



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Identificación de los elementos regulatorios involucrados en el control de la expresión del gen *LEU9* por su parálogo *LEU4* en la levadura *S. cerevisiae*: Implicaciones fisiológicas de la interrelación *LEU4/LEU9*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

I.B.Q. Angélica Mariana Jara Servín

Tutora: Dra. Alicia González Manjarrez
Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Miembros del Comité Tutor:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo, Instituto de Biotecnología. UNAM.
Dr. Luis Servín González, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Ciudad de México. Mayo, 2019.



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

Este trabajo se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas del programa “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo se desarrolló en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el departamento de Bioquímica y Biología Estructural.

El Comité Tutor estuvo conformado por:

Dra. M. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular-UNAM
Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. Luis Servín González	I. de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo CB-2014-239492-B y Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No IN204018. Durante el desarrollo de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de becario: 765278/620723. Se reconoce la ayuda del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo brindado para la presentación de este trabajo en congresos nacionales.

Se reconoce a la Dra. Alicia González por la conducción de este proyecto y por ser parte de mi formación académica.

Se reconoce el apoyo y las aportaciones realizadas por la Dra. Guadalupe Espín y el Dr. Luis Servín, miembros de mi Comité Tutor, que permitieron el desarrollo y evolución de este trabajo.

Se reconoce el apoyo de la Q.F.B. Beatriz Aguirre López durante el desarrollo de este proyecto. Se reconoce el apoyo de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz para el alineamiento de secuencias y búsqueda de cajas de promotores, así como el apoyo del Dr. Mohammed El-Hafidi por el análisis metabólico desarrollado en el Instituto Nacional de Cardiología.

Se reconoce a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por su ayuda en la síntesis de oligonucleótidos y por el préstamo de equipo para la realización del proyecto.

Se reconoce el apoyo secretarial de Rocío Romualdo Martínez.

*La ciencia no nos ha enseñado aún si la locura es o no
lo más sublime de la inteligencia.*

Edgar Allan Poe

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, personas excepcionales, por todo el apoyo y la presencia incondicional. Por siempre decirme que debo hacer lo que me guste. Gracias por infundirme coraje y recordarme que los obstáculos están para ser sorteados.

Al enano de Manuel, por cómo has crecido y encontrado tu camino en los últimos años. Por ayudarme con la computadora, compartir tus gustos conmigo, escuchar cuando fue necesario y siempre amenizar. Muy bien, buena onda.

A Alicia, por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos. Por compartimos su pasión por la investigación, recordarnos que siempre hay que poner controles y llegar todos los días con actitud optimista y sonriéndole a la ciencia. Gracias por estos dos años llenos de aprendizajes.

A la Jefa Gleba, por tantas cosas a lo largo de los años. Por saber entendernos y por querer recuperar el micelio: ILDZV.

A Marco, por seguir pagando impuestos y dar consejos de adulto mientras promueves seguir siendo joven. Siempre. ¡Gracias por las llamadas desde Dubai!

A Jacky, mi caballito de agua. Por estar pendiente, compartir mi humor y enseñarme a disfrutar la Ciudad de México y la vida tal y como se va presentando. Por quedarte conmigo en laboratorio hasta altas horas de la noche y por no haber aceptado nunca un “no puedo” por respuesta.

A mis queridísimas KASAC que han sabido apoyar, escuchar y aconsejar sin importar la distancia. Todo mi cariño para ustedes.

A Eren, por la actitud más optimista y amable que he conocido. Por ser la BigData y por haberme apoyado siempre que fue necesario.

A Adrián, por todas las pláticas sobre cómo arreglar el mundo. Por confiar, por todas las risas y por haberme recibido con una enorme sonrisa en Bogotá. ¡Qué calidad de parceros!

A Mitzy, por ese discurso en el Zinco Jazz Club y por haberme arrastrado a ser gorda profesional para después hacer apuestas inalcanzables. Rodaremos en ese medio maratón. ¡Áaaamonos!

A los señores, por tantos consejos (y presiones) en nuestro Club de WhatsApp y por esas comidas y cenas.

A Cinthya, por escucharme cada noche al llegar de laboratorio. Por tu amistad y por todas esas comidas que me preparaste. ¡Gracias a ti y a Artu!

A Dariel, por esa época dorada en el cuarto de radioactividad y en el centro de la ciudad.

A Christian, por haberme guiado a lo largo de mi vida académica y por nunca dudar de mi y de mis objetivos. ¡Gracias por todos los desayunos!

A Memo, por haber seguido en contacto conmigo y por los infinitos consejos. ¡Un abrazo grande!

A Nash, Martí, Raful, Fer y Juanito que aparecieron de repente en mi vida para compartir técnicas moleculares (sí, Nash, tu también), risas, comidas, conciertos, congresos... ¡shanclitas y sheves!

A los papás de Jaqueline por las cenas y desayunos y por todas las veces que me llevaron de laboratorio a mi casa.

A todos los que coincidimos en algún momento en el laboratorio 301-Ote: Adrián, Bety, Ceci, Charlie, Cristy, Dani, Dariel, Elena, Eren, Estefy, Jack, James, Juanito, Stefy y Ximena. Gracias por discutir datos y por tantas rebanadas de pastel que compartimos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	12
LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Duplicación génica.....	16
1.1.1 Contribución evolutiva de la duplicación génica.....	17
1.2 Duplicación del genoma en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.3 Regulación transcripcional: promotores y factores transcripcionales.....	19
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1 Genes parálogos: <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i>	20
2.2 Las isoenzimas codificadas por <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> permiten una regulación por retroalimentación.....	21
2.3 Expresión de los genes parálogos <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.4 Reguladores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVO GENERAL.....	27
5.1 Objetivos particulares.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Cepas.....	28
6.2 Condiciones de crecimiento.....	30
6.3 Análisis <i>in silico</i> de los promotores de <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i>	30
6.4 Análisis de expresión génica por Northern Blot.....	31
6.5 Determinación de pozas de leucina.....	31
7. RESULTADOS.....	32
7.1 El incremento de expresión de <i>LEU9</i> en ausencia de <i>LEU4</i> está determinado por su promotor.....	32
7.1.1 Efecto de los promotores en glucosa-amonio.....	32
7.1.2 Efecto de los promotores en etanol-amonio.....	35
7.2 Cajas consenso conservadas en los promotores de <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i>	38
7.3 Gln3 incrementa la expresión de <i>LEU9</i> en un fondo <i>leu4Δ</i> en glucosa-amonio.....	40
7.4 La ausencia de <i>LEU4</i> provoca un déficit de valina	

en glucosa-amonio.....	44
7.5 Gcn4 contribuye en menor proporción que Gln3 al incremento de expresión de <i>LEU9</i> en glucosa-amonio.....	46
7.6 Gln3 y Gcn4 incrementan la expresión de <i>LEU9</i> en un fondo <i>leu4Δ</i> en etanol-amonio.....	47
7.7 Gcn4 provoca un déficit de valina en etanol.....	50
7.8 Leu3 está implicado en otras rutas metabólicas no ligadas a la biosíntesis de leucina.....	51
8. DISCUSIÓN.....	55
9. CONCLUSIONES.....	59
10. PERSPECTIVAS.....	60
11. ANEXOS.....	61
11.1 Tablas Suplementarias.....	61
11.2 Mapa del plásmido pRS416.....	64
11.3 Transformación de levadura con acetato de litio.....	65
11.4 Obtención de ADN genómico de levadura.....	66
11.5 Extracción de metabolitos intracelulares.....	67
11.6 Obtención de ARN total de <i>S. cerevisiae</i>	68
11.7 Electroforesis y transferencia de geles de ARN total.....	70
11.8 Marcaje y purificación de sondas obtenidas por PCR.....	72
11.9 Análisis de expresión por Northern Blot.....	73
12. REFERENCIAS.....	74

RESUMEN

Las isoenzimas α -isopropilmalato sintasas codificadas por los parálogos *LEU4* y *LEU9* catalizan la primera reacción de la ruta de biosíntesis de leucina en *Saccharomyces cerevisiae*. En una cepa silvestre se ve favorecida la formación de heterodímeros 4/9, ya que la proporción de Leu4:Leu9 es aproximadamente de 4:1. En una cepa *leu4 Δ LEU9* la expresión de *LEU9* incrementa, formándose el homodímero 9/9 que presenta una IC₅₀ a leucina elevado que ocasiona cambios metabólicos que comprometen el crecimiento de la levadura. De todos los factores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados, Gln3 está involucrado en el incremento de expresión de *LEU9* tanto en condiciones fermentativas como en condiciones respiratorias, mientras que Gcn4 parece fungir como activador interactuando con Gln3 cuando la fuente de carbono es etanol. El efecto que tiene Gcn4 sobre *LEU9* es menor con glucosa, posiblemente debido a que el déficit de aminoácidos que se genera con esta fuente de carbono en una cepa *leu4 Δ* no es tan severo como el que se provoca en etanol. Por otro lado, el factor transcripcional Leu3 está involucrado en la biosíntesis de aminoácidos ramificados y, probablemente en la expresión basal de *LEU9*, pero también en rutas metabólicas ajenas a la biosíntesis de leucina que resultan fundamentales para la célula.

ABSTRACT

The α -isopropylmalate synthases codified by *LEU4* and *LEU9* paralogous genes catalyze the first reaction of the leucine biosynthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In a wild type strain the formation of the 4/9 heterodimer is favored over that of any of the homodimers, mainly because both the expression and the amount of protein have a proportion around 4:1. Conversely, in a *leu4 Δ LEU9* mutant the expression of *LEU9* increases dramatically, allowing the formation of the 9/9 homodimer, which holds an IC₅₀ to leucine so high that the metabolic consequences compromise the cell's growth. Among all the transcriptional factors involved in branched chain amino acid biosynthesis, Gln3 is involved in the over-expression of *LEU9* in both fermentative and respiratory conditions, whereas Gcn4 interacts with Gln3 only under respiratory conditions, generating a similar increase of expression in *LEU9*. The effect that Gcn4 holds upon *LEU9* with glucose as carbon source is minor, probably due to the possibility that the amino acid deprivation generated under fermentative conditions in a *leu4 Δ* strain is not as severe as that evoked with ethanol. On the other hand, albeit the transcriptional factor Leu3 is involved in branched chain amino acids biosynthesis, and probably in the maintenance of *LEU9* basal expression, it appears to play a decisive role in other metabolic pathways apart from leucine biosynthesis that are crucial for the yeast's growth.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACT1	gen que codifica para actina.
ADH1	gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa 1.
ADH2	gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa 2.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ARN	ácido ribonucleico.
α-IPM	α -isopropil malato.
α-IPMS	α -isopropil malato sintasa.
β-IPM	β -isopropilmalato
BAT1	gen que codifica para la enzima aminotransferasa de cadena ramificada Bat1.
BAT2	gen que codifica para la enzima aminotransferasa de cadena ramificada Bat2.
CoA	coenzima A.
Δ	símbolo que hace referencia a una delección.
DAL5	gen que codifica para la alantoato permeasa Dal5.
DEPC	dietilpirocarbonato.
EtOH	etanol.
G418	geneticina.
GABA	ácido γ -aminobutírico.
GCN4	gen que codifica para el factor de transcripción Gcn4.
GLN3	gen que codifica para el factor de transcripción Gln3.
HIS4	gen que codifica para la enzima His4.
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>).
IC₅₀	índice de concentración media inhibitoria.
Ile	isoleucina.
Kan	kanamicina.
KIC	α -cetocaproato.
KIV	α -cetoisovalerato.
Leu	leucina.
LeuRS	leucil-tRNA sintetasa.
LEU4	gen que codifica para la enzima α -isopropilmalato sintasa Leu4.
LEU3	gen que codifica para el factor de transcripción Leu3.
LEU9	gen que codifica para la enzima α -isopropilmalato sintasa Leu9.
M	molar.
μ	velocidad de crecimiento.
MAE	amortiguador MOPS + Acetato de sodio + EDTA.
min	minutos.
MM	medio mínimo.
OD	densidad óptica.

ORF	marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de bases.
PCR	reacción de polimerasa en cadena (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>).
P_{LEU4}	promotor de <i>LEU4</i> .
P_{LEU9}	promotor de <i>LEU9</i> .
rpm	revoluciones por minuto.
s	segundos.
TE	Tris pH 8 + EDTA.
TES	solución con Tris-HCl, EDTA y SDS.
TF	factor transcripcional (del inglés <i>Transcriptional Factor</i>).
URE2	gen que codifica para el regulador transcripcional Ure2.
UTR	región no traducida de un gen (del inglés <i>UnTranslated Region</i>).
Val	valina.
WGD	duplicación completa del genoma (del inglés <i>Whole Genome Duplication</i>).
YPD	medio rico (extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa).
≈	símbolo que hace referencia a una aproximación.
::	símbolo que hace referencia a una inserción.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Relación evolutiva de los clados *KLE*, *ZT* y las cepas *sensu strictu*.
- Figura 2.** Compartimentalización de la ruta biosintética de leucina en *S.cerevisiae*.
- Figura 3.** Curvas de crecimiento de cepas control en glucosa o etanol.
- Figura 4.** Esquematización del funcionamiento del sistema de inhibición por retroalimentación.
- Figura 5.** Concentraciones intracelulares de leucina de cepas control en glucosa o etanol.
- Figura 6.** Northern blot de ARN total obtenido de cepas control en glucosa o etanol.
- Figura 7.** Esquematización de las quimeras $P_{LEU9}LEU4 leu9\Delta$ y $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$.
- Figura 8.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas control y quimeras en glucosa.
- Figura 9.** Concentraciones intracelulares de leucina de cepas control y quimeras en glucosa.
- Figura 10.** Northern blot de las cepas control y las quimeras en glucosa.
- Figura 11.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas control y quimeras en etanol.
- Figura 12.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas $LEU4LEU9$ y $P_{LEU9}LEU4 leu9\Delta$ en etanol y etanol-leucina.
- Figura 13.** Concentraciones intracelulares de leucina de cepas control y quimeras en etanol.
- Figura 14.** Northern blot de cepas control y quimeras en etanol.

- Figura 15.** Sitios de unión de factores transcripcionales los promotores *LEU4* y *LEU9*.
- Figura 16.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas control y dobles mutantes en glucosa.
- Figura 17.** Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas control y dobles mutantes en glucosa.
- Figura 18.** Esquematación del posible mecanismo de activación de *LEU9* por Gln3.
- Figura 19.** Northern blot de las cepas control y *ure2Δ* en glucosa.
- Figura 20.** Esquematación de la ruta de biosíntesis de leucina en una cepa *leu4ΔLEU9*.
- Figura 21.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de *LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9* en glucosa y valina.
- Figura 22.** Northern blot de cepas control y dobles mutantes en glucosa.
- Figura 23.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas control y dobles mutantes en etanol.
- Figura 24.** Concentraciones intracelulares de leucina de las cepas control y dobles mutantes en etanol.
- Figura 25.** Northern blot de cepas control, *ure2Δ* y dobles mutantes en etanol.
- Figura 26.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de *LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9* en etanol y valina.
- Figura 27.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de cepas control y *leu4Δleu3Δ* en glucosa y etanol.
- Figura 28.** Concentraciones intracelulares de leucina de cepas control y *leu4Δleu3Δ* en glucosa.

- Figura 29.** Cinética de crecimiento y velocidades específicas de crecimiento de *LEU4LEU9* y *leu4Δleu3Δ* en glucosa y etanol con y sin leucina.
- Figura 30.** Representación esquemática de la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae*.
- Tabla 1.** Cepas, genotipos y fuentes de cada una de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este trabajo.
- Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este trabajo.
- Tabla 3.** Función de los factores transcripcionales con sitios de unión en los promotores de *LEU4* y *LEU9*.

LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1 Oligonucleótidos usados para confirmar cepas.

Tabla S2 Oligonucleótidos usados para obtener mutantes.

Tabla S3 Oligonucleótidos usados para obtener la quimera $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$.

Tabla S4 Oligonucleótidos usados para obtener sondas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Duplicación génica

La duplicación génica es un fenómeno que se ha encontrado en los tres dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*) y que consiste en la duplicación de un gen, varios genes, fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros. Esta duplicación puede darse por retrotransposición, duplicación en tándem, o duplicación cromosómica o genómica (Zhang, 2003). Sin embargo, también puede ocurrir una duplicación completa del genoma, conocida como un evento WGD (*Whole Genome Duplication*) que se halla comúnmente en plantas (Wolfe y Shields, 1977). Un evento de WGD puede darse por autoploidización (duplicación del set de cromosomas de la especie) o alopoliploidización (hibridación entre dos especies distintas) (Zhang, 2003). Aquellos genes dentro de un mismo genoma que comparten un ancestro común y son resultado de una duplicación génica, son denominados parálogos, mientras que aquellos genes que se encuentran en genomas distintos y comparten un ancestro común como resultado de un evento de especiación, son denominados ortólogos (Hurles, 2004). El destino de cualquier gen duplicado en el genoma varía, pudiendo tener uno de los siguientes cuatro destinos:

- a) Conservación de la función ancestral: se da principalmente cuando la dosis adicional de producto representa una ventaja para el organismo. (Zhang, 2003; Kellis *et al.*, 2004).
- b) Pseudogenización: proceso en el que el gen, al no encontrarse bajo ninguna presión de selección, pierde la función que cumplía como gen parental y se convierte en un pseudogen (Zhang, 2003).
- c) Subfuncionalización: consiste en la división de la expresión del gen ancestral en los dos genes parálogos. La subfuncionalización también puede darse a nivel de función proteica cuando uno de los genes desarrolla mejor una de las funciones del gen parental (Zhang, 2003; Marcet-Houben y Gabaldón, 2015).
- d) Neofuncionalización: es el proceso por el que se realizan cambios en la secuencia, permitiendo generar una nueva función que no tenía el gen parental (Zhang, 2003; Kellis *et al.*, 2004).

De todos los genes que sufren duplicación, la mayoría se pierde debido a la ausencia de presiones de selección, provocando que éstos pasen por un proceso de pseudogenización en uno de los parálogos y conservación de la función en el otro, dependiendo muchas veces de las funciones fisiológicas que cumple este gen (Zhang, 2003).

1.1.1. Contribución evolutiva de la duplicación génica

La mayor contribución de las duplicaciones génicas a la evolución es la posibilidad de tener más material genético susceptible a mutaciones, lo que implica el desarrollo de nuevas funciones o la especialización de funciones ya existentes (Kellis *et al.*, 2004), además de permitir la formación de redes de regulación génica con altos grados de especialización (Zhang, 2003). Del 95% de los genes duplicados que ya se fijaron en el genoma, únicamente una de las dos copias experimenta evolución acelerada, probablemente debido a que, en un proceso de subfuncionalización, uno de los dos genes retiene la función ancestral y el otro, al verse libre de esta restricción de selección, es capaz de evolucionar más rápidamente respondiendo a presiones de selección distintas (Kellis *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2005). La especialización de los genes parálogos se puede dar por localización diferencial del producto codificado (Ryan *et al.*, 1973; Peñalosa-Ruiz, *et al.*, 2012), expresión (DeLuna *et al.*, 2001; Kellis *et al.*, 2004) o regulación transcripcional (Quezada *et al.*, 2008; González *et al.*, 2017).

1.2. Duplicación del genoma en *Saccharomyces cerevisiae*

En el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado 55 regiones duplicadas que contienen 376 pares de genes homólogos (Wolfe y Shields, 1977). El origen de estas regiones duplicadas puede deberse a varias duplicaciones sucesivas que involucran docenas de kilobases o por un solo evento de duplicación del genoma completo seguido de translocaciones recíprocas entre cromosomas para formar mosaicos de regiones duplicadas (Smith, 1987; Wolfe y Shields, 1977). Sin embargo, debido a la sintenia que presentan los genes, el modelo más probable es el de la duplicación del genoma después de la formación de un híbrido entre una especie del clado *ZT* (*Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulaspota delbrueckii*) y una del clado *KLE* (géneros *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium*) para formar un organismo tetraploide (Figura 1) que experimentó conversión génica y rearrreglos y perdió del 85-90% de los genes duplicados, dando así origen a una especie diploide con 5,800 genes, varios de ellos duplicados (Wolfe y Shields, 1977; Kellis *et al.*, 2004; Marcet-Houben y Gabaldón, 2015; Wolfe, 2015).

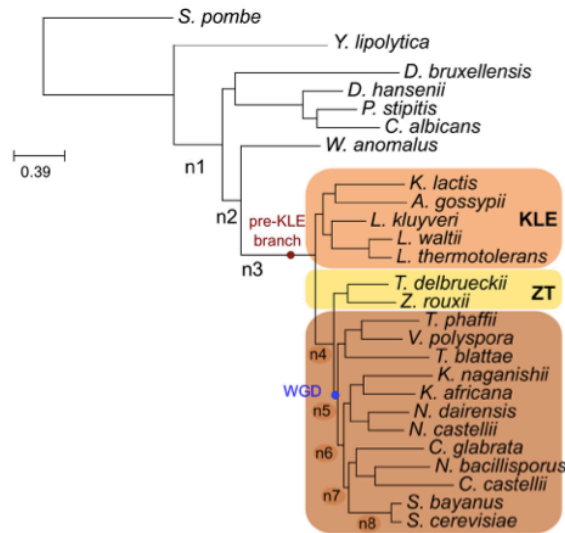


Figura 1. Relación evolutiva de los clados KLE (naranja), ZT (amarillo) y las cepas *sensu stricto* (café). El punto de hibridización (pre-KLE) y de duplicación del genoma (WGD) están indicados con círculos de color. Tomado de Marcet-Houben y Gabaldón, 2015.

Se desconoce la función de la mayor parte de los 376 genes parálogos en *S. cerevisiae* (Wolfe y Shields, 1997). El par de parálogos más estudiados son los genes *ADH1* y *ADH2* que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa. Estos parálogos se expresan bajo condiciones distintas: *ADH1* se expresa de forma constitutiva, mientras que *ADH2* se expresa cuando la concentración de azúcar disminuye y convierte etanol a acetato, que después se integrará al Ciclo de Krebs (Piskur *et al.*, 2006). A través de la construcción y análisis de árboles filogenéticos y secuencias proteicas, puede inferirse que *ADH1* y *ADH2* divergieron en su función respecto al gen *ADH* ancestral para desarrollar una estrategia de producir-acumular-consumir etanol debido a la aparición de plantas con frutos carnosos. Estos frutos representan una fuente de energía digna de que se proteja del consumo de otros microorganismos al utilizar como mecanismo de defensa la acumulación de etanol para después consumirlo (Thomson *et al.*, 2005; Piskur *et al.*, 2006).

Es precisamente la capacidad de fermentar azúcares bajo condiciones anaeróbicas para producir etanol la diferencia fisiológica más evidente entre *S. cerevisiae* y las levaduras tipo ancestral. Las levaduras que sufrieron duplicación de su genoma presentan la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis, mientras que aquellas especies localizadas antes del punto de duplicación en el árbol filogenético presentan una gran variedad de fenotipos; algunas tienen la capacidad y otras son incapaces de crecer en ausencia de oxígeno (Merico *et al.*, 2007). Un patrón similar se identificó respecto a la generación de mutantes *petite* (mutantes con deleciones en el genoma mitocondrial o incluso ausencia de éste), con la diferencia de que ninguna de las especies más alejadas del evento de duplicación fue capaz de producir dichas mutantes (Merico *et al.*, 2007). Aquellas especies que sufrieron

duplicación de su genoma y que presentan un metabolismo fermentativo, efecto Crabtree (capacidad de fermentar en condiciones aeróbicas) y la capacidad de generar *petites* se denominan especies *sensu stricto* (Merico *et al.*, 2007). Los genes duplicados en *S. cerevisiae* establecieron las bases para la estrategia de producir-acumular-consumir etanol (Piskur *et al.*, 2006), ya que varios de estos genes se regulan de forma distinta dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentre la levadura (Wolfe y Shields, 1997; Thomson, 2005).

1.3. Regulación transcripcional: promotores y factores transcripcionales

Existen varios mecanismos para regular la expresión de los genes que conforman un genoma. Para organismos eucariontes, algunos de estos mecanismos incluyen condensación de la cromatina, metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), modificaciones post-traduccionales, etcétera. Sin embargo, la más común de todas ellas es regular el inicio de la transcripción de la región codificante (Latchman 1998; Carey y Smale 2000; Lemon y Tjian 2000; White 2001).

Todos los genes están precedidos por secuencias que regulan su expresión en conjunto con otras proteínas; regulan tanto las condiciones bajo las que se expresan como el nivel de expresión. Estas secuencias se conocen como promotores y es a partir de ellos que el genotipo de una célula se puede convertir en fenotipo (Wray *et al.*, 2003). La función principal de un promotor es integrar información sobre el estado actual de la célula y alterar la transcripción de un gen particular de acuerdo a dicho estado. La información llega al promotor en forma de factores de transcripción (TF), es decir, de proteínas que se unen al promotor para alterar la transcripción del gen al que acompañan (Wray *et al.*, 2003). Hay factores transcripcionales que actúan como activadores, otros que actúan como represores de la transcripción, o como ambos dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la célula. La base genética del perfil de expresión de cada gen está dado por la secuencia del promotor y por los TFs que interactúan con él. Los sitios de unión de los TFs son blancos evolutivos y de selección porque su composición y configuración determinan el perfil de expresión (Wray *et al.*, 2003). La evolución de promotores es crucial para la generación de cambios significativos en el genoma que permiten modificaciones discretas y heredables en el perfil de expresión celular (Arnone y Davidson, 1997).

S. cerevisiae ha sido un modelo de estudio fundamental en el descubrimiento y elucidación de mecanismos de regulación transcripcional, incluyendo estructura, secuencias de activación en el promotor, clasificación y regulación de factores de transcripción (Hahn y Young, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1. Genes parálogos *LEU4* y *LEU9*

Los parálogos *LEU4* y *LEU9* surgieron a raíz del evento WGD y son genes parálogos, ya que ambos provienen de uno de los dos ancestros del híbrido formado a partir de los clados *ZT* y *KLE* (Huerta-Cepas *et al.*, 2013). Estos genes presentan un 82% de identidad en la región correspondiente al ORF, mientras que la identidad entre las secuencias de aminoácidos es de un 82% y de un 97% en cuanto a conservación (Casalone *et al.*, 2000). El producto de estos genes son las isoenzimas α -isopropilmalato sintasas (α -IPMSs) y son las enzimas responsables de la primera reacción de la ruta de biosíntesis de leucina. Este aminoácido es importante para la levadura, ya que además de formar parte de las proteínas sintetizadas en la célula, puede servir como fuente secundaria de nitrógeno, sirve como control positivo de la cascada TORC1 (Kingsbury *et al.*, 2015) y está relacionada con autofagia y esperanza de vida en *Saccharomyces cerevisiae* (Alvers *et al.*, 2009).

La biosíntesis de leucina inicia con la producción de α -isopropilmalato (α -IPM) por las α -IPMSs codificadas por *LEU4* y *LEU9*. Los sustratos para esta primera reacción son α -cetoisovalerato (KIV) y acetil-coenzima A (acetil-CoA) (Kohlhaw, 2003; López *et al.*, 2015) (Figura 2). La reacción de síntesis de α -IPM es la única de toda la ruta de biosíntesis de leucina que se lleva a cabo en la mitocondria. Una vez formado, el α -IPM sale al citoplasma a través del transportador Oac1 (Marobbio *et al.*, 2008; Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012) para convertirse en β -isopropilmalato (β -IPM), α -cetocaproato (KIC) y finalmente en leucina, mediante la actividad catalítica de las enzimas citoplásmicas Leu1, Leu2 y Bat2, respectivamente (Ryan *et al.*, 1973; Kohlhaw, 2003; López *et al.*, 2015). La conversión de KIC a leucina también puede llevarse a cabo en la mitocondria a través de la actividad catalítica de Bat1 (Figura 2).

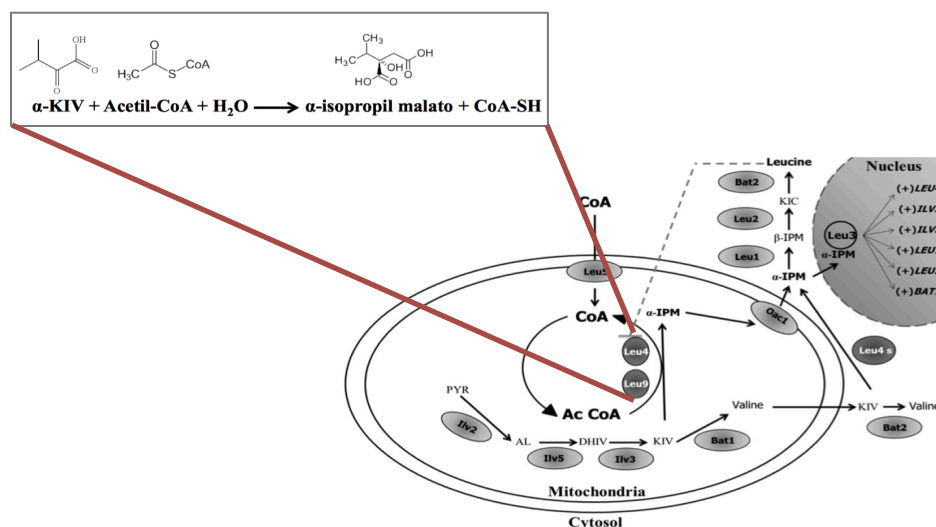


Figura 2. Reacción catalizada por las α -IPMs (Leu4 y Leu9) y representación de la compartimentalización de la ruta biosintética de leucina en *S. cerevisiae*. Las proteínas que participan en la ruta son Leu1 (isopropilmalato isomerasa), Leu2 (β -IPM deshidrogenasa), Ilv2 (acetolactato sintasa), Ilv5 (acetohidroxiácido reductoisomerasa), Ilv3 (dihidroxiácido deshidratasa), Bat1 (aminotransferasa), Bat2 (aminotransferasa), Leu4 (α -IPMS), Leu9 (α -IPMS), Oac1 (transportador de la membrana interna mitocondrial). Los metabolitos PYR (piruvato), AL (acetolactato), DHIV (α , β -dihidroxiálacato), KIV (α -cetoisovalerato), α -IPM (α -isopropilmalato), β -IPM (β -isopropilmalato), KIC (α -cetoisocaproato). *LEU4*, *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2* y *BAT1* son genes cuya expresión está modulada por Leu3 y su coactivador, α -IPM. Leu5 es la proteína de la membrana mitocondrial interna encargada del transporte de coenzima A (CoA) a la matriz mitocondrial. Modificada de López *et al.*, 2015.

Resultados obtenidos por López *et al.* (2015) indican que los genes *LEU4* y *LEU9* no conservaron la misma función que el gen ancestral, ya que la delección de ambos genes provoca una auxotrofia a leucina, mientras que la delección del gen *LEU4* provoca una braditrofia y la de *LEU9* no genera ningún cambio en el crecimiento, sino que es similar al crecimiento de la cepa silvestre *LEU4LEU9* (Figura 3). Esto sugiere que no hay una redundancia de función entre las isoformas Leu4 y Leu9 y que la ausencia de Leu4 provoca un cambio metabólico importante, que compromete el crecimiento de la levadura.

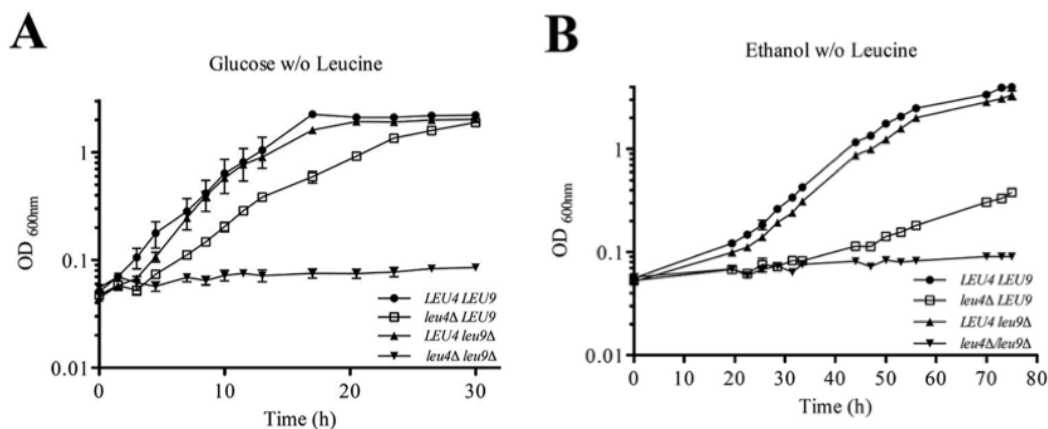


Figura 3. Curvas de crecimiento de *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ* y *leu4Δleu9Δ* en medio mínimo (MM) con (A) 2% de glucosa o (B) 2% de etanol. Los valores presentados son la media de al menos cuatro experimentos \pm la desviación estándar. Tomado de López *et al.*, 2015.

2.2. Las isoenzimas codificadas por *LEU4* y *LEU9* permiten una regulación por retroalimentación.

Las isoenzimas Leu4 y Leu9 no diversificaron en su localización, ya que ambas se encuentran en la mitocondria. Esto permite su interacción y la posibilidad de formar tanto homodímeros (4/4 y 9/9) como heterodímeros (4/9) (López *et al.*, 2015). El homodímero

4/4 predomina sobre el 9/9 tanto en glucosa como en etanol, ya que *LEU9* contribuye únicamente con un 20% del total de la α -IPMS (Boer *et al.*, 2005; López *et al.*, 2015). Debido a que Leu4 y Leu9 no se expresan en cantidades equimolares la formación que se favorece es la del heterodímero, de manera que Leu4 titule en su totalidad a Leu9. Esta preferencia por el heterodímero se relaciona con los niveles de sensibilidad a leucina que presentan Leu4 y Leu9: el homodímero 9/9 presenta una concentración mínima inhibitoria (IC_{50}) a leucina de 1.10 mM, el homodímero 4/4 presenta una IC_{50} de tan solo 0.03 mM y el heterodímero exhibe una IC_{50} de 0.16 mM (López *et al.*, 2015).

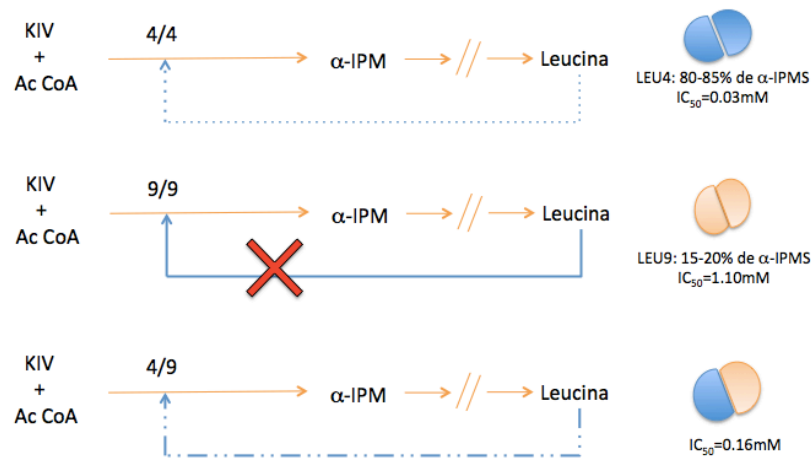


Figura 4. Esquema del funcionamiento del sistema de inhibición por retroalimentación. La presencia del homodímero 4/4 (esquema superior), del homodímero 9/9 (esquema central) o del heterodímero 4/9 (esquema inferior). A la derecha se indican las IC_{50} de cada dímero y las isoenzimas que lo conforman. La línea punteada representa el cambio continuo entre la apertura y la inhibición del sistema por el bajo valor de IC_{50} del homodímero 4/4, la línea sólida representa la apertura constante del sistema debido al valor de IC_{50} del homodímero 9/9 y la línea de guiones y puntos representa el cambio entre la apertura y la inhibición del sistema cuando está presente el heterodímero.

Esto permite un sistema de inhibición por retroalimentación que evita una sobreproducción de α -IPM y leucina (Hinnebusch, 1988; Boer *et al.*, 2005; López *et al.*, 2015), desarrollando a la vez un control sobre el flujo de acetil-CoA (López *et al.*, 2015). En la Figura 4 se muestran tres esquemas indicando el posible funcionamiento de este sistema de inhibición: cuando el homodímero 4/4 es el único dímero presente, el sistema se abre y cierra constantemente debido a la baja cantidad de leucina necesaria para inhibir a Leu4; si el presente es únicamente el homodímero 9/9 la síntesis de leucina se lleva a cabo hasta que se acumule suficiente producto como para inhibir a Leu9, siendo necesario alcanzar concentraciones sumamente elevadas; cuando el heterodímero 4/9 es el que está presente es posible regular el sistema sin acumular intracelularmente un exceso de leucina. Esta hipótesis concuerda con los valores obtenidos en la determinación de concentración de

leucina intracelular de distintas mutantes construidas por López *et al.* y que se muestran en la Figura 5. Estos resultados indican que en una cepa *leu4ΔLEU9* la cantidad de leucina es aproximadamente tres veces mayor a la de las cepas *LEU4leu9Δ* y *LEU4LEU9* que presentan el homodímero 4/4 y el heterodímero 4/9, respectivamente. Es importante mencionar que actualmente se desconocen las condiciones fisiológicas en las que una enzima con IC₅₀ tan alta como Leu9 es necesaria para la célula.

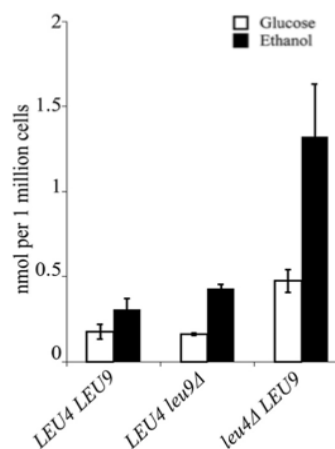


Figura 5. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de extractos celulares en fase exponencial (OD \approx 0.6) crecidos en medio mínimo (MM) suplementado con glucosa o etanol. Los valores corresponden a la media aritmética de tres réplicas. Modificado de López *et al.*, 2015.

2.3. Expresión de los genes parálogos *LEU4* y *LEU9* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los genes *LEU4* y *LEU9*, así como un gran número de genes parálogos, suelen regularse de manera independiente generando así un perfil de expresión distinto para cada gen (Christophides *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2002). Los genes *LEU4* y *LEU9* diversificaron no solo en las características cinéticas de sus enzimas, sino también en su expresión. Resultados de López *et al.* (2015) muestran que en una cepa silvestre *LEU4LEU9* el gen *LEU4* se expresa más que *LEU9*, independientemente de la fuente de carbono disponible, pero es más fuerte en presencia de etanol (Figura 6). El aumento en la expresión de *LEU4* en presencia de etanol permite regular más finamente el uso de acetil-CoA como intermediario de la biosíntesis de leucina sin comprometer al Ciclo de Krebs. Mantener funcional el Ciclo de Krebs es fundamental cuando la fuente de carbono es etanol, ya que este ciclo es la fuente de energía en ausencia de glucosa, mientras que la fermentación, llevada a cabo a través de la glicólisis, es la fuente de energía de la levadura en un medio suplementado con glucosa (Hardwick *et al.*, 1999).

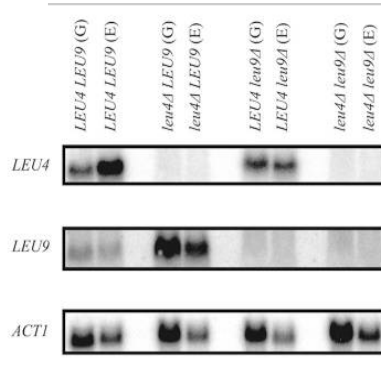


Figura 6. Northern blot de ARN total obtenido de *S. cerevisiae* crecidas en MM con Glucosa (G) o etanol (E) al 2%. Tomado de López *et al.*, 2015.

Al analizar una mutante *leu4ΔLEU9*, capaz de formar solo homodímeros 9/9, se encontró que la expresión del gen *LEU9* se incrementa de forma considerable con respecto a la cepa *LEU4LEU9*. Es decir, la delección de *LEU4* provoca una activación de su parálogo, *LEU9* (Figura 6). Esto indica que Leu4 modula negativamente a *LEU9* y que la regulación transcripcional determina tanto los niveles como la actividad enzimática de Leu4 y Leu9 (López *et al.*, 2015). Sin embargo, los TFs responsables de este aumento de expresión de *LEU9* no han sido identificados.

2.4. Reguladores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos ramificados.

La biosíntesis de aminoácidos ramificados, como la leucina, tiene dos proteínas de regulación clave: Gcn4, que participa en la respuesta general a la escasez de aminoácidos y purinas y Leu3, (Boer *et al.*, 2005; Kohlhaw, 2003; Natarajan *et al.*, 2001) involucrado en la expresión de genes del metabolismo de aminoácidos (Hinnebusch, 1988).

Se sabe que un déficit de aminoácidos provoca una respuesta transcripcional mediante la activación del factor Gcn4 y la red de factores transcripcionales bajo su control capaces de inducir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1985). Esto puede realizarlo de manera directa como sucede con genes como *HIS4*, cuyo producto participa en la síntesis de histidina, o de forma indirecta a genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada al regular a *LEU3* (Boer *et al.*, 2005). Leu3 es un homodímero que se une a secuencias activadoras localizadas en el promotor y reprime su transcripción. Este TF requiere de un coactivador para pasar de estado represor a activador y dicho coactivador es el α -IPM; Leu3 actúa como represor transcripcional a bajas concentraciones de α -IPM y como activador a concentraciones elevadas (Kohlhaw,

2003). Los genes reportados regulados por Leu3 son *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y el parólogo *LEU4* (Kohlhaw, 2003). Se ha reportado que la expresión de *LEU4* en etanol está regulada positivamente por Gcn4 y Leu3- α -IPM (Peters *et al.*, 1990; Natarajan *et al.*, 2001; Boer *et al.*, 2005) pero se desconocen sus papeles como reguladores transcripcionales para el gen *LEU9*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro grupo ha estudiado la diversificación de las isoenzimas codificadas por *LEU4* y *LEU9* desde un punto de vista cinético, determinó que se forman homodímeros y heterodímeros con distintas sensibilidades a leucina y que en ausencia de *LEU4* la expresión de *LEU9* incrementa (López *et al.* 2015). Sin embargo, tanto los reguladores involucrados en este cambio de expresión como los mecanismos por los que se rige la regulación transcripcional permanecen inexplorados y podrían estar involucrados en la diversificación génica, teniendo implicaciones en el uso de los intermediarios del Ciclo de Krebs y, por lo tanto, en los flujos metabólicos celulares.

4. HIPÓTESIS

En ausencia de *LEU4*, tanto en glucosa como en etanol, deben existir mecanismos peculiares mediados por factores transcripcionales específicos, que interactúen con el promotor de *LEU9*, provocando un aumento de expresión de este gen. Como consecuencia de este incremento y de la presencia única del homodímero 9/9, se generarán cambios en los flujos metabólicos que se verán reflejados en modificaciones de la concentración intracelular de leucina que afecten el crecimiento celular.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar los factores transcripcionales involucrados en el aumento de expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4*, así como sus repercusiones en la concentración de leucina en *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la velocidad específica de crecimiento de las cepas silvestres *LEU4LEU9*, *leu4Δ*, *leu9Δ*, *leu4Δleu9Δ*, *leu4Δgcn4Δ*, *leu4Δleu3Δ*, *leu4Δgln3Δ*, *P_{LEU9}LEU4 leu9Δ* y *P_{LEU4}LEU9 leu4Δ*.

Identificar *in silico* secuencias de unión consenso y conservadas de la región 5' de los promotores *LEU4* y *LEU9* mediante alineamiento de secuencias.

Determinar la importancia de los promotores autóctonos en la expresión de *LEU4* y *LEU9* mediante el uso de las quimeras haciendo un cambio recíproco de promotores.

Analizar el efecto de los factores transcripcionales codificados por *GCN4*, *GLN3* y *LEU3* sobre la expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4* mediante análisis tipo Northern Blot en mutantes nulas crecidas con glucosa o etanol como fuente de carbono.

Analizar el efecto de los factores transcripcionales Gcn4, Leu3 y Gln3 mediante la determinación de las pozas de leucina intracelular en las cepas silvestre, *leu4Δ*, *leu9Δ*, *leu4Δgcn4Δ*, *leu4Δleu3Δ*, *leu4Δgln3Δ*, *P_{LEU9}LEU4 leu9Δ* y *P_{LEU4}LEU9 leu4Δ*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta tesis se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas, genotipos y fuentes de cada una de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Cla Wt ura3⁻</i>	<i>MATa LEU4 LEU9 leu2::LEU2 ura3⁻</i>	DeLuna <i>et al.</i> , 2001
<i>Cla leu4Δ::kanMX4 ura3⁻</i>	<i>MATa leu4::kanMX4 LEU9 leu2::LEU2 ura3⁻</i>	López <i>et al.</i> , 2015
<i>Cla leu9Δ::kanMX4</i>	<i>MATa LEU4 leu9::kanMX4 leu2::LEU2 ura3⁻</i>	López <i>et al.</i> , 2015
<i>Cla leu4Δ::URA3 leu9Δ::kanMX4</i>	<i>MATa leu4Δ::URA3 leu9::kanMX4 leu2::LEU2</i>	López <i>et al.</i> , 2015
<i>Cla P_{LEU9}LEU4 leu9Δ</i>	<i>MATa LEU4 leu9::LEU2 ura3⁻ P_{LEU9}LEU4 leu9Δ</i>	Este estudio.
<i>Cla P_{LEU4}LEU9 leu4Δ</i>	<i>MATa LEU9 leu4::kanMX4 ura3⁻P_{LEU4}LEU9 leu4Δ</i>	López <i>et al.</i> , 2015
<i>Cla gcn4Δ::kanMX4</i>	<i>MATa gcn4::kanMX ura3⁻ leu2::LEU2</i>	González <i>et al.</i> , 2017
<i>Cla leu3Δ::kanMX4</i>	<i>MATa leu3::kanMX ura3⁻ leu2::LEU2</i>	González <i>et al.</i> , 2017
<i>Cla gln3Δ::kanMX4</i>	<i>MATa gln3::kanMX ura3⁻ leu2::LEU2</i>	González <i>et al.</i> , 2017
<i>Cla 1-712 ure2Δ</i>	<i>MATa ure2::kanMX4 ura3⁻ leu2::LEU2</i>	González <i>et al.</i> , 2017
<i>Cla leu4Δ::URA3 gcn4Δ::kanMX4</i>	<i>MATa leu4Δ::URA3 gcn4Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio.
<i>Cla leu4Δ::URA3 leu3Δ::kanMX4</i>	<i>MATa leu4Δ::URA3 leu3Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio.
<i>Cla leu4Δ::URA3 gln3Δ::kanMX4</i>	<i>MATa leu4Δ::URA3 gln3Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio.

Todas las cepas isogénicas de *S. cerevisiae* son derivadas de la CLA1-700 (*ura3⁻ leu2::LEU2*) previamente descrita (DeLuna *et al.*, 2001). Las mutantes sencillas *leu4Δ* (CLA1-701), *leu9Δ* (CLA1-702), *gcn4Δ* (CLA1-708), *leu3Δ* (CLA1-709), *gln3Δ* (CLA1-710) y *ure2Δ* (CLA1-712) fueron obtenidas de la cepa CLA1-700 en los trabajos referidos (López *et al.*, 2015; González *et al.*, 2017) en los que se realizó la sustitución completa de las regiones codificantes de cada gen por el módulo de *kanMX4* que confiere

resistencia al antibiótico geneticina. De igual manera, la cepa *leu4Δleu9Δ* se obtuvo del trabajo indicado en la Tabla 1 en el que se sustituyeron las regiones codificantes de los genes *LEU4* y *LEU9* con los módulos de *URA3* y *kanMX4*, respectivamente.

Las dobles mutantes se construyeron a partir de las mutantes sencillas *gcn4Δ*, *leu3Δ* y *gln3Δ* mediante la sustitución de la región codificante de *LEU4* con el módulo de *URA3*. Este módulo se obtuvo por PCR a partir del plásmido pRS416 (Tabla 2, ANEXO 11.2) y los oligonucleótidos que se indican en la Tabla Suplementaria 2 según el método previamente descrito (Longtine *et al.*, 1998). Las transformantes que se seleccionaron fueron aquellas que presentaron crecimiento en placas que contenían medio mínimo (MM) con G418 (200 mg/l, Life Technologies, Inc.) y sin suplementar con uracilo.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente
pRS416	Plásmido mono copia con origen de replicación para la levadura. Cura auxotrofia por uracilo en <i>S. cerevisiae</i> . Contiene el gen de <i>URA3</i> como marcador de selección (ANEXO 11.2).	Colón, M. <i>et al.</i> , 2011

Las quimeras $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ y $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ se construyeron a partir de la doble mutante *leu4Δleu9Δ*. La cepa $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ se obtuvo mediante el procedimiento descrito previamente (López *et al.*, 2015) mientras que la $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ se generó reemplazando el módulo de *kanMX* por la región codificante o marco abierto de lectura (ORF) de *LEU4*. De esta manera se conservan las regiones UTR5' y UTR3' de *LEU9* flanqueando al ORF de *Leu4* (Figura 7). Las transformantes seleccionadas fueron aquellas que presentaban prototrofia a leucina y que crecieron en placas que contenían MM suplementado con uracilo. Los oligonucleótidos utilizados para esta construcción están indicados en la Tabla Suplementaria 3.

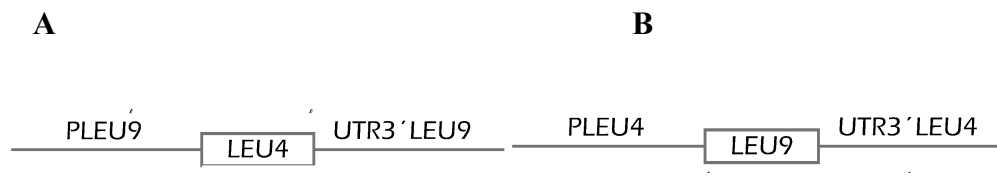


Figura 7. Esquema de las quimeras (A) $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ y (B) $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$.

Las transformaciones se construyeron siguiendo el protocolo de transformación de levadura con acetato de litio (ANEXO 11.3). Las cepas utilizadas se verificaron por PCR; tanto las que se obtuvieron de trabajos previos como las que se construyeron para este trabajo usando los oligonucleótidos indicados en la Tabla Suplementaria 1.

6.2. Condiciones de crecimiento

Las cepas se cultivaron en MM que contenía sales, elementos traza y vitaminas de acuerdo con la fórmula descrita para la base de nitrógeno de levaduras (Difco). Las cepas se crecieron en MM con dos fuentes de carbono, según fuera el caso: glucosa al 2% (p/v) y etanol al 2% (v/v). Los medios se suplementaron con sulfato de amonio (40 mM) como fuente de nitrógeno. Tanto uracilo (20 mg/L) como leucina (100 mg/L), isoleucina (100 mg/L) y valina (300mg/L) se añadieron al medio descrito únicamente cuando fue necesario para el desarrollo de los experimentos. Las células se incubaron a 30°C con agitación (250 rpm) y se realizaron cinéticas de crecimiento tomando mediciones cada dos horas cuando la fuente de carbono era glucosa y cada cuatro cuando era etanol. Se determinó la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) a partir de una regresión lineal de los valores de densidad óptica (OD) a 600nm obtenidos del crecimiento en fase exponencial de la curva de crecimiento. Las ecuaciones utilizadas para el cálculo fueron:

$$t_d = \frac{\log 2}{m} \quad \mu = \frac{\ln 2}{t_d}$$

Donde t_d es tiempo de duplicación, m la pendiente en la fase exponencial de la curva de crecimiento y μ la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} .

6.3. Análisis *in silico* de los promotores de *LEU4* y *LEU9*

Se realizó un análisis *in silico* usando la base de datos Yeabstract para localizar cajas consenso conservadas en los promotores (1000 pb río arriba del codón de inicio de la transcripción, +1 ATG) tanto de *LEU4* (P_{LEU4}) como de *LEU9* (P_{LEU9}). Mediante el programa MEGA 7 se realizó un alineamiento de las regiones relevantes entre las especies *Saccharomyces uvarum*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* y *S. cerevisiae*, todas ellas pertenecientes al clado *sensu stricto*. Las secuencias de cada caja se obtuvieron de Yeabstract (yeabstract.org) utilizando la herramienta “Search for Transcription Factors” y seleccionando únicamente aquellos bajo la clasificación de “Documented Transcription Factors”. En las secuencias alineadas de cada promotor se localizaron los sitios de unión para los TF relacionados con biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y de respuesta transcripcional.

6.4. Análisis de expresión génica por Northern Blot

El análisis de transferencia de Northern y la extracción de ARN total se realizaron mediante el método de Struhl y Davis (1981). Los cultivos se crecieron hasta 0.6 de OD₆₀₀ en MM con glucosa o con etanol como fuente de carbono y con amonio como única fuente de nitrógeno (ver 6.2. Condiciones de Crecimiento). Se extrajo ARN total por el método de fenol:cloroformo cuando los cultivos alcanzaron una OD_{600nm}≈0.6 en ambas condiciones: glucosa-amonio y etanol-amonio. Con los extractos de ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa para poder transferir y fijar el ARN a una membrana de nitrocelulosa.

A partir de ADN genómico de la cepa *LEU4LEU9* se generaron productos de PCR específicos para los genes; *LEU4*, *LEU9*, *DAL5*, *HIS4* y *ACT1*, marcados radioactivamente con α -³²P dCTP con Random Primer Labeling Kit (Agilent Cat # 300385) usando los oligonucleótidos que se describen en la Tabla Suplementaria 4 (ANEXO 11.8). Estos productos radiactivos se utilizaron respectivamente como sondas de hibridación para el ARNm de *LEU4*, *LEU9*, *DAL5*, *HIS4* y *ACT1* (ANEXO 11.9).

6.5. Determinación de pozas de leucina

Los extractos y las muestras utilizadas para la determinación y análisis de pozas de leucina se realizaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente por Quezada *et al.*, 2011. Los cultivos se crecieron en MM con las condiciones previamente descritas (ver sección 6.2. Condiciones de crecimiento) hasta una OD_{600nm} de aproximadamente 0.6. Se tomaron alícuotas de 50mL que se sometieron al protocolo de extracción de metabolitos intracelulares (ANEXO 11.5) para luego ser analizadas por HPLC.

7. RESULTADOS

7.1. El incremento de expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4* está determinado por su promotor.

7.1.1. Efecto de los promotores en glucosa-amonio.

Se crecieron las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ*, *leu4Δleu9Δ*, $P_{LEU9}LEU4leu9Δ$ y $leu4ΔP_{LEU4}LEU9$ tal y como se describió en la sección de Materiales y Métodos usando glucosa al 2% y amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Como ya se había reportado por López *et al.* (2015), la doble mutante *leu4Δleu9Δ* presenta auxotrofia para leucina, mientras que el fenotipo del *LEU4leu9Δ* es equivalente al de la cepa silvestre *LEU4LEU9* (Figura 8A), debido a que las características cinéticas de Leu4 permiten regular el sistema por retroalimentación a pesar de la ausencia de Leu9. Por otro lado, *leu4ΔLEU9* presenta una disminución del crecimiento (Figura 8A), ya que el homodímero 9/9 no puede compensar la falta de Leu4; al ser Leu9 más resistente a leucina, posiblemente el flujo de acetyl-CoA se dirija continuamente a la biosíntesis de leucina, afectando así el crecimiento. Las quimeras $P_{LEU9}LEU4leu9Δ$ y $leu4ΔP_{LEU4}LEU9$ permitieron evaluar el nivel de expresión de estos genes parálogos cuando se intercambian sus promotores.

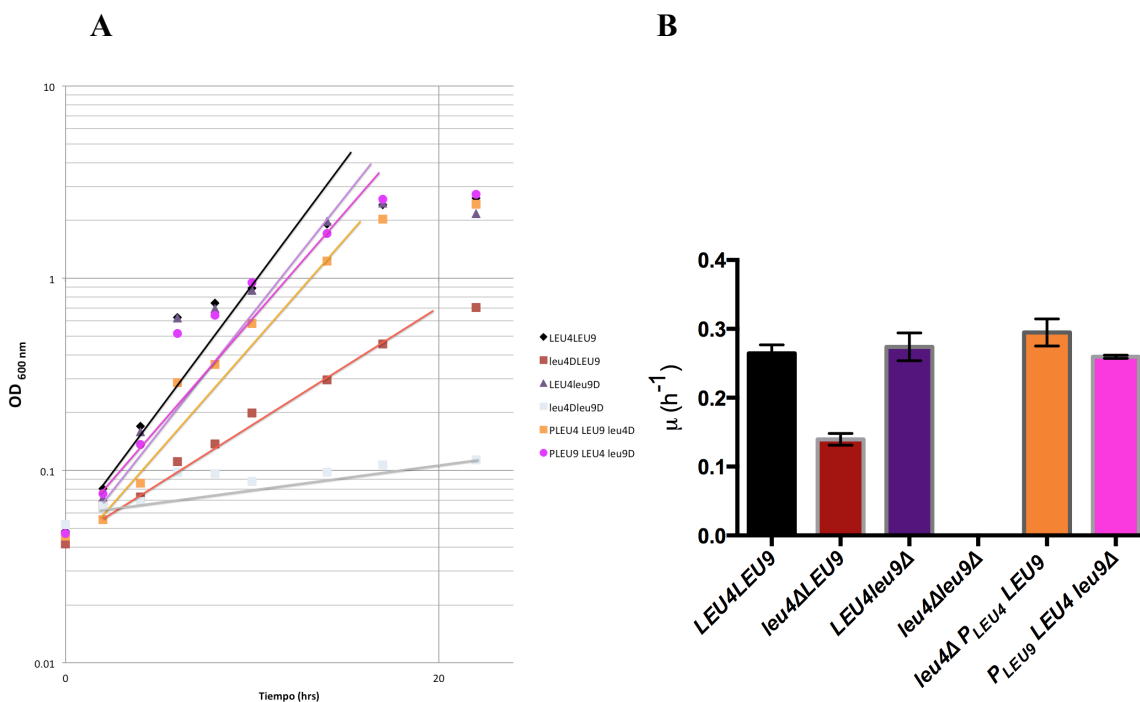


Figura 8. Cinética de crecimiento (A) de quimeras en glucosa. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1})) (B) de cepas de *S. cerevisiae*

(*LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ*, *leu4Δleu9Δ*, *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* y *P_{LEU9}LEU4leu9Δ*) crecidas en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las lecturas se realizaron a una OD₆₀₀. Se muestran los promedios de tres réplicas.

Utilizando glucosa como fuente de carbono, la quimera *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* presenta una velocidad de crecimiento (μ) igual a la de la cepa *LEU4LEU9* (Figura 8B), recuperando así el fenotipo de crecimiento silvestre (Figura 8A). Este comportamiento puede explicarse a partir de las características de los promotores: el incremento de expresión de *LEU9* sucede debido a la regulación a la que está sometida el *P_{LEU9}* y es por esto que, a pesar de que la quimera tenga un fondo genético *leu4Δ*, no hay una sobreproducción de Leu9, ya que el promotor de *LEU4* no responde a las señales metabólicas que determinan la expresión desde el promotor de *LEU9*. La cantidad de enzima no se incrementa en exceso y, por lo tanto, el sistema no alcanza a desestabilizarse como sucede en una cepa *leu4ΔLEU9*, que produce un exceso de leucina. Esto concuerda con los datos obtenidos de concentración intracelular de leucina. En la Figura 9 puede observarse que, a diferencia de las cepas *LEU4LEU9* y *LEU4leu9Δ*, la mutante *leu4ΔLEU9* acumula leucina, tal y como reportaron López *et al.* (Figura 5). La poza de leucina de la quimera *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* es similar a la de la cepa silvestre (Figura 9) y es por esto que el fenotipo de crecimiento no se ve afectado como sucede cuando *LEU9* se sobre expresa (Figura 8A).

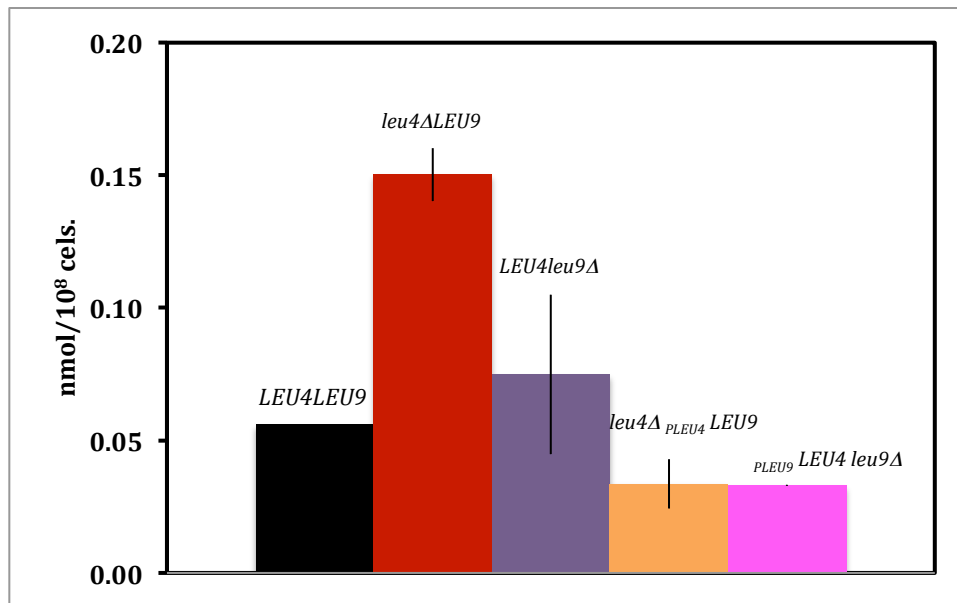


Figura 9. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ*, *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* y *P_{LEU9}LEU4leu9Δ*. Las cepas se crecieron hasta una OD₆₀₀≈0.6 en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se muestra el promedio de tres réplicas.

De manera similar, la quimera $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ presenta un crecimiento similar al de la cepa $LEU4LEU9$ probablemente debido a que el sistema se regula por inhibición como consecuencia de que únicamente se encuentra el homodímero 4/4 presente, tal y como sucede en la cepa $LEU4leu9\Delta$. La poza de leucina de esta quimera es análoga a la de la cepa silvestre (Figura 9), lo que confirma que los intermediarios del Ciclo de Krebs no se están direccionando preferentemente a la producción excesiva de leucina, ya que el sistema está correctamente regulado.

Para evaluar la expresión de ambos genes, así como reforzar la interpretación que los resultados sugieren, se realizó un análisis tipo Northern Blot a partir de ARN extraído de cepas crecidas en glucosa-amonió. Estos experimentos determinan el nivel de expresión génica de cada gen al hibridarlo con sondas marcadas radioactivamente que permiten generar un patrón de bandas. En la Figura 10 (A y B) se muestra el patrón obtenido al hibridar ARN de las cepas $LEU4LEU9$, $leu4\Delta LEU9$, $LEU4leu9\Delta$ y de las dos quimeras. La expresión de $LEU9$ en la quimera $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ aparentemente no se sobre expresa como sucede en una cepa $leu4\Delta LEU9$, sino que presenta un nivel de expresión más parecido al de una cepa silvestre. Esto puede deberse a que no cuenta con su propio promotor y, por lo tanto, no está sujeto a las mismas redes de regulación. De manera similar, la expresión de $LEU4$ en la quimera $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ parece ser prácticamente nula pero aun así permite regular el sistema con una baja cantidad de homodímero 4/4. Es importante mencionar que tanto la cantidad de actina como las bandas obtenidas en algunos carriles para $LEU9$ y $LEU4$ no son homogéneos ni del todo definidos, por lo que repetir el análisis por Northern Blot para obtener bandas más definidas permitiría consolidar la interpretación de la expresión de las quimeras.

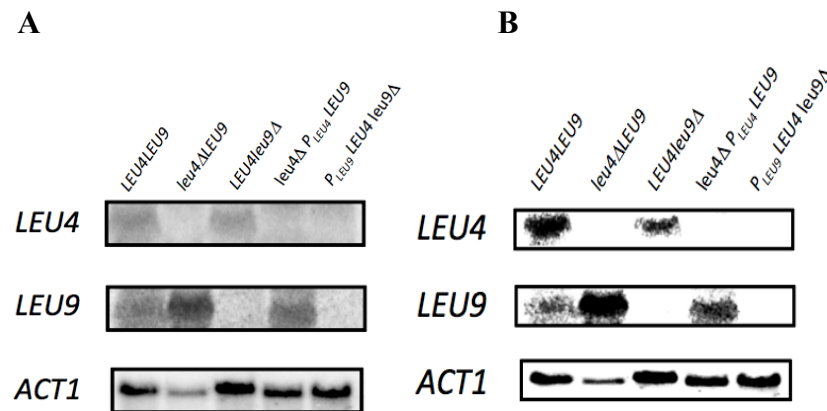


Figura 10. Análisis mediante Northern blot de muestras de ARN total de las cepas de *S. cerevisiae* $LEU4LEU9$, $leu4\Delta LEU9$, $LEU4leu9\Delta$, $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ y $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$. Las cepas se crecieron hasta una $OD_{600} \approx 0.6$ en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las membranas fueron sondeadas con los productos de PCR de los genes $LEU4$ y $LEU9$ descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen $ACT1$ de 1500 pb como control de carga. La imagen obtenida a partir del revelado de la membrana usando el equipo Typhoon se muestra en (A), mientras que en (B) se muestra la

misma imagen después de usar Photoshop 2018 para normalizar la intensidad de iluminación y eliminar el ruido de fondo, buscando hacer más evidentes las bandas obtenidas.

7.1.2. Efecto de los promotores en etanol-amonio.

Para determinar si los promotores definen la regulación de *LEU4* y *LEU9* cuando etanol es la fuente de carbono, las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ*, *leu4Δleu9Δ*, *P_{LEU9}LEU4leu9Δ* y *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* se crecieron tal y como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Al igual que sucede cuando la fuente de carbono es glucosa, la doble mutante *leu4Δleu9Δ* presenta auxotrofia en etanol, mientras que el fenotipo de crecimiento de la cepa *LEU4leu9Δ* es similar al de la cepa silvestre *LEU4LEU9*, debido a la presencia del homodímero 4/4 que es sensible a inhibición por leucina (Figura 11A). Con respecto al fenotipo de crecimiento que se presenta en glucosa, la cepa *leu4ΔLEU9* tiene una disminución mucho más evidente en su crecimiento comparado con el de la cepa *LEU4LEU9* en etanol, ya que el proceso de obtención de energía se modifica. En presencia de etanol como única fuente de carbono la glucólisis disminuye y la única fuente de energía para la célula es el Ciclo de Krebs (Hardwick *et al.*, 1999; Merico *et al.*, 2007). Si este ciclo se interrumpe, como proponemos que sucede en un fondo *leu4Δ*, las consecuencias metabólicas se acentúan porque es probable que la concentración de moléculas de acetil-CoA se alteran.

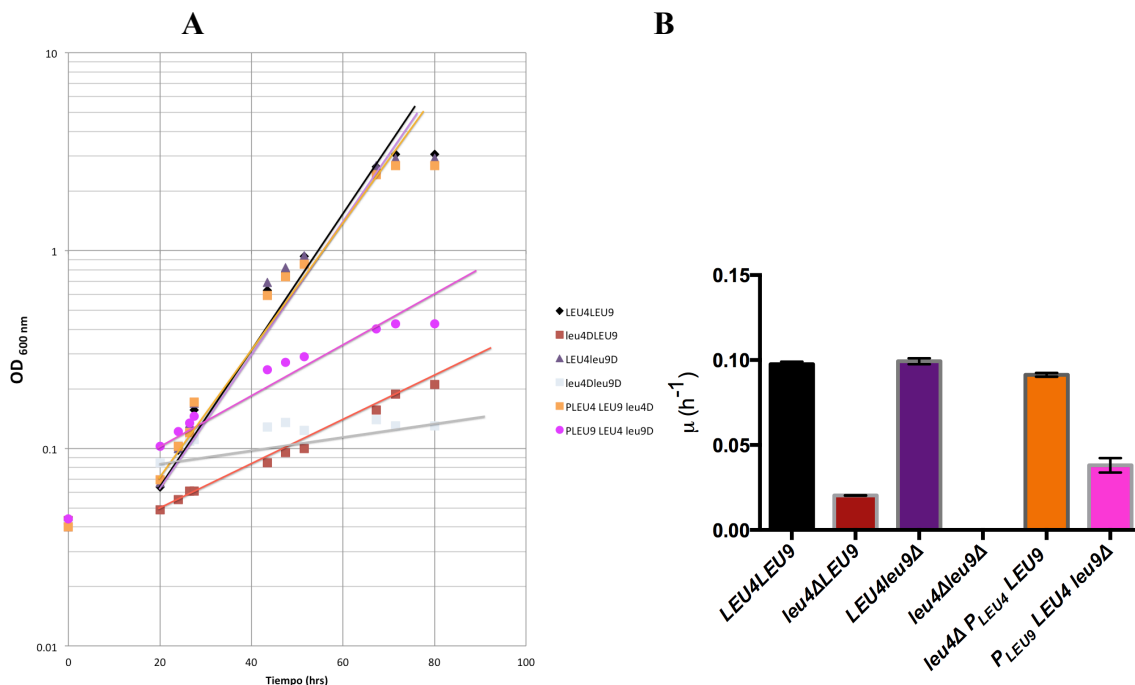


Figura 11. Cinética de crecimiento (A) de quimeras en etanol. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1}))(B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9*, *leu4 Δ LEU9*, *LEU4leu9 Δ* , *leu4 Δ leu9 Δ* , *leu4 Δ P_{LEU4}LEU9* y *P_{LEU9}LEU4leu9 Δ*) crecidas en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las lecturas se realizaron a una OD₆₀₀. Se muestran los promedios de tres réplicas.

La quimera *leu4 Δ P_{LEU4}LEU9* presenta una $\mu_{leu4\Delta P_{LEU4}LEU9} = 0.091h^{-1}$ que le permite restablecer el crecimiento a uno similar al de la cepa *LEU4LEU9* ($\mu_{LEU4LEU9} = 0.097h^{-1}$) (Figura 11B). Nuevamente puede explicarse este comportamiento a partir de la regulación única de cada promotor a partir de un equilibrio entre la sensibilidad a leucina y la cantidad de enzima que se sintetiza. Contrario a lo que sucede con *leu4 Δ P_{LEU4}LEU9*, la quimera *P_{LEU9}LEU4leu9 Δ* presenta una $\mu_{P_{LEU9}LEU4leu9\Delta} = 0.038h^{-1}$ considerablemente menor a la de una cepa *LEU4LEU9*. Este fenotipo de crecimiento puede deberse a que Leu4 se encuentre en menor cantidad cuando está en etanol y sometido a la regulación del promotor de *LEU9*, es decir, que *LEU4* se exprese en una cantidad mucho menor a la basal, siendo esta expresión insuficiente para satisfacer las necesidades de leucina de la célula, comprometiendo así el crecimiento (Figura 11A). De ser así, el crecimiento debería componerse al añadir leucina al medio, por lo que se procedió a realizar una cinética de crecimiento en MM suplementado con etanol, amonio y leucina para corroborar esta interpretación de los datos. En la Figura 12 se muestran tanto la cinética de crecimiento como las velocidades específicas de crecimiento para las cepas *LEU4LEU9* y *P_{LEU9}LEU4leu9 Δ* con y sin leucina. A partir de estos resultados puede concluirse que la disminución en la velocidad de crecimiento de la cepa *P_{LEU9}LEU4leu9 Δ* se debe a un déficit de leucina, ya que el crecimiento se restablece cuando el medio está suplementado con leucina (Figura 12).

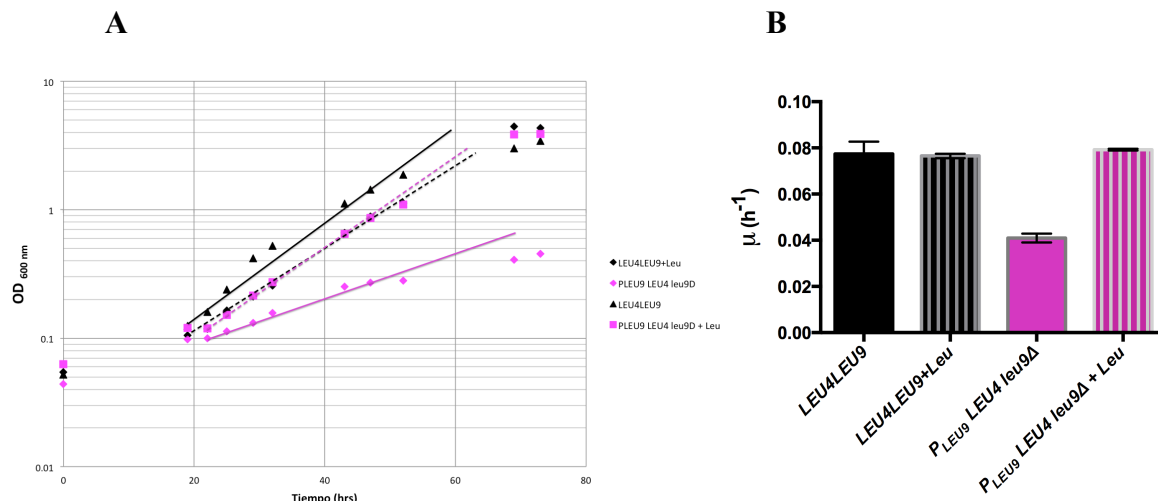


Figura 12. Cinética de crecimiento (A) de quimera suplementada con leucina *P_{LEU9}LEU4 leu9 Δ* . Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1}))(B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9* y *P_{LEU9}LEU4 leu9 Δ*) crecidas en MM con etanol al 2% y

amonio (líneas y barras sólidas) y en MM con etanol al 2%, amonio y leucina (líneas y barras rayadas). Las lecturas se realizaron a una OD_{600} . Se muestran los promedios de dos réplicas.

La interpretación de los datos de las curvas de crecimiento en MM con etanol (Figura 11) y en MM con etanol suplementado con leucina (Figura 12) se refuerzan con los datos obtenidos de la determinación de leucina intracelular que se muestran en la Figura 13: la poza de leucina de la quimera $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ es alta, pudiendo inhibir al homodímero 9/9 y evitando así un desajuste metabólico que impida el crecimiento. En cambio, tomando en cuenta la desviación estándar, la poza de leucina de la quimera $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ es más baja y parece no haber suficiente leucina como para cumplir con los requerimientos de la célula. Es por esto que al suplementar el medio con leucina el fenotipo de $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$ se restablece a un fenotipo de crecimiento tipo silvestre (Figura 12).

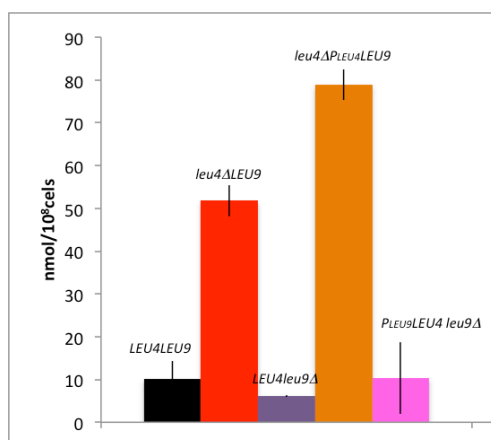


Figura 13. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas $LEU4LEU9$, $leu4\Delta LEU9$, $LEU4leu9\Delta$, $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ y $P_{LEU9}LEU4leu9\Delta$. Las cepas se crecieron hasta una $OD_{600} \approx 0.6$ en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se muestra el promedio de tres réplicas.

Para evaluar la expresión se realizó un análisis tipo Northern Blot a partir de ARN extraído de cepas crecidas en etanol-amonio. En la Figura 14 (A y B) se muestra el patrón obtenido al hibridar ARN de las cepas $LEU4LEU9$, $leu4\Delta LEU9$, $LEU4leu9\Delta$ y de las dos quimeras. A partir de estos resultados se puede inferir que la expresión de $LEU9$ en la quimera $leu4\Delta P_{LEU4}LEU9$ incrementa comparado con la expresión en una cepa silvestre, debido a que el P_{LEU4} se expresa más en etanol. En cambio, la expresión de $LEU9$ en la quimera $P_{LEU9}LEU4 leu9\Delta$ es tan baja que la cantidad de leucina que logra sintetizar el homodímero 4/4 presente no es suficiente. Sin embargo, la cantidad de actina presente en cada carril varía, por lo que, con el fin de robustecer la interpretación realizada se realizó un análisis por densitometría de las bandas obtenidas. A pesar de que los valores que se muestran en la Figura 14 indican una diferencia de expresión entre $LEU4$ y $LEU9$ (1 y 0.5,

respectivamente) es necesario repetir en análisis por Northern Blot, ya que de acuerdo a resultados obtenidos previamente en laboratorio se sabe que la diferencia del nivel de expresión entre estos genes es mayor que la obtenida en este análisis.

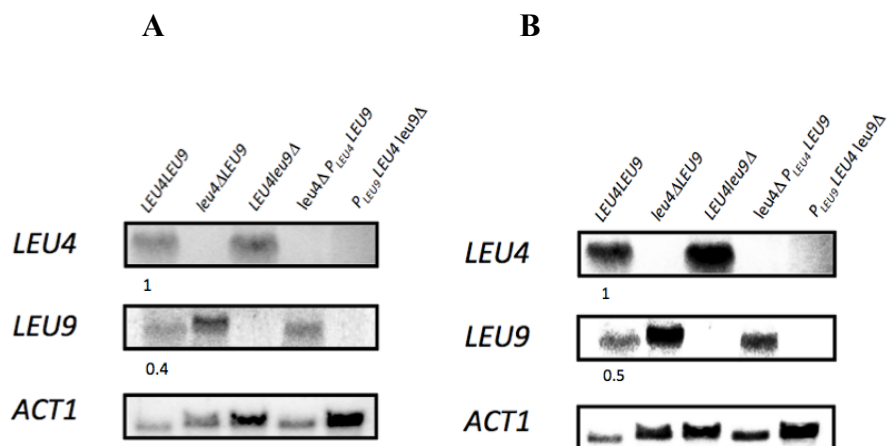


Figura 14. Análisis mediante Northern blot de muestras de ARN total de las cepas de *S. cerevisiae* *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ*, *leu4ΔP_{LEU4}LEU9* y *P_{LEU9}LEU4leu9Δ*. Las cepas se crecieron hasta una $OD_{600} \approx 0.6$ en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las membranas fueron sondeadas con los productos de PCR de los genes *LEU4* y *LEU9* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. La imagen obtenida a partir del revelado de la membrana usando el equipo Typhoon se muestra en (A), mientras que en (B) se muestra la misma imagen después de usar Photoshop 2018 para normalizar la intensidad de iluminación y eliminar el ruido de fondo, buscando hacer más evidentes las bandas obtenidas. Los valores numéricos indican la expresión del gen calculada a partir del análisis por densitometría de las bandas.

7.2. Cajas consenso conservadas en los promotores de *LEU4* y *LEU9*

Utilizando la base de datos Yeastract se buscaron las secuencias documentadas para los TFs Gcn4, Leu3, Gln3, Mcm1, Hap2, Mot3, Cst6, Abf1, Msn2, Msn4, Adr1 y Sip4 que se muestran en la Tabla 3. Las funciones reportadas para cada uno de estos TFs se encuentran en la misma tabla.

Tabla 3. Función de los factores transcripcionales con sitios de unión en los promotores de *LEU4* y *LEU9*.

Factor Transcripcional	Función reportada
Gcn4	Regulador maestro. Activador de genes involucrados en biosíntesis de aminoácidos.
Leu3	Regulador de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos

ramificados y del gen <i>GDH1</i> .	
Gln3	Regulador de genes involucrados con fuentes secundarias de nitrógeno.
Mcm1	Formación de complejos activadores y represores de transcripción.
Hap2	Activador transcripcional y regulador global de la expresión de genes relacionados con la respiración.
Mot3	Represor de genes relacionados con hipoxia.
Cst6	Relacionado con el uso de fuentes de carbono secundarias.
Abf1	Activador transcripcional, silenciador de genes y reorganización de la cromatina.
Msn2	Activador transcripcional en condiciones de estrés.
Msn4	Activador transcripcional en condiciones de estrés.
Adr1	Factor transcripcional necesario para el uso de etanol como fuente de carbono.
Sip4	Regulador transcripcional positivo de la gluconeogénesis.

Las secuencias consenso se buscaron en las secuencias alineadas de los promotores de cuatro especies *sensu stricto* con *Saccharomyces cerevisiae* (ver Materiales y Métodos, sección 6.3). La figura 15 muestra un esquema de la posición de cada una de estas cajas.

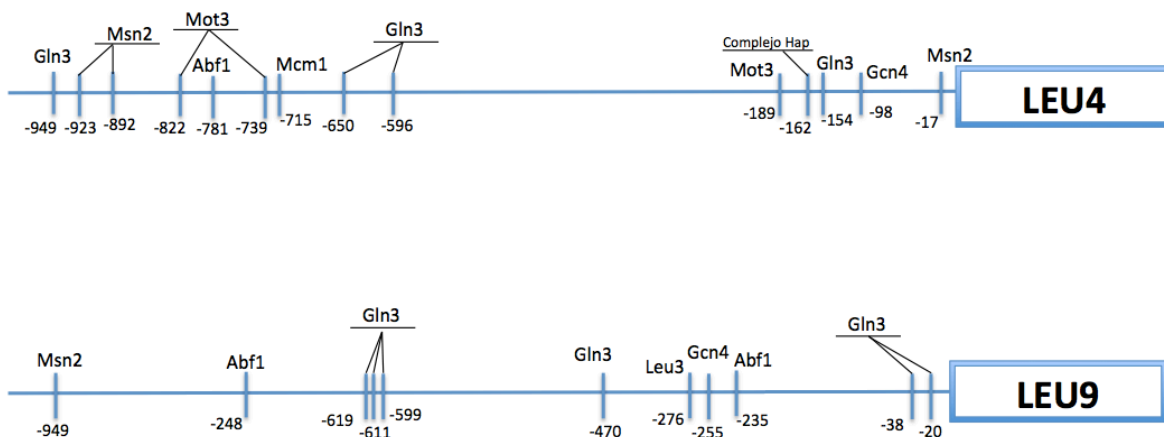


Figura 15. Diagrama con los sitios de unión localizados para los factores transcripcionales Gcn4, Leu3 y Gln3 en los promotores *LEU4* (superior) y *LEU9* (inferior) de *S. cerevisiae*. El análisis *in silico* se realizó usando secuencias documentadas en Yeasttract para cada factor transcripcional.

En el P_{LEU4} se localizaron cajas conservadas para Gln3 en las posiciones -949, -650, -596 y -154 río arriba del codón de inicio de *S. cerevisiae*. Para Gcn4 se identificó una única caja consenso en la posición -98 del P_{LEU4} . Por otro lado, en el P_{LEU9} se identificaron cajas de

unión tanto para Gln3 y Gcn4 como para Leu3. En las posiciones -619, -611, -599, -470, -38 y -20 se localizaron las cajas para Gln3 y en las posiciones -276 y -255 las cajas para Leu3 y Gcn4 respectivamente.

Como ya se mencionó anteriormente, Gcn4 induce a los genes involucrados en las rutas de biosíntesis de aminoácidos, tal y como se ha demostrado para genes de la ruta de biosíntesis de leucina, lisina, histidina, entre otros (Hinnebusch, 1988; Natarajan *et al.*, 2001; Boer *et al.*, 2005). Los genes regulados directamente por Gcn4 deben tener una o más secuencias activadoras; mientras más cercana esté la secuencia activadora del sitio de inicio, más dependerá el gen de Gcn4 (Natarajan *et al.*, 2001). Con base en esta información y la presencia de cajas consenso para Gcn4 en ambos promotores, se decidió construir la doble mutante *leu4Δgcn4Δ*.

Gln3 es un regulador relacionado con el metabolismo nitrogenado. Se ha reportado que actúa regulado por Gcn4 cuando hay un déficit de glutamina, es decir, cuando no hay fuentes primarias de nitrógeno como el amonio (Natarajan *et al.*, 2001). Gln3 activa genes requeridos para la asimilación de fuentes de nitrógeno secundarias (Hinnebusch, 1988; Natarajan *et al.*, 2001), entre las que se encuentran moléculas como ácido γ -aminobutírico (GABA), prolina y leucina. Considerando además el alto número de sitios de unión para Gln3 en ambos promotores se procedió a construir la mutante *leu4Δgln3Δ*.

Las dobles mutantes *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* se construyeron según lo descrito en Materiales y Métodos. Una vez confirmadas las construcciones por PCR se caracterizaron fisiológicamente para posteriormente determinar las pozas de leucina y analizar sus perfiles de expresión ante glucosa y etanol como fuentes de carbono.

7.3. Gln3 incrementa la expresión de *LEU9* en un fondo *leu4Δ* en glucosa-amonio

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que en una mutante *leu4ΔLEU9* la expresión de *LEU9* incrementa de tal manera que el aumento en la cantidad de Leu9 provoca una acumulación de leucina intracelular (López *et al.*, 2015. Figuras 5 y 6) que priva a otras rutas de intermediarios del Ciclo de Krebs y disminuye el crecimiento celular (Figura 3). Para determinar si Gcn4 y Gln3 están involucrados en el incremento de expresión de *LEU9* se caracterizaron fisiológicamente las dobles mutantes *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* en MM con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La Figura 16 muestra la curva de crecimiento y los valores de μ de las cepas control (*LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *gcn4Δ* y *gln3Δ*) y de las cepas *leu4Δgln3Δ* y *leu4Δgcn4Δ*. La velocidad de crecimiento de las mutantes sencillas *gcn4Δ* y *gln3Δ* disminuye con respecto a la de la cepa *LEU4LEU9*. Gcn4 es un TF maestro que tiene bajo

su control más de 1000 genes de biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis de vitaminas, de elementos peroxisomales, autofagia, etc (Natarajan *et al.*, 2001), por lo que su delección afecta múltiples rutas metabólicas, disminuyendo así el crecimiento. De manera similar, la ausencia del regulador Gln3 disminuye el crecimiento, probablemente debido a que distintas rutas metabólicas de nitrógeno se ven afectadas. Por otro lado, los resultados obtenidos de velocidad de crecimiento de la doble mutante *leu4Δgcn4Δ* indican que la ausencia de *GCN4* en un fondo *leu4Δ* no revierte el fenotipo de crecimiento al de una cepa silvestre, ya que la velocidad de crecimiento de *leu4Δgcn4Δ* ($\mu_{leu4\Delta gcn4\Delta} = 0.061h^{-1}$) es ostensiblemente menor que el de la cepa *LEU4LEU9* ($\mu_{LEU4LEU9} = 0.32h^{-1}$) (Figura 16). A partir de esto puede inferirse que Gcn4 no es el TF responsable del aumento de expresión de *LEU9*, ya que su ausencia no impide la sobre expresión de *LEU9* y sus consecuencias metabólicas. Esta interpretación de los datos se corrobora al cuantificar la poza de leucina en una cepa *leu4Δgcn4Δ* (Figura 17). La cantidad de leucina intracelular de la cepa *leu4Δgcn4Δ* es similar al de una cepa *leu4ΔLEU9*; aproximadamente tres veces mayor al de la poza de leucina en una cepa silvestre. Es importante notar que la velocidad de crecimiento de la doble mutante *leu4Δgcn4Δ* es aún menor a la una cepa *leu4ΔLEU9*. Esta diferencia se explica debido no solo a que en esta doble mutante está presente únicamente el homodímero 9/9, sino también a la ausencia del regulador maestro Gcn4; la ausencia de este TF afecta no solo a las rutas de biosíntesis de aminoácidos, sino también la expresión de otros genes relacionados con síntesis de vitaminas, transporte mitocondrial, proliferación de peroxisomas, autofagia, entre otros (Natarajan *et al.*, 2001).

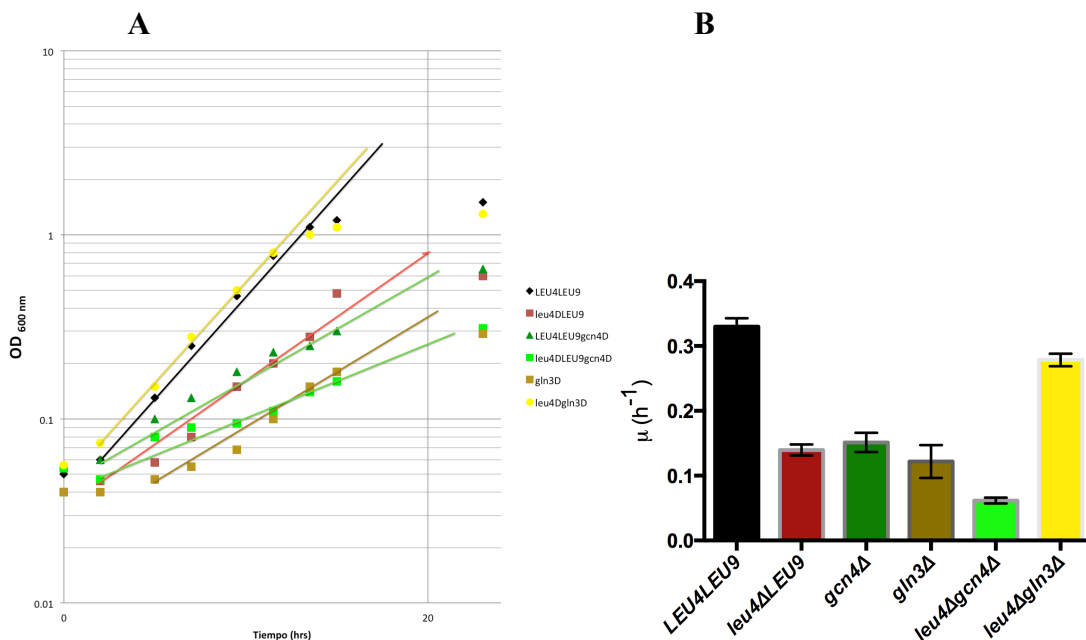


Figura 16. Cinética de crecimiento (A) de dobles mutantes en glucosa. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1}))(B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9*, *leu4 Δ LEU9*, *gcn4 Δ* , *gln3 Δ* , *leu4 Δ gcn4 Δ* y *leu4 Δ gln3 Δ*) crecidas en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las lecturas se realizaron a una OD_{600} . Se muestran los promedios de tres réplicas.

Contrario a lo que sucede con la cepa *leu4 Δ gcn4 Δ* , en ausencia de *GLN3* se restablece el crecimiento de la cepa *leu4 Δ gln3 Δ* (Figura 16). Los resultados mostrados en la Figura 16B sugieren que el TF Gln3 está involucrado en la expresión del gen *LEU9*, ya que el valor de μ de la cepa *leu4 Δ gln3 Δ* ($\mu_{leu4\Delta gln3\Delta} = 0.27\text{h}^{-1}$) es similar al de la cepa silvestre y no al de la mutante *leu4 Δ LEU9* ($\mu_{leu4\Delta LEU9} = 0.17\text{h}^{-1}$). Aunado a esto, en una cepa *leu4 Δ LEU9* hay un incremento notorio en la poza de leucina (Figura 17), probablemente debido a que Gln3 exagera la expresión de *LEU9* y genera grandes cantidades del homodímero 9/9. Esta hipótesis se apoya en los resultados obtenidos de la determinación de leucina que se muestran en la Figura 17, donde se pudo observar que la delección de *GLN3* en un fondo *leu4 Δ* no se acumula leucina como en una *leu4 Δ LEU9*; esto ocurre debido a que en ausencia de Gln3 no se sobre expresa *LEU9* y no se ve afectado el crecimiento de la célula.

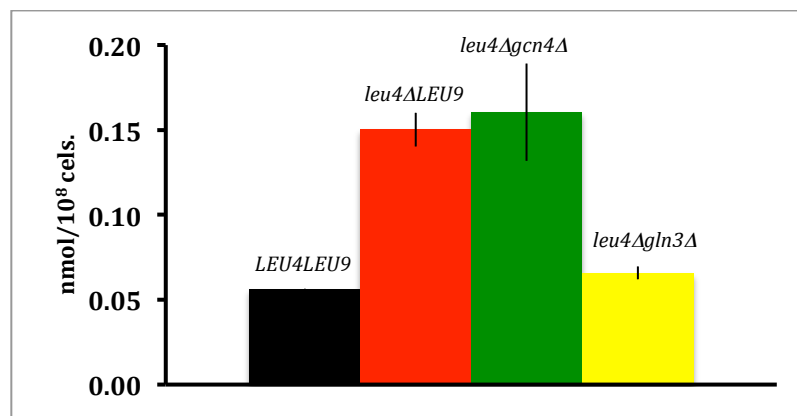


Figura 17. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas *LEU4LEU9*, *leu4 Δ LEU9*, *leu4 Δ gcn4 Δ* y *leu4 Δ gln3 Δ* . Las cepas se crecieron hasta una $\text{OD}_{600} \approx 0.6$ en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se muestra el promedio de tres réplicas.

En una cepa que cuenta únicamente con la isoenzima Leu9 se produce una gran cantidad de leucina que podría ser detectada como fuente secundaria de nitrógeno intracelular y provocar la disociación del complejo Ure2-Gln3, para permitir la entrada de Gln3 al núcleo y activar a *LEU9* (Figura 10A), provocando un desbalance metabólico que afecta al crecimiento celular, tal y como se observa en una cepa *leu4 Δ LEU9* (Figuras 3A, 8A y

11A). Con base en esto, y tal y como sucede en la cepa *leu4Δgln3Δ*, la ausencia del factor Gln3 en el núcleo impide la activación de *LEU9* (Figura 10B), permitiendo así un crecimiento similar al de *LEU4LEU9* mediante la producción de leucina como consecuencia de la expresión basal del gen *LEU9*.

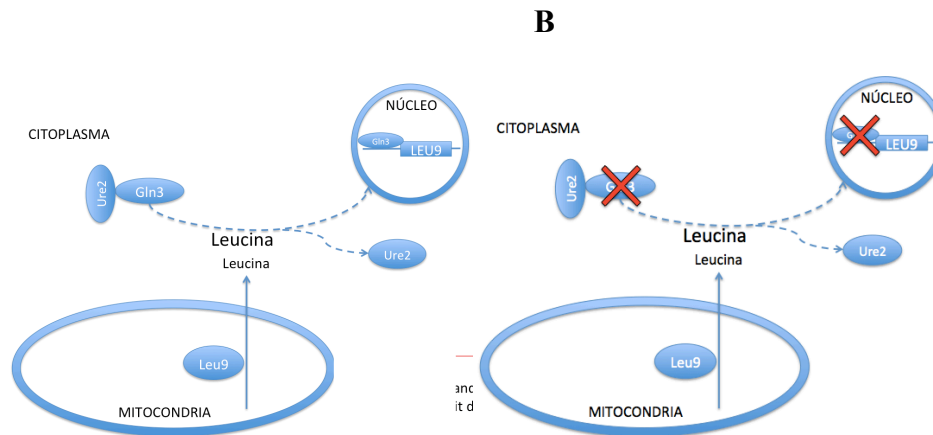


Figura 18. Esquema del posible mecanismo de activación de *LEU9* en una cepa *leu4ΔLEU9* (A) y del posible efecto de la delección de los genes *LEU4* y *GLN3* en la expresión de *LEU9* (B). Los factores que participan son Ure2 y Gln3 que actúan disociándose en respuesta a la acumulación de leucina como fuente secundaria de nitrógeno. Al entrar al núcleo activa los genes que están bajo su control transcripcional.

Para confirmar esta hipótesis se realizó un Northern Blot de ARN total utilizando la cepa *ure2Δ*, ya que en ausencia de Ure2, Gln3 entraría al núcleo para incrementar la expresión de *LEU9* (Figura 18A). El ARN se hibridó con las sondas de *LEU4* y *LEU9*, mientras que *DAL5* y *HIS4* se utilizaron como controles positivos y negativos respectivamente, ya que el primero es un gen catabólico que se activa con la entrada de Gln3 al núcleo (Puria y Cárdenas, 2008) y el segundo es un gen biosintético regulado por Gcn4 y que se activa ante un déficit de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001; Hinnebusch, 2005).

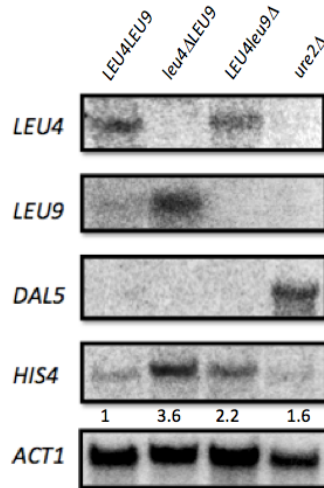


Figura 19. Análisis mediante Northern blot de muestras de ARN total de las cepas de *S. cerevisiae* *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ* y *ure2Δ*. Las cepas se crecieron hasta una $OD \approx 0.6$ en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. La membrana fue sondeada con los productos de PCR de los genes *LEU4*, *LEU9*, *DAL5* y *HIS4* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. Los valores numéricos indican la expresión del gen calculada a partir del análisis por densitometría de las bandas.

La Figura 19 muestra el análisis mediante Northern Blot. Para corroborar la hipótesis debería apreciarse una banda en el carril de *ure2Δ* al hibridar con la sonda de *LEU9*; sin embargo, la ausencia de dicha banda en los resultados obtenidos sugieren que Gln3 no es el activador directo de *LEU9*. A pesar de esto, es probable que Gln3 sea un activador de tipo indirecto.

7.4. La ausencia de *LEU4* provoca un déficit de valina en glucosa-amonio

El gen de *GCN4* se transcribe principalmente cuando se presenta un déficit de aminoácidos (Natarajan *et al.*, 2001; Hinnebusch, 2005). *HIS4* es un gen involucrado en la síntesis de histidina y es uno de los genes activados por el TF Gcn4. Es por esto que *HIS4* suele usarse como control positivo para corroborar la transcripción de Gcn4 y, por lo tanto, la falta de algunos aminoácidos. A partir de los resultados presentados en la Figura 19 se infiere que en una cepa *leu4ΔLEU9* hay una deprivación de aminoácidos, que estimularía la traducción del ARN mensajero de *GCN4*. Esto explica el aumento de expresión de *HIS4* con respecto a las cepas *LEU4LEU9* y *LEU4leu9Δ*. La diferencia de expresión se cuantificó mediante un análisis por densitometría en el que el valor de expresión de *HIS4* con respecto a la *LEU4LEU9* aumenta en la mutante sencilla *leu4ΔLEU9* de 1 a 3.6, mientras que en la cepa *LEU4leu9Δ* disminuye a 2.2 (Figura 19). Al hacer un análisis de las rutas metabólicas relacionadas con la biosíntesis de leucina (Figura 20) se puede proponer que en un fondo

leu4Δ el aminoácido generador de este déficit es valina, ya que para su síntesis es necesario contar con KIV como sustrato, el cual se utiliza principalmente para la producción de leucina.

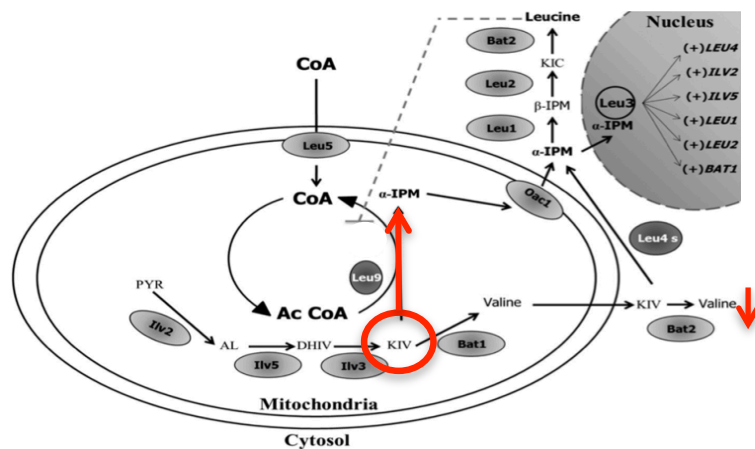


Figura 20. Esquema de la ruta de biosíntesis de leucina en una cepa *leu4ΔLEU9*. Con un círculo rojo se indica el sustrato común entre la ruta de biosíntesis de leucina y la de valina. El uso de KIV por Leu9 provoca un incremento de α -IPM (flecha roja grande) que genera como consecuencia una disminución en la biosíntesis de valina (flecha roja pequeña). Figura modificada de López *et al.*, 2015.

Esta propuesta se corroboró al realizar una curva de crecimiento de la cepa *leu4ΔLEU9* en medio suplementado con valina 1x (150 μ g/L) y 2x (300 μ g/L) y con valina e isoleucina (ambas 1x, es decir, 150 μ g/L y 30 μ g/L, respectivamente), siendo este último el tercer aminoácido de cadena ramificada además de leucina y valina. Como control se utilizaron las cepas *LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21, donde se observa que la cepa *leu4ΔLEU9* presenta una braditrofia a valina que no permite un restablecimiento total del crecimiento. Esto puede deberse a que la cantidad de leucina acumulada aún no es suficiente para inhibir el sistema por retroalimentación; para recuperar el fenotipo silvestre es necesaria la presencia de valina y además inhibir al sistema al acumular más leucina.

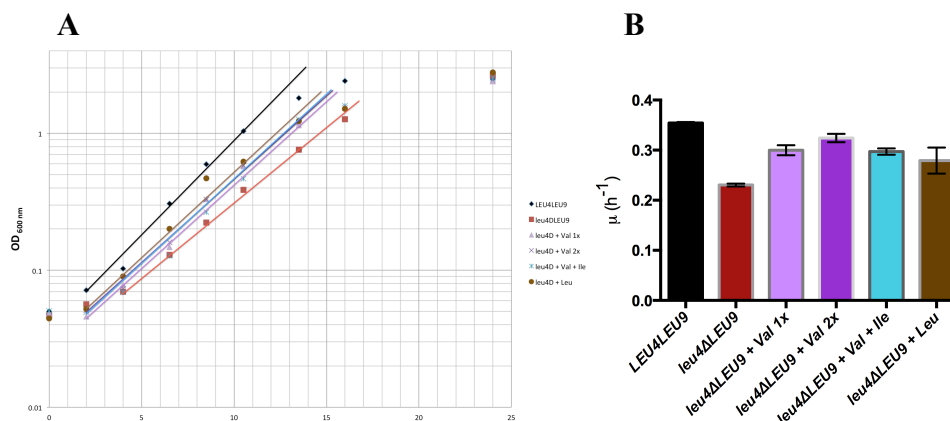


Figura 21. Cinética de crecimiento (A) de *leu4ΔLEU9* suplementada con valina. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h⁻¹)) (B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9*) crecidas en MM con glucosa al 2%, amonio (negro y rojo). Se suplementó con Val 1x (lila), Val 2x (morado), Val+Ile (azul) y Leu (café). Las lecturas se realizaron a una OD₆₀₀. Se muestran los promedios de dos réplicas.

7.5. Gcn4 contribuye en menor proporción que Gln3 al incremento de expresión de LEU9 en glucosa-amonio

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con la mutante *leu4Δgln3Δ* y que la ausencia de *LEU4* provoca un déficit de aminoácidos, se decidió analizar la expresión a través de un análisis tipo Northern Blot utilizando las cepas *LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9* como control para las cepas *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ*. Los resultados se muestran en la Figura 22A. Debido a la falta de claridad con la que aprecian algunas de las bandas obtenidas se realizaron ajustes de contraste e iluminación que se muestran en la Figura 22B, aunque para obtener un patrón de bandeo mucho más claro y concluyente, es necesario repetir el análisis de expresión por Northern Blot. Al analizar ambas figuras se puede apreciar que en una cepa *leu4Δgcn4Δ* la expresión de *LEU9* disminuye. Este resultado se opone a lo esperado a partir de la velocidad de crecimiento, ya que la ausencia de Gcn4 no compone el crecimiento de la doble mutante (Figura 16). La activación de Gcn4 puede comprobarse esperando un incremento de expresión al hibridar con la sonda de *HIS4* (Natarajan *et al.*, 2001; Kohlhaw, 2003; Hinnebusch, 2005). En el carril correspondiente a la cepa *leu4Δgcn4Δ* no hay un incremento de expresión de *HIS4*, por lo tanto, parece que cuando la fuente de carbono es glucosa el déficit de aminoácidos no es tan severo. Esto concuerda con el fenotipo de crecimiento de una cepa *leu4ΔLEU9*, donde la disminución de crecimiento no es tan acentuada como en etanol, donde el déficit de aminoácidos probablemente sea más marcado. Por otro lado, puede inferirse a partir de la Figura 22 que la expresión de *LEU9* aumenta cuando el regulador Gln3 está presente, indicando así que Gcn4 y Gln3 podrían interactuar de alguna manera o incluso tener un efecto aditivo para incrementar la expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4*.

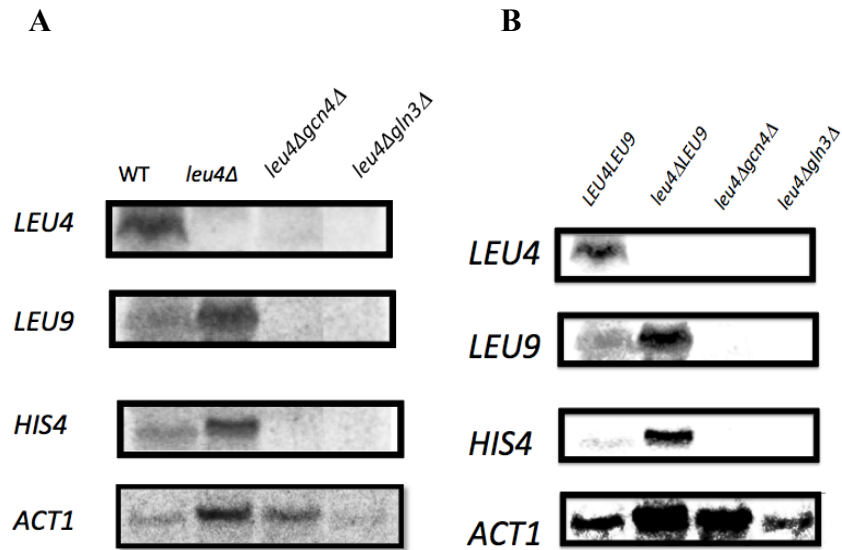


Figura 22. Análisis mediante Northern blot de muestras de ARN total de las cepas de *S. cerevisiae* *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ*. Las cepas se crecieron hasta una $OD \approx 0.6$ en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las membranas fueron sondeadas con los productos de PCR de los genes *LEU4*, *LEU9* y *HIS4* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. La imagen obtenida a partir del revelado de la membrana usando el equipo Typhoon se muestra en (A), mientras que en (B) se muestra la misma imagen después de usar Photoshop 2018 para normalizar la intensidad de iluminación y eliminar el ruido de fondo, buscando hacer más evidentes las bandas obtenidas.

7.6. Gln3 y Gcn4 incrementan la expresión de *LEU9* en un fondo *leu4Δ* en etanol-amonio

Para analizar el papel que juegan Gln3 y Gcn4 en una cepa *leu4ΔLEU9* se crecieron las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* (ver Materiales y Métodos). Todos los medios fueron suplementados con uracilo a excepción de las dobles mutantes que no tienen un fondo genético *ure3⁻*. En la Figura 23 se aprecia que cuando la fuente de carbono es etanol el fenotipo de crecimiento de las cepas *LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9* varía notablemente, pasando de una $\mu_{LEU4LEU9} = 0.08h^{-1}$ a $\mu_{leu4\Delta LEU9} = 0.012h^{-1}$. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por López *et al.* (2015) (Figura 3).

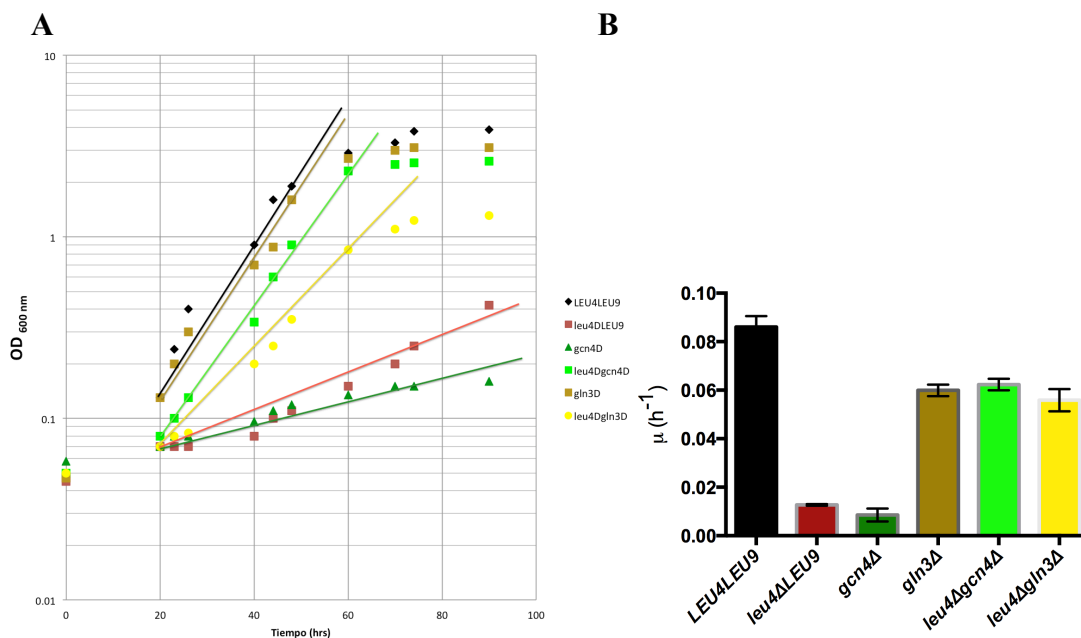


Figura 23. Cinética de crecimiento (A) de dobles mutantes en etanol. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1})) (B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ*) crecidas en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Las lecturas se realizaron a una OD₆₀₀. Se muestran los promedios de tres réplicas.

La cepa *gln3Δ* crece mejor que la cepa *leu4Δgln3Δ* pero sin llegar a tener un crecimiento tipo silvestre. Sin embargo, bajo estas condiciones, podemos observar que si bien la ausencia de *GLN3* no disminuye drásticamente el crecimiento, su ausencia en un fondo *leu4Δ* sí repercute en el fenotipo. El crecimiento de la doble mutante *leu4Δgln3Δ* es similar al de la cepa silvestre, con diferencias en las velocidades de crecimiento de únicamente 0.02h^{-1} ($\mu_{LEU4LEU9} = 0.08\text{h}^{-1}$ y $\mu_{leu4\Delta gln3\Delta} = 0.06\text{h}^{-1}$). Por otro lado, el valor de velocidad de crecimiento de la cepa *gcn4Δ* disminuye con respecto al de la cepa *LEU4LEU9*, ya que al ser un regulador maestro es posible que el número de rutas metabólicas afectadas en su ausencia impidan el crecimiento celular (Figura 23B). Contrario a lo que se observa en glucosa, la cepa *leu4Δgcn4Δ* tiene un valor de μ de 0.06h^{-1} que se acerca más al valor de 0.08h^{-1} de *LEU4LEU9* (Figura 23B). Estos datos indican que tanto *Gcn4* como *Gln3* tienen algún efecto activador sobre *LEU9* ya que, en su ausencia, una cepa *leu4ΔLEU9* recupera un fenotipo de crecimiento tipo *LEU4LEU9*. Estos resultados concuerdan con las pozas de leucina determinadas que se muestran en la Figura 24: la cantidad de leucina intracelular en las cepas *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* es similar a la de la cepa *LEU4LEU9*, mientras que la mutante *leu4ΔLEU9* acumula aproximadamente tres veces más leucina que la cepa silvestre.

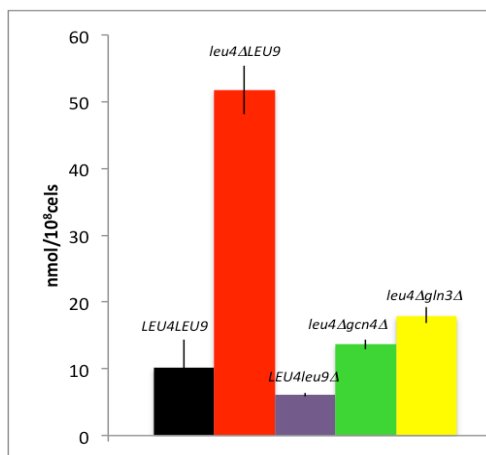


Figura 24. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ*. Las cepas se crecieron hasta una $OD_{600} \approx 0.6$ en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se muestra el promedio de tres réplicas.

Para determinar si en etanol-amonio tiene lugar el mecanismo de activación de *LEU9* a través de Gln3 propuesto para glucosa (Figura 18A) se extrajo ARN total de las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ* y *ure2Δ* y se analizaron mediante Northern Blot. Las Figura 25A y B muestran los resultados del análisis por Northern Blot, aunque para obtener resultados más robustos es conveniente repetir el análisis de expresión por Northern Blot. A partir del patrón de bandeado que se observa en la Figura 25 se puede determinar que el mecanismo propuesto tampoco es el mecanismo utilizado por Gln3 para sobre expresar *LEU9* en etanol-amonio; en el carril correspondiente a la cepa *ure2Δ* no hay presente ninguna banda al hibridar con *LEU9*, tal y como sucede cuando la fuente de carbono es glucosa (Figura 19). De manera paralela se realizó otro análisis tipo Northern Blot para determinar la expresión de *LEU9* en las mutantes *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ*. La Figura 25C muestra que ante la ausencia de *GCN4* o *GLN3* la expresión de *LEU9* disminuye, lo cual concuerda con el restablecimiento del fenotipo de crecimiento (Figura 23) y la determinación de leucina intracelular (Figura 24). Estos datos fortalecen la interpretación de que Gln3 y Gcn4 interactúan para provocar la sobreexpresión de *LEU9* cuando la fuente de carbono es etanol. Por densitometría se calculó el nivel de expresión del gen *HIS4* para las cepas control y las dobles mutantes *leu4Δgln3Δ* y *leu4Δgcn4Δ*. Los valores en la Figura 25C muestran cómo en una cepa *leu4ΔLEU9* la expresión de *HIS4* pasa de 1 a 2.6, sugiriendo un déficit de aminoácidos que disminuye con la delección de los TFs *GCN4* y *GLN3*, pasando de 2.6 a 1.8 y 0.3.

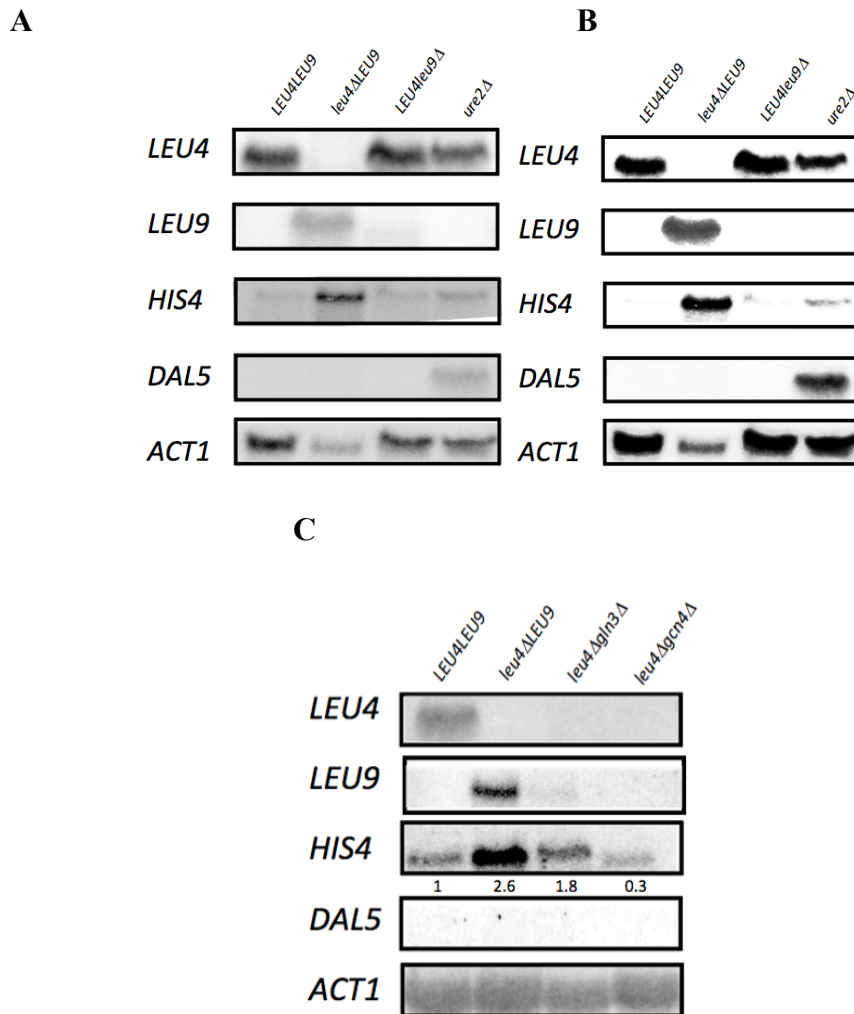


Figura 25. Análisis mediante Northern blot de muestras de ARN total de las cepas de *S. cerevisiae* *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ* y *ure2Δ* (A y B) y de las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* (C). La imagen obtenida a partir del revelado de la membrana usando el equipo Typhoon se muestra en (A), mientras que en (B) se muestra la misma imagen después de usar Photoshop 2018 para normalizar la intensidad de iluminación y eliminar el ruido de fondo, buscando hacer más evidentes las bandas obtenidas. Las membranas fueron sondeadas con los productos de PCR de los genes *LEU4*, *LEU9*, *DAL5* y *HIS4*, según corresponda, descritos en Materiales y Métodos. En ambos casos se crecieron las cepas hasta una $OD \approx 0.6$ en MM con etanol al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. Los valores numéricos indican la expresión del gen calculada a partir del análisis por densitometría de las bandas.

7.7. Gcn4 provoca un déficit de valina en etanol

Con el fin de elucidar si en etanol se está presentando un déficit de aminoácidos por valina, como sucede cuando glucosa es la fuente de carbono (Figura 21), se procedió a realizar una curva de etanol-amonio suplementando con valina (1x y 2x), con valina e isoleucina y con

leucina como control (Figura 26). El supuesto de que el déficit de aminoácidos esté dado por valina se basa en el hecho de que tanto para la producción de valina como para la síntesis de leucina se utiliza KIV como sustrato (Figura 20).

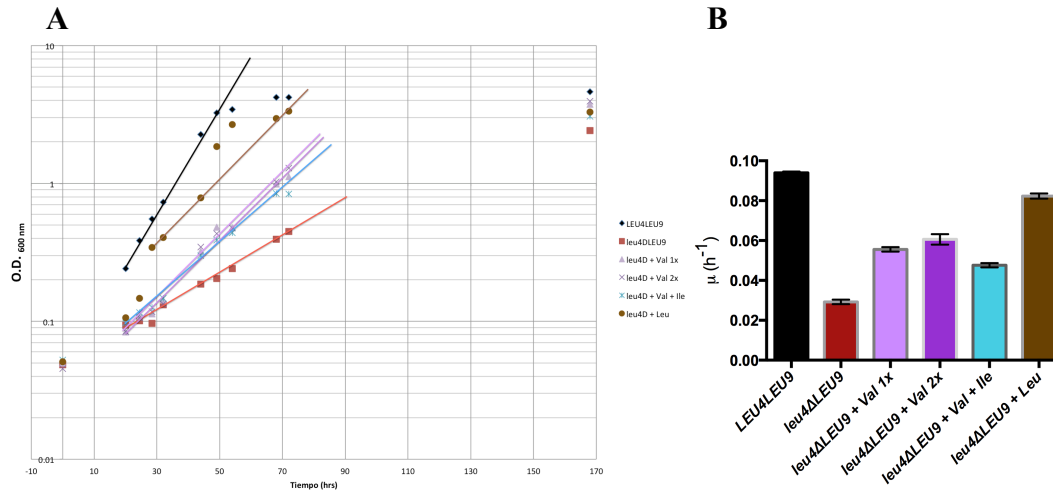


Figura 26. Cinética de crecimiento (A) de *leu4ΔLEU9* suplementada con valina. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1})) (B) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9* y *leu4ΔLEU9*) crecidas en MM con etanol al 2%, amonio (negro y rojo). La suplementación se hizo con Val 1x (lila), Val 2x (morado), Val+Ile (azul) y Leu (café). Las lecturas se realizaron a una OD₆₀₀. Se muestran los promedios de dos réplicas.

Los resultados que se observan en la Figura 26 indican que la cepa *leu4Δ* recupera parcialmente el crecimiento cuando se suplementa el medio con valina. Es importante notar que el restablecimiento generado por valina en etanol es mucho menor que el restablecimiento provocado al añadir este mismo aminoácido cuando la fuente de carbono es glucosa (Figura 21). Esto sugiere que en etanol-amonio el déficit de aminoácidos que se presenta es mucho más fuerte, siendo necesarios otros aminoácidos, además de valina, para poder restablecer en su totalidad el fenotipo de crecimiento. Como ya se mencionó, la energía se obtiene principalmente del Ciclo de Krebs cuando no hay glucosa y si este ciclo se rompe como consecuencia de una sobreproducción de leucina, la célula se verá afectada tanto por falta de energía como por falta de esqueletos de carbono para biosíntesis de diversos aminoácidos.

7.8. Leu3 está implicado en otras rutas metabólicas no ligadas a la biosíntesis de leucina

De ambos promotores analizados *in silico* (ver Resultados, sección 7.2) el único que cuenta con caja consenso para el TF Leu3 y, además, totalmente conservada, es *LEU9*. Debido a esta característica y a que Leu3 es un TF que tiene bajo su control a un gran número de

genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos ramificados, se construyó y caracterizó la doble mutante *leu4Δleu3Δ* tanto en glucosa-amonio como en etanol-amonio. Las curvas y las velocidades de crecimiento se encuentran en la Figura 27, donde se observa que en ausencia del gen *LEU3* en un fondo *leu4Δ* tiene repercusiones metabólicas más severas que las que tienen lugar en una cepa *leu4ΔLEU9*, ya que la ausencia de ambos TFs provoca una disminución aún mayor que la que presentan las mutantes sencillas *leu4Δ* y *leu3Δ*. De manera similar a lo que sucede con la cepa *leu4ΔLEU9*, la doble mutante *leu4Δleu3Δ* presenta una auxotrofia a leucina mucho más marcada ante etanol (Figura 27C y D) que ante glucosa (Figura 27A y B) como fuentes de carbono.

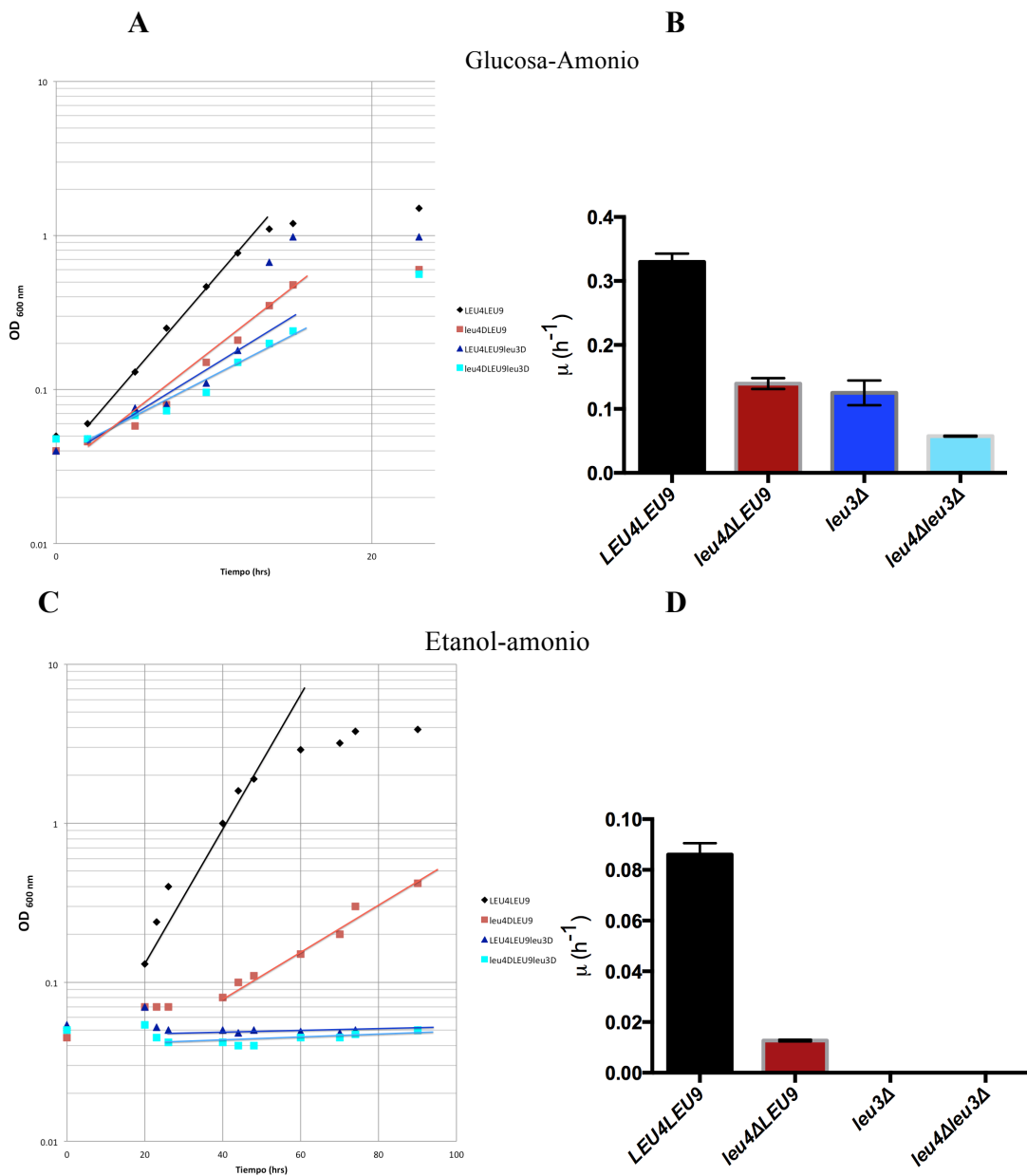


Figura 27. Cinética de crecimiento (A y C) de mutantes *leu3Δ* y *leu4Δleu3Δ*. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1})) (B y D) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9* y *leu4Δleu3Δ*) crecidas en MM con glucosa al 2% (A y B) o etanol al 2% (C y D) con amonio como única fuente de nitrógeno. Las lecturas se realizaron a una OD_{600} . Se muestran los promedios de tres réplicas.

Contrario a lo esperado, en la Figura 28 se observa que la poza de leucina de la cepa *leu4Δleu3Δ* no es similar a la de una mutante *leu4ΔLEU9*, sino similar a la de la cepa silvestre.

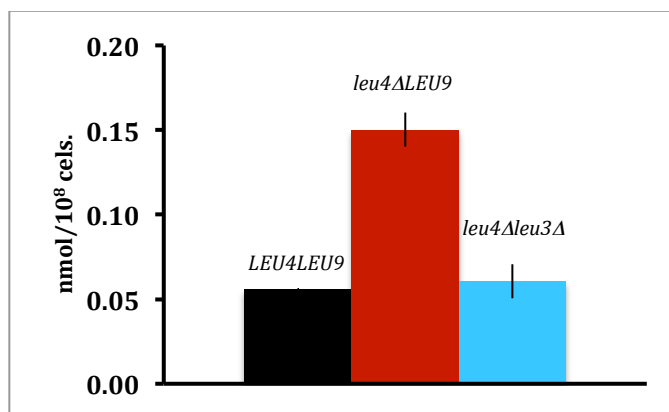


Figura 28. Concentraciones intracelulares de leucina obtenidas de cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9* y *leu4Δleu3Δ*. Las cepas se crecieron hasta una $OD_{600} \approx 0.6$ en MM con glucosa al 2% y amonio como única fuente de nitrógeno. Se muestra el promedio de tres réplicas.

Buscando descartar que la disminución de crecimiento se deba a un déficit de leucina se crecieron las cepas control y la doble mutante en medio suplementado con leucina en glucosa-amonio y en etanol-amonio. Los resultados se muestran en la Figura 29, donde se observa que, ante ambas fuentes de carbono, al suplementar el medio con leucina el fenotipo de crecimiento se recupera parcialmente pero sin llegar a restablecerse por completo. A partir de esto podría inferirse no solo que *Leu3* no es el responsable de la sobre expresión de *LEU9*, sino que este TF está involucrado en otras redes metabólicas fundamentales para el crecimiento de la levadura.

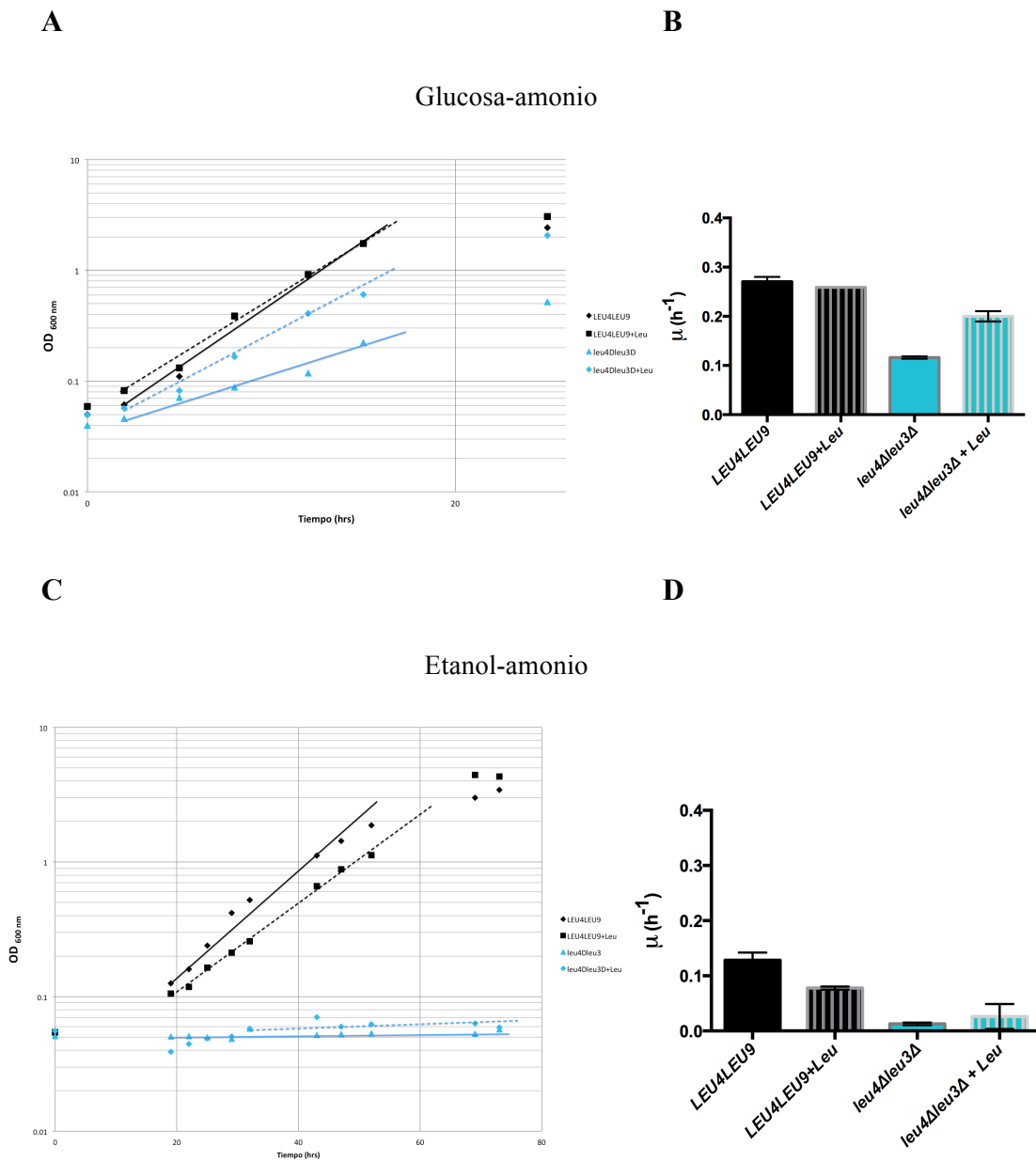


Figura 29. Cinética de crecimiento (A y C) de mutantes *leu3Δ* y *leu4Δleu3Δ* suplementadas con leucina. Las líneas rectas indican los puntos utilizados para calcular la pendiente y las velocidades específicas de crecimiento (μ (h^{-1})) (B y D) de cepas de *S. cerevisiae* (*LEU4LEU9* y *leu4Δleu3Δ*) crecidas en con glucosa al 2% y amonio (A y B) o con etanol al 2% (C y D). Las líneas y barras sólidas corresponden a MM sin leucina y las líneas y barras rayadas a MM suplementado con leucina 1x. Las lecturas se realizaron a una OD_{600} . Se muestran los promedios de dos réplicas.

8. DISCUSIÓN

Los genes *LEU4* y *LEU9* de *S. cerevisiae* son genes parálogos provenientes del evento de hibridación que tuvo lugar hace aproximadamente 150 millones de años (Marcet-Houben y Gabaldón, 2015). Después de este evento, la diversificación de cada una de las copias retenidas se logró a través de especializaciones cinéticas de las isoenzimas Leu4 y Leu9 y de perfiles de expresión distintos (López *et al.*, 2015). Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis indican que también existe una diversificación en la regulación transcripcional a la que están sujetos estos genes.

La diferencia de expresión de *LEU4* y *LEU9* está dada por la secuencia particular de cada promotor. En una cepa *LEU4LEU9* la expresión de *LEU4* es mayor que la de *LEU9* (Figura 6, López *et al.*, 2015), siendo esta diferencia de expresión más marcada cuando la fuente de carbono es etanol y no glucosa. Sin embargo, ante ambas fuentes de carbono y en ausencia de *LEU4*, *LEU9* se sobre expresa únicamente cuando está precedido por su propio promotor. Si el promotor no es el autóctono, la regulación cambia y esto resulta en que no tienen lugar los cambios metabólicos que suceden en un fondo *leu4Δ*, tal y como sucede en la quimera *leu4Δ P_{LEU4}LEU9*. A pesar de no contar con el gen *LEU4*, la expresión de *LEU9* no incrementa porque este aumento de expresión es consecuencia de secuencias de unión a TF contenidas únicamente en el *P_{LEU9}*. Por otro lado, los fenotipos de crecimiento y la expresión de la quimera *P_{LEU9}LEU4leu9Δ* también están sujetos a la regulación de la secuencia única del promotor, produciendo una cantidad de Leu4 menor de la de una cepa silvestre pero permitiendo el crecimiento ante glucosa y retardándolo ante etanol. El papel que juegan los promotores en la regulación transcripcional es fundamental para la expresión de cada gen y para la interpretación de señales bioquímicas a través de TFs (Davidson, 2001; Wray *et al.*, 2003). En varias ocasiones la transcripción de cada gen depende no solo de los TFs sino también de cofactores, de la arquitectura de la cromatina, del tamaño de los sitios de unión y si éstos se empalman con otros sitios de unión, entre otros (Wray *et al.*, 2003). Es por esto que la regulación de un gen depende completamente de la secuencia y arquitectura particular de su promotor para la interacción con los TFs.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los TFs involucrados en el incremento de expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4* varían de acuerdo con la fuente de carbono disponible durante el crecimiento exponencial de la levadura. En presencia de glucosa como fuente de carbono el TF Gln3 provoca un incremento de expresión de *LEU9*, ya que en ausencia de *GLN3* las características fisiológicas se revierten a las de una cepa silvestre (Figura 16). Sin embargo, el efecto de Gln3 sobre la expresión de *LEU9* no ocurre a través de un mecanismo canónico, ya que en una cepa *ure2Δ* la expresión de *LEU9* no se exagera, como ocurre en *DAL5*, cuya expresión se incrementa en una cepa *ure2Δ* (Figura 19).

Cuando una cepa silvestre *LEU4LEU9* se encuentra expuesta a fuentes de nitrógeno primarias, como lo son glutamina o amonio, Gln3 se encuentra localizado en el citoplasma unido a Ure2 y secuestrado por el complejo TORC1. En cambio, cuando la fuente de nitrógeno es secundaria, TORC1 permite la disociación del complejo Gln3-Ure2, de manera que Gln3 entra al núcleo y activa la transcripción de genes de permeasas que permiten el paso de aminoácidos como fuente de nitrógeno (Hardwick *et al.*, 1999; Beck y Hall, 1999; Weisman *et al.*, 2004; Puria y Cárdenas, 2008). El complejo TORC1 está sometido a un control positivo por leucina a través de LeuRS (leucil-tRNA sintetasa) que detecta al intermediario KIC (Kingsbury *et al.*, 2015). Debido a esto es probable que en una cepa *leu4ΔLEU9*, donde el KIC es detectado por LeuRS para indicarle a TORC1 disponibilidad de leucina, Gln3 se mantenga disociado de Ure2 y mantenga activa de manera indirecta la expresión de *LEU9*.

Por otro lado, el activador Gcn4 se regula por un mecanismo de control transcripcional único que incrementa la concentración de Gcn4 en células privadas de aminoácidos (Hinnebusch, 1996) para poder llevar a cabo la respuesta regulatoria denominada Control General de Aminoácidos (GAAC). La GAAC consiste en la inducción de enzimas de biosíntesis de aminoácidos como respuesta al déficit de cualquier aminoácido. Este control es necesario para la supervivencia de células que crecen en medios que inducen déficit de aminoácidos a través de inhibición por retroalimentación (Hinnebusch, 1996; Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012) como parece suceder en una cepa *leu4ΔLEU9*. Curiosamente, Gcn4 parece no ser fundamental para la regulación de *LEU9* en glucosa, ya que su ausencia en un fondo *leu4Δ* no revierte el fenotipo (Figura 16) aunque si disminuye la expresión de *LEU9* de acuerdo con los resultados obtenidos con los análisis de Northern Blot (Figura 22). Esto coincide con resultados reportados por Natarajan *et al.* (2001) donde se establece que alrededor del 25% de los genes blanco de Gcn4 están sujetos a una regulación dual que responde a un déficit de aminoácidos y puede ser dependiente o independiente de Gcn4. Muchos genes presentan expresión residual en una cepa *gcn4Δ* (Hinnebusch, 2002) y, sorprendentemente, más de 500 genes regulados por Gcn4 pueden duplicar su expresión al inducir un déficit de aminoácidos en una mutante *gcn4Δ*. Dentro de este grupo de genes se encuentran genes de biosíntesis de aminoácidos como *HIS5*, *ARG4* y *MET28* (Hinnebusch y Natarajan, 2002). También es importante mencionar que la caja consenso para Gcn4 localizada en el promotor de *LEU9* se encuentra más alejada en comparación con la posición que tiene en el promotor de *LEU4* (posiciones -255 y -98, respectivamente) (Figura 15) pero dentro del rango reportado (entre la posición -20 y la -300) para genes regulados por Gcn4 (Natarajan *et al.*, 2001).

De manera similar, cuando la fuente de carbono es etanol, los TFs que se relacionan con dicho incremento de expresión son Gln3 y Gcn4. A pesar de estar involucrados principalmente en procesos metabólicos distintos (Gln3 en la asimilación de fuentes

secundarias de nitrógeno y Gcn4 en biosíntesis de aminoácidos), la acción conjunta de estos reguladores transcripcionales ya ha sido descrita para los genes *DAL5*, *DAL1*, *GDH2*, *HIS3* y *HIS4* (Hernández *et al.*, 2010). Cuando la célula se encuentra ante una fuente de nitrógeno no represiva como GABA y bajo una condición de déficit de aminoácidos, los factores Gln3 y Gcn4 trabajan en conjunto para activar genes tanto catabólicos como biosintéticos (Hernández *et al.*, 2010). Valenzuela *et al.* (2001) también han reportado que el incremento en la actividad transcripcional de un grupo de genes relacionados con el catabolismo de nitrógeno en presencia de rapamicina se puede atribuir a la acción conjunta de Gcn4 y Gln3. Dichas interacciones surgen a partir de que el catabolismo del nitrógeno y el anabolismo de aminoácidos son rutas que funcionan en paralelo. Esto le permite a la levadura generar intermediarios que funcionan como señales basadas en los nutrientes disponibles y que la levadura puede integrar, aunque los sistemas que detectan estos nutrientes estén separados espacialmente (Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012).

Al igual que en glucosa-amonio, el mecanismo por el cual Gln3 activa a *LEU9* es un mecanismo que no se ha reportado hasta el momento pero que parece darse de manera indirecta, ya que en una cepa *ure2Δ* la expresión de *LEU9* no incrementa (Figura 25A). Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que el déficit de aminoácidos que se genera con etanol como fuente de carbono es mucho más marcado que en glucosa-amonio (Figuras 21 y 26), provocando la activación de Gcn4 como consecuencia de la falta de valina y el exceso de leucina. Este exceso de leucina puede ser detectado por LeuRS que a su vez activará al complejo TORC1, involucrando así al factor Gln3 (Kingsbury *et al.*, 2015). Contrario a lo que sucede en glucosa-amonio, el papel que juega Gcn4 en la regulación transcripcional de *LEU9* es más marcada cuando la fuente de carbono es etanol (Figura 23), ya que en una cepa *leu4Δgcn4Δ* el fenotipo de crecimiento se revierte, siendo similar al de una cepa silvestre. Esto coincide con resultados reportados por Hinnebusch (2002) en los que concluye que Gcn4 se activa no solo ante un déficit de aminoácidos, sino también cuando la levadura crece con fuentes no fermentables de carbono, como etanol, al someter a la levadura a rapamicina, y al déficit de purinas, entre otras.

El último TF analizado en este trabajo fue Leu3. Previamente se ha reportado que bajo el control de Leu3 se encuentran genes clave para la síntesis de aminoácidos ramificados como *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV1*, *ILV2* y *BAT1* (Kohlhaw, 2003; Boer *et al.*, 2005; Dumlao *et al.*, 2008). Leu3 depende de α -IPM para poder actuar como activador y, en ausencia de este metabolito, funge como represor (Kohlhaw, 2003; González *et al.*, 2017). Tomando en cuenta que la caja consenso para Leu3 localizada en la posición -276 del P_{LEU9} está completamente conservada (Figura 15) se podría esperar que *LEU9* también estuviese sometido al control de Leu3 y, sin embargo, la caracterización fisiológica de la cepa *leu4Δleu3Δ* (Figura 27) sugiere que Leu3 no es el responsable del aumento de expresión de *LEU9* en ninguna de las dos fuentes de carbono utilizadas en este trabajo. La velocidad de

crecimiento en glucosa-amonio de la doble mutante *leu4Δleu3Δ* es menor incluso que la de una cepa *leu4Δ* (Figura 27B) y en etanol-amonio se vuelve auxótrofa de leucina (Figura 27D). Con base en la caracterización fenotípica de las cepas *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* puede considerarse que Leu3 sea el responsable de mantener la expresión basal de *LEU9*. Siguiendo el mismo comportamiento que se presentó en las pozas de leucina de las dobles mutantes *leu4Δgcn4Δ* y *leu4Δgln3Δ* la cepa *leu4Δleu3Δ* debería tener pozas de leucina mucho mayores que las de una cepa silvestre y más similares a las de una cepa *leu4Δ*, pero los resultados de la Figura 28 muestran que la poza de leucina es similar al de la cepa *LEU4LEU9*. Estos resultados se explican a partir del conjunto de genes regulados positivamente por Leu3: en ausencia de Leu3 *LEU1* y *LEU2* no se expresan, por lo que la cepa continuará siendo auxótrofa de leucina, disminuyendo así la poza intracelular de este aminoácido. A partir de los resultados obtenidos al suplementar el medio con leucina (Figura 29) se infiere que la ruta de biosíntesis no es la única afectada por la ausencia de *LEU3*, sino que hay rutas fundamentales para la levadura que están siendo alteradas. Además de los genes mencionados previamente, el gen *GDH1* se encuentra también bajo el control de Leu3 (Figura 30) y está sometido a activación alostérica por leucina (Kingsbury *et al.*, 2015). En ausencia de Leu3 y, por lo tanto, al disminuir la leucina disponible, la producción de glutamato, que es esencial para la célula, se ve seriamente comprometida.

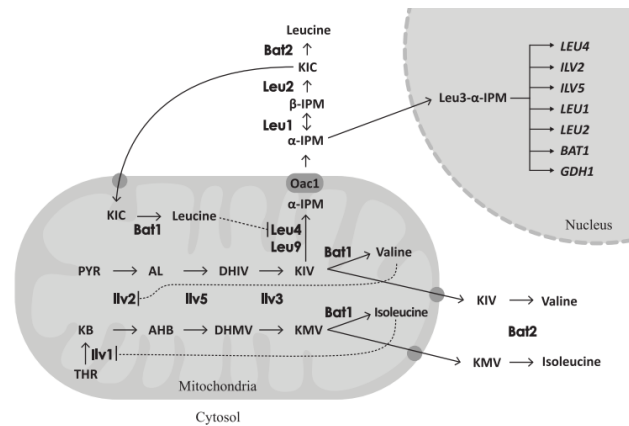


Figura 30. Representación esquemática de la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae*. Las proteínas que participan en la vía son: Leu4/Leu9 (α -isopropilmalato sintasas, que constituyen la vía biosintética de α -isopropilmalato sensible a leucina), Oac1 (transportador mitocondrial de membrana interna), Leu1 (isopropilmalato isomerasa), Leu2 (β -isopropilmalato deshidrogenasa), Bat1 (aminotransferasa de cadena ramificada mitocondrial), Bat2 (aminotransferasa de cadena ramificada citoplásmica), Ilv1 (treonina desaminasa), Ilv2 (acetolactato sintasa), Ilv5 (acetohidroxiácido reductoisomerasa), Ilv3 (dihidroxiácido deshidratasa). Los metabolitos involucrados en la vía son KIC (α -cetoisocaproato), α -IPM (α -isopropilmalato), PYR (piruvato), AL (acetolactato), DHIV (α , β -dehidroxi isovalerato), KIV (α -cetoisovalerato), KB (α -cetobutanoato), AHB (α -ceto-2-hidroxi butirato), DHMV (dihidroxi metilvalerato), KMV (α -cetometilvalerato), THR (treonina). Las flechas indican la dirección de las reacciones para cada vía. Los círculos grises representan los transportadores putativos. Las líneas punteadas indican los sitios de retroinhibición por cada aminoácido. En el núcleo, la expresión de los genes *LEU4*, *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *GDH1*, está regulada positivamente por el complejo Leu3- α -IPM. Tomada de González *et al.*, 2017.

9. CONCLUSIONES

- La regulación de *LEU9* depende de la secuencia particular de su promotor, tanto en condiciones fermentativas como en condiciones respiratorias.
- El déficit de aminoácidos generado por un fondo genético *leu4Δ* es más marcado en etanol-amonio que en glucosa-amonio, pero en ambos hay un déficit por valina.
- En condiciones fermentativas Gln3 provoca la sobre-expresión de *LEU9* mediante un mecanismo no canónico, simultáneamente, Gcn4 contribuye parcialmente al incremento de expresión.
- En condiciones respiratorias las cepas *leu4Δgln3Δ* y *leu4Δgcn4Δ* restablecen el fenotipo de crecimiento y disminuyen la poza de leucina, indicando que Gln3 y Gcn4 interactúan para provocar el aumento de expresión de *LEU9*.
- Gcn4 y Gln3 parecen tener un efecto aditivo en condiciones respiratorias.
- Gcn4 y Gln3 exacerban la expresión, por lo que su delección restablece el crecimiento.

10. PERSPECTIVAS

Para robustecer la interpretación de los datos obtenidos en este trabajo se sugiere repetir los análisis de expresión por Northern Blot, realizar ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de cromatina (qCHIP), con lo que se podría determinar si la unión de los TFs al P_{LEU9} se da de manera directa o indirecta. En los análisis de Northern Blot sería conveniente determinar la expresión de *LEU9* en una mutante *gln3Δ* para profundizar en el efecto que tiene este TF sobre la expresión del gen. Realizar un análisis de expresión usando PCR en tiempo real permitiría detectar cambios más sutiles en los niveles de expresión. Con el fin de analizar más detalladamente el P_{LEU9} se puede realizar un ensayo de escaneo de nucleosomas (NuSA) que generará información nueva sobre la arquitectura del promotor, la distribución de nucleosomas y, por lo tanto, las cajas consenso que se encuentran accesibles para los TFs. Aunado a esto y con el fin de dilucidar el mecanismo de regulación por el que Gln3 incrementa la expresión de *LEU9* podrían analizarse los reguladores sometidos a regulación por *GLN3* y seleccionar aquellos que puedan estar involucrados en la ruta para construir mutantes extragénicas que restauren el crecimiento. Como se menciona en este trabajo, aparentemente la ruta de biosíntesis de valina se ve alterada como consecuencia de la ausencia de *LEU4*. Realizar un aminograma podría indicar qué otras rutas de biosíntesis de aminoácidos resultan afectadas en un fondo *leu4Δ* tanto en glucosa como en etanol, condiciones en las que suponemos que se presenta déficit de esqueletos de carbono. Aunado a esto, podría determinarse el incremento de Gcn4 por inmunoprecipitación con el fin de confirmar que en una cepa *leu4Δ*, se provoca un déficit de amino ácidos y un incremento en la concentración de Gcn4.

11. ANEXOS

11.1. Tablas suplementarias

Tabla S1. Oligonucleótidos usados para confirmar cepas.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
A1	CGCTATGGAGTCGCGTAGGTTTCGATG	Secuencia Fw para comprobar quimera <i>leu4ΔP_{LEU4}LEU9</i> en la región P _{LEU4} y ORF de <i>LEU9</i> . Contiene 26 pb de la región UTR5' de <i>LEU4</i> .
A2	GCACCAGTCAATGCTTCCACGGTTCT	Secuencia Rv para comprobar quimera <i>leu4ΔP_{LEU4}LEU9</i> en la región P _{LEU4} y ORF de <i>LEU9</i> . Contiene 26pb del ORF de <i>LEU9</i> .
A3	CCCCAAGAGCCCCATATGGCGGTG	Secuencia Fw para comprobar quimera <i>leu4ΔP_{LEU4}LEU9</i> en la región ORF de <i>LEU9</i> y UTR3' de <i>LEU4</i> . Contiene 25pb del ORF de <i>LEU9</i> .
A4	CGGCTGGGCCACCTTAGATTACCTG	Secuencia Rv para comprobar quimera <i>leu4ΔP_{LEU4}LEU9</i> en la región ORF de <i>LEU9</i> y UTR3' de <i>LEU4</i> . Contiene 26pb de la región UTR3' de <i>LEU4</i> .
A5	TTCGTCTATTTTGGTGCCGCGCGC	Secuencia Fw para comprobar quimera <i>P_{LEU9}LEU4leu9Δ</i> en la región P _{LEU9} y ORF de <i>LEU4</i> . Contiene 24pb de la región UTR5' de <i>LEU9</i> .
A6	GTTTGGTGGCCTCTACTGCCTTGG	Secuencia Rv para comprobar quimera <i>P_{LEU9}LEU4leu9Δ</i> en la región P _{LEU9} y ORF de <i>LEU4</i> . Contiene 24pb del ORF de <i>LEU4</i> .
A7	GCTGACTCCTGGGTAGAGAACT	Secuencia Fw para comprobar quimera <i>P_{LEU9}LEU4leu9Δ</i> en la región ORF de <i>LEU4</i> y UTR3' de <i>LEU9</i> . Contiene 23pb del ORF de <i>LEU4</i> .
A8	GGCACAAAGGGTTTATCAGATGG	Secuencia Rv para comprobar quimera <i>P_{LEU9}LEU4leu9Δ</i> en la región ORF de <i>LEU4</i> y UTR3' de <i>LEU9</i> . Contiene 24pb de la región UTR3' de <i>LEU9</i> .
A9	GTTTTGTTTACCAATTTGTCTGCTCAAGAAAA TAAATTAATAACAAATAAACGTACGCTGCAGGTCG	Secuencia Fw que contiene 23pb río arriba del codón de inicio de <i>GCN4</i> y la secuencia de kanMX4 (negritas) para comprobar la construcción <i>gcn4Δ::kanMX4</i>
A10	CGTTATACACGAGAATGAAATAAAAAATATA AAATAAAAGGTAAATGAAAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia Rv que contiene 49pb río abajo del codón de término de <i>GCN4</i> y la secuencia de kanMX4 (negritas) para comprobar la construcción <i>gcn4Δ::kanMX4</i>
A11	GCTCACTCATCTACTTCGCAATC	Secuencia Fw que contiene 23pb de la región UTR5' de <i>GCN4</i> .

A12	GAGGATTCCTATATCCATGAGGAG	Secuencia Rv que contiene 24pb de la región UTR3' de <i>GCN4</i> .
A13	CCTCAAGTAAAAATCGCTTCGTAACATTAATAC AAATTCTTTTTGCAATTCGTACGCTGCAGGTCTG	Secuencia Fw que contiene 50pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU3</i> y la secuencia de kanMX4 (negritas) para comprobar la construcción <i>leu3Δ::kanMX4</i> .
A14	TAA CATTTTT TCGAGGG TAAAGTAAACATTACGCAAA AAAAGAAAAGGACTATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia Rv que contiene 50pb río abajo del codón de término de <i>LEU3</i> y la secuencia de kanMX4 (negritas) para comprobar la construcción <i>leu3Δ::kanMX4</i> .
A15	CAAAGCCAATGAACTGCCACAAC	Secuencia Fw que contiene 23pb de la región UTR5' de <i>LEU3</i> .
A16	CATTACGCAAAAAAAGAAAAGGACT	Secuencia Rv que contiene 25pb de la región UTR3' de <i>LEU3</i> .
A17	GAGACGAGAGAGAGCACAGG	Secuencia Fw que contiene 20pb de la región UTR5' de <i>GLN3</i> .
A18	GAATAATGATAATGATAATACGCGG	Secuencia Rv que contiene 25pb de la región UTR3' de <i>GLN3</i> .
A19	GTCCTGAAATACAGAAAAGTT	Secuencia Rv para comprobar la construcción <i>leu4Δ::ura3</i> . Contiene 21pb río abajo del codón de término de <i>LEU4</i> .

Tabla S2. Oligonucleótidos usados para obtener mutantes.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
A20	CACTAGAAGTTTACTGTAGACTTTTTCTTACAAAA AGACAAGGAACAATCTTCAATTCAATTCATCATT	Secuencia de <i>LEU4</i> Fw que contiene 50pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pRS416 (negritas) para construir las mutantes <i>leu4Δgcn4Δ</i> , <i>leu4Δgln3Δ</i> y <i>leu4Δleu3Δ</i> .
A21	AAGTATAGAAATAAATAGAAGCGAAAAAGTCCTGAA ATACAGAAAAGTTCTTAGTTTTGCTGGCCGCATC	Secuencia de <i>LEU4</i> Rv que contiene 50pb río abajo del codón de inicio y la secuencia del plásmido pRS416 (negritas) para construir las mutantes <i>leu4Δgcn4Δ</i> , <i>leu4Δgln3Δ</i> y <i>leu4Δleu3Δ</i> .

Tabla S3. Oligonucleótidos usados para obtener la quimera $P_{LEU9}LEU4leu9A$.

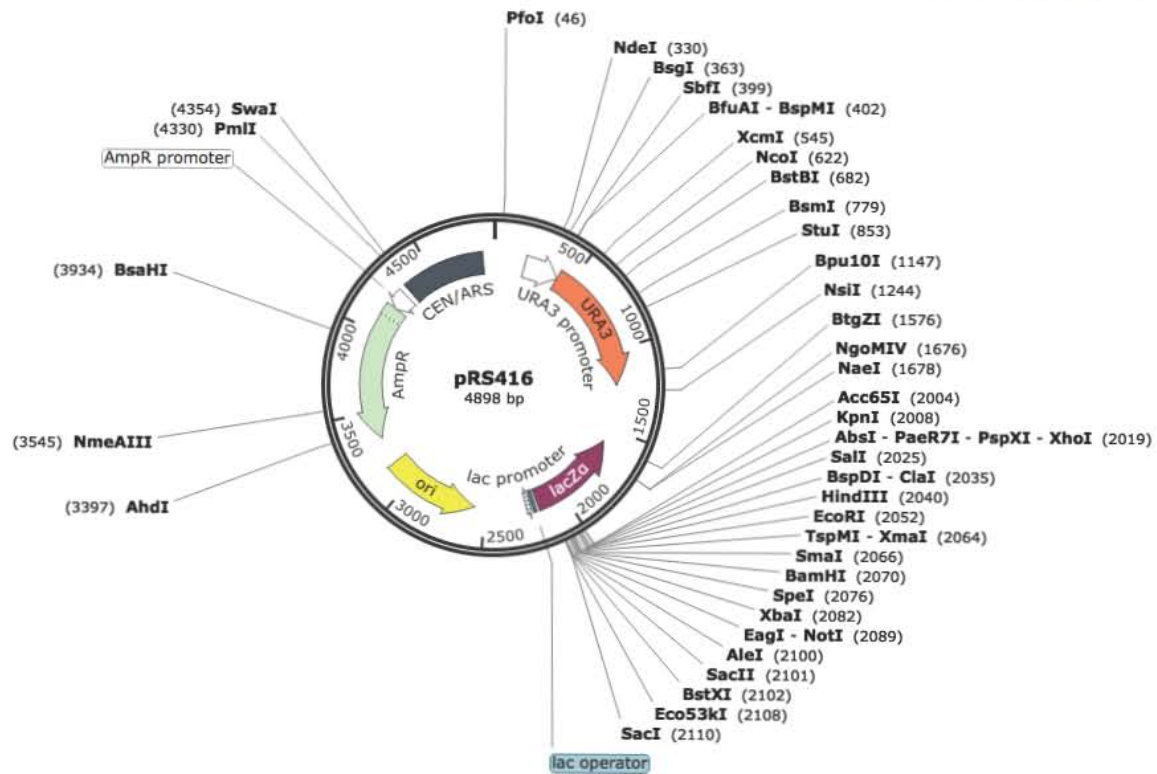
Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
A22	CTTCTCCTTAGGATAATACTATCGGCACATTATCATT TAGCCGCGTAGCCATGGTTAAAGAGAGTATTATTG	Secuencia del P_{LEU9} con 22pb río abajo del codón de inicio del ORF de $LEU4$ (negritas).
A23	CATATATATATAACATGAGTAATCATAAGCTA CTCCTTTCTATTATGCAGAGCCAGATGCCG	Secuencia de la región UTR3' de $LEU9$ con 20pb río arriba del codón de término del ORF de $LEU4$ (negritas).

Tabla S4. Oligonucleótidos usados para obtener sondas.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
NLEU4Fo	CTGACTCCTTGGGTAGAG	Fw, amplifica la sonda para $LEU4$.
NLEU4Re	CTGTACCTTCAATATCGACG	Rv, amplifica la sonda para $LEU4$.
NLEU9Fo	AGATGCCTTAGGAAGAGAG	Fw, amplifica la sonda para $LEU9$.
NLEU9Re	TCCGTAGCCTTCGATGTTG	Rv, amplifica la sonda para $LEU9$.
J41	GTCAGCGGATGCTAGTACAA	Fw, amplifica la sonda para $DAL5$.
J42	CAGCTATCTTATCACGTCTCT	Rv, amplifica la sonda para $DAL5$.
J43	GGTTTTGCCGATTCTACCGTTA	Fw, amplifica la sonda para $HIS4$.
J44	TTGGCTTAGCATCACCTTTCC	Rv, amplifica la sonda para $HIS4$.
J27	ATCAATAGTAAGGCTCGCAAACCGCCC	Fw, amplifica la sonda para $BAT1$.
J28	CATGTAAAGTCCAGCGAGATACCTGGC	Rv, amplifica la sonda para $BAT1$.
J29	CAAACATCTTCGAACGTGAAAACCTGCCTCT GAGGG	Fw, amplifica la sonda para $BAT2$.
J30	GTCCTTGATACCGATAGGCCAGC	Rv, amplifica la sonda para $BAT2$.
J31	GTTTTGCCGGTGACGAC	Fw, amplifica la sonda para $ACT1$.
J32	CTTTCGGCAATACCTGGG	Rv, amplifica la sonda para $ACT1$.

11.2. Mapa del plásmido pRS416

Created with SnapGene®



11.3. Transformación de levadura con acetato de litio.

- 1.- Inocular 10 mL de YPD con una asada de la cepa. Incubar a 30°C/250rpm por toda la noche.
 - 2.- Hacer una dilución 1:10 del cultivo en una celda con YPD y leer la OD a 600nm.
 - 3.- Inocular 50 mL de YPD para obtener una OD_{600nm} de 0.2-0.25.
 - 4.- Inocular a 30°C/250 rpm durante 4 horas, para alcanzar una OD_{600nm} de 0.5-0.6.
 - 5.- Centrifugar a 3000 rpm durante 3-4 min. para colectar las células. Resuspender en 10-20mL de H₂O_{ii} estéril y centrifugar nuevamente a 3000 rpm para lavar y recolectar las células. Hacer dos lavados.
 - 6.- Resuspender en 1mL de agua bidestilada estéril y transferir a un tubo Eppendorf de 1.5mL.
 - 7.- Centrifugar a 14000rpm por 1 min. Eliminar sobrenadante.
 - 8.- Lavar con 1mL de TE/LiOAc recién preparado. Centrifugar a 14000 rpm por 15s y eliminar el sobrenadante.
 - 9.- Resuspender las células en 200µL de TE/LiOAc usando el vórtex.
 - 10.- Dividir las células en tres colocando 70µL en cada tubo Eppendorf.
 - 11.- Agregar la concentración de ADN a usar (mínimo 1 µg) y 10µL de ADN de esperma de salmón a uno de los tubos Eppendorf. Para el tubo correspondiente al control negativo agregar 10µL de ADN de esperma de salmón. El esperma de salmón debe estar previamente hervido por 5 min y mantenido en hielo.
 - 12.- Mezclar con vórtex.
 - 13.- Adicionar 300mL de PEG/TE/LiOAc al 50% recién preparado y mezclar con vórtex.
 - 14.- Incubar a 30°C/250rpm por 30 min.
 - 15.- Someter a choque térmico de 42°C por 15 min.
- Si se va a incorporar un módulo de resistencia a antibiótico:
- 16.- Preparar tubos Falcon con 3mL de YPD.
 - 17.- Centrifugar las células a 14000 rpm por 30s Eliminar el sobrenadante.
 - 18.- Resuspender el pellet en 1 mL de YPD y transferir al tubo Falcon con 3mL de YPD.
 - 19.- Incubar a 30°C/250 rpm durante 3 horas.
- Si NO se va a incorporar un módulo de resistencia a antibiótico:
- 20.- Colectar las células por centrifugación. Desechar el sobrenadante y agregar 100mL de agua bidestilada estéril.
 - 21.- Hacer dos diluciones (usando agua bidestilada estéril) del concentrado de células: uno de 1:10 y otro de 1:100.
 - 22.- Plaquear 100µL del control negativo, del concentrado y de las diluciones en YPD o en MM, según sea el caso.
 - 23.- Incubar a 30°C.

11.4. Obtención de ADN genómico de levadura.

- 1.- Inocular 10 mL de YPD con una asada de la cepa. Incubar a 30°C/250rpm toda la noche.
- 2.- Centrifugar a 3000rp por 2-5min a temperatura ambiente para colectar las células. Eliminar el sobrenadante.
- 3.- Resuspender en 1mL de agua bidestilada estéril (o que haya sido estéril) y transferir a un tubo Eppendorf de 1.5mL.
- 4.- Centrifugar a 14000rpm por 5s Eliminar el sobrenadante.
- 5.- Adicional 200µL de una solución de: 2% Tritón, X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM Na-EDTA (para romper membranas).
- 6.- Agregar 300µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El fenol debe ser básico.
- 7.- Agregar 0.3g de perlas de vidrio a cada muestra.
- 8.- Mezclar con vórtex por 5 min. Adicionar 200µL de TE pH 8.0.
- 9.- Centrifugar a 14000 rpm por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- 10.- Agregar 400µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- 11.- Centrifugar a 14000 rpm por 5 min. Transferir con micropipeta la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 1.5mL. Repetir los pasos 10 y 11 dos veces más.
- 12.- Agregar 1mL de EtOH al 100%+10µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- 13.- Centrifugar a 14000rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante.
- 14.- Resuspender el pellet en 400µL de TE+10µL de RNAsa (10mg/mL). Incubar a 37°C por 30 min.
- 15.- Agregar 1mL de EtOH al 100%+10µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- 16.- Centrifugar a 14000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 30 min.
- 17.- Resuspender el pellet en 50µL de agua bidestilada estéril.
- 18.- Cuantificar en Nanodrop.

11.5. Extracción de metabolitos intracelulares.

- 1.- Poner un precultivo en YPD de la cepa a usar.
- 2.- Inocular matraz con MM (con etanol o glucosa) a la OD calculada para que llegue a la OD deseada en el tiempo establecido.
- 3.- Centrifugar 5 min a 3,000 rpm.
- 4.- Resuspender la pastilla en 2mL de amortiguador HEPES 0.1M pH=8 frío en un tubo Falcon estéril. Mantener en hielo.
- 5.- Poner en baño maría 5 minutos.
- 6.- Pasar el contenido dividiéndolo en dos tubos Eppendorf de 1.5mL y centrifugar 15 minutos a 4°C y 14000 rpm.
- 7.- Tomar el sobrenadante midiendo con la pipeta el volumen total.
- 8.- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm.
- 9.- Tomar 500µL del sobrenadante y colocarlos en un tubo Eppendorf.
- 10.- Agregar 200µL de HClO₄ al 71% para precipitar proteínas.
- 11.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos. No separar el sobrenadante.
- 11.- Neutralizar agregando 100µL de KOH 22M y posteriormente gotas de 5µL hasta alcanzar un pH= 7-7.5. Mantener en hielo.
- 12.- Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.
- 13.- Tomar el sobrenadante y desechar el precipitado (sales de KClO₄).
- 14.- Guardar a -20C para su análisis por HPLC.

11.6. Obtención de ARN total de *S. cerevisiae*.

- 1.- Centrifugar el medio a 3000rpm por 5 min en tubos Falcon de 50mL, para recuperar las células.
- 2.- Recuperar las células y lavar en 20mL de agua DEPC.
- 3.- Resuspender el pellet de células en 1mL de agua DEPC.
- 4.- Transferir las células a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a 14000rpm durante 30s a temperatura ambiente para recuperar las células.
- 5.- Remover el sobrenadante con una micropipeta (si es necesario, en este paso es posible congelar a -80°C)
- 6.- Resuspender el pellet (sin descongelar) con 400µL de TES (buffer de lisis) usando una micropipeta.
- 7.- Agregar 400µL de fenol ácido pH=4.3.
- 8.- Agitar en vórtex hasta formar una emulsión blanca.
- 9.- Incubar a 65°C por 1 hora agitando a 14000rpm/10s cada 10min en el termoblock.
- 10.- Incubar 10 min en hielo.
- 11.- Centrifugar a 13500rpm durante 5 min a 4°C.
- 12.- Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL y agregar 400µL de fenol. Agitar hasta formar una emulsión blanca.
- 13.- Incubar 10 min en hielo.
- 14.- Centrifugar a 13500 rpm por 5min a 4°C.
- 15.- Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL y agregar 400µL de cloroformo. Agitar hasta formar una emulsión blanca.
- 16.- Centrifugar a 13500 rpm por 5min a 4°C.
- 17.- En un tubo nuevo colocar 1mL de etanol absoluto + 40µL de acetato de sodio 3M pH=5.3.
- 18.- Transferir el sobrenadante al tubo con etanol+acetato.
- 19.- Precipitar el ARN manteniendo los tubos a -20°C durante toda la noche.
- 20.- Centrifugar a 13500 rpm durante 15 min a 4°C.
- 21.- Lavar por inversión el pellet con etanol al 70% frío.
- 22.- Decantar el etanol y dar un pulso con la centrífuga a temperatura ambiente para quitar con micropipeta el resto de etanol.
- 23.- Agregar 80µL de agua DEPC y dejar rehidratando a temperatura ambiente por 40min-1 hora. No resuspender el pellet.
- 24.- Cuantificar en Nanodrop.
- 25.- Mantener a -70°C.

SOLUCIONES

Solución TES

Preparar a partir de soluciones stock (en DEPC), aforar con agua DEPC y mantener a temperatura ambiente.

Tris-HCl 10mM, pH 7.5

EDTA 10mM, pH 8

SDS 0.5%

Acetato de sodio 3M, pH 5.3

Disolver en agua DEPC, ajustar pH con ácido acético glacial. Esterilizar en autoclave y mantener a temperatura ambiente.

Agua libre de ARNsas (agua DEPC)

Agitar al menos 4 horas y esterilizar en autoclave. Mantener en refrigeración.

1mL de dietilpirocarbonato

1000mL de agua bidestilada o miliQ.

11.7. Electroforesis y transferencia de geles de ARN total.

ELECTROFORESIS

- 1.- Limpiar la cámara, el tanque, la base y el peine con agua DEPC.
- 2.- Preparar el gel mezclando 1 gr de agarosa, 84 mL de agua bidestilada y 10mL de MAE 10X. Hervir la mezcla y dejar enfriar agitando con una mosca. Cuando llegue aproximadamente a 55°C añadir 6 mL de formaldehído en la campana. Vaciar en el molde para que gelifique usando un peine de 10 pozos y 1.5 mm de grosor.
- 3.- Llenar la cámara con 1L amortiguador de corrida: 100mL de MAE 10X, 30 mL de formaldehído y aforar a 1L con agua bidestilada.
- 4.- Preparar la muestra de ARN: el volumen de ARN dependerá de la concentración obtenida al final de la extracción (de 5-8mL), 2 mL de bromuro de etidio 1% y 20-40mL de Tampón 1.25X.
- 5.- Calentar las muestras preparadas de ARN calentándolas a 65°C durante 15 minutos. Dar un pulso en la centrífuga y cargar todo el volumen en los pozos del gel.
- 6.- Correr el gel en el cuarto frío durante aproximadamente 4 horas a 130 volts.

TRANSFERENCIA DE GELES DE ARN

- 1.- Para eliminar el exceso de formaldehído del gel debe hacerse un lavado de 15-20 minutos con 250 mL de SSC 10X (preparado a partir del stock 20X) en el agitador.
- 2.- Cortar un papel filtro 3MM de 25x14 cm y dos de 12x14cm.
- 3.- Poner un vidrio apoyado en los bordes de un recipiente Pyrex.
- 4.- Verter en un recipiente Pyrex aproximadamente 400 mL de SCC 10X.
- 5.- Colocar encima del vidrio el papel filtro grande, previamente humedecido en SCC 10X de manera que las orillas queden sumergidas en el SCC 10X a ambos lados del vidrio (tipo puente).
- 6.- Colocar el gel encima del papel filtro, eliminando cualquier burbuja atrapada entre el papel filtro y el gel usando una pipeta de vidrio. Los pozos del gel deben apuntar hacia el lado izquierdo.
- 7.- Poner tiras de parafilm encima de los bordes del gel (6 tiras de parafilm en total) para evitar que el SCC sea absorbido por las toallas de papel sin pasar por el gel.
- 8.- Humedecer la membrana de Hybon con agua bidestilada y después sumergirla en SCC 10X.
- 9.- Colocar la membrana encima del gel y eliminar las burbujas.
- 10.- Poner encima del gel los dos papeles filtro de 12x14cm, humedecidos con SCC 10X.
- 11.- Formar sobre el gel y los papeles filtro una pila con 7-10cm de sanitas y un libro de aproximadamente 1kg (poner un vidrio debajo del libro para que no se humedezca). Dejar transfiriendo toda la noche.
- 12.- Quitar todo el peso y marcar los carriles con un lápiz.
- 13.- Lavar el filtro con 80mL SCC 1X durante 30s para quitar los restos de agarosa adheridos y cristales de sal. Agitar suavemente y dejar secar.

14.- Corroborar con luz ultravioleta en el gel que se haya transferido todo el ARN a la membrana.

15.- Fijar covalentemente el ARN a la membrana colocándolo durante 2 minutos en el Stratalinker. Guardar la membrana en un sobre de papel filtro.

SOLUCIONES

Tampón (5mL) Se guarda a -20°C

2.75mL formamida desionizada (en refrigeración)

1mL formaldehído 37%

625 µL de MAE al 10X

500µL glicerol al 80% estéril

15µL de bromofenol al 2% (0.02 gr de bromofenol en 1mL de agua DEPC)

MAE 10X Se guarda a 4°C (Ajustar el volumen con agua DEPC)

0.2M MOPS

50mM acetato de sodio

10mM EDTA

Ajusta pH a 7 usando NaOH 10N

Esterilizar por filtración y guardar en envase obscuro

SSC 20X

175.3gr de NaCl

88.2gr de citrato de sodio

Ajustar volumen a 11 con agua DEPC

11.8. Marcaje y purificación de sondas obtenidas por PCR.

- 1.- Mezclar aproximadamente 4 μ L de sonda con 10 μ L de mezcla de nanómeros y 25 μ L de agua estéril o que haya sido estéril.
- 2.- Hervir durante 10 minutos.
- 3.- Dejar enfriar durante 10 minutos.
- 4.- Dar un spin.
- 5.- Añadir 10 μ L de Buffer dCTP.
- 6.- Añadir 2 μ L de marca radioactiva cCTP-p³²
- 7.- Añadir 1 μ L de enzima Klenow.
- 8.- Incubar durante 10-15 min a 37°C.
- 9.- Añadir 2 μ L de Buffer Stop.
- 10.- Determinar porcentaje de incorporación.
- 11.- Diluir la sonda marcada en 100 μ L de agua estéril o que haya sido estéril.
- 12.- Purificar pasando la sonda marcada por una columna con gel dextrano.
- 13.- Centrifugar la columna 4 min a 1800rpm
- 14.- Almacenar a -20°C.

11.9. Análisis de expresión por Northern Blot

- 1.- Colocar la membrana en el tubo con los ARN viendo hacia la luz del tubo.
 - 2.- Agregar buffer de hibridización y colocar en el hibridizador durante 10-15 min.
 - 3.- Hervir la sonda purificada durante 10 min.
 - 4.- Descargar la sonda en el buffer contenido en el tubo.
 - 5.- Dejar hibridando durante mínimo 12 hrs.
 - 6.- Recuperar la sonda y realizar un lavado de aproximadamente 10 min la membrana usando buffer de baja astringencia previamente calentado a 65°C.
 - 7.- Medir radioactividad y, de ser necesario, dar un segundo lavado con buffer de baja o alta astringencia.
 - 8.- Blanquear durante aproximadamente 10 min una pantalla en el transiluminador.
 - 9.- Cubrir membrana con papel film transparente y colocar en el cassette con los ARN hacia la pantalla.
 - 10.- Cerrar el cassette y dejar exponiendo mínimo 12 hrs.
 - 11.- Revelar la imagen obtenida en la pantalla usando el equipo Typhoon.
- Si se va a sondear la membrana nuevamente:
- 12.- Lavar la membrana durante aproximadamente 15 min con SDS al 0.5% hirviendo.
 - 13.- Repetir paso de prehibridización (Paso 2) mientras se hierve la siguiente sonda (paso 3).
 - 14.- Repetir todos los pasos hasta revelar la nueva imagen en el Typhoon.

SOLUCIONES

Buffer de Hibridación

- 28mL SDS 10%
- 12mL buffer de fosfatos disódico 0.5M
- 40 μ L EDTA 0.5M pH 8.0

Buffer de Baja Astringencia

- 50mL SSC 20X
- 5mL SDS 10%
- 445mL agua destilada

Buffer de Alta Astringencia

- 3.75 mL SSC 20X
- 5mL SDS 10%
- 491.25mL agua destilada

12. REFERENCIAS

- Arnone, M. I., Davidson, E. H. (1997) The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development*.124:1851–1864.
- Beck, T. y Hall, M. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. 402: 689-692.
- Boer, V., Daran, J.M., Almering, M., de Winde, J. y Pronk, J. (2005) Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research*. 5: 885–897.
- Casalone, E., Barberio, C., Cavalieri, D., Polsinelli, M. (2000) Identification by functional analysis of the gene encoding α -isopropylmalate synthase II (*LEU9*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16: 539-545.
- Carey, M., y Smale, S.T. (2000) Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Christophides, G. K., Livadras, I., Savakis, C., Komitopolou, K. (2000) Two medfly promoters that have originated by recent gene duplications drive distinct sex, tissue and temporal expression patterns. *Genetics* 156:173–182.
- Davidson, E. H. (2001) Genomic regulatory systems: development and evolution. *Academic Press*, San Diego, Cal.
- DeLuna, A., A. Avendano, L. Riego, A. Gonzalez (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem*. 276: 43775-43783.
- Dean, A.M. y Thornton, J.W. (2007) Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis. *Nat Rev Genet* 8(9): 675–688.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G. *et al.*(2004) Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430, 6995: 35–44.
- Dumlao, D., Hertz, N., Clarke, S. (2008) Secreted 3-Isopropylmalate Methyl Ester Signals Invasive Growth during Amino Acid Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 47: 698-709.
- González, J., López, G., Argueta, S., Escalera-Fanjul, X., El Hafidi, M., Campero-Basaldúa, C., Strauss, J., Riego-Ruiz, L., González, A. (2017) Diversification of Transcriptional Regulation Determines Subfunctionalization of Paralogous Branched Chain Aminotransferases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 207: 975–991.
- Gu, Z., Nicolae, D., Lu, S., Li, W. (2002) Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data. *Trends Genet*. 18:609–613.

- Hardwick, J., Kuruvilla, F., Tong, J., Shamji, A., Schreiber, S. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *PNAS*. 96, 26: 14866-14870.
- Hernández, H., Aranda, C., Riego, L., González, A. (2010) Gln3–Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 404: 859–864.
- Hinnebusch, A. G. (1985) A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. 5: 2349–2360.
- Hinnebusch, A. (1988) Mechanisms of Gene Regulation in the General Control of Amino Acid Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*. 52, 2: 248-273.
- Hinnebusch, A. G. (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 319–414. In J. R. Broach, E. W. Jones, and J. R. Pringle (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Hinnebusch, A. G. (1996) Translational control of *GCN4*: gene-specific regulation by phosphorylation of eIF2, p. 199–244. In J. W. B. Hershey, M. B. Mathews, and N. Sonenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Hinebusch, A., Natarajan, K. (2002) Gcn4p, a Master Regulator of Gene Expression, Is Controlled at Multiple Levels by Diverse Signals of Starvation and Stress. *Eukaryotic Cell*. 1,1: 22–32.
- Hinnebusch, A. (2005) Translational Regulation of *GCN4* and the General Amino Acid Control of Yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005. 59:407–50.
- Huerta-Cepas, J., Capella-Gutierrez, S., Pryszcz, L., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T. (2014) PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Research*. 42: 897-902.
- Hurles, M. (2004) Gene duplication: The genomic trade in spare parts. *PLoS Biology*. 2, 7: 900- 904.
- Jansen, R. P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M. & Nasmyth, K. (1996) Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687–697.
- Kellis, M., Birren, B. y Lander, E. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 428: 617-624.
- Kimura, M. (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge University Press.

- Kingsbury, J., Sen, N., Cardenas, M. (2015) Branched-Chain Aminotransferases Control TORC1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*. 11, 12: 24.
- Kohlhaw, G. B. (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67:1-15
- Kwast, K.E., Lai, L-C., Menda, N., James, D.T. III, Aref, S. y Burke, P.V. (2002) Genomic analysis of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol* 184, 250–265.
- Lalo, D., Stettler, S., Mariotte, S., Slonimski, P. P. & Thuriaux, P. (1993) Une duplication fossile entre les régions centromériques de deux chromosomes chez la levure. *C.R. Acad. Sci*. 316, 367–373.
- Latchman, D. S. (1998) Eukaryotic transcription factors. Academic Press, San Diego, Cal.
- Lemon, B., Tjian, R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev*. 14:2551–2569.
- Ljungdahl, P., Daignan-Fornier, B. (2012) Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190: 885–929.
- Longtine, M.S., A. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach *et al.*(1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14: 953-961.
- López, G., Quezada, H., Duhne, M, González, J., Lezama, M., El-Hafidi, M., Colón, M., Martínez de la Escalera, X., Flores-Villegas, M., Scazzocchio, C., DeLuna, A. y González, A. (2015) Diversification of Paralogous α -Isopropylmalate Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-Oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 14, 6: 564-577.
- Marcet-Houben, M. y Gabaldón, T. (2015) Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLOS Biology*. 13 (8): 1-26
- Marobbio, C., Giannuzzi, G., Paradies, E., Pierri, C. y Palimeri, F. (2008) α -Isopropylmalate, a Leucine Biosynthesis Intermediate in Yeast, Is Transported by the Mitochondrial Oxalacetate Carrier. *J Biol Chem*. 283: 28445-28453.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., Compagno, C. (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal*. 274: 976-989
- Natarajan, K., Meyer, M., Jackson, B., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. y Marton, M. (2001) Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular And Cellular Biology*. 21, 13: 4347–4368.
- Peñalosa-Ruiz, G., Aranda, C., Ongay-Larios, L., Colon, M., Quezada, H., Gonzalez, A. (2012) Paralogous *ALT1* and *ALT2* retention and diversification have generated catalytically active and inactive aminotransferases in *Saccharomyces*

cerevisiae. *PLoS One*. 7: 1–13.

- Peters, M., Beltzer, J. y Kohlhaw, G. (1990) Expression of the yeast LEU4 gene is subject to four different modes of control. *Arch Biochem Biophys*. 276: 294-298.
- Piškur, J. y Langkjær, R.B. (2004) Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Mol Microbiol* 53, 381–389.
- Piskur, J., Rozpełowska, E., Polakova, S., Merico, A. y Compagno, C. (2006) How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*. 22, 4: 183-186.
- Puria, R. y Cárdenas, M. (2008) Rapamycin bypasses vesicle-mediated signaling events to activate Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Communicative & Integrative Biology*. 1,1: 23-25.
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernández, H., Calcagno, M., Marín-Hernández, A. y González, A. (2008) Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 154: 1656–1667.
- Quezada, H., Marín-Hernández, A., Aguilar, D., López, G., Gallardo-Pérez, J.C., *et al.* (2011) The Lys20 homocitrate synthase isoform exerts most of the flux control over the lysine synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 82: 579-590.
- Ryan, E., Tracy, J., y Kohlhaw, G. (1973) Subcellular Localization of the Leucine Biosynthetic Enzymes in Yeast. *Journal of Bacteriology*. 116, 1: 222-225
- Scannell, D.R., Frank, A.C., Conant, G.C., Byrne, K.P., Woolfit, M., Wolfe, K.H. (2007) Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 8397–8402.
- Schmidt, A., Kunz, J. & Hall, M. N. (1996) TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 13780–13785.
- Smith, M. (1987) Molecular Evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* Histone Gene Loci. *Journal of Molecular Evolution*. 24:252-259.
- Struhl, K., and R. W. Davis, 1981 Transcription of the *HIS3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 152: 535-552.
- Ter Linde, J.J.M., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (1999) Genomic-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 7409–7413.
- Thomson, J. M., Gaucher, E., Burgan, M., De Kee, D., Li, T., Aris, J. y Benner, S. (2005) Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet*. 37(6): 630–635.
- Valenzuela, L., Aranda, C., González, A. (2001) TOR Modulates *GCN4*-Dependent Expression of Genes Turned on by Nitrogen Limitation. *Journal Of Bacteriology*. 183, 7: 2331–2334.

- Weisman, R., Roitburg, I., Nahari, T. y Kupiec, M. (2005) Regulation of Leucine Uptake by tor1 in *Schizosaccharomyces pombe* Is Sensitive to Rapamycin. *Genetics*. 169: 539–550.
- White, R. J. (2001) Gene transcription: mechanisms and control. Blackwell Science, Malden, Mass.
- Wilgen, M. y Tilz, G. (2007) DNA microarray analysis: Principles and clinical impact. *Hematology*. 12:4, 271-287
- Wolfe, K. y Shields, D. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*. 387: 708-713.
- Wolfe, K. (2006) Comparative genomics and genome evolution in yeasts. Comparative genomics and genome evolution in yeasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 361, 1467: 403–412.
- Wolfe, K. (2015) Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLOS Biology*. 13(8): 1-7.
- Wray, G., Hahn, M., Abouheif, E., Balhoff, J., Pizer, M., Rockman, M., Romano, L. (2003) The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 20(9):1377–1419.
- Zarin, T. y Moses, A. (2014) Insights into molecular evolution from yeast genomics. *Yeast*. 31: 233-241.
- Zhang, J. (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 6: 292-298