

11281

40



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**La regulación transcripcional de *GDH1* de
Saccharomyces cerevisiae: una conexión entre el
metabolismo de nitrógeno y el metabolismo de
carbono**

T E S I S

**que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS**

presenta

BIÓL. LINA RAQUEL RIEGO RUIZ

Directora de Tesis: Dra. Alicia González Manjarrez

Ciudad Universitaria

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la asesoría de la doctora Alicia González Manjarrez. Este trabajo forma parte de un proyecto general en el cual participan Amaranta Avendaño y Alexander De Luna.

Durante el trabajo experimental, se contó con la invaluable ayuda técnica de la Quím. Cristina Aranda Fraustro.

La investigación fue parcialmente financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 31774-N) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN212898). Además, se contó con el apoyo de una Beca para estudios de Doctorado (febrero de 1997 a enero de 2002) y dos donativos (PAEP-201371 y PAEP-102358), por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

El Comité Tutorial estuvo conformado por los doctores Luis Servín González, Alejandro Zentella Dehesa y Alicia González Manjarrez.

Los doctores Laura Camarena Mejía, Roberto Coria Ortega, Jorge Luis Folch Mallo, Alicia González Manjarrez, Félix Recillas Targa, Gloria Soberón Chávez y Marietta Tuena Sangri, revisaron críticamente este documento y conformaron el Jurado de Examen de Grado.

A Fernando

Uno se cree
que las mató
el tiempo y la ausencia.
Pero su tren
vendió boleto
de ida y vuelta.
Son aquellas pequeñas cosas
que nos dejó un tiempo de rosas
en un rincón,
en un papel
o en un cajón.

Como un ladrón
te acechan detrás
de la puerta.
Te tienen tan
a su merced
como hojas muertas
que el viento arrastra allá o aquí.....
Que te sonríen tristes y
nos hacen que
lloremos cuando
nadie nos ve.

"Aquellas pequeñas cosas"
Joan Manuel Serrat

AGRADECIMIENTOS

A Alicia, estos años de experiencias cotidianas, su apoyo constante cuando todo parece negro.

A Amaranta, tantas cosas: la convivencia, los viajes, las fotos, los recuerdos, todos esos días.

A Alexander el apoyo recibido en esta etapa, la lectura y corrección de la primera versión de esta tesis, los ratos de congresos, los cantos

A Adriana, tantos años y tantas aventuras compartidas, seguir ahí los consejos. Por el momento cerramos esta etapa Es, pero abriremos otra.

A Víctor Hugo la comprensión, la grata compañía del horario matutino y por sobre todo el estar ahí.

A Carlos el aprendizaje diario, a Claudia las porras y a Ceci la claridad de pensamiento cuando más lo necesitaba, a Lalo la persistencia para sacarme de mi mundo, Cris

A Lichi, Jordi las pláticas

A Luis Humberto, Ekaterina, Martín por las distintas etapas del trabajo diario.

A Martín, Alma, Juan, Félix, Adriana los partidos, el boliche, las cenas y demás

A Aidé, Ilse, Ariadna, Roxana, Raúl y Claudia

A Manuel Riego y Raquel Ruiz observadores de mis batallas y por la fundación y muchas cosas más

A Sandra por esa forma tan especial de demostrarme su cariño y a Manuel por compartir su nuevo camino.

A Juan Arroyo y María del Carmen Estrada por permitirme convivir en cada momento.

A Carmen, Enrique, Enrique, Alejandra, Tere, Paco, Martín, Marcela, Ernesto, Mariana, Edénida, Toño, Edén, Antonín, Juan Manuel, Juan, Cristina, Laura, Chiquis, Poncho, Jenny, Olga, Sergio, Andrea, Susana.

A las Ortiz, Susana sus locuras

A los Estrada-Bernal

A Carmina, José, Lucía, Sagrario, Memo, Moisés, Socorrito

A Graciela, las palabras de consuelo y el apoyo constante desde el otro lado del atlántico

A Lourdes Miranda, estos años de consejos atinados y de lecturas, el introducirme a Pérez-Reverté, la confianza y sobre todo Doctora la amistad.

CONTENIDO

i. RESUMEN.....	1
ii. RESUMEN EN INGLÉS.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. La asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato	
2. Control transcripcional del metabolismo de nitrógeno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
3. La vía del control general de la biosíntesis de aminoácidos	
4. Consideraciones acerca de la regulación por carbono en levadura	
5. La estructura de la cromatina, los complejos remodeladores y su función en la regulación transcripcional	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
1. Secuenciación de la región promotora e identificación de las presuntas zonas de control transcripcional	
2. Regulación de la expresión de <i>GDH1</i> por fuentes de carbono y de nitrógeno	
3. Efecto de los factores de transcripción	
4. Análisis de delección de la región 5' del promotor	
5. Complejos remodeladores de la cromatina y determinación de la organización nucleosomal	
6. Panorama general de la regulación de los genes de la biosíntesis de glutamato.	
V. CONCLUSIONES.....	50
VI. PERSPECTIVAS.....	51

VII. RESULTADOS PUBLICADOS.....	53
Artículo 1	
VIII. REFERENCIAS.....	61
IX. APÉNDICE I.....	72
Protocolos	
1. Inicio de transcripción por el método de <i>Primer Extension</i>	
2. Extracción de RNA total de levadura	
3. Protocolo para la preparación de cromatina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
Digestión <i>in vivo</i> con MNasal	
X. APÉNDICE II.....	82
Artículo 2	

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1.	Metabolismo central de nitrógeno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
Figura 2.	Modelo de regulación de Gln3p vía TOR	9
Figura 3.	Modelo del control traduccional de <i>GCN4</i> por medio de la fosforilación de eIF2- α por la proteína cinasa GCN2	11

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.	Secuencia del promotor de <i>GDH1</i>	23
Figura 5.	Inicio de transcripción de <i>GDH1</i>	24
Figura 6.	Efecto de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la expresión de <i>GDH1</i>	27
Figura 7.	Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de <i>GDH1</i>	28
Figura 8.	Expresión de <i>GDH1</i> en las mutantes afectadas en los factores transcripcionales de la familia GATA y en Gcn4p	31
Figura 9.	Actividad específica de β -galactosidasa en condiciones basales o de privación de aminoácidos	34
Figura 10.	Expresión de <i>GDH1</i> en mutantes afectadas en factores transcripcionales del metabolismo de carbono	36
Figura 11.	Análisis de delección del promotor de <i>GDH1</i>	39
Figura 12.	Análisis de delección del promotor de <i>GDH1</i> en las cepas <i>gln3Δ</i> y <i>gcn4Δ</i>	42
Figura 13.	Expresión de <i>GDH1</i> en mutantes afectadas en las subunidades de los complejos de remodelaje	44
Figura 14.	Análisis de la estructura de la cromatina del promotor de <i>GDH1</i> usando la sonda 5'	47
Figura 15.	Análisis de la estructura de la cromatina del promotor de <i>GDH1</i> usando la sonda ATG	48

ABREVIATURAS USADAS

3-AT	3-Amino Triazol
α-IPM	α -isopropil malato
caja CCAAT	Secuencia en el DNA a la que se une el complejo HAP
caja GATA	Secuencia en el DNA a la que se unen Gln3p, Gat1p, Dal80p y Deh1p
caja GCN4	Secuencia en el DNA a la que se une Gcn4p
caja Mig	Secuencia en el DNA a la que se unen Mig1p y Mig2p
DNasal	Nucleasa que corta el DNA
DEPC	Dietyl-piro-carbonato
FCI	Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
HAT	Acetil transferasa de histonas
lacZ	β -galactosidasa
LM-PCR	Técnica para detectar cortes en la cadena de DNA por medio de PCR
MM	Medio mínimo de cultivo, con sulfato de amonio, glucosa, vitaminas, sales y elementos traza
MNasal	Nucleasa micrococcal
NCR	Represión catabólica nitrogenada
pb	Par(es) de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Transcriptasa reversa
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
UAS_{NTR}	Secuencia activadora río arriba, regulada por nitrógeno
URR	Región de represión río arriba
URS_{GATA}	Secuencia represora río arriba que contiene la secuencia 5'-GAT(T/A)A-3'
YPD	Medio rico para levadura con peptona, dextrosa y extracto de levadura

GENES Y OTRAS NOTACIONES

ACT1	Actina
ADA	Complejo remodelador de la cromatina con actividad de acetiltransferasa de histonas
Ada1p	Producto del gen <i>ADA1</i> , componente de los complejos ADA y SAGA
Ada2p	Producto del gen <i>ADA2</i> , componente de los complejos ADA y SAGA
ada2Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>ADA2</i>
Ada3p	Producto del gen <i>ADA3</i> , componente de los complejos ADA y SAGA
ada3Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>ADA3</i>
Ahc1p	Producto del gen <i>AHC1</i> , componente del complejo ADA
AreA	Factor transcripcional de <i>Aspergillus nidulans</i> , homólogo a <i>GLN3</i>
ARO4	Aldolasa, cataliza el primer paso de la biosíntesis de amino ácidos aromáticos
ASN1	Asparagina sintetasa
CAN1	Permeasa de aminoácidos básicos
COX6	Subunidad VI de la citocromo oxidasa c
CYC1	Isoforma 1 del citocromo c
DAL3	Hidrolasa de ureidoglicolato, participa en la utilización de purinas
DAL80/UGA43	Represor general de los genes del metabolismo de nitrógeno
Dal80p/Uga43p	Producto del gen <i>DAL80</i>
DEH1/GZF3	Represor de los genes del metabolismo de nitrógeno
Deh1p/Gzf3p	Producto del gen <i>DEH1</i>
EF3	Factor de elongación 3
eIF-2	Factor de inicio de la traducción
eIF-2B	Factor de inicio de traducción, cataliza el intercambio de GDP por GTP

FKBP	Receptor intracelular de la rapamicina, forma un complejo FKBP-rapamicina el cual inhibe específicamente a las proteínas TOR
GAP1	Permeasa general de aminoácidos
GAT1/NIL1	Activador general de los genes del metabolismo de nitrógeno
Gat1p/Nil1p	Producto del gen <i>GAT1</i>
GATA-1	Factor transcripcional de la familia GATA de eucariotes superiores
GCN1	El producto de este gen se requiere para la activación de la proteína cinasa Gcn2p
Gcn1p	Producto del gen <i>GCN1</i>
GCN20	El producto de este gen se requiere para la activación de la proteína cinasa Gcn2p
Gcn20p	Producto del gen <i>GCN1</i>
Gcn2p	Proteína cinasa que regula el inicio de la traducción
GCN4	Factor transcripcional que regula la vía del control general de la biosíntesis de aminoácidos
Gcn4p	Producto del gen <i>GCN4</i>
gcn4Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>GCN4</i>
GCN5	Acetil transferasa de histonas
Gcn5p	Producto del gen <i>GCN5</i> , componente de los complejos ADA y SAGA
gcn5Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>GCN5</i>
GDH1	NADP-glutamato deshidrogenasa (anabólica), homólogo de <i>GDH3</i>
GDH2	NAD-glutamato deshidrogenasa (catabólica)
GDH3	NADP-glutamato deshidrogenasa (anabólica), homólogo de <i>GDH1</i>
gdh3Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>GDH3</i>
GLN1	Glutamino sintetasa
GLN3	Activador general de los genes del metabolismo de nitrógeno
Gln3p	Producto del gen <i>GLN3</i>
GLT1	Glutamato sintasa
GOGAT	Producto del gen <i>GLT1</i>

GS	Producto del gen <i>GLN1</i>
H2A	Histona H2A, forma parte del nucleosoma
H2B	Histona H2B, forma parte del nucleosoma
H3	Histona H3, forma parte del nucleosoma
H4	Histona H4, forma parte del nucleosoma
HAP1	Factor de transcripción con actividad de unión al DNA dependiente de hemo
HAP2	Factor de transcripción que forma parte del complejo HAP
Hap2p	Producto del gen <i>HAP2</i>
hap2Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>HAP2</i>
HAP2/3/4/5	Sistema de regulación transcripcional que controla los genes de la biogénesis mitocondrial. También se le conoce como complejo HAP
HAP3	Factor de transcripción que forma parte del complejo HAP
Hap3p	Producto del gen <i>HAP3</i>
hap3Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>HAP3</i>
HAP4	Subunidad de activación del complejo HAP
Hap4p	Producto del gen <i>HAP4</i>
hap4Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>HAP4</i>
Hap5p	Factor de transcripción que forma parte del complejo HAP
HIS3	Gen de la vía de biosíntesis de histidina
HSP70	Proteína de choque térmico
ISWI	Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP
Leu3p	Factor de transcripción que regula los genes de las vías de biosíntesis de aminoácidos ramificados
MIG1	Represor transcripcional que actua en presencia de glucosa
Mig1p	Producto del gen <i>MIG1</i>
mig1Δ	Mutante interrumpida en <i>MIG1</i>
MIG2	Represor transcripcional que actua en presencia de glucosa
Mig2p	Producto del gen <i>MIG2</i>
mig2Δ	Mutante interrumpida en <i>MIG2</i>
NAD-GDH	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
NADP-GDH	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺

NIT2	Factor transcripcional de <i>Neurospora crassa</i> , homólogo a <i>GLN3</i>
PUT1	Prolina deshidrogenasa
RSC	Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP
SAGA	Complejo remodelador de la cromatina con actividad de acetiltransferasa de histonas
SDH3	Subunidad de anclaje a membrana para Sdh1p en el complejo de la succinato deshidrogenasa
Sit4p	Producto del gen <i>SIT4</i> , fosfatasa Ser/Thr
Snf1p	Producto del gen <i>SNF1</i> , cinasa Ser/Thr esencial para la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa
SNF2	ATPasa, componente del complejo SWI/SNF
Snf2p/Swi2p	Producto del gen <i>SNF2</i>
snf2Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>SNF2</i>
Spt20p	Producto del gen <i>SPT20</i> , componente del complejo SAGA
Spt3p	Producto del gen <i>SPT3</i> , componente del complejo SAGA
spt3Δ	Mutante interrumpida en el gen <i>SNF2</i>
Spt7p	Producto del gen <i>SPT7</i> , componente del complejo SAGA
Spt8p	Producto del gen <i>SPT8</i> , componente del complejo SAGA
Ssn6p	Producto del gen <i>SSN6</i> , corepresor, forma un complejo con Tup1p y reprimen la transcripción
SWI/SNF	Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP
TAF	Factores accesorios de la transcripción
TAF_{II}145	Subunidad con actividad de acetil transferasa de histonas
Tap42p	Producto del gen <i>TAP42</i> , se asocia con la fosfatasa Sit4p en la vía de TOR
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TFIIB	Complejo basal de transcripción
TOR	Vía de transducción de señales que responde a rapamicina
TOR1	Proteína cinasa sensible a rapamicina, homólogo de <i>TOR2</i>
TOR2	Proteína cinasa sensible a rapamicina, homólogo de <i>TOR1</i>
Tra1p	Producto del gen <i>TRA1</i> , componente del complejo SAGA
TRP4	Antranilato fosforibosiltransferasa

Tup1p	Producto del gen <i>TUP1</i> , corepresor, forma un complejo con Ssn6p y reprimen la transcripción
UGA4	Permeasa de aminoácidos con especificidad para el ácido para-amino butírico
uORF	Marcos de lectura abiertos localizados río arriba
<i>ure2</i>	Mutante interrumpida en el gen <i>URE2</i>
Ure2p	Producto del gen <i>URE2</i>

LISTA DE CEPAS

MAR1	<i>gdh1⁻ ura3⁻</i> , usada para obtener el gen de <i>GDH1</i> por complementación con un banco genómico de <i>S. cerevisiae</i> construido en el YCp50
CLA1	Silvestre
CLA1-1	Silvestre transformada con el pLIN1, isogénica para las cepas CLA102-1, CLA302-0-1, CLA100-1 y CLA300
CLA102-1	<i>gat1Δ</i> transformada con el pLIN1
CLA302-0-1	<i>gln3Δ</i> transformada con el pLIN1
CLA100-1	<i>gcn4Δ</i> transformada con el pLIN1
CLA-300	Silvestre transformada con el p180
27034b-10	Silvestre transformada con el pLIN10, isogénica para la cepa 30078c-10
30078c-10	<i>dal80Δ</i> transformada con el pLIN10
BWG1-7a-1	Silvestre transformada con el pLIN1, isogénica para las cepas LWG1-1 y JP40-1
LWG1-1	<i>hap2-1</i> transformada con el pLIN1
JP40-1	<i>hap3-1</i> transformada con el pLIN1
Y0000-1	Silvestre transformada con el pLIN1, isogénica para la cepa Y04959-1
Y04959-1	<i>hap4Δ</i> transformada con el pLIN1
YM4797-10	Silvestre transformada con el pLIN10, isogénica para la cepa YM4968-10
YM4968-10	<i>mig1Δ mig2Δ</i> transformada con el pLIN10
PSY316-1	Silvestre transformada con el pLIN1, isogénica para las cepas PSY316-gcn5-1, PSY316-ada2-1 y PSY316-ada3-1
PSY316-gcn5-1	<i>gcn5-1</i> transformada con el pLIN1
PSY316-ada2-1	<i>ada2-1</i> transformada con el pLIN1
PSY316-ada3-1	<i>ada3-1</i> transformada con el pLIN1
FY2-10	Silvestre transformada con el pLIN10, isogénica para las cepas FY293-10 y FY1656-10
FY293-10	<i>spt3Δ</i> transformada con el pLIN10
FY1656-10	<i>snf2Δ</i> transformada con el pLIN10

LISTA DE PLÁSMIDOS

YCp50	Plásmido centromérico de bajo número de copias (de una a tres copias)
pCRI1	Plásmido obtenido de la complementación de la cepa MAR1 con el banco genómico de <i>S. cerevisiae</i> construido en el YCp50
pRR1	Plásmido obtenido a partir de la subclonación del fragmento <i>PvuI-ClaI</i> del pCRI1 en el YCp50
YEp353	Plásmido con origen de replicación de 2 μ , contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y el gen <i>URA3</i> de <i>S. cerevisiae</i>
YEp363	Plásmido con origen de replicación de 2 μ , contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y el gen <i>LEU2</i> de <i>S. cerevisiae</i>
pLIN1	Promotor completo de <i>GDH1</i> (874 pb) fusionado al YEp363
pLIN10	Promotor completo de <i>GDH1</i> (874 pb) fusionado al YEp353
p180	Plásmido centromérico que contiene el promotor de <i>GCN4</i> fusionado al gen <i>lacZ</i>
pLIN2	Deleción que contiene 648 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN3	Deleción que contiene 588 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN4	Deleción que contiene 528 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN5	Deleción que contiene 466 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN6	Deleción que contiene 393 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN7	Deleción que contiene 268 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363
pLIN7mut	Deleción que contiene 268 pb del promotor de <i>GDH1</i> fusionadas al YEP363 y mutada la caja GATA

PAGINACION

DISCONTINUA

i. RESUMEN

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* dos isoenzimas glutamato deshidrogenasas NADP dependientes codificadas por *GDH1* y *GDH3* catalizan la síntesis de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato. Aunque las vías de asimilación de amonio han sido estudiadas por muchos años, se conoce poco sobre la regulación transcripcional de los genes implicados en éstas. El objetivo de este trabajo fue analizar la regulación transcripcional de *GDH1* con el fin de tratar de entender su papel en la biosíntesis de glutamato. Se construyeron fusiones *GDH1-lacZ* y se determinó la actividad de β -galactosidasa en células crecidas en glucosa o etanol en diferentes fuentes de nitrógeno. Se utilizaron cepas con mutaciones sencillas en *GCN4*, *GLN3*, *GAT1*, *DAL80*, *MIG1,2*, *HAP2*, *HAP3*, *HAP4*, *GCN5*, *ADA2*, *ADA3*, *SPT3* y *SNF2* para determinar el posible papel de cada uno de estos factores sobre la expresión de *GDH1*. Se observó que: 1) la expresión de *GDH1* en etanol se encuentra controlada por un mayor número de factores, 2) la expresión de *GDH1* está regulada por activadores transcripcionales que se habían considerado como exclusivos del metabolismo de nitrógeno (Gln3p y Gcn4p) o del metabolismo de carbono (complejo HAP), y 3) los complejos de remodelamiento de la cromatina juegan un papel en la expresión de *GDH1*. Este control de la expresión de *GDH1* da como resultado un mecanismo de regulación fina que coordina la utilización de carbono como de nitrógeno.

ii. ABSTRACT

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase isoenzymes encoded by *GDH1* and *GDH3* catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and α -ketoglutarate. Although the nitrogen assimilation pathways have been studied for many years, few things are known about the transcriptional regulation of their genes. The main goal of the present study was to analyze *GDH1* transcriptional regulation, in order to understand its role in glutamate biosynthesis. Plasmid *GDH1-lacZ* fusions were constructed and β -galactosidase activity was determined in the cells grown on glucose or ethanol and various nitrogen sources. Strains carrying null mutations in either *GCN4*, *GLN3*, *GAT1*, *DAL80*, *MIG1,2*, *HAP2*, *HAP3*, *HAP4*, *GCN5*, *ADA2*, *ADA3*, *SPT3* y *SNF2* were examined for the possible role of these factors in *GDH1* expression. Our results indicate that: i) *GDH1* expression is controlled by more transcriptional factors in ethanol-grown cultures, ii) *GDH1* expression is controlled by transcriptional activators that have been considered as exclusive of either nitrogen (Gln3p and Gcn4p) or carbon metabolism (HAP complex), and (iii) chromatin remodeling complexes play a role in *GDH1* expression. The above described combinatorial control results in a refined mechanism that coordinates carbon and nitrogen utilization.

I. INTRODUCCIÓN

1. La asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato.

El amonio y el nitrato son dos de las fuentes de nitrógeno más comunes para la mayoría de los microorganismos de vida libre. A pesar de que la mayor parte del nitrógeno presente en la biosfera se encuentra en estado gaseoso (N_2), que es la forma más estable de este elemento, pocos microorganismos son capaces de asimilar el nitrógeno molecular en compuestos orgánicos. En todos los sistemas biológicos, la asimilación de nitrógeno en macromoléculas es esencial para el crecimiento, siendo el glutamato y la glutamina los donadores de nitrógeno para las reacciones biosintéticas. Así pues, la mayoría de los organismos procariotes y eucariotes tienen mecanismos de control específicos que les permiten obtener un suministro constante de nitrógeno.

En el hábitat natural de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se pueden encontrar una gran variedad de fuentes de nitrógeno (Cooper, 1982); sin embargo, no todas éstas permiten un crecimiento óptimo. El amonio, la glutamina y la asparagina son buenas fuentes de nitrógeno mientras que la prolina, la alantoina, el ácido gamma-aminobutírico y la urea resultan pobres como fuentes de nitrógeno. Para que un compuesto sea usado como fuente de nitrógeno, la levadura tiene que convertir la molécula en glutamato y glutamina; ya que estos dos amino ácidos sirven como donadores de nitrógeno para la síntesis de todos los demás compuestos que contienen nitrógeno en la célula (Magasanik, 1992). Tanto el glutamato como la glutamina pueden sintetizarse en forma directa usando el amonio como grupo donador de amino. La glutamato deshidrogenasa dependiente de $NADP^+$ (NADP-GDH) convierte el amonio y el α -cetoglutarato en glutamato (Holzer y Schneider, 1957); por su parte, la glutamino sintetasa (GS) produce glutamina a partir de amonio y glutamato (Mitchell y Magasanik, 1983) (Figura 1). Por lo anterior se entiende que todas las fuentes nitrogenadas se degradan para dar finalmente amonio o glutamato, este último es eventualmente convertido en amonio y α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (NAD-GDH) (Cooper, 1982; Magasanik, 1992). Durante el crecimiento en glutamato, la GS produce glutamina usando el amonio generado por la NAD-GDH (Magasanik, 1992). Cuando la glutamina es la única fuente de nitrógeno, el glutamato es producido por acción de la glutamato sintasa (GOGAT) o la NADP-GDH (Roon *et al.*, 1974; Magasanik, 1992; Cogoni *et al.*, 1995).

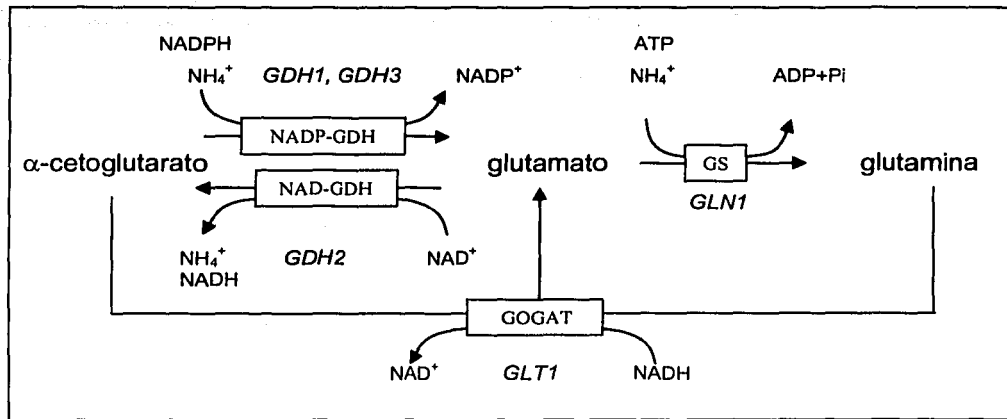


Figura 1. Metabolismo central de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.

En *S. cerevisiae*, además de la NADP-GDH codificada por *GDH1* y la GOGAT, que es producto del gen *GLT1*, existe una tercera ruta para la biosíntesis de glutamato constituida por una isoenzima de NADP-GDH codificada por el gen *GDH3* (Avenidaño *et al.*, 1997). Por lo tanto, para obtener un auxótrofo total de glutamato es necesario inactivar simultáneamente a *GDH1*, *GDH3* y *GLT1*.

La existencia de la GOGAT como una ruta alternativa para la biosíntesis de glutamato fue demostrada por Tempest *et al.* (1970). Desde entonces se propuso que el papel del ciclo GS/GOGAT podría ser la asimilación de amonio y la biosíntesis de glutamato en condiciones de limitación de amonio, debido a que la afinidad de la GS por amonio es 10 veces mayor que aquella que exhiben las GDHs de varios organismos. Lo anterior resultó ser cierto para el caso de *Klebsiella aerogenes* (Senior, 1975). Sin embargo, en otros microorganismos como *S. cerevisiae* y *Neurospora crassa*, la NADP-GDH se usa para la incorporación de amonio tanto en condiciones de exceso como de limitación de nitrógeno (Folch *et al.*, 1989; Lomnitz *et al.*, 1987).

En *Escherichia coli* se ha propuesto que el ciclo GS/GOGAT puede tener por lo menos dos funciones, que no pueden ser sustituidas por la vía GDH. La primera es que el ciclo GS/GOGAT asimila el amonio en moléculas orgánicas cuando la concentración externa

de amonio es baja y la célula no está en condiciones de limitación de energía (Reitzer y Magasanik, 1987; Helling, 1994), mientras que la segunda consiste en que el ciclo regula las cantidades intracelulares de glutamina (Reitzer y Magasanik, 1987). El trabajo de Helling (1994) en *Escherichia coli* sugiere que la vía GDH tiene un papel importante en la síntesis de glutamato en condiciones de exceso de amonio y limitación de energía, al tener un costo energético menor al del ciclo GS/GOGAT; mientras que éste es responsable de la síntesis de glutamato cuando el contenido energético es alto o cuando la concentración de amonio es limitante.

2. Control transcripcional del metabolismo de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*

2.1. Represión catabólica nitrogenada

La levadura *S. cerevisiae* utiliza selectivamente las fuentes de nitrógeno que le permiten un mejor crecimiento por medio de un mecanismo llamado represión catabólica nitrogenada. Cuando se adicionan buenas fuentes de nitrógeno como la glutamina, la asparagina o el amonio a un cultivo de levaduras que crecen con alguna fuente de nitrógeno pobre, la transcripción de algunos de los genes responsables de la utilización de estas fuentes pobres se reprime, a la vez que sus productos correspondientes se inactivan y se degradan (Wiame *et al.*, 1985; Magasanik, 1992). A la respuesta fisiológica de inactivar la expresión génica como respuesta a la presencia de una buena fuente de nitrógeno en el medio se le conoce como represión catabólica nitrogenada (NCR: "nitrogen catabolite repression") (Cooper y Sumrada, 1983). La respuesta NCR es característica de genes catabólicos; sin embargo, no se observa en genes biosintéticos o en aquellos que se requieren independientemente de la fuente de nitrógeno (Cooper, 1982).

2.2. Regulación por nitrógeno: las secuencias blanco y los factores transcripcionales

La regulación del metabolismo nitrogenado está mediada, principalmente, por factores transcripcionales que reconocen sitios en el DNA denominados UAS_{NTR} (UAS: "upstream activating sequence", NTR: "nitrogen regulated") o secuencias GATA, cuya secuencia consenso es 5'-GAT(T/A)A-3'. Estos blancos son necesarios y suficientes para la regulación por NCR (Cooper *et al.*, 1989). Un sitio UAS_{NTR} en combinación con otro elemento en *cis* puede también mediar la respuesta NCR. Además, cuando un sitio UAS_{NTR} funciona en

combinación con otro sitio presente en el DNA, las respuestas regulatorias observadas son una combinación de las características derivadas tanto del sitio UAS_{NTR} como del sitio no relacionado (Rai *et al.*, 1995).

Hasta el momento, existen cuatro factores transcripcionales que se unen a estas secuencias UAS_{NTR}: Gln3p y Gat1/Nil1p son dos factores que se han identificado como activadores (Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1996; Minehart y Magasanik, 1991), mientras que para Dal80p/Uga43p y Deh1p/Gzf3p se ha visto una función represora (Cunningham y Cooper, 1991; Daugherty *et al.*, 1993; Cunningham *et al.*, 1994). La mutagénesis a saturación del sitio UAS_{NTR} del gen que codifica para la permeasa de alantoato ha demostrado que existe una gran flexibilidad en cuanto a las posibles secuencias nucleotídicas que pueden llevar al cabo su activación (Bysani *et al.*, 1991). En una secuencia de 15 pb, 37 de las 60 mutaciones posibles permiten una actividad transcripcional alta. Este resultado va de acuerdo con la gran variedad de secuencias UAS_{NTR} homólogas que se han encontrado en los promotores de los genes del metabolismo de nitrógeno. Además, la secuencia auxiliar 5'-TTG(T/G)T-3' localizada inmediatamente río arriba del sitio UAS_{NTR} es importante para la activación transcripcional de los genes *GAP1*, *GLN1* y *GDH2*, mediada por Gln3p (Rai *et al.*, 1995; Stanbrough *et al.*, 1995).

2.2.1. Los activadores: Gln3p y Gat1p

Gln3p fue el primer regulador transcripcional de los genes del metabolismo de nitrógeno que fue clonado y se secuenció (Minehart y Magasanik, 1991). La secuencia deducida es de 730 aminoácidos y contiene un solo dedo de zinc Cys2/Cys2 en la región 306-330 que tiene homología con el producto del gen *NIT2* de *N. crassa*, *AreA* de *Aspergillus nidulans* y el factor de transcripción eritroide específico GATA-1 (Minehart y Magasanik, 1991). Gln3p se une a las UAS_{NTR} de *GLN1*, *GDH2*, *PUT1*, *UGA4*, *DAL3* y *CAN1* en *S. cerevisiae* (Minehart y Magasanik, 1991; Blinder y Magasanik, 1995; Cunningham *et al.*, 1996).

Gat1p es un activador transcripcional de 510 aminoácidos, homólogo de Gln3p. La expresión de *GAT1* es dependiente de Gln3p, regulada por Dal80p y sensible a represión catabólica nitrogenada. La actividad de Gat1p sólo es evidente en un fondo genético *ure2⁻* y hasta el momento no se ha detectado ninguna ventaja regulatoria en una célula que expresa tanto Gln3p como Gat1p. La expresión total, independiente del inductor de los genes NCR, requiere de ambos activadores; sin embargo, la contribución específica de cada factor en la activación transcripcional depende del gen que esté siendo regulado (Coffman *et al.*, 1996). Por ejemplo, para activar la expresión de *GAP1*, Gln3p y Gat1p usan los mismos sitios 5'-

GATAAG-3', aunque la sensibilidad de los elementos UAS_{NTR} de *GLN1*, *GDH2* y *GAP1* por uno u otro activador varía considerablemente (Stanbrough *et al.*, 1995). Los tres genes responden a la activación por Gln3p, pero la UAS_{NTR} de *GDH2* es insensible a Gat1p. Además, la UAS_{NTR} de *GLN1* no responde tan bien a Gat1p como las dos secuencias 5'-GATAAG-3' que se encuentran en el promotor de *GAP1*.

2.2.2. Los represores: *Dal80p* y *Deh1p*

Gln3p y Gat1p no son los únicos factores de transcripción que pueden unirse a los elementos que contienen la secuencia 5'-GAT(T/A)A-3'; se ha demostrado que la proteína Dal80p también puede unirse a estas zonas (Cunningham y Cooper, 1993). Como en Gln3p, la estructura primaria de Dal80p contiene un motivo de dedo de zinc, además de un "zipper" de leucinas putativo, y se ha demostrado que la proteína dimeriza en ensayos de doble híbrido. Aún más, para que Dal80p reconozca los sitios URS_{GATA} (URS: "upstream repressing sequence") y pueda unirse, requiere de la presencia de dos elementos GATA separados por 15-35 pb y orientados cola con cola o cabeza con cola, lo cual sugiere que la dimerización es un proceso importante para este factor transcripcional (Cunningham y Cooper, 1991; 1993). La expresión del gen *DAL80* es sensible a represión por nitrógeno y su promotor contiene 12 secuencias homólogas a las UAS_{NTR}. A su vez, la proteína codificada por *DAL80* reprime a una serie de genes del metabolismo de nitrógeno dependientes de un cierto inductor. No todos los genes dependientes de Gln3p se regulan por el producto de *DAL80*, tampoco el caso contrario resulta completamente cierto (Daugherty *et al.*, 1993). Estas diferencias en la regulación pueden deberse a constantes de asociación distintas, o bien a la espaciación de los distintos elementos GATAA (Cunningham y Cooper, 1993).

DEH1 es el cuarto gen cuyo producto es homólogo de Dal80p, Gat1p y Gln3p. La mayor similitud se presenta entre Deh1p y Dal80p, los cuales conservan el dedo de zinc de la familia GATA y el "zipper" de leucinas. Además, la región promotora de *DEH1* contiene once secuencias GATA y puede, por lo tanto, estar regulada por otros miembros de esta familia (Coffman y Cooper, 1997). Estos datos sugieren que Deh1p puede funcionar como un regulador negativo adicional de los genes sensibles a NCR, y a su vez ser controlado a sí mismo por los factores de la familia GATA. Se piensa que *DEH1* antagoniza la función de *GAT1*, compitiendo por los mismos sitios de unión al DNA (Stanbrough *et al.*, 1995). Tanto Deh1p como Dal80p carecen de la región ácida de activación transcripcional presente en Gln3p y Gat1p.

2.3. La vía TOR y la regulación de la expresión génica en respuesta a los nutrientes

El crecimiento normal de una célula requiere que ésta ajuste su actividad metabólica en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y a otras señales ambientales. Existen mecanismos específicos de transducción de señales que permiten a las células percibir e integrar estas señales y establecer o mantener niveles apropiados de expresión. Una vía de transducción de señales que es usada en todos los organismos eucariotes es la vía de la cinasa blanco de rapamicina (TOR: "Target Of Rapamycin kinase pathway"). *S. cerevisiae* presenta dos genes TOR, *TOR1* y *TOR2*, y los productos de ambos son inhibidos por el complejo FKBP/rapamicina. El tratar las células con rapamicina da lugar a una serie de efectos parecidos a los que se observan durante la privación de nutrientes. Estos efectos incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas, la acumulación de glucógeno, el arresto en la etapa G1/S del ciclo celular, el inicio de la autofagia y la inhibición de la biogénesis ribosomal (Schmelzle y Hall, 2000; Raught *et al.*, 2001).

La expresión de cientos de genes se ve afectada cuando la función de TOR es inhibida por rapamicina. Entre ellos se encuentran los genes que participan en la biosíntesis de proteínas, en la glucólisis, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en el metabolismo de nitrógeno (Cardenas *et al.*, 1999; Hardwick *et al.*, 1999). Por lo tanto, una función importante de TOR parece ser la de coordinar la transcripción de genes implicados en distintas vías de respuesta celular a nutrientes.

El mecanismo molecular mediante el cual la vía de TOR controla la expresión de varios genes del metabolismo de nitrógeno se basa en cambios en la localización subcelular de Gln3p y Gat1p (Beck y Hall, 1999) (**Figura 2**). En presencia de una buena fuente de nitrógeno, Gln3p se encuentra secuestrado en el citoplasma por la asociación con la proteína Ure2p, la cual ha sido previamente identificada como un regulador negativo de la función de Gln3p (Courchesne y Magasanik, 1988). La formación del complejo Gln3p-Ure2p depende de la inhibición de la fosfatasa Sit4p y requiere de la proteína Tap42, que es regulada por TOR (Jiang y Broach, 1999; Beck y Hall, 1999). Al tratar las células de levadura con rapamicina, o con un medio pobre de nitrógeno, Gln3p se desfosforila y disocia de Ure2p, por lo que puede traslocarse al núcleo donde activa a sus genes blanco (Beck y Hall, 1999).

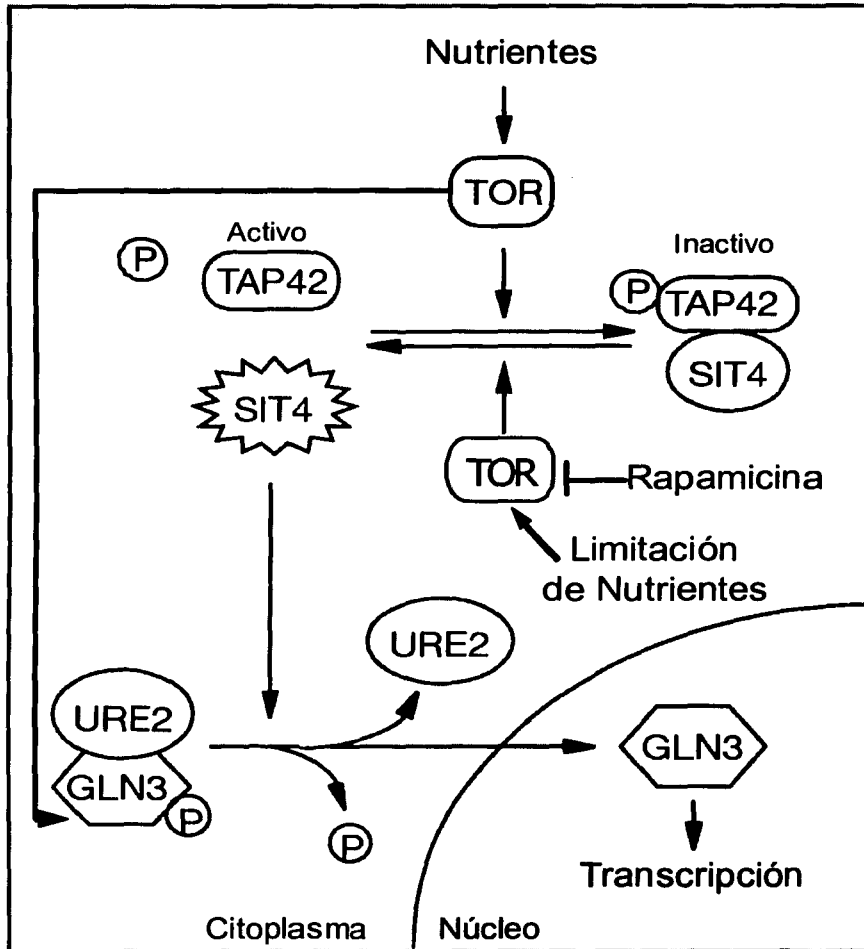


Figura 2. Modelo de regulación de Gln3p vía TOR. En respuesta a nutrientes (buenas fuentes de nitrógeno), TOR promueve la formación del complejo GLN3-URE2 por medio de la fosforilación de Gln3p y la inhibición mediada por TAP42 de la fosfatasa SIT4. De esta manera se previene la acumulación de GLN3 en el núcleo y, por lo tanto, la transcripción de los genes que participan en el catabolismo de fuentes de nitrógeno pobres (Modificado de Beck y Hall, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. La vía del control general de la biosíntesis de aminoácidos.

En la levadura *S. cerevisiae*, la privación de un sólo aminoácido es suficiente para inducir la transcripción de más de 50 genes que codifican para: *i*) las enzimas de varias de las vías de biosíntesis de aminoácidos, *ii*) las aminoacil tRNAs sintetetasas, y *iii*) las enzimas de la biosíntesis de purinas. Dado que la respuesta que se observa no es específica de la vía del aminoácido limitante, este sistema de regulación genética lleva el nombre de control general de la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1992).

La limitación de aminoácidos tiene como resultado la síntesis del factor de transcripción Gcn4p, que induce de 2 a 10 veces la transcripción de los genes cuya expresión regula (Hope y Struhl, 1986). Por medio de un análisis de mutagénesis de saturación en la región blanco para Gcn4p del promotor de *HIS3*, se ha identificado la secuencia consenso 5'-ATGA(C/G)TCAT-3' que es necesaria para la respuesta a este sistema general de control (Hill *et al.*, 1986). Mientras que algunos genes tales como *HIS3* o *TRP4* se regulan por la presencia de varios elementos GCN4 en su promotor, la presencia de una sola caja GCN4 es esencial y suficiente para la regulación de *ARO4* por Gcn4p (Hinnebusch, 1992).

La expresión de *GCN4* está regulada a nivel del inicio de su traducción, ya que la presencia de cuatro uORFs en la región líder del mRNA previenen que la traducción empiece en el codón de inicio de *GCN4* (**Figura 3**). Cuando las células crecen en presencia de todos los aminoácidos, los ribosomas traducen el primer uORF, reinician en los uORFs 2 a 4 y no pueden reconocer del codón de inicio de traducción de *GCN4*. En células privadas de algún aminoácido, los ribosomas que ya han traducido el primer uORF reinician en el sitio de inicio de traducción de *GCN4*, dando como resultado una alta expresión de la proteína. La inactivación por delección de los cuatro uORFs o la mutación de los cuatro codones de inicio presentes en la región líder del mRNA de *GCN4* tienen como resultado una alta expresión de Gcn4p en condiciones de no privación de aminoácidos (Hinnebusch, 1997).

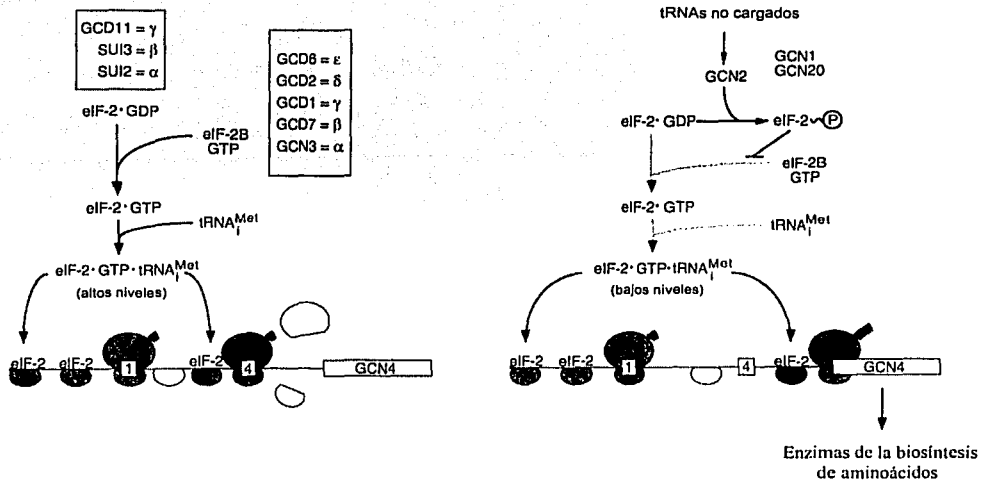


Figura 3. Modelo del control traduccional de GCN4 por medio de la fosforilación de eIF-2 α por la proteína cinasa GCN2. Los uORF1 y uORF4 y la secuencia codificadora se muestran sobre el mRNA de GCN4, encerrados en recuadros. Por simplicidad en el esquema no se esquematizan los uORF2 y uORF3. Las subunidades ribosomales 40S se presentan en gris cuando están asociadas con el complejo ternario compuesto por eIF-2, GTP y Met-tRNA^{Met}, y por lo tanto están listas para reiniciar la traducción. Se muestran en blanco las subunidades ribosomales 40S que carecen del complejo ternario y que, por lo tanto, no pueden reiniciar la traducción. En los ribosomas 80S que están traduciendo el uORF1, uORF4, o a GCN4, se representa la síntesis peptídica por medio de una cola que sobresale de la subunidad 60S. En el panel de la izquierda, se ejemplifican las subunidades ribosomales 40S y 60S que se disocian del mRNA después del terminador del uORF4. También se señalan los genes que codifican para las subunidades que componen los complejos eIF-2 α y eIF-2B. GCN1 y GCN20 son reguladores positivos de la actividad de cinasa de GCN2 (Modificado de Hinnebusch, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La regulación traduccional de *GCN4* depende de la cinasa Gcn2p, la cual contiene el dominio de cinasa en su extremo amino terminal y en su extremo carboxilo terminal el dominio de aminoacil tRNA sintetasa (Roussou *et al.*, 1988; Wek *et al.*, 1989). En condiciones de privación de aminoácidos, los tRNAs no cargados se unen al dominio de aminoacil tRNA sintetasa de Gcn2p, activando el dominio de cinasa de esta proteína. Gcn2p responde fosforilando la subunidad α del factor eIF-2 de inicio de traducción. El eIF-2 fosforilado inhibe la traducción de la mayor parte de los mRNAs por medio de la inhibición de la actividad de intercambio de guanina de eIF-2B, que cataliza el intercambio de GDP por GTP de eIF-2 después de cada ronda de inicio. Dado que sólo la forma de eIF-2 que lleva unido el GTP puede llevar al tRNA^{Met} al ribosoma, una modificación de la actividad de eIF-2B da como resultado una menor cantidad de eIF-2 activo (Wek *et al.*, 1995). La reducción de los niveles de actividad de eIF-2 es lo que permite que los ribosomas pasen a través de los uORFs presentes en la región 5' no traducida de *GCN4* sin volver a unir un tRNA^{Met} iniciador cargado. Por lo tanto, el reinicio en estos uORFs no se presenta, lo que permite que el codón de inicio de *GCN4* sea reconocido y traducido (**Figura 3**).

Existen por lo menos 12 genes más que participan en la transmisión de la señal de falta de aminoácidos que pasa a través de Gcn2p y que tiene como resultado la regulación de la traducción de *GCN4*. Por ejemplo, las mutaciones que inactivan a las proteínas codificadas por *GCN1* y *GCN20* resultan en una reducción (*GCN20*) o ausencia (*GCN1*) de la fosforilación de eIF-2 α por Gcn2p. Se sabe que Gcn1p y Gcn20p se encuentran físicamente asociados entre ellos y que co-sedimentan con los polisomas y con los ribosomas 80S. Ambas proteínas presentan similitud con el factor de elongación EF3, una proteína esencial que estimula la unión del complejo ternario EF1 α -GTP-aminoacil tRNA al sitio A del ribosoma y libera el tRNA del sitio E del ribosoma (Hinnebusch, 1997). Tanto Gcn1p como Gcn20p se requieren para mediar e incrementar la actividad de cinasa de Gcn2p en presencia de tRNAs no cargados.

4. Consideraciones acerca de la regulación por carbono en levadura.

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo, lo que significa que puede crecer bajo condiciones tanto aerobias como anaerobias. Puede utilizar una gran variedad de mono-, di-, y oligosacáridos, etanol, acetato, glicerol, piruvato y lactato como fuentes de carbono. La glucosa es la fuente de carbono preferida, ésta se metaboliza fermentativamente mediante la vía Embden-Meyerhof, resultando en la formación de etanol. En presencia de glucosa, independientemente de la concentración de oxígeno, se encuentra

reprimida la síntesis de las enzimas necesarias para la utilización de disacáridos (sacarosa y maltosa) o galactosa, para el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (etanol, acetato, glicerol, piruvato y lactato) y para el desarrollo mitocondrial. Tan pronto como la glucosa se consume, ocurre la inducción de las enzimas necesarias para la respiración, así como de los componentes de la cadena de transporte de electrones. Este cambio metabólico ocurre, en presencia de oxígeno, cuando la levadura empieza a utilizar el etanol producido con anterioridad. La completa oxidación del etanol a dióxido de carbono y agua requiere de la participación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y del ciclo del glioxilato (Dickinson, 1999).

S. cerevisiae posee una serie de mecanismos que le permiten utilizar de manera eficiente la glucosa sobre cualquier otra fuente de carbono presente en el medio. Uno de estos mecanismos consiste en la represión de la transcripción de aquellos genes cuyos productos no son necesarios en las células que crecen en presencia de glucosa. A este mecanismo de represión de algunos genes en presencia de una mejor fuente de carbono, como la glucosa, se le conoce como represión catabólica por carbono o represión por glucosa.

4.1. Algunos de los elementos del sistema de regulación por carbono

4.1.1. Los represores

La represión de la expresión de los genes en presencia de glucosa se ejerce principalmente a través de Mig1p y Mig2p. Estos factores transcripcionales reconocen en el DNA una secuencia rica en GCs (Lutfiyya y Johnston, 1996). Mig1p y Mig2p reprimen la expresión de sus genes blanco por medio del reclutamiento de dos represores generales de la transcripción: Ssn6p y Tup1p (Treitel y Carlson, 1995).

La función de Mig1p está regulada por su localización intracelular; en ausencia de glucosa este factor transcripcional se localiza en el citoplasma, mientras que la presencia de glucosa provoca que la proteína se mueva hacia el núcleo (DeVit *et al.*, 1997). La localización diferencial de Mig1p parece estar regulada por Snf1p, una proteína cinasa que se requiere para la expresión de una gran cantidad de genes reprimidos por glucosa. Ensayos de fosforilación realizados *in vitro* han demostrado que Snf1p fosforila a Mig1p y, por lo tanto, se ha concluido que la fosforilación de Mig1p en ausencia de glucosa haría que este factor se mueva del núcleo hacia el citoplasma (Smith *et al.*, 1999). Por el contrario,

Snf1p no afecta la localización subcelular de Mig2p, dado que este factor transcripcional se encuentra siempre en el núcleo, independientemente de la fuente de carbono en la cual se cultive a las células (Lutfiyya *et al.*, 1998).

4.1.2. Los activadores

En eucariotes, la utilización de fuentes de carbono no fermentables requiere del ciclo TCA y de la cadena de transporte de electrones, ambas vías se encuentran localizadas en la mitocondria. En la levadura *S. cerevisiae*, la mayor parte de las proteínas que se requieren para las funciones celulares antes mencionadas son codificadas por genes nucleares. Durante la utilización fermentativa de la glucosa, la expresión de los genes que codifican para muchas de estas proteínas se encuentra reducida. Se ha demostrado que la transcripción de varios de estos genes nucleares está determinada por mecanismos de control global, como lo son la regulación por hemo y HAP1 (Forsburg y Guarente, 1990) o la inducción efectuada, en ausencia de glucosa, por el complejo activador HAP2/3/4/5 (Olesen *et al.*, 1987; Hahn y Guarente, 1988; Forsburg y Guarente, 1989; McNabb *et al.*, 1995).

El complejo HAP consiste en por lo menos cuatro subunidades: Hap2p, Hap3p y Hap5p forman un complejo heterotrimérico que es esencial para su actividad de unión al DNA, mientras que Hap4 es una proteína ácida que actúa como el dominio de activación transcripcional del complejo. Las mutaciones en cualquiera de estos genes HAP resultan en la incapacidad de las células de levadura de crecer en presencia de fuentes de carbono no fermentables como el lactato, el glicerol o el etanol (Gancedo, 1998). El complejo HAP se une al DNA reconociendo la secuencia consenso 5'-ACCAA(T/C)NA-3', conocida como la caja CCAAT (Olesen *et al.*, 1987). Se ha propuesto que Hap5p interactúa tanto con Hap2p como con Hap3p, sirviendo de puente entre estas proteínas y permitiendo la interacción entre los dominios de unión al DNA de Hap2 y Hap3 (McNabb *et al.*, 1995).

Poco se sabe acerca de la regulación transcripcional de los genes HAP. Se ha reportado que la presencia de glucosa disminuye la expresión de *HAP2* (Pinkham y Guarente, 1985). Un trabajo posterior determina que la expresión de *HAP4*, a diferencia de *HAP2* y *HAP3*, se induce cinco veces cuando las células de levadura se transfieren de un medio con glucosa a uno con lactato (Forsburg y Guarente, 1989). El efecto que tiene la glucosa sobre la regulación de *HAP4* es más claro. El promotor de *HAP4* presenta un sitio consenso de unión para Mig1p, lo cual sugiere que la represión catabólica por carbono de esta subunidad del complejo HAP se ejercería a través de Mig1p. Sin embargo, la expresión de *HAP4* se encuentra reprimida aún en ausencia de Mig1p, lo cual sugiere que Mig2p es

suficiente para regular la represión de *HAP4* en presencia de glucosa (Gancedo, 1998). Aunque se sabe que *CYC1* o *COX6* son regulados por el complejo HAP2/3/4/5 y requieren de Snf1p para la inducción (Wright y Poyton, 1990), no existen reportes sobre el posible papel de esta cinasa en la regulación de la expresión de *HAP4*.

5. La estructura de la cromatina, los complejos remodeladores y su función en la regulación transcripcional.

En eucariotes, la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (RNA pol II) requiere de la presencia tanto de factores generales como de aquellos activadores específicos del gen en cuestión. Los factores generales de transcripción incluyen a la RNA pol II, a la proteína de unión de la caja TATA (TBP: "TATA Binding Protein"), a TFIIB y otros factores generales que se requieren para la formación del complejo de preinicio de la transcripción. Como se mencionó con anterioridad, los activadores reconocen y se unen a secuencias específicas en el DNA, incrementando así la transcripción por medio del reclutamiento de un coactivador, un adaptador o directamente de los complejos que interactúan con la maquinaria basal de transcripción (Guarente, 1995).

Es importante tener en cuenta que, en células eucariotes, el reconocimiento de los activadores a sus secuencias blanco y el inicio de la transcripción ocurren en el contexto del DNA empaquetado en forma de cromatina. Lo anterior representa un nivel de regulación adicional y juega un papel importante en la modulación de la transcripción.

La cromatina está constituida por nucleosomas, que a su vez están compuestos por 146 pb de DNA enrolladas 1.65 veces alrededor de un octámero de histonas. El octámero de histonas puede a su vez subdividirse en dos heterodímeros de H3/H4 y H2A/H2B (Luger *et al.*, 1997). Se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la estructura y posición de los nucleosomas pueden causar la represión de la transcripción de un gen al impedir que un activador reconozca su secuencia blanco (Orphanides y Reinberg, 2000). El estado de represión de los nucleosomas puede cambiarse por medio de actividades remodeladoras o modificadoras que dan como resultado una estructura accesible para ser reconocida por otros componentes de la maquinaria basal de transcripción de la RNA pol II.

Los complejos remodeladores de la cromatina pueden clasificarse en dos grandes grupos, dependiendo de su forma de acción: *i*) Complejos dependientes de ATP, como SWI/SNF, ISWI y RSC (Vignali *et al.*, 2000), éstos utilizan la energía proveniente de la hidrólisis de ATP para disgregar localmente o alterar la asociación de las histonas con el DNA. *ii*) Complejos con actividad de acetiltransferasa de histonas (HAT: "h₂istone

acetyltransferase"), como SAGA y ADA (Roth *et al.*, 2001), los cuales regulan la actividad transcripcional de los genes dependiendo de la acetilación de los extremos amino terminal de las histonas asociadas a ellos. Estudios *in vivo* han demostrado que la presencia de histonas hiperacetiladas se asocia con regiones cromosómicas transcripcionalmente activas mientras que aquellas regiones inactivas o de heterocromatina se encuentran hipoacetiladas (Hebbes *et al.*, 1994; Braunstein *et al.*, 1993). A continuación se describirán con mayor detalle los complejos remodeladores de la cromatina que se utilizaron en este trabajo.

El complejo SWI/SNF altera la estructura del nucleosoma por medio de una reacción dependiente de ATP, esto puede dar como resultado la liberación de la represión que la cromatina ejerce sobre la transcripción. Hasta el momento, este complejo contiene 11 subunidades conocidas, siendo la subunidad Swi2/Snf2 la que presenta la actividad de ATPasa (Laurent *et al.*, 1993). Este complejo puede catalizar el movimiento de las histonas en *cis* a lo largo de la hebra de DNA, así como desplazar las histonas en *trans* de un sitio a otro (Vignali *et al.*, 2000). Se piensa que este complejo es reclutado a su zona de acción por medio de los activadores que interactúan específicamente con cada gen (Peterson and Logie, 2000).

El complejo SAGA ("Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase") es un sistema multiprotéico que se requiere para la transcripción normal de muchos genes (Lee *et al.*, 2000). SAGA contiene diferentes clases de factores como las proteínas Spt, las proteínas Ada, la acetiltransferasa de histonas Gcn5, un grupo de los factores asociados a la proteína de unión a la caja TATA (TAFs: "TATA-binding-protein Associated Factors"), y la proteína Tra1 (Roth *et al.*, 2001). El análisis del fenotipo de mutantes afectadas en los componentes de este complejo ha revelado la presencia de tres grupos funcionales: 1) Spt7, Spt20 y Ada1; 2) Spt3 y Spt8; y 3) Gcn5, Ada2 y Ada3. El análisis bioquímico de los complejos SAGA mutados sugiere que los miembros del grupo 1, Spt7, Spt20 y Ada1, se requieren para la integridad del complejo. Por otro lado, Spt3p y Spt8p interactúan directamente con TBP. Finalmente, los componentes del tercer grupo funcionan como adaptadores entre el complejo de remodelaje y el gen en cuestión, interactuando con los activadores (Ada2p) y acetilando las histonas (Gcn5p) (Sterner *et al.*, 1999). Recientemente se ha demostrado que no es la subunidad Ada2p la que interactúa con los activadores; por el contrario, la interacción entre los activadores y el complejo SAGA se lleva a cabo por medio de la proteína Tra1 (Brown *et al.*, 2001; Balasubramanian *et al.*, 2002).

Dado que el complejo ADA está conformado por las proteínas Ada2p, Ada3p y Gcn5p, se había considerado que ADA representaba un subcomplejo de SAGA. Sin

embargo, la presencia de la subunidad Ahc1p como parte integral de la estructura del complejo ADA ha demostrado que este complejo no es simplemente un subcomplejo, ya que contiene elementos únicos que no se encuentran presentes en SAGA (Eberharter *et al.*, 1999). A pesar de compartir subunidades, ambos complejos presentan diferentes propiedades; por ejemplo: *i*) muestran diferentes patrones de acetilación en las lisinas presentes en el amino terminal de la histona H3 (Grant *et al.*, 1999), *ii*) ADA no interactúa con activadores ácidos como Gcn4p *in vitro*, al contrario de SAGA (Utley *et al.*, 1998), *iii*) una mutante en *GCN5* carente de la región del bromodominio reduce significativamente la actividad HAT de SAGA, mientras que la habilidad de ADA para acetilar histonas se mantiene sin cambio (Sternner *et al.*, 1999).

Con estos antecedentes, es importante resaltar que la regulación transcripcional en eucariotes es un proceso complejo, el cual se encuentra regulado a varios niveles y en donde la cromatina es una parte integral, dinámica y activa de la regulación genética. En la actualidad, el estudio de la regulación diferencial de un gen eucariote no puede ser entendido sin tomar en cuenta el contexto cromosómico en el que se encuentra.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como en la mayoría de los organismos de vida libre, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta vías de biosíntesis que le permiten usar el amonio como única fuente de nitrógeno. La utilización de amonio sólo ocurre a través de su incorporación a glutamato y glutamina por medio de la acción de la NADP-GDH y del ciclo GS/GOGAT (Magasanik, 1992). En esta levadura existen dos genes (*GDH1* y *GDH3*) cuyos productos codifican para isoenzimas de NADP-GDH; cuando la célula se crece en glucosa-amonio, Gdh1p es la vía principal que lleva a cabo la biosíntesis de glutamato. La presencia de un gen homólogo, había pasado inadvertida dada la represión de *GDH3* por glucosa.

Durante los últimos años, el grupo de la Dra. Alicia González ha estado interesado en definir y entender el papel de cada una de las vías que participan en la biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae* (Avenidaño *et al.*, 1997; Cogoni *et al.*, 1995; Folch *et al.*, 1989). ¿Por qué existen diferentes vías para la biosíntesis de glutamato? ¿Qué papel juega cada uno de los genes que codifican para las NADP-GDHs? ¿Existen diferencias en la función o en la regulación de ambas vías? Para tratar de contestar estas preguntas, se han abordado dos estrategias principales: i) la caracterización bioquímica de los productos de *GDH1* y *GDH3* y, ii) el estudio de las regiones promotoras que regulan la expresión de cada uno de estos genes.

La caracterización bioquímica de las isoenzimas permitió determinar que Gdh1p y Gdh3p tienen diferentes propiedades alostéricas y velocidades de utilización de α -cetoglutarato. El análisis de la expresión relativa de estas proteínas reveló que la expresión de *GDH1* y *GDH3* se encuentra regulada de manera diferente y dependiente de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono. Los resultados de este estudio indican que la regulación coordinada de las enzimas codificadas por *GDH1*, *GDH2* y *GDH3* resulta en la biosíntesis de glutamato sin comprometer el uso balanceado de α -cetoglutarato, bajo condiciones de crecimiento respiratorio (DeLuna *et al.*, 2001).

El presente trabajo se planteó como objetivo estudiar la regulación de la transcripción del gen *GDH1* con el fin de tratar de entender su papel en la biosíntesis de glutamato. Aunque las vías de asimilación de amonio han sido estudiadas por muchos años, se conoce poco sobre la regulación transcripcional de los genes implicados en éstas. Trabajos previos han demostrado que el promotor de *GDH1* presenta varias secuencias homólogas a los elementos UAS_{NTR}. Cuando las levaduras se cultivan en presencia de glucosa la

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

transcripción de este gen, es dependiente de Gln3p y se encuentra ligeramente reprimida por Dal80p (Daugherty *et al.*, 1993). También se localiza en el promotor una secuencia de unión para el factor transcripcional Leu3p, el cual activa la expresión de los genes de la vías de biosíntesis de los aminoácidos ramificados (Friden, 1988). La activación de Leu3p depende de la presencia de α -isopropilmalato y *GDH1* requiere para su activación, en parte, de la presencia del complejo Leu3- α -isopropilmalato (Hu *et al.*, 1995). La expresión transcripcional de *GDH1* depende de la naturaleza de la fuente de carbono y requiere para su expresión del complejo HAP que reconoce la secuencia CCAAT (Dang *et al.*, 1996).

Los objetivos específicos de este trabajo fueron: *i*) la caracterización de la región promotora, *ii*) la expresión del gen en distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, *iii*) el efecto de algunos factores de transcripción en la regulación de la expresión, y *iv*) el papel de los complejos remodeladores de la cromatina y la organización nucleosomal de la región promotora.

La mayor parte de los resultados de este trabajo de investigación se presentan en el **ARTÍCULO 1**. Los datos indican que la expresión de *GDH1* se encuentra controlada por un mayor número de factores transcripcionales en los cultivos de células crecidas en etanol, lo que sugiere que la regulación de la expresión en estas condiciones fisiológicas es un mecanismo fino de control que determinará la abundancia de los monómeros de Gdh1p. Además, la expresión de *GDH1* en etanol está controlada por factores transcripcionales que habían sido considerados exclusivos del metabolismo de nitrógeno (Gln3p y Gcn4p) o del metabolismo de carbono (complejo HAP). Por último, los complejos remodeladores de la cromatina también juegan un papel en la expresión de *GDH1*.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo general del trabajo se centró en el estudio de la regulación de *GDH1*, con el fin de analizar su papel en la biosíntesis de glutamato. Para lo anterior, se planteó la siguiente estrategia:

1. Clonar y fusionar el promotor de *GDH1* al gen reportero de *lacZ*. Se obtuvo un fragmento de 950 pb que contenía el promotor del gen de *GDH1*. Este fragmento se fusionó con el gen reportero de la β -galactosidasa en los vectores pertinentes, los cuales se utilizaron para medir la actividad transcripcional de este gen. Por medio del análisis de la secuencia del promotor, se determinaron los posibles elementos de regulación presentes en la región.

2. Determinar la expresión de *GDH1* en distintas condiciones fisiológicas. Se transformó una cepa silvestre con los plásmidos de fusión y se determinó la actividad transcripcional del promotor de *GDH1* proveniente de células cultivadas en presencia de distintas fuentes de nitrógeno con glucosa o etanol como fuentes de carbono. Se realizó también un ensayo tipo Northern para validar los resultados obtenidos por el ensayo de β -galactosidasa.

3. Determinar la importancia de algunos factores transcripcionales sobre la expresión de *GDH1*. Se determinó la expresión de *GDH1* en la cepa silvestre y en las mutantes afectadas en algunos de los reguladores transcripcionales que se sabe son importantes para la regulación tanto del metabolismo de nitrógeno como del metabolismo de carbono.

4. Analizar la presencia de regiones adicionales de control en el promotor de este gen. Por medio de una serie de deleciones de la región 5' del promotor fusionadas al gen reportero *lacZ*, se intentó identificar algunas regiones adicionales de control que pudiera presentar este promotor. La actividad de cada una de las nuevas construcciones fue obtenida a partir de cultivos crecidos en presencia de amonio o glutamato como fuentes de nitrógeno y glucosa o etanol como fuentes de carbono.

5. Determinar el papel de los complejos remodeladores de la cromatina. Se determinó la expresión de *GDH1* en la cepa silvestre y en mutantes afectadas en algunos de los componentes de los complejos remodeladores ADA, SAGA y SWI/SNF. Se determinó la dependencia que presenta el promotor de *GDH1* para cada uno de estos complejos en presencia de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol como fuente de carbono.

6. Conocer la estructura de la cromatina del promotor de *GDH1*. Se determinó la estructura de la cromatina por medio del análisis de baja resolución con la nucleasa micrococcal (MNasaI) en amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol como fuente de carbono.

En el apartado de "Materiales y Métodos" del **ARTÍCULO 1** se describen las características de las cepas y plásmidos utilizados en el trabajo experimental, así como la mayor parte de las técnicas utilizadas en el presente trabajo. De manera adicional, en el **APÉNDICE I** se encuentran los protocolos no contemplados en el artículo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los datos y figuras que aparecen en el **Artículo 1** se muestran en esta sección junto con datos adicionales no publicados que complementan este trabajo de Tesis.

1. Secuenciación de la región promotora e identificación de las presuntas zonas de control transcripcional.

Por medio de la complementación de la cepa MAR1 (*gdh1⁻ura3⁻*) con el banco genómico de la levadura *S. cerevisiae* construido en el vector YCp50 (Rose *et al.*, 1987), se obtuvo un plásmido (pCRI1) que complementaba el fenotipo de lento crecimiento de la cepa mutante. A partir de este plásmido se realizó la subclonación del gen completo y la posterior subclonación de la región promotora de *GDH1*.

La clonación del gen de *GDH1* ya había sido reportada por dos grupos de manera independiente (Moye *et al.*, 1985; Nagasu and Hall, 1985). Se hizo un alineamiento de las secuencias reportadas y se encontraron diferencias en la región promotora (dato no mostrado), por lo que se decidió obtener el gen completo y secuenciar su región promotora. Se utilizó la secuencia de *GDH1* reportada en la base de datos del genoma completo de levadura (SGD: "*Saccharomyces Genome Database*") para obtener un mapa de restricción del gen y de sus secuencias aledañas. Tomando como guía ese mapa, se digirió el plásmido pCRI1 con las enzimas de restricción *PvuI-ClaI*, obteniéndose un fragmento de aproximadamente 3.3 kb que se subclonó en el plásmido YCp50 (pRR1). Este fragmento contenía 1.7 kb de la región 5', 1.4 kb de la región codificante y 0.2 kb de la región 3'. Posteriormente se digirió el plásmido pRR1 con la enzima de restricción *HindIII* con el fin de obtener la parte correspondiente al promotor del gen (0.95 kb). Este fragmento se fusionó al gen reportero *lacZ* presente en los plásmidos YEp353 (*URA3*) y YEp363 (*LEU2*).

Se realizó la secuenciación completa del promotor de *GDH1*, en el cual se encontraron 3 cambios de base comparando la secuencia obtenida con las secuencias del promotor previamente reportadas. Estos tres cambios de base parecen no ser relevantes ya que se localizan fuera de los sitios de unión para factores de transcripción. Los posibles sitios de unión para factores de transcripción que aparecen señalados en la **Figura 4**, fueron identificados usando el programa RSA-tools (<http://embnet.cifn.unam.mx/rsa-tools>).

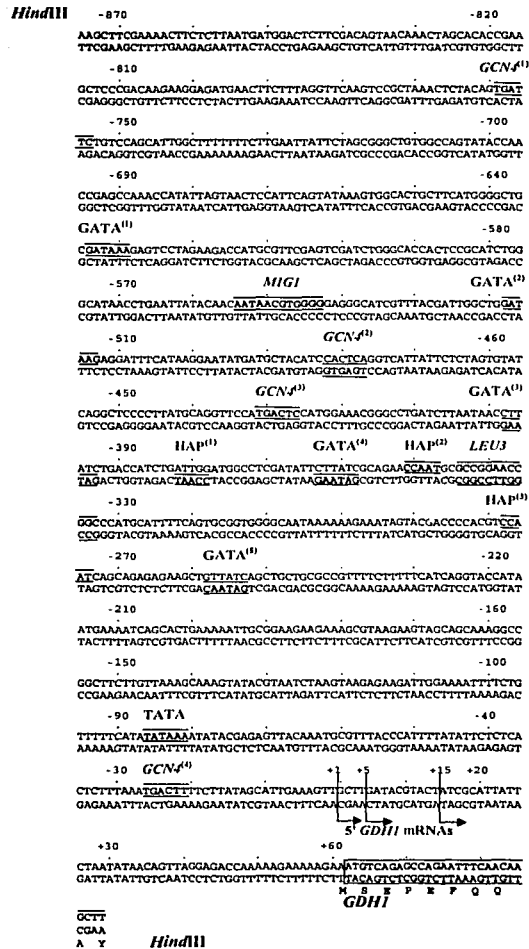


Figura 4. Secuencia del promotor de *GDH1*. Se muestran, resaltados y numerados a partir del extremo 5' de la secuencia, los sitios putativos de unión para Gcn4p (*GCN4*), Gln3p, Gat1p y Dal80p (*GATA*), el complejo HAP (*HAP*) y Leu3p (*LEU3*). Se resalta también la caja TATA putativa y los tres sitios de inicio de la transcripción en las posiciones +1, +5, y +15. Se utilizaron los sitios de restricción *Hind*III para clonar el promotor en el plásmido YEp363 (2µ *LEU2 lacZ*) y YEp353 (2µ *URA3 lacZ*), generándose así los plásmidos pLIN1 y pLIN10, respectivamente.

1.1. Determinación del inicio de transcripción del gen

Por medio de la técnica de "Primer Extension", se identificaron los sitios de inicio de transcripción del gen *GDH1*. Para ello se utilizó el RNA total de una cepa silvestre y el RNA total de una cepa silvestre transformada con el plásmido pLIN1, crecidas en amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono, así como oligonucleótidos específicos para la secuencia cromosomal del gen *GDH1* y para el gen *lacZ* (APÉNDICE I). Se determinó el inicio de transcripción para la secuencia cromosomal del promotor de *GDH1* y para la secuencia del promotor fusionada al plásmido. En ambos casos se observaron tres inicios de transcripción localizados a +1, +5 y +15 (Figura 5), encontrándose el codón de inicio de traducción (ATG) a +60 pb. Se realizó el experimento con una cepa *gdh3Δ* cultivada en glucosa-amonio, observándose el mismo resultado que en la cepa silvestre (datos no mostrados). En secciones posteriores se discutirán las posibles implicaciones de estos tres sitios de inicio de la transcripción en la regulación de la expresión de *GDH1*.

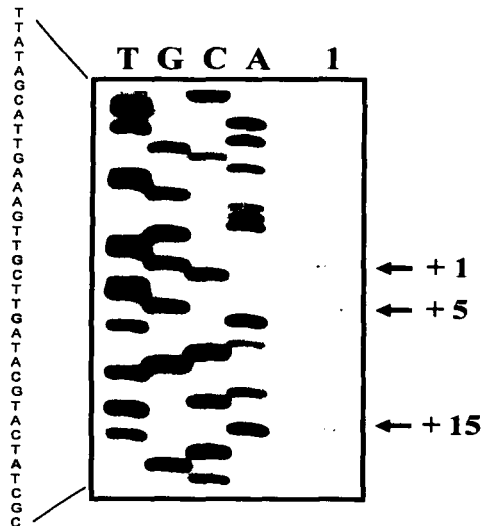


Figura 5. Inicio de transcripción de *GDH1*. Se muestran los resultados representativos del análisis de inicio de transcripción de *GDH1* por medio de "Primer Extension". Se obtuvo el RNA total de las cepas CLA1 (silvestre) y CLA1-1 (silvestre/pLIN1) crecidas en glucosa, sólo se muestra el inicio de transcripción obtenido a partir de la cepa CLA1-1 (*Carril 1*). Para la reacción de secuencia se emplearon los mismos desoxi oligonucleótidos usados en la reacción de "Primer Extension" (Apéndice I).

2. Regulación de la expresión de *GDH1* por fuentes de carbono y de nitrógeno

La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar una gran variedad de fuentes de carbono para su crecimiento, en condiciones fermentativas o respiratorias. La aminación reductiva del acetoglutarato por la NADP-GDH no sólo es un paso importante para la utilización de amonio sino también es un punto de conexión fundamental entre el metabolismo de nitrógeno y el metabolismo de carbono. se sabe por estudios previos que la expresión de *GDH1* se incrementa en presencia de fuentes de carbono no fermentables (Dang *et al.*, 1996), y que para su expresión requiere de la presencia de factores de transcripción característicos tanto del metabolismo de nitrógeno como del metabolismo de carbono. como primer paso en el presente trabajo se decidió caracterizar la regulación transcripcional de este promotor bajo diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono.

2.1. Efecto de la fuente de carbono

La expresión de *GDH1* en una cepa silvestre se incrementa tres veces en presencia de etanol comparada con aquella observada en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno (**Figuras 6 y 7**). Sin embargo, aunque la expresión del gen aumenta en etanol, este incremento no se refleja en una mayor actividad enzimática (De Luna *et al.*, 2001). El incremento en la expresión de *GDH1* en presencia de una fuente de carbono no fermentable, como el etanol, ya había sido reportado, aunque tampoco se había observado una correlación entre el incremento en expresión y la actividad enzimática. Dado que la actividad enzimática se determinó en una cepa silvestre, ese efecto había sido atribuido a una expresión diferencial entre *GDH1* y *GDH3* (Dang *et al.*, 1996). Sin embargo, la actividad de NADP-GDH en una cepa *gdh3Δ* crecida en glucosa o etanol es similar a la observada en una cepa silvestre en las mismas condiciones (DeLuna *et al.*, 2001). Estos resultados confirman que aunque la expresión de *GDH1* aumenta en etanol, esta inducción no tiene como consecuencia una mayor actividad enzimática, y sugiere además la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional.

Los posibles mecanismos de regulación postranscripcional podrían tener que ver con: *i*) una menor estabilidad del mensajero, *ii*) una menor traducibilidad del mismo o *iii*) la formación de una enzima menos estable. Estos mecanismos de regulación podrían estar actuando en conjunto para darnos como resultado la misma actividad enzimática en una fuente de carbono que en otra. A este respecto cabe mencionar que, cuando el mismo promotor regula la expresión tanto de *GDH1* como de *GDH3*, la actividad de Gdh1p en glucosa es 5 veces mayor que la de Gdh3p; mientras que en etanol esta diferencia es de

sólo dos veces (De Luna *et al.*, 2001). De manera adicional, en un ensayo tipo Northern se observan dos bandas de distintos tamaños cuando las muestras provienen de células cultivadas en etanol-amonio (**Figura 7**). Una de las bandas corresponde al tamaño esperado para el gen completo mientras que la banda más pequeña parece ser un producto de degradación que no se encuentra presente en la muestra proveniente de glucosa. Estos resultados sugieren que el mensajero de *GDH1* podría ser menos estable cuando la levadura se cultiva en presencia de etanol como fuente de carbono. En este sentido y teniendo en cuenta que se observaron tres inicios de transcripción de *GDH1* cuando las células se cultivaron en glucosa como fuente de carbono, resulta importante determinar: *i*) cuáles son los sitios de inicio de la transcripción de *GDH1* cuando las células se cultivan en presencia de etanol y *ii*) si en estas condiciones existe un uso preferencial de alguno de los tres inicios de transcripción.

Se puede decir que la expresión *GDH1* se encuentra reprimida en glucosa y mayormente activa en presencia de etanol. No obstante, el aumento en actividad transcripcional no se ve reflejado en un incremento en actividad enzimática debido, probablemente, a una regulación postranscripcional cuyo mecanismo desconocemos.

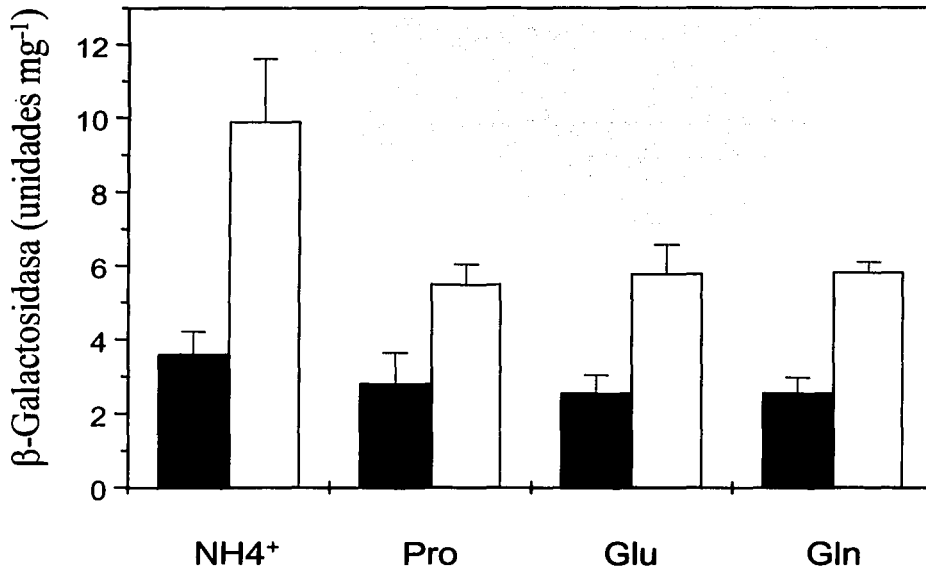


Figura 6. Efecto de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la expresión de *GDH1*. Se obtuvieron extractos de la cepa silvestre CLA1 crecidas en glucosa (*barras negras*) o etanol (*barras blancas*) como fuente de carbono, y en amonio (NH_4^+), prolina (Pro), glutamato (Glu), o glutamina (Gln) como fuente de nitrógeno. Las levaduras se cosecharon durante la fase exponencial de crecimiento. Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

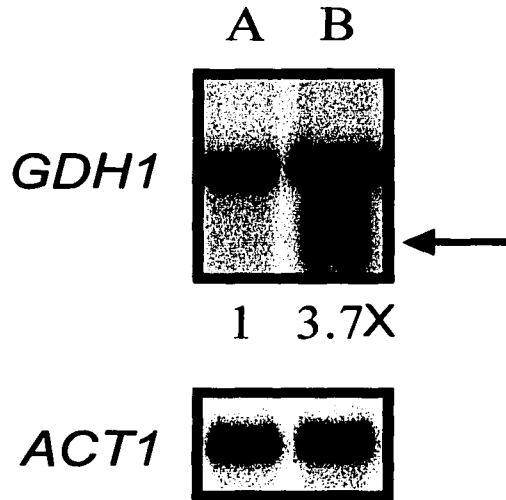


Figura 7. Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de *GDH1*. Se obtuvo el RNA total de la cepa CLA1 crecida medio mínimo con glucosa (carril A) o etanol (carril B). Para realizar un experimento tipo Northern se utilizó como sonda el gen completo de *GDH1* (1,365 pb) así como un fragmento de 1,100 pb del gen *ACT1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *ACT1* para normalizar. La flecha señala una banda de menor tamaño que se observa sólo en la condición con etanol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

En presencia de etanol en el medio, cualquiera de los aminoácidos usados como fuente de nitrógeno disminuyen la expresión de *GDH1*. Este gen no está sujeto a represión catabólica nitrogenada (NCR) dado que la represión que observamos en etanol es en realidad llevada a cabo por cualquier aminoácido, sin importar si se trata de una fuente de nitrógeno rica o pobre.

En glucosa, no obstante, la represión por carbono se impone al efecto de la fuente de nitrógeno ya que no se observó una disminución adicional en la actividad transcripcional por la presencia de prolina, glutámico o glutamina como fuentes de nitrógeno (**Figura 6**). Lo anterior contrasta con trabajos previos en donde se disminuye tanto la expresión de *GDH1* como la actividad de NADP-GDH en presencia de cualquier fuente de nitrógeno, distinta de amonio (Hu *et al.*, 1995; Roon and Even, 1973). Es importante hacer notar que los experimentos de Hu *et al.* (1995) se realizaron usando glucosa al 1% a diferencia de 2% que se utilizó en este trabajo, lo cual sugeriría que el efecto de los aminoácidos sobre la expresión transcripcional de *GDH1* depende de la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo. ¿Qué ocurre con la represión ejercida por los aminoácidos sobre este promotor en el caso de etanol? En una cepa silvestre en presencia de etanol no se puede definir si el efecto de los aminoácidos se lleva a cabo directamente sobre la expresión del gen, sobre la actividad enzimática o si es una mezcla de ambos efectos, ya que la actividad NADP-GDH no está únicamente codificada por *GDH1*. La expresión del gen *GDH3*, que codifica para la isoenzima de NADP-GDH, se encuentra reprimida en glucosa y se induce alrededor de 70 veces en etanol; a diferencia de *GDH1*, este gen sí se regula por NCR (Avendaño A., comunicación personal).

3. Efecto de los factores de transcripción.

Nuestros resultados muestran que *GDH1* es un gen regulado principalmente por la naturaleza de la fuente de carbono y no por NCR. Además, la regulación transcripcional observada en el apartado anterior concuerda con las observaciones que muestran que este gen se encuentra bajo el control de sistemas regulatorios generales tanto del metabolismo de nitrógeno como del metabolismo de carbono (Dang *et al.*, 1996; Daugherty *et al.*, 1993). Con estos antecedentes, resulta importante saber cuáles son los factores que regulan la expresión de *GDH1* y en qué condiciones lo hacen.

3.1. Factores del metabolismo de nitrógeno

3.1.1. Efecto de *Gln3p*, *Gat1p/Nil1p* y *Dal80p*

El promotor de *GDH1* presenta cinco sitios GATAA (**Figura 4**), los cuales pueden constituir los elementos en *cis* para la unión de dos activadores transcripcionales, *Gln3p* y *Gat1p/Nil1p*, que regulan la expresión de genes modulados por la fuente de nitrógeno (Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1997; Courchesne y Magasanik, 1988; Minehart y Magasanik, 1991; Stranbrough y Magasanik, 1995). Estos sitios también pueden ser reconocidos por otro miembro de la familia GATA, *Dal80p/Uga43p*, que actuaría como represor (Coornaert *et al.*, 1992; Cunningham y Cooper, 1993).

La falta de *Gln3p* disminuye la expresión de *GDH1* en glucosa y tiene un efecto aún mayor en presencia de etanol. Por el contrario, la falta de *Gat1p* o de *Dal80p* no tiene efecto sobre la expresión de *GDH1* (**Figura 8**). Aunque se sabe que *Gln3p* activa la expresión de *GDH1* cuando las células se cultivan en glucosa como fuente de carbono (Daugherty *et al.*, 1993), nuestros resultados muestran que *Gln3p*, un activador transcripcional que se pensaba regulaba a sus genes blanco únicamente en respuesta a fuentes nitrógeno, también regula la expresión dependiente de carbono.

Se ha propuesto que las proteínas de la vía TOR se comunican con los factores de transcripción de la familia GATA como parte de un mecanismo de respuesta a nutrientes. *Gln3p* y *Gat1p/Nil1p* son activados por distintas señales nutricionales como la baja calidad de la fuente de nitrógeno y la baja calidad de la fuente de carbono, respectivamente (Kuruvilla *et al.*, 2001). El hecho de que la mayor expresión de *GDH1* en etanol sea dependiente de *Gln3p* y no de *Gat1p* (**Figura 8**), sugiere que ambos factores GATA podrían tener funciones que se traslapan. Según el modelo propuesto por Kuruvilla y cols. (2001), las células responden a una baja calidad en la fuente de carbono (etanol) haciendo intermediarios, como el α -cetoglutarato y el succinato, que puedan servir de sustratos para el ciclo TCA y reduciendo la concentración de glutamato. Nuestros datos no coinciden con esta hipótesis, ya que tanto la expresión de *GDH1* como la expresión de *GDH3* (Avendaño A., comunicación personal) aumentan cuando se crece a la levadura en etanol (**Figuras 6 y 7**). Aunque el incremento en la expresión de estos genes no se refleje en un aumento en la actividad enzimática (ver **Artículo 2**), la presencia de ambas isoenzimas permite el funcionamiento de un sistema regulatorio en el cual la abundancia relativa de cada isoforma modula la velocidad bajo la cual el α -cetoglutarato es utilizado para la biosíntesis de glutamato (DeLuna *et al.*, 2001).

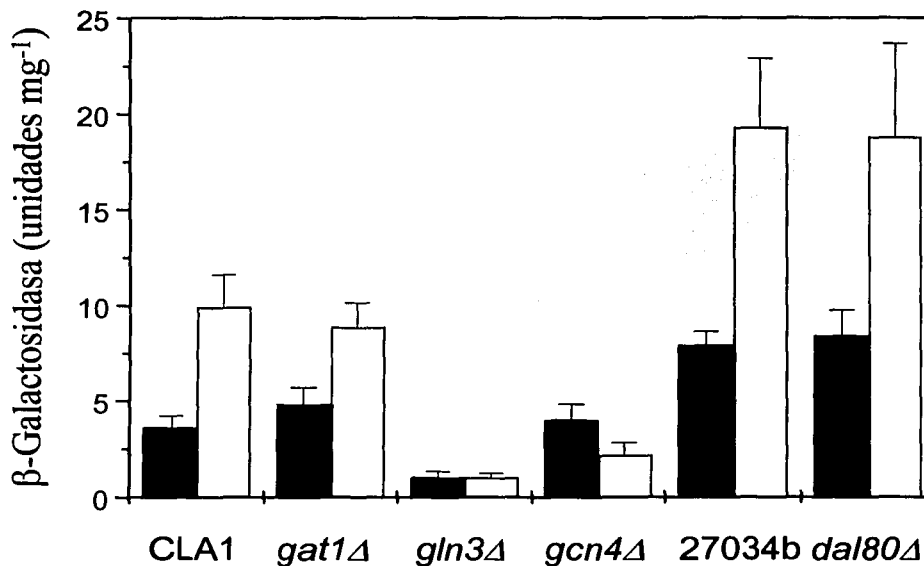
A**B**

Figura 8. Expresión de *GDH1* en las mutantes afectadas en los factores transcripcionales de la familia GATA y en *Gcn4p*. **A**, Esquema del promotor de *GDH1*, se señalan los sitios de unión presuntos para *Gcn4p* (O), *Gln3p* (>, <), *Mig1p* (◆) y el complejo HAP (■), la caja TATA presunta (*), los sitios de inicio de transcripción (→) y las URRs putativas (-----). **B**, Las cepas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con glucosa (barras negras) o etanol (barras blancas), y cosechadas en fase exponencial de crecimiento. Cepas: CLA1-1 (silvestre/pLIN1), CLA102-1(*gat1*Δ/pLIN1), CLA302-0-1 (*gln3*Δ/pLIN1), CLA100-1 (*gcn4*Δ/pLIN1), 27034b-10 (silvestre/pLIN10), 30078c-10 (*dal80*Δ/pLIN10). Los promedios de las actividades de β-galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

En presencia de una buena fuente de nitrógeno, la fosforilación de Gln3p vía TOR es un mecanismo que impide la entrada de este factor al núcleo (Beck y Hall, 1999; Bertram *et al.*, 2002). Recientemente se ha visto que Gln3p también se encuentra fosforilado cuando las levaduras se cultivan en presencia de etanol, rafinosa, galactosa, de una baja concentración de glucosa (0.05%) y en condiciones de falta de glucosa en el medio. La fosforilación de Gln3p en condiciones de privación de glucosa es dependiente de Snf1p (Bertram *et al.*, 2002). Tanto TOR como Snf1p son cinasas citoplásmicas que controlan la fosforilación de Gln3p en respuesta a diferentes nutrientes; sin embargo, ambas cinasas en este caso tienen efectos opuestos. La fosforilación dependiente de TOR mantiene a Gln3p en el citoplasma mientras que la fosforilación dependiente de Snf1p podría permitir la importación de Gln3p al núcleo o inhibir su exportación (Bertram *et al.*, 2002). La fosforilación, además de regular la localización intracelular de Gln3p, podría modular la habilidad de este factor transcripcional para activar a sus genes blanco.

Hasta el momento no se conoce con precisión la gama de fosforilación u otras modificaciones que puede presentar Gln3p en respuesta a distintos nutrientes como por ejemplo, la calidad de la fuente de carbono en el medio ni como estas modificaciones determinan la interacción con sus genes blanco. El caso de la regulación de *GDH2* por este factor transcripcional es un buen ejemplo de lo mencionado con anterioridad. La expresión de este gen es baja en células creciendo en glucosa y aumenta en presencia de etanol. Se sabe que en glucosa *GDH2* requiere para su expresión de la presencia de Gln3p y que el incremento observado en etanol es independiente de este activador transcripcional (Coschigano *et al.*, 1991). En cambio, en condiciones de privación de glucosa el aumento en la expresión de *GDH2*, sí depende de Gln3p (Bertram *et al.*, 2002). En este caso faltaría definir con precisión cuáles y cuántos son los sitios de fosforilación en cada una de las condiciones y si la fosforilación de Gln3p en etanol depende también de Snf1p. El hecho de que un factor transcripcional como Gln3p esté regulado por distintas señales nutricionales abre un panorama aún mas complejo de la regulación fina que podrían presentar otros factores transcripcionales y por lo tanto sus genes blanco. Al parecer, el reconocimiento de las secuencias blanco y la activación transcripcional de los genes, así como las interacciones que puedan establecer estos factores con otros elementos de regulación dependerán de las modificaciones que presenten en respuesta a cada una de las condiciones de crecimiento.

3.1.2. Efecto de Gcn4p

La secuencia del promotor de *GDH1* presenta cuatro sitios probables para la unión de Gcn4p. Como se observa en la **Figura 8**, la falta de Gcn4p no tiene efecto sobre la expresión basal de *GDH1* en glucosa; sin embargo, sí afecta la expresión en etanol.

Dado que Gcn4p es un activador transcripcional que regula la expresión de genes biosintéticos cuando falta algún aminoácido en la célula (Hinnebusch, 1992), determinamos la actividad β -galactosidasa de una cepa silvestre transformada con el plásmido pLIN1 en presencia o ausencia de 3-AminoTriazol (3-AT). El 3-AT, al ser un inhibidor competitivo de la enzima codificada por *HIS3*, crea una falta de histidina en el medio. La expresión de *GDH1* no respondió a la privación de histidina en ninguna de las condiciones ensayadas. En las células crecidas en glucosa y tratadas con 3-AT, la actividad de β -galactosidasa fue menor en comparación con la obtenida en ausencia del análogo. Para el caso de las células crecidas en etanol, la expresión de *GDH1* fue similar en presencia o ausencia de 3-AT (**Figura 9A**).

El hecho de que Gcn4p regule la expresión de *GDH1* únicamente en presencia de etanol y no en condiciones de privación de aminoácidos podría deberse a que exista una mayor cantidad de este activador transcripcional en una condición que en otra. Este no resultó ser el caso ya que la cantidad de Gcn4p fue similar en glucosa+3AT comparado con etanol (**Figura 9B**). De manera adicional, la presencia simultánea de etanol y de 3AT no incrementó la cantidad de Gcn4p observada en etanol, lo cual indica que existe un umbral máximo de activación que puede alcanzar este factor.

En condiciones de privación de aminoácidos, la presencia de tRNAs no cargados cerca de los ribosomas induce la fosforilación de eIF-2 α por Gcn2p. Gcn1p y Gcn20p forman un complejo que se asocia con los ribosomas y podría mediar la activación de la proteína cinasa Gcn2 en respuesta a los niveles elevados de estos tRNAs no cargados (Hinnebusch, 1997). Aunque la privación por glucosa también induce la fosforilación de eIF-2 α por Gcn2p, lo cual estimula la expresión traduccional de *GCN4*, existen algunas diferencias entre el mecanismo de regulación en respuesta a la privación de aminoácidos y el de limitación de glucosa (Yang *et al.*, 2000). En limitación de glucosa, tanto la región de Gcn2p que interactúa con los ribosomas así como la proteína Gcn20p no se requieren para el control traduccional de *GCN4*, mientras que en condiciones de privación de aminoácidos estos elementos resultan esenciales para la respuesta (Yang *et al.*, 2000).

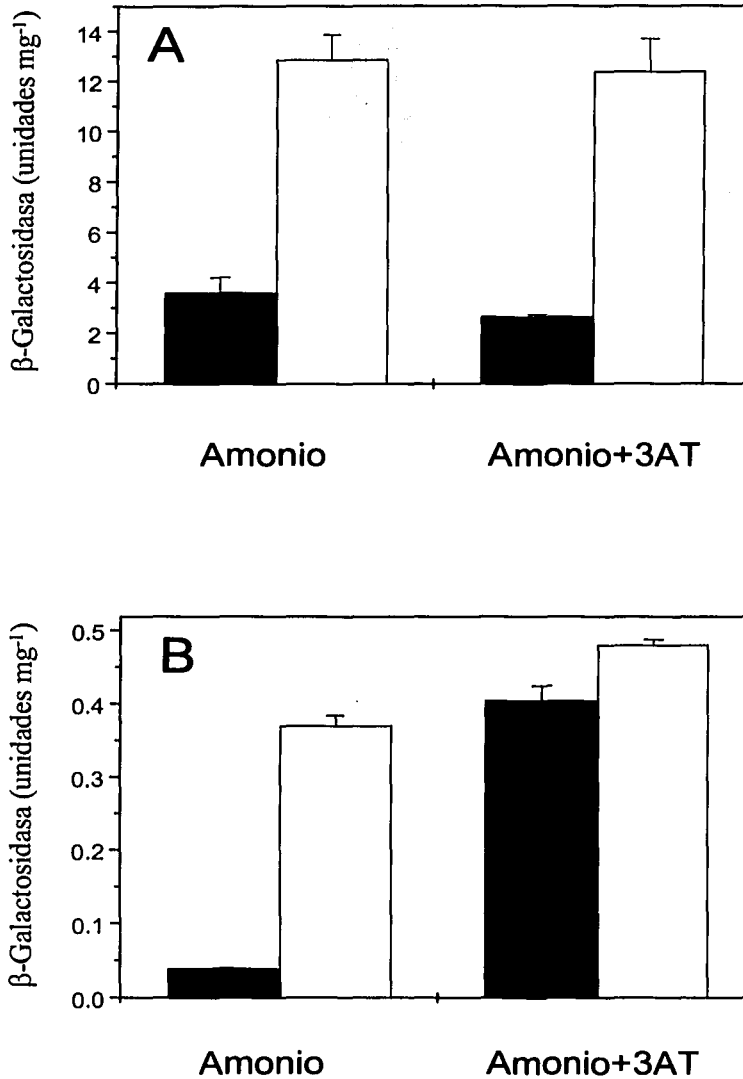


Figura 9. Actividad específica de β -Galactosidasa en condiciones basales o de privación de aminoácidos. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con glucosa (*barras negras*) o etanol (*barras blancas*), en presencia o ausencia de 10mM de 3AT, y cosechadas durante la fase exponencial de crecimiento. **A**, CLA1-1 (silvestre/pLIN1): cepa silvestre transformada con el promotor de *GDH1*. **B**, CLA-300 (silvestre/p180): cepa silvestre transformada con el plásmido que lleva la fusión traduccional de *GCN4*.

Cabe preguntarse entonces cuál es el mecanismo que permite que Gcn4p sólo regule la expresión de *GDH1* en etanol y no en otras condiciones. Al respecto, podrían existir varias posibilidades: *i*) que la acción de *Gcn4p* sobre el promotor de *GDH1* sea indirecta y que en realidad este factor transcripcional regule a otro que a su vez active la expresión de *GDH1*, *ii*) que la vía de transducción de señales que opera en el caso de la privación de aminoácidos sea distinta de la que se activa en presencia de etanol y por lo tanto, en estas condiciones Gcn4p tenga alguna modificación que le permita reconocer e interactuar con las secuencias blanco del promotor de *GDH1*.

3.2. Factores del metabolismo de carbono

Tomando en cuenta que la expresión de *GDH1* resultó estar regulada por la fuente de carbono presente en el medio y que la represión de la expresión de los genes en glucosa se ejerce principalmente a través de Mig1p y Mig2p, se decidió determinar la actividad transcripcional de *GDH1* en una doble mutante *mig1Δ mig2Δ*. Aunque el promotor presenta una zona rica en GCs muy parecida a la que requieren estos activadores transcripcionales para actuar, la represión en la expresión de *GDH1* que se observa en glucosa no mostró depender de la presencia de Mig1p/Mig2p. Contrario a lo esperado, en etanol la falta de estos represores disminuye la actividad transcripcional de *GDH1* (**Figura 10**). Parece que estos factores transcripcionales estarían actuando como activadores de la transcripción de *GDH1* en presencia de etanol.

El promotor de *GDH1* presenta tres elementos CCAAT que pueden ser reconocidos por el complejo HAP (**Figura 4**). En glucosa, la falta de las subunidades Hap2p y Hap3p disminuyeron la expresión de *GDH1* mientras que la ausencia de la subunidad activadora Hap4p no tuvo efecto (**Figura 10**), confirmando así las observaciones de Dang *et al.* (1996). En etanol, la inactivación de cualquiera de las subunidades Hap2p, Hap3p o Hap4p disminuyeron la actividad transcripcional de *GDH1* (**Figura 10**). No obstante, la falta de la subunidad Hap4p tiene un efecto menor en la transcripción de este gen que cualquiera de las otras dos subunidades del complejo. Aunque Hap4p parece ser la subunidad responsable de la activación transcripcional en respuesta a la fuente de carbono (Forsburg y Guarente, 1989), es muy probable que, por lo menos en este promotor, la activación transcripcional opere en parte de una manera Hap4p independiente.

A



B

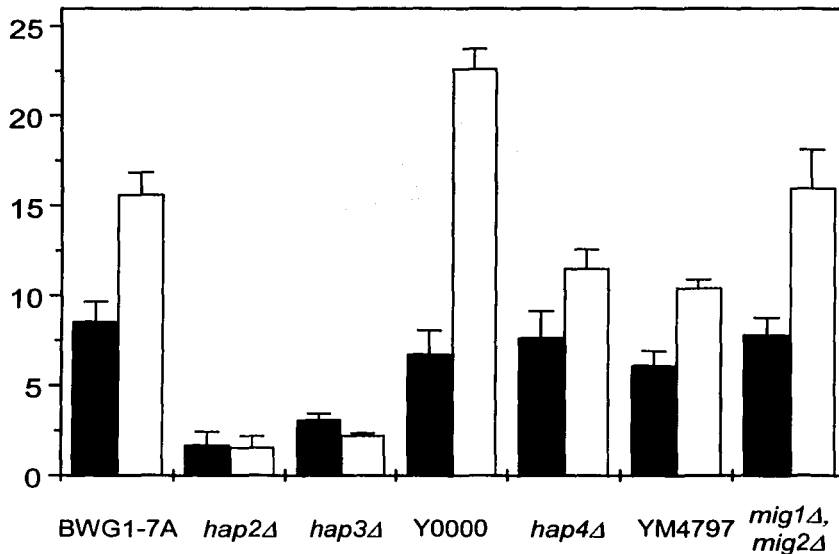


Figura 10. Expresión de *GDH1* en mutantes afectadas en factores transcripcionales del metabolismo de carbono. **A**, Esquema del promotor de *GDH1*, se señalan los sitios de unión presuntos para Gcn4p (O), Gln3p (▷,◁), Mig1p (◆) y el complejo HAP (■), la caja TATA presunta (*), los sitios de inicio de transcripción (→) y las URRs putativas (-----). **B** Las cepas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con glucosa (*barras negras*) y cosechadas durante la fase exponencial de crecimiento. Para el caso de los cultivos en etanol, las células se crecieron en glucosa hasta alcanzar 0.3 de D.O., se lavaron y se incubaron en medio mínimo suplementado con etanol (*barras blancas*) durante 16 horas. *Cepas*: BWG1-7a-1 (silvestre/pLIN1), LWG1-1 (*hap2Δ*/pLIN1), JP40-1 (*hap3Δ*/pLIN1), Y0000-1 (silvestre/pLIN1), Y04959-1 (*hap4Δ*/pLIN1), YM4797-10 (silvestre/pLIN10), YM4968-10 (*mig1Δ, mig2Δ*/pLIN10). Los promedios de las actividades de β-galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

El fenómeno de que la mutante *hap4Δ* no disminuya la expresión de *GDH1* en glucosa y que en etanol no afecte la actividad transcripcional de la misma manera que cuando faltan las otras subunidades del complejo, ya había sido observado en otros genes como es el caso de *CYC1* y *SDH3* (Daignan-Fornier *et al.*, 1994). Aún más, el gen *ASN1* se regula de manera positiva por el complejo Hap2p/3p/5p, independientemente de la presencia de la subunidad Hap4p. Estas observaciones podrían sugerir más de una función para el complejo Hap2p/3p/4p/5p, tales como el remodelamiento de la cromatina, la cual no requeriría de la subunidad Hap4p, y la activación directa de la RNA polimerasa, en la cual Hap4p sería importante (Gancedo, 1998). Existen evidencias claras en ambos sentidos: el factor general TFIIB de *S. cerevisiae* presenta una hélice anfipática que se requiere para la activación de la transcripción por medio del complejo Hap2p/3p/4p/5p (Shaw *et al.*, 1996). Por otra parte, el complejo NF-Y de *Xenopus*, homólogo al complejo HAP de *S. cerevisiae*, preestablece una estructura apropiada en la cromatina, la cual permite la transcripción del gen *HSP70* por medio del reclutamiento de la acetiltransferasa de histonas p300 (Li *et al.*, 1998).

3.3. Otros factores de transcripción que regulan a *GDH1*

Además de los factores de transcripción anteriormente mencionados, la activación de *GDH1* depende de la presencia Leu3p (Hu *et al.*, 1995). Este activador transcripcional está implicado en el control de la biosíntesis de los aminoácidos ramificados. Leu3p activa la transcripción de sus genes blanco sólo cuando el α -isopropilmalato (α -IPM), el producto del primer paso en la biosíntesis de leucina, se encuentra presente. Por lo tanto, la activación transcripcional por Leu3p está relacionada con la producción de α -IPM por la α -IPM sintasa, la cual se inhibe retroactivamente por leucina. La importancia que tiene la regulación de *GDH1* por Leu3p podría radicar en que la trasaminación del glutamato es el paso final de la biosíntesis de cada uno de los tres aminoácidos ramificados. Si la leucina se encuentra en exceso y su biosíntesis se reprime a través de la inactivación de Leu3p, la transcripción de *GDH1* necesita disminuir dado que se requiere menos glutamato (Dickinson, 1999).

4. Análisis de delección de la región 5' del promotor

4.1. Fuentes de carbono

El promotor de *GDH1* se encuentra reprimido en glucosa, se induce en presencia de etanol y esta inducción depende de la acción de Gln3p, Gcn4p y de Hap2p/3p/4. Dado que Mig1p/Mig2p no tienen efecto sobre el promotor de *GDH1*, no conocemos cuáles son los elementos que podrían estar regulando la menor expresión de *GDH1* en glucosa. Para tratar de abordar esta pregunta, se realizaron una serie de delecciones sistemáticas de la región 5' del promotor de *GDH1* con el fin de identificar otros elementos de regulación que pudieran estar determinando la expresión de este gen en diferentes condiciones de cultivo (**Figura 11**). Este análisis nos permitió determinar la existencia de dos regiones de regulación negativa (URR1 Y URR2) que al ser eliminadas incrementaron la expresión de *GDH1*. El incremento fue más evidente en los cultivos crecidos en etanol-amonio que en aquellos provenientes de glucosa-amonio (**Figura 11, pLIN2 y pLIN4**). Es importante resaltar que en la zona denominada URR2 se localiza la caja que podría ser reconocida por Mig1p/Mig2p; sin embargo, estos factores no tuvieron ningún efecto sobre la transcripción del gen *GDH1* (**Figura 10**). En este sentido puede pensarse que en la URR2 se encuentren otros elementos mediante los cuales se esté ejerciendo la represión de la transcripción, o que otros factores de transcripción repriman la expresión de *GDH1* a través de la caja Mig.

Entre las dos regiones de represión se encuentra la caja GATA⁽¹⁾, que resultó importante para la expresión de este gen tanto en glucosa como en etanol, ya que al removerla, la actividad transcripcional de *GDH1* en ambas fuentes de carbono fue menor (**Figura 11, pLIN3**). La pérdida de la caja GATA⁽²⁾ y la caja GCN4⁽²⁾ también disminuyó la transcripción de *GDH1* tanto en glucosa como en etanol (**Figura 11, pLIN5**). En la construcción pLIN7, la expresión de *GDH1* en ambas condiciones de cultivo se encuentra disminuída; no obstante, el incremento en los valores de β -galactosidasa cuando las células provenían de etanol se mantuvo. Ninguna de las construcciones realizadas nos permitió determinar cual es el elemento necesario para la inducción de la expresión de *GDH1* en etanol. La presencia de las cajas GATA⁽⁵⁾ y GCN4⁽⁴⁾ en la región de 268pb contenida en la construcción pLIN7 podría sugerir que éstas serían las responsables de la regulación por la fuente de carbono.

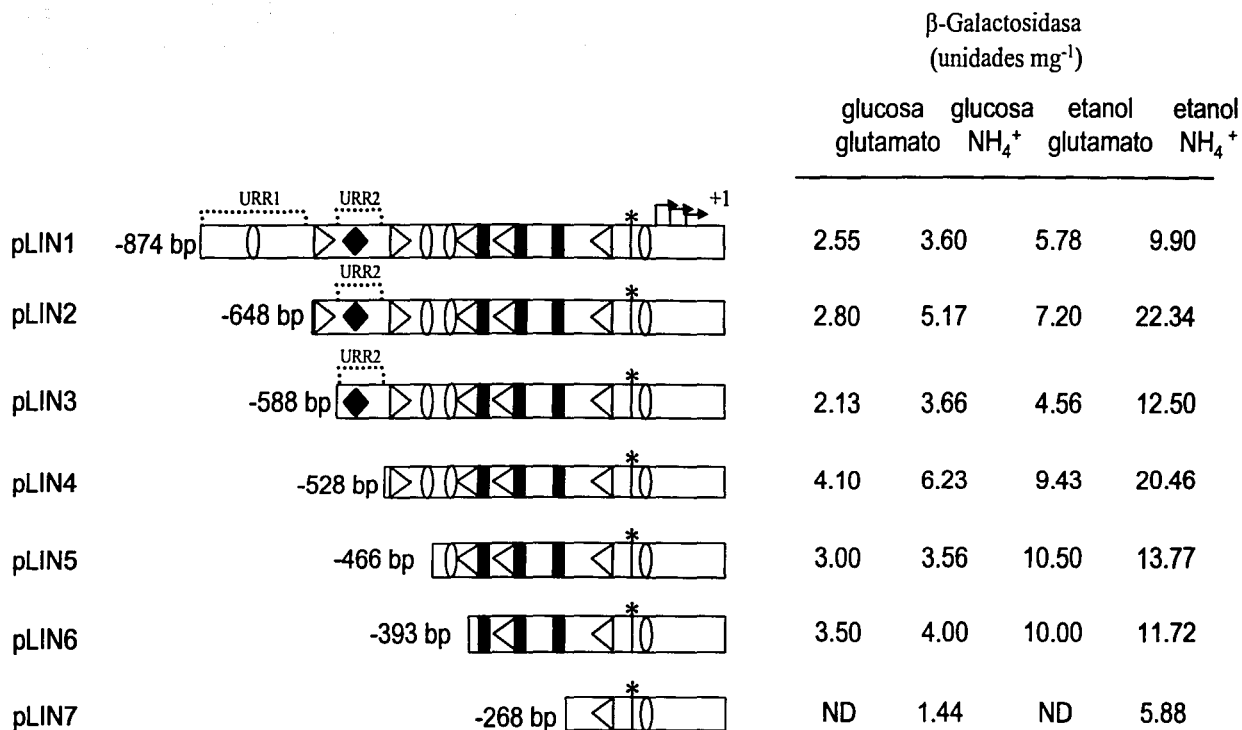


Figura 11. Análisis de delección del promotor de *GDH1*. El promotor completo así como las delecciones fueron clonadas en el vector YEp363 (2μ *LEU2 lacZ*) dando lugar a los plásmidos pLIN1 a pLIN7. La cepa silvestre se transformó con la colección de plásmidos y se determinó la actividad de β-galactosidasa de los cultivos crecidos en amonio o glutamato como fuentes de nitrógeno y glucosa o etanol como fuentes de carbono. Los valores de β-galactosidasa son un promedio de tres experimentos independientes con una variación ≤ 15%. Se esquematizan los sitios de unión presuntos para Gcn4p (○), Gln3p (▷, ◁), Mig1p (◆) y el complejo HAP (■), la caja TATA presunta (*), los sitios de inicio de transcripción (→) y las URRs putativas (.....). ND: no determinado.

4.2. Glutamato y fuentes de carbono

Los estudios realizados con el promotor completo mostraron que en presencia de glucosa, la represión por carbono es mayor a la ejercida por la fuente de nitrógeno, mientras que el efecto de la fuente de nitrógeno sólo es evidente en presencia de etanol (**Figura 6**). Aunque no se pudieron identificar los elementos en *cis* que regulan la inducción de *GDH1* en etanol por medio del análisis de deleción, se quiso identificar una región del promotor que respondiera a la represión por nitrógeno. Dado que este promotor no se regula por NCR, se utilizó glutamato como la fuente de nitrógeno represora. Las cepas que llevan las construcciones pLIN1 a pLIN4 mostraron una menor actividad de β -galactosidasa en presencia de glutamato como fuente de nitrógeno. La expresión de *GDH1* en estas construcciones se encontró en su nivel más bajo en presencia de glucosa-glutamato y se incrementó gradualmente al liberarse la represión por carbono y por nitrógeno, obteniéndose la máxima expresión en etanol-amonio (**Figura 11**). De manera adicional, se observó que las construcciones pLIN5 y pLIN6 no se reprimen por la presencia de glutamato. Aunque en esta región de 62 pb se encuentran presentes la caja GATA⁽²⁾ y la caja GCN4⁽²⁾, se requiere de un análisis fino de la zona para poder identificar con precisión las secuencias en *cis* que podrían estar regulando la represión por glutamato.

4.3. Factores de los cuales dependen las distintas construcciones del promotor

Cuando las células fueron cultivadas en presencia de etanol, se observó un incremento neto en actividad de β -galactosidasa en todas las construcciones. Este efecto puede deberse a los elementos en *cis* GATA⁽⁵⁾ y GCN4⁽⁴⁾ o a otros elementos no identificados que se encuentren presentes en la construcción pLIN7 (**Figura 11**). Por lo anterior, se estudió el efecto que tienen los factores Gln3p y Gcn4p sobre la expresión de las distintas construcciones tanto en glucosa como en etanol (**Figura 12**). Se observó que la falta de Gln3p disminuye la expresión de *GDH1* en todos los casos, con excepción de la construcción pLIN7 en presencia de glucosa, en donde el valor de β -galactosidasa observado parece representar la actividad basal de este promotor. La expresión inducida del promotor de *GDH1* en etanol depende por completo de Gln3p. Estos datos sugieren que el elemento en *cis* GATA⁽⁵⁾, presente en la construcción pLIN7, pudiera tener un papel en la activación de *GDH1* mediada por Gln3p cuando las células se cultivan en etanol. Tratando de contestar esta pregunta se realizó una mutagénesis sitio dirigida sobre la caja GATA⁽⁵⁾ en el plásmido pLIN7, obteniéndose la construcción pLIN7mut (**Apéndice I**). Aún cuando Gln3p regula la inducción de la construcción pLIN7 en etanol la caja GATA⁽⁵⁾ a la cual podría unirse

este factor no resultó importante para la regulación de la actividad transcripcional de *GDH1* (**Figura 12**, pLIN7mut). Aunque en este caso Gln3p parece ser importante para la inducción de la expresión de *GDH1*, esta activación tendría que llevarse al cabo sin la unión directa del factor con su secuencia blanco. Para resolver esta discrepancia es necesario realizar otro tipo de análisis tal como un retardo en gel, con el fin de definir si Gln3p se une de manera directa a esta región.

Por otra parte, la expresión del promotor de *GDH1* en las distintas construcciones no se modificó en una mutante *gcn4Δ* crecida en presencia de glucosa como fuente de carbono (**Figura 12**). En cambio, la falta de Gcn4p en las distintas construcciones disminuyó la actividad transcripcional de *GDH1* de dos a seis veces en presencia de etanol. Este resultado confirmó que Gcn4p regula de manera positiva la expresión de *GDH1* en etanol. El hecho de que la expresión de β-galactosidasa disminuyera a la mitad en la cepa *gcn4Δ* transformada con la construcción pLIN7, sugiere que la caja GCN4⁽⁴⁾ podría ser importante para la inducción de la expresión de *GDH1* en presencia de etanol.

		β -Galactosidasa (unidades mg^{-1})						
		CLA 1-1		CLA 100-1		CLA 302-0-1		
		<i>GCN4 GLN3</i>		<i>gcn4Δ GLN3</i>		<i>GCN4 gln3Δ</i>		
		glucosa NH_4^+	etanol NH_4^+	glucosa NH_4^+	etanol NH_4^+	glucosa NH_4^+	etanol NH_4^+	
pLIN1	-874 bp		3.60	9.90	4.00	2.16	1.00	1.00
pLIN2	-648 bp		5.17	22.34	5.61	7.64	0.59	1.00
pLIN3	-588 bp		3.66	12.50	4.50	5.00	0.50	0.65
pLIN4	-528 bp		6.23	20.46	5.50	3.26	0.75	1.77
pLIN5	-466 bp		3.56	13.77	3.50	3.00	0.65	1.45
pLIN6	-393 bp		4.00	11.72	5.17	4.00	0.70	1.50
pLIN7	-268 bp		1.44	5.88	2.40	2.92	1.12	1.41
pLIN7mut	-268 bp		0.92	6.00	ND	ND	ND	ND

Figura 12. Análisis de delección del promotor de *GDH1*. El promotor completo así como las delecciones fueron clonadas en el vector YEp363 (2μ *LEU2 lacZ*) dando lugar a los plásmidos pLIN1 a pLIN7. La cepas se transformaron con la colección de plásmidos y se determinó la actividad de β -galactosidasa de los cultivos crecidos en amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol como fuentes de carbono. Los valores de β -galactosidasa son un promedio de tres experimentos independientes con una variación $\leq 15\%$. Se esquematizan los sitios de unión presuntos para Gcn4p (O), Gln3p (\triangleright , \triangleleft), Mig1p (\blacklozenge) y el complejo HAP (\blacksquare), la caja TATA presunta (*), los sitios de inicio de transcripción (\rightarrow) y las URRs putativas (.....).

5. Complejos remodeladores de la cromatina y determinación de la organización nucleosomal.

La estructura de la cromatina tiene un papel central y dinámico en la regulación de la expresión de un gen. Dado que la cromatina parece tener una capacidad represora intrínseca, el cambio en la organización nucleosomal de un promotor, que puede ocurrir antes o durante la activación, facilitaría la función de la maquinaria basal de transcripción. Por lo tanto, resulta adecuado pensar que la diferencia de expresión entre glucosa y etanol que presenta el promotor de *GDH1* sea producto de la acción conjunta entre la regulación diferencial de los activadores, como se demostró en los apartados previos, y la remodelación de la estructura de la cromatina a través de un arreglo nucleosomal distinto.

Para abordar esta hipótesis, estudiamos el efecto que tienen algunos de los complejos de remodelaje de la cromatina en la regulación de la expresión de *GDH1*. El complejo SWI/SNF remodela la cromatina *in vivo* y estimula la unión de los activadores y los factores basales de transcripción en el DNA nucleosomado (Peterson and Logie, 2000). La **Figura 13** muestra que *GDH1* requiere para su expresión de la subunidad *SNF2* de este complejo tanto en glucosa como en etanol. El incremento en la expresión de *GDH1* que se observa en etanol fue completamente dependiente del complejo SWI/SNF. Es importante hacer notar que la actividad transcripcional residual que queda en la mutante *snf2Δ* en ambas condiciones de cultivo es muy similar a la que se presenta en la construcción pLIN7 en glucosa (**Figura 11**), sugiriendo que este valor de β -galactosidasa corresponde a la expresión basal del promotor de *GDH1* dada por la maquinaria general de transcripción. Resulta interesante que la expresión de *GDH1* dependa del complejo SWI/SNF, dado que los estudios realizados por medio de microarreglos de DNA muestran que solo el 1% de los 6,104 genes ensayados presentan un cambio en la expresión del mRNA de más de tres veces comparando una cepa silvestre y la cepa *snf2Δ* (Sudarsanam *et al.*, 2000).

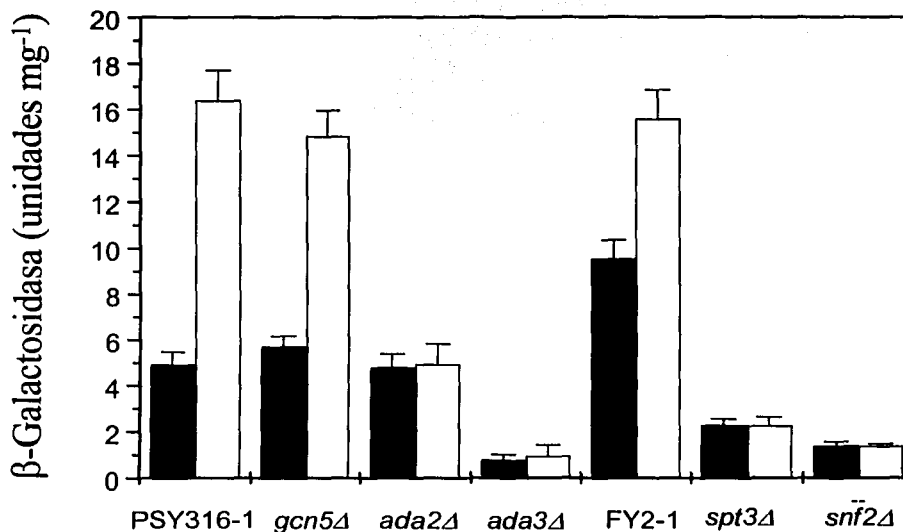


Figura 13. Expresión de *GDH1* en mutantes afectadas en las subunidades de los complejos de remodelaje. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con glucosa (*barras negras*) y cosechadas durante la fase exponencial de crecimiento. Para el caso de los cultivos en etanol, las células se crecieron en glucosa hasta alcanzar 0.3 de D.O., se lavaron y se incubaron en medio mínimo suplementado con etanol (*barras blancas*) durante 16 horas. *Cepas*: PSY316-1 (silvestre/pLIN1), PSY316-*gcn5-1* (*gcn5Δ*/pLIN1), PSY316-*ada2-1* (*ada2Δ*/pLIN1), PSY316-*ada3-1* (*ada3Δ*/pLIN1), FY2-10 (silvestre/pLIN10), FY293-10 (*spt3Δ*/pLIN10), FY1656-10 (*snf2Δ*/pLIN10). Los promedios de las actividades de β -galactosidasa reportadas representan el resultado de tres experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que la acetilación de histonas incrementa la unión de los factores de transcripción con sus secuencias blanco presentes en un DNA nucleosomado. En *S. cerevisiae*, se han descrito dos tipos de complejos con actividad de acetiltransferasa de histonas: el complejo SAGA y el complejo ADA (Eberharther *et al.*, 1999). La actividad transcripcional del promotor completo de *GDH1* fue determinada en cepas *gcn5Δ*, *ada2Δ*, *ada3Δ* y *spt3Δ*. Tanto en glucosa como en etanol, la expresión de *GDH1* se vió afectada por la falta de Ada3p o Spt3p (**Figura 13**). La subunidad Ada2p sólo disminuyó la expresión de este promotor en presencia de etanol, mientras que Gcn5p no tuvo efecto alguno en ambas fuentes de carbono. Estos resultados indican que el complejo SAGA, o por lo menos una parte de éste, regula la expresión de *GDH1* tanto en glucosa como en etanol. Aunque se ha pensado que el complejo SAGA incluye a *GCN5*, no todos los promotores dependen para su actividad de la acetilación de histonas (Lee *et al.*, 2000). La expresión de *GDH1* es independiente de la presencia de *GCN5*, lo cual nos sugiere que este promotor no está regulado por acetilación o que existen otras proteínas con actividad de acetilasa de histonas, como TAF_{II}145, que podrían estar actuando sobre la actividad transcripcional de este promotor. Ya que SAGA es un complejo multimérico formado por al menos 15 subunidades, podrían existir diferentes subcomplejos, hasta ahora no caracterizados, que regulen de manera diferencial la expresión de los genes dependiendo de las condiciones de crecimiento. Dado que Ada2p, Ada3p y Gcn5p también se encuentran presentes en el complejo ADA, sería necesario definir si la subunidad Ahc1p, componente exclusivo de este complejo (Roth *et al.*, 2001), regula la expresión de *GDH1*.

El hecho de que la expresión de *GDH1* se encuentre regulada por un mayor número de factores en etanol y que en esta condición exista un requerimiento diferencial de las subunidades que forman parte de los complejos remodeladores de cromatina sugiere que podría existir una diferencia importante en el arreglo nucleosomal entre las células cultivadas en glucosa y aquellas provenientes de etanol. Por medio del análisis de la cromatina a baja resolución utilizando el método de digestión *in vivo* por MNasaI, la enzima capaz de digerir el DNA en regiones internucleosomales (**Apéndice I**), se observó que el promotor de *GDH1* no presentó un posicionamiento nucleosomal definido tanto en glucosa como en etanol (**Figuras 14 y 15**). El no encontrar un posicionamiento nucleosomal claro sugiere que, en este promotor, la mayor parte de la población presenta una estructura nucleosomal móvil, como si la regulación de la expresión de *GDH1* estuviera definida por los factores transcripcionales que interactúan con sus secuencias blanco en las distintas condiciones de crecimiento y no por una estructura cromatínica en sí.

Si se compara el patrón de bandas obtenido en glucosa con aquel de cultivos con etanol, usando la sonda cercana al ATG, podemos distinguir la pérdida de una banda en etanol que se encontraba en la región de 450 pb (zona de la GATA⁽³⁾ y HAP⁽¹⁾) y el incremento en una banda localizada alrededor de 650 pb (zona de la GATA⁽¹⁾ y URR2). Cuando se usó la sonda localizada en el extremo 5' del promotor de *GDH1*, se observó un aumento en la sensibilidad de la región comprendida entre las 350 pb y las 450 pb GCN4^(2,3) y GATA⁽²⁾ en etanol (**Figuras 14 y 15**). Esta técnica de baja resolución no resulta lo suficientemente sensible para definir si los pequeños cambios observados son reales o no. Para ello sería necesario realizar un análisis de sensibilidad a DNasaI, con el fin de determinar si el patrón de bandas observado se debe a la presencia o ausencia de activadores. Además, un análisis fino de la región usando un mapeo por LM-PCR y MNasaI podría ser de utilidad para definir con precisión si existen diferencias entre la organización nucleosomal de células crecidas en ambas fuentes de carbono.

En general, los trabajos reportados sobre la estructura de los nucleosomas de un promotor dado presentan ejemplos en donde la transcripción del gen en cuestión depende de que la organización nucleosomal se modifique en diferentes condiciones de cultivo. A este respecto, la organización nucleosomal del promotor del gen α_1 -anti-tripsina de humano (α_1 -AT) es el segundo reporte hasta el momento, en que la posición de los nucleosomas no cambia en respuesta a diferentes condiciones de cultivo (Soutoglou y Talianidis, 2002).

Recientemente se ha hecho extensivo el uso de los microarreglos de DNA para estudiar la expresión genética de manera global. Esta técnica es de gran ayuda para identificar los cambios que ocurren en la expresión del genoma completo de *S. cerevisiae* en respuesta a condiciones del medio de cultivo, estados fisiológicos o en cepas mutadas. Aunque los microarreglos son una herramienta poderosa, se han observado diferencias considerables entre los datos obtenidos de manera global y el estudio de la regulación de un gen de manera fina (Sudarsanam *et al.*, 2000). Por lo tanto si se quiere estudiar en detalle la regulación transcripcional de un gen dado, es recomendable emplear el enfoque que se utilizó en este trabajo de tesis.

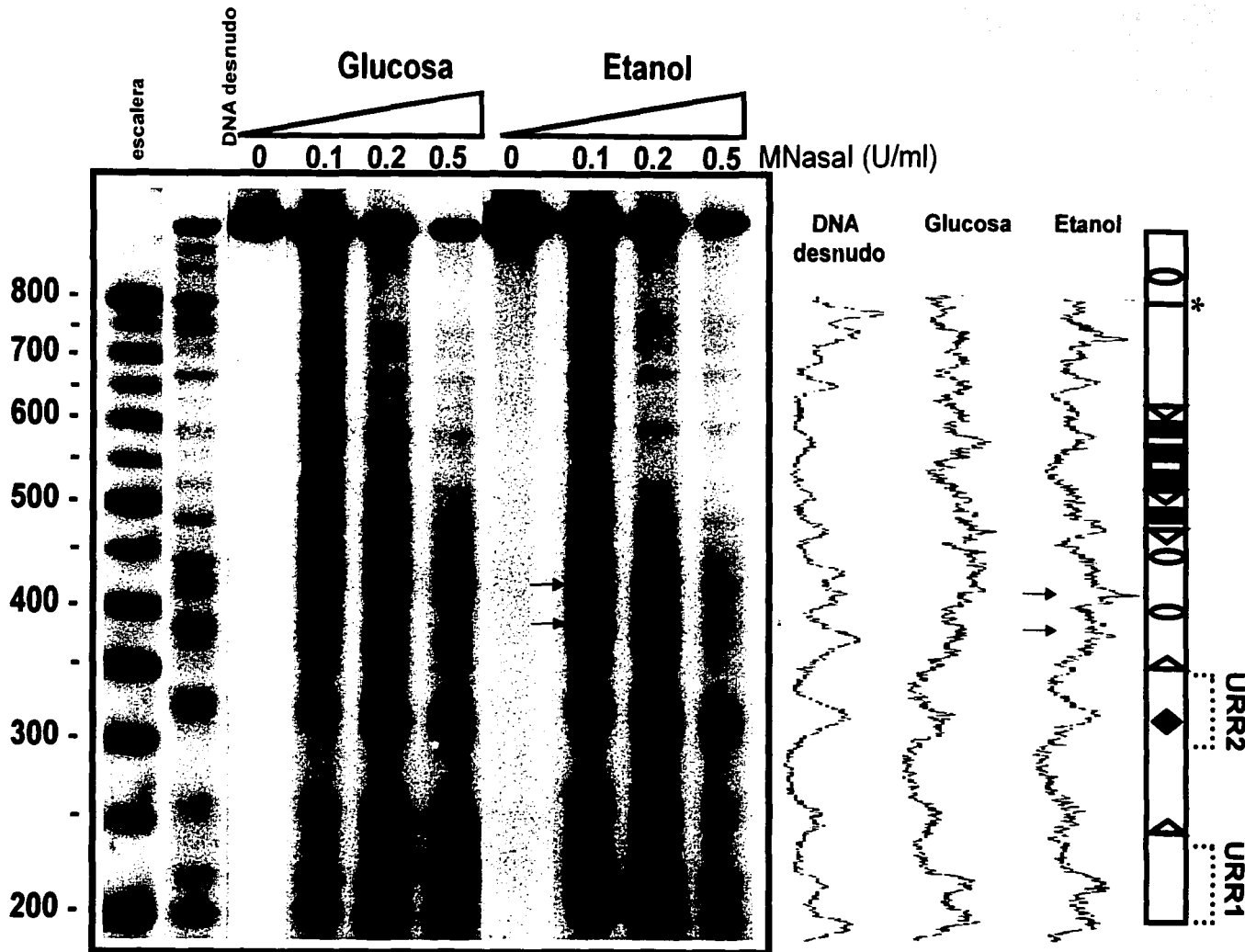


Figura 14. Análisis de la estructura de la cromatina del promotor de *GDH1* usando la sonda 5'. Se obtuvieron las muestras de células crecidas en medio mínimo con glucosa o etanol como fuentes de carbono. Las cromatinas se digirieron con concentraciones crecientes de MNasal y posteriormente con *HindIII*. Se muestran el control del DNA digerido *in vitro* (DNA desnudo) y el marcador de peso molecular (escalera). Las flechas denotan los sitios de cambio entre glucosa y etanol.

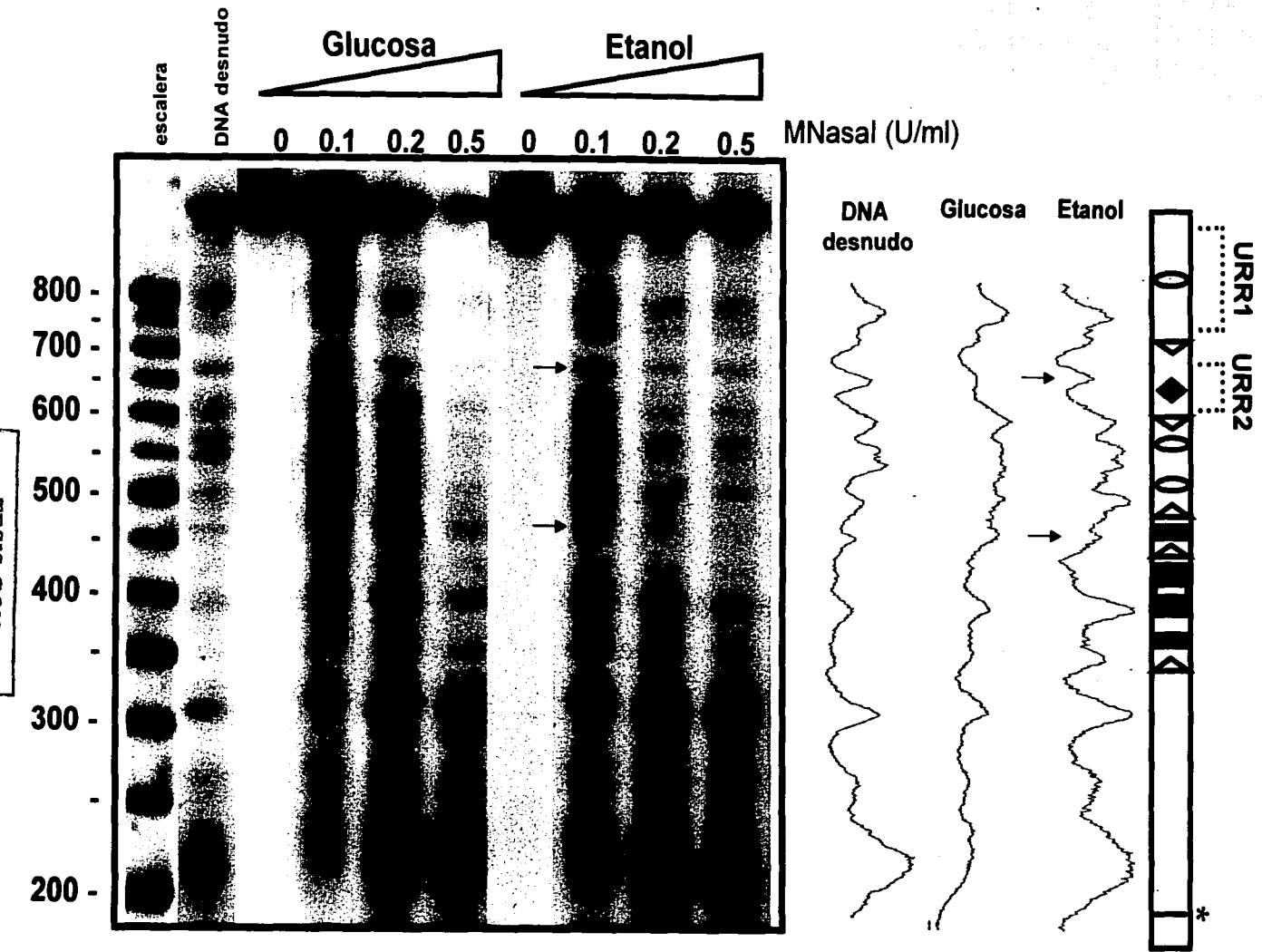


Figura 15. Análisis de la estructura de la cromatina del promotor de *GDH1* usando la sonda ATG. Se obtuvieron las muestras de células crecidas en medio mínimo con glucosa o etanol como fuentes de carbono. Las cromatinas se digirieron con concentraciones crecientes de MNasal y posteriormente con *HindIII*. Se muestran el control del DNA digerido *in vitro* (DNA desnudo) y el marcador de peso molecular (escalera). Las flechas denotan los sitios de cambio entre glucosa y etanol.

6. Panorama general de la regulación de los genes de la biosíntesis de glutamato.

En general, la expresión de los genes presentes en la vía de biosíntesis de un aminoácido se encuentra regulada por un factor de transcripción común. Aunque algunos activadores se comparten, la regulación particular de cada gen estará determinada por las interacciones específicas que se presenten entre los factores generales de una vía y los elementos específicos intrínsecos de cada promotor. Las vías de biosíntesis de glutamato son un buen ejemplo de ello, ya que Gln3p, un factor transcripcional que activa a los genes del metabolismo de nitrógeno, regula de manera diferencial la expresión de *GDH1*, *GDH3*, *GDH2*, *GLN1* y *GLT1* en las distintas condiciones de crecimiento (**Artículo 1**; Avendaño A., comunicación personal; Coschigano *et al.*, 1991; Hofman-Bag, 1999; Valenzuela *et al.*, 2000). Se ha demostrado, por ejemplo, que la expresión en glucosa tanto de *GDH1* como de *GDH2* depende de la presencia de Gln3p. Aunque ambos genes se inducen, en presencia de etanol sólo el aumento en la actividad transcripcional de *GDH1* depende de Gln3p (**Artículo 1**; Coschigano *et al.*, 1991).

El complejo HAP también juega un papel importante en el control de la utilización de amonio en presencia de etanol, aunque esta regulación se limita a las GDH's anabólicas (*GDH1* y *GDH3*) (**Artículo 1**; Avendaño A., comunicación personal), tomando en cuenta que la expresión de *GDH2* en etanol (Coschigano *et al.*, 1991) no se afecta por la ausencia de este complejo. El hecho de que un complejo regulador del metabolismo de carbono también regule a los genes *GDH1* y *GDH3* del metabolismo de nitrógeno resalta el papel crucial que juega la GDH en la conexión entre ambos aspectos del metabolismo. ¿Qué sentido podría tener que el complejo HAP regule la expresión de estos genes? El complejo HAP juega un papel crítico en el control de la regulación del metabolismo energético (Forsburg and Guarente, 1989; McNabb *et al.*, 1995). Bajo estas condiciones, la actividad del ciclo TCA se requiere no solo para la producción de energía sino también para la síntesis de hemo y aminoácidos, incluyendo el glutamato. Por ello se ha propuesto que el complejo HAP ejerce un control general sobre la actividad del ciclo TCA, así como en la síntesis de sus productos derivados (hemo, glutamato, etc) (Dang *et al.*, 1996).

El estudio conjunto de la regulación de la expresión de *GDH1* (este trabajo), *GDH3* (Avendaño A., en preparación) y el análisis de sus productos (DeLuna *et al.*, 2001) ha permitido definir que la expresión de los genes está regulada de manera diferencial y que la presencia relativa de estas proteínas en la célula está controlada por la fuente de carbono del medio de cultivo. Además, el estudio fisiológico de las mutantes sugiere que cada uno de los homólogos tiene una función fisiológica que el otro no puede suplir.

V. CONCLUSIONES

1.- La expresión de *GDH1* de *Saccharomyces cerevisiae* es regulada por la fuente de carbono y no está sujeta a NCR. Este gen es expresado en glucosa y su expresión se induce cuando se cultiva a las células en etanol como fuente de carbono. *GDH1* no está regulado por NCR ya que cualquier fuente de nitrógeno (rica o pobre) hace que la expresión disminuya; sin embargo, la represión por carbono es más fuerte que la ejercida por la fuente de nitrógeno.

2.- La regulación de *GDH1* está estrictamente controlada en presencia de etanol. Los factores transcripcionales que actúan para que *GDH1* se exprese en presencia de etanol permiten un control fino sobre la regulación de este gen y, por lo tanto, sobre la abundancia de los monómeros de Gdh1p presentes en estas condiciones.

3.- Los factores de transcripción Gln3p y Gcn4p regulan la expresión de *GDH1* en etanol. La inducción de la expresión de *GDH1* en etanol como fuente de carbono depende de la presencia de Gln3p; este factor transcripcional se había considerado como un regulador exclusivo del metabolismo de nitrógeno. Por su parte, Gcn4p regula la expresión de *GDH1* sólo en etanol y no en condiciones de privación de aminoácidos. Estos datos muestran que los factores de transcripción pueden responder a una gama de señales y que es necesario modificar el concepto de ciertos reguladores transcripcionales como exclusivos de alguna parte del metabolismo.

4.- Los complejos remodeladores de la cromatina son necesarios para la expresión de *GDH1*. Aunque la estructura de la cromatina es la misma en glucosa que en etanol, tanto el complejo SWI/SNF como SAGA participan en la activación transcripcional de *GDH1*. El complejo SAGA necesario para la expresión de *GDH1* en glucosa parece ser distinto del que se requiere en presencia de etanol.

VI. PERSPECTIVAS

Como se discutió en este trabajo, la expresión transcripcional de *GDH1* está regulada principalmente por la naturaleza de la fuente de carbono y en esta regulación participan factores transcripcionales del metabolismo de nitrógeno (Gln3p y Gcn4p) y del metabolismo de carbono (complejo HAP) así como los complejos remodeladores de la cromatina. Este estudio nos abrió un panorama fino de regulación de la expresión de *GDH1* en donde existen varias preguntas por contestar.

1) La transcripción de *GDH1* aumenta en presencia de etanol comparado con glucosa pero la actividad enzimática no se modifica, por lo que parecería existir un mecanismo de regulación postranscripcional. ¿Es el mensajero de *GDH1* menos estable o se traduce menos en etanol? A este respecto resulta primordial conocer el inicio de transcripción de *GDH1* en etanol y ver si se observan diferencias con respecto a los inicios de transcripción determinados en presencia de glucosa.

2) Gln3p se había considerado como un factor transcripcional que responde a diferentes fuentes de nitrógeno y no a la fuente de carbono; sin embargo, la expresión de *GDH1* tanto en glucosa como en etanol se encuentra regulada por este factor transcripcional. Aunque se ha demostrado que Gln3p se fosforila de manera Snf1p dependiente y se mueve hacia el núcleo en condiciones de falta de fuente de carbono en el medio, la regulación de que ejerce Gln3p sobre algunos de sus genes blanco parece ser distinta en etanol que en ausencia de fuente de carbono. Por lo tanto, sería importante determinar la localización intracelular de Gln3p en etanol y si esta localización depende de Snf1p. Además, el saber cuáles y cuántos son los sitios de fosforilación de Gln3p ayudaría a entender el mecanismo de acción de este factor sobre sus genes blanco.

3) ¿Cuál es el mecanismo que permite que Gcn4p solo regule la expresión de *GDH1* en presencia de etanol y no en otras condiciones de cultivo? Primero habría que determinar por medio de un retardo en gel que existe una interacción directa de Gcn4p sobre el promotor de *GDH1* cuando las células se cultivan en etanol. Si existe esta interacción, habría que estudiar la vía de transducción de señales que opera en el caso de etanol y que estaría regulando la actividad de Gcn4p y determinar si este factor transcripcional presenta o no alguna modificación postraduccional.

En este sentido, el reconocimiento de las secuencias blanco y la activación transcripcional de los genes, así como las interacciones que puedan establecer estos factores con otros elementos de regulación dependerán de las modificaciones que presenten en respuesta a cada una de las condiciones de crecimiento.

VII. RESULTADOS PUBLICADOS

El artículo que enseguida se presenta constituye una parte sustancial de los resultados discutidos en esta Tesis. En este trabajo se reporta el análisis de la regulación transcripcional de *GDH1*. Los resultados de este estudio indican que la expresión de *GDH1* se incrementa en etanol y depende de un mayor número de factores, por lo que el control transcripcional que se ejerce en estas condiciones es mas estricto que en presencia de glucosa. Este control tiene como resultado un mecanismo de regulación fino que coordina la utilización tanto de carbono como de nitrógeno.

ACADEMIC
PRESS

Biochemical and Biophysical Research Communications 293 (2002) 79–85

BBRC

www.academicpress.com

***GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth[☆]**

Lina Riego, Amaranta Avendaño, Alexander DeLuna, Ekaterina Rodríguez, and Alicia González*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 Mexico City, México

Received 12 March 2002

Abstract

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase isoenzymes encoded by *GDH1* and *GDH3* catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and α -ketoglutarate. In this work we analyzed *GDH1* transcriptional regulation, in order to deepen the studies in regard to its physiological role. Our results indicate that: (i) *GDH1* expression is strictly controlled in ethanol-grown cultures, constituting a fine-tuning mechanism that modulates the abundance of Gdh1p monomers under this condition, (ii) *GDH1* expression is controlled by transcriptional activators that have been considered as exclusive of either nitrogen (Gln3p and Gcn4p) or carbon metabolism (HAP complex), and (iii) chromatin remodeling complexes play a role in *GDH1* expression; *ADA2* and *ADA3* up-regulated *GDH1* expression on ethanol, while that on glucose was *ADA3*-dependent. *SPT3* and *SNF2* activated *GDH1* expression on either carbon source whereas *GCN5* played no role in any condition tested. The above described combinatorial control results in a refined mechanism that coordinates carbon and nitrogen utilizations. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: NADP-glutamate dehydrogenase; Glutamate biosynthesis; Carbon metabolism; Nitrogen metabolism

In most microorganisms, glutamate biosynthesis can be achieved through the action of two biosynthetic pathways. The first one is mediated by the NADP-glutamate dehydrogenase [16]. The second one depends on the concerted action of glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT), respectively, encoded by *GLN1* and *GLT1* [29]. In *Saccharomyces cerevisiae*, there is a third route for glutamate biosynthesis constituted by the *GDH3*-encoded isoenzyme [1]. Thus, in this microorganism, mutations inactivating *GDH1*, *GLT1*, and *GDH3* are needed to attain full glutamate auxotrophy [1].

The purification and characterization of *GDH1*- and *GDH3*-encoded enzymes and heteromers of these two, showed that these enzymes have distinct metabolic roles,

different allosteric properties, and rates of α -ketoglutarate utilization [10]. It was also shown that the expression of *GDH1*, *GDH3*, and *GDH2* (encoding the catabolic NAD-GDH) is coordinately regulated by the carbon source [6,10]. These findings indicate that glutamate biosynthesis and catabolism could provide a mechanism that modulates the utilization of α -ketoglutarate under fermentative and respiratory conditions without impairing the integrity of the connected energy-providing systems [10].

Since the GS/GOGAT pathway links α -ketoglutarate and glutamine metabolism, it has been suggested to play a regulatory link between carbon/energy and nitrogen metabolisms [12,30]. In *Escherichia coli* regulation of the GS/GOGAT pathway is crucial to control nitrogen metabolism and levels of α -ketoglutarate. Glutamine constitutes the signal that coordinately regulates carbon and nitrogen metabolisms [26]. Altogether, these observations indicate that a metabolic circuit that includes *GDH1*-, *GDH3*-, *GDH2*-, *GLN1*-, and *GLT1*-encoded enzymes plays a fundamental role in determining the

[☆] Abbreviations: GDH, glutamate dehydrogenase; GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; β -Gal, β -galactosidase; 3-AT, 3-aminotriazole.

* Corresponding author. Fax: +52-55-56225630.

E-mail address: amanjarr@fisiol.unam.mx (A. González).

intracellular levels of a variety of cofactors and energy yielding molecules [10,12,30]. Consequently, inquiries on the regulatory mechanisms determining the expression of this set of genes must consider this crucial role.

The *GDH1*-encoded NADP-GDH is the main catalyst for glutamate biosynthesis; its expression, mainly studied in glucose-grown cultures, is regulated by the HAP complex [8], *LEU3*- [17], and *GLN3*-encoded proteins [9]. Considering recent findings on the different roles that *GDH1*- and *GDH3*-encoded isoenzymes may play under fermentative and respiratory conditions [10], we undertook a comparative analysis of the transcriptional regulation of *GDH1* in either glucose- or ethanol-grown cells. The results herein described show that Gcn4p, Gln3p, and the HAP complex regulate *GDH1* expression in ethanol-grown cultures, and indicate that different chromatin remodeling and transcriptional complexes are involved in *GDH1* expression in glucose- and ethanol-grown cells.

Materials and methods

Strains. The following strains were transformed according to the method described by Ito et al. [18], with either pLIN1 (*GDH1-lacZ* 2 μ *LEU2*) or pLIN10 (*GDH1-lacZ* 2 μ *URA3*): CLA1, CLA-100, CLA-102 [31], CLA-302-0 [32], 27034b, 30078c [5], BWG1-7A, LWG1, JP40 [13], Y0000, Y04959 (Euroscarf Collection), PSY316, PSY316-ada2 [2], PSY316-gen5, PSY316-ada3 [19], FY2, FY293, and FY1656 [28]. Construction of strain CLA-300 (*MAT α ura3 leu2* p180 *GCN4-lacZ CEN4 ARS1 URA3* pRS315 *CEN6 ARS4 LEU2*) has been previously reported [32].

Growth conditions. Strains were routinely grown on minimal medium (MM), following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter sterilized glucose (2%) or ethanol (2%) was used as the carbon source and 0.2% (NH₄)₂SO₄ or 0.1% glutamate, glutamine, or proline was used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01%. Cells were incubated at 30 °C with shaking (250 rpm). For amino acid deprivation experiments, CLA1 and CLA-300 strains were treated as previously described [31]. Cultures were centrifuged and used for β -galactosidase (β -Gal) determinations.

Construction of *lacZ* fusions. Complementation of a *gdh1A* (MAR1) mutant [31] with a YCp50 genomic library led to select plasmid pCR11. Sequencing of the 8 kb fragment present in pCR11 confirmed that *GDH1* gene was carried by this plasmid. In order to construct a *lacZ* fusion with the *GDH1* promoter, we followed the procedure described by Dang et al. [8]. A 964 *HindIII* fragment including the *GDH1* promoter and 27 bp corresponding to the nine N-terminal codons of *GDH1* was obtained by digesting plasmid pCR11 (Fig. 1). This fragment was fused in frame to the *E. coli lacZ* of YEp363 (2 μ *LEU2*) or YEp353 (2 μ *URA3*) [25] generating pLIN1 and pLIN10, respectively. To obtain a 5' *GDH1* promoter deletion series, the pertinent forward deoxyoligonucleotides were designed based on the *GDH1* promoter sequence. Deoxyoligonucleotide R1 (5'-GCG CGA AGC TTG TTG AAA TTC TGG C-3') was used as the reverse deoxyoligonucleotide in order to amplify the six individual deletions. Qiagen purified pLIN1 DNA was used as a template for PCR amplification, carried out in a Stratagene Robocycler 40 with the following program: one denaturing cycle for 3 min at 95 °C, followed by five cycles of 1 min denaturation at 95 °C, 1 min annealing at 52 °C and 2 min extension at 72 °C and 25 cycles of 1 min denaturation at 95 °C, 1 min annealing at 68 °C and 2 min extension at 72 °C, finally 5 min extension at 72 °C. The entire

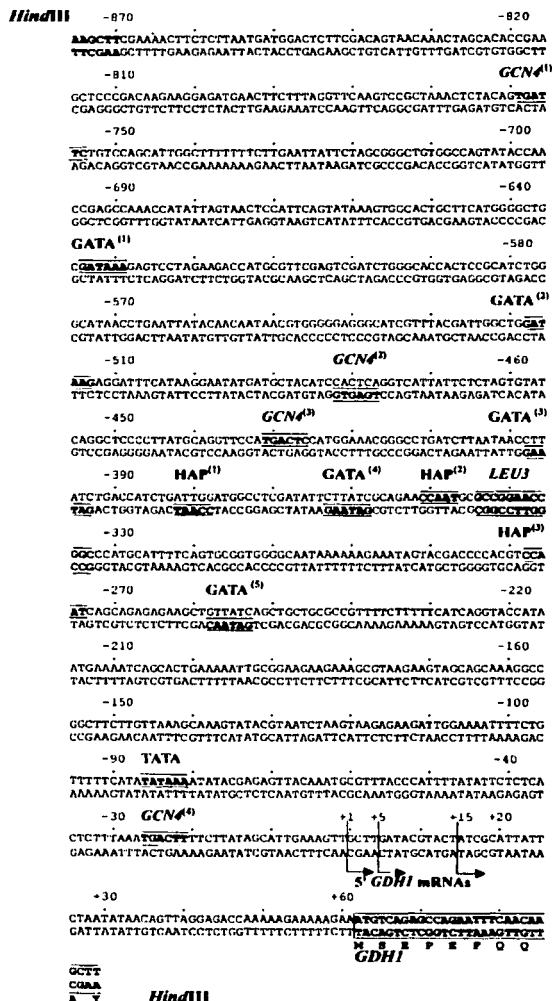


Fig. 1. *GDH1* promoter sequence. Putative binding sites for Gcn4p (*GCN4*), Gln3p, and Gat1p (*GATA*), HAP complex (*HAP*), and Leu3p (*LEU3*) are boxed and numbered starting from the most 5'. A putative TATA box as well as the three transcription initiation sites, at positions +1, +5, and +15 are indicated. *HindIII* sites were used to clone this fragment into YEp363 (2 μ *LEU2 lacZ*) and YEp353 (2 μ *URA3 lacZ*), generating plasmids pLIN1 and pLIN10, respectively.

family of PCR products was fused in-frame to the *E. coli lacZ* gene of YEp363 (2 μ *LEU2*) [25], generating six fusion plasmids, pLIN2 through pLIN7. All fusion plasmids were sequenced with an ABI PRISM Genetic Analyzer, using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit from Applied Biosystems.

Determination of β -Gal activities. Soluble extracts were prepared and β -Gal activities were determined as previously described [31]. One

unit of β -galactosidase corresponds to 1 μ mol of *o*-nitrophenol produced per minute. Protein was measured by the method of Lowry et al. [23], with bovine serum albumin as the standard.

Results and discussion

Regulation of *GDH1* expression by nitrogen and carbon sources

Determination of β -Gal activity in a wild type strain harboring plasmid pLIN1, containing the *GDH1* promoter fused to the complete β -Gal coding region, showed that in the presence of glucose as carbon source, *GDH1* transcriptional activity was similar in all the tested nitrogen sources (Fig. 2). However, when ethanol was used as carbon source, maximal transcriptional activity was found when ammonium was used as sole nitrogen source; on proline, glutamate, or glutamine, β -Gal activity decreased (Fig. 2). These results indicate that carbon repression is overimposed to that exerted by amino acids. The fact that *GDH1* transcriptional activity is repressed in the presence of amino acids is consistent with the role of *GDH1* as the main pathway involved in glutamate biosynthesis [1], which is the do-

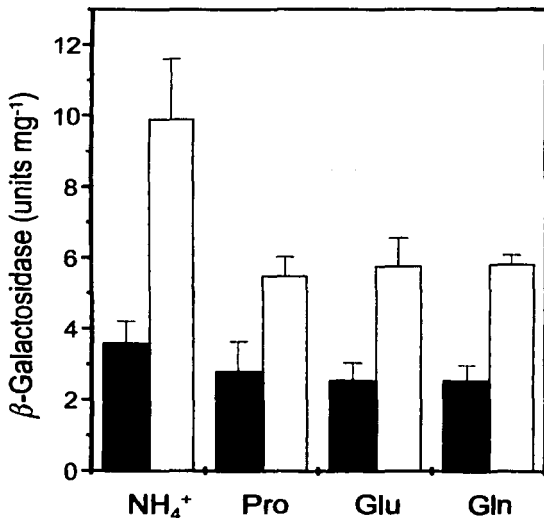


Fig. 2. Effect of different carbon and nitrogen sources on *GDH1* expression. β -Gal activity was determined in extracts obtained from the CLA1 wild type strain harvested during exponential growth on either glucose (black bars) or ethanol (white bars) as the carbon source, and ammonium sulfate (NH_4^+), proline (Pro), glutamate (Glu), or glutamine (Gln) as the nitrogen source. The reported β -Gal activities are averages of values obtained from three independent experiments \pm SD.

nor of the amino nitrogen utilized for the biosynthesis of most nitrogenous compounds.

In extracts of ethanol-grown cells, β -Gal activity fostered by *GDH1* (Fig. 2) was threefold higher, compared to that found on ammonium/glucose cultures. Northern analysis showed similar results, using the complete *GDH1* coding sequence as probe (data not shown). However, ethanol-increased expression did not correspond to an equivalent increment of NADP-GDH activity [8]. Extracts prepared from a *gdh3* null mutant grown on glucose or ethanol showed similar NADP-GDH activity (data not shown), indicating that the discrepancy between *GDH1* expression and NADP-GDH activity found in the wild type strain could not be attributed to a differential expression pattern of *GDH1* and *GDH3*. These results confirmed that ethanol-induced *GDH1* expression does not result in higher enzymatic activity and suggests the existence of a posttranscriptional regulatory mechanism, which remains to be identified. In this regard, it has been found that when *GDH1* or *GDH3* expression is fostered by the same promoter in glucose-grown cultures, Gdh1p activity is fivefold higher to that of Gdh3p, while in ethanol-grown cultures Gdh1p activity is only twofold higher compared to that of Gdh3p [10]. This supports the possibility that *GDH1* and *GDH3* transcripts could have a differential stability or translation rate in ethanol versus glucose. This would allow the organization of a NADP-GDH (Gdh1p/Gdh3p) isoenzyme with an appropriate rate of α -ketoglutarate utilization [10].

Effect of *Gcn4p*, *Gln3p*, and *IIAP* complexes on *GDH1* expression

Primer extension analysis performed with total RNA extracted from the CLA1 wild type strain harboring plasmid pLIN1 defined three transcription initiation sites (data not shown), which grossly corresponded to those previously determined [24] (Fig. 1).

Examination of the *GDH1* promoter sequence revealed a canonical *Gcn4p* binding site, *GCN4*⁽³⁾, and three noncanonical binding sites: *GCN4*^{(1),(2), and (4)} (Fig. 1), suggesting that *GDH1* expression could be directly controlled by *Gcn4p*. The impairment of *Gcn4p* had no effect on *GDH1* basal expression on glucose, while it clearly affected *GDH1* ethanol-induced expression (Fig. 3A). To address if *GDH1* expression was regulated during amino acid deprivation by the *Gcn4p*-mediated general amino acid control [15], β -Gal activity was determined in extracts from cultures of the wild type strain carrying pLIN1, grown in the presence or absence of 3-AT, a competitive inhibitor of His3p. In the presence of this analog, cells become deprived of histidine. β -Gal activity was slightly lower in extracts obtained from glucose-grown cultures treated with 3-AT, as compared to that determined in cells grown in the absence of this

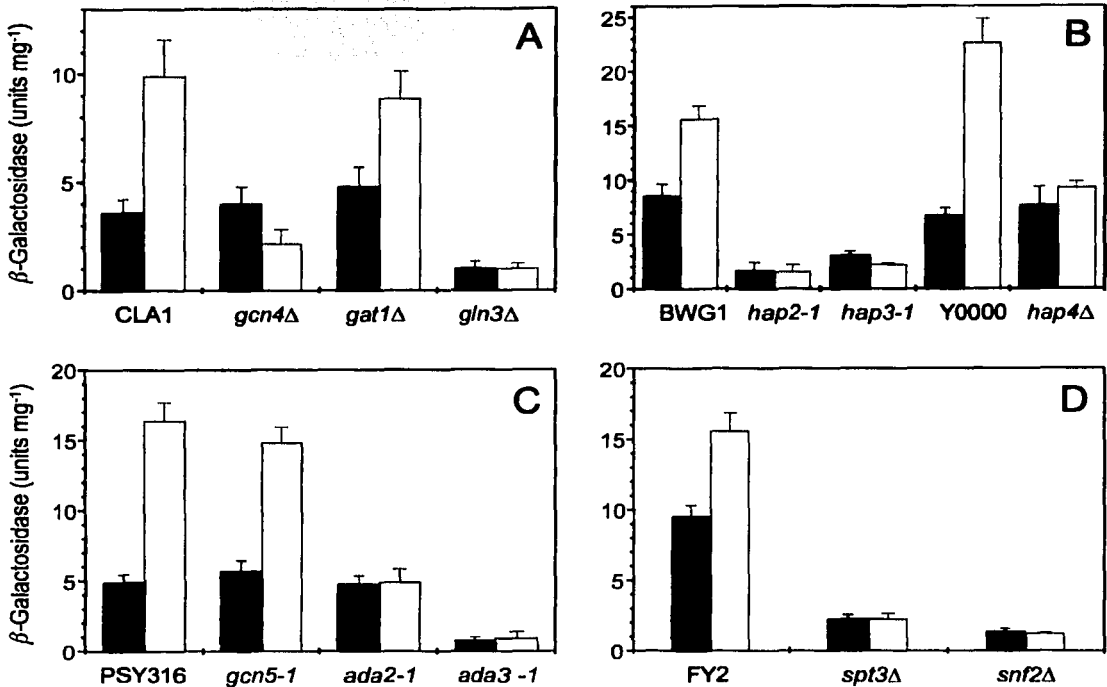


Fig. 3. *GDH1* expression in mutants altered in various transcriptional activators and chromatin remodeling factors. β -Gal activity was determined in extracts obtained from yeast cells harvested during exponential growth on either glucose (black bars) or ethanol (white bars) as carbon sources, and ammonium sulfate as the nitrogen source. (A) Parental strain CLA1 (*MAT α ura3 leu2*) and its isogenic *gcn4* Δ , *gat1* Δ , and *gln3* Δ derivatives transformed with pLIN1 (*GDH1-lacZ* 2 μ *LEU2*). (B) Parental strain BWG1-7A (*MAT α ade1 leu2 ura3 his4*) and its isogenic *hap2-1* and *hap3-1* derivatives transformed with pLIN1, together with the parental strain Y0000 (*MAT α his3A leu2A met15A ura3A*) and its isogenic *hap4* Δ derivative transformed with pLIN1. (C) Parental strain PSY316 (*MAT α ura3 lys2 leu2 ade2 his3A*) and its isogenic *gcn5-1*, *ada2-1*, and *ada3-1* derivatives transformed with pLIN1. (D) Parental FY2 (*MAT α ura3*) and its isogenic *spt3* Δ and *snf2* Δ derivatives transformed with pLIN10 (*GDH1-lacZ* 2 μ *URA3*). The reported β -Gal activities are averages of values obtained from three independent experiments \pm SD.

analog (2.64 versus 3.60 units mg^{-1}). These results indicate that *GDH1* is not regulated by the general amino acid control during amino acid deprivation on glucose. *GDH1* expression of ethanol-grown cells in the presence of 3-AT was similar to that found on ethanol alone (10.0 versus 9.90 units mg^{-1}), showing that *GDH1* transcription did not respond to histidine deprivation on ethanol. Accordingly, β -Gal activity fostered by the translational *GCN4-lacZ* gene fusion [14] in glucosc-grown cultures (0.039 units mg^{-1}) increased 10-fold in ethanol-grown cultures (0.370 units mg^{-1}), or after 3-AT treatment (0.460 units mg^{-1}), indicating that translation of *GCN4* mRNA is equally increased in the presence of either 3-AT or ethanol. These results demonstrate that Gcn4p plays a crucial role in *GDH1* regulation on ethanol-grown cultures, and are in agreement with previous observations showing that glucose starvation stimulates *GCN4* translational expression through a different

mechanism to that elicited by amino acid limitation [33]. The fact that *GCN4* translation is similarly increased in ethanol and 3-AT (0.37 versus 0.46 units mg^{-1}), but that *GDH1* expression is only induced by ethanol, possesses an interesting question in regard to the mechanisms determining the selective induction of *GDH1* by Gcn4p, which remains unsolved.

The *GDH1* promoter contains five GATAA sequences, four of which have been previously described [9] (Fig. 1). These sequences can constitute the *cis*-acting elements, UAS_{NTR}, acting as binding site(s) for two transcriptional activators, Gln3p and Gat1p/Nil1p, known to regulate the expression of nitrogen-modulated genes [4]. These sites could also have a role in down regulation of nitrogen-controlled gene expression exerted by the GATA family member Dal80p/Uga43p [5,7]. The lack of Dal80p/Uga43p (data not shown) or Gat1p/Nil1p (Fig. 3A), had no effect on *GDH1* expression in either

glucose- or ethanol-grown cells. The impairment of Gln3p diminished β -Gal activity in extracts obtained from glucose-grown cells. However, it had a more severe effect on *GDHI* expression in ethanol-grown cells, in which a 10-fold lower β -Gal activity was obtained compared to that found in the wild type strain (Fig. 3A). Recent findings obtained from the study of whole-genome transcription profiling, led to the proposition that proteins of the TOR signaling pathway communicate with transcription factors as part of a nutrient-response network [20]. It was considered that Gln3p was mainly involved in the nitrogen discrimination pathway, while Gat1p played this role in the carbon discrimination pathway. Our results show that Gln3p and Gat1p could have overlapping functions, since *GDHI* carbon-induced expression is Gln3p-dependent, while Gat1p plays no role in this regulation. To our knowledge, *GDHI* is the first example of a gene whose carbon regulation is *GLN3*-dependent. These findings strengthen the notion that ammonium assimilation constitutes the link between carbon and nitrogen regulations.

It has been previously shown that *GDHI* expression is glucose-repressed and highly induced in the presence of nonfermentable carbon sources [8]. Our results confirmed that impairment of either *HAP2* or *HAP3*, resulted in a decreased β -Gal activity fostered by *GDHI-lacZ* gene fusion in extracts obtained from glucose-grown cells, while the *hap4* null mutant showed no effect on β -Gal activity. However, impairment of either *HAP2*, *HAP3*, or *HAP4* diminished *GDHI*-dependent β -Gal activity in ethanol-grown cells (Fig. 3B). These results show that Hap4p is not involved in glucose-dependent regulation, but that it does play a role in *GDHI* expression in ethanol-grown cultures. Thus, in glucose-grown cells, the HAP complex operates in a Hap4p independent manner, while in ethanol the three subunits are involved in *GDHI* expression; supporting previous observations indicating that under respiratory metabolism, the α -ketoglutarate yielding enzymes are HAP-controlled [22]. The *GDHI*-encoded enzyme, being regulated by the HAP complex, could form part of a HAP-dependent network determining synthesis and utilization of α -ketoglutarate.

The above results show that *GDHI* transcription of yeast cells grown on glucose is regulated by Gln3p, Hap2p, and Hap3p; however, the lack of these effectors has a more dramatic effect on ethanol-grown cells. Furthermore, results show that Gcn4p- and Hap4p-mediated regulation is only observed in ethanol-grown yeast cells.

Regulation of *GDHI* expression by chromatin remodeling factors

Two distinct Gcn5p-dependent histone acetyltransferase complexes [11]: the SAGA (Spt-ADA-Gcn5-acetyltransferase) and ADA (ADA-Gcn5-acetyltrans-

ferase), and the Swi-Snf complex [27] have been shown to remodel chromatin in vivo and to stimulate the binding of activators and basal factors to nucleosomal DNA.

To learn if the SAGA, ADA, or the Swi-Snf complexes were involved in *GDHI* expression, β -Gal activity was determined in a wild type strain and in *gcn5*, *ada2*, *ada3*, *spt3*, and *snf2* mutants transformed with either plasmid pLIN1 or pLIN10. The lack of Spt3p or Ada3p affected *GDHI* expression in extracts obtained from either glucose or ethanol cultures (Figs. 3C and D), showing that the SAGA complex participates in *GDHI* transcriptional regulation. Lack of Ada2p affected ethanol-induced *GDHI* expression, indicating that depending on the carbon source, different members of the SAGA remodeling complex regulate *GDHI* expression. A *gcn5* null mutation had no effect on *GDHI* expression on either glucose or ethanol. Even though the SAGA complex includes Gcn5p, apparently not all SAGA-dependent promoters are affected by Gcn5p-dependent acetylation [21]. In this regard, it has been recently shown that in strains lacking *GCN5*, *GAL1* transcription occurred at wild type levels [3]. These data indicate that individual SAGA components are differentially required for the transcription of a given gene. Our results also suggest that either *GDHI* expression is not regulated by acetylation or that the TAF₁₁₄₅ histone acetylase present in the TFIID transcription complex could play this role [21].

β -Gal activity was several-fold lower in the *snf2* mutant compared to that found in the wild type strain in extracts from both glucose- and ethanol-grown cells (Fig. 3D). These results show that the Swi-Snf complex is readily involved in *GDHI* transcriptional regulation.

Deletion analysis of *GDHI* promoter

A collection of 5' deletions of increasing size affecting the *GDHI* promoter was constructed as described in Materials and methods. When a wild type strain harboring pLIN2, which lacks the most 5' 226 bp of the *GDHI* promoter, was grown on ammonium-glucose β -Gal activity was higher than that obtained with the wild type strain carrying plasmid pLIN1 (Fig. 4). This increment was more evident in yeasts grown on ammonium with ethanol as carbon source, a condition in which β -Gal activity was 2.2-fold higher than that found in the wild type strain carrying pLIN1. These results suggest that a target for negative regulation (upstream repressing region I [URR1]) was missing in pLIN2. Loss of the neighboring 60 bp (pLIN3) resulted in a twofold decrease in β -Gal activity on both glucose and ethanol compared to that fostered by pLIN2, suggesting that the GATA⁽¹⁾ box lost in pLIN3 may play a role in *GDHI* expression. The loss of a second URR localized between -588 and -528 (pLIN4), doubled β -Gal activity (Fig. 4). Enzymatic activity fostered by pLIN5 was decreased

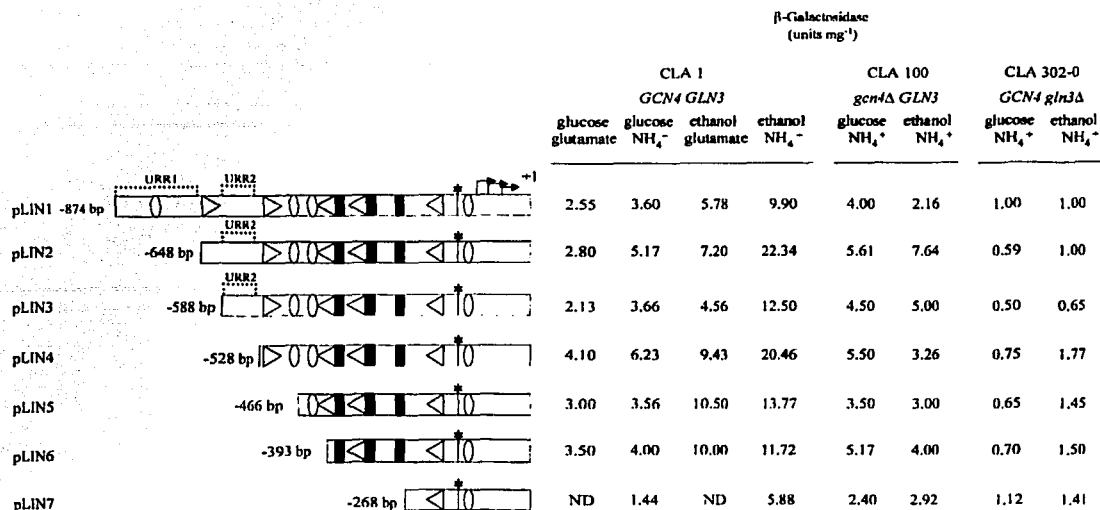


Fig. 4. β -Gal specific activities of 5' deletions of the *GDH1* promoter. The *GDH1* full promoter and 5' deletions were cloned into the 2 μ *LEU2 lacZ* vector YEp363, generating plasmids pLIN1 through pLIN7. These plasmids were transformed into the wild type strain CLA1 and its isogenic derivatives CLA100 (*gen4Δ*) and CLA101 (*gln3Δ*). The 5' region carried in each plasmid is indicated in rows pLIN1 to pLIN7. Activity was determined in extracts obtained from cells grown on either ammonium sulfate or glutamate as nitrogen sources, with glucose or ethanol as carbon sources. The reported β -Gal activities are averages of values obtained from three independent experiments; variation was always $\leq 15\%$. ND, not determined. Diagrams depict putative binding sites for Gen4p (○), Gln3p (△, ▽), and HAP complex (■), putative TATA box (*), transcription initiation sites (→), and putative URRs (.....).

twofold compared to that sustained by pLIN4, suggesting that the GATA⁽²⁾ and the GCN4⁽²⁾ *cis*-acting sites could also play a role in *GDH1* transcriptional activation. A further 5' extended deletion construct (pLIN7) fostered β -Gal activity which was half-fold lower to that found with the full promoter (pLIN1), suggesting that the GATA⁽⁵⁾ and GCN4⁽⁴⁾ sites could be determining *GDH1* expression from this plasmid. Strains harboring constructs from pLIN1 through pLIN4 showed lowest β -Gal activity in the presence of glucose and glutamate, increasing gradually as nitrogen and carbon repressions were relieved, the highest expression being attained on ethanol plus ammonium. These results show that carbon repression is stronger than that exerted by the nitrogen source. Most interesting is the fact that strains harboring plasmids pLIN5 and pLIN6 failed to show repression by glutamate (Fig. 4). However, sequences that could participate in glutamate repression were not identified and further analysis will be needed to determine these *cis*-acting elements. The net increase in β -Gal activity in ethanol-grown cultures was evident in all deletion constructs, suggesting that this effect could be dependent on the GATA⁽⁵⁾ and GCN4⁽⁴⁾ *cis* elements or in a so far unidentified element which was retained in pLIN7 construct.

Null *gen4* and *gln3* mutants were transformed with pLIN1 through pLIN7, and β -Gal activity was deter-

mined. As Fig. 4 shows, results obtained for β -Gal expression confirmed that Gen4p has a role in *GDH1* expression in ethanol-grown cultures, and that although Gln3p affects *GDH1* expression on either glucose or ethanol-grown cultures, its effect is more pronounced in ethanol.

Concluding remarks

Results presented throughout this paper indicate that *GDH1* expression in ethanol is highly regulated, and are in agreement with the role that has been previously assigned to the NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes [10]. Gdh1p, Gdh3p, and the heteromeric enzyme present in ethanol-grown cultures show different allosteric properties and rates of α -ketoglutarate utilization. This constitutes a pacemaker mechanism in which the relative abundances of Gdh1p and Gdh3p monomers result in a balanced utilization of α -ketoglutarate under respiratory conditions [10]. It is tempting to speculate that the stringent regulation of *GDH1* expression in ethanol-grown cultures determines the amount of Gdh1p present in this condition, and consequently the overall Gdh1p/Gdh3p ratio that governs the rate of α -ketoglutarate utilization for glutamate biosynthesis.

Acknowledgments

We acknowledge Cristina Aranda for skillful technical assistance, Lourdes Valenzuela for helpful discussions, to the Molecular Biology Unit of the Instituto de Fisiología Celular for the synthesis of deoxyoligonucleotides, and Fernando Bastarrachea for his critical review of the manuscript. We also thank Allan Hinnebusch for kindly providing plasmid p180, and Bruno Andre, Mark Jhonston and Leonard Guarente, for providing yeast strains. The work was supported in part by the DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México (IN212898), and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (31774-N). L.R. received a fellowship and two grants (PAEP-201371 and 102358) from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

References

- [1] A. Avendaño, A. DeLuna, H. Olivera, L. Valenzuela, A. González, *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 5594–5597.
- [2] S.L. Berger, B. Piña, N. Silverman, G.A. Marcus, J. Agapite, J.L. Regier, S.J. Triezenberg, L. Guarente, Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains, *Cell* 70 (1992) 251–265.
- [3] S.R. Bhaumik, M.R. Green, SAGA is an essential *in vivo* target of the yeast acidic activator Gal4p, *Genes Dev.* 15 (2001) 1935–1945.
- [4] D. Blinder, B. Magasanik, Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 4190–4193.
- [5] D. Coornaert, S. Vissers, B. Andre, M. Grenson, The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper, *Curr. Genet.* 21 (1992) 301–307.
- [6] P.W. Coschigano, S.M. Miller, B. Magasanik, Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4455–4465.
- [7] T.S. Cunningham, T.G. Cooper, The *Saccharomyces cerevisiae* *DAL80* repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URS_{GATA}), *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5851–5861.
- [8] V.D. Dang, C. Bohn, M. Bolotin-Fukuhara, B. Daigan-Fornier, The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 1842–1849.
- [9] J.R. Daugherty, R. Rai, H.M.E. Berry, T.G. Cooper, Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 64–73.
- [10] A. DeLuna, A. Avendaño, L. Riego, A. González, NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties and physiological roles, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43775–43783.
- [11] A. Eberharter, D.E. Sterner, D. Schieltz, A. Hassan, J.R. Yates 3rd, S.L. Berger, J.L. Workman, The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 6621–6631.
- [12] B. Flores-Samaniego, H. Olivera, A. González, Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 7705–7706.
- [13] S.L. Forsburg, L. Guarente, Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer, *Genes Dev.* 8 (1989) 1166–1178.
- [14] A.G. Hinnebusch, A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 5 (1985) 2349–2360.
- [15] A.G. Hinnebusch, Mechanism of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiol. Rev.* 52 (1988) 248–273.
- [16] H. Holzer, S. Schneider, Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe, *Biochem. Z.* 329 (1957) 361–367.
- [17] Y. Hu, T.G. Cooper, G.B. Kohlhaw, The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 52–57.
- [18] H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 163–168.
- [19] A.J. Koleske, S. Buratowski, M. Nonet, R.A. Young, A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II, CTD and TFIID, *Cell* 69 (1992) 883–894.
- [20] F.G. Kuruvilla, A.F. Shamji, S.L. Schreiber, Carbon- and nitrogen-quality signaling to translation are mediated by distinct GATA type transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 7283–7288.
- [21] T.H. Lee, H.C. Causton, F.C.P. Holsteg, W. Shen, N. Hannett, E.G. Jemmings, F. Winston, M.R. Green, R.A. Young, Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription, *Nature* 405 (2000) 701–704.
- [22] Z. Liu, R. Butow, A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 6720–6728.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [24] W.S. Moye, N. Amuro, J.K.M. Rao, H. Zalkin, Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8502–8508.
- [25] A.M. Myers, A. Tzagaloff, D.M. Kinney, C.J. Lusty, Yeast shuttle integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions, *Gene* 45 (1986) 299–310.
- [26] A.J. Ninfa, P. Jiang, M.R. Atkinson, J.A. Peliska, Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*, *Curr. Top. Cell Regul.* 36 (2000) 31–75.
- [27] C.L. Peterson, J.W. Tamkun, The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine?, *TIBS* 20 (1995) 143–146.
- [28] D.E. Sterner, P.A. Grant, S.M. Roberts, J.L. Duggan, R. Belotserkovskaya, L.A. Pacella, F. Winston, J.L. Workman, S.L. Berger, Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation and TATA-binding protein interaction, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 86–98.
- [29] D.W. Tempest, J.L. Meers, C.M. Brown, Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route, *Biochem. J.* 117 (1970) 405–407.
- [30] N.A.W. Van Riel, M.L.F. Giuseppin, E.G. TerSchure, C.T. Verrips, A structured minimal parameter model of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the prediction of the behaviour of mutants, *J. Theor. Biol.* 191 (1998) 397–414.
- [31] L. Valenzuela, P. Ballario, C. Aranda, P. Filetici, A. González, Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3533–3540.
- [32] L. Valenzuela, C. Aranda, A. González, TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 2331–2334.
- [33] R. Yang, S.A. Wek, R.C. Wek, Glucose limitation induces *GCN4* translation by activation of Gen2 protein kinase, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 2706–2717.

VIII. REFERENCIAS

Avendaño A., DeLuna A., Olivera H., Valenzuela L., and González A. (1997) *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:5594-5597.

Balasubramanian R., Pray-Grant M.G., Selleck W., Grant P.A., and Tan S. (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **277**:7989-7995.

Beck T., and Hall M. (1999) The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**:689-692.

Bertram P.G., Choi J.H., Carvalho J., Chan T.F., Ai W., and Zheng X.F.S. (2002) Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Mol. Cell. Biol.* **22**:1246-1252.

Blinder D., and Magasanik B. (1995) Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J. Bacteriol.* **177**:4190-4193.

Braunstein M., Rose A.B., Holmes S.G., Allis C.D., and Broach J.R. (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**:592-604.

Brown C.E., Howe L., Sousa K., Alley S.C., Carrozza M.J., Tan S., and Workman J.L. (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292**:2333-2337.

Bysani N., Daugherty J.R., and Cooper T.G. (1991) Saturation mutagenesis of the UAS_{NTR} (GATAA) responsible for nitrogen catabolite-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**:4977-4982.

- Cardenas M.E., Cutler N.S., Lorenz M.C., Di Como C.J., and Heitman J.** (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* **13**: 3271-3279.
- Coffman J.A., Rai R., Cunningham T., Svetlov V., and Cooper T.G.** (1996) Gat1p, a GATA-family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:847-858.
- Coffman J.A., and Cooper T.G.** (1997) Nitrogen GATA factors participate in transcriptional regulation of vacuolar protease genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:5609-5613.
- Coffman J.A., Rai R., Loprete D. M., Cunningham T., Svetlov V., and Cooper T.G.** (1997) Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:3416-3429.
- Cogoni C., Valenzuela L., González-Halphen D., Olivera H., Macino G., Ballario P., and González A.** (1995) *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* **177**:792-798.
- Coornaert D., Vissers S., Andre B., and Grenson M.** (1992) The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. *Curr. Genet.* **21**:301-307.
- Cooper T.G.** (1982) Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Strathern, J.N., E.W., Jones y J.R. Broach, Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. pp. 39-99.
- Cooper T.G., Rai R., and Yoo H.S.** (1989) Requirement of upstream activation sequences for nitrogen catabolite repression of the allantoin system genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**:5440-5444.

Cooper T.G., and Sumrada R.A. (1983) What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*? *J. Bacteriol.* **155**:623-627.

Coschigano P. W., Miller S. M., and Magasanik B. (1991) Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4455-4465.

Courchesne W.E., and Magasanik B. (1988) Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J. Bacteriol.* **170**:708-713.

Cunningham T.S., and Cooper T.G. (1991) Expression of the *DAL80* gene, whose product is homologous to GATA factors and is a negative regulator of multiple catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolic repression. *Mol. Cell. Biol.* **11**:6205-6215.

Cunningham T.S., and Cooper T.G. (1993) The *Saccharomyces cerevisiae DAL80* repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (*URS_{GATA}*). *J. Bacteriol.* **175**:5851-5861.

Cunningham T.S., Dorrington R.A., and Cooper T.G. (1994) The *UGA4 UASNTR* site required for *GLN3*-dependent transcriptional activation also mediates *DAL80*-responsive regulation and *DAL80* protein binding in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**:4718-4725.

Cunningham T.S., Svetlov V.V., Rai R., Smart W., and Cooper T.G. (1996) *Gln3p* is capable of binding to *UAS(NTR)* elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**:3470-3479.

Daignan-Fornier B., Valens M., Lemire B. D., and Bolotin-Fukuhara M. (1994) Structure and regulation of *SDH3* the yeast gene encoding the cytochrome *b₅₆₀* subunit of respiratory complex II. *J. Biol. Chem.* **269**: 15469-15472.

Dang V.D., Bohn C., Bolotin-Fukuhara M., and Daignan-Fornier B. (1996) The *CCAAT* box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining

- a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J. Bacteriol.* **178**:1842-1849.
- Daugherty J.R., Rai R., El Berry H.M., and Cooper T.G.** (1993) Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the GLN3 and DAL80 proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**:64-73.
- DeLuna A., Avendaño A., Riego L., and González A.** (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:43775-43783.
- DeVit M.J., Waddle J.A., and Johnston M.** (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell* **8**:1603-1618.
- Dickinson J.R.** (1999) Carbon metabolism. *In*: The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson J.R., and Schweizer M., eds.) Taylor and Francis, London, pp.23-56.
- Eberharter A., Sterner D.E., Schieltz D., Hassan A., Yates III J.R., Berger S.L., and Workman J.L.** (1999) The ADA Complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:6621-6631.
- Folch J.L., Antaramián A., Rodríguez L., Bravo A., Brunner A., and González A.** (1989) Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* **171**:6776-6781.
- Forsburg S.L., and Guarente L.** (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **3**:1166-1178.
- Friden P.** (1988) *LEU3* of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino-acid biosynthesis by binding to a common dodecanucleotide core sequence. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2690-2697.
- Gancedo J.M.** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:334-361.

- Grant P.A., Eberharter S., John S., Cook R.G., Turner B.M., and Workman J.L.** (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* **274**:5895-5900.
- Guarente L.** (1995) Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem Sci.* **20**:517-21.
- Hahn S., and Guarente L.** (1988) Yeast HAP2 and HAP3: transcriptional activators in a heteromeric complex. *Science* **240**:317-321.
- Hardwick J.S., Kuruvilla F.G., Tong J.K., Shamji A.F., and Schreiber S.L.** (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 14866-14870.
- Hebbes T.R., Clayton A.I., Thorne A.W., and Crane-Robinson C.** (1994) Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DnaseI sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**:1823-1830.
- Helling R.B.** (1994) Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* **176**:4664-4668.
- Hill D.E., Hope I.A., Macke J.P., and Struhl K.** (1986) Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: Requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* **234**:451-457.
- Hinnebusch, A.** (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *S. cerevisiae*. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Gene expression vol. II (Jones E.W., Pringle J. R. and Broach J.R., Eds.) pp. 319-415. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Hinnebusch, A.** (1997) Translational regulation of yeast *GCN4*. A window of factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**:21661-21664.

Holzer H., and Schneider S. (1975) Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Bioche. Z.* **329**:361-367.

Hope I.A., and Struhl K. (1986) functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* **46**:885-894.

Hu Y., Cooper T.G., and Koholaw G.B. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol. Cell. Biol.* **15**:52-57.

Jiang Y., and Broach J.R. (1999) Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* **18**:2782-2792.

Kuruville F. G., Shamji A. F., and Schreiber S. (2001) Carbon- and nitrogen-quality signaling to translation are mediated by distinct GATA-type transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:7283-7288.

Laurent B.C., Treich I., and Carlson M. (1993) The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**:583-591.

Lee T.I., Causton H.C., Holstege F.C., Shen W.C., Hannett N., Jennings E.G., Winston F., Green M.R., and Young R.A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* **405**:701-704.

Li Q., Herrler M., Landsberger N., Kaludov N., Ogryzko V.V., Nakatani Y., and Wolffe A.P. (1998) *Xenopus* NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the *Xenopus hsp70* promoter in vivo. *EMBO J.* **21**:6300-6315.

Lomnitz A., Calderón J., Hernández G., and Mora J. (1987) Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:2333-2340.

Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., and Richmond T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**:251-260.

- Lutfiyya L.L., Vishwanath R.I., DeRisi J., DeVit M.J., Brown P.O., and Johnston M.** (1998) Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**:1377-1391.
- Lutfiyya L.L., and Johnston M.** (1996) Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell. Biol.* **16**:4790-4797.
- Magasanik B.** (1992) Regulation of nitrogen utilization. *In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* (Jones, E.W., J.R. Pringle y J.R. Broach, Eds.) pp. 283-317. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- McNabb D.S., Xing Y., and Guarente L.** (1995) Cloning of yeast *HAP5*: a novel subunit of a heteromeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**:47-58.
- Minehart P.L., and Magasanik B.** (1991) Sequence and expression of *GLN3*, a positive regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **11**:6216-6228.
- Mitchell A.P., and Magasanik B.** (1983) Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**:12054-12062.
- Moye W.S., Amuro N., Rao M.J.K., and Zalkin H.** (1985) Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **260**:8502-8508.
- Nagasu T., and Hall B.D.** (1985) Nucleotide sequence of the *GDH* gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **37**:247-253.
- Olesen J., Hahn S., and Guarente L.** (1987) Yeast *HAP2* and *HAP3* activators both bind to the *CYC1* upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* **51**:953-961.
- Orphanides G., and Reinberg D.** (2000) RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* **407**:471-475.

Peterson C.L., and Logie C. (2000) Recruitment of chromatin remodeling machines. *J. Cell. Biochem.* **78**:179-185.

Pinkman J.L., and Guarente L. (1985) Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulation of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3410-3416.

Rai R., Daugherty J.R., and Cooper T.G. (1995) UAS_{NTR} functioning in combination with other UAS elements underlies exceptional patterns of nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **11**:247-260.

Raught B., Gingras A.C., and Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:7037-7044.

Reitzer L.J., and Magasanik B. (1987) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagines, L-alanine, and D-alanine. *In: Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* (Neidhardt J.L., Ingraham K.B., Low B., Magasanik B., Schaechter M., and Umberger H.E.) pp.313-330. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Roon R. J., and Even H. L. (1973) Regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **116**:367-372.

Roon R.J., Even H.L., and Larrimore F. (1974) Glutamate synthase: Properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **118**:89-95.

Rose M.D., Novick P., Thomas J.H., Botstein D., and Fink G.R. (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* **60**:237-243.

Roth S.Y., Denu J.M., and Allis C.D. (2001) Histone acetyl-transferase complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:81-120.

- Roussou I., Thireos G., and Hauge B.M.** (1988) Transcriptional-translational regulatory circuit in *Saccharomyces cerevisiae* which involves the GCN4 transcriptional activator and the GCN2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **8**:2132-2139.
- Schmelzle T., and Hall M.N.** (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**:253-262.
- Senior P.J.** (1975) Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* **123**:407-418.
- Shaw S.P., Wingfield J., Dorsey M.J., and Ma J.** (1996) Identifying a species-specific region of yeast TFIIIB *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3651-7.
- Shaw S.P., Wingfield J., Dorsey M.J., and Ma J.** (1996) Identifying a species-specific region of yeast TFIIIB *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3651-3657.
- Smith F.C., Davies S.P., Wilson W.A., Carling D., and Hardie D.G.** (1999) The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p *in vitro* at four sites within or near the regulatory domain 1. *FEBS Lett.* **453**:219-223.
- Soutoglou E., and Talianidis I.** (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* **295**:1901-1904
- Stanbrough M., Rowen D.W., and Magasanik B.** (1995) Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:9450-9454.
- Sterner D.E., Grant P.A., Roberts S.M., Duggan L.J., Belotserkovskaya R., Pacella L.A., Winston F., Workman J.L., and Berger S.L.** (1999) Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell. Biol.* **19**:86-98.

- Sudarsanam P., Iyer V.R., Brown P.O., and Winston F.** (2000) Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**:3364-3369.
- Tempest D.W., Meers J.L., and Brown C.M.** (1970) Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by hitherto unknown route. *Biochem. J.* **117**:405-507.
- Treitel M.A., and Carlson M.** (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3132-3136.
- Utlely R.T., Ikeda K., Grant P.A., Côté J., Steger D.J., Eberharter A., John S., and Workman J.L.** (1998) Transcriptional activators target histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**:498-502.
- Vignali M., Hassan A.H., Neely K.E., and Workman J.** (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**:1899-1910.
- Wek R.C., Jackson B.M., and Hinnebusch A.G.** (1989) Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4579-4583.
- Wek S.A., Zhu S., and Wek R.C.** (1995) The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2a protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4497-4506.
- Wiame J.M., Grenson M., and Arst Jr H.N.** (1985) Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **26**:1-88.
- Wright R.M., and Poyton R.O.** (1990) Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, *COX6* and *CYC1*, from glucose repression requires *SNF1* and *SSN6* gene products. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1297-1300.

Yang R., Wek S.A., and Wek R.C. (2000) Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2706-2717.

IX. APÉNDICE I-PROTOCOLOS

1. INICIO DE TRANSCRIPCIÓN POR EL MÉTODO DE "PRIMER EXTENSION"

Antes de comenzar, asegurarse de tener la muestra del RNA total de la cepa en las condiciones deseadas.

Paso 1: Fosforilación del oligonucleótido

1.- Mezclar:

- 1μl buffer 10X de la T4 polinucleótido cinasa
- 50ng oligonucleótido
- 1μl (γ - 32 P) ATP de alta actividad específica (>5000 Ci/mmol; 10mCi/ml)
- 2.2μl H₂O
- 0.8μl T4 polinucleótido cinasa
- Total de la reacción 10μl

2.- Incubar a 37°C por 1 hora.

3.- Inactivar la enzima 10 minutos a 68°C.

Paso 2: Apareamiento del oligonucleótido

1.- Mezclar:

- 5μg RNA total
- 1.76μl NaCl 2.5M
- 0.66μl TrisHCl 1M
- 2μl Oligonucleótido fosforilado
- Llevar a 24.42μl con H₂O+DEPC

2.- Incubar a 95°C por 3 min.

3.- Apagar el baño y esperar que llegue a 42 °C

4.- Centrifugar

Paso 3: Reacción de transcriptasa reversa

1.- Primero hacer la mezcla de RT, para cada reacción poner:

0.17µl Inhibidor de RNasa

7.2µl Buffer 5X de la transcriptasa reversa

3.7µl DTT 10mM

1.0µl dNTP's 40mM

Llevar a 12.4µl con H₂O+DEPC

2.- Agregarle a la muestra los 12.4µl de la mezcla de RT recién preparada.

3.- Agregar 0.5µl de RT a cada tubo.

4.- Incubar a 42°C por una hora.

Paso 4: Precipitación

1.- Después de la reacción de RT, precipitar la muestra con 10µl de AcNa 10M y 100µl de ETOH al 100%.

2.- Incubar a -20 °C mínimo una hora.

3.- Centrifugar 10-15 min, eliminar el etanol.

4.- Lavar con 100µl de ETOH al 70%.

5.- Centrifugar 3-5 min, eliminar el etanol.

6.- Repetir desde el paso 4 dos veces más.

7.- Secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min.

8.- Resuspender en 6µl de H₂O y después adicionar 4µl de solución stop.

9.- Cargar las muestras en un gel de secuencia.

2. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEVADURA

1. Cuando los cultivos alcancen la D.O. deseada, recuperar las células centrifugando 5 min a 3,000rpm. Hacer 2 lavados con H₂O+DEPC fría.
2. Resuspender las células en 1ml de H₂O+DEPC fría. Transferir a eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar 2 min. a 14,000rpm. Quitar el sobrenadante con tip.
3. Resuspender las células en 470µl de **BUFFER DE LISIS**. Mezclar con el tip.

BUFFER DE LISIS

	Tomar del stock para 10 ml
100mM Acetato de Na 0.1M pH 5	0.33ml Acetato de Na 3M pH 5
5mM MgCl ₂	0.5 ml MgCl ₂ 100mM
	9.17ml H ₂ O

4. Agregar rápidamente 25µl de SDS al 20% y 5µl de DEPC. Mezclar con el tip.
5. Agregar 500µl de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Dar vortex 1 min.

Para 15 ml

Fenol	7.5 ml
Cloroformo	7.2 ml
Alcohol Isoamílico	0.3 ml

6. Poner los tubos destapados 2 min a 65°C y después taparlos. Dejarlos 3 min más, para un total de 5 min.
7. Congelar las muestras en un baño de hielo seco-etanol, aproximadamente 1 min.
8. Centrifugar 8 min a 14,000 rpm.
9. Recuperar la fase acuosa , aprox. 600µl, y repetir los pasos del 5 al 8, 2 veces más. Total 3 extracciones de FCI.
10. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un eppendorf de 1.5ml, al que previamente se le han puesto 5µl de MgCl₂ 100mM.
11. Extraer una vez con 500µl de cloroformo:isoamílico (24:1). Dar vortex 1min.

Para 10 ml

Cloroformo	9.6 ml
Alcohol Isoamílico	0.4 ml

12. Centrifugar 5min a 14,000rpm. Recuperar la fase superior en un nuevo eppendorf, aprox. 400µl.
13. Agregar 40µl de Acetato de Na 3M pH 5, (¹/₁₀ del volumen total). Mezclar con el tip. Agregar 1000µl de etanol (2 ¹/₂ volúmenes) de una botella exclusiva para RNA.

14. Poner los tubos en un baño de hielo seco-etanol hasta que se congelen. Tardan aprox. 15 min.
15. Centrifugar 15min a 14,000 rpm.
16. Decantar el sobrenadante. Lavar el botón (sin resuspenderlo) en 500 μ l de etanol al 80% (preparado con H₂O+DEPC). Centrifugar 5min a 14,000rpm. El botón se desprende del tubo con mucha facilidad, lo mejor es decantar la mayor cantidad de etanol y quitar lo restante con el tip.
17. Quitar todo el sobrenadante y secar el pellet al aire. Antes de que esté transparente resuspenderlo en 50 μ l de H₂O+DEPC. Almacenar a -80°C.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CORRER GELES DE RNA

Para el gel de agarosa al 1%

H ₂ O	84ml
Agarosa	1 g
MAE 10X	10ml

Se funde la agarosa y una vez tibia se agrega:

Formaldehído	6ml
--------------	-----

Tratamiento de la cámara de corrida

Lavar la cámara, el peine y demás aditamentos de electroforesis con SDS al 1%. Enjuagar con H₂O+DEPC. Dejar secar y después vaciar la agarosa previamente fundida.

BUFFER DE CORRIDA

MAE10X	80ml
Formaldehído	24ml
Aforar a 800ml con H ₂ O	

Preparación de las muestras

SOLUCIÓN TAMPÓN

Formamida desionizada	2.2ml
Formaldehído	0.8ml
MAE10X	0.5ml
Glicerol al 80%	0.4ml
Azul de bromofenol al 2%	100µl
Aforar a 4ml con H ₂ O+DEPC	

Para cargar la muestra agregar:

Muestra	3µl
Solución tampón	40µl
Bromuro de etidio (10mg/ml)	2µl

Calentar las muestras 10 min a 65°C e inmediatamente después cargarlas en el gel.

ANÁLISIS TIPO NORTHERN

A. Sondas empleadas

Se utilizó el gen completo de *GDH1* (1,365 pb) así como un fragmento del gen de *ACT1* (1,100pb). Las sondas se marcaron por "Random Primer".

B. Condiciones de hibridización

El filtro se prehibrido durante 1 hora a 65°C y se hibridó con la sonda correspondiente durante toda la noche a la misma temperatura en **BUFFER DE HIBRIDACIÓN**.

BUFFER DE HIBRIDACIÓN

Para 10 ml

3.0ml	Na ₂ HPO ₄ 1M pH7.4
10 µl	EDTA 0.5M
7.0ml	SDS 10%

3. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE CROMATINA DE***Saccharomyces cerevisiae.*****DIGESTIÓN *IN VIVO* CON MNasal**

1. Preparar 200ml de cultivo a una densidad óptica de 0.3-0.4 en MM o YPD.
2. Centrifugar el cultivo 5 min a 3,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
3. Resuspender la pastilla en 5ml de **BUFFER I** recién preparado. Resuspender primero en el sorbitol y después agregar los demás reactivos.

BUFFER I

- 5ml Sorbitol 1M
 - 200 μ l EDTA 0.5M (25mM)
- Agregar en la campana de extracción:
- 200 μ l β -mercaptoetanol 14M (600mM)

4. Incubar 5min con agitación a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5min a 3,000 rpm. Quitar el sobrenadante.
6. Lavar 1 vez con 5ml de Sorbitol 1M. Centrifugar 5min a 3,000 rpm.
7. Resuspender la pastilla en 5ml de **BUFFER II**. Resuspender primero en sorbitol y después agregar los demás reactivos.

BUFFER II

- 4ml Sorbitol 1M
- Agregar en la campana de extracción:
- 2 μ l β -mercaptoetanol
 - 40mg de β -glucuronidasa previamente resuspendida en 1ml de Sorbitol 1M

8. Incubar 10-20 min a 30°C con agitación. Tener mucho cuidado a partir de este momento ya que las levaduras tienen digerida la pared celular.
9. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min.
10. Lavar con 5ml de Sorbitol 1M. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min.
11. Resuspender la pastilla en 5ml de **BUFFER DE NISTATINA 1X**. Primero resuspender la pastilla y agregar al final la Nistatina.

BUFFER DE NISTATINA 1X

	Tomar del stock para 5ml	
50mM NaCl	0.25ml	NaCl 1M
1.5mM CaCl ₂	0.25ml	CaCl ₂ 50mM
20mM Tris HCl pH 8.0	0.1ml	Tris-HCl 1M
1M Sorbitol	2.5ml	Sorbitol 2M
	1.9ml	H ₂ O

200µg/ml Nistatina

12. Incubar en el **BUFFER DE NISTATINA 1X** por 5 min.
13. Tomar alícuotas de 500µl en tubos eppendorf de 2.0 ml.
14. Adicionar **MNasa I** (Nucleasa Micrococal) en diferentes concentraciones. Mezclar suavemente.

BUFFER DE DILUCIÓN DE MNasal

	Tomar del stock para 10ml	
50mM Tris HCl pH 8.0	0.5ml	Tris-HCl 1M
50mM NaCl	0.5ml	NaCl 1M
10mM MgCl ₂	1.0ml	MgCl ₂ 100mM
50% Glicerol	5.0ml	Glicerol 100%
	3.0ml	H ₂ O

15. Incubar 20 min a 37°C.
16. Adicionar 50µl de **STOP MIX**. Mezclar suavemente.

STOP MIX (10ml)

9ml SDS10%
1ml EDTA 0.5M

17. Adicionar a cada muestra 10µl de la solución de **PROTEINASA K** (20mg/ml) recién preparada.

BUFFER DE RECONSTITUCIÓN DE LA PROTEINASA K

	Tomar del stock para 10ml	
50mM Tris-HCl pH 8.0	0.5ml	Tris-HCl 1M
3mM CaCl ₂	0.6ml	CaCl ₂ 50mM
	8.9ml	H ₂ O

Para preparar 200µl de solución de Proteinasa K:

200µl Buffer de reconstitución
0.004g Proteinasa K

18. Incubar 45 min a 56°C.
19. Extraer 1 vez con 500µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Dar vortex de 1 min y centrifugar durante 3 min a 14,000 rpm.
20. Precipitar con 50µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 1.5 ml de etanol al 100%. 30 min a -80°C y 1h a -20°C ó toda la noche a -20°C.
21. Centrifugar 15 min a 14,000 rpm.
22. Resuspender en 200µl de TE 1X y agregar 20µl RNAsa A (10mg/ml). Incubar 1 ó 2 horas a 37°C.
23. Hacer 1 extracción con 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
24. Hacer 1 extracción con 200µl de cloroformo-alcohol isoamílico.
25. Precipitar con 20µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 500µl de etanol al 100%.
26. Dejar toda la noche a -20°C.
27. Centrifugar 15 min a 14,000 rpm.
28. Lavar el pellet con 300µl de etanol al 70%. Dejar secar.
29. Resuspender el pellet en 50µl de H₂O bidestilada estéril.
30. Cargar un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X con 5µl de la muestra para ver la digestión y la cantidad de DNA.
31. Una vez cuantificado el DNA, digerir cada muestra con 100U de la enzima de restricción apropiada. Incubar toda la noche a 37°C.
32. Hacer una extracción con 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
33. Precipitar con 20µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 500µl de etanol al 100%. Dejar toda la noche a -20°C.
34. Centrifugar 15 min a 14,000 rpm. Lavar el pellet con 200µl de etanol al 70%. Dejar secar.
35. Resuspender el botón en 20µl de agua.
36. Cargar las muestras en un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X. Utilizar marcadores de peso molecular radioactivos.
37. Correr a 70V durante 16h. Transferir a la membrana de nylon Hybond N+ por el método alcalino.
38. Transferir durante 6-8 horas, después lavar la membrana con SSC 1X por unos segundos y esperar hasta que se seque.

DIGESTIÓN DE DNA DESNUDO *IN VITRO* CON MNasa I

1. Tomar un tubo sin digerir de cada condición y agregarle 44µl de H₂O.
2. Agregar a cada tubo 10µl del **BUFFER DE DIGESTIÓN 10X** y 0.1U de MNasa I. Digerir de 2-5 min.

BUFFER DE DIGESTIÓN 10X

	Tomar del stock para 10ml	
20mM Tris HCl pH 8.0	2.0ml	Tris-HCl 1M
50mM NaCl	5.0ml	NaCl 1M
1.5mM CaCl ₂	0.16ml	CaCl ₂ 900mM
	2.84ml	H ₂ O

3. Extraer con 100µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
4. Extraer con 100µl de cloroformo-alcohol isoamílico.
5. Precipitar con 10µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 300µl de etanol al 100%. Dejar toda la noche a -20°C.
6. Resuspender en 30µl de H₂O.
7. Cargar un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X con 3µl de la muestra para ver la digestión y la cantidad de DNA.
8. Una vez cuantificado el DNA, digerir cada muestra con 100U de la enzima de restricción apropiada. Incubar toda la noche a 37°C.
9. Hacer una extracción con 200µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
10. Precipitar con 20µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 500µl de etanol al 100%. Dejar toda la noche a -20°C.
11. Centrifugar 15 min a 14,000 rpm. Lavar el pellet con 200µl de etanol al 70%. Dejar secar.
12. Resuspender el botón en 20µl de agua. Cargar las muestras del DNA desnudo un gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X junto con las muestras previamente digeridas *in vivo*.

ANÁLISIS TIPO SOUTHERN

C. Desoxioligonucleótidos empleados

5F (5'- AAG CTT CGA AAA CTT CTC TTA ATG -3')

5R (5'- CTG GAC AGA TCA ACT GTA GAG -3')

3F (5'- CTC TCA CTC TTT AAA TGA CTT -3')

3R (5'- GCG CGA AGC TTG TTG AAA TTC TGG C -3')

D. Condiciones del PCR radioactivo

Para obtener las sondas específicas necesarias para la hibridización con las cromatinas digeridas con MNasal, se diseñaron 2 pares de desoxioligonucleótidos con base en la secuencia del promotor de *GDH1*. El primer par de desoxioligonucleótidos (5F y 5R) se diseñó en el extremo 5' del promotor del gen y amplifica un producto de 127pb (**SONDA 5'**). El segundo par de desoxioligonucleótidos (3F y 3R) se diseñó en el extremo 3' del promotor y amplifica un producto de 130 pb (**SONDA ATG**).

Al inicio de cada reacción de PCR se adicionaron 5µl de dCTP P³² (3000 Ci/mmol). Para la amplificación por PCR de la SONDA 5' se utilizó como templado el plásmido pLIN1 con el siguiente programa: un ciclo a 95°C por 3 min, seguido de 26 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 52°C y 2 min a 72°C, y un último ciclo de 5 min a 72°C. Para la amplificación por PCR de la SONDA ATG se utilizó el programa mencionado anteriormente pero la temperatura de alineamiento de los desoxioligonucleótidos fue de 55°C.

E. Condiciones de hibridización

El filtro se prehibrido durante 1 hora a 65°C y se hibridó con la sonda correspondiente durante toda la noche a la misma temperatura en **BUFFER DE DENHART'S 5X**.

BUFFER DE DENHART'S 5X

		Tomar del stock para 150 ml	
6X	SSC	45 ml	SSC 20X
5X	Denhart's	15 ml	Denhart's 50X
0.5%	SDS	7.5ml	SDS 10%
		82.5ml H ₂ O	

Adicionar 600µl de DNA de esperma de salmón previamente hervido durante 10 min.

X. APÉNDICE II

Artículo 2

DeLuna A., Avendaño A., Riego L., and González A. (2001) NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**:43775-43783.

En el artículo, se reporta la caracterización bioquímica y fisiológica de las isoenzimas NADP-GDH de *S. cerevisiae*, codificadas por *GDH1* y *GDH3*. Las proteínas purificadas mostraron diferencias en sus propiedades alostéricas y en sus velocidades de consumo de α -cetoglutarato. El análisis de la expresión relativa de estas proteínas, reveló que la expresión de *GDH1* y *GDH3* se encuentra regulada de manera diferente y dependiente de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono. Más aún, el estudio fisiológico de las mutantes que carecen o que expresan *GDH1* o *GDH3* en multicopia sugirió que estos genes juegan papeles no redundantes.

NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*

PURIFICATION, KINETIC PROPERTIES, AND PHYSIOLOGICAL ROLES*

Received for publication, August 20, 2001, and in revised form, September 17, 2001
Published, JBC Papers in Press, September 18, 2001, DOI 10.1074/jbc.M107986200

Alexander DeLuna†, Amaranta Avendaño, Lina Riego, and Alicia González‡

From the Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenases (NADP-GDHs) encoded by *GDH1* and *GDH3* catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and α -ketoglutarate. The *GDH2*-encoded NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase degrades glutamate producing ammonium and α -ketoglutarate. Until very recently, it was considered that only one biosynthetic NADP-GDH was present in *S. cerevisiae*. This fact hindered understanding the physiological role of each isoenzyme and the mechanisms involved in α -ketoglutarate channeling for glutamate biosynthesis. In this study, we purified and characterized the *GDH1*- and *GDH3*-encoded NADP-GDHs; they showed different allosteric properties and rates of α -ketoglutarate utilization. Analysis of the relative levels of these proteins revealed that the expression of *GDH1* and *GDH3* is differentially regulated and depends on the nature of the carbon source. Moreover, the physiological study of mutants lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* suggested that these genes play nonredundant physiological roles. Our results indicate that the coordinated regulation of *GDH1*-, *GDH3*-, and *GDH2*-encoded enzymes results in glutamate biosynthesis and balanced utilization of α -ketoglutarate under fermentative and respiratory conditions. The possible relevance of the duplicated NADP-GDH pathway in the adaptation to facultative metabolism is discussed.

Like most free living microorganisms, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* possesses amino acid biosynthetic pathways that allow the cell to use ammonium as sole nitrogen source. Ammonium utilization occurs exclusively via its incorporation into glutamate and glutamine (1), a process that can be achieved by two metabolic routes. One of them is constituted by the concerted action of glutamine synthetase and the *GLT1*-encoded glutamate synthase (2, 3). The other pathway is mediated by the NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH)¹ (EC 1.4.1.4), a broadly distributed enzyme that

catalyzes the reductive amination of α -ketoglutarate to form glutamate (4, 5). In *S. cerevisiae*, two genes (*GDH1* and *GDH3*) have been described whose products constitute NADP-GDH isoenzymes (6). Glutamate catabolism is achieved through a reaction catalyzed by a different but related enzyme, the *GDH2*-encoded NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH) (EC 1.4.1.2), which determines glutamate degradation to ammonium and α -ketoglutarate (4, 7, 8).

S. cerevisiae is the first microorganism described in which the NADP-GDH activity is encoded by two genes (6); the physiological significance of this apparent redundancy is not clear. When this yeast is grown on glucose and ammonium as carbon and nitrogen sources, *Gdh1p* is the primary pathway for glutamate biosynthesis (6, 9, 10). It has also been shown that *GDH1* expression is regulated by the *HAP* system (11), which is known to control expression of genes involved in carbon metabolism and respiratory function (12). Null *gdh3Δ* mutants show no evident growth phenotype on glucose, and *GDH3*-dependent activity is negligible on this carbon source. Nevertheless, a biosynthetic role was established for *GDH3* in a double *gdh1Δ glt1Δ* mutant that grows on ammonium sulfate as sole nitrogen source by means of *Gdh3p* (6). Moreover, global analysis of transcription suggests that *GDH3* expression is influenced by the general nitrogen control system (13).

S. cerevisiae is able to grow using a variety of carbon sources under fermentative and respiratory conditions. This fact has stimulated discussion as to which specific mechanism allows α -ketoglutarate utilization for glutamate biosynthesis without impairing the integrity of the tricarboxylic acid cycle as an energy-providing system. In this regard, it has been shown that *Klebsiella aerogenes* strains overexpressing their *gdhA* gene coding for the biosynthetic NADP-GDH display an auxotrophy that is interpreted as a limitation for α -ketoglutarate and succinyl-coenzyme A (14). Accordingly, α -ketoglutarate modulates NADP-GDH activity so that fluctuations in the intracellular levels of tricarboxylic acid cycle intermediates would regulate glutamate biosynthesis. Indeed, it has been shown that the signal that coordinately regulates carbon and nitrogen metabolism in *Escherichia coli* depends on the intracellular levels of α -ketoglutarate and glutamine (15). Interestingly, the presence of *Gdh3p* has been found to be increased during diauxic transition in *S. cerevisiae* (16), suggesting a particular role of this enzyme in respiratory metabolism.

To understand the function of the duplicated NADP-GDH pathway present in *S. cerevisiae*, we purified both isoenzymes and studied their biochemical properties. Our results revealed

* This work was supported in part by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Grant IN212898 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 31774. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Recipient of a fellowship and a grant (PAEP-102315) from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-56225631; Fax: 52-56225630; E-mail: amanjarr@fisiol.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: NADP-GDH, NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase; NAD-GDH, NAD⁺-dependent glutamate dehy-

drogenase; MM, minimal medium; YPD, yeast-peptone-dextrose; PCR, polymerase chain reaction; TLCK, N^ω-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; bp, base pair(s).

TABLE I
S. cerevisiae strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
CLA1	MATa GDH1 GDH3 ura3 leu2	Ref. 6
CLA4	MATa GDH1 GDH3 URA3::Y1p5 LEU2::Y1p351	Ref. 6
CLA6	MATa gdh1Δ::URA3 GDH3 LEU2::Y1p351	Ref. 6
CLA7	MATa GDH1 gdh3Δ::LEU2 URA3::Y1p5	Ref. 6
CLA10	MATa gdh1Δ::URA3 gdh3Δ::LEU2	Ref. 6
CLA11	MATa GDH1 GDH3 LEU2::Y1p351 ura3	This study
CLA12	MATa GDH1 gdh3Δ::LEU2 ura3	This study
CLA13	MATa gdh1Δ::kanMX4 GDH3 LEU2::Y1p351 ura3	This study
CLA14	MATa gdh1Δ::kanMX4 gdh3Δ::LEU2 ura3	This study

that Gdh1p and Gdh3p have different allosteric properties and rates of α -ketoglutarate utilization. The construction of chimerical plasmids harboring combinations of the *GDH1* and *GDH3* promoter and coding regions allowed us to determine that expression of these two genes is differentially modulated by the carbon source. Finally, physiological analysis of mutants lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* showed that expression of both genes is required to achieve wild-type growth on ethanol. Our results indicate that existence of different NADP-GDH isoenzymes allows the functioning of a regulatory system in which the relative abundance of each isoform modulates the rate at which α -ketoglutarate is channeled to glutamate biosynthesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains

Table I describes the characteristics of the strains used in the present work. All strains constructed for this study were *LEU2* derivatives of CLA1 (*ura3 leu2*) and thus suited for *URA3* selection. To obtain a *gdh3Δ* mutant, CLA1 was transformed with the *Bgl*III-linearized plasmid pLV6 (6) harboring a 760-bp *GDH3* fragment and the yeast *LEU2* gene, generating strain CLA12 (*GDH1 gdh3Δ ura3*). A *gdh1Δ gdh3Δ ura3* mutant was obtained from CLA12, using the PCR-based gene replacement protocol described by Wach *et al.* (17), with *kanMX4* as a marker. Two deoxyoligonucleotides were designed based on the *GDH1* nucleotide sequence and that of the multiple cloning site present in the pFA6a vector (17). The deoxyoligonucleotide D1 (5'-CAG AAT TTC AAC AAG CTT ACG AAG AAG TTG TCT CCT CTT TGG AAG CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3') comprised 45 bp of the 5' region of the *GDH1* coding sequence (+11 to +55), and 18 bp (in boldface type) of the pFA6a multiple cloning site. The deoxyoligonucleotide D2 (5'-AAC ACC GAT ATC ACC AGC TGG CAC GTC AGT GTC TTG ACG AAT GTG ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3') contained 45 bp corresponding to an internal *GDH1* gene fragment (+451 to +495) and 19 bp (in boldface type) from the pFA6a multiple cloning site. Qiagen purified pFA6a DNA was used as template for PCR amplification in a Stratagene Robocycler 40 with the following program: one denaturing cycle for 3-min at 94 °C, followed by 26 cycles of 30-s denaturation at 94 °C, 1-min annealing at 50 °C, and 1-min extension at 72 °C. The 522-bp PCR product obtained was gel-purified and used to transform strain CLA12, generating strain CLA14. A CLA1 *LEU2* derivative was obtained by transforming this strain with plasmid Y1p351, generating strain CLA11. To obtain a *gdh1Δ GDH3 ura3* mutant, the CLA11 strain was transformed with the above mentioned 522-bp PCR product, thus generating CLA13.

Yeast was transformed by the method described by Ito *et al.* (18). Transformants were selected for either leucine prototrophy on minimal medium (MM), or G418 resistance (200 mg/liter) (Life Technologies, Inc.) on yeast extract-peptone-dextrose (YPD)-rich medium.

Growth Conditions

Strains were routinely grown on MM containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter-sterilized glucose (2%, w/v) or ethanol (2%, w/v) was used as a carbon source, and 40 mM ammonium sulfate was used as a nitrogen source. Supplements needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.1 mg/ml. Cells were incubated at 30 °C with shaking (260 rpm).

Construction of Low Copy Number and High Copy Number Plasmids Bearing *GDH1* or *GDH3* Genes

All standard molecular biology techniques were followed as previously described (19). *GDH1* or *GDH3* were PCR-amplified together with

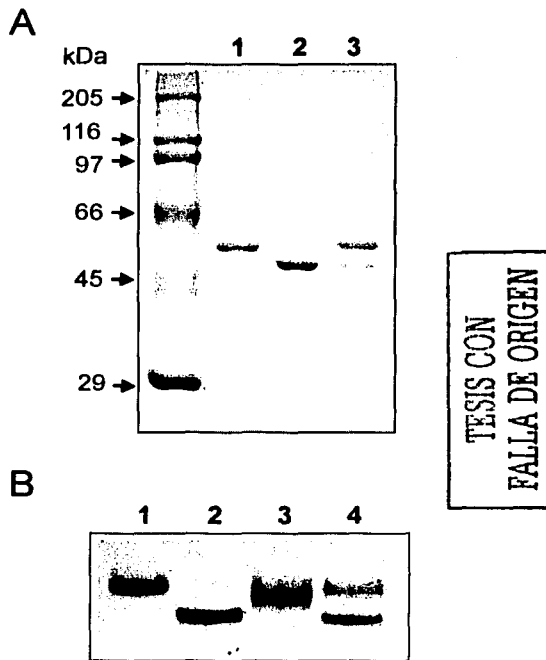


FIG. 1. Purification and electrophoretic characterization of yeast NADP-GDHs. A, SDS-PAGE showing proteins purified to electrophoretic homogeneity from ethanol-grown yeast cultures (see "Experimental Procedures" for purification strategy). Lane 1, Gdh1p (from CLA14-11); lane 2, Gdh3p (from CLA14-22); lane 3, wild-type NADP-GDH (from CLA4). B, purified proteins (2 μ g) were subjected to native gel electrophoresis (6%) and Coomassie-stained. Lane 1, Gdh1p (from CLA14-11); lane 2, Gdh3p (from CLA14-22); lane 3, wild-type NADP-GDH (from CLA4); lane 4, Gdh1p plus Gdh3p.

their 5' promoter sequence and cloned into either the pRS316 (*CEN6 ARSH4 URA3*) low copy number or pRS426 (2 μ ori *URA3*) high copy number yeast shuttle vectors (20, 21). For *GDH1*, the 2596-bp region between -952 from the start codon and +285 from the stop codon was considered to comprise the full *GDH1* promoter and coding sequences (11). For *GDH3*, a 2646-bp fragment was PCR-amplified, containing the putative regulatory region (-1213 from the start codon) plus the full coding sequence and +48 from the end codon, as reported in the nucleotide sequence of chromosome I from *S. cerevisiae* (22). Deoxyoligonucleotides used for this purpose were S1 (5'-CGC GGG ATC CAG TAG TTC AGC GAC AGA AG-3'), S2 (5'-CGC GCG GAT CCC GAG TAA GGT CAT CAA TAA G-3'), S3 (5'-CGC GGG ATC CTG CCG TTA TAT GAT CTT C-3'), and S4 (5'-CGC GCG GAT CCT ACT ACA TAC ACA GAT AG-3'), generating plasmids pLAM1 (*GDH1 CEN URA3*), pLAM11 (*GDH1 2 μ URA3*), pLAM2 (*GDH3 CEN URA3*), and pLAM22 (*GDH3 2 μ URA3*). DNA sequencing was carried out, using the T3/T7 priming sites of pRS316 and pRS426, at the Unidad de Biología Molec-

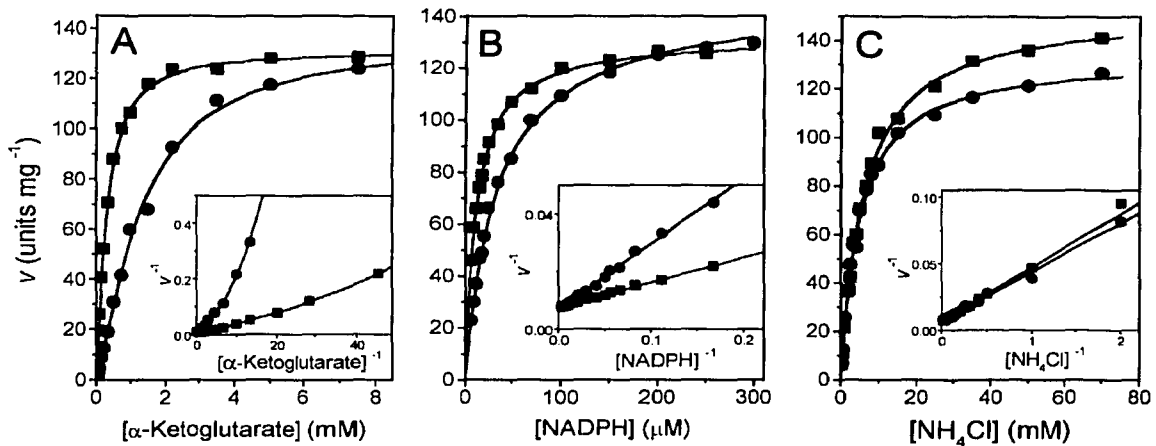


FIG. 2. Comparative kinetic analysis of two NADP-GDH isoenzymes. Plots show the dependence of the relative rate of the reductive amination reaction on the concentration of α -ketoglutarate (A), NADPH (B), and ammonium (C). Reactions were carried out in 100 mM Tris buffer (pH 7.2) at 25 °C (see "Experimental Procedures"). ■, Gdh1p enzyme; ●, Gdh3p enzyme. Insets represent double reciprocal plots.

ular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Plasmids were subsequently transformed into CLA14 double mutant, and uracil prototrophs were selected, thus generating strains CLA14-1, CLA14-11, CLA14-2, and CLA14-22. Control strains harboring the 2 μ pRS426 plasmid were constructed by transforming CLA11, CLA12, CLA13, and CLA14, generating strains CLA11-00, CLA12-00, CLA13-00, and CLA14-00, respectively.

Construction of GDH1 and GDH3 Chimerical Fusion Plasmids

Fusions containing either the *GDH1* promoter and the *GDH3* coding sequence or the *GDH3* promoter and the *GDH1* coding sequence were generated by overlapping PCR amplification. For this purpose, primers S1 and S5 (5'-CTC TGG TTC GCT TGT CAT TTC TTT TTC TTT TTG G-3') were used to obtain a 980-bp product corresponding to the *GDH1* 5' cognate sequence and the first 19 bp of the *GDH3* coding sequence (in boldface type); this was overlapped with the 1431-bp product of primers S4 and S8 (5'-GAC AAG CGA ACC AGA GTT TC-3'), which included the complete *GDH3* coding sequence. Similarly, primers S2 and S9 (5'-GAA ATT CTG GCT CTG ACA TTT TTA CTT TTT ACC-3') were used to obtain a 1244-bp product corresponding to the *GDH3* 5' cognate sequence, together with the first 17 bp of the *GDH1* coding sequence (in boldface type), and overlapped with the 1632-bp product of primers S3 and S10 (5'-GTC AGA GCC AGA ATT TCA AC-3'), which included the complete *GDH1* coding sequence. The whole procedure led to the generation of the following plasmids: pLAM3 (5'*GDH3-GDH1* CEN *URA3*), pLAM33 (5'*GDH3-GDH1* 2 μ *URA3*), pLAM4 (5'*GDH1-GDH3* CEN *URA3*), and pLAM44 (5'*GDH1-GDH3* 2 μ *URA3*). Constructs were verified by DNA sequencing as described above.

Plasmids were subsequently transformed into the CLA14 double mutant, and uracil prototrophs were selected, generating strains CLA14-3, CLA14-33, CLA14-4, and CLA14-44.

NADP-GDH Purification

NADP-GDH activity was purified from ethanol-grown cultures of CLA 14-11 (*gdh1Δ gdh3Δ*/pLAM11 (*GDH1* 2 μ *URA3*)), CLA 14-22 (*gdh1Δ gdh3Δ*/pLAM22 (*GDH3* 2 μ *URA3*)), and the CLA4 wild-type strain. Strains were grown in 10 liters of MM supplemented with ethanol and ammonium sulfate, in a fermentor at the Unidad de Escalamiento, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Cultures were incubated at 30 °C and 300 rpm and aerated with 7 liters of oxygen/min. Cells were harvested at an optical density of 0.8–1.0 at 600 nm and stored at -70 °C until used. NADP-GDH was purified by a modified version of the method of Doherty (23). All steps were carried out at 5 °C.

Step 1: Whole Cell Soluble Protein Extract—Cells were thawed and resuspended in 1 ml of buffer A (100 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50 μ g of

N-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)/ml)/g of cells. Crude extracts were obtained after mechanical disruption of cells with a Bead-Beater (8 cycles of 1 min). After centrifugation at 30,000 \times g for 30 min, protein extracts were resuspended in buffer A and diluted to ~25 mg/ml.

Step 2: Ammonium Sulfate Fractionation—Proteins that precipitated between 40 and 65% saturation of ammonium sulfate were resuspended in buffer A. Mixtures were dialyzed twice against 4 liters of buffer B (20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA).

Step 3: DEAE Bio-Gel A Chromatography—Dialyzed fractions were applied to a DEAE Bio-Gel A column (23 by 2.8 cm) equilibrated with buffer C (20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50 mg of TLCK/liter). After sample application, the column was washed with 5 column volumes of buffer B. NADP-GDH was subsequently eluted with a linear NaCl gradient of 10 column volumes (0–0.5 M). Fractions with NADP-GDH activity were pooled and dialyzed against 4 liters of buffer B.

Step 4: Affinity Chromatography—A Reactive Red-agarose column (13 by 1.2 cm) was equilibrated with buffer A. After application of the sample from the previous step, the column was washed with 10 volumes of buffer A. NADP-GDH was eluted with buffer A containing 0.1 mM NADPH. Fractions with NADP-GDH activity were pooled, dialyzed against buffer B, concentrated by ultrafiltration to ~1 mg/ml with an Amicon YM30 membrane, and stored at -70 °C until used.

Enzyme Assay and Protein Determination

Whole cell soluble protein extracts were prepared by glass bead lysis of cell pellets harvested during exponential growth, as described (24). NADP-GDH and NAD-GDH were assayed by the method of Doherty (23). One unit of activity is defined as the oxidation of 1.0 μ mol of NADPH or NADH/min. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (25), using bovine serum albumin as a standard.

Preparation of Anti-NADP-GDH Antibodies

Antibodies were raised in rabbits injected with purified yeast *GDH1*-encoded NADP-GDH and partially purified by ammonium sulfate precipitation according to the method of González-Halphen *et al.* (26).

Electrophoresis and Immunoblotting

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and native PAGE were performed with 10 and 6% slab gels, respectively. Proteins on polyacrylamide gels were visualized with Coomassie Blue. Immunoblot analysis of SDS-electrophoresed crude extract or pure NADP-GDH was carried out as described by Towbin *et al.* (27). Immunoblot signaling was optimized by analyzing a number of combinations of antigen and antibody concentrations in the linear range of detectability. Scanned blots were subjected to densitometric analysis using the program ImageQuant 4.2 (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). Data were

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

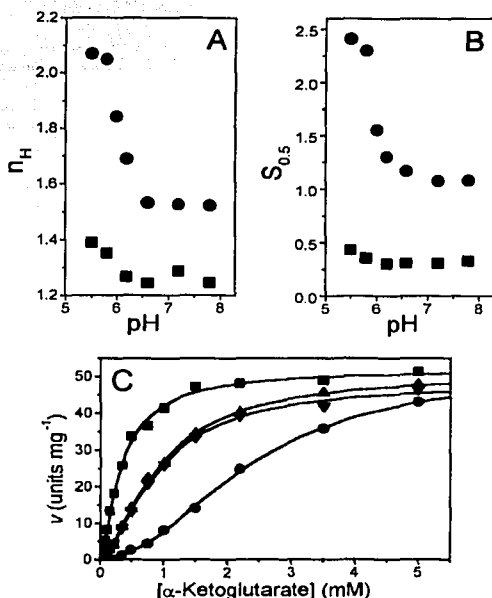


FIG. 3. NADP-GDH isoenzymes show different allosteric properties depending on the concentration of α -ketoglutarate. Plots show the dependence of n_H (A) and $S_{0.5}$ (B) on the pH of the reaction. C, at pH 5.8, the relative rates of the NADP-GDH purified from the wild-type strain depend on the relative abundance of each isoenzyme. Assays were carried out in 25 mM acetic acid, 25 mM MES, 50 mM Tris buffer, at 25 °C. Purified samples used in this experiment were the same as those shown in Fig. 1B. \square , Gdh1p enzyme; \bullet , Gdh3p enzyme; \blacktriangle , wild-type NADP-GDH; \blacktriangledown , Gdh1p plus Gdh3p (3:1 mixture).

normalized to the immunoblot signals of the corresponding purified protein.

Molecular Mass Determination

Native molecular mass was determined on a Sephacryl S-300 gel filtration column (2.6 by 90 cm) equilibrated with 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol. The column was calibrated with molecular mass standards (29–700 kDa) from Sigma. Purified NADP-GDH was diluted in the same buffer, loaded into the column, and eluted at a rate of 6 ml/h. Molecular mass was determined from a plot of the log molecular mass against elution volume per void volume.

The apparent molecular masses of denatured subunits were determined by SDS-PAGE with molecular mass standards (29–205 kDa) from Sigma.

Amino-terminal Sequencing

The isolation of polypeptides for amino-terminal sequencing was carried out as described previously (28). Edman degradation was carried on an Applied Biosystems Sequencer at the Laboratoire de Microséquence des Protéines (Institut Pasteur, Paris, France).

Enzyme Kinetics and Analysis of Kinetic Data

NADP-GDH activity was assayed for the reductive amination reaction at different concentrations of α -ketoglutarate, NADPH, or ammonium chloride and at saturating concentrations of the remaining substrates (8 mM α -ketoglutarate, 200 μ M NADPH, and 50 mM ammonium chloride). For the oxidative deamination reaction, different concentrations of glutamate or NADP⁺ and saturating concentration of the remaining substrate (100 mM glutamate and 300 μ M NADP⁺) were used. The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial substrate. Measurements were made at 25 °C in 100 mM Tris at pH 7.2 or 8.0 for the reductive amination or oxidative deamination reaction, respectively. For experiments in which pH was varied, 25 mM acetic acid, 25 mM MES, 50 mM Tris was used as buffer. This buffer

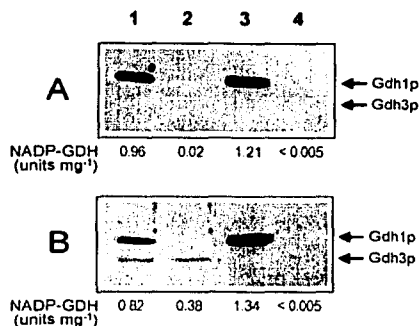


FIG. 4. Levels of Gdh1p and Gdh3p are differentially regulated by carbon source. Cells were grown on MM supplemented with glucose (A) or ethanol (B) and subjected to immunoblot analysis using Gdh1p antiserum. Cells were harvested during logarithmic growth, and protein extracts were assayed for NADP-GDH activity and electrophoresed (SDS-10% PAGE, 20 μ g of protein/lane). Lane 1, CLA4 (wild type); lane 2, CLA6 (*gdh1Δ*); lane 3, CLA7 (*gdh3Δ*); lane 4, CLA10 (*gdh1Δ gdh3Δ*).

minimizes the change of ionic strength with pH (29). Kinetic data were analyzed by nonlinear regression using the program Origin 4.1 (Micro-Cal Software, Inc.).

Extraction and Determination of Intracellular α -Ketoglutarate

Protein-free cell extracts were prepared as described by Kang *et al.* (30). The intracellular concentration of α -ketoglutarate relative to protein concentration was determined with beef glutamate dehydrogenase (Sigma) by following NADH oxidation (31).

Determination of Extracellular Glucose Concentration

Cells were filtered through 0.22- μ m Millipore membranes. Extracellular glucose concentration was determined in the filtrate with the Glucose [HK] kit from Sigma.

RESULTS

NADP-GDH Purification from Mutant and Wild-type Strains—*S. cerevisiae* is the first microorganism in which the existence of two NADP-GDH isoenzymes has been reported (6). Although yeast NADP-GDH has been previously purified and characterized (32), the properties described could be ascribed to either or both isoenzymes. Therefore, we purified the Gdh1p and Gdh3p enzymes to electrophoretic homogeneity to study their individual biochemical properties. Gdh1p was 36-fold purified from the CLA14-11 mutant strain harboring plasmid pLAM11, whereas Gdh3p was 49-fold purified from strain CLA14-22 bearing plasmid pLAM22. Additionally, NADP-GDH was 252-fold purified from the wild-type strain CLA4 grown on ethanol, a condition in which both isoenzymes are readily expressed (see below). Apparent molecular masses of the monomers were 51 and 46 kDa for Gdh1p and Gdh3p, respectively (Fig. 1A). The observed molecular mass of the latter was at variance with the expected value deduced from its amino acid sequence, which is 49.6 kDa. This suggested the existence of a post-translational modification of Gdh3p, which remains to be identified. Amino-terminal sequencing was not possible, because both Gdh1p and Gdh3p purified polypeptides were blocked.

The active oligomeric structures of the purified samples obtained from the wild-type and mutant strains were hexameric, as revealed by gel filtration experiments (data not shown). This is in agreement with results obtained for all members of the small glutamate dehydrogenase subfamily, which show an α_6 50-kDa oligomeric structure (33) and whose three-dimensional crystal structure has been reported (34, 35). Native PAGE

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Yeast NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes

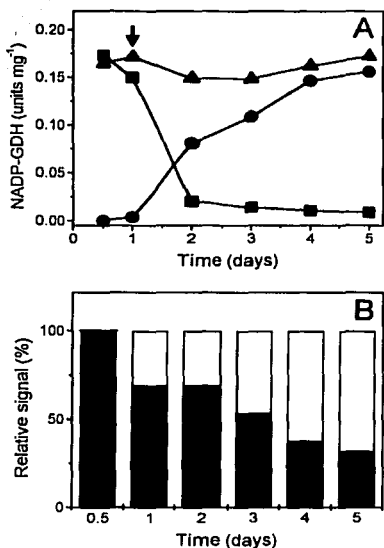


Fig. 5. Relative levels of Gdh1p and Gdh3p change depending on growth phase. A, yeast were cultured by extended growth in YPD-rich medium. Aliquots were withdrawn at different times, and protein extracts were assayed for NADP-GDH activity. Extracellular glucose concentration was determined in parallel; a dark arrow indicates the time at which glucose was exhausted from the medium. ■, CLA7 (*gdh3Δ*); ●, CLA6 (*gdh1Δ*); ▲, CLA4 (wild type). B, the abundance of each isoenzyme relative to the total NADP-GDH of the wild-type strain was calculated from the normalized densitometric analysis of immunoblot signals obtained for electrophoresed protein extracts of strain CLA4. Black bars, Gdh1p; white bars, Gdh3p.

analysis of the protein purified from the wild-type strain showed a smeared pattern (Fig. 1B, lane 3), compared with the sharp bands observed when a mixture of equivalent amounts of purified homomeric proteins was electrophoresed (Fig. 1B, lane 4). Hence, the enzyme purified from the wild-type strain was most probably a natural mixture of several isoforms built up by the oligomerization of the two different monomers encoded by *GDH1* and *GDH3*. In SDS-PAGE electrophoresis, the NADP-GDH purified from the wild-type strain grown on ethanol showed two bands corresponding to Gdh1p and Gdh3p monomers (Fig. 1A). Densitometric analysis of Coomassie-stained gels revealed that 73% of the total NADP-GDH was composed of Gdh1p; the remaining 27% corresponded to Gdh3p.

Kinetic Analysis of NADP-GDH Isoenzymes—Enzymological properties were separately determined for the Gdh1p and Gdh3p homomeric NADP-GDHs. Activities were measured in Tris-MES-acetic acid buffer at pH values ranging from 4.5 to 9.5 (data not shown); maximum activity was obtained at pH 6.8 for both enzymes. We examined the dependence of NADP-GDH activity on α -ketoglutarate, NADPH, or ammonium, using saturating concentrations of the two remaining substrates (Fig. 2). Both isoenzymes showed hyperbolic behavior at increasing NADPH and ammonium concentrations but sigmoidal responses to increasing α -ketoglutarate concentrations (Fig. 2A).

NADP-GDH isoenzymes showed V_{max} values that were similar in all experiments (130–150 units mg^{-1}). All substrates caused inhibition of enzyme activity above a given threshold concentration (data not shown). NADPH began to inhibit the activity of both enzymes at a concentration of 300 μM (10% inhibition); with 100 mM ammonium chloride, we observed a

similar effect. A 5% inhibition of the maximal activity was observed with 10 mM α -ketoglutarate for the Gdh1p enzyme, whereas a 25 mM substrate concentration was needed to generate the same inhibition of the Gdh3p enzyme.

For the Gdh1p enzyme assayed in both directions of the NADP-GDH reaction, the K_m values for NADPH, ammonium, NADP⁺, and glutamate were 11.3 μM , 5.96 mM, 14.1 μM , and 9.79 mM, respectively. Values of 33.1 μM , 5.00 mM, 10.5 μM , and 6.36 mM, respectively, were obtained for the Gdh3p isoenzyme. Phosphate competitive inhibition on NADPH binding has been previously described for yeast NADP-GDH (36). We confirmed that with respect to NADPH concentration, phosphate competitively inhibited both isoenzymes at various concentrations (0–250 mM sodium phosphate) (data not shown). However, Gdh3p was more sensitive to this effect, with a K_i value for phosphate of 9.3 mM, compared with 72.5 mM for the Gdh1p enzyme.

Differences were also found between the two isoenzymes in their kinetics for α -ketoglutarate. At pH 7.2, substrate concentrations at which rates were equal to half the V_{max} ($S_{0.5}$) were 0.29 and 1.27 mM for the Gdh1p and Gdh3p enzyme, respectively. Hill coefficients (n_{11}) in the same experiments were 1.3 and 1.5 for the Gdh1p and Gdh3p enzyme, respectively. In this regard, hexameric glutamate dehydrogenases from other organisms are known to be allosteric enzymes activated by different molecules (AMP, ADP, GTP, ATP, NADP⁺, succinate, aspartate, and asparagine) (33, 37–39). The effect of these compounds was assayed for the yeast NADP-GDH isoenzymes, but none of them behaved as an allosteric effector (data not shown). However, sigmoidal kinetics could most likely reflect a phenomenon of cooperativity, since n_{11} values strictly depended on the pH at which the kinetics for α -ketoglutarate was assayed (Fig. 3A). The n_{11} plot for the Gdh3p isoenzyme against pH showed an inflection point at pH 6.2. Near optimum pH, Gdh3p exhibited a higher $S_{0.5}$ value compared with its homologue; this difference was higher at low pH (Fig. 3B). Conversely, the Gdh1p isoenzyme showed no considerable changes in sigmoidicity and had higher affinity for α -ketoglutarate in terms of $S_{0.5}$. Thus, the overall data indicate that the NADP-GDH isoenzymes differ in their allosteric properties and rates at which they use α -ketoglutarate.

We determined α -ketoglutarate kinetics for the NADP-GDH purified from the wild-type strain and compared them with those of the homomeric Gdh1p and Gdh3p isoenzymes. Since the maximum kinetic differences between the two isoenzymes were observed at pH 5.8, we analyzed the behavior of the wild-type enzyme at this pH. The wild-type enzyme exhibited kinetic parameters ($S_{0.5}$, 0.90 mM; n_{11} , 1.6) similar to those of a preparation containing 75% Gdh1p and 25% Gdh3p homomeric isoenzymes (Fig. 3C). This indicates that kinetics toward α -ketoglutarate depends on the relative abundance of the *GDH1*- and *GDH3*-encoded monomers, whether or not these proteins associate in heteromeric structures.

Relative Levels of Gdh1p and Gdh3p Are Carbon-dependent—To compare the relative levels of the two NADP-GDHs under different conditions, extracts were prepared from the wild-type or the pertinent null mutant strains grown on glucose or ethanol as carbon sources. The specific activities and immunochemically detected levels of Gdh1p were similar in extracts obtained from the *gdh3Δ* strain grown on glucose or ethanol (Fig. 4, lane 3). For Gdh3p, low levels of NADP-GDH activity were observed, and no signal in immunoblots could be detected when glucose was the carbon source. However, when extracts were prepared from ethanol-grown cells, Gdh3p enzymatic activity increased 20-fold, and an immunoblot signal was clearly observed (Fig. 4, lane 2). Normalized densitometric

Yeast NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes

TABLE II
NADP-GDH activity of MM-grown strains harboring recombinant plasmids constructed in this study

Strain	Specific activity ^a	
	Glucose	Ethanol
CLA14-0 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS316 (CEN <i>URA3</i>))	<0.005	<0.005
CLA14-1 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM1 (<i>GDH1</i> CEN <i>URA3</i>))	3.26 ± 0.220	1.36 ± 0.099
CLA14-2 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM2 (<i>GDH3</i> CEN <i>URA3</i>))	0.03 ± 0.007	0.51 ± 0.042
CLA14-3 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM3 (5' <i>GDH3-GDH1</i> CEN <i>URA3</i>))	0.12 ± 0.015	0.97 ± 0.076
CLA14-4 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM4 (5' <i>GDH1-GDH3</i> CEN <i>URA3</i>))	0.60 ± 0.066	0.62 ± 0.031
CLA14-00 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	<0.005	<0.005
CLA14-11 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ <i>URA3</i>))	9.01 ± 0.85	10.6 ± 1.02
CLA14-22 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM22 (<i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>))	0.17 ± 0.013	8.65 ± 0.77
CLA14-33 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM33 (5' <i>GDH3-GDH1</i> 2 μ <i>URA3</i>))	0.86 ± 0.069	11.4 ± 0.94
CLA14-44 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM44 (5' <i>GDH1-GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>))	2.41 ± 0.311	9.90 ± 0.86

^a Values are presented as means from three independent experiments \pm S.D.

TABLE III
Growth phenotypes and glutamate dehydrogenase activities of strains lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* in MM

Strain	Relative growth ^a		NADP-GDH Specific activity ^b		NAD-GDH Specific activity ^b	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
	%	%				
CLA11-00 (<i>GDH1 GDH3</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	100	100	0.884	0.718	0.038	0.055
CLA12-00 (<i>gdh1Δ GDH3</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	63	55	0.019	0.459	0.032	0.063
CLA13-00 (<i>GDH1 gdh3Δ</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	105	67	1.34	0.940	0.043	0.156
CLA14-00 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	58	45	<0.005	<0.005	0.033	0.041
CLA14-11 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ <i>URA3</i>))	92	51	10.5	8.98	0.098	0.160
CLA14-12 (<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM12 (<i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>))	75	82	0.234	7.87	0.035	0.123

^a Values are shown relative to doubling time of the wild-type strain (2.3 and 9.5 h on glucose and ethanol, respectively) and are presented as means from three independent experiments (variation was always \leq 10%).

^b Values are given in μ mol/min/mg of protein and are presented as means from three independent experiments (variation was always \leq 10%).

analysis of immunoblots showed that 25% of the wild-type NADP-GDH from ethanol-grown yeasts corresponded to Gdh3p.

In light of the previous results, it was relevant to determine whether NADP-GDHs containing different Gdh1p/Gdh3p ratios could be found in long term yeast cultures. In YPD-rich medium, *S. cerevisiae* grows by fermentation; diauxic shift occurs after glucose is exhausted from the medium and cells adapt to respiratory metabolism using the ethanol produced during glucose fermentation (40). In fermentative growth, with glucose as the only carbon source, NADP-GDH activity was solely due to Gdh1p (Fig. 5, A and B). However, as cells proceeded through postdiauxic growth, different Gdh1p/Gdh3p ratios were observed, and after 5 days of incubation, 70% of the total NADP-GDH activity in the wild-type strain corresponded to Gdh3p (Fig. 5B). Within this context, it is relevant that NADP-GDH proteolysis has been observed after glucose starvation (41); this could account for the specific inactivation of Gdh1p after glucose was exhausted from the medium. Taken together, these results indicate that the relative abundance of Gdh1p or Gdh3p depends on the carbon source.

GDH3 Expression Is Transcriptionally Regulated by the Nature of the Carbon Source—To determine whether *GDH3* carbon-dependent regulation was exerted at the transcriptional level, several recombinant plasmids were constructed (see "Experimental Procedures"). NADP-GDH activities were determined for strains derived from the CLA14 mutant strain transformed with these plasmids (Table II). Cells bearing low copy number constructs showed differences in enzymatic activity, which could be mainly attributed to the different levels of expression allowed by the cognate 5' promoter sequences of either *GDH1* or *GDH3*. In glucose-grown cells, Gdh1p-dependent NADP-GDH activity was 27-fold higher when expressed from its own promoter as compared with that fostered by the 5'*GDH3-GDH1* fusion. Likewise, Gdh3p-dependent activity was 20-fold higher when this gene was under the regulation of the *GDH1* pro-

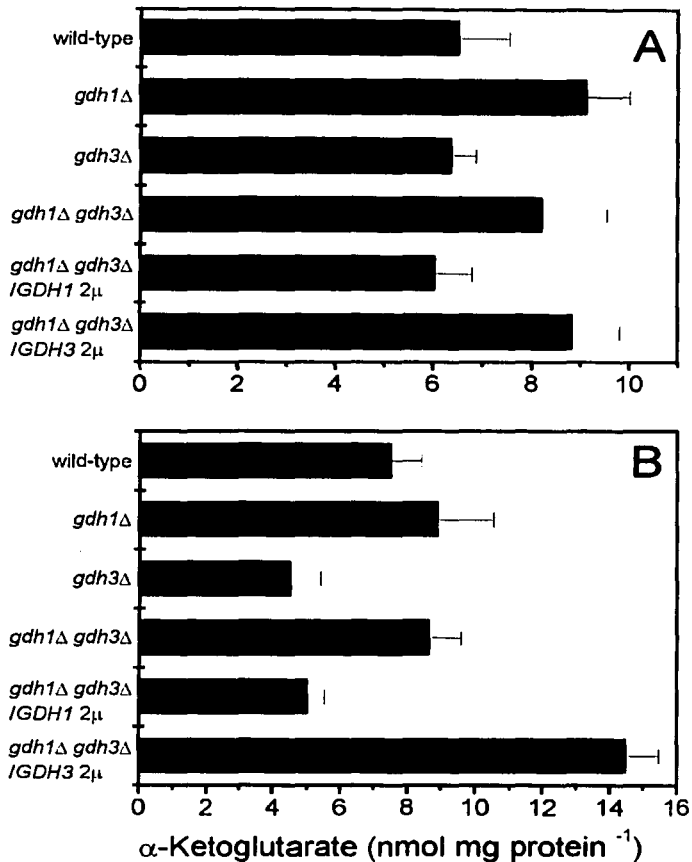
motor sequence (5'*GDH1-GDH3*) than when expressed from its cognate promoter. Similar results were obtained using cells harboring high copy number plasmids. When NADP-GDH activity was monitored in extracts obtained from ethanol-grown cells, high levels were observed for either Gdh1p or Gdh3p, regardless of which promoter fostered expression. These results confirmed that *GDH3* expression was repressed by glucose at the transcriptional level.

It is worth mentioning that in extracts prepared from glucose-grown cultures, Gdh1p activity was at least 5-fold higher than that of Gdh3p when the genes were expressed from either promoter; this effect was barely observed in ethanol (Table II). Considering that V_{max} values are similar for both isoenzymes, this differential level of expression could be attributed to a post-transcriptional level of regulation. In fact, it could be considered that the codon bias difference of these genes (0.75 and 0.19 for *GDH1* and *GDH3*, respectively) may account for different translation rates of their transcripts.

NADP-GDH Isoenzymes Modulate α -Ketoglutarate Utilization for Glutamate Biosynthesis—Gdh1p enzyme is the primary pathway for glutamate biosynthesis in glucose-grown cells (6). Double *gdh1Δ gdh3Δ* mutants lacking NADP-GDH activity are not full glutamate auxotrophs; this strain grows with a 2-fold higher doubling time than that observed in the wild-type strain. This growth is achieved through the action of the *GLT1*-encoded glutamate synthase, which constitutes an ancillary pathway for glutamate biosynthesis (42). *GDH3* expressed from a high copy number plasmid conferred only a partial recovery of the slow growth phenotype of a *gdh1Δ gdh3Δ* strain (Table III), as expected from the observed repression of the *GDH3* gene by glucose. Conversely, *GDH1* expressed from a high copy number plasmid completely restored wild-type growth to a *gdh1Δ gdh3Δ* strain.

It is relevant that in cells grown on ethanol, single disruptions of either *GDH1* or *GDH3* resulted in a slower growth with respect to the wild-type strain. Furthermore, the *gdh1Δ gdh3Δ*

FIG. 6. *In vivo*, NADP-GDHs consume α -ketoglutarate at different relative velocities. Yeast cells were grown on MM supplemented with glucose (A) or ethanol (B) and harvested during logarithmic growth. Protein-free extracts and soluble protein extracts were prepared as described under "Experimental Procedures." Values of intracellular α -ketoglutarate relative to protein concentration are presented as means from three independent experiments \pm S.D. Strains used were CLA11-00 (wild-type), CLA12-00 (*gdh1* Δ), CLA13-00 (*gdh3* Δ), CLA14-00 (*gdh1* Δ *gdh3* Δ), CLA14-11 (*gdh1* Δ *gdh3* Δ /pLAM11 (*GDH1* 2 μ)), and CLA14-22 (*gdh1* Δ *gdh3* Δ /pLAM22 (*GDH3* 2 μ)).



double mutant strain overexpressing *GDH1* from a plasmid grew considerably slower on ethanol than the one bearing the *GDH3* high copy number construct. Thus, it can be concluded that wild-type growth on ethanol depends on both Gdh1p and Gdh3p and that overexpression of *GDH1* could result in a deleterious effect.

Because of the differences in the rates of α -ketoglutarate *in vitro* utilization by the NADP-GDH isoenzymes, we explored if these differences could be observed *in vivo*. To this end, we measured α -ketoglutarate intracellular pools in cells lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3*. We also determined the NAD-GDH-specific activities in the various strains, since this catabolic enzyme would be expected to increase α -ketoglutarate concentration. In yeast cells grown on glucose, the only evident phenotype was due to the lack of *GDH1*; either single (*gdh1* Δ) or double (*gdh1* Δ *gdh3* Δ) mutants exhibited a significant accumulation of α -ketoglutarate. A lack of *GDH3* did not affect either the intracellular concentration of this intermediate or NAD-GDH activity (Fig. 6A, Table III). These results are in consonance with the growth phenotypes observed for the same strains on glucose. When *GDH1* was overexpressed, NAD-GDH activity exhibited a 2-fold increase, suggesting that this activity increased as a result of glutamate accumulation (3, 43). As

expected, *GDH3* overexpression did not result in increased NAD-GDH activity (Table III).

When grown on ethanol, the single *gdh1* Δ mutant did not show a net increase in α -ketoglutarate concentration, whereas the *gdh3* Δ single mutant exhibited a 2-fold lower α -ketoglutarate pool size as compared with that of the wild-type strain. However, the *gdh1* Δ *gdh3* Δ strain had α -ketoglutarate levels similar to those found in the *gdh1* Δ mutant; this suggested that the α -ketoglutarate depletion observed in a *gdh3* Δ mutant was due to a Gdh1p-dependent consumption of this compound in the absence of the Gdh3p enzyme (Fig. 6B). These results are in agreement with the fact that Gdh1p enzyme has a higher rate of α -ketoglutarate utilization than the heteromeric enzyme that exists in ethanol-grown cells. Moreover, NAD-GDH specific activity was induced 3-fold in ethanol-grown cells lacking the Gdh3p enzyme (Table III), indicating that under this condition glutamate accumulated, resulting in induced *GDH2* expression (43).

Overexpression of either *GDH1* or *GDH3* in ethanol-grown cells caused an increase in the specific activity of NAD-GDH. However, the effect on α -ketoglutarate concentration was contrasting. Cells overexpressing *GDH1* showed a reduced α -ketoglutarate pool size, whereas *GDH3* high copy number expres-

sion caused its accumulation. Thus, it can be concluded that *GDH1* overexpression causes a drain of the intracellular α -ketoglutarate pool, suggesting that *in vivo* Gdh1p uses this compound at a higher rate than Gdh3p.

DISCUSSION

This study addresses the question of whether *GDH1* and *GDH3* play overlapping or distinct roles and whether these roles are involved in the inherent capacity of *S. cerevisiae* to grow under fermentative or respiratory conditions. The results presented in this paper indicate that the existence of different NADP-GDH isoforms results in glutamate biosynthesis and balanced α -ketoglutarate utilization. The main observations that support this assertion are the following: (a) NADP-GDHs showed differences in their allosteric properties and rates of α -ketoglutarate utilization; (b) the relative abundance of both isoforms depended on the nature of the carbon source; (c) a *gdh3A* mutant grew slowly on ethanol, although it had wild-type NADP-GDH activity levels (this mutant showed reduced α -ketoglutarate pools and high activity levels of the catabolic NAD-GDH, indicating an abnormal high glutamate production rate); and (d) *GDH1* overexpression from a plasmid did not suppress slow growth or the reduced α -ketoglutarate pool phenotypes of a *gdh1A gdh3A* strain; in contrast, overexpression of *GDH3* resulted in faster growth and α -ketoglutarate accumulation.

It has been recently shown that the regulated expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes is governed by two transcriptional complexes that function alternatively, depending on the integrity of the respiratory function (44). The *HAP* system regulates the expression of genes that lead to the synthesis of α -ketoglutarate during respiratory metabolism (12), whereas expression of these genes is controlled by the *RTG* system when respiratory function is dampened or lost. This model considers that glutamate plays a central role by repressing *RTG*-dependent expression of genes leading to α -ketoglutarate (44), thus indicating that NADP-GDH activity should be controlled accordingly. A yeast NADP-GDH activity was previously purified (32) at a time when the existence of two isoenzymes was not yet recognized; thus, the kinetic properties and regulation of each isoenzyme could not possibly be discerned. In this study, purification and independent characterization of Gdh1p and Gdh3p enzymes shows that yeast possesses NADP-GDH isoforms that differ in their biochemical properties.

Even after the two NADP-GDHs were recognized, induction of *GDH3* could not be observed in genome-wide transcription analysis of ethanol-grown yeast, probably because of detectability limitations (45, 46). The results presented here differ from those mentioned above and show unequivocally that *GDH3* expression is ethanol-induced and glucose-repressed and that *GDH1* expression is high on both carbon sources. This brings into accountability the role of the different NADP-GDH isoenzymes in either glucose or ethanol-grown cells. Our results also consider the allosteric regulation of the *GDH3*-encoded enzyme, which suggests particular regulatory properties for this activity *in vivo*. This would mediate a more relaxed distribution of α -ketoglutarate to either glutamate biosynthesis or energy-yielding metabolism when cells grow on a nonfermentable or limiting carbon source. During fermentative growth, glutamate biosynthesis would be afforded by the Gdh1p isoenzyme that uses α -ketoglutarate at a faster rate. Accordingly, the existence of multiple isoforms of NADP-GDH activity would provide the pacemaker mechanism that assures optimum glutamate biosynthesis in either fermentative or respiratory conditions without compromising the energy-yielding metabolism. Within this context, it is relevant that the nonfacultative yeast *Kluyveromyces fragilis*, closely related to *S. cerevisiae*,

bears a single homomeric NADP-GDH enzyme (47).

It has been recognized that the expression of the NADP-GDH catabolic enzyme is induced in the presence of ethanol (43). However, the physiological significance of this observation has remained obscure, since *gdh2A* mutants show no evident phenotype in ethanol-grown cultures. Considering the results presented in this paper, it can be suggested that the coordinated action of *GDH1*, *GDH3*, and *GDH2*-encoded enzymes allows growth on ethanol, equilibrating the production and utilization of α -ketoglutarate. This study further confirms that nitrogen and carbon metabolisms are coordinately modulated for ammonium assimilation (11, 48) and that the genetic and metabolic regulation of genes involved in nitrogen metabolism can be influenced by the nature of the carbon source.

Finally and worth mentioning is the existence of other duplicated yeast genes, such as *COX5A/COX5B*, *HYP2/IANB1*, *CYC1/CYC7*, and *AAC2/AAC3*, whose regulation has diverged and which are differentially expressed under aerobic or anaerobic conditions (49). Thus, the described duplication and further diversification of an NADP-GDH gene may be representative of a general mechanism through which *S. cerevisiae* acquired facultative metabolic properties (50).

Acknowledgments—We thank C. Aranda and M. Vázquez-Acevedo for skillful technical assistance and X. Aguirre, who worked on the construction of recombinant plasmids. We are grateful to A. Blancas (Unidad de Esclamamiento, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for assistance in growing yeast cultures in the fermentor; L. Ongay, G. Codiz, and M. Sosa (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for DNA sequencing and synthesis of oligonucleotides; and J. d'Alayer (Institut Pasteur) for amino-terminal peptide sequencing. We are indebted to M. M. Altamirano, F. Bastarrachea, D. G. Fraenkel, D. González-Halphen, and L. Valenzuela for helpful discussions and critical review of the manuscript. We appreciate the encouraging and insightful comments of A. Gómez-Puyou during this work.

REFERENCES

- Magnsanik, B. (1992) *In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression* (Jones, E. W., Pringle, J. R., and Broach, J. R., ed) pp. 283-317, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tempest, D. W., Meers, J. L., Brown, C. M. (1970) *Biochem. J.* 117, 405-407
- Roon, R. J., Even, H. L., and Larimore, F. (1974) *J. Bacteriol.* 118, 89-95
- Holzer, H., and Schneider, S. (1957) *Biochem. Z.* 228, 361-367
- Bongchenou-Lahfa, N., Forterre, P., and Labendian, B. (1993) *J. Mol. Evol.* 36, 335-346
- Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and González, A. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 5594-5597
- Smith, E. L. (1975) *In The Enzymes*, Vol. XI (Boyer, P. D., ed) pp. 293-367, Academic Press, Inc., New York
- Miller, S. M., and Magasanik, B. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 4927-4935
- Drillien, R., and Lacroute, F. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 203-208
- Gronson, M., Dubois, E., Piotrowska, M., Drillien, R., and Aigle, M. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 128, 73-85
- Dang, V. D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M., and Daignan-Fornier, B. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 1842-1849
- Forsberg, S. L., and Guarente, L. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 153-180
- Cox, K. H., Pinchack, A. B., and Cooper, T. C. (1999) *Yeast* 15, 703-713
- Janes, B. K., Pomposiello, P. J., Perez-Matos, A., Najarian, D. J., Goss, T. J., and Bender, R. A. (2001) *J. Bacteriol.* 183, 2709-2714
- Ninfa, A., Jiang, P., Atkinson, M. R., and Poliska, J. A. (2000) *Curr. Top. Cell Reg.* 36, 31-75
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 1044-1052
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* 10, 1793-1808
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163-169
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., pp. 1.1-7.87, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* 122, 19-27
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., Hieter, P. (1992) *Gene (Amst.)* 110, 119-122
- Bussay, H., Kaback, D. B., Zhong, W., Vo, D. T., Clark, M. W., Fortin, N., Hall, J., Ouellette, B. F., Keng, T., Barton, A. B., Su, Y., Davies, C. J., and Storms, R. K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3809-3813
- Doherty, D. (1970) *Methods Enzymol.* 17, 850-856
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballarín, P., and González, A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 792-798

25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
26. González-Halphen, D., Lindorfer, M. A., Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* **27**, 7021-7031
27. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Bio/Technology* **24**, 145-149
28. Gutierrez-Cirlos, E. B., Antaramian, A., Vazquez-Acevedo, M., Coria, R., and Gonzalez-Halphen, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9147-9154
29. Ellis, K. J., Morrison, J. F. (1982) *Methods Enzymol.* **87**, 405-426
30. Kang, L., Keeler, M. L., Dunlop, P. C., and Roon, R. J. (1982) *J. Bacteriol.* **151**, 29-35
31. Dubois, E., Grenson, M., and Wiame, J. M. (1974) *Eur. J. Biochem.* **48**, 603-616
32. Camardella, L., Di Prisco, G., Garofano, F., and Guerrini, A. M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 324-330
33. Mihambros, B., Olivera, E. R., Jensen, R. A., and Luengo, J. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 39529-39542
34. Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C., Farrants, G. W., Lilley, K. S., Rice, D. W., and Stillman, T. J. (1992) *Proteins* **12**, 75-86
35. Yip, K. S., Stillman, T. J., Britton, K. L., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sedelnikova, S. E., Engel, P. C., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Scandurra, R., and Rice, D. W. (1995) *Structure* **3**, 1147-1158
36. Venard, R., Jallon, J. M., Fourcade, A., Iwatsubo, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* **57**, 371-378
37. Veronese, F. M., Boccu, E., and Conventi, L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 217-228
38. Lascu, I., Barzu, T., Ty, N. G., Ngoc, L. D., Barzu, O., and Mantsch, H. H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 251-260
39. Bonete, M. J., Pérez-Pomares, F., Ferrer, J., and Camacho, M. L. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 14-24
40. Fugo, E. K., Braun E. L., Werner-Washburne, M. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5802-5813
41. Mazón, M. J., and Hemmings, B. A. (1979) *J. Bacteriol.* **139**, 686-689
42. Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Piletici, P., and González, A. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3533-3540
43. Coschigano, P. W., Miller, S. M., and Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4455-4465
44. Liu, Z., and Butow, R. A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6720-6728
45. Shamji, A., Kuruvilla, F. G., and Schreiber, S. L. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 1574-1581
46. Kuruvilla, F. G., Shamji, A. F., and Schreiber, S. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7283-7289
47. Romero, M., Guzmán-León, S., Aranda, C., González-Halphen, D., Valenzuela, L., and González, A. (2000) *Microbiology* **146**, 239-245
48. ter Schure, E. G., van Riel, N. A., and Verrips, T. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 67-83
49. Kwast, K. E., Burke, P. V., and Poyton, R. O. (1998) *J. Exp. Biol.* **201**, 1177-1195
50. Piškur, J. (2001) *Trends Genet.* **17**, 302-303