a la producida por la mutante *leu3Δ* (figura 12c). Desconocemos como podría participar *GCN4* en la "represión" de *BAT2* en leucina, ya que nuestros experimentos han indicado a *GCN4* como activador de la expresión basal de *BAT2* (figura 10b).

Finalmente la estructura del promotor del *UAS_{BAT2}*, podría sugerir al represor en glucosa *NRG1*, como el represor dependiente de *LEU3*, ya que los sitios *cis* de cada uno de ellos, se encuentran uno al lado del otro en el promotor de *BAT2* (figura 5).

13 Regulación epigenética de *BAT2*

Dos estudios globales de expresión de genes, uno sobre la histona H4 y el otro sobre el remodelador Snf2p durante el crecimiento en medio rico (Sudarsanam *et al.*, 2000; Wyrick *et al.*, 1999), muestran que la expresión de *BAT2* depende positivamente de los remodeladores de cromatina. Explorando esta posibilidad, se buscó determinar si la expresión de *BAT2* fuese dependiente de Gcn5p (acetiltransferasa de histona), Snf2p (complejo remodelador SWI/SNF) y Hda1p (des-acetilasa de histona).

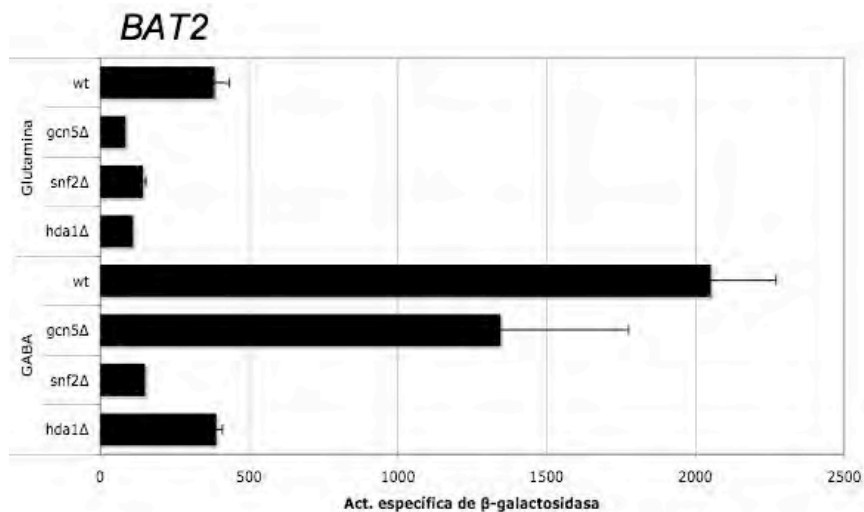


Figura 13. Remodeladores de cromatina modifican la expresión de *BAT2*. Se midió la expresión de *BAT2* en los fondos genéticos: WT, *gcn5Δ*, *snf2Δ* y *hda1Δ*, y en las condiciones de glutamina y GABA donde la expresión silvestre de *BAT2* es contrastante.

Probamos dos condiciones fisiológicas donde la expresión de *BAT2* es contrastante: Q y GABA. En la condición de Q y GABA, las tres mutantes *gcn5Δ*, *snf2Δ* y *hda1Δ*, disminuyen la expresión silvestre de *BAT2* (figura 13), lo que sugiere que se requiere de remodeladores para mantener la expresión basal de *BAT2* (Tirosh y Barkai, 2008).

14 Conclusiones y perspectivas: Modelo divergente de expresión de las aminotransferasas *BAT1* y *BAT2*

El patrón de expresión de las isoenzimas *BAT1* y *BAT2* es contrastante e indica su tendencia metabólica (figura 6, 7), gracias a que la regulación por represión es diferente para cada uno de ellos: *BAT1* se reprime por "VIL", en cambio *BAT2* se reprime por glutamina. *BAT1* al reprimirse por su producto final "VIL" le confiere principalmente su rasgo de gen biosintético. Mientras que *BAT2* al reprimirse por glutamina, aumentar en fuentes no-represoras de nitrógeno (GABA, P) y ser inducido por los aminoácidos V, I y L a través de una misma vía, indica su rasgo principalmente catabólico, como gen sujeto a represión catabólica nitrogenada.

El mecanismo transcripcional responsable del patrón de expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2* lo llevan a cabo en parte los siguientes factores transcripcionales: *GCN4*, *LEU3* y *GLN3*.

BAT1 y *BAT2* se activan basalmente por *GCN4* pero no responden a la sobretranscripción producida por la privación de aminoácidos, comandada típicamente por *GCN4* (figura 8 y 10b). Asimismo *BAT1* y *BAT2* se activan por

GLN3, pero dependen de manera diferente: *BAT1* depende de *GLN3* basalmente (figura 10a), mientras que *BAT2* depende de manera típica por nitrógeno de *GLN3* (figura 9). Como resultado, los parálogos *BAT1* y *BAT2* se co-regulan por *GCN4* y *GLN3*, pudiendo ser a través del complejo transcripcional *GCN4* y *GLN3* o bien los activen de manera independiente, como lo sugiere la regulación NCR de *BAT2* dependiente de *GLN3*.

La regulación típica NCR de *BAT2* dependiente de *GLN3*, se debe a que en una mutante *ure2Δ* se desreprime su expresión a niveles similares que en la condición de GABA –fuente no-represora– en una cepa silvestre y además su expresión en las fuentes no-represoras se abate por completo en una mutante *gln3Δ* (figura 9) (Coffman *et al.*, 1995). Asimismo *GLN3* está asociado a la inducción de la expresión de *BAT2* por los aminoácidos V, I y L (figura 9), y es posible que sea a través también de la participación de *STP1*, el factor transcripcional que activa a *BAP2* y *BAP3*, que codifican para las permeasas de los aminoácidos de V, I y L (Boer *et al.*, 1998, Boer *et al.*, 2000).

Inesperadamente el factor transcripcional *LEU3* presenta dos efectos distintos sobre la expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2*. El fenotipo en Q, GABA y L de la mutante *leu3Δ* disminuye la expresión de *BAT1* pero desreprime al doble la expresión de *BAT2* (figura 11). Así que *BAT1* es activado por *LEU3*, pero también éste se encuentra involucrado en la represión por el producto final “VIL”, como lo apunta el caso del gen *LEU2*, donde la presencia de leucina induce la conformación de *LEU3* sin el α -IMP (Sze *et al.*, 1992, Fitzgerald *et al.*, 2006), y se promueve la interacción con un represor, donde participa parcialmente *MOT1* (Wade y Jaening, 1996). Por lo que quedará por identificar si represor asociado a *LEU3* responsable de la represión de *BAT1* a causa de la presencia del producto final “VIL” sea *DIG1*, tal como lo sugiere la estructura del el UAS_{BAT1} . Asimismo será preciso aclarar, porque es obsoleta la represión de *BAT1* en L como fuente de nitrógeno, dado que *GLN3* lo activa de manera primordial, e independiente de *LEU3*.

En cambio la represión de *BAT2* dependiente de *LEU3*, es diferente a la descrita para *BAT1* y *LEU2*, ya que *BAT2* no se reprime por el producto final “VIL”. Asimismo la represión es independiente de *GLN3* y *GCN4*, por lo que sugerimos de acuerdo a la estructura del UAS_{BAT2} , la participación del represor en glucosa *NRG1*, que tiene un sitio *cis* contigo al sitio *cis* de *LEU3*.

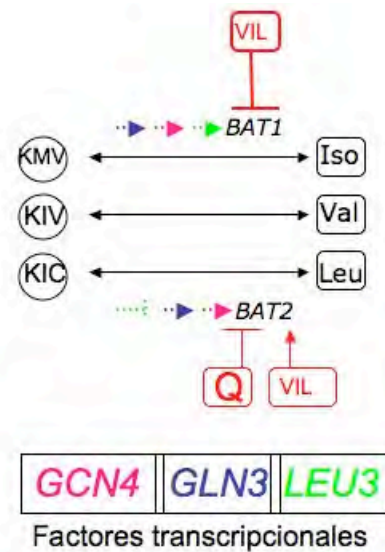


Figura 14. Modelo de regulación de las aminotransferasas *BAT1* y *BAT2*. Se muestra la reacción de aminotransferasa de los cetoácidos (KMV, KIV, KIC) hacia el aminoácido (Iso, Val, Leu). La reacción la lleva a cabo los parálogos *BAT1* y *BAT2*, y estos se regulan por los factores transcripcionales *GCN4* (rosa), *GLN3* (azul), *LEU3* (verde), los cuales se muestran por flechas cuando activan al gen parálogo, o bien por una flecha de bloqueo cuando lo reprime. Respecto a la regulación por producto "VIL" y por glutamina (Q) se muestran en rojo.

Otros reguladores que debiesen explorarse en la expresión de *BAT2* son: *RTG1/RTG3* y el complejo HAP, los cuales están involucrados en las vías anapleróticas del ciclo de Krebs y en el metabolismo respiratorio respectivamente. Se ha reportado que *BAT2* es necesario para la producción de alcoholes fusel, que son elementos de carbono que se desechan al exterior de la célula (Yoshimoto *et al.*, 2002; Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005; Lilly *et al.*, 2006) y también que *BAT2* aumenta su expresión en levaduras deficientes de la función mitocondrial (Epstein *et al.*, 2001), donde presuntamente proporciona de manera anaplerótica succinil-CoA, elemento de carbono para el funcionamiento del ciclo de Krebs. Asimismo es interesante que la activación de las vías anapleróticas a través de *RTG1/RTG3* se reprime por glutamina (Crespo *et al.*, 2002), y su principal función sea mantener la poza de α -cetoglutarato del ciclo de Krebs; características que comparte el gen *BAT2*, ya que también se reprime por glutamina (figura 7a), y la reacción de catabólisis de la aminotransferasa *BAT2*, produce derivados de amonio y cetoácidos ramificados que serán procesados hasta succinil-CoA. De esta manera los elementos *cis* del UAS_{BAT2} Hap2p 3'-ATTGG-5' (-373) y dos sitios no conservados de *RTG3* 5'-GGTCAT-3' (-456) y 5'-TGTCAA-3' (-217) sean funcionales (figura 5), y *BAT2* sea regulado por fuentes de carbono.

La participación de varios factores transcripcionales en la expresión de *BAT2*, sugiere la participación de la cromatina para permitir una adecuada expresión al coordinar la exposición de los elementos *cis* (Tirosh y Barkai, 2008),

y ya los primeros indicios apuntan que su expresión depende de los remodeladores *HDA1*, *SNF2* y *GCN5* (figura 13). Así que quedará por analizar a mayor profundidad la participación de la cromatina en el UAS_{BAT2} .

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* paradójicamente responden de manera diferente a los mismos factores transcripcionales: *GCN4*, *GLN3* y *LEU3*. Es posible que existan otros factores transcripcionales que en combinación con los ya descritos, puedan dar pie al nivel de expresión diferente pero que se co-expresen en una misma condición fisiológica. Otra posibilidad es que la combinación sea únicamente por los tres factores transcripcionales ya descritos (*GCN4*, *GLN3* y *LEU3*), y que el orden y las proporciones sean determinadas de manera diferente por la estructura del promotor, y por lo tanto den cabida a los dos patrones de expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2*. Sin embargo, aún no es posible declarar que se han subdividido los elementos *cis* del gen ancestral a éstos parálogos, como lo proponen Force *et al.*, (2005) y Tuch *et al.*, (2008) a través de pérdidas y ganancias de los elementos *cis*, para dar pie a una complementación por una subdivisión de la expresión. Para posteriormente compararlo con la regulación del gen tipo-ancestro más inmediato de *S. kluyverii* y así comprender a mayor detalle la evolución de la regulación de los parálogos *BAT1* y *BAT2*.

Respecto a la subdivisión funcional, se puede inferir un control metabólico a partir de la expresión. La presencia del producto final "VIL", es la única condición donde se reprime *BAT1* posiblemente vía *LEU3*, pero se expresa *BAT2* vía *GLN3*. De esta manera *BAT1* adquiere el rasgo biosintético, porque no es necesario biosintetizar cuando existe suficiente producto "VIL", en cambio es necesario catabolizarlos como fuentes alternativas de nitrógeno por *BAT2*. Por otro lado, cuando la glutamina reprime a *BAT2* como rasgo NCR catabólico a través de la falta de activación por *GLN3*, es precisamente esta condición donde se expresa mayormente *BAT1* activado por *LEU3* principalmente y donde las pozas de amonio se utilizan para reacciones anabólicas. Por lo tanto la regulación de *BAT1* y *BAT2*, al reprimir a uno de los parálogos, permite la expresión de uno de ellos en una condición metabólica específica: biosintética o catabólica, respectivamente.

La subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2* ocurre transcripcionalmente al expresar únicamente a uno de ellos, por lo que se favorece una dirección metabólica (Ihmels *et al.*, 2004; Conant y Wolfe, 2007; Kuepfer *et al.*, 2005; Conant y Wolfe 2008), evitando ciclos fútiles o estados de redundancia funcional que podrían presentarse cuando se co-expresan los dos parálogos. Por lo tanto queda por determinar si estos patrones de expresión han promovido cambios en las afinidades por los sustratos y productos de las isoenzimas *BAT1* y *BAT2*.

15 METODOLOGÍA

i) Predicción de los elementos *cis* en el promotor de *BAT1* y *BAT2*.

Se utilizaron tres páginas web para identificar los elementos *cis* potencialmente funcionales. La búsqueda en la del Fraenkel Lab (fraenkel.mit.edu/yeast_map_2006), fue la que se uso principalmente. Para refinar la búsqueda a mano, se obtuvieron las regiones intergénicas de los genes ortólogos a los parálogos *BAT1* y *BAT2* en la página Fungal Orthogroups (www.broad.mit.edu/regev/orthogroups), y se alinearon por Clustal W en el programa CLC Free Workbench v. 4, y se compararon con la base de datos de los elementos *cis* del YEASTRACT (www.yeastrac.org) y del Fraenkel Lab.

Escogimos los elementos *cis*, de acuerdo a nuestro criterio sobre el metabolismo de los aminoácidos.

ii) Cepas de levadura

La cepa parental de *S. cerevisiae* de la colección del laboratorio es W301/*CLAI* y el fondo genético es *ura3Δ/leu2Δ*. Las cepas mutantes utilizadas de la colección fueron las siguientes: *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *snf2Δ*, *hda1 Δ*, *gcn5Δ*, las cuales fue necesario curarles la auxotrofia de leucina reconstituyéndoles el gen *LEU2*. El gen *LEU2* (1989 pb) se amplificó con Leu2Fo (5'-GAC CGC AGT TAA CTG TGG-3') y Leu2Re (5'-CGA CTA CGT CGT TAA GGC-3') (Quezada *et al.*, 2008), se purificó por columnas de QIAgen, y se transformó en las cepas de levaduras ya mencionadas.

La mutante *leu3Δ* se construyó al remplazar el gen *LEU3* por un cassette que contiene el gen de resistencia a geneticina *kamMX*. El cassette se amplificó a partir del plásmido pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) además que debe contener los extremos complementarios al gen *LEU3*, que le indicaran el sitio de recombinación y poder introducir la mutación. De esta manera se diseñan los oligos con 45 pb de 5' y el 3' que corresponden al forward y reverse. Se usaron los siguientes oligonucleótidos: Leu3Fo (5'-CAT GAT ATA TAA GGT CAT AAA ACT AGG TTT CAG GGG CTA TCG GCG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG-3') y Leu3Re (5'- GAA AAT CAT TTA CCT CTC CTG TAG CAC CGC AGT CAT TAC ATA ACC AGC TGA AGC TTC GTA CGC-3'). Y se utilizaron los siguientes oligonucleótidos

para confirmar la mutante: FowLeu3Conf: (5'-CGG AGG TGC CGC CTA ATT TAT CGC C-3') y el RevLeu3Conf (5'-CAA GGC TGG TTG GCG GTT TAA GTC C-3') que amplifica un producto de PCR de 3,132 pb.

La mutante *gln3Δ/leu3Δ* la construyó Geovani López, al transformar la cepa mutante *gln3::NAT* (NAT: nourseotricina, y el gen de resistencia es la N-acetiltransferasa de nourseotricina), con el módulo de *leu3::KAN*.

Las cepas construidas se conservan a -120°C, en YAPD-glicerol (YPD, adenina 0.004%, glicerol 15%).

iii) Medios de cultivo

Las levaduras se crecieron en medios sintéticos (por cada litro de medio: trazas 1 ml, vitaminas 1 ml, sales 20 ml, glucosa 20g, amonio 0.5%, agar 20g), en los cuales variamos la fuente de nitrógeno: glutamina [10 mM], amonio [10 mM], GABA [10 mM], prolina [8.67mM], y los aminoácidos se usaron valina [12.8 mM], isoleucina [0.23 mM] y leucina [0.76 mM].

Los medios de cultivo se inocularon a una densidad óptica de $OD_{600nm}=0.05$, se dejaban crecer en agitación (250 rpm) a 30 C y se colectaban las células en fase exponencial a $OD_{600nm}=0.5-0.6$.

iv) Construcción del plásmido YEp363

Un método para medir el nivel de expresión de un gen, es a través de medir la actividad enzimática del gen traducido. Así que es posible producir un gen heterólogo, que esté compuesto de la región regulatoria del gen de interés y la región codificante de un gen *LacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. De esta manera se mide la actividad del gen *LacZ* que ha sido expresado a niveles dirigidos por el promotor del gen desconocido.

Así se construyeron dos plásmidos que contienen el gen *LacZ* fusionado con el promotor de *BAT1* y *BAT2* respectivamente. El plásmido original es el YEp363 que contiene el gen *LEU2*, que se utiliza como marcador de las células que contienen el plásmido. Los experimentos mostrados de ensayos de b-galactosidasa se utilizaron las fusiones de los promotores de *BAT1* y *BAT2* en el plásmido YEp353, que tiene el gen *URA3*, que fueron construidos por Maritrini Colón.

Así que se clonaron los promotores de *BAT1* y *BAT2* en el plásmido YEp363 de la siguiente manera: se amplificó el módulo que contiene el promotor de *BAT1* con los oligonucleótidos Forward-BAT1 (CCC GGG CGT TTA AGG TTC CTA TTT TGA TAG TC), mientras que para *BAT2*, se utilizaron Forward-BAT2 (GCG CGC CCC GGG GAA TGT CTC TGC AAC ATG TTT TAG TAT). Que son complementarios a los sitios de restricción *BamHI* y *PstI*, que se utilizaran posteriormente para su ligación al plásmido YEp363.

El producto de PCR se purificó por columnas de QIAgen, y se utilizó para digerirlo con las enzimas *BamHI* y *PstI*, así como también el plásmido YEp363. La reacción de restricción se incubó la noche a 25°C, y después se incubó la reacción de ligación con 1 unidad de T4 ligasa toda la noche a 16°C. Para mejorar la eficiencia de la reacción, el plásmido tuvo que ser desfosforilado, por tanto se incubó a 37°C dicha reacción con 1 µl de fosfatasa alcalina de camarón por 30 minutos y se inactivó a 65°C por 15 minutos.

Finalmente se transformaron a las células TBI electrocompetentes con el nuevo plásmido construido, y se usó una dilución de 1:10 de la reacción de ligación, que no exceda 2 µl de muestra. Después de electroporarse las células se recuperaron en 1 ml de LB y se incubaron a 37°C por 1 hora. Posteriormente se sembraron dos diluciones: 100 y 200 µl de células en cajas de LB con ampicilidna [100 µg/ml]. Se dejaron crecer toda la noche y ya crecidas las colonias, es posible inocular cultivos de 10 ml y extraerles el plásmido y analizarlo por una reacción de restricción.

v) Transformación de levadura por acetato de litio

Las células que se utilizan se dejan crecer hasta $OD_{600nm} = 0.1-0.2$. Se tratan con acetato de litio, al resuspenderlas en 200 µl de TE/LiOAc (50mM EDTA; 10mM de Tris-HCl pH 7.5; LiOAc pH 7.5 100 mM), y se toman 50 µl de las células en un tubo nuevo de 1.5 ml estéril. Se agregan a cada tubo 10 µl de DNA de esperma de salmón previamente preparado al haberlo hervido por 5 minutos y dejarlo otros 5 minutos en hielo, y entonces ya es posible agregar el DNA (1 µg de DNA –producto de PCR o 200 ng de plásmido-). Se agregan 300 µl de PEG 2%/TE/LiOAc recién preparado y se resuspende con la pipeta y se incuba a 30°C, a 250 rpm por 30 minutos.

Las muestras se colocan en termoblock y se dá el choque térmico por 15 minutos a 42°C en agitación. Se colecta el botón celular por centrifugación a 14,000 rpm por 30 segundos y se elimina el sobrenadante. Cuando se trata de mutaciones, es necesario recuperar la viabilidad de las células del tratamiento, por lo que se resuspenden en 3 ml de YPD por 3 horas incubando a 30°C y en agitación (tiempo necesario para que las células tengan una duplicación

celular). En cambio cuando se transforma con plásmido, no es necesario recuperar la viabilidad celular, y puede pasarse a sembrar las células en una caja de petri, en medio de agar. En el caso de los plásmidos que le confieren a la célula alguna curación de axotrofia, es necesario sembrar las células en medio selectivo, en cambio para las mutaciones que les confieren resistencia a antibióticos, es necesario sembrar en cajas de YPD con geneticina [200 µg/ml].

Se incuban las cajas a 30°C, y se espera hasta observar colonias aisladas, para poder hacer un cultivo y extraer DNA genómico y genotipificar la incorporación de la mutación o del plásmido.

vi) Ensayo de β-galactosidasa

Se colectan las células de la cepa que contiene el plásmido (YEp363 o YEp353) de la fusión de los promotores de *BAT1* y *BAT2* al gen *LacZ*. Del matraz se vierte el medio con las células en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugan a 3000 rpm, a 4°C por 3 minutos. Se lavan dos veces con 30 ml de agua estéril fría. Se transfiere el botón celular en un 1 ml de agua a un tubo eppendorf, se da un spin y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el botón celular en 600 µl de amortiguador de extracción (Solución de fosfato de potasio 100 mM; EDTA 0.1 M 1 mM; DTT 1 mM). Se vierte 1/3 del tubo de perlas frías y se lisan las células mecánicamente, por agitación en Vortex. Se agita un minuto a máxima potencia y después se coloca 1 min en hielo. Se repetir 7 veces, la agitación vigorosa de las muestras. Para recuperar el sobrenadante, denominado extracto proteico se centrifuga 20 min a 13,000 rpm a 4° C. Se traspasa el extracto proteico a un tubo eppendorf limpio.

El ensayo se realiza en una placa de Elisa, donde se cargan 100 µl de extracto proteico de acuerdo al orden experimental. Usando la pipeta multicanal de 8 puntas, se toman 5, 10 y 15 µl de muestra proteica. Se aforar cada pozo a 15 µl con amortiguador de extracción.

La reacción se lleva a cabo en el amortiguador Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -0.06M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04M; KCl 0.01M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, pH 7.0; DTT 1 mM), así que se agregan 135 µl a cada pozo. Se incuba la placa en el baño a 30°C. En incubación se agrega el sustrato de la reacción y la sustancia que parará la reacción. Se vierte dichas sustancias en una caja Petri, para que sea puedan tomar con la pipeta multicanal. Se agregan 30 µl de ONPG [4 µg/µl] y se deja transcurrir la reacción por 1 minuto, para posteriormente interrumpir la reacción al agregarle 75 µl de Na_2CO_3 [1 M]. Finalmente se mide la reacción de color amarillo a 420 nm de longitud de onda. Dicha medición es proporcional al nivel de expresión del gen, y es necesario ajustarla de acuerdo a la concentración de proteína de la muestra.

vii) Cuantificación de proteína por Lowry

La cuantificación de proteína se lleva a cabo en placas de Elisa y se usa la albúmina [1mg/ml] como concentración de proteína de referencia, de esta manera se agregan las siguientes cantidades: 1.5, 3, 4.5, 6, 8, 10, 15, y 20 μ l, y se afora la reacción a 40 μ l de agua. Las muestras proteicas se miden a partir de dos concentraciones 1 y 1:1 en agua, y se utilizan las siguientes cantidades para determinar su concentración: 5, 10, 15 y 20 μ l. Se agregan 200 μ l de solución ABC a cada pozo, se mezcla con la pipeta y se deja incubar 10 min a temperatura ambiente. La solución ABC está compuesta de la solución A (NaOH 0.1 N, NaCO₃), de la solución B (Tartrato de sodio y potasio 2%) y de la solución C (sulfato cúprico 1%), las cuales se mezclan en las siguientes proporciones: solución A 19.6 ml, B 0.2 ml y C 0.2ml.

Se agrega a cada pozo 20 μ l de Follin (diluido 1:1 en agua) y se deja incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Se da lectura a la placa de Elisa a 625 nm.

viii) Extracción de RNA total de levadura

El cultivo celular se encuentra en un matraz y se vacía en un tubo Falcon de 50 ml y se coloca en hielo. Se colecta la pastilla celular por centrifugación (3 minutos a 3000 rpm a 4°C) cuando el cultivo este a la densidad óptica establecida (OD_{600nm}: 0.5-0.6 fase exponencial). Se lavan las células con H₂O-DEPC (di-etil-pirocarbonato) y se vuelve a colectar por centrifugación. Se resuspenden en 1ml de H₂O-DEPC y se transfiere a un tubo de 1.5ml estéril, y se colecta por un spin. Se retira el agua para dejar únicamente la pastilla de células.

Para lisar las células, se le agregan 100 μ l de 20 mM ATA y 100 μ l de amortiguador de lisis. Se agita en vortex al máximo por 6 min., en el cuarto frío. Se le agrega 200 μ l de amortiguador LET [1X] y se centrifuga por 15min., a 14 000 rpm y a 4°C. Se traspara la fase acuosa a otro tubo de 1.5ml y se precipita agregándole 1 ml de etanol frío. Se deja

precipitando al menos 2hrs a -20°C . Se descarta el etanol y se lava las pastilla de ácidos nucleicos con 500 μl de etanol-70% (en H_2O -DEPC). Se elimina cualquier traza de etanol con la punta de pipeta y se resuspende en 60 a 80 μl de 1 mM de ATA. Finalmente las muestras se conservan a -70°C .

La determinación de la concentración del RNA total, se prepara con una dilución de 250 de la muestra, en una cubeta de 500 μl de capacidad (2 μl de muestra). Se mide la absorbancia a $A_{280\text{nm}}$ y $A_{260\text{nm}}$ y se calcula la concentración con la fórmula: $250 \times 40 \times A_{260\text{nm}} = 10 \times A_{260\text{nm}} = [] \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

ix) Síntesis de sondas radiactivas

Es necesario de 1–2 μg de DNA (previamente purificado por columna) para sintetizar la sonda radiactiva. Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 155 pb del gen constitutivo *scRI* (Zhao et al., 2002): *scRI-Fo* (5'-GGA GTT TTA TCC AGG GTC AGC AAA GG-3') y *scRI-Re* (5'-TTT AAT TTG GCG GTG CCA TCA GGA TTT A-3') diseñados por Jorge Herrera Díaz. También se usó el gen de Actina como gen constitutivo, y el fragmento es de 1599 pb. Para amplificar un fragmento de 2,044 pb del gen *BAT1* se utilizaron los oligonucleótidos *BAT1-Fo* (5'-ATC AAT AGT AAG GCT CGC AAA CCG CCC-3') y el *BAT1-Re* (5'-CAT GTA AAG TCC AGC GAG ATA CCT TGG C-3'), y para amplificar un fragmento de 1,901 pb del gen *BAT2*, se usaron los *BAT2-Fo* (5'-CAA ACA TCT TCG AAC GTG AAA ACC TGC CTC TGA GGG-3') y el *BAT2-Re* (5'-GTC CTT GAT ACC GAT AGG CCA GC-3'), diseñados por Maritri Colón.

x) Hibridación tipo Northern Blot

Se lava la cámara de electroforesis con SDS 0.1% y el gel se hace a 1.2% de agarosa; MAE IX; 6% formaldehído. Se prepara el RNA total (20 a 30 μg) en amortiguador de cargado (5 μl de tampon por cada 1 μl de muestra) y por 10 minutos se incuban las muestras a 65°C . La electroforesis se realiza a 70 mV y aproximadamente transcurre en ~5hrs, en el amortiguador MAE IX con 3% formaldehído.

La transferencia del RNA a la membrana de nylon requiere que el gel se lave dos veces en agitación con SSC 10X (por cada litro: 175.3g de NaCl; 88.2g Citrato de sodio, pH 7.0) por 20 min., cada uno. La membrana de nylon

N⁺ se sumerge en H₂O y después se deja reposar 5 minutos en amortiguador de SSC 10X. Se coloca el gel de modo que la abertura de los pozos quede sobre el papel filtro humedecido que tiene contacto con el amortiguador SSC y se delimitan los bordes del gel con el parafilm. Sobre el gel se coloca la membrana de nylon con el mismo tamaño del gel. Sobre la membrana se sobreponen dos papeles filtro húmedos y después papel absorbente doblado con un grosor de ~8 cm. Sobre esto, se coloca un vidrio y después un libro pesado. La transferencia transcurre por 9–12 hrs.

Se desmonta la transferencia: con un lápiz se marcan los carriles y se corta una esquina de la membrana para indicar la cara expuesta al gel. Se lava la membrana sumergiéndola en SSC 1X y se le fija el RNA con UV (1200 μ Joules).

La hibridación de la membrana requiere una sonda radiactiva que hibrida de manera específica a 65°C. Primero se coloca la membrana en tubo con solución de hibridación (SDS 1.4%; Buffer de fosfatos disódico pH=7.2 [0.3M]; EDTA pH=8. [0.5 mM]), durante 1 h. Después se agrega la sonda radiactiva previamente hervida por 10 minutos y se deja la hibridación toda la noche. Para quitar inespecificidades, la membrana se lava con dos soluciones astringentes a 65°C: baja astringencia (SSC 2X; SDS 0.1%) y alta astringencia (SSC 0.15X; SDS 0.1%). El lavado con cada solución se realiza en dos tiempos (5 y 30 minutos).

La membrana húmeda se envuelve en plástico para exponerse sobre la pantalla. Las exposiciones pueden variar de 1 h a 3 días dependiendo de la intensidad de la señal medida por el Geiger. La pantalla se escanea en el Typhon a una resolución de 100 μ m. Finalmente la pantalla se blanquea por 10 minutos y la membrana se lava con SDS 0.1% hirviendo en dos tiempos: 5 minutos y 2 horas.

Las imágenes se analizan con el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics), y se hacen los cálculos de densitometría.

REFERENCIAS

1. Abdel-Sater, F., Iraqui, I., Urrestarazu, A. & Andre, B. The external amino acid signaling pathway promotes activation of Stp1 and Uga35/Dal81 transcription factors for induction of the AGPI gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 166, 1727-39 (2004).
2. Amoutzias, G. D., Robertson, D. L., Van de Peer, Y. & Oliver, S. G. Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends Biochem Sci* 33, 220-9 (2008).
3. Bardwell, L., Cook, J. G., Zhu-Shimoni, J. X., Voora, D. & Thorner, J. Differential regulation of transcription: repression by unactivated mitogen-activated protein kinase Kss1 requires the Dig1 and Dig2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15400-5 (1998).
4. Barnett, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast* 25, 689-731 (2008).
5. Bilu, Y. & Barkai, N. The design of transcription-factor binding sites is affected by combinatorial regulation. *Genome Biol* 6, R103 (2005).
6. Boer et al. Stp1p, Stp2p and Abf1p are involved in regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 28, 974-981 (2000).
7. Boer, V. M., Daran, J. M., Almering, M. J., de Winde, J. H. & Pronk, J. T. Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res* 5, 885-97 (2005).
8. Borneman, A. R. et al. Divergence of transcription factor binding sites across related yeast species. *Science* 317, 815-9 (2007).
9. Carvalho, J. & Zheng, X. F. Domains of Gln3p interacting with karyopherins, Ure2p, and the target of rapamycin protein. *J Biol Chem* 278, 16878-86 (2003).
10. Chin, C. S., Chubukov, V., Jolly, E. R., DeRisi, J. & Li, H. Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biol* 6, e146 (2008).
11. Coffman, J. A., Rai, R. & Cooper, T. G. Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177, 6910-8 (1995).
12. Conant & Wolfe. Functional Partitioning of Yeast Co-Expression Networks after Genome Duplication. *PLOS Biology* 4, e109 (2006).
13. Conant, G. C. & Wagner, A. Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci* 271, 89-96 (2004).
14. Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B. & Hall, M. N. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6784-9 (2002).
15. Dean, E. J., Davis, J. C., Davis, R. W. & Petrov, D. A. Pervasive and persistent redundancy among duplicated genes in yeast. *PLoS Genet* 4, e1000113 (2008).
16. DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L. & Gonzalez, A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276, 43775-83 (2001).
17. Dickinson, J. R. & Norte, V. A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 326, 29-32 (1993).
18. Dickinson, J. R., Harrison, S. J. & Hewlins, M. J. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 25751-6 (1998).
19. Dimas, A. S. et al. Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. *Science* 325, 1246-50 (2009).

20. Doniger, S. W. & Fay, J. C. Frequent gain and loss of functional transcription factor binding sites. *PLoS Comput Biol* 3, e99 (2007).
21. Epstein et al. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297-308 (2001).
22. Famham, P. J. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* 10, 605-16 (2009).
23. Fitzgerald, M. X., Rojas, J. R., Kim, J. M., Kohlhaw, G. B. & Marmorstein, R. Structure of a Leu3-DNA complex: recognition of everted CGG half-sites by a Zn₂Cys₆ binuclear cluster protein. *Structure* 14, 725-35 (2006).
24. Force et al. The Origin of Subfunctions and Modular Gene Regulation. *Genetics* 170, 433-446 (2005).
25. Godard, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 3065-86 (2007).
26. Goodey, N. M. & Benkovic, S. J. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol* 4, 474-82 (2008).
27. Gu, X., Zhang, Z. & Huang, W. Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 707-12 (2005).
28. Ha, M., Li, W. H. & Chen, Z. J. External factors accelerate expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 23, 162-6 (2007).
29. Hazelwood, L. A. et al. A new physiological role for Pdr1 2p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res* 6, 937-45 (2006).
30. Hinnebusch, A. G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59, 407-50 (2005).
31. Hittinger, C. T. & Carroll, S. B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449, 677-81 (2007).
32. Hofman-Bang, J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* 12, 35-73 (1999).
33. Ihmels, J., Collins, S. R., Schuldiner, M., Krogan, N. J. & Weissman, J. S. Backup without redundancy: genetic interactions reveal the cost of duplicate gene loss. *Mol Syst Biol* 3, 86 (2007).
34. Ihmels, J., Levy, R. & Barkai, N. Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 22, 86-92 (2004).
35. Ishida, C. et al. The UGA3-GLT1 intergenic region constitutes a promoter whose bidirectional nature is determined by chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 59, 1790-806 (2006).
36. Kellis, M., Birren, B. W. & Lander, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617-24 (2004).
37. Kohlhaw, G. B. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 1-15, table of contents (2003).
38. Kuepfer, L., Sauer, U. & Blank, L. M. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 15, 1421-30 (2005).
39. Kulkarni, A. A., Abul-Hamd, A. T., Rai, R., El Berry, H. & Cooper, T. G. Gln3p nuclear localization and interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276, 32136-44 (2001).
40. Levy, S. et al. Strategy of transcription regulation in the budding yeast. *PLoS One* 2, e250 (2007).
41. Li, W. H., Yang, J. & Gu, X. Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 21, 602-7 (2005).
42. Liu, X., Lee, C. K., Granek, J. A., Clarke, N. D. & Lieb, J. D. Whole-genome comparison of Leu3 binding in vitro and in vivo reveals the importance of nucleosome occupancy in target site selection. *Genome Res* 16, 1517-28 (2006).
43. Lopez-Maury, L., Marguerat, S. & Bahler, J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* 9, 583-93 (2008).

44. Maclsaac, K. D. et al. An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* 7, 113 (2006).
45. Marton, M. J. et al. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* 4, 1293-301 (1998).
46. Moxley, J. F. et al. Linking high-resolution metabolic flux phenotypes and transcriptional regulation in yeast modulated by the global regulator Gcn4p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6477-82 (2009).
47. Natarajan, K. et al. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21, 4347-68 (2001).
48. Papp, B., Pal, C. & Hurst, L. D. Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424, 194-7 (2003).
49. Peter, G. J., During, L. & Ahmed, A. Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the TOR signaling pathway. *J Biol Chem* 281, 5546-52 (2006).
50. Presser, A., Elowitz, M. B., Kellis, M. & Kishony, R. The evolutionary dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* protein interaction network after duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 950-4 (2008).
51. Prud'homme, B., Gompel, N. & Carroll, S. B. Emerging principles of regulatory evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 Suppl 1, 8605-12 (2007).
52. Quezada, H. et al. Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154, 1656-67 (2008).
53. Riego, L., Avendano, A., DeLuna, A., Rodriguez, E. & Gonzalez, A. GDH1 expression is regulated by GLN3, GCN4, and HAP4 under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 79-85 (2002).
54. Schoodermark-Stolk et al. Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Reseach* 6, 777-791 (2005).
55. Segal, E. & Widom, J. From DNA sequence to transcriptional behaviour: a quantitative approach. *Nat Rev Genet* 10, 443-56 (2009).
56. Sosa, E. et al. Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 1175-80 (2003).
57. Sudarsanam, Iyer, Brown & Winston. Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 97, 3364-3369 (2000).
58. Sze, J. Y., Wootner, M., Jaehning, J. A. & Kohlhaw, G. B. In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science* 258, 1143-5 (1992).
59. Tuch, B. B., Galgoczy, D. J., Hemday, A. D., Li, H. & Johnson, A. D. The evolution of combinatorial gene regulation in fungi. *PLoS Biol* 6, e38 (2008).
60. Tuch, B. B., Li, H. & Johnson, A. D. Evolution of eukaryotic transcription circuits. *Science* 319, 1797-9 (2008).
61. Wade & Jaehning. Transcriptional corepression in vitro: a Mot1p-associated form of TATA-binding protein is required for repression by Leu3p. *Molecular and Cellular Biology* 16, 1641-1648 (1996).
62. Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K. & Kohlhaw, G. B. Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J Biol Chem* 272, 19383-92 (1997).
63. Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K. & Kohlhaw, G. B. Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J Biol Chem* 272, 19383-92 (1997).
64. Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. & Regev, A. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449, 54-61 (2007).
65. Wolfe & Shield. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713 (1997).
66. Wray, G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nat Rev Genet* 8, 206-16 (2007).

67. Wyrick et al. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* 402, 418-421 (1999).
68. Yoshimoto. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 501-508 (2002).
69. Zhao, J., Herrera-Diaz, J. & Gross, D. S. Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density. *Mol Cell Biol* 25, 8985-99 (2005).