



00381
1-2 ES

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

FALLA DE ORIGEN

**CARACTERIZACION GENETICA Y FISIOLÓGICA
DE UN GEN (*GUS 2/GCN 5*) QUE REGULA LA
ACTIVIDAD DE GLUTAMATO SINTASA
(GOGAT) DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

P R E S E N T A

M. en C. LUISA ALVARINA ALBA LOIS.

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ALICIA
GONZALEZ MANJARREZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 301 del Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la U. N. A. M.; bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez.

Quiero dedicar especialmente este trabajo a Jorge, compañero de toda mi vida a quien no dejo de querer y admirar siempre y a mi hija Daniela quien llena de experiencias únicas mi vida. Gracias por soportar el tiempo no compartido durante el logro de esta meta.

**No puedo dejar de dedicarle este trabajo a Alicia,
quien hace 25 años me descubrió el mundo de la Ciencia
sorprendiéndome y quien aún hoy sigue sorprendiéndome por su
entusiasmo y dedicación. Gracias, Alice!**

**A mi madre Carmen Lois de Alba y a la memoria de mi padre
José Manuel Alba Gutiérrez, quienes exiliados de su país
desde su juventud, lograron una vida plena en éste que
adoptaron como propio.**

**A la memoria del Dr. Jaime Martínez Medellín,
mi maestro, mi amigo, compañero de tantas experiencias,
quien no debió de irse tan pronto.
Es una gran pena que no viera este trabajo concluido.**

A G R A D E C I M I E N T O S

Quiero señalar mi agradecimiento de una manera muy especial a la Quim. Cristina Aranda, cuya habilidad y conocimiento fueron invaluableles, quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme y cuya paciencia fue determinante para que yo pudiera entender este campo de la genética molecular.

También quiero agradecer a la Dra. Paola Ballario, investigadora de la Università di Roma. "La Sapienza", Roma, Italia; por permitirme pasar una estancia de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular, dentro del convenio CONACyT-Consiglio Nazionale delle Ricerche de la Comisión de la Comunidad Europea C11*-CT91-0898.

Quiero agradecer a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo brindado dentro de los proyectos #IN-201894 y #IN-202293; para compra de equipo y reactivos que redundarán en el desarrollo del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Quiero agradecer al Programa de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado (PADEP) programa # 003330, ya que durante tres años consecutivos recibí apoyo para la realización de este trabajo. Al CONACyT por concederme recursos mediante una Beca Patrimonial para finalizar la tesis doctoral.

Quiero expresar mi reconocimiento y deuda al Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. y a su actual director el Dr. Goerges Dreyfus Cortés, por todo el apoyo brindado para hacer inolvidable mi estancias en dicho Instituto.

Quiero agradecer al Dr. Antonio Peña, quien me permitió trabajar en el Instituto de Fisiología Celular. U.N.A.M., durante la realización de ésta y quien siempre me animó a seguir adelante.

Agradezco al Taller de Fotografía del I.F.C., por la elaboración del material fotográfico y al P. de Biol. José Antonio Hernández Gómez por la reproducción de material fotográfico.

A todos los miembros del Laboratorio 301 Oriente, del I. F. C. quienes siempre estuvieron dispuestos a aclarar mis dudas e hicieron de mi estancia allí una experiencia muy grata.

También mi cariño y agradecimiento a quienes siempre me impulsaron para concluir esta etapa de mi vida: Alice, Annie, Angélica, Nieves, Patricia y Rosaura.

CONTENIDO

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN:

- Biosíntesis de aminoácidos de la familia del glutamato1-3
- Asimilación y biosíntesis de glutamato y glutamina en
S. cerevisiae3-4
- Glutamato sintasa en otros organismos4-7
- Regulación de la biosíntesis de glutamato sintasa (GOGAT) en
Bacillus subtilis8-9
- Control general de la biosíntesis de aminoácidos10-11
- Factores regulatorios *TRANS* que participan en la respuesta
del control general de la biosíntesis de aminoácidos12-23
- Dos activadores transcripcionales de levadura requieren de la
función del producto *Gcn5p* para promover los niveles normales
de transcripción24-27

3. OBJETIVOS28

4 MATERIAL y METODOS:

- Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento29-30
- Construcción de cepas ROMEX 0 y ROMEX 131
- Transformación31
- Determinación de actividades enzimáticas31-32
- Purificación de plásmidos32
- Subclonación de *GUS2/GCN5*32
- Aislamiento de RNA total para análisis de Northern32-33
- Gel de agarosa para RNA total33
- Transferencia a filtro de *Nylon* para análisis de Northern blot33-34
- Obtención de sondas34-35
- Digestión con enzimas de restricción35
- Marcaje de sondas por "Marcaje al azar"35
- Cuantificación de la radioactividad incorporada35
- Hibridación para análisis tipo Northern35-36

-Autorradiografía	36
-Reutilización de filtros de <i>Nylon</i>	36
-Aislamiento de DNA genómico para análisis tipo Southern blot	36
-Digestión de DNA genómico	37
-Transferencia a filtro de <i>Nylon</i> para análisis de Southern blot	37

4. RESULTADOS:

-El glutamato reprime la expresión del gen <i>GLT1</i> que codifica para un monómero que constituye a la GOGAT de <i>S. cerevisiae</i>	38-40
-Clonación y caracterización de un gen que complementa la falta de actividad de glutamato sintasa	40-42
-¿Qué papel juega el producto de <i>GUS2</i> en la expresión de <i>GLT1</i> ?	
¿Tiene algún papel en el efecto represivo mediado por glutamato?.....	43-47
-Efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad de GOGAT	48-52
-Efecto del ayuno de aminoácidos sobre la expresión del RNA mensajero de GOGAT (<i>GLT1</i>)	52-53
-Construcción y caracterización de mutantes interrumpidas en <i>GUS2/GCN5</i>	54-60

5. DISCUSION:

-Regulación de la expresión de <i>GLT1</i> por la fuente de nitrógeno	61-62
-Papel de <i>GUS2</i> en la regulación de la expresión basal de GOGAT	62-65
-Regulación de la expresión de <i>GLT1</i> en condiciones de privación	66-68

6. CONCLUSIONES:

69

7. BIBLIOGRAFIA:

70-74

R E S U M E N

En este trabajo se aborda el estudio molecular y fisiológico de la enzima glutamato sintasa (GOGAT), la cual está involucrada, junto con la glutamino sintetasa (GS) en la síntesis de glutamato, aminoácido fundamental para la formación de otros aminoácidos e importantes moléculas nitrogenadas. La función de las dos enzimas, antes mencionadas, es la asimilación de amonio y su incorporación a moléculas orgánicas.

Basicamente este trabajo se enfoca en conocer más acerca de la función que ejerce el gen *GUS2/GCN5*, el cual se identificó en nuestro laboratorio al complementar una mutante carente de actividad de glutamato sintasa (GOGAT), esta mutante era portadora de una mutación en *GUS2/GCN5*. Esta mutación resultaba en la falta de actividad de GOGAT.

Así mismo, se estudió el efecto de glutamato sobre la actividad y/o expresión del gen correspondiente (*GLT 1*).

Para abordar el problema se diseñaron las siguientes estrategias:

1. Se determinó la actividad enzimática de GOGAT y los niveles de expresión del RNA mensajero de *GLT 1*, en cepas cultivadas en amonio y en glutamato.
2. Se clonó y caracterizó un gen que complementa la falta de actividad de glutamato sintasa (GOGAT), en cepas *gus2*, que resultó ser el gen regulador *GCN5*, previamente descrito.
3. Se determinó la actividad de GOGAT y los niveles de RNA mensajero de *GLT 1*, en cepas silvestres y en cepas con una mutación en *gus2/gcn5*; cultivadas tanto en condiciones de ayuno de aminoácidos (represión), como en condiciones de no-ayuno (desrepresión).

4. Se construyeron mutantes interrumpidas en el gen *GUS2/GCN5* y se determinó su actividad enzimática y los niveles de RNA mensajero *GLT 1*, cuando se cultivan en condiciones normales y en condiciones de ayuno de aminoácidos.

INTRODUCCION

Biosíntesis de aminoácidos de la familia del glutamato.

Un elemento común en todos los aminoácidos es la presencia de su grupo α -amino, este grupo es originado, directa o indirectamente, del amonio via el grupo amino del L-glutamato, (Zubay, 1993).



La aminación directa del α -cetoglutarato dá lugar al glutamato: esta es la manera como muchos microorganismos forman glutamato cuando crecen en un medio que contiene sales de amonio como única fuente de nitrógeno.

Glutamato deshidrogenasa (GDH):

La glutamato deshidrogenasa biosintética de levadura, cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato, dependiente de NADPH como donador de electrones, en este tipo de organismos. Algunos otros presentan dos deshidrogenasas, dependientes de NAD^+/NADH o $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. En algunos casos la enzima dependiente de NADH se considera que juega un papel catabólico, convirtiendo de nuevo al glutamato en α -cetoglutarato y amonio, Figura 1.

En cierto tipo de hongos, se ha observado que la GDH catabólica es inhibida por ATP, CTP y fructosa-difosfato, moléculas indicadoras de una alta carga energética y es estimulada en presencia de AMP como indicador de baja carga energética.

Estudios de la glutamato deshidrogenasa (GDH), en plantas verdes muestran que esta enzima puede utilizar tanto NADH o NADPH como coenzima donadora de electrones en la reacción de desaminación. Parece ser que en

plantas verdes, así como en ciertos hongos y muchas bacterias, que crecen en limitación de amonio, la adquisición del grupo amino del glutamato no proviene del ión amonio, sino que lo toman a través de la glutamina. En este caso la conversión primaria del amonio a nitrógeno orgánico es catalizado por la glutamino sintetasa (GS), (Mifflin y Lea, 1977; Umbarger, 1978).

Glutamino sintetasa(GS):

La glutamino sintetasa es una enzima clave en el flujo de nitrógeno a compuestos orgánicos y su actividad está sujeta a diferentes tipos de control que la célula sensa en respuesta a la necesidad de compuestos nitrogenados.

En *Escherichia coli*, (Stadtman y col. 1972), consta de 12 subunidades idénticas, con un peso molecular de 50 kDa; arregladas simétricamente en dos anillos hexaméricos; la actividad de ésta se regula por un complejo patrón de retroinhibición. Otro mecanismo de regulación de la actividad de la GS, en *E. coli*, es la adenilación reversible, dependiente de ATP, en un residuo tirosil específico de cada subunidad. A medida que la enzima llega a ser más adenilada (1 a 12 grupos AMP/molécula de enzima) ésta comienza a ser menos activa. La reacción de adenilación y su inversa, una deadenilación fosforolítica están reguladas por el suministro de nitrógeno en la célula. Una relación alta de glutamina o de glutamina/ α -cetoglutarato dan a la célula la señal de exceso de nitrógeno y por el contrario, una baja relación α -cetoglutarato/glutamina dan la señal opuesta de limitación de nitrógeno. El exceso de N, provoca la inactivación de GS, así como la limitación de N la activa. Por lo tanto la activación de la GS favorece la incorporación del NH_4^+ en glutamato para sintetizar glutamina, Figura 1.

Glutamato sintasa (GOGAT):

Como se mencionó, la síntesis de glutamato puede ocurrir vía la incorporación de amonio con el α -cetoglutarato por medio de la GDH-NADPH dependiente. Tanto en *E. coli*, como en otros microorganismos y en muchas plantas verdes, la formación de glutamato se lleva a cabo por la aminación del α -cetoglutarato por medio de la glutamato sintasa (GOGAT), esta es una reacción reductiva en la cual el grupo amino no proviene del amonio sino de una “forma activada” que se obtiene del grupo δ -amino de la glutamina, la cual puede ser amidada otra vez y así mantener la síntesis

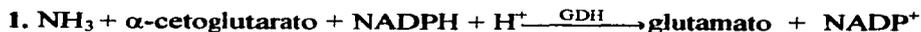
continúa de grupos amino. Sin embargo, esta formación de grupos amino requiere de suministro de energía de enlaces fosfato, por lo que para la célula es una ventaja si la formación de grupos amino puede originarse a una concentración más baja de amonio que la necesaria para la glutamato deshidrogenasa (GDH).

El donador de electrones varía con las diferentes GOGAT's, para las bacterias es NADPH, mientras que para levadura, hongos y otros microorganismos es NADH. En plantas superiores se han reconocido dos GOGAT's, una de ellas específica para ferredoxina.

Asimilación y biosíntesis de glutamato y glutamina en *S. cerevisiae*.

Al igual que muchos otros microorganismos, la levadura *S. cerevisiae* puede utilizar amonio como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto, todos los compuestos nitrogenados de la célula pueden sintetizarse a partir de intermediarios derivados de la degradación de una fuente de carbono como la glucosa y del amonio.

El amonio puede ser asimilado por la glutamato deshidrogenasa dependiente (GDH-NADPH) y por la glutamato sintetasa (GS). Aproximadamente el 88% de todo el nitrógeno celular se deriva del grupo amino del glutamato y el 12% del grupo amino de la glutamina. Existen 3 permeasas, las cuales transportan el amonio al interior de la célula (Grenson, 1983b). Una vez dentro de la célula, el amonio puede reaccionar con α -cetoglutarato y NADPH para formar glutamato o con glutamato y ATP para formar glutamina. Estas reacciones son catalizadas por la GDH-NADPH y por la GS, (reacciones 1 y 2, respectivamente):



La GS cataliza una reacción esencial en el crecimiento en medio mínimo adicionado de glucosa y amonio. Mutantes que carecen de esta enzima únicamente pueden crecer en medios adicionados de glutamina (González y col. 1985). La GDH-NADPH, cataliza una reacción importante pero no esencial para el crecimiento en amonio y glucosa. Mutantes carentes de

GDH-NADPH crecen en MM/glucosa/amonio con la mitad de la velocidad que los organismo silvestres. La capacidad de estas mutantes para utilizar el amonio para la síntesis de glutamato, depende de la acción combinada de la GS y de la glutamato sintasa (GOGAT) que cataliza la reacción 3:



La suma de las reacciones 2 y 3 es equivalente a la reacción 1, aunque la 2 lleva a cabo hidrólisis de ATP y existe una sustitución de NADPH por NADH.

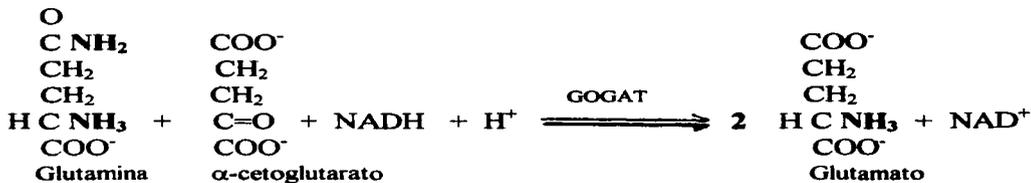
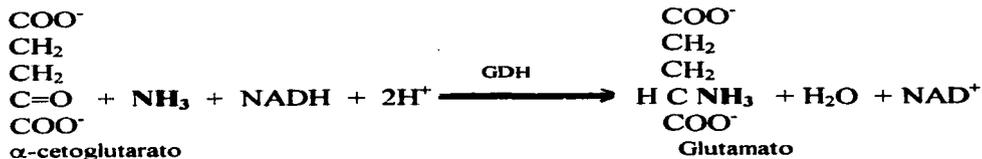
El gen que codifica para la GDH-NADP⁺ dependiente, se ha denominado *GDH1*; la actividad de esta enzima aumenta cuando la levadura se cultiva en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno y disminuye cuando los medios se adicionan con glutamato (Roon y col.1974). Cuando la levadura se priva de glucosa, la GDH-NADP dependiente se inactiva (Mazon y Hemmings, 1979). Cepas que presentan una mutación en aconitasa son completamente incapaces de inducir a esta enzima, lo que sugiere que el α -cetoglutarato o algún intermediario del ciclo de Krebs son moduladores positivos de la actividad de GDH (González y col. 1985).

La GS de *S. cerevisiae* está compuesta de 12 monómeros con un peso molecular de 43 kDa; su expresión se regula por tres sistemas: *GLN3*, *GCN4* y un tercero que responde a la limitación de purinas. El gen estructural de esta enzima ha sido clonado y secuenciado, (Mitchell y Magasanik, 1984).

Glutamato sintasa en otros organismos:

Microorganismos: En organismos fijadores de nitrógeno, la asimilación de amonio se lleva a cabo vía las reacciones catalizadas por glutamino sintetasa (GS) y por glutamato sintasa (GOGAT) como fué sugerido por Nagatani y colaboradores (1971), hace 20 años. Estas vías de asimilación han sido demostradas en un gran número de bacterias. La glutamato sintasa (GOGAT) fué descrita por vez primera en *Klebsiella aerogenes* por Tempest y Meers, (1970). En *E. coli* la GOGAT es una flavoproteína oligomérica con hierro-

FIGURA 1



La entrada del amonio como grupo amino al glutamato por medio de la aminación directa del α -cetoglutarato por el ión NH_4^+ , se lleva a cabo por la glutamato deshidrogenasa (GDH-NADPH) bajo condiciones de alta concentración de amonio. La glutamino sintetasa (GS) incorpora el ión amonio por amidación dando glutamina, esta enzima regula los niveles de asimilación de nitrógeno. La glutamato sintasa (GOGAT) a partir de la glutamina y del α -cetoglutarato y utilizando como cofactor reducido al NADH, dá lugar a dos moléculas de glutamato, (Zubay, 1993).

azufre compuesta por dos diferentes subunidades una pequeña de 53 kDa y otra grande de 135 kDa. La glutamato sintasa (GOGAT) de *Azospirillum brasilensis* es la única enzima aislada de organismos fijadores de nitrógeno, tiene gran similitud con la GOGAT de *E. coli*, aunque presenta algunas diferencias en la composición de aminoácidos y en la secuencia del amino terminal de la subunidad pequeña. Dicha glutamato sintasa también ha sido estudiada, purificada y caracterizada parcialmente en *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus* y *R. sphaeroides*, (Calberg y Nordlung, 1991).

Los niveles de GOGAT en *E. coli* son similares cuando dicha bacteria se crece en amonio entre 4 y 100 mM y un poco más bajos cuando ésta se encuentra en presencia de glutamato como fuente de nitrógeno. La enzima de esta bacteria ha sido purificada y se conoce su secuencia primaria, contiene restos de cisteína; presenta 7.8 moles de flavina (FAD⁺ o FMN⁺), 38.4 moles de hierro y 30.4 moles de azufre con 800 kDa de peso molecular. La saturación de la misma da una curva hiperbólica, su pH óptimo es de 7.6 y sufre inhibición por algunos L-aminoácidos, (Vanoni, 1990 y Miller y Stadtman, 1972).

En cianobacterias se conoce poco de esta enzima, se ha descrito como ferredoxina-GOGAT (Fd-GOGAT) en *Nostoc*, *Anabaena*, *A. cylindrica* y en heterocistos de *Anabaena sp.* y otros (Márquez y col. 1992).

Plantas superiores:

La glutamato sintasa (GOGAT) cataliza la transamidación del nitrógeno amido de la glutamina al α -cetoglutarato para formar dos moles de glutamato. A la par con la glutamino sintetasa (GS), estas dos enzimas forman la principal, y quizá, la única ruta de asimilación de amonio en plantas superiores, (Chen y Cullimore, 1988). La GS es la responsable de la asimilación inicial de amonio a glutamina y como las dos enzimas son dependientes, una de otra, para la obtención de sustratos, sus actividades constituyen lo que se conoce como el ciclo de la glutamato sintasa (Mifflin y Lea, 1977). El amonio en las plantas superiores es derivado, ya sea de la fuente primaria de nitrógeno en plantas (amonio, nitratos, y para leguminosas

dinitrógeno), ya sea a partir de un número de vías internas de nitrógeno tales como la fotorrespiración, el catabolismo de aminoácidos y el metabolismo de fenilpropanoide. El ciclo GOGAT por tanto, es esencial no solo para la asimilación primaria de nitrógeno, sino también para mantener la economía del nitrógeno en plantas superiores, (Chen y Cullimore, 1988). En plantas superiores dos tipos de GOGAT han sido purificadas y caracterizadas; una de ellas dependiente de ferredoxina como reductante (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1) y otra que utiliza como cofactor NADPH (NADPH-GOGAT, EC 1.4.1.14). Se ha considerado a las dos enzimas como proteínas inmunológicamente diferentes porque el antisuero probado contra Fd-GOGAT, no cruza con la NADH-GOGAT de hojas etioladas y de tejido de raíz (Susuki y col. 1982; Hayakawa y col. 1992).

La Fd-GOGAT es un componente importante de plantas verdes, se localiza principalmente en el estroma de cloroplastos. Se ha demostrado en mutantes carentes de Fd-GOGAT, que dicha enzima es la responsable del recambio de glutamato durante la fotorrespiración (Kendall y col 1986; Somerville y Ogren, 1980). Esta enzima ha sido purificada en varias especies de plantas y esta caracterizada. También se ha reportado la producción de antisuero contra la Fd-GOGAT a partir de la proteína purificada de hojas verdes de arroz, cebada y tomate. En hojas de maíz se ha logrado sintetizar el cDNA que codifica para esta ferredoxina; de tal suerte que a la fecha se cuenta con información concerniente a la Fd-GOGAT en plantas verdes, suficiente para conocer más acerca de su fisiología, de sus propiedades cinéticas, además de estudios sobre inmunología, inmunocitología y de regulación (Sakakibara y col. 1991). En comparación con la Fd-GOGAT, poco se sabe de la NADH-GOGAT en tejidos vegetales, la razón es la falta de atención que se ha tenido en este campo, a excepción de los trabajos hechos en nódulos de leguminosas, (Anderson y col. 1989). La actividad enzimática de ésta GOGAT es mucho menor aunque ha sido medida en tejidos no verdes, como raíces (Susuki y col. 1982), plántulas etioladas y en células en cultivo (Matoh y Takahashi, 1982). Ha sido purificada parcialmente a partir de brotes de chícharo y hojas de tomate y de endospermo de maíz, descrita como una flavoproteína monomérica con un peso molecular 220 kDa, (Avila y col. 1987).

Regulación de la biosíntesis de glutamato sintasa (GOGAT) en *Bacillus subtilis*:

La glutamato sintasa (GOGAT), es una de las enzimas claves en el metabolismo del nitrógeno en *Bacillus subtilis*. Cataliza la síntesis de glutamato y junto con la glutamino sintetasa (GS), es la responsable de la asimilación de amonio en compuestos orgánicos. La actividad de GOGAT se regula por la disponibilidad de su fuente de nitrógeno; ésta es alta en células creciendo en presencia de amonio como fuente de nitrógeno y baja en células creciendo en presencia de glutamato como única fuente de nitrógeno, (Pan y Coote, 1979; Schreider y col. 1982). Las variaciones observadas en la actividad enzimática de GOGAT se deben a cambios en la tasa de síntesis de sus mensajeros y a los niveles, en estado estacionario, de los transcritos de *GltA* y *GltB*. La glutamato sintasa ha sido aislada y purificada en *B. licheniformis* (Schreider y Bernlohr, 1984) y consta de dos subunidades, una de 158 kDa y otra de 54kDa, proponiendo a ambas como los productos génicos de *GltA* y *GltB* respectivamente, (Deshpande y Kane, 1980). Ha sido postulado por Bohannon y col. (1989), que la expresión del promotor de *GltA*, esta regulada por el producto de un tercer gen denominado *GltC*.

Dependiendo de la fuente de nitrógeno disponible, los genes para la glutamato sintasa (*GltA* y *GltB*) requieren de un factor *trans* positivo el cual está codificado en el gen *GltC*. Esta región es transcrita a partir de un promotor que está distante pero sobrelapado con el promotor de *GltA*. Al aumentar la expresión del promotor de *GltA*, el producto de *GltC* regula negativamente su propia transcripción de tal forma que es independiente de la fuente de nitrógeno, (Bohannon y Sonenshein, 1989).

El modelo propone que el producto GltCp se ligue a los sitios, dentro de las regiones de los promotores *GltA/GltC*, de tal forma que se limita el inicio de la transcripción desde su propio promotor, de manera que se mantiene una baja pero constante concentración intracelular de su propio transcrito y de su propio producto. Bajo condiciones limitantes de glutamato, ocurre un cambio conformacional en el producto GltCp, el cual estimula la unión de la RNA polimerasa con el promotor de *GltA*, aumentando, por tanto, la transcripción de los genes estructurales de la glutamato sintasa (*GltA* y *GltB*). El cambio conformacional en GltCp no altera ni sus propiedades de unión al DNA, ni su habilidad de reprimir la transcripción de *GltC*. El ocultamiento del promotor no explicaría el papel que juega el producto GltCp en la regulación de la transcripción de *GltA*, ya que la expresión de *GltC*, no varía bajo condiciones

en las cuales se altera la expresión de *GltA* hasta 10 veces, como por ejemplo en células creciendo en amonio *versus* creciendo en glutamato, (Bohannon y Sonenshein, 1989).

La idea de que el producto GltCp estimula la transcripción del promotor de *GltA* por interactuar con la RNA polimerasa es consistente con la propuesta de Ryu y colaboradores, quienes postulan que mutantes Rif^r RNA polimerasa tienen reducida la actividad de GOGAT, (Ryu, 1978; Ryu y Takayanagi, 1979). Aún no se sabe con certeza si los genes contiguos *GltA* y *GltB* constituyen un operón, de tal suerte que la regulación por el producto GltCp sobre la expresión de *GltB* podría ocurrir en el promotor de *GltA* o en un promotor separado de *GltB*, en cualquier caso el mecanismo de acción del producto GltCp sería equivalente.

Mutantes en el gen *GltC* muestran un decremento significativo en la expresión de *GltA*, aunque ésta varía escasamente su respuesta a cambios con diferentes fuentes de nitrógeno. La idea anterior lleva a la posibilidad de que exista un factor adicional que actúa en concordancia con el producto GltCp, el cual informaría a la célula de la carga de glutamato intracelular. No se sabe exactamente cual sería el metabolito que informara al producto GltCp de la carga de glutamato dentro de la célula.

Bohannon y colaboradores (1989), han secuenciado el gen *GltC* en *B. subtilis*, y comparando su secuencia proteica en un banco de datos encontrando similitud con otras proteínas como LysR, CysB y LlvY de *E. coli* y NodD de *R. meliloti*, (Henikoff y col. 1988). Recientemente se ha reportado que estas proteínas pertenecen a un grupo de activadores proteicos en bacterias, conocidos como la familia LysR e incluyendo al producto GltCp como un miembro de esta familia (Henikoff y col. 1988).

Control general de la biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*.

La regulación de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de aminoácidos involucra una interacción compleja de varios mecanismos de control. La mayoría de estos genes están sujetos a un sistema de regulación general denominado "Control General de Aminoácidos" (GCN). Este sistema aumenta la expresión transcripcional de dichos genes en condiciones de ayuno de dichas moléculas. El producto del gen *GCN4* es el regulador positivo de la expresión génica en este sistema. Por otro lado, muchos genes de los que participan en la biosíntesis de aminoácidos están sujetos a mecanismos específicos de regulación de cada vía que reducen la expresión de alguna enzima, siempre y cuando, el producto final de la vía este presente en el medio. En algunos casos, la represión específica de una vía puede anular la desrepresión mediada por *GCN4*, bajo condiciones de ayuno, cuando el producto de una vía particular no es limitante.

Se conocen 35 genes, sujetos a este control general, los cuales pertenecen a 12 diferentes vías biosintéticas de aminoácidos. La transcripción de estos genes, en respuesta a una señal de ayuno de cualquier tipo de aminoácidos, se estimula de 2 a 10 veces (Tabla 1) (Hinnebush, 1992).. Como se observa en la Tabla 1, no todas las enzimas pertenecientes a una vía biosintética están sujetas a este control; aunque las que sí lo están presentan diferentes grados de desrepresión, siendo mayor para unas vías que para otras. Dado que *S. cerevisiae* es capaz de sintetizar los 20 aminoácidos para construir sus proteínas, la respuesta a este control general no se observa en cepas silvestres crecidas en MM, la respuesta de GCN se puede observar en: i) cepas que tienen alterada la capacidad de sintetizar algún aminoácido, ii) cuando se cultivan las células en presencia de un inhibidor, el cual actúa sobre una enzima específica, de una vía biosintética de aminoácidos en particular, como el 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) que es un inhibidor competitivo de la enzima imidazol glicerol-p-dehidratasa que codifica para el gen *HIS 3*, en la vía de biosíntesis de histidina, o iii) cultivar en MM una cepa, portadora de una mutación en un gen que corresponda a una enzima biosintética, la cual produzca una proteína con una actividad enzimática muy baja o residual. La ventaja de éstas dos estrategias es que las células permanecen capaces de crecer y dividirse, aunque las velocidades decrecen debido a la imposición de la condición de ayuno, (Niederberger, 1986).

TABLE 1 Enzimas biosintéticas de aminoácidos sujetas al control general de aminoácidos (GCN)

Vía	Enzimas	Gen	Desrepresión observada en respuesta		
			Ayuno	mutación en <i>gcd</i>	
Trp	Antranilato Prib-transferasa (EC 2.4.2.18)	<i>TRP 4</i>	+	+	
	Antranilato sintasa (EC 4.1.3.27)	<i>TRP 2</i>	+	+	
	Indoleglicerol-P sintetasa (EC 4.1.1.48)	<i>TRP 3</i>	+	+	
	Triptófano sintasa (EC 4.1.1.48)	<i>TRP 5</i>	+	+	
	Prib-antranilato isomerasa	<i>TRP 1</i>	-	-	
Trp/Phe/Tyr	DHAP sintasa (4.1.2.15)	<i>ARO2/ ARO3</i>	-	n d	
Phe/Tyr	Cofamato nitasa	<i>ARO 7</i>	n d	-	
	Arginin succinato sintasa (E.C 6.3.4.5)	<i>ARG 1</i>	+	n d	
Arg	Acetilglutamato sintasa	<i>ARG 2</i>	+	nd	
	Acetilglutamato cinasa (E.C 2.7.2.8)	<i>ARG 5, 6</i>	+	n d	
	Acetilglutamil-P reductasa (E.C 1.2.1.38)	<i>ARG5, 6</i>	+	n d	
	Acetil ornitina aminotransferasa	<i>ARG 8</i>	+	n d	
	Ornitrin carbamoil transferasa (OTCase)	<i>ARG 3</i>	+	+	
	Arginin succinato liasa (E.C 4.3.2.1)	<i>ARG 4</i>	+	n d	
	Acetilornitrin acetyltransferasa	<i>ARG 7</i>	+	n d	
	Carbamoil-P sintasa	<i>CPA 1, 2</i>	+	n d	
	His	ATP-PR transferasa (E.C 2.4.2.17)	<i>HIS 1</i>	+	n d
		Histidinol deshidrogenasa (E.C 1.1.1.23)	<i>HIS 4C</i>	+	+
		PRib-AMP ciclohidrolasa (E.C 3.5.4.19)	<i>HIS 4A</i>	+	+
		Imidazol gheerol-P dehidratasa (E.C 4.2.1.19)	<i>HIS 3</i>	+	+
Histidinol-P aminotransferasa (E.C 2.6.1.9)		<i>HIS 5</i>	+	n d	
Lys	Histidinol-P fosfatasa (E.C 3.1.3.15)	<i>HIS2</i>	+	+	
	Homocitrato sintasa (E.C 4.1.3.21)		+	+	
Lys	Sacaropina deshidrogenasa (E.C 1.5.1.7)	<i>LYS 1</i>	+	n d	
	Sacaropina reductasa	<i>LYS 9</i>	+	n d	
	α -aminoacido pirato reductasa (E.C 1.2.1.319)	<i>LYS 2, 5</i>	+	+	
	Homoacnitasa		+	n d	
	Homoisocitrato deshidrogenasa (E.C 1.1.1.155)		+	n d	
Ile/Val	Lisil-TRNA sintetasa (E.C 6.1.1.6)	<i>KRS 1</i>	+	n d	
	Transaminasa B (E.C 2.6.1.42)		+	+	
	Treonina hidratasa (deamidasa E.C 4.2.1.16)	<i>ILV1</i>	+	+	
Ile/Val	Acetolactato sintasa (E.C 4.1.3.18)	<i>ILV2</i>	+	n d	
	Acetohidroácido reductoisomerasa	<i>ILV 5</i>	+	+	
	Leu	Isolucil-TRNA sintetasa (E.C 6.1.1.15)	<i>ILS 1</i>	+	+
α -IPM sintasa (E.C 4.1.3.12)		<i>LEU 4</i>	+	+	
α -IPM-isomerasa		<i>LEU 1</i>	+	+	
Gln	β -IPM Deshidrogenasa (E.C 1.1.1.85)	<i>LEU 2</i>	-	-	
	Proteína Activadora transcripcional	<i>LEU 3</i>	+	n d	
	Glutamina sintetasa (E.C 6.3.1.2)	<i>GLN 1</i>	+	+	
Glu	Glutamato deshidrogenasa-NAD (EC 1.4.1.2)	<i>GIDH 2</i>	+	n d	
	Glutamato deshidrogenasa-NADP (EC 1.4.1.3)	<i>GIDH 1</i>	-	n d	
Thr/Met	Asparto cinasa (E.C 2.7.2.4)	<i>HOM 3</i>	+ ^a	+	
Thr	Aspartato semialdehído deshidrogenasa	<i>HOM 2</i>	+	+	
Met	Homoserina cinasa	<i>THR 1</i>	+	-	
	ATP sulforilasa	<i>MET 3</i>	?	7 ^b	
	APS cinasa	<i>MET 1, 4</i>	-	7 ^b	
	Sulfito reductasa (E.C 1.8.99.1)	<i>MET 5</i>	+ ^c	+	
	Homocisteína metil transferasa	<i>MET 6</i>	?	7 ^b	
	Metionil-TRNA sintetasa	<i>MEN 1</i>	+	+	

^adesrepresión dependiente de Gcn4p en el mRNA de *HOM3* en respuesta a ayuno de histidina y su desrepresión constitutiva en una cepa *gcd-101* sugiere fuertemente a favor de que *HOM3* esta siendo sujeto al control general.^a

^bUna desrepresión convincente de mRNA se observó en una mutante *gcd-101*, solamente bajo condiciones de represión de metionina.

^cSi bien la transcripción de *MET5* parece estar regulada por el control general, la actividad de la enzima sulfito reductasa nose ha observado que responda a ayuno de histidina. Sin embargo la actividad de esta enzima es afectada por mutaciones en *MET10*, *MET18*, *MET19* y *MET26*, en adición a *MET5*, y la relación gen-enzima no es clara, (Jones y Fink, 1982). n.d.= no determinado.

Factores regulatorios TRANS que participan en la respuesta del control general de la biosíntesis de aminoácidos.

A. Jerarquía de factores que regulan la transcripción de los genes de biosíntesis de aminoácidos en respuesta a la disponibilidad de estas moléculas.

Reguladores positivos y negativos en el control general: Han sido obtenidas mutantes, en genes no ligados, que alteran la expresión de enzimas sujetas al control general de aminoácidos. Con base en su fenotipo estas mutaciones son de dos clases: GCN y GCD. Mutaciones en cualquiera de los 9 genes (*GCN1-9*) son recesivas y alteran la desrepresión enzimática bajo condiciones de ayuno de aminoácidos. Mutaciones en cualquiera de los 12 genes *GCD*, control general de desrepresión, (*GCD1-13*; el *GCD2* es el mismo que *GCD12*) aumentan la expresión de las enzimas sujetas al control general bajo condiciones de no-ayuno. Las mutaciones *gcn⁻* (control general no desreprimible) han sido estudiadas con fusiones génicas *lacZ* para estudiar la expresión del gen *His4* en particular, (Hinnebush, 1992).

Como las mutaciones *gcn* producen un fenotipo no desreprimible, sugiere que los productos de los genes *GCN* son los reguladores positivos. Los nueve genes *GCN* regulan, a nivel de transcripción, la síntesis enzimática aumentando los niveles del RNA mensajero, (Hinnebush, 1988). El fenotipo *gcn* de no llevar a cabo la desrepresión, las hace ser más sensibles que una cepa silvestre a diferentes condiciones de crecimiento en las cuales la biosíntesis de algunos aminoácidos está inhibida, bajo condiciones como: (1) la presencia de análogos de aminoácidos, (2) la presencia de una mutación portadoras en el gen estructural de una enzima de la biosíntesis en cuestión y (3) un desbalance de aminoácidos.

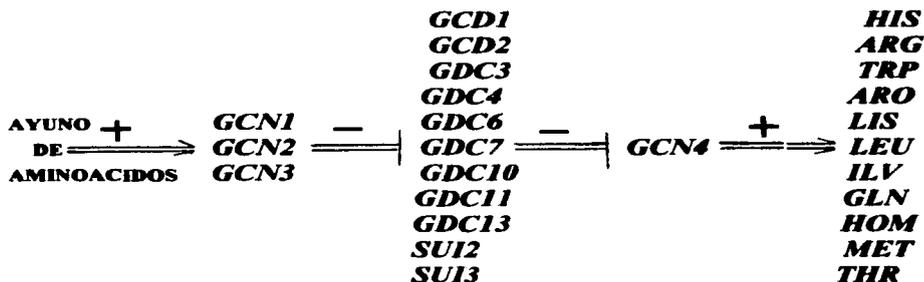
El fenotipo de mutantes *gcd* (control general desreprimible), sugiere que los productos de los genes *GCD* actúan como reguladores o efectores negativos de la expresión génica. La desrepresión en la mayoría de las mutantes *gcd*, no parece ser el resultado de la disminución de la síntesis de aminoácidos o la activación de los t-RNA, (Hill y Hinnebush, 1988).

El producto *Gcn4p* es el regulador positivo en el control general de aminoácidos: los genes *GCN* se han dividido en dos clases en base a sus interacciones con las mutantes *gcd*. Con una sola excepción, todas las dobles

mutantes *gcn4/gcd*, examinadas a la fecha, tienen un fenotipo Gcn^- , siendo incapaces de desreprimir las enzimas sujetas al control general bajo condiciones de ayuno. (Hinnebush y Fink, 1983a; Harashima y Hinnebush, 1986; y Niederberger y col. 1981). Estos resultados demuestran que la función del regulador positivo *GCN4* es indispensable para la desrepresión, aún en ausencia de los factores de regulación negativa *GCD*. Porque la desrepresión asociada con las mutaciones *gcd* es completamente dependiente de la función de *GCN4*, lo anterior nos sugiere que los factores *GCD*, arriba mencionados, actúan como reguladores negativos en el sistema de control general por antagonismo o represión del producto *Gcn4p*, mostrando por tanto una relación epistática para todas las combinaciones de mutantes *gcn4/gcn*, con la excepción de *gcd5* y *gcd8*. (Figura 2).

Analizando la Figura 2 podemos decir que *GCN4* codifica para un regulador positivo, el cual actúa directamente uniéndose a un gen estructural, bajo el control general de biosíntesis de aminoácidos; y que los productos *Gcn1p*, *Gcn2p*, y *Gcn3p* actúan indirectamente por desrepresión de *GCN4* o activación del producto *Gcn4p* en células sometidas a condiciones de ayuno de aminoácidos. (Hinnebush y Fink 1983a). El gen *GCN4* codifica para una proteína que se liga al DNA reconociendo secuencias reguladoras específicas localizadas en la región promotora, de los genes particulares que regula, estimulando su transcripción. Se ha observado la expresión de la actividad de β -galactosidasa, a partir de la fusión traduccional *GCN4-lacZ*, la cual se desreprime cerca de 10 veces en cepas tipo silvestre, en respuesta a condiciones de ayuno y que esta desrepresión no se alcanza en mutantes *gcn2* y *gcn3* (Hinnebush, 1984 y Thireos y col. 1984).

FIGURA 2



Jerarquía de los factores regulatorios de la transcripción relacionados con el control general de aminoácidos. Las flechas con señales positivas (+) indican interacciones de estimulación, las barras con señal negativa (-) indican interacciones de represión o antagonistas. Los productos de los genes *GCN* son efectores positivos; los genes *GCD* son efectores negativos. El producto Gcn4p estimula la expresión de 12 diferentes vías biosintéticas de aminoácidos, indicando que *GCN4* corresponde al gen estructural. Ver Tabla 1 para relacionar cada gen con su enzima correspondiente, (Hinnebusch, 1992).

B. Regulación de la expresión de *GCN4* a nivel traduccional.

Una región río arriba (uORF-upstream open reading frames-) del marco de lectura abierta del gen *GCN4*, regula la traducción de su RNA mensajero en respuesta a la disponibilidad de aminoácidos. Ha sido reportado que los activadores o reguladores positivos *Gen2p* y *Gen3p*, así como los reguladores negativos *Gcd1p*, *Gcd2p*, *Gcd10p*, *Gcd11p* y *Gcd13p* regulan la expresión de *GCN4*, a nivel traduccional, a través de un mecanismo relacionado con cuatro sitios cortos localizados en la región líder del RNA mensajero de *GCN* del marco de lectura abierta (uORFs), (Hinnebush, 1992).

La mayoría de los RNA mensajeros de levaduras, estudiados a la fecha, no contienen un solo uORF, más aún, la inserción de tan solo una de estas regiones en la zona líder del RNA mensajero reduce invariablemente la traducción de secuencias codificadas río abajo, (Hinnebush, 1992). Se sugiere que el modelo de registro de la iniciación para la traducción propuesto en muchos eucariontes, funciona también para levadura, (Kozak, 1989). Este modelo propone que, la subunidad ribosomal 40S se liga al extremo 5' del RNA mensajero y recorre hacia la dirección 3' hasta encontrar el primer codón de inicio, AUG, llevando a cabo la iniciación de la traducción. De manera que cuando un uORF está presente en una región del RNA mensajero, la traducción comienza preferentemente en este sitio y evita la iniciación hacia los codones de inicio situados río abajo, (Kozak, 1989).

Con estudios de deleciones en los 4 uORFs (Hinnebush, 1984 y Thireos y col 1984), o por medio de mutaciones puntuales en los cuatro codones de inicio ATG (Mueller y Hinnebush, 1986) se ha demostrado la alta expresión constitutiva de *GCN4* independiente de los factores *GCN* y *GCD*, los cuales normalmente regulan la expresión de *GCN4*. Estas mutaciones no alteran el extremo terminal 5' o la abundancia del RNA mensajero de *GCN4*, lo cual implica que los uORF inhiben la expresión de *GCN4* a nivel traduccional, debido a una restricción en el recorrido de los ribosomas desde el extremo 5' del transcripto hacia el codón de inicio de *GCN4*.

En la Figura 3 se esquematizan algunas de las construcciones hechas alterando la región río arriba de la zona líder del RNA mensajero del gen *GCN4*, en todos los casos la secuencia líder esta fusionada con la secuencia *lac-Z* al codón 55 del gen *GCN4*. En esta figura podemos observar que al estar presentes, los uORF 1, 3 y 4 se reprime la traducción de *GCN4*;

mientras que la presencia del uORF 3 o del uORF 4 se reduce la traducción de dicho gen en un porcentaje bajo con respecto a lo que ocurre en ausencia de todos los uORF, donde se observan los máximos niveles de expresión de la actividad de β -galactosidasa.

En un gen tipo silvestre el uORF 1 actúa como un elemento de control positivo; ya que estimula la expresión de *GCN4* unicamente en presencia de uORF 3 o 4, pareciendo ser la función positiva de este uORF 1 capacitar a los ribosomas a superar la barrera traduccional impuesta por los uORF 3 y 4 e iniciar la traducción en el codón de comienzo de *GCN4*, cuando las células están deprivadas de aminoácidos.

Un alelo de *GCN4*, conteniendo solamente los uORF 1 y 4 muestra una regulación cercana a la silvestre, lo cual indica que los uORF 2 y 3 son elementos redundantes negativos de la expresión del gen en cuestión, (Mueller y Hinnebusch, 1986).

Análisis mutacionales han mostrado diferencias funcionales entre los uORF 1 y uORF 4, sobretudo en las regiones que flanquean dichas secuencias, en la Figura 3 se observa este fenómeno en las construcciones 6 a 9 en las cuales cada inserción o reemplazamiento tiene un efecto diferente sobre la expresión de *GCN4*, en algunos casos aumentando la expresión y en otros disminuyéndola. En presencia de los uORF 1 y de los uORF 4 la traducción termina de forma diferente y la reanudación o continuación del registro ribosomal y la reiniciación río abajo puede ocurrir de una manera muy eficiente después de la terminación del uORF 1 pero no después de la traducción del uORF 4. Desde este punto de vista, el cambio en una región terminal del uORF 1 con la normalmente presente en uORF 4 elimina la reiniciación río abajo desde el uORF 1. Como esta alteración elimina la capacidad del uORF 1 de estimular la traducción de *GCN4*, ha sido propuesto que la función positiva del uORF1 recae en su capacidad de permitir a los ribosomas reanudar el registro siguiendo su propia traducción y que estos ribosomas son capaces de cruzar los uORF 2, 3 y 4 bajo condiciones de ayuno y traducir a *GCN4*, (Mueller y col. 1987, Tzamarias y Thireos, 1988 y Williams y col. 1988).

Al alargar el uORF4 y hacerlo sobrelapar con el inicio de *GCN4*, no se afecta considerablemente la expresión, lo que puede sugerir que aquellos ribosomas que traducen *GCN4*, no han traducido previamente el uORF 4.

Existe evidencia de que los ribosomas fallan al reconocer los codones de inicio de los uORF 2, 3 y 4 después de la traducción del uORF 1 y esto es porque el intervalo de tiempo que toma el registro de los uORF 1 a uORF 4

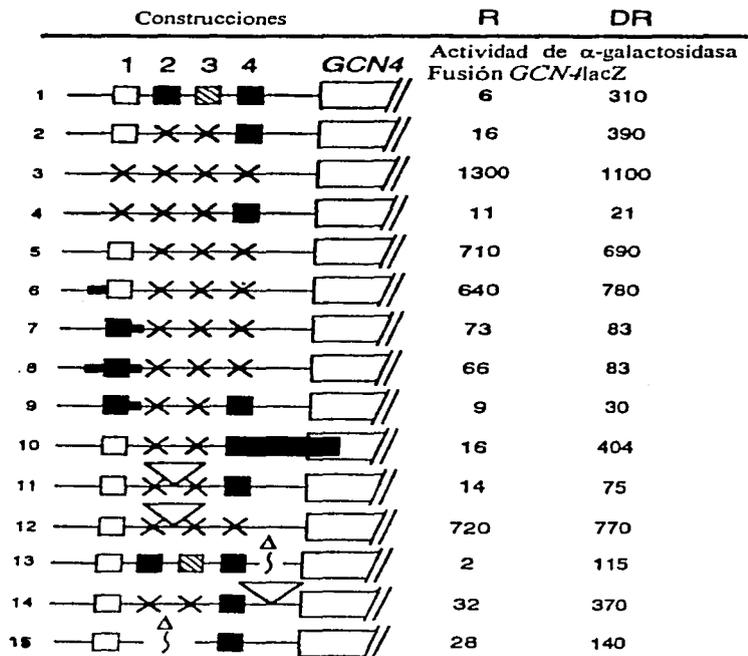
es insuficiente, bajo condiciones de ayuno, para reformar el complejo de iniciación con la subunidad ribosomal 40S. Bajo condiciones normales de crecimiento, los ribosomas deberían recuperarse más rápidamente y poder reiniciar la traducción de los uORF 2, 3 y 4 después de terminar la del uORF 1, (Abastado, 1991b). De acuerdo con este modelo, el control traduccional de *GCN4* resulta en un incremento en tiempo de registro para una reiniciación eficiente en células en ayuno de aminoácidos *versus* células no ayunadas. Datos experimentales concuerdan con esta hipótesis en el sentido de que inserciones de nucleótidos, las cuales aumentan progresivamente la distancia entre los uORF 1 a uORF 4, conducen paso a paso a una reducción en la traducción de *GCN4* bajo condiciones de ayuno. Es de hacer notar que cuando el espacio entre los uORF 1 a los uORF 4 se incrementa casi al mismo tamaño que el intervalo entre el uORF 1 a *GCN4*, presente en la cepa silvestre, la desrepresión de *GCN4* se elimina casi por completo. Este es el resultado esperado si el tiempo que toma a una cepa silvestre registrar del uORF 1 a *GCN4* es suficiente para que la mayoría de los ribosomas reinicien la traducción, aún en células sometidas a condiciones de ayuno de aminoácidos. Cada vez que el intervalo entre uORF 1 a uORF 4 se aumenta, en cuanto a distancia, la mayoría de los ribosomas serán competentes para reiniciar mientras alcanzan el uORF 4, después de traducir este uORF, estos ribosomas no pueden reiniciar otra vez en *GCN4*.

De igual manera una delección (145 a 166 nucleótidos) en la misma región reduce la expresión de *GCN4*, (construcción 13), por la razón de que una distancia menor entre los uORF 1 y *GCN4*, causa que los ribosomas no recuperen la habilidad de reiniciar para poder traducir a *GCN4*, (Dever, 1992).

Modelo para el mecanismo molecular del control traduccional de *GCN4*.

Estudios bioquímicos en mamíferos han arrojado datos que muestran que la fosforilación del factor de iniciación de la traducción, eIF-2 α en su Ser-51, regula la iniciación de la traducción, (London y col. 1987; Hershey, 1991). En levadura se ha demostrado que el factor eIF-2 está relacionado directamente en la selección del codón de inicio AUG por el ribosoma durante el proceso de registro del mismo (Donahue y col., 1988; Cigan y col. 1989). Estas dos propiedades del factor eIF-2 y los resultados obtenidos de análisis mutacionales de la región líder del RNA mensajero de *GCN4*, han servido para integrarlos y proponer un modelo molecular de control traduccional para dicho gen, de acuerdo al cual la fosforilación de eIF-2 α , en células bajo condiciones de ayuno, cambia la utilización de los sitios de la

FIGURA 3



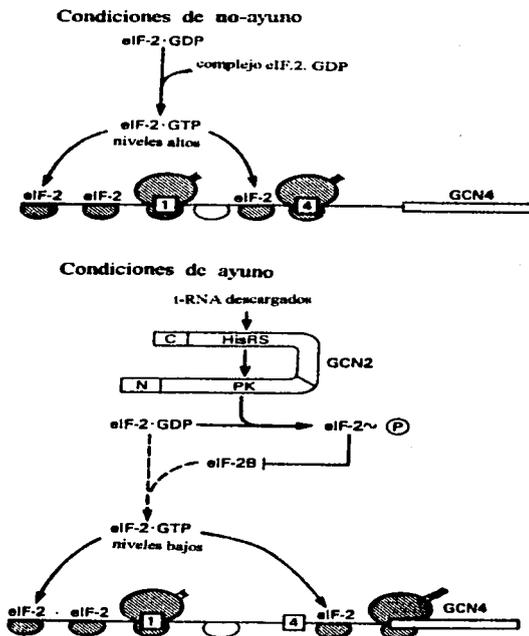
Efectos mutacionales en la zona líder del mRNA de *GCN4* para la expresión de β -galactosidasa de una fusión *GCN4-lacZ*, bajo dos condiciones (R) represión y (DR) desrepresión para genes sujetos al control general de aminoácidos. En el lado izquierdo de la Figura se muestra las secuencias de la zona líder de *GCN4* con sus uORF (cuadros marcados del 1 al 4) y el principio de la secuencia codificable para *GCN4* (cuadro marcado *GCN4*), en diferentes construcciones. Las cruces (X) sobre la región líder indican los puntos de mutación en los codones de inicio de los uORF. Las construcciones 6-9, muestran los rectángulos sólidos unidos al primer uORF (uORF 1 ó 4), que indican 16 nucleótidos localizados río arriba y 25 nucleótidos normalmente situados río abajo del uORF4. Un rectángulo largo representa la remoción del codón de término del uORF4 y dos codones de término más situados río abajo (línea 10). Las construcciones de las líneas 11, 12 y 14, con triángulos invertidos, indican las inserciones de 144 a 146 nucleótidos, los triángulos Δ , indican deleciones de 144 a 165 nucleótidos respectivamente, línea 13 y 15. En todas las construcciones las secuencias líder de *GCN4* están fusionadas con secuencias *lacZ* al codón 55 del gen *GCN4*. (Abastado y col. 1991a).

iniciación de la traducción desde uORFs 2, 3 y 4 al del codón de inicio AUG para *GCN4*, (Figura 4).

En condiciones de no-deprivación de aminoácidos, los ribosomas inician el registro en el uORF 1 en la región líder del RNA mensajero de *GCN4*, termina la traducción del codón de término de uORF 1 y cerca del 50% de las subunidades ribosomales 40S se mantienen asociadas al RNA mensajero y reanuda su registro río abajo. La mayoría de estas subunidades recuperan el complejo ternario consistente en el factor eIF-2, GTP y Met tRNA^{Met}, antes de alcanzar el codón de inicio de los uORFs 2, 3 o 4 y reiniciar la traducción de uno de estos uORFs. Los ribosomas del RNA mensajero siguen la traducción a los uORF 2, 3 o 4, se disocian y así ninguno alcanza el codón de inicio AUG de *GCN4* (Dever y col. 1992).

En condiciones de ayuno de aminoácidos, los RNA de transferencia descargados, como respuesta a la condición impuesta, se acumulan y estimulan la actividad de cinasa del producto Gcn2p, por interferencia con un dominio de la histidil-tRNA sintetasa. La proteína Gcn2p fosforila a la subunidad α del factor eIF-2 en la Ser-51. La fosforilación de eIF-2 α reduce a cantidad de este factor activo disponible para la formación del complejo ternario, por medio de una inhibición parcial del factor eIF-2B, ya que un factor intercambiador de guanidina reemplaza GDP por GTP en el eIF-2 durante cada vuelta de iniciación. El alto peso molecular del complejo *Gcdp* podría ser el equivalente, en levadura, al factor eIF-2B, lo que explicaría por que mutaciones en las subunidades eIF-2 y en los factores *GCD* presentan el mismo efecto de desrepresión en la traducción de *GCN4*. Una disminución en la cantidad de los complejos ternarios, observados bajo condiciones de deprivación, provoca que cerca del 50% de las subunidades 40S, registrando río abajo, después de terminar la traducción del uORF1, no logre religarse al complejo ternario conteniendo el RNA de transferencia iniciador antes de alcanzar el uORF 4 y de esta manera ignora los codones de inicio de los uORF 2, 3 y 4. La mayoría de estas subunidades se ligan al complejo ternario antes de que ellos alcancen el codón AUG de *GCN4* y reinician la traducción en ese mismo lugar, (Dever, 1992 y Kozak, 1989).

FIGURA 4



Modelo que explica el papel que juega el factor de iniciación (eIF-2) en el control transcripcional de *GCN4*. Se observa el mRNA de *GCN4* con sus uORF 1 y 4, (los uORF 2 y 3 se omiten ya que no son indispensables para la regulación) se muestran las secuencias que codifican el inicio de *GCN4* como rectángulos. La subunidad ribosomal 40S se adhiere al mensajero cuando se asocia al factor eIF-2 y se hace competente para iniciar la transcripción formando un complejo ternario (subunidad 40S, eIF-2 GTP y Met-tRNA^{Met}) las subunidades sin sombreado no son competentes; la subunidad 80S para traducir el mensaje se adhiere al mensajero. Bajo condiciones normales, de no ayuno, el factor eIF-2·GDP se recicla rápidamente a eIF-2·GTP, elevando los niveles de éste y así formando el complejo ternario. El complejo ternario se reune nuevamente con la subunidad 40S y registra hacia río abajo hasta terminar la lectura del uORF1, llevando a la reiniciación del uORF4, en cuanto termina la lectura del uORF4 ya no se lleva a cabo la reiniciación de *GCN4*, probablemente porque los ribosomas se disocian del mensajero. Bajo condiciones de ayuno de aminoácidos, los tRNA no pueden cargarse, aumentan y se acumulan provocando la estimulación de la cinasa Gcn2p, esta enzima media una fosforilación del eIF-2, lo cual provoca una inhibición de formación de eIF-2·GTP hacia eIF-2·GDP disminuyendo sus niveles, esto provoca que la formación del complejo ternario disminuya la tasa a la cual los complejos de iniciación competente se reasocian a la subunidad 40S para continuar con la traducción del uORF1, de tal suerte que muchas subunidades no pueden iniciar la lectura del uORF4, esta subunidades adquierien el complejo ternario mientras registran a intervalos el uORF4-*GCN4* y se inicia a cambio la transcripción de *GCN4*, (Dever, 1992).

C. Dominios funcionales del producto Gcn4p

El dominio del extremo carboxilo terminal del producto Gcn4p es el mediador para la unión del DNA y la dimerización de esta proteína. Los residuos de aminoácidos del producto Gcn4p que intervienen en la unión específica al DNA, así como en su activación transcripcional, han sido identificados por análisis funcional de deleciones en cepas *gcn4*-. Estas dos funciones requieren de dos segmentos diferentes del producto Gcn4p. Un fragmento de Gcn4p conteniendo 60 aminoácidos en el extremo del carboxi-terminal, el cual ha sido sintetizado y traducido *in vitro*, se liga a un fragmento de DNA conteniendo una secuencia TGACTC, de una manera muy específica. Estos 60 residuos del extremo carboxi-terminal, intervienen también en la formación de dímeros, lo que aparentemente es un requisito indispensable para la unión de este factor al DNA. (Hope y Struhl, 1985).

El producto Gcn4p dimeriza a través de un dominio de "Cierre de Leucina". Los residuos del extremo carboxi-terminal del producto Gcn4p han sido descritos como dominios permisivos de α -hélice, (Voght y col. 1987). Cuando se exhiben las secuencias de aminoácidos, de esta región en α -hélice, se observa la presencia de una leucina cada 7 residuos a lo largo de 28 residuos de aminoácidos. La misma estructura ha sido encontrada en un segmento de la oncoproteína Myc de rata, en Jun, en el prooncogen Fos y en Gcn4p; (Landschulz y col. 1988). Se propone que estos extremos polipeptídicos se presentan en conformación de α -hélice, con sus cadenas laterales de leucina extendiéndose desde la misma cara de la hélice y que la dimerización de la proteína ocurre a través de una juxtaposición antiparalela de la α -hélice, por interdigitación de las cadenas laterales de leucina, las cuales sobresalen y de esta forma se produce un "cierre de leucina". De acuerdo con este modelo de "cierre" la periodicidad con la que se presentan los residuos de leucina en el producto Gcn4p, del extremo carboxi-terminal, es suficiente para que se lleve a cabo la dimerización de la proteína en cuestión, (Figura 5). Experimentos se han realizado sustituyendo residuos de leucina por valina y/o alanina, ambos buenos formadores de conformación α -hélice, actuando de la misma manera, promoviendo la formación de dímeros proteicos, (Sellers y Struhl, 1989).

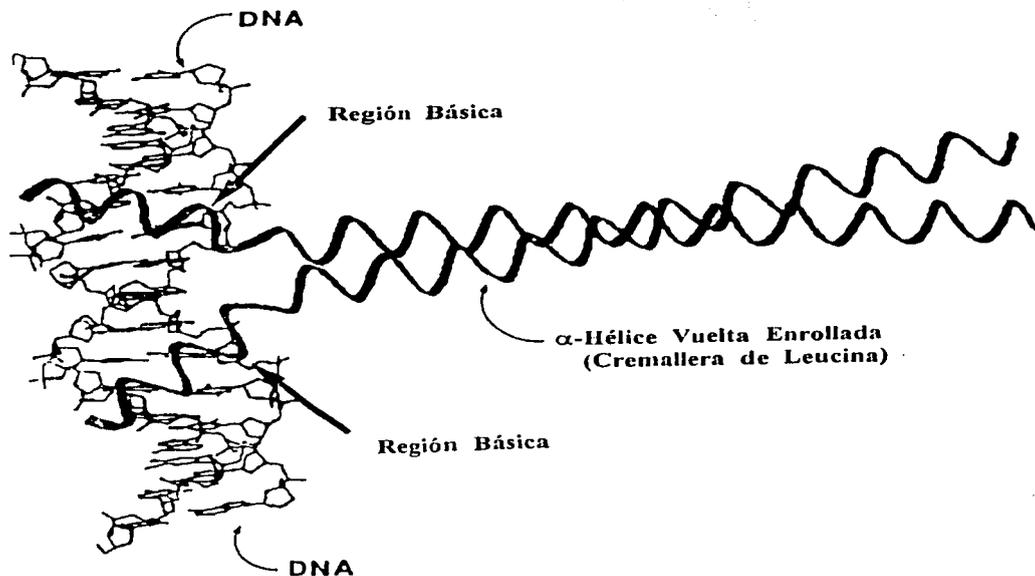
Otra característica que comparten Fos y Gcn4p es la presencia de una región formada por aminoácidos básicos inmediata a la región del "cierre de leucina", hacia el amino-terminal. En el caso del producto Gcn4p este

segmento cae dentro de los 66 residuos del carboxi-terminal requeridos para la unión directa con el DNA.

Trabajos realizados por Vinson y col. 1989, han demostrado que la región básica y el “cierre de leucina” están espaciados por el mismo número de residuos en Gcn4p y en otras 9 proteínas relacionadas con “cierre de leucina”; más aún, la composición de la región básica de estas proteínas es compatible con la estructura α -hélice. Estas observaciones sugieren que el “cierre” y las regiones básicas, forman una α -hélice continua, y que la región básica, cargada positivamente, se repele más que dimerizar. Esto produce una estructura de “Y” en la cual el tronco está formado por el “cierre de leucina” y los segmentos interactúan en una vuelta enrollada, y los brazos están formados por una región básica en α -hélice divergiendo, (Figura 5), O’Neil y col. 1991). Ha sido propuesto que en la bifurcación de los brazos es donde se lleva cabo el punto de contacto con el DNA y que las dos regiones básicas en hélice rodean al DNA envolviéndolo en direcciones opuestas y llenando el surco mayor. El “modelo de tijeras”, propuesto por Vison y col. (1989), postula que un enrollamiento se presenta en la región básica la cual permite a la hélice seguir la curva del surco mayor y envolver al DNA. El modelo de “bifurcación helicoidal inducida”, que es la versión del modelo de O’Neil y col. (1991), postula un doblez liso de la hélice estabilizado por contactos entre aminoácidos específicos conservados y bases expuestas en el surco mayor del DNA. (Figura 5).

Los dos modelos coinciden con el análisis molecular de la unión del producto Gcn4p a su respectivo sitio de acción y en que la proteína lleva a cabo un pronunciado contacto simétrico en los dos sitios de las secuencias a reconocer, e interactúan principalmente con el surco mayor del DNA. Se ha observado que en solución, las regiones básicas parecen estar sin estructura característica, lo que implica que la interacción con el DNA es esencial para estabilizar su estructura de α -hélice. Por otro lado se ha demostrado que interacciones no específicas con DNA inducen únicamente una conformación helicoidal limitada, las cuales se llevarán a cabo, únicamente por la especificidad de la unión del DNA al producto Gcn4p, (Weiss y col. 1990).

FIGURA 5



Modelo generado por un ordenador para el complejo establecido entre la "cierre de leucina" y el dominio de DNA al cual se une, el producto Gcn4p se sintetiza y reconoce secuencias específicas del DNA que regula transcripcionalmente de manera positiva, en respuesta a condiciones de ayuno expresado bajo el control general de biosíntesis de aminoácidos, (O'Neil y col. 1991).

Dos activadores transcripcionales de levadura requieren de la función del producto GCN5p para promover los niveles normales de transcripción.

Una activación traduccional adecuada del RNA mensajero de *GCN4* es indispensable para que la proteína Gcn4p lleve a cabo la regulación transcripcional a su máxima capacidad. Sin embargo la magnitud de dicha activación sobre los diferentes genes que regula, está determinada por la naturaleza del sitio de unión a GCN4, (Hill y Struhl, 1986). El sitio óptimo de unión a GCN4, es una secuencia palindrómica perfecta: TGAC/GTCA; la primera secuencia presenta una afinidad mayor para la unión de GCN4 y la última puede presentar más alteraciones.

Se ha reportado en estudios recientes, que no es suficiente cierta cantidad del producto Gcn4p para determinar los niveles transcripcionales de los genes que esta proteína regula. Por análisis de efectos mutacionales, se ha encontrado la presencia de una nueva proteína codificada por el gen *GCN5*, y que aparentemente es necesaria para facultar al producto Gcn4p a promover los máximos niveles de transcripción de los genes sobre los cuales actúa. Por otro lado se ha encontrado que el producto Gcn5p, también se requiere para llevar a cabo la máxima activación transcripcional de los genes relacionados con funciones respiratorias mediados por el complejo HAP2-HAP3-HAP4 (Forsburg y Guarente, 1989). Por lo tanto podemos afirmar que la función de *GCN5* es necesaria para la actividad de, al menos, dos reguladores transcripcionales. Así mismo se ha observado que Gcn5p comparte una región de similitud con otras proteínas de levadura y *Drosophila*, las cuales también actúan con una variedad de factores transcripcionales, (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

Mutantes en *gcn5* se obtuvieron como cepas incapaces de crecer en un medio sometido a limitación de aminoácidos (Penn y col. 1983). Las cepas que contienen esta mutación recesiva muestran sensibilidad a crecer en un medio en presencia de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT, privación de histidina); 5-metil-triptofano (5-MT, privación de triptofano); a una alta concentración de leucina (limitación para valina e isoleucina) y con *o*-metil-treonina (limitación de treonina); bajo estas condiciones todas las cepas muestran una sensibilidad al crecimiento comparadas con el crecimiento de una cepa silvestre isogénica. Sin embargo esta sensibilidad, para *gcn5*, es

menos severa que la que presentan las mutantes *gcn2⁻*, *gcn3⁻*, *gcn1⁻* o *gcn4⁻*; por lo que se puede concluir que la mutación *gcn5⁻* confiere un fenotipo menos severo que las otras mutaciones dentro del sistema *gcn*.

La incapacidad de las cepas *gcn1*, *gcn2* y *gcn3* de crecer bajo condiciones de limitación de aminoácidos es el resultado de un defecto en el mecanismo que activa la traducción del RNA mensajero de *GCN4*, sin embargo estas cepas pueden crecer cuando se transforman con un derivado transcripcional activo de *GCN4*, el cual tiene todos sus uORFs deletados, (Hinnebush, 1984 y Thireos y col. 1984). En contraste este derivado de *GCN4*, no recupera el fenotipo de *gcn5⁻*, lo que sugiere que el fenotipo *gcn5* no está relacionado con la cantidad del gen *GCN4* y que el producto Gcn5p no afecta la activación traduccional del RNA mensajero de *GCN4*. Esto ha sido confirmado, por ensayos en cepas *gcn5*, las cuales mantienen la capacidad de activación transcripcional cuando son crecidas bajo condiciones de ayuno, (Georgakopoulos y Thireos, 1992).

Se ha observado que la activación traduccional del RNA mensajero de *GCN4*, no se ve afectada en las mutantes *gcn5*, se han examinado los niveles de RNA mensajero producidos en estas cepas bajo condiciones de represión y desrepresión para los genes regulados por el producto Gcn4p. Resultados de Georgatsou y col. (1992) muestran la comparación de una cepa silvestre con otra cepa conteniendo la mutante *gcn5*, observándose que esta última acumula menos RNA mensajero para los genes ensayados, *HIS3*, *ILV1* y *TRP3*, cuando las células se crecen en condiciones de ayuno o limitación de aminoácidos. En contraste con lo anterior, la presencia de la mutación *gcn5*, aparentemente no afecta la regulación normal del RNA mensajero de *HIS4* o del mensajero de *ARG4* y tampoco afecta significativamente los niveles de la expresión basal en todos los genes ensayados (Georgatsou y col. 1992), como las cepas *gcn5* no crecen adecuadamente bajo condiciones de ayuno de aminoácidos, esto podría considerarse indirectamente como un estrés, para la célula, por privación.

Se han reportado análisis de Northern en donde se observan los niveles de RNA mensajeros en cepas transformadas con un gen derivado Δ *ORF-GCN4*, el cual causa la expresión constitutiva de estos genes. Tanto la cepa silvestre como la transformada *gcn5*, con este derivado, crecieron a la misma velocidad en medio mínimo. El análisis de Northern mostró para las cepas transformadas, que los niveles de los RNA mensajeros de los genes *HIS3*, *TRYP3* y *ILV1*, se redujeron en presencia de la mutación *gcn5*, mientras que el RNA mensajero de *HIS4*, no lo hizo.

La proteína Gcn5p es necesaria para que Gcn4p lleve a cabo la activación transcripcional de los genes que regula, (Forsburg y Guarente, 1989).

Las levaduras con una mutación o deleción en *GCN5* crecen lentamente en un medio al que se le impone una condición de ayuno. Este fenotipo resulta por la incapacidad de tales cepas de acumular suficiente RNA mensajero para los genes de biosíntesis de aminoácidos, cuando crecen bajo tales condiciones de deprivación. La regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de aminoácidos está mediada por Gcn4p y requiere de la derepresión traduccional del RNA mensajero de *GCN4*, (Hinnebush, 1984; Thireos y col. 1984)

Niveles normales de RNA mensajero de *GCN5* son necesarios cuando el producto Gcn4p está sobreexpresado. Ha sido demostrado que la mutación *gcn5* no afecta ni la transcripción de *GCN4*, ni la activación traduccional del RNA mensajero de este gen. Por estudios de análisis de configuraciones de promotores de regulación mínima, ha sido demostrado que la función de Gcn5p es necesaria para alcanzar los niveles máximos de activación transcripcional que son mediados por el homodímero Gcn4p, (Georgakopoulos y Thireos, 1992). Este estudio confirma la fuerte dependencia que existe entre el producto Gcn4p y la naturaleza del sitio de unión al DNA que regula (Arndt y Fink, 1986; Hill y Strhul, 1986), y demuestran que los requerimientos del producto Gcn5p son altos para poder incrementar la función de Gcn4p cuando los sitios de unión de éste, al DNA que regula, son más débiles, lo cual confirma que el producto Gcn4p podría ser inestable (Tzamarias y col. 1989) en su unión con ciertas regiones del DNA sobre el cual ejerce su regulación, de tal suerte que el producto Gcn5p actúa como co-activador del producto Gcn4p incrementando la unión de éste sobre el DNA que regula. Lo anterior se resume en que el producto Gcn5p es un regulador postraduccional de Gcn4p.

Otro dato interesante es el expuesto por Hinnebush (1992), en el que afirma que los genes de la biosíntesis de aminoácidos, tienen dentro de su promotor diferentes elementos que contribuyen a elevar la expresión basal de éstos, aunque los datos expuestos por Georgakopoulos y Thireos (1992), sostienen que la expresión basal de *HIS3* no requiere de la función del producto Gcn5p, sino de otros elementos, nuestros datos demuestran que la presencia del producto Gcn5p regula la expresión basal para *GOGAT*, cuando dicha enzima se mide en una cepa baja en síntesis de glutamato, como sería el caso

de una cepa *gdh⁻*, esto será discutido en detalle más adelante. Otros trabajos sugieren que los genes de la biosíntesis de aminoácidos que han sido reportados como independientes de la función del producto Gcn5p, no lo son así para Gcn4p, ya que en éstos, aparentemente, su unión al DNA es sumamente eficiente y no requieren del coactivador Gcn5p, (Lucchini y col. 1984).

Se ha reportado también que el producto Gcn5p es importante y necesario para mediar en los niveles de transcripción de elementos *CYCI* y *UAS2*; dichos elementos regulan la transcripción de una serie de genes relacionados con la fosforilación oxidativa (Guarente y col. 1984; Trueblood y col. 1988), estos resultados son consistentes con el fenotipo presentado en las cepas *gcn5⁻*, las cuales crecen lentamente cuando se someten a condiciones estrictas de aerobiósis.

Por lo anteriormente expuesto, se puede concluir, que el producto Gcn5p es necesario para mantener los niveles normales de activación de la transcripción, al menos, en dos sistemas regulatorios diferentes: la biosíntesis de aminoácidos y la aerobiósis. Por lo tanto el producto Gcn5p puede considerarse como un activador general de la transcripción que funciona en concordancia con otros activadores transcripcionales que se unen al DNA.

OBJETIVOS

- 1. Estudiar el papel del glutamato sobre la síntesis y actividad enzimática de glutamato sintasa (GOGAT), en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**
- 2. Conocer el papel que juega la mutación *gus2⁻/gcn5⁻*, sobre la actividad y/o expresión de glutamato sintasa (GOGAT) en cepas de levadura *gdh⁻*.**

MATERIAL Y METODOS

Cepas.

La Tabla 2 describe las diferentes cepas empleadas en este trabajo. La biblioteca genómica utilizada para las complementaciones, fue construida en Ycp50 (*ApR,URA3,CEN4,ARS1*) por Rose y col (1987).

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Para cultivar levaduras se utilizaron los medios convencionales: El medio rico (YPD), se preparó siguiendo la fórmula de Difco: extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2%, dextrosa al 2% en agua destilada. Para medios sólidos se agregó agar al 2%.

Medio Mínimo (MM). Se preparó según la fórmula de Difco y siguiendo la receta previamente descrita (González y col. 1985). Como fuente de carbono se adicionó dextrosa al 2% y la fuente de nitrógeno según se indique. Los requerimientos de auxotrofia se adicionaron al 0.01%.

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio completo (LB) siguiendo la fórmula publicada previamente (Covarrubias y col. 1980). La concentración final de ampicilina en el medio LB fué de 100 µg/ml.

Con el fin de cultivar a la levadura en condiciones de ayuno se utilizaron análogos de aminoácidos. Ayuno por tratamiento con 5-metil-triptofano (5-MT): las levaduras se cultivaron en YPD durante 18 horas a 30°C con agitación a 250 rpm., estos cultivos se centrifugaron, se resuspendieron y se inocularon dos matraces uno sin el análogo y otro adicionando el análogo 5-MT a 1.25 mM ambos a una densidad óptica de 0.50 µµ, se incubaron a 30°C bajo agitación a la velocidad ya descrita tomando alicuotas a los tiempos 0, 2 y 3 horas en presencia y ausencia de 5-MT.

Ayuno por tratamiento con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT): las cepas se cultivaron en MM durante 18 horas a 30°C con 250 rpm de agitación, estos se centrifugan, se resuspenden y se utilizan para inocular matraces a 0.20 de densidad óptica en MM sin el análogo de aminoácidos y otro se inocula a 0.40 de densidad óptica en MM adicionando el análogo 3-AT 10 mM. Ambos matraces se incubaron durante 6 horas a 30°C, agitados a 250 rpm.

TABLA 2 LISTA DE CEPAS UTILIZADAS

CEPAS	GENOTIPO	Referencia
<i>S. cerevisiae:</i>		
S288C	<i>MATα, GDH, GUS1, GUS2, GLT1</i>	Cold Spring Harbor Laboratory
R757	<i>GDH, GUS1, GUS2, ura3, lys, his</i>	Cold Spring Harbor Laboratory
CN 31	<i>MATα, gdh, gus1, gus2, GLT1</i>	Folch, J.L., et al. 1989
KY117	<i>MAT a, trp1, his3, ade2, lys2, ura3, GDH, GLT1, GUS1, GUS2</i>	Struhl, K., et al. 1981
ROMEX 0	<i>gdh, his, gus1, gus2, ura3, GLT1</i>	González, A., et al. 1992
ROMEX 1	<i>gdh, his, GUS1, gus2, ura3, GLT1</i>	González, A., et al. 1992
AG 1	<i>gdh, GUS1, GUS2, ura3, GLT1</i>	Este trabajo
AG 1 Δ16	<i>gdh, GUS1, gus2Δ, URA3, GLT1</i>	Este trabajo
LA 1	<i>GDH, GUS1, GUS2, ura3, GLT1</i>	Este trabajo
LA 1 Δ28	<i>GDH, GUS1, gus2Δ, URA3, GLT1</i>	Este trabajo
F 113	<i>MATα, GDH, GUS1, GUS2, GCN4, GLT1</i>	Hinnebush, A. 1994
F 212	<i>MATα, GDH, GUS1, GUS2, gcn4, GLT1</i>	Hinnebush, A. 1994
<i>E. coli:</i>		
DH-alfa 5	<i>F-80 Δ-lacZ, M15, endA1, recA1, hsdR17 (r-K m+k), supE44, th-1, d-, gyrA 96, (lacZYA-argF), U169</i>	Hanahan, D. 1963

Construcción de las cepas ROMEX 0 y ROMEX 1.

La cepa CN31 previamente descrita (Folch y col.1989) , es portadora de una mutación monogénica que resultó en una carencia de actividad de GDH-NADP (*gdh⁻*), así mismo, esta cepa es portadora de dos mutaciones más (*gus1⁻* y *gus2⁻*) que resultan en un fenotipo *gogat⁻*. Por lo tanto la cepa CN31 es un auxótrofo total de glutamato. Esta cepa se cruzó por la mutante *ura3⁻* KY117 (Tabla 2). De entre la progenie de esta cruz, se seleccionó la cepa ROMEX 0 con el siguiente genotipo: *gdh1⁻*, *gus1⁻*, *gus2⁻*, *ura3⁻*. Esta cepa se usó como receptora en los experimentos de complementación con la biblioteca genómica de levadura contruida en Ycp50 (Rose y col. 1987). La cepa ROMEX 1 se obtuvo de la cruz de la cepa CN38 *gdh⁻*, *GUS1⁺*, *gus2⁻*, por la KY117 *ura3⁻*. Al igual que la ROMEX 0, esta cepa se utilizó en experimentos de complementación.

Las cepas haploides de tipo sexual opuesto, se cruzaron en YPD. Los diploides resultantes se aislaron seleccionando para prototrofia y se purificaron. La población de la cruz se estudió por análisis de esporas al azar.

Transformación.

S. cerevisiae se transformó por el método de protoplastos descrito por Hinnen y col. (1978). Las transformantes se seleccionaron como protótrofas para uracilo y glutamato, en MM suplementado con los requerimientos de auxotrofia de las cepas receptoras. Células competentes de *E. coli*, se prepararon según el método descrito por Cohen y col. (1972). Las transformantes de *E. coli* se seleccionaron para resistencia a ampicilina (*ApR*) en medio Luria suplementado con el antibiótico.

Determinación de actividades enzimáticas.

Los extractos celulares se prepararon filtrando los cultivos en membranas Millipore con poro de 45 μ de diámetro y suspendiendo las células enteras en el buffer de extracción correspondiente. Posteriormente las células se rompieron por acción mecánica con perlas de vidrio en un Vortex. Los extractos de centrifugaron en microfuga durante 15 minutos a 15,000 rpm en frío.

Para la determinación de GDH-NADP se siguió el método de: Doherty, 1970. La GOGAT se ensayó con el método reportado por Roon y col. (1974), utilizando como control de la actividad, la inhibición por azaserina. La actividad de glutamino sintetasa se determinó con el método de Ferguson y Sims, 1974.

La proteína de los extractos se determinó por el método de Lowry y col. 1951.

Purificación de plásmidos.

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se purificaron usando el protocolo de QIAGEN tip 500 para maxipreparaciones. Se utilizaron los plásmidos: YCp50 (Rose y col. 1987), YIp5 (Davis y col. 1980), y PIJ2925 (Jansen y Bibb, 1993).

Subclonación de GUS2/GCN5.

El plásmido pGB102 se digirió con Xho1-Pst1, obteniéndose un fragmento de 1.9 Kb que contiene el gen *GUS2* completo con su promotor incluido. Este fragmento fue subclonado en el vector PIJ2925 (Jansen y Bibb, 1993), cortado con Sal1-Pst1. Este plásmido se replica en *E. coli* y confiere resistencia a ampicilina. Con este procedimiento se obtuvo el pCA1, se digirió con Bgl II, liberándose así un fragmento Xho1-Pst1 y por lo tanto *GUS2*. El fragmento Bgl II fue subclonado en el sitio único de BamHI de Ycp50, generándose así el pCA2, que ahora contiene el fragmento mínimo presente en pGB102 capaz de complementar la auxotrofia por glutámico de la ROMEX 1 y ROMEX 0. Figura 5.

Aislamiento de RNA total para análisis de Northern blot.

Preparación de RNA total de levadura: protocolo modificado del de Carlson y Bolstein, (1982). Se prepararon precultivos de MM con los requerimientos especiales de cada cepa, se dejó creciendo a saturación durante toda la noche, al día siguiente se inocularon matraces de MM, a una D.O $_{600\text{ nm}} = 0.20$, para las cepas que no se sometieron a ayuno y de 0.40 para las cepas que fueron tratadas con 3-AT. Se dejó crecer 6 horas bajo agitación a 30°C. Se lavaron las células con agua + DPC 1µl/ml (dietilpirocarbonato), recuperando los botones celulares en tubos de microfuga. Se resuspendió en 470 µl de buffer de lisis, añadiendo:

inmediatamente 25 μ l de SDS al 20% + 5 μ l de DPC. Se llevó a cabo una extracción con 500 μ l de RFC (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico: hidroxiquinoleína, 25:24:1); agitando inmediatamente en un *Vortex* durante un minuto, se incubaron los tubos, primero destapados, a 65°C durante 2 minutos y después tapados durante 3 minutos, esto es 5 minutos en total, se centrifugaron, se deshechó el precipitado y se repitió la misma extracción dos veces más, 3 en total, se enfrió después de cada extracción en un baño de hielo seco: etanol durante un minuto. Se recuperó la fase líquida de la última extracción y se añadieron 5 μ l de $MgCl_2$ 100 mM. Se llevó a cabo una extracción más pero esta vez con Fenol: Cloroformo (24:1), se centrifugó y se alicuotaron 400 μ l del sobrenadante + 40 μ l de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol. Se incubaron los tubos en un baño de hielo seco-etanol hasta que se congelaron, aproximadamente 15 minutos, se centrifugó durante 15 minutos a velocidad máxima en una microfuga y el precipitado se resuspendió en 200 μ l de etanol al 80%, se centrifugó y secó el precipitado, se resuspendió en 50 μ l de agua + DPC y se guardó a -70°C. Es importante llevar a cabo esta extracción usando guantes en todos los pasos.

Gel de agarosa para RNA total: Se limpió la cámara de electroforésis y los accesorios, peines, soporte, etc., con una solución de SDS al 1% y se enjuagó con agua + DPC. Se utilizó el protocolo propuesto por Sheiness y Sullivan (1986). Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer MAE, se dejó enfriar y se añadió formaldehído al 2.2% de concentración final. Una vez solidificado el gel se enfrió durante 15 minutos en el refrigerador. Las muestras se prepararon con 50 μ g de RNA total, 40 μ l de mezcla de corrida y 2 μ l de EtBr 0.1%. Se desnaturalizó a 56°C durante 15 minutos y se cargó el gel. Se corrió cerca de 4 horas a 100 V. Se visualizó el gel a través de un transiluminador de UV, se lavó el mismo dos veces con SSC 10 \times durante 20 minutos para eliminar el formaldehído.

Transferencia a membrana de Nylon para análisis de Northern blot: protocolo modificado de Thomas, (1980). Se colocó el gel de agarosa en un puente de papel *Whatman 3 MM*, haciendo contacto con

una solución de SSC 10×, el gel se cubrió con una membrana de *nylon Hybond, Amersham*, se colocaron cerca de 10 cm de altura de papel absorbente y un peso de cerca de 500 g en la parte superior. Se dejó durante 12 horas al menos, se retiró la membrana *Hybond* y se lavó con SSC 1×, y se fijó con luz UV durante 5 minutos a baja intensidad. Se secó a temperatura ambiente hasta dejarlo húmedo y se guardó en frío o se usó para hibridar, en ambos casos en una bolsa de *celofán* especial para tal fin.

Obtención de sondas.

Purificación: se corrió un gel de agarosa al 1% en TBE durante cerca de 2 horas a 70 V, con el plásmido, previamente digerido, o con la sonda que se quería purificar. Se extrajo, una vez visualizada en UV la banda de elección, se cortó un pozo justo debajo de ella y se rellenó con agarosa de bajo punto de fusión al 0.6%, se dejó gelificar durante 30 minutos a 4°C y se volvió a correr el gel al mismo voltaje hasta que la banda de interés migró a la agarosa de bajo punto de fusión. Una vez ocurrido esto, se cortó la banda y se incubó a 65°C, con objeto de fundir la agarosa. Se agregó 1/10 de volumen de NaCl 5 M, se mezcló bien y se dejó a 65°C por 5 minutos más y después se incubó a 37°C por otros 5 minutos. Al mismo tiempo se saturó fenol con NaCl 1 M centrifugándose éste y obteniéndose la fase superior que sirvió para extraer el DNA de la agarosa de bajo punto de fusión, se llevó a cabo la extracción mencionada a 37°C añadiendo al tubo de agar 2/3 de volumen del fenol saturado e inmediatamente después se agitó en *Vortex* durante 30 segundos, trabajar lo más rápido posible para evitar que la agarosa se gelifique. Se centrifugó y recuperó el sobrenadante, se añadieron 45µl de TE o agua y 5µl de NaCl 5M, se agitó con *Vortex*, se centrifugó y mezcló la fase acuosa con la anterior, se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo, se agitó 15 segundos en *Vortex* y se centrifugó dos minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se repitió la última extracción fenol:cloroformo. Se pasó a un tubo nuevo y se añadió 1 volumen de isopropanol. Para aumentar la recuperación del DNA se puede añadir 10 µg de RNA de transferencia. Se mantuvo a -20°C durante al menos 2 horas. Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm en la microfuga. Se sacó todo el alcohol con una pipeta, con cuidado de no perder el botón que normalmente es muy pequeño y puede despegarse fácilmente, se secó y resuspendió en 50 µl de TE.

Las sondas utilizadas fueron: *GLT 1* que corresponde a un fragmento interno de dicho gen obtenido por digestión EcoR1-EcoR1 de 4.5 Kb, (Cogoni y col. 1995). Fragmento interno del gen *HIS 3* de 1.7 Kb, (Struhl y Davis, 1980). Fragmento del gen de actina de 1.5 Kb, obtenido por Gallwitz y Seidel, (1980), este gen se utiliza en los ensayos de Northern blot como control, ya que es un gen constitutivo y no está regulado por el sistema GCN.

Digestiones con enzimas de restricción: se utilizaron las enzimas como se indica en las instrucciones del fabricante. Se incubaron el tiempo y a la temperatura adecuadas para cada enzima, se corrieron en un minigel de agarosa al 1% a 70 V en una cámara de electroforesis, por 1 hora. Se visualizaron las digestiones a través de luz UV y se estimó la concentración según se visualizó en comparación con el DNA del bacteriófago Lambda digerido con Hind III y que se usó como control a 500ng/ul.

Las enzimas utilizadas en este trabajo fueron: AatII, BamHI, BglII, ClaI, EcoR1, Hind III, PstI, SmaI, Sall y XhoI.

Marcaje de sondas por “Marcaje al Azar”: se utilizó el estuche de reactivos Random Primed DNA labeling Kit, de *Boehringer Mannheim Biochemica* como se indica en el instructivo. El isótopo radiactivo utilizado fue [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP.

Cuantificación de la radiactividad incorporada: se tomaron 2 μl de una dilución 1:100 de la sonda marcada y se colocaron en el centro de un papel filtro Whatman DE-81, se dejó secar y se lavaron tres veces con 25 ml de Na_2PO_4 0.5 M durante 5 minutos cada uno. Se lavó con agua dos veces durante un minuto y luego con etanol 2 veces por un minuto. Se secó al aire, se introdujeron los filtros en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se contó la cantidad de ^{32}P incorporado. Se calculó la radiactividad incorporada con respecto a las cpm del filtro no lavado.

Hibridación para Northern: Se prehibridó la membrana de *nylon*, previamente transferida, con una mezcla de prehibridación en 10 ml se

precalentó a 65°C y se introdujo en la bolsa de hibridación, se dejó bajo agitación lenta 30 minutos a 65°C. Una vez transcurrida la prehibridación, se introdujo la sonda marcada correspondiente, se selló la bolsa y se dejó hibridando durante 18 a 24 horas con agitación lenta a 65°C. Transcurrido el tiempo se abrió la bolsa se recuperó la sonda marcada y se lavó el filtro de *nylon* dos veces con SSC 2× + SDS 0.1% a 65°C durante 5 minutos el primer lavado y 30 minutos el segundo. Enseguida se lavó con SSC 0.15× + SDS 0.1% dos veces a 65°C primero 10 minutos y luego 20 minutos. Se secó el filtro al aire hasta que estuvo húmedo y se conservó envuelto en papel *celofán* autoadherible.

Autorradiografía : se cubrieron las paredes de un *cassette* para autorradiografía con *celofán* autoadherible, evitando que se seque el filtro. Se colocó éste con cuidado de que no quedaran burbujas, se estimó el tiempo de exposición midiendo con un contador de radiactividad *Geiger* la señal radioactiva. Se colocó encima la película fotográfica *Kodak X-OMAT™ AR* en el cuarto oscuro. Se dejó exponiendo de acuerdo a la señal entre 1 hora y varios días a -70°C. Se reveló.

Reutilización de los filtros de Nylon Hibridados: es necesario reutilizar los filtros dado que deben hibridarse varias sondas sobre ellos, al menos una más como control interno, en todos los casos se utilizó la sonda de actina, ya que es un gen constitutivo que no es regulado por este sistema. El filtro no debe dejarse secar jamás y debe lavarse antes de reusarlo en 250 ml de SDS 0.1% hirviendo, dos veces. Se verificó que la señal radiactiva hubiera desaparecido por estimación con *Geiger* o exponiendo de nuevo el filtro con una película fotográfica, se guardó en plástico autoadherible a 4°C .

Aislamiento de DNA genómico para análisis de Southern blot.
Preparación de DNA genómico de levadura: se siguió el protocolo “a ten minute DNA preparation from yeast” establecido por Hoffman y Winston (1987). Se rompieron las células con un detergente y perlas de vidrio por agitación y se llevaron a cabo dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico, se precipitó con etanol y se resuspendió el botón en TE. Se visualizó en luz UV la calidad de la preparación mediante un minigel de agarosa 0.8%.

Digestión de DNA genómico: se digirió con Hind III, buffer NEB II y agua, se incubó a 37°C durante 12 horas, se corrió un gel grande de agarosa al 0.8% en TBE 1X a 70 V, durante 4 horas, se observó en luz UV y se transfirió a una membrana de *Nylon*.

Transferencia a membrana de *Nylon* para análisis de Southern blot: el gel de agarosa debe ser tratado previamente antes de transferir a la membrana de *nylon*, el procedimiento fue el siguiente: se incubó el gel en HCl 0.2N durante 10 minutos, enseguida se lavó dos veces con agua; se desnaturalizó el DNA, incubando el gel en NaCl 1.5 M y NaOH 0.5N, bajo agitación constante durante 45 minutos a temperatura ambiente; se lavó el gel en agua dos veces y se incubó para neutralizarlo en TRIS-HCl 1M pH 7.4-NaCl 1.5 M con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente; se descartó esta solución y se volvió a agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente, otra vez con TRIS-HCl 1M pH 7.4-NaCl 1.5 M. Se mojó la membrana de *Nylon* en agua y una vez listo el gel se formó un puente con papel filtro *Whatman 3MM* en contacto con SSC 10X, igual que se describió en el inciso de -transferencia para Northern-. Se dejó cerca de 24 horas y se levantó la transferencia lavando el filtro con SSC 6x durante 5 minutos, se expuso para su fijación a luz UV por 5 minutos a intensidad baja. Se secó hasta dejarlo húmedo y se colocó en una bolsa de hibridación o cubierto de plástico autoadherible y se guardó a 4°C hasta su uso.

RESULTADOS

EL GLUTAMATO REPRIME LA EXPRESION DEL GEN *GLT1* QUE CODIFICA PARA UN MONOMERO QUE CONSTITUYE A LA GOGAT DE *Saccharomyces cerevisiae*

Como se mencionó en la INTRODUCCION la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee dos vías para la biosíntesis de glutamato; la deshidrogenasa glutámica biosintética (GDH-NADP⁺)-(GDH1) y la ruta constituida por la glutamino sintetasa (GS)-(GLN1) y la GOGAT, (*GLT 1*). Por este motivo, el aislamiento de mutantes auxótrofos para este aminoácido, supone la supresión de ambas vías. Siguiendo el método de selección propuesto por Driellen y Lacroute (1972), en nuestro laboratorio, se aislaron mutantes carentes de la actividad de GDH-NADP⁺, (Folch y col.1989). Cuando se determinó la actividad de GOGAT en una de las mutantes carentes de actividad de GDH-NADP⁺ (CN31), encontramos que ésta presentaba una actividad específica de GOGAT que era el doble de la presente en la cepa silvestre (Tabla 3). En virtud de que una mutante *gdh*⁻ carente de la actividad de GDH-NADP⁺ acumula una poza de glutamato considerablemente menor que una cepa silvestre (Folch y col.1989), consideramos, que el incremento de actividad observado en esta mutante pudiera ser debido a un fenómeno de desrepresión similar al descrito en *Bacillus subtilis* (Bohannon y Sonensheim 1989). La Tabla 3 muestra, que cuando se determinó la actividad de GOGAT en extractos obtenidos de la cepa silvestre y de la mutante *gdh*⁻ crecidas en presencia de glutamato, ambas cepas presentaron la misma actividad, la cual correspondió a la encontrada cuando la cepa silvestre se cultiva en medio mínimo (Tabla 3). Estos resultados indican que en presencia de glutamato, la actividad de GOGAT disminuye en mutantes *gdh*⁻.

Con el fin de determinar si la regulación ejercida por glutamato era a nivel de transcripción se realizó un análisis tipo Northern con RNA total obtenido tanto de la cepa silvestre como de la mutante *gdh*⁻ cultivadas en amonio o en glutamato como fuentes de nitrógeno. El RNA mensajero de GOGAT se detectó utilizando un fragmento de 4.5 Kb del gen *GLT 1* que se ha identificado como el gen estructural de GOGAT (Cogoni y col. 1995). Como se muestra en la Tabla 3, la concentración del RNA mensajero de *GLT 1* aumenta 3 veces en la mutante *gdh*⁻ cultivada en

TABLA 3. Actividad enzimática de GOGAT y niveles de RNAm de *GLT1* y *HIS3*.

CEPAS	FUENTE DE NITROGENO	GOGAT^a Act Esp	GLT1^b RNAm	HIS3^c RNAm
S288C	NH ₄ SO ₄	0.03	0.30	0.92
(GDH⁺; GUS2⁺)	40 mM			
S288C	Glutamato	0.03	0.26	1.13
(GDH⁺; GUS2⁺)	7 mM			
AG1	NH ₄ SO ₄	0.06	0.60	0.93
(gdh⁻; GUS2⁺)	40 mM			
AG1	Glutamato	0.03	0.24	0.90
(gdh⁻; GUS2⁺)	7 mM			
ROMEX1	NH ₄ SO ₄	0.03	0.60	1.00
(gdh⁻; gus2⁻)	40 mM			
ROMEX1/pCA	NH ₄ SO ₄	0.06	0.60	0.90
(gdh⁻; GUS2⁺)	40 mM			

^a Actividad específica de GOGAT expresada en μ moles/min/mg proteína.

^b RNAm de *GLT1*. Los valores presentados son resultados de análisis densitométricos, utilizando RNAm de actina para normalizar. La sonda utilizada corresponde a un fragmento (EcoRI-EcoRI) interno de *GLT1* de 4.5 kb (Cogoni y col. 1995).

^c RNAm de *HIS3*. Los valores presentados son resultados de análisis densitométricos, utilizando RNAm de actina para normalizar. La sonda utilizada corresponde a un fragmento Bam HI de 1.7 Kb del que contiene *HIS3* y un fragmento del gene adyacente *DED1* (Struhl, 1985).

amonio como única fuente de nitrógeno, de tal manera que el aumento de actividad de GOGAT observado en esta condición corresponde a un aumento en el RNA mensajero de *GLT 1*. La Tabla 3 muestra que la expresión de *HIS3*, no se modifica por acción del glutamato.

Estos resultados permiten concluir que la expresión de *GLT 1* se regula por glutamato a nivel de transcripción.

CLONACION Y CARACTERIZACION DE UN GEN QUE COMPLEMENTA LA FALTA DE ACTIVIDAD DE GLUTAMATO SINTASA.

A partir de una mutante (CN31) (Folch y col. 1989), carente de actividad de GDH-NADP⁺, se aisló una mutante auxótrofa de glutámico (CN39) (Folch y col. 1989). El análisis genético y bioquímico de una de estas mutantes (CN31), permitió demostrar que esta cepa carecía de actividad de GOGAT y que este fenotipo se debía a la presencia de dos mutaciones: *gus1* y *gus2* que segregaban independientemente. Al cruzar la cepa CN31 con una silvestre, se obtuvieron mutantes monogénicas afectadas solamente en *gus1* o en *gus2*. Estas conservaban actividad parcial de GOGAT y por lo tanto no eran auxótrofas totales de glutamato. Estos resultados, sugerían la existencia de dos isozimas de GOGAT en *S. cerevisiae*, sin embargo se encontró, que esta levadura posee una sola GOGAT homotrimérica compuesta por subunidades de 200 kDa (Cogoni y col. 1995). Estos resultados indican que las mutaciones *gus1* y *gus2* no pudieron haber afectado el gen estructural de GOGAT (*GLT 1*). El estudio del papel que juegan *GUS1* y *GUS2* en la regulación de la actividad de GOGAT nos interesó, ya que a la fecha no se conocía nada acerca de la regulación de GOGAT en levadura. Por lo tanto, nos propusimos clonar *GUS1* y *GUS2* y estudiar su papel fisiológico. En este trabajo se presentan los resultados en relación a la clonación y caracterización de *GUS2*.

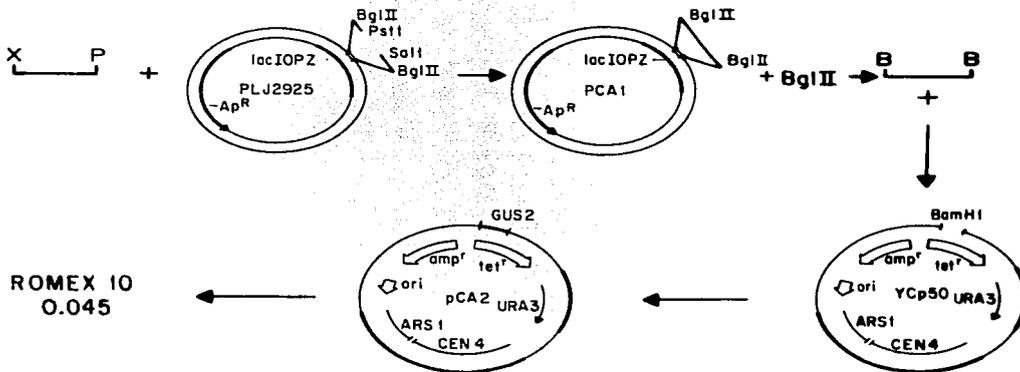
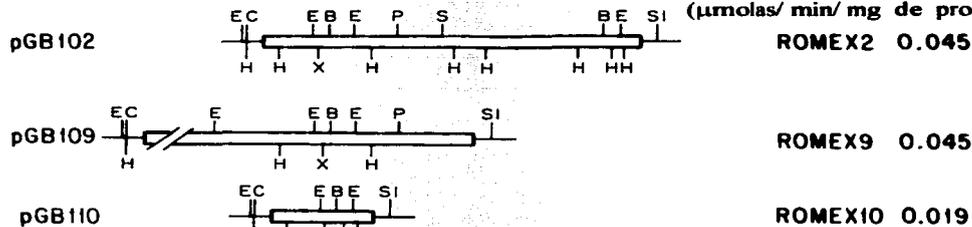
Con el fin de clonar *GUS2*, se construyeron dos mutantes: ROMEX 1 (*gdh1⁻, ura3⁻, GUS1⁺, gus2⁻*) y ROMEX 0 (*gdh⁻, ura3⁻, gus1⁻, gus2⁻*). Aún cuando la mutante ROMEX 1 es *GUS1⁺*, la auxotrofia parcial por glutámico que presenta es tan severa que permitió la complementación simultánea del requerimiento por uracilo y por glutamato, al igual que en la ROMEX 0, que es un auxótrofo total de glutamato. La complementación genética de ROMEX 1 y ROMEX 0 se llevó a cabo

utilizando un banco genómico de levadura, construido en un vector centromérico utilizando la capacidad de sintetizar uracilo (*URA3⁺*) como marcador. Se obtuvieron 21 transformantes protótrofos para uracilo y para glutamato. De éstas, 12 recuperaron la actividad de GDH-NADP⁺ y 9 recuperaron la actividad de GOGAT. A partir de estas últimas se purificaron los plásmidos que complementaban la carencia de GOGAT y se construyó un mapa de restricción (Figura 6). Utilizando la estrategia descrita en MATERIAL y METODOS, se subclonó en YCp50 el fragmento mínimo capaz de complementar a la ROMEX 1 y ROMEX 0 obteniéndose así el plásmido pCA (Figura 6). La Tabla 3 muestra la actividad de GOGAT presente en la cepa silvestre (S288C), en una mutante *gdh⁻; GUS2⁺* (AG1) y en la mutante ROMEX1 (*gdh⁻, gus2⁻*). Se observa claramente, que cuando la cepa ROMEX 1 se complementa con el pCA (ROMEX 1/pCA), la actividad de GOGAT aumenta al doble.

Estos resultados permiten concluir que la presencia del gen *GUS2* es necesaria para que la actividad de GOGAT aumente al doble en una cepa carente de GDH-NADP⁺; es decir, *GUS2* actúa como un efector positivo.

Figura 6

Actividad Especifica de GOGAT
($\mu\text{molas/ min/ mg de proteina}$)



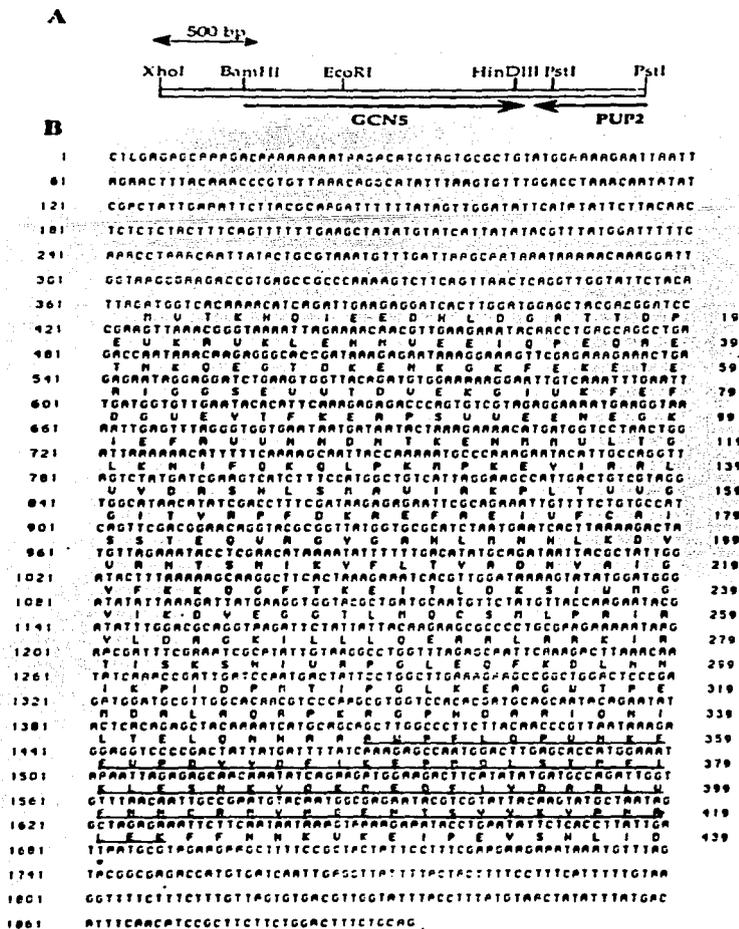
Se muestra el plásmido pGB102 digerido con *XbaI-PstI*, fragmento que contiene al gen *GUS2 GCN5* con su promotor (1.9 Kb). Este fragmento se subclona en el vector PLJ2925, digerido con *SalI-PstI*. Por replicación en *E. coli* se obtiene el plásmido PCA1 el cual se digiere con *BglII*, liberando así el fragmento *XbaI-PstI* que contiene a *GUS2 GCN5*. Este fragmento se subclona en Ycp50 introduciéndolo en su único sitio *BamHI*, dando lugar al plásmido PCA2 el cual complementa a las cepas Romex 1 y Romex 0 para su autotrofia por glutato. Los sitios de restricción se abrevian de la siguiente forma: B, *BamHI*; C, *Cla I*; E, *EcoRI*; H, *Hind III*; P, *Pst I*; S, *SmaI*; SI, *Sal I*; X, *Xba I*.

¿QUE PAPEL JUEGA EL PRODUCTO DE *GUS2* EN LA EXPRESION DE *GLT 1* ?, ¿TIENE ALGUN PAPEL EN EL EFECTO REPRESIVO MEDIADO POR GLUTAMATO?

La secuencia del gen *GUS2* (Figura 7) y la comparación de ésta en los bancos de datos (Zurita y González, comunicación personal), mostró que *GUS2* era idéntico al gen *GCN5* previamente descrito (Georgakopoulos y Thireos, 1992), que codifica para un coactivador que puede funcionar aumentando la transcripción de ciertos genes al asociarse con algunos activadores de la transcripción. Este hecho se deriva de que *GCN5*, contiene un motivo conocido como bromodominio presente en otras proteínas caracterizadas como coactivadoras (Figura 8). Uno de los activadores con los que se asocia el producto de *GCN5* es el producto de *GCN4*. Este producto participa en un sistema global de regulación de la transcripción de una serie de RNA mensajeros que codifican para enzimas de las vías biosintéticas de aminoácidos. El aumento en la transcripción de los genes sujetos a control por GCN ocurre en células ayunadas de aminoácidos, porque en estas condiciones se elevan los niveles del producto *Gcn4p*, sin embargo, la complementación de las cepas ROMEX 1 y Romex 0 por *GUS2*⁺ no se hizo en condiciones de ayuno. Esto podría sugerir que al igual que para el caso de la expresión de *HIS4*, *HIS3*, *ARG4* y *ARG3* (Hinnebush, 1992), el sistema GCN pudiera regular la expresión basal de *GLT1* no dependiente de condiciones de privación. Ya que la regulación de estos genes a nivel basal ocurre a nivel de transcripción, se realizó un análisis tipo Northern con RNA total obtenido de las cepas ROMEX 1 y ROMEX 1/pCA. Como se observa en la Tabla 3, la cepa ROMEX 1 y ROMEX 1/pCA presentan niveles similares de mensajero para *GLT 1*.

Estos resultados muestran que la presencia de una copia silvestre de *GUS2* es indispensable para que se incremente la actividad enzimática de GOGAT en una cepa *gdh*⁻. Sin embargo, los resultados del análisis tipo Northern indican que los niveles de RNA mensajero de *GLT 1* están elevados en cepas *gdh*⁻ tanto *gus2*⁻ (ROMEX 1) como *GUS2*⁺ (ROMEX 1/pCA) (Tabla 3); de tal manera que se puede concluir que el producto de *GUS2* participa en el incremento de actividad, sin modificar los niveles de transcripción de *GLT 1*. Ya que la desrepresión de *GLT 1* observada en ausencia de glutamato si ocurre a nivel de transcripción, podemos concluir que el producto de *GUS2* no juega ningún papel en este fenómeno. La Tabla 4 muestra, que cuando la cepa ROMEX 1 se cultiva en glutamato

Figura 7



A. Representación esquemática de un fragmento de DNA genómico de levadura entre dos sitios de restricción *XhoI* y *PstI*, los cuales incluyen al gen *GCN5*. **B.** Secuencia nucleotídica del fragmento anterior incluyendo el gen *GCN5* con su promotor, la secuencia subrayada corresponde a una región de gran similitud presente en otras proteínas cuya función está relacionada con regulación nivel de transcripción

Figura 8

GCN5	349	ALFSLQFVHREEL--PDMYDF	KPEPDLSTNEIKLESKMKOKHSDPIVDAALDFNMDRNYNGENTISMYK/AMR--	351	422
FSH1H	322	ALFSLVKFVDAASALGLHDSHDI	KHPFDLS*UKATMGRADVDAQEPAAQVALDPSKCYKYPDPDHDVVAAGAK--	320	367
fsh1	500	ALFSLVKFVDAASALGLHDSHDI	KHPFDLS*UKATMGRADVDAQEPAAQVALDPSKCYKYPDPDHDVVAAGAK--	500	575
CCG1	1469	SLFSAHWLAKKFL--PDSYKV	UNPFDLEIIRKMIKSKHMOSRSELDVNLILASISUKYNGPESQVKTAGEIUNIQ	1547	1547
SNF2	1573	SDIILSKPSAL--VPSYKMI	YVPVAFDHINTHIEFLAVHSLKETLQDFHIFSSAATVNIAGSUWY--EDSLE	1610	1646
STH1	1260	-SILEKLPSSAD--VPSYKMI	EKPTAIDILKNCKNGTYKTLSEURALQTAENARAFYNEGSUWY--VDADK	1311	1341
bra	1440	SEFANLPSAQR--LPSYKMI	KAPDIIKKILQRIEDCLMADLNELEKDFNQLCALIYNEASLIY--LDSIA	1521	1521
SPT7	463	STFANLPSAQR--LPSYKMI	KKSDELATVULKIKKSFQMSKQEPDQIINLIUKKQIYNS-DPQAF	537	537

Alineamiento de la secuencia de la region del gen *GCN5 G1/S2* entre el aminoacido 349 al 422 como se indica, con respecto a otras proteinas. Las secuencias subrayadas son las que se presentan identicas en todas las proteinas mostradas. Los asteriscos (*) denotan residuos identicos en todas las secuencias analizadas y los puntos (•) denotan las sustituciones conservativas. (84)

como única fuente de nitrógeno, tanto la actividad de GOGAT como el RNA mensajero de *GLT 1* son menores a los encontrados cuando la cepa se cultiva en amonio como única fuente de nitrógeno. La Tabla 4 también muestra que la expresión de *GLT 1* de la mutante ROMEX 1/pCA también se reprime en presencia de glutamato. Estos resultados confirman que el producto de *GUS2* no participa en la regulación de la expresión de *GLT 1* dependiente de glutamo.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia *GUS2/GCN5* indicó, que el producto de este gen corresponde a un coactivador de la transcripción, (Georgakopoulos y Thireos, 1992; Zurita y González comunicación personal). Así mismo, se ha propuesto que *GCN5* actúa aumentando la actividad de varios activadores (Georgakopoulos y Thireos, 1992). De entre los activadores con los que se ha encontrado que interacciona el producto Gcn5p se encuentra Gcn4p, el complejo *HAP2- HAP3- HAP4* (Georgakopoulos y Thireos, 1992) y *ADA2* (Marcus y col. 1994). Dado que el sistema *GCN4* regula la expresión de genes implicados en la biosíntesis de una variedad de aminoácidos, se podría suponer que en el caso de la regulación de GOGAT, *GUS2/GCN5* funcionara activando al producto Gcn4p. Sin embargo, nuestros resultados indican que el aumento de actividad en GOGAT dependiente de *GUS2/GCN5* no modifica los niveles de RNA mensajero de *GLT 1*, (Tabla 3) ni ocurre en condiciones de privación de aminoácidos. Por lo tanto, se podría proponer, que en este caso *GUS2/GCN5* actúa activando un sistema distinto de *GCN4* que regula positivamente la transcripción de un gen cuyo producto regula postraduccionalmente la actividad de GOGAT. Considerando, que por un lado, el sistema GCN regula la biosíntesis de aminoácidos, y que se ha probado que *GCN5* activa al producto Gcn4p, se decidió estudiar el papel de *GUS2/GCN5* sobre la expresión de *GLT 1* en condiciones de ayuno, que es en donde se ha descrito que GCN pudiera jugar un papel más importante (Hinnebush, 1992).

TABLA 4. Actividad enzimática de glutamato sintasa y expresión de RNAm de *GLT1*.

CEPAS	ROMEX1	ROMEX1	ROMEX1/pCA	ROMEX1/pCA
FUENTE DE NITROGENO	NH ₄ so ₄ 40mM	glutamato 7mM	NH ₄ so ₄ 40mM	glutamato 7mM
GOGAT ^a	0.025	0.0108	0.058	0.024
<i>GLT1</i> ^b				
<i>HIS3</i> ^c				
ACTINA ^d				

^a Actividad específica de GOGAT expresada en μ moles por minuto por miligramo de proteína

^b Como sonda se utilizó un fragmento interno de 4.5 Kb de *GLT1* (Cogni y col. 1995)

^c Como sonda se utilizó un fragmento interno del gene *HIS3* (Struhl y Davis, 1980)

^d Como sonda se utilizó un fragmento del gene de actina (Callwitz y Seidel, 1980)

EFFECTO DEL AYUNO DE AMINOACIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE GOGAT.

Como se menciona en INTRODUCCION, en *Saccharomyces cerevisiae*, la expresión de muchos de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de aminoácidos se regulan a nivel de transcripción. Este sistema de regulación global funciona, cuando la levadura se cultiva en condiciones en las que se genera un desbalance nutricional tal que para obtener un crecimiento tipo silvestre se requeriría añadir aminoácidos o cuando un auxótrofo dado se cultiva en ausencia del aminoácido que requiere. Este sistema se denomina GCN (general control of nitrogen-control general de la biosíntesis de aminoácidos-) y resulta en un incremento en la síntesis de RNA mensajero de los genes regulados por este circuito, cuando la célula se encuentra en condiciones de ayuno de aminoácidos. Se ha demostrado, que en todas las rutas biosintéticas hasta ahora analizadas, al menos una de las enzimas que participa, se encuentra regulada por este sistema, sin embargo, en el caso de la biosíntesis de glutamato, la participación del sistema GCN en el control de la expresión de la GDH-NADP⁺ como de la GOGAT no ha sido estudiado.

La participación del sistema GCN en la regulación de la expresión de un gen determinado puede analizarse utilizando diferentes enfoques experimentales. En nuestro caso, el primer enfoque que se utilizó, fue el de cultivar un auxótrofo de histidina en ausencia y en presencia de este requerimiento, midiendo en cada una de estas condiciones la actividad de GOGAT. Como se muestra en la Tabla 5, el ayuno de histidina, no resultó en un incremento en la actividad de GOGAT, sugiriendo por lo tanto, que la expresión de *GLT 1* no está regulada por GCN.

Una manera alternativa para ayunar un cultivo de aminoácidos, es el uso de análogos. En muchos casos, los análogos de aminoácidos inhiben la actividad de alguna de las enzimas que participan en la vía biosintética pertinente, resultando en una auxotrofia fenotípica. Los análogos mas utilizados son el 5-metil-triptofano (5-MT) y el 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). Al incubar una cepa de levadura en presencia de 5-MT o de 3-AT, se inhiben respectivamente la biosíntesis de triptofano o histidina, produciéndose una privación o ayuno del aminoácido correspondiente. La Tabla 5 muestra que tal y como se esperaba, la actividad de GS aumenta en extractos obtenidos de levaduras incubadas en presencia de 5-MT, ya que ha sido reportado que este análogo desreprime la actividad de

TABLA 5. Actividad enzimática de GOGAT y GS.

TIEMPO	CONDICION							
	R757 GOGAT		R757 GOGAT		AGI GOGAT		R757 GS	
	MM+	MM	MM	MM+	MM	MM+	MM	MM+
	His ^a		5MT ^b		3AT ^c			5MT ^b
0 h	0.018	0.018	0.019	0.019	0.049	0.049	0.007	0.007
2 h	0.015	0.020	0.022	0.019	0.049	0.020	0.006	0.012
4 h	0.010	0.015	0.022	0.019	0.043	0.025	0.012	0.030

^a 0.01% de histidina adicionado desde el tiempo 0.

^b 1.2 mM 5-metil-triptofano adicionado desde el tiempo 0.

^c 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol adicionado desde el tiempo 0.

la GS. En virtud de que la cepa que se utilizó para realizar estos experimentos es auxótrofa de histidina, se utilizó como análogo el 5-MT.

A continuación se estudió el efecto de 3-AT sobre la actividad de GOGAT en la cepa AG1 que carece de GDH-NADP⁺. Se utilizó esta cepa con el fin de analizar el efecto del ayuno sobre la actividad de GOGAT en ausencia de GDH-NADP⁺, ya que *GUS2* se obtuvo complementando una cepa *gdh⁻*, en este caso se utilizó 3-AT, ya que esta cepa no es auxótrofa de histidina. La Tabla 5 muestra que en presencia de AT, la actividad de GOGAT no solamente no se incrementa, sino que disminuye. Esta disminución puede ser atribuible al hecho de que por un lado, la expresión de *GLT1* no se regula por el circuito GCN y por otro a que la velocidad de crecimiento de la cepa utilizada se abate en presencia de 3-AT (dato no mostrado). Estos resultados indican que la actividad de GOGAT no está regulada por el circuito GCN.

Como se mencionó en el inciso anterior el gen *GUS2* se obtuvo complementando las mutantes ROMEX 1 y ROMEX 0. Con el fin de completar el análisis de la respuesta de la actividad de GOGAT a la presencia de análogos de aminoácidos, se cultivó la cepa ROMEX 1 con y sin los plásmidos portadores de *GUS2* (pGB102) y (pCA) en presencia y ausencia de 3-AT y se determinaron las actividades enzimáticas de GOGAT. La Tabla 6 muestra que, en la mutante ROMEX 1 no aumenta la actividad de GOGAT en presencia de 3-AT. Este resultado sería de esperarse ya que esta cepa es *gus2⁻*, sin embargo la mutante ROMEX 1 complementada con *GUS2*, tampoco aumenta su actividad de GOGAT al ser cultivada en presencia de 3-AT. Estos resultados muestran que la actividad de GOGAT no se regula por el circuito GCN en respuesta al ayuno de aminoácidos.

Por lo dicho anteriormente, el producto Gcn4p juega un papel fundamental en la regulación por GCN (Hinnebush, 1992). Esta proteína es un activador de la transcripción y es el mediador del incremento en la transcripción de los genes que están bajo el control de GCN (Hinnebush, 1992). Por tanto, mutantes alteradas en *GCN4* son incapaces de incrementar la actividad de las enzimas sujetas a este control. Con el fin de analizar el efecto del ayuno de aminoácidos sobre GOGAT, solicitamos una cepa alterada en *GCN4* (F212: *gcn4⁻*) y el padre (F113: *GCN4⁺*) del cual se derivó la misma. Ambas cepas se crecieron en presencia y ausencia de 3-AT y se determinó la actividad de GOGAT. La Tabla 6

TABLA 6. Actividad enzimática de GOGAT en presencia y ausencia de 3-AT^a

CEPAS	GOGAT^b Act Esp
ROMEX1 (<i>gdh⁻</i>, <i>gus2⁺</i>; <i>GCN4⁺</i>)	0.020
ROMEX1+ 3-AT	0.026
ROMEX1/pGB102 (<i>gdh⁻</i>; <i>GUS2⁺</i>; <i>GCN4⁺</i>)	0.040
ROMEX1/pGB102 + 3-AT	0.027
ROMEX1/pCA (<i>gdh⁻</i>; <i>GUS2⁺</i>; <i>GCN4⁺</i>)	0.048
ROMEX 1/pCA + 3-AT	0.037
F113 (<i>GDH⁺</i>; <i>GUS2⁺</i>; <i>GCN4⁺</i>)	0.030
F113 + 3AT	0.031
F112 (<i>GDH⁺</i>; <i>GUS2⁺</i>; <i>gcn4⁻</i>)	0.037
F112 + AT	0.022

^a 10mM

^b micromolas de NADH oxidado por minuto por miligramo de proteínas.

muestra, que tanto en presencia como en ausencia del análogo, la actividad de GOGAT no cambió. Estos datos definitivamente demuestran, que la actividad de GOGAT no responde al ayuno de aminoácidos.

EFFECTO DEL AYUNO DE AMINOACIDOS SOBRE LA EXPRESION DEL RNA MENSAJERO DE GOGAT (*GLT 1*).

Aún cuando los datos presentados en el inciso anterior muestran que la actividad de GOGAT no aumenta en condiciones de ayuno, decidimos determinar los niveles de los transcritos de *GLT 1* en RNA total obtenido de células cultivadas en presencia y ausencia de 3-AT. La Tabla 7 presenta las autorradiografías y los datos de densitometría obtenidos del análisis de las mismas. En estos experimentos se incluye como control el análisis de la expresión de *HIS3*, ya que se ha reportado que la expresión de este gen se regula por GCN, (Hill y col. 1982a). Los resultados muestran, que la expresión del RNA mensajero de *GLT 1* responde ligeramente a la presencia de 3-AT, aumentando de 3 a 8 veces en las diferentes cepas cultivadas con este análogo. Sin embargo la expresión de *HIS3* aumenta considerablemente (de 10 a 20 veces). Así mismo, cuando se analizó la expresión del RNA mensajero de *HIS3* en cepas *GCN4⁺* y *gcn4⁻*, la diferencia de expresión fue de 15 veces, en tanto que para *GLT 1* la diferencia no fue ni siquiera de 2 veces. Estos resultados indican que la expresión del RNA mensajero de *GLT 1* en presencia de 3-AT, es decir en condiciones de ayuno, aumenta ligeramente y este aumento no corresponde a un incremento en actividad de la enzima.

TABLA 7. Expresión de RNAm de *GLT1* y *HIS3*

CEPA	S288C	S288C +3AT ^a	LA1	LA1 +3AT	AG1	AG1 +3AT	F113	F113 +3AT	F212	F212 +3AT
<i>GLT1</i>	3.35	17.7 (5.3X)	1.39	11.11 (8.0X)	4.24	11.10 (3.0X)	0.39	1.82 (5.0X)	0.15	0.44 (3.0X)
<i>GLT1</i> ^b										
<i>HIS3</i>	9.0	90.2 (10X)	2.12	37.24 (18X)	12.87	218.79 (17.0X)	1.0	15.5 (15.5X)	0.43	1.20 (3.0X)
<i>HIS3</i> ^c										
ACTINA ^d										

^a 10 mM

^b Como sonda se utilizó un fragmento interno de 4.5 Kb de *GUS2* (Cogoni y col., 1995).

^c Como sonda se utilizó un fragmento interno del gene *HIS3* (Struhl y Davis 1980)

^d Como sonda se utilizó un fragmento del gene de actina (Gallwitz y Seidel, 1980)

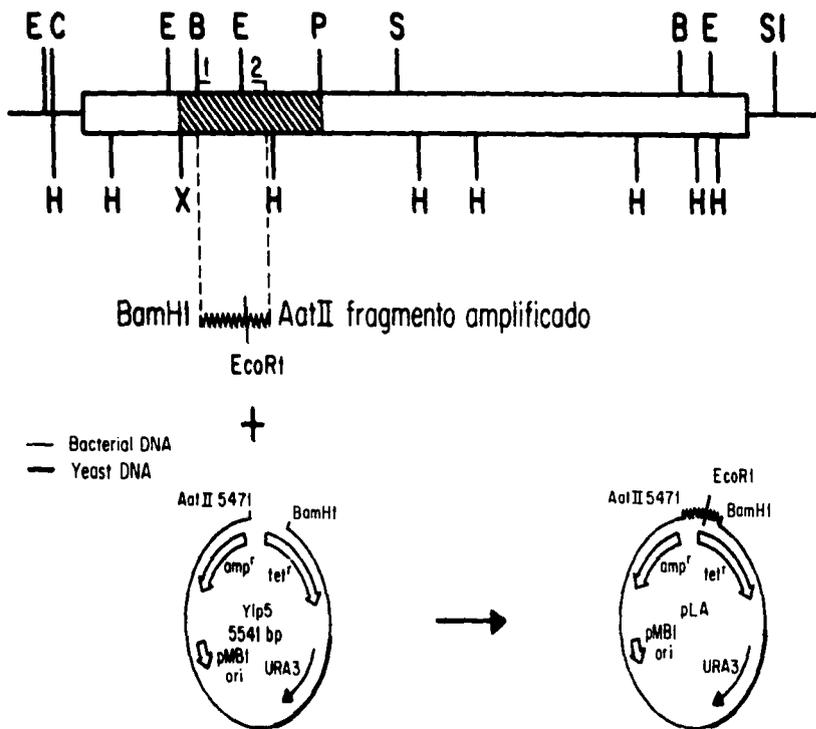
CONSTRUCCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES INTERRUMPIDAS EN *GUS2/GCN5*

Una estrategia muy utilizada en levadura, cuando se ha clonado un gen cuya función nos interesa estudiar, es la construcción de mutantes que se preparan interrumpiendo la copia cromosomal del gen deseado en una cepa determinada. Para este fin se subclona un fragmento del gen en cuestión en un plásmido integrativo, que carezca de origen de replicación en levadura. En estas circunstancias, la cepa a interrumpir se transforma con una preparación del plásmido linearizado, de tal suerte, que así se selecciona la integración del plásmido al cromosoma. Esta integración ocurrirá en la región de homología, de tal manera que si al linearizar el plásmido, en cada uno de los extremos queda un fragmento del gen pertinente, el plásmido se integrará en la copia cromosomal del mismo, quedando así interrumpido.

Con el fin de interrumpir la copia cromosomal del gen *GUS2/GCN5*, se construyó el plásmido pLA1. Esto se hizo subclonando un fragmento interno de *GUS2* de 751 pb obtenido por amplificación con PCR en el plásmido integrativo YIp5 (Figura 9). El plásmido YIp5 es portador del gen *URA3* de levadura. Cuando pLA1 se digiere con *EcoRI*, se lineariza, quedando en uno de los extremos, una región de 406 pb y en el otro una región de 346 pb, ambas correspondientes a *GUS2* (Figura 9). El plásmido linearizado se utilizó para dirigir la recombinación homóloga dentro del genoma de levadura. Por lo tanto se transformaron la cepa LA1 (*GDH⁺, ura3⁻*) y la cepa AG1 (*gdh⁻, ura3⁻*) con el pLA linearizado y se seleccionaron colonias protótrofas capaces de crecer en ausencia de uracilo. Se aisló el DNA de 10 colonias derivadas de la cepa LA1 y 10 colonias derivadas de la cepa AG1. La Figura 10, muestra el resultado del análisis tipo Southern. Se observa claramente que en las candidatas interrumpidas la banda de *GUS2* aumentó de tamaño, como era de esperarse, debido a la integración de pLA en la copia cromosomal de *GUS2*.

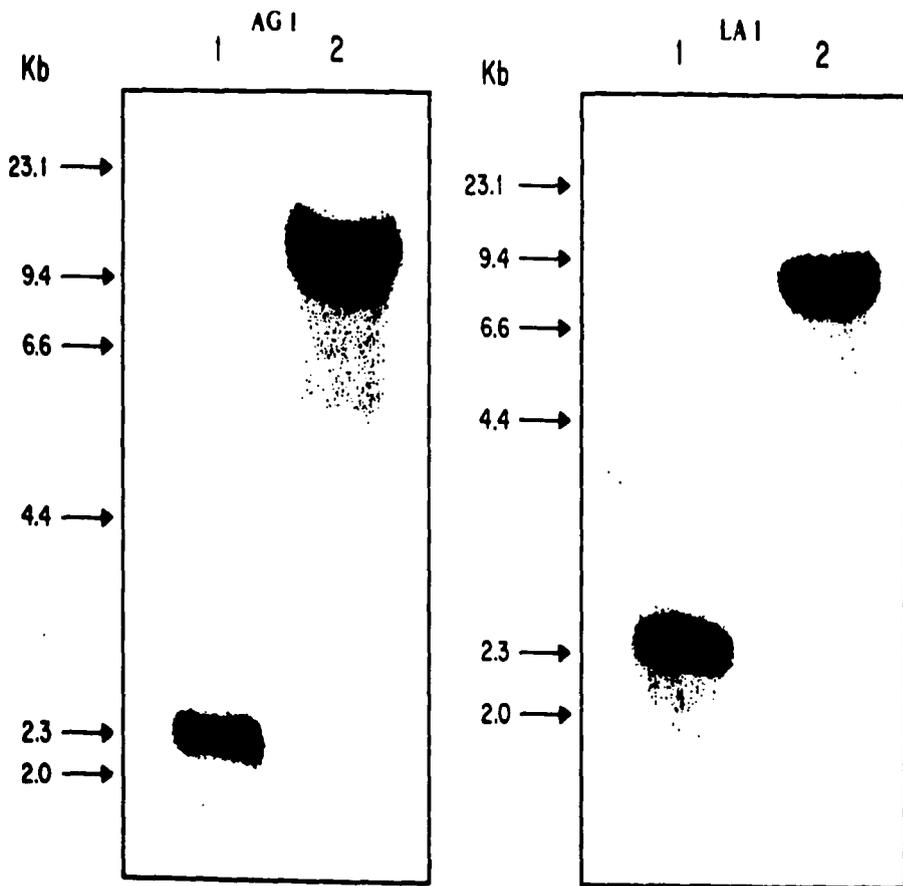
Con el fin de analizar el efecto de la interrupción en *GUS2/GCN5*, sobre la actividad basal de GOGAT, se prepararon extractos de las cepas padre y las interrumpidas y se determinaron las actividades enzimáticas de GOGAT. Como se muestra en la Tabla 8, la actividad de GOGAT no muestra diferencias entre las cepas padre y las interrumpidas. Estos datos

Figura 9



El plásmido pGB102, se digiere con *Bam*HI-*Aat*II (751 pb) el cual se amplifica por PCR. Este fragmento se subclona en el plásmido integrativo Yip 5, que lleva el gen *URA3* para levadura, dando lugar al pLA1. Este último se linealiza con *Eco*RI comenzando en los dos extremos secuencias de *GUN2/GUN3*, uno con 416 pb y otro con 346 pb, ambos extremos se recombinan con sus regiones homólogas en el genoma de levadura provocando la ruptura de *GUN2/GUN3* y la inserción del gen *URA3*. Se transforman las copias AG 1 y LA 1, seleccionando colonias prototrofas capaces de crecer en ausencia de uracilo. Los sitios de restricción se abrevian de la siguiente manera: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; P, *Pst*I; S, *Sma*I; SI, *Sat*I; X, *Xba*I.

Figura 10



Análisis tipo Southern para las cepas AG 1 y LA 1, las cuales fueron interrumpidas en el gen *GUS2/GCN5*, como se describe en la Figura 9 y en *Material y Métodos*. Los carriles 1 muestran la banda correspondiente al gen *GUS2/GCN5*, sin interrumpir, con un peso de 2.3 Kb. En los carriles 2 se muestran la banda correspondiente al gen *GUS2/GCN5* interrumpido con el gen *URA3* con un peso de aproximadamente 9.3 Kb el cual aumenta debido a la inserción del gen mencionado.

indican que la interrupción en *GUS2* no anuló por completo la actividad de este gen. Cuando se analizaron los niveles de RNA mensajero para *GLT 1* en presencia y ausencia de 3-AT se encontró (Tabla 9), que tanto las mutantes como los padres eran capaces de aumentar el RNA mensajero de *HIS3* en respuesta a la presencia de 3-AT, mas que los niveles de *GLT 1*. Por lo tanto se puede concluir que la interrupción no resultó en un fenotipo null. En virtud de que por interrupción génica no fuimos capaces de construir mutantes en *GUS2/GCN5*, decidimos analizar la expresión de *GLT 1* y *HIS3* en la mutante ROMEX 1 complementada con y sin pCA. La Tabla 10 muestra que en la mutante ROMEX 1, el RNA mensajero de *HIS3* no aumenta en respuesta a 3-AT. Ahora bien, cuando la cepa ROMEX 1 se complementa con el pCA, la respuesta en la síntesis de RNA mensajero de *HIS3* se recupera. En relación a la expresión de *GLT 1* se observa que como era de esperarse, ésta no aumenta en la cepa ROMEX 1. Sin embargo, a diferencia de la respuesta de *HIS3*, la de *GLT 1* no se repone en la mutante ROMEX 1 complementada con pCA. Estos datos muestran que ROMEX 1 posee una mutación en *GCN5* y confirma como se mencionó anteriormente , que la expresión de *GLT 1* no se regula por el circuito GCN.

TABLA 8. Actividad enzimática de GOGAT en cepas silvestres y mutantes interrumpidas en *GUS2*.

CEPAS	GOGAT ^a Act. Esp.
LA1 (<i>GDH</i> ⁺ ; <i>GUS2</i> ⁺)	0.03
LA1 + 3-AT	0.025
LA1 Δ 28 (<i>GDH</i> ⁺ ; <i>gus2</i> Δ)	0.016
LA1 Δ 28 + 3-AT	0.015
AG1 (<i>gdh</i> ⁻ ; <i>GUS2</i> ⁺)	0.049
AG1 + 3AT	0.018
AG1 Δ 16 (<i>gdh</i> ⁻ ; <i>gus 2</i> Δ)	0.042
AG1 Δ 16 + 3AT	0.016

^aMicromolas de NADH oxidado por minuto por miligramo de proteína

TABLA 9. Niveles de RNAm de *GLT1* y *HIS3*

CEPAS	LA1	LA1 +3-AT ^a	LA1Δ28	LA1Δ28 +3-AT	AG1	AG1 +3AT	AG1Δ16	AG1Δ16 +3-AT
<i>GLT1</i>	1.39	6.95 (5.0X)	1.76	8.8 (5.0X)	4.24	11.09 (2.6X)	1.86	4.56 (2.4X)
<i>GLT1</i> ^b								
<i>HIS3</i>	8.2	111.9 (13X)	6.60	132.0 (20X)	8.7	127.0 (14.6X)	1.83	29.70 (16.5X)
<i>HIS3</i>								
ACTINA ^c								

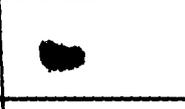
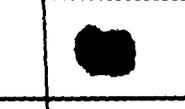
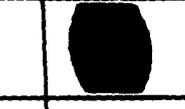
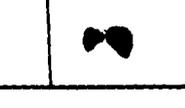
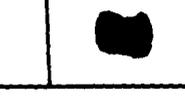
^a 10 mM

^b Como sonda se utilizó un fragmento interno de 4.5 Kb de *GUS2* (Cogoni y col. 1995)

^c Como sonda se utilizó un fragmento interno de *HIS3* (Struhl y Davis, 1980).

^d Como sonda se utilizó un fragmento del gene de actina (Gallwitz y Seidel, 1980).

TABLA 10 Actividad enzimática de glutamato sintasa y expresión de RNAm de *GLT1* y *HIS3*

CEPAS	ROMEX1	ROMEX1 + 3-AT ^a	ROMEX1/pCA	ROMEX1/pCA + 3-AT
GOGAT ^b	0.02	0.008	0.046	0.037
<i>GLT1</i> ^c				
<i>HIS3</i> ^d				
ACTINA ^e				

^a 10mM

^b Actividad específica de GOGAT expresada en μ moles por minuto por miligramo de proteoma.

^c Como sonda se utilizó un fragmento interno de 4.5 Kb de *GLT1* (Cogoni y col. 1995)

^d Como sonda se utilizó un fragmento interno del gene *HIS3* (Struhl y Davis, 1980)

^e Como sonda se utilizó un fragmento interno del gene de actina (Gallwitz y Seidel, 1980)

DISCUSION

La glutamato sintasa (GOGAT) es una enzima clave del metabolismo nitrogenado en *Saccharomyces cerevisiae*. En coordinación con la glutamino sintetasa, constituye una vía de asimilación de amonio y una ruta alternativa para la biosíntesis de glutamato. En esta levadura, se ha probado que existe una sola GOGAT cuya forma activa es un homotrímero, constituido por monómeros de 200 kDa y el gen estructural ha sido clonado (*GLT 1*), (Cogoni y col. 1995).

Los mecanismos regulatorios responsables de la modulación de la actividad y de la expresión de GOGAT que operan en los organismos que poseen esta enzima, prácticamente se desconocen. El único ejemplo de un gen cuya función consiste en regular la expresión de los genes estructurales de GOGAT es el gen *GLT C* de *Bacillus subtilis*, (Bohannon y Sonensheim, 1989).

En este trabajo se estudió la regulación de la expresión de GOGAT mediada por la fuente de nitrógeno y por el producto del gen *GUS2/GCN5*.

REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE *GTL 1* POR LA FUENTE DE NITROGENO.

Nuestros resultados indican, que cuando una cepa se cultiva en presencia de glutamato, los niveles de RNA mensajero de *GLT 1* disminuyen, cuando se comparan con los obtenidos si la levadura se cultiva en amonio. Esta disminución corresponde a un decremento en la actividad específica de la enzima. Estos resultados demuestran por vez primera, que la fuente de nitrógeno regula la expresión de GOGAT a nivel de transcripción en un organismo eucarionte. En relación a los efectores de esta regulación solamente hemos identificado la fuente de nitrógeno, sin embargo aún no hemos determinado cuales son los productos génicos que actuando en *trans* fueran los responsables de modular los niveles de RNA mensajero que se sintetizan. Aún más, nuestros resultados no nos permiten concluir si se trata de una regulación mediada por un activador como es el caso en *B. subtilis* o por un represor.

En relación al papel del producto del gen *GUS2/GCN5*, Gcn5p, en la regulación mediada por la fuente de nitrógeno, nuestros resultados indican, que éste no juega ningún papel en el mecanismo, ya que mutantes alteradas *gus2*, mantienen la capacidad de reprimir la expresión de *GLT 1*

cuando son cultivadas en glutamato como única fuente de nitrógeno. Los resultados presentados también muestran que la represión por glutámico no es total, de tal manera, que aún en presencia de este aminoácido se encuentra una expresión basal de *GLT 1*. Estos datos hacen suponer que mutantes alteradas únicamente en el circuito que modula la expresión de GOGAT vía la fuente de nitrógeno, no resulta en una carencia completa de actividad de GOGAT. En este sentido y como se mencionó en RESULTADOS, la búsqueda de auxótrofos de glutamato a partir de mutantes *gdh⁻*, resultó en el aislamiento de dobles mutantes *gus 1* y *gus2*.

Hasta ahora no conocemos a que nivel afectó la mutación *gus1*, presente en la cepa ROMEX 0, la expresión o actividad de GOGAT. Considerando los resultados reportados en este trabajo, y tomando en cuenta que el producto de *GUS2/GCN5*, Gcn5p, no participa en la regulación por glutamato sería interesante determinar los niveles de RNA mensajero de *GLT 1* en mutantes *gus1⁻*, cultivadas en amonio o en glutamato como fuente de nitrógeno, con el fin de determinar si esta mutación afectó el sistema que media la regulación de la expresión de GOGAT por la fuente de nitrógeno. De no ser así, la búsqueda de mutantes en este circuito regulatorio podría hacerse buscando auxótrofos de glutamato a partir de la cepa ROMEX 1, ya que esta cepa por un lado no está afectada en este circuito y tiene una actividad basal de GOGAT de 2 a 3 veces menor que la de una cepa silvestre. Naturalmente esta selección solo nos permitirá encontrar mutantes si el mecanismo de acción está mediado por un activador como es el caso de *B. subtilis* (Bohannon y Sonensheim, 1989). Si el sistema está mediado por un represor, el fenotipo esperado para una mutante afectada en el mismo, sería la expresión constitutiva de *GLT 1* en un medio de cultivo en presencia de glutamato, fenotipo para el cual no tenemos aún un método de selección.

PAPEL DE *GUS2* EN LA REGULACION DE LA EXPRESION BASAL DE GOGAT.

La activación transcripcional en eucariontes involucra la interacción funcional entre los activadores transcripcionales que se unen en secuencias potenciadoras "enhancers" o UAS (upstream activated sequences -secuencias activadoras río arriba-) y los factores generales de la transcripción que se unen a las secuencias TATA. Los activadores son estructuras modulares, que contienen dominios de unión al DNA y dominios de activación (Hope y Struhl, 1985). Cualquiera que sea el mecanismo de acción de los activadores, estos requieren de factores

proteicos (coactivadores), para alcanzar su máxima actividad. Existen varias clases de coactivadores, la primera clase agrupa a aquellos factores asociados a la proteína que se une a secuencias TATA (TBP, tata binding protein -proteína ligada a la caja TATA-). Estas proteínas asociadas a TBP (TAFs), sirven como sitios de la maquinaria general a los que se pueden unir los activadores (Goodrich y col. 1993). Otra clase de coactivadores está formada por los productos de genes como *SW11-3* y *SNF5-6* que constituyen un solo complejo (Peterson y col. 1994). Aparentemente estas proteínas actúan relajando la estructura cromatinica (Hirschhorn y col. 1993). Un tercer grupo de cofactores incluye los factores *ADA2* y *ADA3*, estos actúan como adaptadores que median las interacciones entre los dominios de activación y los factores generales en los sitios promotores (Beger y col. 1990). En relación al producto *Gcn5p* se ha propuesto que éste podría ser un coactivador que aumenta la actividad de *Gcn4p*, (Georgakopoulos y Thireos, 1992). Como se mencionó anteriormente, la secuencia de *GUS2* resultó ser idéntica a la de *GCN5*. Considerando, que se había reportado que el producto de *GCN5* jugaba un papel en la regulación de la expresión transcripcional de algunos genes que participan en la biosíntesis de aminoácidos, dirigimos nuestros esfuerzos a estudiar el efecto de *GUS2* en la transcripción de *GLT 1*.

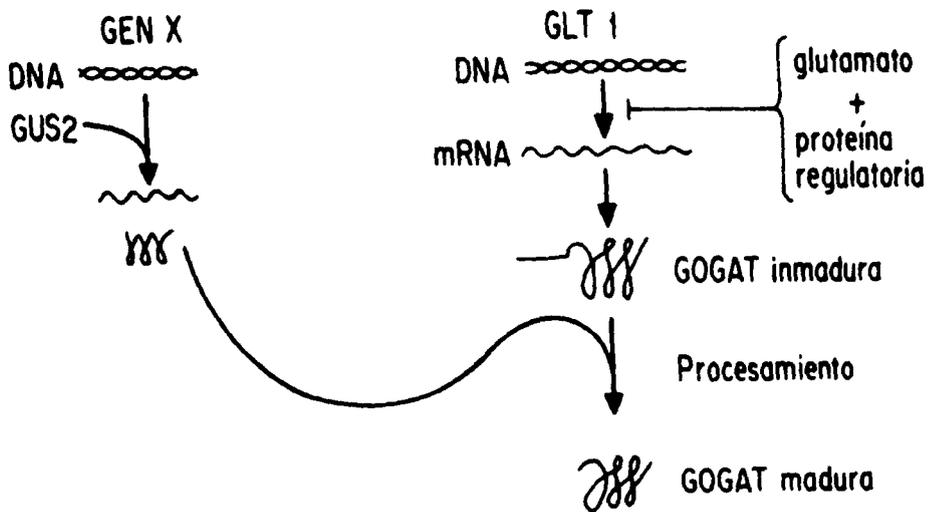
Como se presentó en RESULTADOS, la clonación de *GUS2* se llevó a cabo complementando la mutante ROMEX 1 en condiciones de no ayuno, este hecho inmediatamente indica que como en el caso de las vías biosintéticas de otros aminoácidos (Hinnebush, 1992) el circuito GCN, a través de *GUS2/GCN5* podría estar regulando la expresión de *GLT 1* en condiciones de no privación, a las que se ha mencionado condiciones basales ya que no dependen de la privación ya mencionada (Hinnebush, 1992). Nuestros resultados claramente indican, que la actividad de GOGAT aumenta al doble en mutantes *gdh*; *GUS2*⁺ cuando se compara con la actividad reportada para mutantes *gdh*; *gus2*⁻. Sin embargo, los niveles de RNA mensajero de *GLT 1* son iguales tanto en cepas *gus2*⁻ como *GUS2*⁺, por lo que debemos concluir, que el producto de *GUS2*, *Gcn5p*, no regula la expresión de *GLT 1* a nivel transcripcional, sino que por el contrario, regula la actividad de GOGAT a nivel postraduccional. Considerando que tanto la secuencia de *GUS2/GCN5* como el papel de *GCN5* sobre la regulación de *HIS3* (Hinnebush, 1992), sugiere que éste actúa a nivel transcripcional, el resultado de nuestro análisis con relación al papel de este gen sobre la expresión de *GLT 1* resulta contradictorio, ya que nuestros datos claramente indican que en este caso, la regulación

ocurre a nivel postraducciona. Esta aparente contradicción puede resolverse, tomando en cuenta el hecho de que se ha encontrado, que el papel de *GUS2/GCN5* como coactivador ocurre, ya que el producto *GCN5* es capaz de aumentar la actividad de varios activadores; es decir, el producto del gen *GCN5* es promiscuo, en el sentido que es capaz de funcionar activando la transcripción, actuando en combinación con diferentes activadores (*GCN5, HAPI- HAP2- HAP3, ADE2*).

Nuestra hipótesis propone, que *GUS2/GCN5*, actúa regulando la expresión, a nivel transcripcional, de un gen al que hemos denominado "X", aún no identificado, y cuyo producto regula la actividad de GOGAT a nivel postraducciona. En este sentido, en nuestro laboratorio, hemos obtenido tanto la secuencia nucleotídica de *GLT 1* como la secuencia de los primeros 8 aminoácidos de la enzima GOGAT madura, (Cogoni C. y col. 1995 y Valenzuela, comunicación personal). La comparación de estas secuencias nos permitió encontrar que la GOGAT posee una preproteína de 50 residuos de aminoácidos. Por lo tanto proponemos que la disminución de actividad de GOGAT observada en mutantes ROMEX 1, se debe a que en esta cepa, la ausencia del producto *GUS2*, no permite la inducción de la transcripción de un gen cuyo producto (pudiera ser una proteasa) participa en la degradación de la preproteína inmadura de GOGAT que da como resultado la producción de la GOGAT madura. Proponemos que el corte de la preproteína sea el proceso postraducciona que activa a la GOGAT, ya que el análisis de la secuencia de GOGAT no muestra sitios putativos que pudiera tener que ver con algún otro tipo de procesamiento, Figura 11.

Es importante hacer notar, que el estudio realizado nos permitió proponer, que la mutante ROMEX 1 posee un defecto tal que, la enzima GOGAT producida por esta mutante no es procesada o modificada correctamente. En éste sentido, nos proponemos purificar la GOGAT de la cepa ROMEX 1 y hacer un análisis del amino terminal con el fin de estudiar si esta enzima no ha sido debidamente procesada. Esta mutante constituirá una herramienta valiosa en el estudio de la modificación postraducciona de la GOGAT. Vale la pena mencionar que todas las GOGATs hasta ahora secuenciadas presentan preproteína y en ningún caso se ha estudiado la función de la misma. Así mismo, la mutante ROMEX 1 es la primera descrita en su género.

Figura 11



Modelo propuesto para explicar un sistema de regulacion de la expresion de *GLT 1* a nivel transcripcional mediado por glutamato y un sistema postraduccionnal mediado por *GUS2* GGT1.

REGULACION DE LA EXPRESION DE *GLT 1* EN CONDICIONES DE AYUNO.

En relación a la expresión de *GLT 1* en condiciones de privación de aminoácidos, se encontró que en presencia de 3-AT el RNA mensajero de *GLT 1* aumenta de 3 a 8 veces. Este aumento, es varias veces menor al encontrado para *HIS3* y además no corresponde a un incremento en la actividad de GOGAT, estos resultados indican que *GLT 1* no está regulado por privación de aminoácidos. Con el fin de profundizar un poco más en este punto se estudió la expresión del RNA mensajero de *GLT 1* y *HIS 3* en mutantes *gcn4⁻*. Si la expresión de *GLT 1* estuviera bajo el control de *GCN4*, se esperaría, que el ligero incremento en niveles de mensajero observados en la cepa *GUS2⁺* en presencia de 3-AT se disminuyera completamente en la mutante *gcn4⁻*. Nuestros resultados mostraron que la expresión de *HIS3* es 13 veces menor en una mutante *gcn4⁻* que en una cepa *GCN4⁺*, sin embargo la expresión de *GLT 1* es muy parecida entre una cepa *GCN4⁺* y una *gcn4⁻*. Así mismo, utilizando la expresión de *HIS3* como control, encontramos, que la mutante ROMEX 1 es incapaz de inducir la transcripción de *HIS3* en presencia de 3-AT.

Ahora bien, cuando esta mutante se complementa con un plásmido portador de *GUS2*, la capacidad de regular la expresión de *HIS3* se restituye, estos resultados sugieren, que la cepa ROMEX 1 efectivamente presenta una mutación en *GUS2/GCN5*. En relación a la inducción del RNA mensajero de *GLT 1* nuestros datos indican, que ésta es la misma tanto en la mutante ROMEX 1 como en la mutante ROMEX 1 complementada con el pCA.

Vale la pena hacer notar que en nuestro laboratorio se secuenció la región promotora (Figura 12) de *GLT 1*. El análisis de la misma mostró que ésta posee una caja consenso para unión de la proteína *GCN4*. Sin embargo el papel que ésta podría jugar tendrá que ser valorado una vez que se determine su posición en relación al inicio de la transcripción. Todos estos datos nos permiten concluir de manera definitiva que la expresión de *GLT 1* no se regula por el circuito GCN. Es interesante hacer notar, que la expresión de GDH-NADP⁺ tampoco parece estar regulada por el circuito GCN (datos no mostrados). Esto querría decir que a diferencia de la biosíntesis de otros 12 aminoácidos (Hinnebush, 1992), la biosíntesis de glutamato no se regula por privación de aminoácidos, es decir, por el circuito GCN. Podría resultar paradójico que la síntesis del aminoácido precursor, el glutamato; no esté regulada por este sistema, sin embargo,

dado que la biosíntesis de glutamato necesariamente implica la asimilación de amonio y por tanto la utilización de esqueletos de carbono, se podría suponer, que un incremento importante en la síntesis de glutamato pudiera resultar en un desbalance metabólico.

Como se presentó en RESULTADOS, la construcción de mutantes interrumpidas en *GUS2/GCN5*, no resultó en el fenotipo esperado, aún cuando los experimentos tipo Southern muestran efectivamente que la copia cromosomal de *GUS2/GCN5*, esta interrumpida, posiblemente, la manera en la que se llevó a cabo la interrupción mencionada, permite la formación de un producto que mantiene la actividad de *GUS2/GCN5*. Esto podría ser aclarado, realizando análisis tipo Northern con el fin de determinar si las mutantes "interrumpidas" son capaces de sintetizar un RNA mensajero para *GUS2/GCN5*.

Así mismo, será necesario construir otras mutantes, pero en éste caso consideramos que deberán constituirse por remplazo génico en lugar de hacerlo por interrupción génica.

La Figura 11 muestra el esquema que resume los resultados aquí presentados. Nuestro trabajo nos permitió identificar un sistema de regulación de la expresión de *GLT 1* a nivel transcripcional mediado por glutamato y un sistema de regulación postraduccional mediado por *GUS2/GCN5*.

Figura 12

1 CAATTCAGC TTCTCCACGC CATAATTCAT ACCTCACTTT AAAAACTTT
51 GTTTTCTTGG CATCCATACA TGAACAATAA CAACAATTCT ATATCATCTT
101 AAGTAAGACT CTTATTGTAA TTTCTTTTTT TTTGATGACT CAGACCCTGG
151 TAGCCCTACC GTTCAACCCT ATACAGCGCA AATTTGGTCC TAATACACTT
201 CGGTTTTAAT GCGTCAATCC GATTGGCTCC GATAAGCTTT TGCACATTTT
251 TCAAGTCATA TGTCACGACG AACGTGATGC CTCAAACGTA AAAAGAAGCA
301 ATAAATTGCC CAAAAAAAAA ATATAACTGC TTTTCTTAGT CATTCATAAG
351 TTCTGATGGT CTTCTTATC TTATTGTATT TTTCGTCCTA TTGTTTCATT
401 TCTTACCAA TTAATCAATT CTTATATCTT ACTTGATAAC ACACCAAAC
451 AATCGTCTCC ACATCATAGG AAGATAGGAA ATTGCTATCT CAGTCCTATA
501 CTACGCAGAC GGATACCTCA GTTGCTCTCT TTCTTCCCCT TCTTTAGCT
551 CATTGAGGTA GTGATTAACG TTTAACTTAT TTATTTATIT TTCTGCTTCA
601 GTTTTTTTTT ATTTATTTTT GTCTTTCTAC TCTCTTTTTT TTCTTAATCT
651 ATTTGCCATT TATTTATTTT GAAGAAGTAG AAAAAGAATT AGAAAAGAAA
701 GCATGCCAGT GTTGAAATCA GACAATTTTCG ATCCATTGGA AGAAGCTTAC
751 GAAGGTGGCA CAATTCAAAA CTATAACGAT GAACACCATC TTCATAAATC
801 TTGGGCAAAT GTGATTCCGG ACAAACGAGG ACTTTACGAC CCTGATTATG
851 ATGATGACGT TCGTGGTGTG GGTTCGTAG CAAATAAGCA TGGTGAACAG
901 TCTACAAGA TTGTTACTGA CGCTAGATAT CTTTLAGTGA ATATGACACA
951 TCGTGGTGCC GTCTCATCTG ATGGGAACGG TGACGGTGCC GGTATTCTGC
1001 TAGGTATTCC TCACGAATTT ATGAAAAGAG AATT

Caja: TGACTC y TGATGC: secuencia consenso para *GCN4* - - - - -

Caja GATA y GATAA secuencia consenso para proteínas con dedos de zinc. -----

Región promotora del gen *GLT 1* mostrando las cajas consenso para el producto *Gcn4p* y las secuencias consenso para proteínas con dedos de zinc. -----> se refiere al inicio de la presecuencia de *GLT 1*.

CONCLUSIONES

1. La expresión del gen de la glutamato sintasa (*GLT 1*), se ve disminuida bajo condiciones de crecimiento en presencia de glutamato. Este fenómeno no ha sido observado previamente en levadura, un solo antecedente se encuentra reportado en la literatura y es referente a la expresión de los genes *GLT A* y *GLT B*, que constituyen los genes estructurales de GOGAT en *Bacillus subtilis* y cuya expresión se ve afectada cuando dicha bacteria se crece en un medio conteniendo glutamato.

La expresión del RNA mensajero de *GLT 1* se ve disminuida en presencia de glutamato. Lo que demuestra que la regulación es a nivel transcripcional y que el glutamato está involucrado en el mecanismo relacionado con este tipo de represión.

2. Nuestros datos muestran al haber clonado el gen *GUS 2*.
 - a) el producto de este gen corresponde a un coactivador transcripcional.
 - b) la mutantes *gus 2⁻* presentan una actividad enzimática disminuida en GOGAT.
 - c) los niveles de RNA mensajero correspondientes a *GLT 1* son iguales en cepas *GUS 2⁺* que *gus 2⁻*.
3. Por lo tanto la función del producto Gcn5p sobre GOGAT es indirecta. Por lo que proponemos, que el producto Gcn5p en cuestión, regula la expresión de un gen cuyo producto modula la actividad de GOGAT.
4. La función propuesta en la literatura para el producto Gcn5p es la de actuar como coactivador transcripcional, aumentando la síntesis de RNA mensajero de algunos genes cuyos productos participan en la biosíntesis de aminoácidos. Esto ocurre en condiciones de privación de aminoácidos; en el caso de glutamato sintasa (GOGAT), no se observó ningún efecto, ni sobre la actividad enzimática, ni sobre los niveles de RNA mensajero correspondiente a *GLT 1*.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFIA

- Abastado, J. P., P. F. Miller and A. G. Hinnebusch. (1991a). *New Biol.* **3**: 511.
- Abastado, J. P., P. F. Miller, B. M. Jackson and A.G. Hinnebusch. (1991b). *Mol. Cell Biol.* **11**: 486.
- Anderson, M. P., C. P. Vance, G. H. Hiechel and S. S. Miller (1989). *Plant Physiol.* **90**: 351-358.
- Arndt, K., and G. R. Fink. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8516.
- Arndt, K., C. Styles and G. R. Fink. (1987) *Science* **237**: 874.
- Avila, C., J. R. Botella, F. Cánovas, Y. Nuñez de Castro and V. Valpuesta. (1987) *Plant. Physiol.* **85**: 1036-1039.
- Barthelmess, Y. B. (1982). *Genet. Res.* **39**: 169.
- Berger, S. L., W. D. Crees, A. Crees, S. J. Truzenberg and L. Guarente. (1990) *Cell.* **61**: 1199-1208.
- Bohannon, D., M. S. Rosenkrantz and A. L. Sonensheim (1985). *J. Bacteriol.* **163**: 957- 964.
- Bohannon, D., and A. L. Sonensheim. (1989). *J. Bacteriol.* **171**: 9, 4718-4727.
- Calberg, Y. and S. Nordlund. (1991). *Biochem. J.* **279**: 151-154.
- Carlson, M., and D. Bolstein. 1982. *Cell* **28**: 145-154.
- Cigan, A. M., M. Foiani, E. M. Hanning and A. G. Hinnebusch. (1991). *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3217.
- Cigan, A. M., E. K. Pabich, L. Feng and T. F. Donahue. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2784.
- Cogoni, C., L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballario and A. González. (1995). *J. Bacteriol.* **177**: 792-798.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110- 2114.
- Covarrubias, A. A., R. Sánchez-Pescador, A. V. Osorio, F. Bolivar and F. Bastarrachea. (1980). *Plasmid* **3**. 150- 164.
- Crabeel, M., R. Huygen, K. Verschueren, F. Messenguy, K. Tinel, R. Cinin and N. Glansdorff. (1985). *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3139
- Curran, T., and B. R. Franza Jr. (1988). *Cell* **55**: 395.
- Chen, J. J., M. S. Troop, L. Gehrke, Y. Kuo, J. K. Pal and I. M. London. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7729.
- Davis, R. W., D. Botstein and J. R. Roth, eds. (1980), *Advanced bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

- Delforge, J. F., F. Messenguy, and J. M. Wiame (1975). *Eur. J. Biochem.* 57: 231.
- Deshpande, K. L. and J. F. Kane. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 308- 314.
- Dever, T. E., L. Feng, R. C. Wek, A. M. Cigan, T. F. Donahue and A. G. Hinnebusch (1992). *Cell*. 68: 585.
- Doherty, D. (1970). *Methods of Enzymology*. 17: 850- 856.
- Donahue, T. F., A. M. Cigan, E. K. Pabich and B. C. Valavicus. (1988). *Cell*. 54: 621.
- Drillier, R., and F. Lacroute (1972). *J. Bacteriol.* 109: 203-209.
- Ferguson, A. R. and A. P. Sims. (1974). *J. Gen. Microbiol.* 80: 159-171.
- Foiani, M., A. M. Cigan, C. J. Paddon, S. Harashima and A. G. Hinnebusch. (1991). *Moll. Cell. Biol.* 11: 3203.
- Folch, J. L., A. Antaramian, L. Rodríguez, A. Bravo, A. Brunner and A. González. (1989). *J. Bacteriol.* 171: 4927-4935.
- Foroburg, S. K. and L. Guarentes. (1989). *Genes Dev.* 3: 1166-1178.
- Furter, R., G. Braus, G. Paravicini, H. U. Mösh, P. Niederberger and F. Hütter. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 211: 168.
- Gentz, R., F. J. Rauscher III, C. Abate and T. Carrant. (1989). *Science*. 243: 1695.
- Georgatsou, E., T. Georgakopoulos and G. Thireos. (1992). *FEBS Lett.* 299: 39-43.
- Georgakopoulos, T. and G. Thireos. (1992). *EMBO J.* 11: 4145-4152.
- González, A., L. Rodríguez, H. Olivera and M. Soberón. (1985) *J. Gen. Microbiol.* 131: 2565-2571.
- Goodrich, T. A., T. Hoey, C. J. Thut, A. Adam and R. Tjian. (1993). *Cell*. 75: 519-530.
- Grenson, M. (1983b). *Eur. J. Biochem.* 133: 141- 144.
- Guarente, L., B. Lallonde, P. Gifford and J. Alani. (1984). *Cell* 36: 503- 511.
- Harashima, S. and A. G. Hinnebusch. (1986). *Moll. Cell. Biol.* 6: 3990.
- Hayakawa, T., T. Yamaya, K. Kamachi and K. Ojima. (1992) *Plant. Physiol.* 98: 1317- 1322.
- Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo and J. C. Wallace. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 6602- 6606.
- Hershey, J. W. B. (1991). *Annu. Rev. Biochem.* 60: 717.
- Hiennen, A., J. B. Hicks, G. R. Fink. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 1929- 1933.
- Hill, D. E., Y. A. Hope, J. P. Macke and K. Struhl. (1986) *Science* 234: 451.
- Hill, D. E. and K. Struhl. (1986). *Nucleic Acids Res.* 14: 10045.
- Hill, D. E. (1988). *Nucleic. Acids Res.* 16: 9253.

- Hinnebusch, A. G. and G. R. Fink. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 5374.
- Hinnebusch, A. G. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 6442.
- Hinnebusch, A. G. (1988). *Microbiol. Rev.* **52**: 248.
- Hinnebusch, A. G. (1992). In "The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". Gene expression. Vol II. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- Hirschorn, J. N., S. A. Brown, C.D.Clark and F.Winston (1992). *Genes.* **6**: 2288-2298.
- Hoffamn, I. and R. Winston. (1987). *Gene* **57**: 267-272.
- Hope, I. A. (1986). *Cell.* **46**: 885.
- Hope, I. A. (1987). *EMBO J.* **6**: 2781.
- Hope, I. A. and K. Struhl. (1985). *Cell.* **43**: 177.
- Janssen, R. J. and M. J. Bibb. (1993). *Gene.* **124**: 133-134.
- Jones, E. W. and G. R. Fink. (1982). *Metabolism ans gene expression.*(Ed. Strathern.) p. 181. Cold Spring Harbord Laboratory. Cold Spring Harbor. U.S.A.
- Kendall, A. C., R. M. Wallsgrove, M. P. Hall, J. C. Turner and P. J. Lea. (1986). *Planta***168**: 316- 323.
- Kouzarides, T. and E. Ziff. (1988). *Nature* **336**: 64679.
- Kozak, M. (1989). *J. Cell. Biol.* **108**: 229.
- Landschulz, W. H., P. F. Jonhnsen and S. L. McKnight. (1988). *Science***240**: 1759.
- London, I. M., D. H. Levin, R. L. Matts, N. S. B. Thomas, R. Petryshyn and J. J. Chen. (1987) *The enzymes.* (De. P.D.Boyer and E.G.Krebs), Vol **18** p. 359. Academic Press. N.Y.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lucchini, G., A. G. Hinnebusch, C. Chen and G. R. Fink. (1984). *Mol. Cell Biol.* **4**: 1326-1333.
- Magasanik, B. (1992). The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene Expression. Vol.II. Chapter 6. Regulation of nitrogen utilization. *Cold Spring Harbor Laboratory Academic Press.* U.S.A. 283-317.
- Marcus, G. A., N. Silverman, S. L. Berger, J. Horiuchi and L. Guarente. (1994). *EMBO J.* **13**: 4807-4815.
- Márquez, S., J.F.Florencio and P. Candau. (1992). *Eur. J. Biochem.* **206**: 69-77.
- Match, T. and E. Takahashi. (1982). *Planta* **154**: 289- 294.
- Mazon, M. J. and B. A. Hemmings. (1979). *J. Bacteriol.* **139**: 686- 689.

- Meurs, E. K., K. Chong, J. Galabru, N. S. B. Thomas, Y. M. Kerr, B. R. G. Williams and A. G. Hovanessian. (1990). *Cell* **62**: 379.
- Mifflin, B. J. and P. J. Lea. (1977). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 299.
- Miller, R. E. and E. R. Stadtman. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**: 7407-7419.
- Mitchell, A. P. and B. Magasanik. (1984). *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2767.
- Mountain, H. A., A. S. Byström, J. T. Larsen and C. Korch. (1991). *Yeast*. **7**: 781.
- Mueller, P. P. and A. G. Hinnebusch. (1986). *Cell*. **45**: 201.
- Mueller, P. P., S. Harashima and A. G. Hinnebusch. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 2863.
- Nagatani, H., M. Shimizu and R. C. Valentine. (1971). *Arch. Mikrobiol.* **79**: 164-175.
- Niederberger, P., G. Miozzari and R. Hütter. (1981). *Mol. Cell. Biol.* **1**: 584.
- Niederberger, P. M. (1986). *Curr. Genet.* **10**: 657.
- O'Neil, K. T., J. D. Shuman, C. Ampe and W. F. deGrado (1991). *Biochemistry*. **30**: 9030.
- Paluh, J. L., J. L. Orbach, T. L. Legerton and C. Yanofsky. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 3728.
- Pan, F. L. and J. G. Coote. (1979). *J. Gen. Microbiol.* **112**: 373- 377.
- Paravicini, G., H. U. Mösch, T. Schmidheini and G. Braus. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**: 144.
- Penn, M. D., B. Galgoci and H. Greer (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 2704.
- Peterson, C. L., A. Dingwall and M. P. Sedtl (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8, 2905-2908.
- Pu, W. T. and K. Struhl, (1991a). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 6901.
- Roberts, T. M., S. L. Swanberg, A. Poteete, G. Riedel and K. Backman. (1980). *Gene* **12**: 123- 127.
- Roon, R. J., H. L. Even, F. Larimore. (1974) *J. Bact.* **118**: 1, 89-95.
- Rose, M. D., P. Novock, J. H. Thomas, D. Bolstein and G. R. Fink. (1987). *Gene*. **60**: 237-243.
- Roussou, I., G. Thireos and B. M. Hauge. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2132.
- Ryu, J. L. (1978). *J. Bacteriol.* **135**: 408-414.
- Ryu, J. L. and S. Takayanagi. (1979). *J. Bacteriol.* **139**: 652-656.
- Sakakibara, H., M. Watanabe, T. Hase and T. Sugiyama. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**: 4, 2028- 2035.
- Schaeffer, P., J. Millet and J. P. Aubert. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**: 704-711.
- Schreier, H. J., T. M. Smith and R. W. Bernlohr. (1982). *J. Bacteriol.* **151**: 971-975.
- Schreier, H. J. and R. W. Bernlohr. (1984). *J. Bacteriol.* **160**: 591-599.

- Sellers, J. W. and K. Struhl. 1989. *Mol. Cell Biol.* **10**: 5077.
- Sheiness, D. and D. Sullivan. (1986). *Focus*. **8**: 11- 15.
- Somerville, C. W. and W. L. Ogren. (1980). *Nature*. **286**: 257- 259.
- Stadtman, E. R., A. Ginsburg, W. B. Andersom, A. Segal, M. S. Brown and J. Ciardi. (1972). In "Molecular basis of biological activity"*PAABS*. **1**: 127-143. Symposium Academic Press, Inc. N.Y.
- Struhl, K. and R. W. Davis. (1981). *J. Mol. Biol.* **152**: 553-568.
- Struhl, K. (1982a). *Nature* **300**: 284.
- Struhl, K. (1982b). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 7385.
- Struhl, K. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 8419.
- Struhl, K. (1986). *Mol. Cell. Biol.* **6**: 3847
- Struhl, K. and D.E. Hill. (1987). *Mol. Cell. Biol.* **7**: 104.
- Suzuki, A., J. Vidal and P. Gadal. (1982). *Plant Physiol.* **70**: 827- 832.
- Talanian, R. V., C. J. McKnight and P. S. Kim. (1990). *Science* **249**: 769.
- Tempest, D. W. and J.L. Meers. (1970) *Biochem. J.* **117**: 405-407.
- Thireos, G., M. Driscoll-Penn and H. Greer. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 5096.
- Thomas, P. S. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 5201- 5205.
- Trueblood, C. E., R. M. Wright and R. O. Pogton. (1988). *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4537- 4540.
- Tzamarias, D., D. Alexandri and G. Thireos. (1988). *EMBO J.* **7**: 3547.
- Tzamarias, D., I. Roussou and G. Thireos. (1989) *Cell.* **57**: 947.
- Umbarger, H. E. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 533.
- Vanoni, M. A. (1990). *Biochem. Biophys. Acta.* **1039**: 374- 377.
- Vison, C. R., P. B. Sigler and S. L. McKnight. (1989). *Science.* **246**: 911.
- Vogt, P. K., T.J. Bos and R.F. Doolittle. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 3316.
- Weiss, M. A., T. Ellenberger, C. R. Wobbe, J. P. Lee, S. C. Harrison and K. Struhl. (1990). *Nature.* **347**: 575.
- Wek, R. C., M. Ramirez, B. M. Jackson and A. G. Hinnebusch. (1990). *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2820.
- Williams, N. P., A. G. Hinnebusch and T. F. Donahue. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 7515.
- Wolfner, M. D. (1975). *J. Biol. Mol.* **96**: 273.
- Zubay, G. (1993). Biochemistry. Third Edition. *MacMillan Publishing Co.*, Duburque, I., U.S.A. 1024 p.p.