



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Estudio de la regulación transcripcional del gen
GDH3 y su valor fisiológico en la biosíntesis de
glutamato en *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

p r e s e n t a

BIÓL. LUZ AMARANTA AVENDAÑO VÁZQUEZ

Directora de Tesis:

Dra. Alicia González Manjarrez

Ciudad Universitaria

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Doctora Alicia González Manjarrez. La presente tesis forma parte de un proyecto general en el cual participaron: Lina Riego y Alexander De Luna, en el estudio de la regulación de *GDH1*, la caracterización enzimática de las enzimas GDH-NADP, su sobreexpresión y la generación de la cepa con promotor intercambiado; Cecilia Ishida y Guillermo Romero, realizando los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina; Beatriz Rodarte, que participó, junto con Cristina Aranda, en los experimentos de tipo northern blot de *DAL5*, Cristina Aranda también tuvo un aporte sustancial en los experimentos de análisis de la estructura de la cromatina de *GDH3*; y Sergio Zonszein que realizó los experimentos de localización subcelular de Gln3p.

Durante el trabajo experimental, se contó con la invaluable ayuda técnica de la Química Cristina Aranda Fraustro y la Q. B. P Miriam Vázquez-Acevedo.

El apoyo técnico de los miembros de la Unidad de Biología Molecular, del IFC, a cargo de la Dra. Laura Ongay, fue fundamental para el desarrollo de este proyecto de investigación, al igual que el apoyo del personal de la Unidad de Cómputo, a cargo de Gerardo Coello.

La investigación fue parcialmente financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto U40506Q) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN221103-2). Además, se contó con el apoyo de una Beca para estudios de Doctorado (agosto de 1997 a agosto de 2002) y dos donativos (PAEP 102303 y PAEP 201308), por parte de la Dirección General de estudios de Posgrado de la UNAM.

El Comité Tutorial estuvo conformado por los Doctores: Fernando Bastarrachea Avilés, Félix Recillas Targa, Roberto Coria Ortega y Alicia González Manjarrez.

Los Doctores Fernando Bastarrachea Avilés, Gloria Soberón Chavez, Rosa Laura Camarena Mejía, Félix Recillas Targa, Roberto Coria Ortega, Arturo Carlos Becerra Bracho y Alicia González Manjarrez, revisaron críticamente este documento y conformaron el Jurado de Examen de Grado.

En honor a mis pequeñas hijas, me permito citar la historia de una princesa.

“La mano de la princesa”

Una conocida serie checa de dibujos animados cuenta, en sucesivos capítulos, la historia de una

princesa cuya mano es disputada por un gran número de pretendientes.

Estos deben convencerla: distintos episodios muestran los intentos de seducción que despliega cada uno de ellos, de los más variados e imaginativos.

Así, empleando diferentes recursos, algunos más sencillos, y otros verdaderamente magníficos, uno tras otro pasan los pretendientes pero nadie logra conmovier siquiera un poco a la princesa. Recuerdo por ejemplo a uno de ellos mostrando una lluvia de luces y estrellas; a otro, efectuando un majestuoso vuelo y llenando el espacio con sus movimientos. Nada. Al fin de cada capítulo aparece el rostro de la princesa, el cual nunca deja ver gesto alguno.

El episodio que cierra la serie nos proporciona el impensado final; en contraste con las maravillas ofrecidas por sus antecedentes, el último de los pretendientes extrae con humildad de su capa un par de anteojos, que da a probar a la princesa: esta se los pone, sonrío y le brinda su mano.

Pablo Amster

En *Matemática...¿estás ahí?* de Adrián Paenza.

El binomio de Newton es tan hermoso como la venus de Milo;
lo que pasa es que muy poca gente se da cuenta.

Fernando Pessoa.

*Dedico esta tesis a mis padres Alberto y Etelvina,
a quienes les debo todo.*

*A mis queridas hermanas Eréndira y Odette,
por su amor a toda prueba.*

A mis pequeños amores Muriel y Olivia.

*A Jorge,
por ser mi compañero y amor.*

A mi amiga Cristi.

*Y a la memoria de mis abuelos: Luz y Gabriel,
Alberto y Ofelia,
y de mi suegro Carlos Tazzoli.*

Muchos son los momentos que recuerdo ligados al laboratorio y a toda la gente con quienes tuve la suerte de convivir y trabajar en él, es uno de los espacios más importantes que he tenido en mi vida y la ha marcado profundamente. Pero quiero mencionar un momento en particular, que he tenido presente todos estos años, cuando Carlos Castillo Pompeyo, quien había sido mi profesor durante un semestre en la Facultad de Ciencias, me llevó por primera vez al laboratorio y me presentó con Alicia. El sabía de mi interés en aprender y trabajar en lo que más me gusta, la investigación científica, y no dudó de que fuera yo la persona indicada para estar con La Doctora González, como él, con énfasis especial la llamaba . Y recuerdo la siguiente escena a la perfección, como si hoy la viera: él, de pie en el cubículo de Alicia, con los ojos cerrados y las manos extendidas, en señal de que las ponía en el fuego por mí. Ese gesto no lo he olvidado nunca, es la mejor carta de recomendación que me han dado, siempre me ha acompañado, y sinceramente espero que no lo haya defraudado. Gracias a la generosidad de Carlos, por lo que vio en mí, su confianza en mi capacidad, y gracias también a Alicia, que prolongó esa confianza durante muchos años, y así tuve la fortuna de una de las experiencias más importantes de mi vida.

Agradezco

Lo más interesante que hay en este país, no se ve.

El país de la magia

Henri Michaux

A la Dra. Alicia González por la oportunidad de participar en este proyecto y en su grupo de trabajo, por guiarme y enseñarme con su ejemplo. Por mostrarnos su entusiasmo y compromiso con el trabajo científico y el ser universitario, más allá del laboratorio.

La generosa disposición de los miembros de mi comité tutorial integrado por los doctores Fernando Bastarrachea, Félix Recillas y Roberto Coria. La atención que me brindaron fue un aliciente importantísimo en cada paso de este proyecto de investigación y mi formación académica. Con sus comentarios y propuestas me permitieron superar los problemas y los retos.

A los miembros del jurado en mi examen, por su comprensión, recomendaciones y comentarios.

A mis profesores, tanto en el IFC como en la Facultad de Ciencias, que me ofrecieron pacientemente su guía y conocimientos.

A Paola Ballario y Patrizia Filetici por recibirme en su laboratorio. A sus alumnas Prisca, Emanuela, Silvia, y Daniela, por su cálida hospitalidad.

Al personal administrativo del Doctorado en Ciencias Biomédicas, y al del IFC, por su apoyo y disposición.

Al personal de la Unidad de Biología Molecular y la Unidad de Cómputo del IFC, por su invaluable apoyo.

A Lina Riego y Alexander De Luna, por su compañía inspiradora y estimulante en la aventura didáctica, que fue explorar el universo GDH.

A Cristina Aranda por su excelente disposición, por su generosidad a toda prueba y por sus conocimientos. Gracias, también, a su familia: Plinio, Agni e Inari.

A Miriam Vázquez por su entusiasmo, profesionalismo y alegría para encarar cualquier tarea.

A Valentín Mendoza, por su disposición y ayuda siempre positivas y valiosas.

A Soledad Guevara, por su ejemplo, que es la síntesis de la excelencia y el amor al trabajo.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio, donde compartimos horas gratas e ingratas pero memorables todas. Otra vez, Cris Aranda porque su ayuda es fundamental. A Lina por ser algo así como la hermana mayor de todos. A Mauricio y Alex por sus descomposiciones melódicas. A Sandra Lupo, por su apoyo de este lado del Ecuador. A Lourdes, que quiso ser mi maestra y me mostró el valor de la constancia; Simón, que me enseñó a ser paciente, y Augusto, a los tres por ser parte de mi grupo de inicio en el 301. A Ceci por toda su ayuda. A Carlos y Lalo, tan distintos entre sí, pero igual de generosos. A Martín, Adriana, Gerardo, Luis Bernardo, Ekaterina, Claudia, Cristina, Xitlali y Victor, por permitirme aprender de cada uno. A Alejandra que nos sostiene a todos con su labor.

A Marichuy y Norberto por su cariño, y porque con su visita renovaron mi ánimo.

A Catherine por ser mi amiga y por su ejemplo, que me inspira a ser mejor.

A Marco, Adrián, Dago, Armando, Gerardo y Erika por el cariño y la amistad que permanece a pesar del tiempo y los miles de kilómetros.

A Froylan, por esa forma tan particular de ser. A Agustín por los buenos momentos.

A Patricia Ronis, que me ha ayudado a transitar con tranquilidad los primeros meses de vida de Olivia, comprender los primeros años y las necesidades de Muriel; lo que me ha permitido aprender de mí misma durante la escritura de la tesis y el cuidado de mis bebés. Igualmente, gracias a otras líderes y mamás dentro de LLL Argentina.

A Francisco, Bettina, Triana y Nicolás, por su amistad y cariño.

A Daniel, Angie, Malen, Zoe y Theo, por ser parte de mi familia en tierras Argentinas.

A mis abuelos Luz y Gabriel y mi tío Nef, por su cariño hacia mi familia.

A mi Tía y tíos, y primas Avendaño.

A mis padres Alberto y Etelvina, por su amor y confianza. Por enseñarme y permitirme ser libre.

A mis hermanas Eréndira y Odette, por su amor, por ser mis amigas y las mejores compañeras.

A mis hijas Muriel y Olivia, que llenan de felicidad mi vida con su hermosura.

A Jorge por su amor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO

i. RESUMEN.....	1
ii. RESUMEN EN INGLÉS.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Un modelo para el estudio de la célula eucarionte.	
2. La duplicación del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
3. Las GDH-NADP ⁺ del Metabolismo Central de Nitrógeno de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
4. La estructura de la cromatina y su relación con la regulación transcripcional.	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
1. Clonación de la región promotora de <i>GDH3</i> , e identificación de los sitios probables de unión de factores transcripcionales.	
2. Actividad transcripcional de <i>GDH3</i> en diferentes condiciones de cultivo.	
3. Efecto de algunos factores transcripcionales sobre la expresión de <i>GDH3</i> .	
4. Determinación del arreglo nucleosomal del promotor de <i>GDH3</i> .	
5. Los complejos SAGA y SWI/SNF y la regulación de <i>GDH3</i> .	
6. Efecto de los complejos remodeladores sobre la estructura de la cromatina del promotor del gen <i>GDH3</i> .	
Consideraciones finales	

V. CONCLUSIONES.....	99
----------------------	----

VI. PERSPECTIVAS.....	102
-----------------------	-----

VII. RESULTADOS PUBLICADOS.....	104
---------------------------------	-----

Artículo

VIII. REFERENCIAS.....	105
------------------------	-----

IX. APÉNDICE I.....	125
---------------------	-----

Protocolos

1. Protocolo para la obtención de DNA no cromatinizado de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando β -glucoronidasa.
2. Protocolo para la preparación de cromatina de *Saccharomyces cerevisiae*.
 - a) Digestión *in vivo* con DNasaI
 - b) Digestión *in vivo* e *in vitro* con Nucleasa Micrococcal (MNasa).

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

I. INTRODUCCION

- Cuadro 1** Genes onhólogos que se regulan diferencialmente en aerobiosis o anaerobiosis.
- Cuadro 2** Fenotipos de proliferación y actividades de GDH-NADP de distintas cepas portadoras de plásmidos recombinantes.
- Figura 1** Filogenia aproximada y algunos eventos de la evolución metabólica de los hemiascomicetos.
- Figura 2** Metabolismo Central de Nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 3A** Regulación de la actividad de Gln3p por la vía TOR.
- Figura 3B** Dominios estructurales de Gln3p y su regulación por TOR en respuesta a la disposición de nutrientes.
- Figura 4** Regulación de Gln3p por la vía TOR y las ligasas de ubiquitina.
- Figura 5** Modelo hipotético de la participación de los complejos remodeladores en la regulación génica.
- Figura 6** Posibles modificaciones postranscripcionales en el extremo N-terminal de las histonas.
- Figura 7** El complejo SAGA de *Saccharomyces cerevisiae*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Figura 8** Secuencia promotora del gen *GDH3*.
- Figura 9** Representación esquemática del promotor de *GDH3*.
- Figura 10** Efecto del etanol como fuente de carbono en la expresión de *GDH3*.
- Figura 11** Efecto de la Represión Catabólica por Carbono (CCR) en la expresión de *GDH3*.
- Figura 12** Efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la expresión del gen *GDH3*.
- Figura 13** Efecto de la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR) sobre la transcripción del gen *GDH3*.

- Figura 14** Ensayo tipo Northern de la expresión transcripcional de *GDH3* en cultivos prolongados en medio rico (YPD).
- Figura 15** Perfil de expresión de *GDH3*, *GDH1* y *GLT1* en cultivos prolongados en medio rico (YPD).
- Figura 16.** Actividad enzimática de GDH-NADP de la cepa silvestre y las mutantes *gdh1Δ* y *gdh3Δ* en cultivos prolongados.
- Figura 17** Expresión transcripcional de *GDH3* en mutantes afectadas en los factores tipo GATA: Gln3p, Gat1p y Dal80p.
- Figura 18** Localización subcelular de Gln3p.
- Figura 19** Expresión transcripcional de *GDH3* en mutantes afectadas en componentes del complejo HAP.
- Figura 20** Análisis de baja resolución de la sensibilidad al corte de DNAsal de un fragmento de 5 kpb alrededor del gen *GDH3*.
- Figura 21** El promotor de *GDH3* muestra un arreglo de la cromatina abierto o cerrado, en cultivos en etanol o glucosa, respectivamente.
- Figura 22** Expresión transcripcional del gen *GDH3* en mutantes afectadas en componentes de los complejos remodeladores de la cromatina SAGA y SWI/SNF.
- Figura 23** La acetilasa Gcn5p y la desacetilasa Hda1p se unen al promotor de *GDH3*.
- Figura 24** El remodelamiento de la cromatina del promotor de *GDH3* en cultivos en etanol depende de Gcn5p y de Snf2p.
- Figura 25** Actividad de β-galactosidasa de un fragmento de 600 pb del promotor de *GDH3*, en etanol como fuente de carbono.
- Figura 26** El remodelamiento de la cromatina del promotor de *GDH3* en la fase estacionaria depende de Gcn5p.
- Figura 27** El remodelamiento de la cromatina del promotor del gen *GDH3* depende de *SNF2* en la fase estacionaria.
- Figura 28** Expresión transcripcional de *GDH3* y *DAL5* en medio rico (YPD).

ABREVIATURAS

CCAAT	Secuencia en el DNA a la que se une el complejo HAP
GATA	Secuencia en el DNA a la que se unen los factores tipo GATA, como Gln3p.
DNAsal	Enzima que introduce cortes dobles en la hebra de DNA
FCI	Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
HAT	Acetil transferasa de histonas
LacZ	Gen de <i>E. coli</i> que codifica la enzima β -Galactosidasa
MM	Medio mínimo para cultivo de levaduras con fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas, sales y elementos traza
MNasa	Nucleasa Micrococcal. Corta el DNA en el espacio entre nucleosomas
NCR	Represión catabólica nitrogenada (<u>N</u> itrogen <u>c</u> atabolite <u>r</u> epresión)
pb	Par (es) de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDS	Secuencia en el DNA a la que presuntamente se unen proteínas que regulan durante la transición diáuxica
SGD	Base de datos del genoma de <i>S. cerevisiae</i> (<u>S</u> accharomyces <u>G</u> enome <u>D</u> atabase)
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
UAS	Secuencia activadora que regula río arriba del inicio de transcripción
URR	Región de represión río arriba del inicio de transcripción
YPD	Medio rico para levadura con peptona, glucosa y extracto de levadura.

GENES Y OTRAS NOTACIONES

ABF1	Regulador positivo con posible actividad reorganizadora de la cromatina
ACT1	Gen de actina
ADA	Complejo remodelador de la estructura de la cromatina con actividad de acetiltransferasa de histonas
Ada1p	Producto del gen <i>ADA1</i> , componente de los complejos ADA y SAGA
ADA2	Gen de la subunidad Ada2p, componente de los complejos ADA y SAGA
ada2Δ	Mutante por interrupción del gen <i>ADA2</i>
ADA3	Gen de la subunidad Ada3p, componente de los complejos ADA y SAGA
ada3Δ	Mutante por interrupción del gen <i>ADA3</i>
AreA	Factor transcripcional tipo GATA de <i>Aspergillus nidulans</i> , homólogo a <i>GLN3</i> de <i>S. cerevisiae</i>
DAL80/UGA43	Represor general de los genes del metabolismo de nitrógeno
DEH1/GZF3	Represor de los genes del metabolismo de nitrógeno
Deh1p/Gzf3p	Producto del gen <i>DEH1</i>
DNAsal	Enzima con actividad de nucleasa
FLO9	Gen de la floculina Flo9p que participa en floculación
FKBP	Receptor intracelular de la rapamicina, se une a la rapamicina e inhibe específicamente a las proteínas TOR
GAP1	Permeasa general de aminoácidos
GAT1/NIL1	Activador general de los genes del metabolismo nitrogenado. Factor transcripcional tipo GATA
GATA-1	Factor transcripcional de la familia GATA de eucariotes superiores
GCN4	Factor transcripcional que regula el inicio de la vía del control general de la biosíntesis de aminoácidos

<i>gcn4Δ</i>	Mutante por interrupción en el gen <i>GCN4</i>
<i>GCN5</i>	Codifica la acetil transferasa de histonas Gcn5p, componente de SAGA y ADA
<i>gcn5Δ</i>	Mutante por interrupción en el gen <i>GCN5</i>
<i>GDH-NAD</i>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH
<i>GDH-NADP</i>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH
<i>GDH1</i>	Gen de la Glutamato deshidrogenasa anabólica, dependiente de NADH. Homólogo de <i>GDH3</i>
<i>GDH2</i>	Gen de la Glutamato deshidrogenasa catabólica, dependiente de NADPH.
<i>GDH3</i>	Gen de la Glutamato deshidrogenasa anabólica, dependiente de NADPH. Homólogo de <i>GDH1</i>
<i>gdh1Δ</i>	Mutante por interrupción del gen <i>GDH1</i>
<i>gdh3Δ</i>	Mutante por interrupción del gen <i>GDH3</i>
<i>GLN1</i>	Gen de la Glutamino Sintetasa
<i>GLN3</i>	Activador general de los genes del metabolismo nitrogenado
<i>Gln3p</i>	Producto del gen <i>GLN3</i>
<i>GLT1</i>	Gen de la Glutamato sintasa
<i>GOGAT</i>	Producto del gen <i>GLT1</i>
<i>GS</i>	Producto del gen <i>GLN1</i>
<i>H2A</i>	Histona H2A, componente del nucleosoma
<i>H2B</i>	Histona H2B, componente del nucleosoma
<i>H3</i>	Histona H3, componente del nucleosoma
<i>H4</i>	Histona H4, componente del nucleosoma
<i>HDA</i>	Complejo de deacetilación de histonas
<i>HDA1</i>	Gen de la desacetilasa de histonas Hda1p.
<i>HAP1</i>	Factor de transcripción, se une al DNA dependiente de hemo
<i>HAP2</i>	Factor de transcripción, forma parte del complejo HAP, y posee un motivo de unión a DNA
<i>hap2Δ</i>	Mutante por interrupción en el gen <i>HAP2</i>

HAP2/3/4/5	Complejo multiprotéico HAP. Controla los genes de la biogénesis mitocondrial.
HAP3	Factor de transcripción que forma parte del complejo HAP, posee motivo de unión a DNA
hap3Δ	Mutante por interrupción del gen <i>HAP3</i>
HAP4	Subunidad de activación del complejo HAP
hap4Δ	Mutante por interrupción del gen <i>HAP4</i>
HAP5	Factor de transcripción que forma parte del complejo HAP
HIS3	Gen de la biosíntesis de histidina
ISWI	Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP
MIG1	Represor transcripcional que actúa en presencia de glucosa
mig1Δ	Mutante por interrupción del gen <i>MIG1</i>
MIG2	Represor transcripcional que actúa en presencia de glucosa
mig2Δ	Mutante por interrupción del gen <i>MIG2</i>
MNA_{sa}	Nucleasa micrococcal, puede generar mononucleosomas
MSN2	Factor transcripcional que actúa como dímero con Msn4p
MSN4	Factor transcripcional que actúa como dímero con Msn2p
NIT2	Factor transcripcional tipo GATA de <i>Neurospora crassa</i> , homólogo de <i>GLN3</i>
RSC	Complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP
RPD3	Gen de la desacetilasa de histonas Rpd3p
SAGA	Complejo remodelador de la cromatina con actividad de acetiltransferasa de histonas
SNF2	ATPasa, subunidad catalítica del complejo SWI/SNF
snf2Δ	Mutante por interrupción del 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 por interrupción del gen <i>SPT3</i>
Spt7p	Producto del gen <i>SPT7</i> , componente del complejo SAGA
Spt8p	Producto del gen <i>SPT8</i> , componente del complejo SAGA

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
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TFIIB	Complejo basal de transcripción
TOR	Vía de señalización sensible a rapamicina
TOR1	Cinasa sensible a rapamicina
TOR2	Cinasa sensible a rapamicina
Tra1p	Producto de gen <i>TRA1</i> , componente del complejo SAGA
TSA	Tricostatina A
WGD	Duplicación del genoma completo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

LISTA DE PLÁSMIDOS

YEp353	Plásmido con origen de replicación 2 μ , contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y el gen <i>URA3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YEp363	Plásmido con origen de replicación 2 μ , contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> y el gen <i>LEU2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
pGDH3-LEU2	Promotor completo de <i>GDH3</i> (1230 pb) fusionado con el gen <i>lacZ</i> del YEp363. Genera las cepas serie A1
pGDH3-URA3	Promotor completo de <i>GDH3</i> (1230 pb) fusionado con el gen <i>lacZ</i> del YEp353. Genera las cepas serie B
p609	Fragmento de 609 pb del promotor de <i>GDH3</i> fusionado con el gen <i>lacZ</i> del YEp363
pRS426	Plásmido multicopia con origen de replicación 2 μ , contiene el gen <i>URA3</i>
pLAM11	Plásmido pRS426, contiene el gen <i>GDH1</i>
pLAM22	Plásmido pRS426, contiene el gen <i>GDH3</i>
pLAM44	Plásmido pRS426, contiene la región 5' de <i>GDH1-GDH3</i>

LISTA DE CEPAS

CLA1	Silvestre
CLA1-A1	Silvestre portadora del pGDH3- <i>LEU2</i> , isogénica para las cepas
CLA1-609	Silvestre portadora del p609
CLA6-A1	<i>gdh1</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
CLA100-A1	<i>gcn4</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
CLA102-A1	<i>gat1</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
CLA302-0-A1	<i>gln3</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
CLA400-A1	<i>dal80</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
CLA 11	Silvestre portadora del pRS426 (2μ URA3)
CLA 12	Silvestre portadora del pLAM11 (<i>GDH1</i> 2μ URA3)
CLA 13	Silvestre portadora del pLAM22 (<i>GDH3</i> 2μ URA3)
CLA 14	Silvestre portadora del pLAM44 (5'- <i>GHD1</i> - <i>GDH3</i> 2μ URA3)
BWG1-7a-A1	Silvestre transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i> , isogénica con las cepas LWG1-A1 y JP40-A1
LWG1-A1	<i>hap2</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
JP40-A1	<i>hap3</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
Y0000-A1	Silvestre transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i> , isogénica para la cepa Y04959-A1
Y04959-A1	<i>hap4</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
PSY316-A1	Silvestre transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i> , isogénica con las cepas PSY316- <i>gcn5</i> -A1, PSY316- <i>ada2</i> -A1 y PSY316- <i>ada3</i> -A1
PSY316-<i>gcn5</i>-A1	<i>gcn5</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
PSY316-<i>ada2</i>-A1	<i>ada2</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
PSY316-<i>ada3</i>-A1	<i>ada3</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>LEU2</i>
FY2-B	Silvestre transformada con el pGDH3- <i>URA3</i> , isogénica con las cepas FY293-B y FY1656-B
FY293-B	<i>spt3</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>URA3</i>
FY1656-B	<i>snf2</i> Δ transformada con el pGDH3- <i>URA3</i>
GLN3	Silvestre transformada con la fusión <i>GLN3</i> -myc ¹³ -(kan MX6).

i. RESUMEN

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* los productos enzimáticos de los genes ohnólogos (parálogos con un origen común y simultáneo) *GDH1* y *GDH3*, participan en el mismo proceso metabólico: la síntesis de glutamato. Se propone que los genes ohnólogos son producto de la duplicación masiva que tuvo lugar en el genoma de este organismo y que constituyó un paso previo hacia la adquisición del metabolismo facultativo característico de *Saccharomyces cerevisiae*. La presencia aparentemente redundante de las GDH-NADP en la levadura, se debe en parte a su diversidad regulatoria y su especialización bioquímica en la síntesis de glutamato. El objetivo de este trabajo fue conocer la regulación transcripcional de *GDH3* con el fin de entender su papel fisiológico en la biosíntesis de glutamato. De esta forma, se construyeron fusiones entre el promotor de *GDH3* y el gen *LacZ*, se determinó la actividad de β -Galactosidasa en células provenientes de cultivos en glucosa y/o etanol, en diversas fuentes de nitrógeno y distintas fases de crecimiento. Se analizó el efecto sobre la expresión transcripcional de *GDH3* de mutaciones en: *GCN4*, *GLN3*, *GAT1*, *DAL80*, *HAP2*, 3 y 4, *GCN5*, *ADA2*, *ADA3*, *SPT3* y *SNF2*. Así mismo, se determinó el arreglo nucleosomal del promotor de *GDH3*, en varias mutantes de complejos remodeladores y condiciones de cultivo, mediante la digestión con DNAsal y nucleasa micrococcal (MNAsa). Nuestros resultados mostraron que: 1) El gen *GDH3*, se reprime por glucosa y se expresa predominantemente en etanol, la regulación por la fuente de nitrógeno juega un papel menor, 2) El factor Gln3p es un importante regulador de *GDH3*, 3) La mayor desrepresión transcripcional de *GDH3* depende de la naturaleza de la fuente de carbono y la actividad remodeladora de los complejos SAGA y SWI/SNF, 4) La expresión de *GDH3* se induce durante la transición diáuxica y en la fase estacionaria, lo cual depende de la organización de la cromatina y la actividad de factores específicos.

ii. ABSTRACT

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP-dependent glutamate dehydrogenase isoenzymes, encoded by the ohnologs (paralogous) genes *GDH1* and *GDH3*, catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and α -ketoglutarate. It has been proposed that the ohnologs genes are derived from the same duplication event, which greatly increased the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to respond to glucose, under facultative metabolism conditions. The duplicated NADP-glutamate dehydrogenase pathway has been maintained due to the differential expression of the ohnologs *GDH1* and *GDH3*, and the biochemical specialization of the enzymes they encode. The main goal of the present work has been aimed to the understanding of the regulatory mechanism that modulate *GDH3* transcriptional activation. Plasmid *GDH3-LacZ* fusions were constructed and β -galactosidase activity was determined in the cells grown on glucose or ethanol, diverse nitrogenous conditions and growth phases. Strains carrying null mutations in either *GCN4*, *GLN3*, *GAT1*, *DAL80*, *MIG1/2*, *HAP2*, *HAP3*, *HAP4*, *GCN5*, *ADA2*, *ADA3*, *SPT3*, *SNF2*, y *RPD3* were examined for the possible role of these factors in *GDH3* expression. Thus, in order to study nucleosomal organization of *GDH3* promoter, chromatin from the wild-type strain, and several mutants, was digested *in vivo* with micrococcal (MNase) and DNase I enzymes. Our results show that: 1) *GDH3* expression is repressed in glucose-grown cultures and induced under respiratory conditions, *GDH3* carbon mediated regulation is superimposed to that exerted by the nitrogen source, 2) *GDH3* pertains to the nitrogen metabolic network, and its expression is Gln3p-regulated, 3) Complete derepression is ultimately determined by the carbon source through the action of the SAGA and SWI/SNF chromatin remodeling complexes, 4) *GDH3* expression is induced in cells on the diauxic shift and stationary phase, this phenomenon is chromatin and factor specific dependent.

I. INTRODUCCION

1. *Saccharomyces cerevisiae*: Un modelo para el estudio de la célula eucarionte.

Super Reino *Eucarya*
Reino *Fungi*
Phylum *Ascomycota*
Clase *Hemiascomycetes*
Orden *Saccharomycetales*
Familia *Saccharomycetaceae*
Saccharomyces cerevisiae

Levadura: del latín *levare* (levantar)

El término levadura, sin tener carácter taxonómico, agrupa gran variedad de hongos que existen en forma unicelular durante parte de su ciclo de vida y que se reproducen por gemación o división; incluye patógenos del hombre como *Candida albicans*, de plantas como *Ustilago maydis*, y especies inocuas como *Saccharomyces cerevisiae*, de gran importancia biotecnológica [1, 2, 3].

Las levaduras son microorganismos con una amplia dispersión en los hábitats naturales; comunes sobre las hojas de plantas, flores, frutos, suelo y agua salada. Se encuentran, además, sobre la piel y el tracto gastrointestinal y urogenital de animales, donde pueden vivir como simbioses o parásitos [4]. Las levaduras del Phylum *Ascomycota*, llamadas también “levaduras verdaderas”, han sido divididas en tres clases: *Archiascomycetes*, *Euascomycetes* y *Hemiascomycetes*; su clasificación precisa utiliza diversos aspectos de la célula, la ascospora y la colonia. Las características fisiológicas son usadas, también, para la identificación de especies [5].

Uno de los rasgos mejor conocidos del metabolismo de algunos miembros del orden *Saccharomycetales* es su capacidad de fermentar azúcares, aún en presencia de oxígeno, produciendo etanol y bióxido de carbono. La fermentación en condiciones aeróbicas a veces es referida como efecto Crabtree, y las levaduras que pueden llevar a cabo la fermentación en estas condiciones se denominan Crabtree positivas

I. INTRODUCCION

(van Urk *et al.*, 1990), este tipo de levaduras se utilizan ampliamente en la elaboración de vino, cerveza, pan y otros alimentos. *Saccharomyces cerevisiae*, su representante por excelencia, con su gruesa pared y células ovaladas, de aproximadamente 10 μm de largo y 5 μm de ancho, puede fermentar su peso en glucosa por hora, y en condiciones óptimas producir el 18 % de su volumen en etanol [4, 6].

Saccharomyces cerevisiae tiene la capacidad de sobrevivir tanto en condiciones de anaerobiosis como de aerobiosis, siendo un organismo facultativo. La fuente de carbono que le permite la proliferación más alta es la glucosa, pero puede utilizar otros carbohidratos y otras moléculas no fermentables como etanol, glicerol, acetato, etc. En presencia de glucosa, con o sin oxígeno en el medio, la energía, en forma de ATP, es generada a partir de la glucólisis; cuando la concentración de glucosa en el medio disminuye, debido a su consumo, se inducen los genes del metabolismo respiratorio, y en presencia de oxígeno, la célula utiliza el etanol como fuente de carbono, y la síntesis de ATP, por la fosforilación oxidativa, tiene lugar dentro de la mitocondria.

Saccharomyces cerevisiae un compañero del hombre

Del griego *sákchar* σακχαρ-αροζ (latín *saccharum*, azúcar)
y *myckes* μυκηζ (hongo) y del latín *cerevisia* (cerveza).

“Beer is proof that God loves us and wants us to be happy”
Benjamin Franklin

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha acompañado la historia de la humanidad y el desarrollo de la civilización. Los primeros registros escritos acerca de la fabricación de cerveza provienen de Sumeria, hace alrededor de 6,000 años, y se cree que fueron los egipcios los que comenzaron a elaborar pan utilizando levaduras hace 5,000 años [6]. Recientemente McGovern *et. al.* (2004) han encontrado los indicios más antiguos de actividad vitivinícola en fragmentos de cerámica de 7,000 años de antigüedad, en la cuenca del Río Amarillo, al norte de China. Los restos encontrados

I. INTRODUCCION

corresponderían a una bebida fermentada producida a partir de una mezcla de arroz, miel, y uvas o frutos de espino. Sin embargo, se cree que el uso de las levaduras para la fermentación de algún tipo de grano y la obtención de bebidas alcohólicas se remonta a la Mesopotamia de hace 10,000 o 15,000 años [6].

La fermentación contribuye a preservar y enaltecer el valor nutricional de alimentos y bebidas; de esta forma se explica su importancia clave en el desarrollo de la cultura y la tecnología, contribuyendo al avance e intensificación de la agricultura, horticultura, y técnicas de procesamiento de alimentos (McGovern *et al.*, 2004).

En cuanto a su empleo biotecnológico, las levaduras se emplean, también, en la elaboración de alimentos para animales, vitaminas, ácidos orgánicos, insulina, hormona de crecimiento, reciclado de residuos y en la producción de energía mediante la utilización del etanol como combustible (Piskur y Langkjaer, 2004; 6). La importancia de estos microorganismos se ilustra por el hecho de que los primeros productos recombinados aprobados para ser utilizados por humanos, como la vacuna contra la hepatitis B, y la renina, utilizada en la fabricación de quesos, fueron producidos en sistemas de levaduras [7, 8].

Saccharomyces cerevisiae: un modelo para la investigación en la era de los genomas.

Desde hace más de dos siglos *Saccharomyces cerevisiae* se ha consolidado como modelo biológico en la investigación, resultando una herramienta poderosa para entender el funcionamiento de la célula eucarionte y procarionte. La simplicidad de su manipulación en el laboratorio, su rápido crecimiento y proliferación la equipara a las bacterias. Es un modelo muy utilizado en los estudios de genética, al poseer estados sexuales haploides y diploides, donde las mutaciones recesivas pueden ser convenientemente aisladas. Dispone, además, de un sistema de transformación versátil y estable, lo que permite el aislamiento sencillo de mutantes, y el desarrollo de la tecnología de DNA recombinante ha hecho a la levadura particularmente

I. INTRODUCCION

accesible a la clonación de genes y a las técnicas de ingeniería genética. Estas metodologías han sido extensamente explotadas en el análisis de la regulación de la expresión génica, el estudio de la interacción, estructura y función de las proteínas, la estructura cromosomal, y otras cuestiones generales de la biología celular, altamente conservadas entre los organismos eucariontes [7, 8].

Una ventana importante para nuevos tipos de análisis, en cuanto a la estructura, evolución y funcionamiento del genoma eucarionte, se abrió el 24 de abril de 1996, cuando se dio a conocer por primera vez la secuencia completa del genoma de una cepa silvestre, S288C, de *Saccharomyces cerevisiae* (Dujon *et al.* 1996; Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau *et al.*, 1997; 9).

El genoma de esta levadura es relativamente pequeño, con 12,052 kpb, contiene apenas 3.5 veces más DNA que la bacteria *Escherichia coli* y 200 veces menos que una célula de mamífero. El genoma nuclear de una levadura haploide comprende 16 cromosomas, con tamaños comprendidos entre 200 y 2,200 kpb, donde se localizaron 6,183 marcos abiertos de lectura, ORFs, (open-reading-frames) de los cuáles se presume que cerca de 5,700 estarían codificando proteínas (7, 8; Goffeau *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 2002).

A diferencia del genoma de otros eucariontes, el de *S. cerevisiae* es muy compacto, pues cerca del 72 % de la secuencia está constituida por genes, con un tamaño promedio de 1.5 kpb, y sólo el 4.8 % de los ORFs contiene un solo intrón. El intrón promedio de *Saccharomyces cerevisiae* tiene 260 pb y se localiza generalmente hacia el extremo 5' del gen. Esta característica contrasta con lo observado en otros hongos como *Neurospora crassa* o *Schizosaccharomyces pombe*, donde los genes sin intrones son excepcionales (Bon *et al.*, 2003).

Este es un genoma del que se tiene gran cantidad de información ya que cerca del 30 % de los genes han sido caracterizados experimentalmente y aproximadamente la mitad del 70 %, que permanece con función desconocida, presenta similitudes con proteínas o motivos de proteínas ya caracterizados en levadura u otros organismos [7, 8, 9].

Con la secuencia del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, y aún antes de que ésta estuviera completa, se han realizado diversos análisis acerca de la

I. INTRODUCCION

estructura y evolución de un genoma eucarionte. Una particularidad de la organización general de este genoma es que se han encontrado gran cantidad de genes duplicados (Melnick y Sherman, 1993; Kaback, 1995; Goffeau *et al.*, 1996; Mewes *et al.*, 1997).

La duplicación de genes

Amplius redundantiae-amplius mutationis
“ Evolution by gene duplication”
Susumu Ohno, 1970.

Estudios comparativos han sugerido que la duplicación de grandes segmentos de DNA es un proceso continuo durante la evolución de los organismos (Friedman y Hughes, 2001; Koszul *et al.*, 2004); y contribuye a la plasticidad genómica, al ser la fuente primaria de novedad en la evolución biológica del genoma de arqueobacterias, bacterias y eucariontes (Ohno, 1970; Friedman y Hughes, 2001; Koszul *et al.*, 2004; Schacherer *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005a) .

Li *et al.* (2001) han estimado que los genes duplicados en el genoma humano comprenden alrededor del 15 %. De la misma forma, se ha encontrado que las secuencias duplicadas representan el 8 % del genoma de *Drosophila melanogaster*, el 20 % en *Caenorhabditis elegans*, el 16 % en *Saccharomyces cerevisiae* y el 25 % en *Arabidopsis thaliana* (Lynch y Conery, 2000; Wolfe K. H., 2001). Se sabe, también, que los eucariontes poseen mayor proporción de genes duplicados que los procariontes (He y Zhang, 2005a). Grandes incrementos en el número de genes se relacionan con el aumento en la complejidad de los organismos, lo observado en la divergencia hacia diferentes destinos en la historia de los metazoarios, incluso en la transición cordados/vertebrados y durante la divergencia de los peces teleosteos, puede ser un ejemplo de este fenómeno (Rastogi y Liberles, 2005)

La duplicación de segmentos de DNA tiene lugar mediante diversos mecanismos que incluyen la repetición en tándem, la conversión génica, el deslizamiento de la DNA polimerasa, durante la duplicación y recombinación, la

I. INTRODUCCION

transferencia horizontal y otras transposiciones. Puede ocurrir la duplicación de un solo gen o segmento de éste, la duplicación de fragmentos o cromosomas enteros y la auto- o alo-tetraploidía temporal, que seguida de un proceso de pérdida de genes o grandes segmentos de DNA, resulta en una duplicación efectiva del genoma completo (Ohno, 1970; Sankoff, 2001).

Aparentemente los eventos de duplicación conducen a la redundancia, el primer paso en la aparición de nuevas funciones (Ohno, 1970), sin embargo, las teorías de la genética de poblaciones predicen que una duplicación redundante no puede mantenerse en el genoma por largo tiempo, por lo que las mutaciones deletéreas tienden a acumularse y el gen se inactiva (He y Zhang, 2005b). Diferentes hipótesis intentan explicar el destino de los genes duplicados, cualquiera que sea su origen, e hipotetizan cuatro caminos posibles para los genes nuevos:

i) Pérdida de función. Es un proceso neutral que elimina como gen funcional a una de las copias duplicadas, que puede permanecer como un pseudogen o eliminarse en un rearrreglo cromosomal (Sankoff, 2001; Schacherer *et al.*, 2004; Rastogi y Liberles, 2005).

ii) Nueva-Función. Comprende un proceso adaptativo donde después de la duplicación una copia del gen conserva la función ancestral mientras la otra copia muta (cambiando su secuencia codificante o reguladora) hacia una función (o especialización de algún aspecto de su actividad) que no estaba presente en el gen previo a la duplicación. Este mecanismo permite la retención de ambas copias (Ohno, 1970; Sankoff, 2001; Schacherer *et al.*, 2004; Rastogi y Liberles, 2005). Si el gen nuevo conserva todas las funciones del gen ancestral, He y Zhang (2005b) proponen que este proceso se denomine NF-I, si no conserva ninguna NF-II y si conserva algunas NF-III.

iii) Sub-Función. Consiste en la división de la función del gen ancestral entre los dos duplicados. Para explicar esto se considera un gen con dos funciones diferentes, controladas por diferentes elementos regulatorios. Si después de la duplicación la primera función se pierde en el primer gen y la segunda función se pierde en el segundo gen, entonces ambos genes son esenciales y se conservan, al parecer un evento moderado de pérdida de función eleva muchísimo la probabilidad

I. INTRODUCCION

de preservar las duplicaciones (Lynch y Force, 2000; Ward y Durrett, 2004). Ambas copias persisten en el genoma con una alta identidad en su secuencia. En este proceso la novedad adquirida por una o ambas copias puede consistir en una especialización de su actividad hacia un período del desarrollo en particular o tejidos particulares, es decir, se pierde la generalidad del gen ancestral. (Lynch y Force, 2000; Schacherer *et al.*, 2004; He y Zhang, 2005b; Rastogi y Liberles, 2005).

iv) Sub-Neo-Función. Dado que aparentemente ni la hipótesis ii y iii separadas explican el amplio patrón de interacción de proteínas y expresión de los genes duplicados en la levadura y el ser humano. He y Zhang (2005b) proponen un modelo de Sub-Neo-Función (SNF) donde la SF juega un papel muy importante pero transitorio, en la preservación de las copias que subsecuentemente adquirirán nuevas funciones (NF) en un largo proceso que puede llevar millones de años.

He y Zhang (2005a) avanzan sobre la idea de la duplicabilidad de los genes y plantean que, dado que la duplicación es la fuente primaria de nuevos genes, y la complejidad promedio en un genoma puede incrementarse por la duplicación, los genes complejos serían preferentemente duplicados. Entendiendo por genes complejos aquellos que codifican para proteínas más largas, con más motivos funcionales y reguladores. En este proceso los genes complejos tienen mayor probabilidad de ser conservados después de una duplicación debido a su rápida subfuncionalización, la complejidad génica se logra por la subsecuente neofuncionalización. Por lo tanto, el incremento en el número y la complejidad de los genes, son dos factores importantes en el origen y complejidad del genoma de los organismos. Los resultados de este enfoque en su análisis con el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* sugiere, que muchas de las nuevas interacciones entre proteínas han surgido 25 a 100 millones de años después de la duplicación del genoma completo, por lo que el proceso de NF continuó ocurriendo a lo largo del tiempo después del evento de duplicación.

Otro aspecto importante de la duplicación de genes, además de la posibilidad de generar novedad dentro del genoma, es que puede proteger al organismo amortiguando el efecto de perturbaciones ambientales y mutaciones, ya que si la

I. INTRODUCCION

copia de un gen es de alguna manera inactivada, la otra copia con la misma función puede ser usada en su lugar (Meyer, 2003).

2. La duplicación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Only the cistron that became redundant was able to escape from the relentless pressure of natural selection. By escaping, it accumulated formerly forbidden mutations to emerge as a new gene locus.

“ *Evolution by gene duplication*”

Susumu Ohno, 1970.

Una de las características sobresalientes de la estructura del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* es la gran cantidad de genes duplicados que posee. De los cerca de 5700 genes identificados, aproximadamente 1500 son parálogos (aquellos genes derivados de una duplicación) (Gu, 2003), resulta peculiar su número y distribución en grandes regiones a lo largo de todo el genoma (Coissac *et al.*, 1997; Mewes *et al.*, 1997; Wolfe y Shields, 1997;10).

Algo muy semejante se observa en *Arabidopsis thaliana*. En ambos organismos los miembros de los pares de genes duplicados están en el mismo orden a lo largo de dos segmentos distintos del genoma, que son esporádicamente separados por genes únicos. Recientemente Vision *et al.* (2000) propone que cerca de 100 segmentos duplicados encontrados en *A. thaliana* se originaron en cuatro grandes eventos diferentes de duplicación. Aparentemente estas grandes duplicaciones representan la base de la diversificación entre las angiospermas. De manera similar dos duplicaciones genómicas totales pudieron ocurrir, también, en el linaje de los vertebrados (Sidow, 1996).

En contraste, el arreglo de los los genomas de la mosca de la fruta, *Caenorhabditis elegans* y *Candida albicans*, muestra a la mayoría de los parálogos dispersos, independientemente de algunos bloques pequeños de genes duplicados (Rubin *et al.*, 2000).

I. INTRODUCCION

En 1997 Wolfe y Shields, agrupando al 42 % de los genes duplicados de *Saccharomyces cerevisiae*, en 55 bloques distribuidos por todo el genoma, proponen un modelo en el cual la levadura moderna es producto de la fusión de dos hongos ancestrales. Este hemiascomiceto habría evolucionado de un tetraploide que experimentó una duplicación completa en su genoma, anterior a la divergencia filogenética con *Kluyveromyces lactis* (Keogh *et al.*, 1998; Seoighe y Wolfe, 1999; 10). En cada bloque de Wolfe los genes parálogos conservan su orientación transcripcional con respecto al centrómero, ninguna de estas regiones se traslapan entre sí y juntas cubren un poco más del 45 % del genoma. El origen poliploide de *Saccharomyces cerevisiae* había sido propuesto por primera vez en 1987, al analizar la duplicación existente en el locus de los genes que codifican las histonas H3-H4 y H2A-H2B (Smith, 1987).

Se ha generado una acalorada polémica acerca del origen poliploide de *Saccharomyces cerevisiae* y los genes que aparecen duplicados en su genoma. Varios grupos dudan de la posibilidad de que una meiosis aberrante permitiera el curso de *S. cerevisiae* desde la tetraploidía a la haploidía actual, como en un principio proponía el grupo de Wolfe (Wolfe y Shields, 1997). Tomando en cuenta la evidencia de una amplia heterogeneidad en el tamaño y los tiempos de duplicación de genes, o fragmentos cromosomales, dentro de un mismo bloque definido por Wolfe, proponen que el gran número de duplicaciones presentes en el genoma de la levadura actual, son producto de la acumulación de eventos múltiples de duplicación y pérdida de segmentos de DNA, no de un evento masivo. (Llorente *et al.*, 2000a, Llorente *et al.*, 2000b; Hugues y Friedman, 2003; Koszul *et al.*, 2004).

Aunque hipotéticamente esta posibilidad existe, varios autores consideran que no explicaría las duplicaciones en algunas levaduras modernas, y que no es adecuada para explicar la organización y la localización relativa de todos los bloques en *Saccharomyces cerevisiae* (Keogh, 1998; Piskur, 2001; Dietrich, 2004; Kellis, 2004)

Considerando esto, estudios posteriores al de Wolfe en 1997, donde se analizan las duplicaciones que comparte *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* (Seoighe y Wolfe, 1998; Seoighe y Wolfe, 1999) o se observa el

I. INTRODUCCION

patrón particular de la distribución de los genes duplicados en *Saccharomyces* con respecto a otros eucariontes como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Friedman y Hughes, 2001), apoyan la teoría de la duplicación ancestral, WGD (Whole Genome Duplication).

Gracias a la información disponible sobre las secuencias genómicas, 4 completas y 10 parciales, de 14 hemiascomicetos comprendidas en el proyecto Génolevures [11]. El grupo de Wolfe (Wong, 2002; Wolfe, 2004) confirma y extiende el mapa inicial de regiones hermanas en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Su análisis en esta oportunidad es diferente, pues no sólo comprende a aquellos genes que se encuentran duplicados en la secuencia del genoma, sino que considera la sintenia de los genes. Es decir, cuando un par de genes se ubican sobre el cromosoma de una especie en un cierto orden y orientación, y conservan ese orden y orientación sobre el cromosoma de otra especie, se dice que son sinténicos. Se sabe también que el grado de sintenia entre varias especies de levadura decrece en tanto la distancia filogenética se incrementa (Piskur, 2001). Varios autores han reportado la conservación del orden de los genes entre los hemiascomicetos, particularmente entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces waltii* o *Ashbya gossypii* [11, 12, 13]. Por lo que apoyan, también, la teoría de la duplicación ancestral (Keogh, 1998; Dietrich *et al.*, 2004; Kellis *et al.*, 2004).

Considerando el criterio de sintenia, las regiones hermanas en el genoma de *Saccharomyces* pueden ser identificadas aun cuando no retengan ningún gen duplicado. De esta forma, con la referencia de 14 genomas de hemiascomicetos [11], Wong *et al.* (2002) identifican 112 regiones conservadas, que incluyen 4,561 de los 5,583 genes de *Saccharomyces cerevisiae*, abarcando el 82 % del genoma total. Además, agrupan las 16 regiones centroméricas de *S. cerevisiae* en 8 pares. En vista de que el número de centrómeros debe ser igual al número de cromosomas, el genoma de esta levadura evolucionó de un ancestro con 8 cromosomas que se duplicaron junto con su correspondiente centrómero. La duplicación exacta de los centrómeros, de 8 a 16, sólo pudo haber ocurrido mediante una poliploidización y no

I. INTRODUCCION

por duplicaciones individuales (Keogh *et al.*, 1998; Seoighe y Wolfe, 1999; Dietrich *et al.*, 2004; Friedman y Hughes, 2001; Kellis *et al.*, 2004; Wolfe, 2004).

Con la información que ofrecen las secuencias parciales o totales de Génolevures [11], y otras fuentes de datos [12, 13], se ha podido construir la filogenia de los hemiascomicetos y ubicar en ella el momento en que tuvo lugar la duplicación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1**), (Dietrich *et al.*, 2004; Kellis *et al.*, 2004; Wolfe, 2004; Wong *et al.*, 2002).

Aproximadamente el 13% de los parálogos de la levadura de la cerveza actual se habrían generado en el evento de poliploidía ancestral (Seoighe y Wolfe, 1998; Seoighe y Wolfe, 1999). Lo que comprende cerca de 500 parejas de genes, para los que Wolfe (2004) sugiere el término de “ohnólogos”, en honor a Susumu Ohno. De esta manera, busca diferenciarlos de otros parálogos y hacer patente su origen común y simultáneo. Estos ohnologos estarían agrupados en 52 bloques, con tres o más genes duplicados, y 32 bloques con por lo menos dos genes duplicados, que cubren el 45.5 % del genoma. Wolfe propone que el paleopoliploide ancestral de *Saccharomyces cerevisiae* experimento diversos eventos de traslocación, pérdida de genes, y fragmentos de cromosomas, a lo largo de su historia evolutiva (Wolfe, 2004). Como se ha observado que la duplicación y pérdida de DNA es un proceso dinámico en *Saccharomyces cerevisiae* y otros organismos eucariontes (el maíz, el sorgo, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*) en el caso de esta levadura las duplicaciones que se observan hoy son, en realidad, el resultado de la suma de la WGD y de diversos y numerosos eventos posteriores (Seoighe y Wolfe, 1999; Friedman y Hughes, 2001).

El momento en el cual se produjo la duplicación del genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* también ha sido motivo de polémica. En trabajos recientes se calcula un tiempo aproximado de 150-200 millones de años (Friedman y Hughes, 2001; Hughes y Friedman, 2003). Sí esto fuera así, el origen y diversificación de las angiospermas (hace 140-180 millones de años, Bell *et al.*, 2005), cuyos frutos proporcionan un hábitat natural para la levadura, coincide y podría ser un hecho clave en el curso de la evolución del metabolismo de este organismo.

I. INTRODUCCION

Aparentemente la WGD proveyó del material genético que sirvió de base para un remodelamiento metabólico a gran escala, incluyendo el desarrollo de una vía de represión de glucosa eficiente y una independencia por oxígeno (Piskur y Langkjaer, 2004). El desarrollo del linaje de *Saccharomyces* aparentemente tuvo ventaja competitiva, al proliferar rápidamente con o sin oxígeno y producir etanol, que resulta tóxico para sus competidores bacterianos. Tan es así, que interacciones y competencia levadura-bacteria, en ausencia de oxígeno con producción de etanol, se pueden encontrar actualmente en el ecosistema de la uva del vino (Fleet, 2003)

Observando la lista de ohnólogos compilada en los estudios recientes, es evidente que la duplicación del genoma juega un papel directo en la adaptación del linaje de *Saccharomyces cerevisiae* al metabolismo facultativo y la capacidad de proliferar con o sin oxígeno (Piskur, 2001; Wolfe, 2000). De esta forma, algunos de los genes duplicados han modificado su expresión para hacerla dependiente de la presencia o ausencia de oxígeno y glucosa (**Cuadro 1, Figura 1**).

De las 500 parejas de genes ohnólogos, 117 pares tienen un miembro que se regula diferente con respecto al oxígeno, 73 genes se inducen en anoxia y 113 en aerobiosis; 247 son regulados por Rox1p, un represor de respuesta a anaerobiosis, algunos ejemplos se presentan en el **Cuadro 1** (Wolfe y Shields, 1997, Kwast *et al.*, 2002). En relación con esto, también, se han identificado parejas de ohnólogos que participan significativamente en el metabolismo de carbono, como los genes de los sensores de glucosa, *SNF3* y *RGT2*, y reguladores de los transportadores de hexosas, *MTH1* y *STD1*. Se piensa, por ejemplo, que la WGD modificó de manera importante la vía de la cinasa Snf1p, que reprime la gluconeogénesis y la respiración en presencia de altas concentraciones de glucosa, cuando se generó el par de ohnólogos que codifican una cinasa específica para glucosa, *HXK2*, y otra no específica, *HXK1*; y por la presencia de otro par de genes duplicados, *GAL83* y *SIP2*, que actúan como subunidades reguladoras de la cinasa Snf1p (Wolfe, 2004).

Otra vía de respuesta a glucosa que adquirió complejidad gracias a la duplicación del genoma fue la de la proteína cinasa A, en la que participan los pares ohnólogos de las glucocinasas Glk1p/Emi2, las proteínas G Ras1/Ras2, las

subunidades de cinasa Tpk1/Tpk3, y los factores de transcripción Msn2p/Msn4p (Wolfe, 2004).

3. Las GDH-NADP del Metabolismo Central de Nitrógeno de *Saccharomyces cerevisiae*

Metabolismo de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* los productos enzimáticos de los genes homólogos *GDH1* y *GDH3*, participan en la misma función metabólica, la asimilación de nitrógeno y la biosíntesis de glutamato.

El nitrógeno (N₂) constituye el 80% de la atmósfera de la Tierra, pero a pesar de su abundancia, no es metabólicamente accesible para la mayoría de los seres vivos. Sólo algunos organismos pueden utilizar el nitrógeno, tomándolo directamente del ambiente, entre estos, denominados fijadores de nitrógeno, encontramos algunas bacterias del suelo como *Klebsiella* y *Azotobacter*, cianobacterias como *Nostoc* y *Anabaena*, y bacterias simbióticas como *Rhizobium*. Una vez reducido, en forma de amonio, que es el punto de partida en la síntesis de dos aminoácidos fundamentales: el glutamato y la glutamina que, con la transferencia de sus grupos amino y amido dan lugar a la generación de aminoácidos, nucleótidos, aminoazúcares y todos los demás compuestos nitrogenados, necesarios para el crecimiento y la proliferación celular.

En su hábitat natural *Saccharomyces cerevisiae* encuentra gran variedad de fuentes de nitrógeno. Todas las fuentes de nitrógeno a las que tiene acceso son convertidas a amonio y a glutamato. Sin embargo, la utilización de las moléculas nitrogenadas del ambiente no es aleatoria, la levadura está provista de todo un sistema metabólico que le permite seleccionar la mejor fuente de nitrógeno. Fuentes primarias o buenas como el amonio, la glutamina y la asparagina, sostienen niveles de proliferación altos; en tanto que, las que por esta razón se han definido como

I. INTRODUCCION

fuentes secundarias o pobres, como la prolina o la urea, no son capaces de hacerlo (Cooper, 1982).

El mecanismo por el cual *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de seleccionar la fuente de nitrógeno que permite el mejor crecimiento se llama represión catabólica nitrogenada, NCR (Nitrogen Catabolite Represión) (Cooper y Sumrada, 1983; ter Schure *et al.*, 2000). La represión catabólica nitrogenada es la respuesta fisiológica que lleva a la inactivación de la expresión de genes como respuesta a la fuente de nitrógeno en el medio (Cooper y Sumrada, 1983). Es decir, cuando una buena fuente de nitrógeno, como la glutamina, la asparagina o el amonio, es adicionada al medio donde las células de levadura se cultivan en una mala fuente de nitrógeno, prolina o urea, la transcripción de los genes implicados en la utilización de la fuente pobre es reprimida y sus correspondientes productos son inactivados y degradados (Wiame *et al.*, 1985, Magasanik *et al.*, 1992). En contraste, cuando la concentración intracelular de algún aminoácido disminuye, se inducen los genes que codifican las enzimas de la maquinaria de biosíntesis de aminoácidos (Hinnebush, 1992).

De forma paralela, en el metabolismo de carbono sucede algo parecido. *Saccharomyces cerevisiae* y muchas otras levaduras pueden prosperar en gran variedad de fuentes de carbono, sin embargo, la glucosa y la fructosa son las preferidas, ya que permiten la proliferación más exitosa. Cuando uno de estos azúcares está presente en el medio, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes alternativas de carbono no se sintetizan o son sintetizadas a tasas muy bajas. Y este fenómeno es conocido como Represión Catabólica por Carbono, CCR (Carbon Catabolite Repression) (Gancedo, 1998).

El glutamato ocupa una posición central en el metabolismo de nitrógeno. En las levaduras y otros organismos eucariontes, cerca del 88 % del nitrógeno celular proviene del grupo amino del glutamato, el 12 % de la glutamina (Reitzer y Magasanick, 1987). Por lo anterior, ter Schure *et al.*, (2000), propone llamar a las vías metabólicas de interconversión de amonio, glutamato y glutamina, el Metabolismo Central de Nitrógeno, CNM (Central Nitrogen Metabolism) (**Figura 2**).

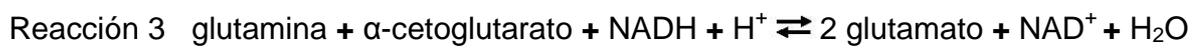
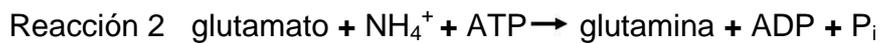
Existen dos vías metabólicas de asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato altamente conservadas entre los organismos, ya que se encuentra en

I. INTRODUCCION

levaduras, bacterias, hongos, algas y plantas superiores (Tempest *et al.*, 1970; Senior, 1975; Bastarrachea *et al.*, 1980; Hummelt y Mora, 1980; Marqués *et al.*, 1992;). En una de ellas, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH, Reacción 1) cataliza de manera reversible la biosíntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio.



La segunda vía, descrita en *Klebsiella aerogenes*, por Tempest *et al.*, (1970), consiste en un ciclo donde participan la enzima glutamato sintetasa (GS, Reacción 2) y la glutamato sintasa (GOGAT, Reacción 3). La GS sintetiza glutamina, a partir de glutamato y amonio, y la GOGAT cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato, al transferir el grupo amido de la glutamina y generar dos moléculas de glutamato.



En procariontes, protistas y hongos, las GDH son específicas para NAD^+ o para NADP^+ , mientras que las descritas en vertebrados pueden funcionar con ambos cofactores. Por lo anterior, se considera que las GDH-NAD son responsables del catabolismo de glutamato, mientras que las GDH-NADP son enzimas anabólicas que participan en la asimilación de amonio (Smith, 1975). Las GDH son enzimas ampliamente distribuidas en todos los grupos filogenéticos (Hudson y Daniel, 1993). Todas las GDH reportadas a la fecha son enzimas multiméricas que constituyen una familia dentro de la superfamilia de las deshidrogenasas de aminoácidos, que parece haber evolucionado por duplicación génica y especialización en diferentes sustratos (Britton *et al.*, 1992).

En *Escherichia coli*, la vía GDH es preferida en condiciones de exceso de amonio. Cuando existe limitación, la vía utilizada es el ciclo GS/GOGAT (Helling, 2004), que parece controlar el metabolismo de nitrógeno y los niveles de α -

I. INTRODUCCION

cetoglutarato, por lo que esta vía aparece como una conexión reguladora entre el metabolismo de carbono y el de nitrógeno (Flores-Samaniego *et al.*, 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* se cree que el ciclo GS/GOGAT constituye una vía auxiliar y secundaria para la biosíntesis de glutamato (Valenzuela *et al.*, 1998), y se especula que en ciertas condiciones podría participar en el control de las concentraciones de dinucleótidos (van Riel *et al.*, 1998). En este organismo la vía principal de asimilación de amonio y síntesis de glutamato la constituye la GDH-NADP, codificada por el gen *GDH1* (DeLuna A. *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002). En *Saccharomyces cerevisiae* y en *Neurospora crassa*, la GDH-NADP se utiliza para la incorporación de amonio tanto en condiciones de exceso como de limitación de nitrógeno (Folch *et al.*, 1989; Lomnitz *et al.*, 1987).

En la levadura de la cerveza existe otra GDH-NADP codificada por el onólogo de *GDH1*, *GDH3* que es capaz de mantener una tasa de proliferación baja en una doble mutante *glt1Δgdh1Δ* (Avenidaño *et al.*, 1997). La enzima con función catabólica de GDH-NAD⁺ es codificada por el gen *GDH2*. Se cree que las reacciones catalizadas por las GDH de *Saccharomyces cerevisiae* constituyen un punto de conexión y equilibrio entre el metabolismo del nitrógeno y el de carbono (**Figura 2**) (DeLuna A. *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002).

En células en respiración los genes cuyos productos participan en los tres primeros pasos del TCA, *CIT1*, *ACO1*, *IDH1* e *IDH*, cambian y dejan de ser controlados por el complejo HAP, y pasan al control de *RTG1*, *RTG2* y *RTG3*, lo cual, permite la síntesis de α -cetoglutarato para asegurar glutamato suficiente para los procesos de biosíntesis y para incrementar el flujo del ciclo del glioxilato, elevando la expresión de *CIT2*, asegurando al TCA el suplemento de metabolitos necesario para soportar las vías anabólicas. El glutamato es un potente represor de la expresión de los genes RTG dependientes, mitocondriales y no mitocondriales, por lo que se sugiere que participa en la retroalimentación negativa del sistema RTG (Liu y Butow, 1999).

I. INTRODUCCION

La duplicación de las GDH-NADP de *Saccharomyces cerevisiae*

Al igual que en otros organismos, en *Saccharomyces cerevisiae* el hexámero es la única forma con actividad de GDH-NADP. Esta enzima, que se forma por el ensamblado de dos trímeros, pertenece a la subfamilia de S_GDHs, con monómeros de ≈ 50 kDa.

DeLuna *et al.* (2001) demuestran que la enzima purificada de una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae*, es una mezcla natural de varias isoformas, debidas a la oligomerización aleatoria de las subunidades monoméricas codificadas por *GDH1* y *GDH3*, cuando estos genes se expresan de manera simultánea. Hipotetizan la presencia de siete isoformas (dos homohexámeros y cinco heterohexámeros) que se ensamblarían según la proporción relativa de cada monómero. En forma similar se ha observado la existencia de siete isoformas de GDHs heteroméricas, que se ensamblan *in vivo* como hexámeros híbridos en *Arabidopsis thaliana*, que posee dos genes para GDH (Melo-Olivera *et al.*, 1996).

DeLuna *et al.* (2001) han observado que las isoenzimas codificadas por los ohnólogos *GDH1* y *GDH3*, a pesar de presentar un 87 % de identidad y un 93 % de similitud, difieren en diversos aspectos. Tanto Gdh1p como Gdh3p tienen la misma masa molecular hipotética de 49.6 kDa, sin embargo, en la purificación y caracterización electroforética, Gdh3p aparece con un tamaño menor que Gdh1p, lo cual sugiere la posibilidad de una modificación postraduccional que tenga este efecto. La veracidad de esta suposición no pudo definirse ya que el extremo N terminal de ambas isoenzimas se encuentra bloqueado, por lo que no fue posible secuenciarlo. Al analizar las propiedades cinéticas de ambas isoenzimas encontraron que Gdh1p es más afin por NADP^+ que Gdh3p, y ambas tienen la misma afinidad por amonio. De manera similar, ambas son poco afines por glutamato, lo cual indica una baja capacidad catalítica. Gdh1p es hasta 6 veces más afín por α -cetoglutarato, y Gdh3p tiene 8 veces más afinidad por fosfatos. De manera particular la GDH-NADP de monómeros de *GDH3* presenta un comportamiento cooperativo marcado. Lo cual resulta muy interesante ya que la regulación alostérica sólo se había observado en las GDH de mamíferos. Estos autores concluyen que las

I. INTRODUCCION

propiedades catalíticas *in vivo* dependerán de la proporción de Gdh1p y Gdh3p presentes en los heterohexámeros. Los resultados de las pruebas de estabilidad mostraron que los homohexámeros formados por Gdh1p son más estables que aquellos ensamblados con monómeros de Gdh3p. Se ha observado, además, que la Gdh1p es susceptible a proteólisis por privación de glucosa (Mazón y Hemmings, 1979) en tanto la Gdh3p no experimenta este tipo de inactivación (DeLuna A. *et al.*, 2001).

La regulación transcripcional de *GDH1*

Los homohexámeros de Gdh1p son la población mayoritaria en las células de *Saccharomyces cerevisiae* que proliferan en medios de cultivo con glucosa como fuente de carbono, por lo que no resulta extraño que la actividad de Gdh1p en glucosa es cinco veces mayor que la de Gdh3p (DeLuna *et al.*, 2001).

Al nivel de expresión transcripcional, *GDH1* es predominante sobre su homólogo *GDH3*, en células cultivadas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. Se sabe que la expresión transcripcional de este gen se incrementa en presencia de fuentes de carbono no fermentables (Dang *et al.*, 1996). De manera que la expresión transcripcional de *GDH1* aumenta tres veces, con respecto a glucosa, en presencia de etanol y amonio (DeLuna *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002), sin embargo, este incremento no se refleja en una mayor actividad enzimática. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional (DeLuna *et al.*, 2001, Dang *et al.*, 1996); a este respecto, Riego (2002) ha observado en ensayos de tipo Northern blot indicios de un mRNA de *GDH1* más corto, presente sólo en células cultivadas en etanol-amonio, el cual aparentemente es producto de algún tipo de degradación.

Como la presencia de cualquier aminoácido en el medio de cultivo reprime la expresión de *GDH1*, se considera que este gen no está sujeto a represión catabólica nitrogenada (Riego *et al.*, 2002). En contraste, *GDH1* responde a represión catabólica por carbono (CCR). Los resultados de Riego *et al.* (2002) demuestran que *GDH1* es el primer gen del NCM cuya regulación por carbono depende de Gln3p, un

I. INTRODUCCION

miembro de la familia de factores transcripcionales tipo GATA, y un regulador positivo del metabolismo de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae* (Wingender *et al.*, 2000). Riego *et al.*, 2002 sugieren que Gln3p podría unirse a uno o varios de los cinco sitios GATA que se encuentran sobre el promotor de este gen, y que regula su activación transcripcional en glucosa y en etanol (Daugherty *et al.*, 1993; Riego *et al.*, 2002).

GLN3 es una proteína de 730 aminoácidos que se caracteriza por poseer un motivo dedo de zinc, con cuatro cisteínas (Cys2/Cys2) coordinando el ión metálico (Minehart y Magasanik, 1991) (**Figura 3B**). El dedo de zinc que une al DNA está compuesto por dos hojas beta antiparalelas y una hélice alfa, que junto con el asa que conecta las hojas beta interactúa con el surco mayor del DNA, mientras que la región básica carboxilo terminal del dedo de zinc se dobla alrededor del surco menor (Omichinski *et al.*, 1993). El dedo de zinc de *GLN3* tiene homólogos en los factores transcripcionales, con un solo dedo zinc, NIT2 de *Neurospora crassa* y AREA de *Aspergillus nidulans*, y con los dos dedos de zinc que posee el factor de transcripción eritroide específico, GATA-1 (Minehart y Magasanik, 1991).

Gln3p, se une directamente a las secuencias UAS_{NTR} (UAS: Upstream Activating Sequence, NTR: Nitrogen Regulated) de los promotores de los genes que regula. Estas UAS_{NTR} son denominadas secuencias o cajas GATA por su secuencia consenso 5 '-GAT(T/A)A-3'. Estas secuencias blanco son necesarias y suficientes para la regulación por NCR (Cooper *et al.*, 1989). Se postula que Gln3p y Gat1p son los mediadores de la represión/desrepresión catabólica nitrogenada, por lo que en ausencia de una buena fuente de nitrógeno activan la transcripción de los genes del catabolismo nitrogenado. Entre los genes en cuyos promotores Gln3p se une a las UAS_{NTR} se encuentran *GAP1*, *GLT1*, *GLN1*, *GDH2*, *PUT1*, *UGA4*, *DAL3*, *DAL5*, y *CAN1* en *Saccharomyces cerevisiae* (Minehart y Magasanik, 1991; Blinder y Magasanik, 1995; Cunningham y Cooper, 1991; Valenzuela *et al.*, 1998; Riego *et al.*, 2002).

Hasta el momento se han descrito cuatro factores que se unen a las UAS_{NTR}: Gln3p y Gat1/Nil1p, como activadores (Minehart y Magasanik, 1991; Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1996); Dal80p/Uga43p y Deh1p/Gzf3p, como

I. INTRODUCCION

represores transcripcionales (Cunningham y Cooper, 1991; Minehart y Magasanik, 1991; Dauherty *et al.*, 1996). Aunque se ha dicho que Dal80p es el antagonista de Gln3p, como *DEH1* lo sería de *GAT1*, no todos los genes dependientes de Gln3p se regulan por el producto de *DAL80* (Cunningham y Cooper, 1993). Ni Dal80p ni Gat1p, tienen efecto sobre la expresión transcripcional de *GDH1*, en glucosa o etanol como fuente de carbono (Riego *et al.*, 2002).

Gln3p y su regulación por la vía de señalización TOR

Tanto Gln3p como Gat1p alcanzan a sus promotores blanco en el núcleo cambiando su localización subcelular gracias a la vía de señalización, esencial y altamente conservada en eucariontes, de la cinasa sensible a rapamicina: TOR (Target Of Rapamycin kinase pathway)(Beck y Hall, 1999) (**Figura 3A**).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos complejos multiprotéicos TOR diferentes: TORC1 y TORC2. TORC1 contiene a los productos de los genes *LST8*, *KOG1* y cualquiera de los genes *TOR1* o *TOR2* (Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003; Jacinto y Hall, 2003). Las cinasas codificadas por *TOR1* y *TOR2* son cinasas del tipo Ser/Thr semejantes a la cinasa fosfatidilinositol-3' (PIKK), de aproximadamente 280 kDa con 70% de identidad (Bertram *et al.*, 2000; Schmeizie y Hall, 2000).

TOR1 y *TOR2*, en TORC1, regulan la expresión de cientos de genes que participan en gran variedad de procesos, como la biosíntesis de proteínas, el ciclo celular, la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la respuesta general a estrés salino, el inicio de la traducción, la biogénesis ribosomal, la acumulación de glicógeno, la esporulación, la importación de nutrientes, la regulación de la autofagia y el metabolismo de nitrógeno y de carbono (Mahajan, 1994; Cardenas *et al.*, 1999; Harwick *et al.*, 1999; Powers y Walter, 1999; Schmeizie y Hall, 2000; Jacinto y Hall, 2003). Por lo tanto, TOR funciona como un regulador del crecimiento y la proliferación celular en levaduras y también en mamíferos.

El complejo TORC2 contiene los productos de los genes *LST8*, *AVO1*, *AVO2*, *AVO3* y *TOR2*. TORC2 media el control del crecimiento celular por la organización

I. INTRODUCCION

de la actina del citoesqueleto (Zheng y Schreiber, 1997). Sin embargo, la señalización de TORC2 es insensible a rapamicina debido a la inhabilidad de la rapamicina de unirse a Tor2p, cuando forma parte del complejo TORC2 (Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003; Jacinto y Hall, 2003).

La rapamicina es un antibiótico macrocíclico con potente efecto inmunosupresor y anticancerígeno. Cuando la rapamicina se acompleja con su receptor FKBP12, causa la inhibición del crecimiento de las células de levadura y mamífero. El complejo FKBP12-rapamicina se une a su dominio de unión específico, FRB (FKBP-rapamycin binding domain), de Tor1p o Tor2p, en el complejo TORC1, e inhibe la actividad de cinasa de TOR. Experimentalmente, esta capacidad de la rapamicina se utiliza para imitar el efecto de la escasez o baja calidad de nutrientes (Bertram *et al.*, 2000; Schmeizie y Hall, 2000).

En el caso de *GDH1*, se ha observado que incrementa al doble su transcripción después de 30 minutos en un medio con rapamicina (Bertram *et al.*, 2000).

En presencia de una buena fuente de nitrógeno, Gln3p se encuentra fosforilado y unido en el citoplasma con la proteína Ure2p, la cual se ha caracterizado como un regulador negativo de la función de Gln3p (Minehart y Magasanik, 1991). La formación del complejo Gln3p-Ure2p depende de la inhibición, gracias a la proteína Tap42p, que también es regulada por TOR, de la fosfatasa Sit4p, que directa o indirectamente es la responsable de la desfosforilación de Gln3p (Jiang y Broach, 1999; Beck y Hall, 1999; Cardenas *et al.*, 1999). Al cultivar las células de levadura en un medio con rapamicina, o en una fuente de nitrógeno pobre, Gln3p se desfosforila y disocia de Ure2p, que a su vez es unido por Mks1p (Bertram, *et al.*, 2000), por lo que puede entrar al núcleo, asociado a la importina α /Srp1p, que se une a su dominio de unión específico en Gln3p. Existe también en la estructura de Gln3p un dominio de señalización de exportación (NES: Nuclear Exportation Signal) donde se une la β -carioferina (o exportina) Crm1p, que lo sacará del núcleo; y un dominio de unión específico para su interacción con Ure2p (Ure2p BD) y Torc1/2p (TOR BD) (Carvalho y Zheng, 2003) (**Figura 3B**). Una vez en el núcleo Gln3p se une a sus secuencias blanco y ejerce su función activadora (Beck y Hall, 1999) (**Figura 3A**).

I. INTRODUCCION

Existen dudas al respecto de la identidad de la fosfatasa que actúa directamente sobre Gln3. Recientemente se ha encontrado que Sit4p podría estar actuando sobre la cinasa Ser/Thr, Npr1p, que a su vez regularía un complejo de ligasas de ubiquitina E3,E4, Rsp5p, Bul1/2p, que aparentemente son necesarias para la activación de *GLN3* en rapamicina y condiciones de nitrógeno pobre, excepto prolina (Crespo *et al.*, 2004). No se ha encontrado que Gln3p sea ubiquitinado, por lo que se plantea que Ure2p o la maquinaria de transportación al núcleo de Gln3p podrían ser el blanco del complejo Rsp5p, Bul1/2p (Crespo *et al.*, 2004) (**Figura 4**).

La respuesta GCN y la regulación de *GDH1* por Gcn4p

Empleando en el medio de cultivo rapamicina, que produce un efecto que imita el de la privación de aminoácidos en las células de levadura, Valenzuela *et al.* (2001) encuentran que TOR controla también al factor transcripcional *GCN4*. La respuesta GCN (General Control of Nitrogen) tiene lugar cuando las células de levadura son privadas de aminoácidos. En el comienzo de GCN, la transcripción y traducción del activador *GCN4* se incrementan, permitiendo la inducción transcripcional de más de 30 enzimas de las vías de síntesis de aminoácidos. Ha sido propuesto que la señal que comienza esta respuesta puede ser la presencia de tRNA no cargados (Hinnebusch, 1997). Los resultados indican que TOR regula la actividad transcripcional de *GCN4* previniendo la traducción de su mRNA, sugiriendo que este sería un mecanismo alternativo dependiente de TOR, que adicionalmente contribuye a modular la actividad de los factores transcripcionales, además de controlar su traslado al núcleo (Valenzuela *et al.* 2001).

Examinando la secuencia del promotor de *GDH1* se encuentran cuatro sitios a los que se podrían unir Gcn4p. La falta de *GCN4* no afecta la expresión transcripcional en glucosa de *GDH1*, y al utilizar el inhibidor competitivo de histidina 3-AT (que provoca la privación de este aminoácido, y por lo tanto incrementa la traducibilidad del mRNA de *GCN4*) tampoco se observó ningún efecto. Sin embargo, la presencia de etanol en el medio como fuente de carbono, sí induce la transcripción de *GDH1*, por acción de Gcn4p (Riego *et al.*, 2002).

La regulación de *GDH1* por Mig1/2p y el complejo HAP

Como ya hemos mencionado Riego *et al.* (2002) encuentran que *GDH1* es un gen regulado de manera muy estricta por la naturaleza de la fuente de carbono. Este gen encuentra su expresión más baja en glucosa y se ha observado que su transcripción se induce, no sólo en etanol, sino también en lactato, glicerol y galactosa (Dang *et al.*, 1996). Explorando los posibles reguladores del metabolismo nitrogenado, Riego *et al.* (2002), encuentran que la represión de la transcripción de *GDH1* en glucosa, no parece estar medida por el efecto de los represores Mig1p y Mig2p. En contraste su activación en etanol depende de ambos, este resultado es inesperado ya que se ha observado que el factor Mig1p en ausencia de glucosa se traslada al citoplasma (Smith *et al.*, 1999).

Otro complejo activador relacionado al metabolismo de carbono que regula la transcripción de *GDH1* es el complejo HAP (Dang *et al.*, 1996; Riego *et al.* 2002). El complejo heteromérico HAP se encuentra evolutivamente conservado en hongos, plantas y mamíferos (Bourgarel *et al.*, 1999; Tuncher *et al.*, 2005).

En *Saccharomyces cerevisiae* el complejo HAP se compone de Hap2/3/4 y Hap5p, y es necesario para la proliferación exitosa en fuentes de carbono no fermentables, uniéndose al DNA a través de su secuencia consenso 5' ACCAA(T/C)NA 3', denominada la caja CCAAT o HAP. Los genes *HAP2*, *HAP3* y *HAP5* son absolutamente necesarios para la capacidad de unión a la caja CCAAT (McNabb *et al.*, 1995). Se ha propuesto que Hap5p interacciona con Hap2p y Hap3p y mantiene a estas proteínas juntas, permitiendo la interacción entre los dominios de unión al DNA de Hap2p y Hap3p. Las proteínas Hap3p y Hap5p, pero no Hap2p, poseen un motivo tipo histona, una característica que primero se identificó en las histonas y que hoy se sabe que se encuentra en gran cantidad de proteínas, este elemento estructural participa en las interacciones proteína-proteína o proteína-DNA (Gancedo, 1998).

Hap4p es la subunidad responsable de la activación de la transcripción producida por el complejo, al ser la subunidad reguladora en respuesta a la fuente de

I. INTRODUCCION

carbono. *HAP4* es fuertemente inducido durante la transición del metabolismo fermentativo al respiratorio, mientras que los niveles del transcrito de *HAP2* descienden en glucosa (Pinkham y Guarente, 1985), la transcripción de *HAP4*, se incrementa hasta cinco veces cuando las células de levadura son transferidas de un medio con glucosa a uno con lactato (Forsburg y Guarente, 1987).

El promotor de *GDH1* posee tres elementos CCAAT que podrían ser unidos por el complejo HAP y se ha observado que *HAP2*, *HAP3* y *HAP4* son necesarios para la transcripción de este gen, cuando las células de levadura proliferan en un medio con glucosa como fuente de carbono. Una vez transferidas a un medio con etanol, todas las subunidades funcionan como activadores de la transcripción, siendo Hap4p la subunidad que tiene, inesperadamente, el efecto menor. Aparentemente, en el promotor de *GDH1*, la activación transcripcional ejercida por el complejo HAP, opera parcialmente independiente de Hap4p (Riego *et al.*, 2002).

La regulación de *GDH1* por Leu3p

Hu *et al.* (1995) han encontrado que la transcripción de *GDH1* depende, también, del factor transcripcional Leu3p, del tipo Zn(II)₂-Cys₆, que interactúa con las secuencias UAS_{LEU}, 5' GCCGGAACCGGC 3', de los promotores de *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2* y *ILV5*. Este factor transcripcional está implicado en el control de la biosíntesis de los aminoácidos ramificados y puede actuar como activador o represor al unirse a sus secuencias blanco. El factor Leu3p activa la transcripción sólo cuando el α -isopropilmalato (α -IPM), el producto del primer paso en la biosíntesis de leucina, se encuentra presente. Esta dependencia de Leu3p por α -IPM, está altamente regulada por la α -IPM sintasa. En ausencia de α -IPM, Leu3p reduce su actividad transcripcional de cuatro a cinco veces.

El promotor de *GDH1* posee una UAS_{LEU} perfecta, que al ser mutada provoca una disminución en la expresión transcripcional del gen. Además, la mutante *leu3* tiene una actividad de GDH-NADP menor que la silvestre (Hu *et al.* 1995).

La importancia que tiene la regulación de *GDH1* por Leu3p radica en que la

I. INTRODUCCION

regulación de la biosíntesis de los aminoácidos ramificados parece extenderse hacia la regulación de la actividad de GDH-NADP, asimilación de nitrógeno y síntesis de glutamato, un punto clave en el metabolismo nitrogenado (Hu *et al.*, 1995).

4. La estructura de la cromatina y su relación con la regulación transcripcional.

Hasta aquí hemos hablado de la transcripción como un proceso donde diversos tipos de proteínas, los factores transcripcionales, actúan facilitando o inhibiendo la transcripción. En este caso en particular, interesados en las interacciones entre proteínas y algunas secuencias especiales en el DNA, que afectan la transcripción del gen *GDH1*, y otros genes del metabolismo de *Saccharomyces*. Pero el DNA no existe como una molécula desnuda y lineal dentro del núcleo de las células de levadura. De hecho, cada cromosoma de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra eficientemente empaquetado con ayuda de proteínas cuya labor específica es esa, junto con el DNA, constituir la estructura compacta denominada fibra de cromatina. Así que, para que se lleve a cabo la transcripción debe flanquearse esta barrera que gracias a su organización, previene la expresión de genes que resulten inadecuados para un tejido o momento del desarrollo.

Antes de referirnos a aquellos elementos que conforman o interactúan modificando la cromatina, resulta útil enumerar los efectores de la síntesis del mRNA, en la levadura. El complejo de síntesis de RNA en *Saccharomyces cerevisiae*, está constituido por la holoenzima, es decir, la RNA polimerasa II en asociación con el mediador, y los factores generales TFII (Transcription Factors of RNAPol II):TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. El factor general TFII-D está formado por aproximadamente diez proteínas TAFs (TBP Associated Factors) y la proteína TBP, (TATA binding protein). Como su nombre lo indica, TBP, se une a una secuencia específica en los promotores, denominada caja TATA, permitiendo con esto, el ensamblaje del complejo de transcripción activo. La asociación resultante, TBP-TATA es una estructura reconocida específicamente por TFIIB, el factor que sirve de

I. INTRODUCCION

conexión entre TFIID y la holoenzima-RNA pol II. Aunque TBP es suficiente para sostener el inicio correcto de la transcripción, en los promotores que contienen caja TATA *in vitro*, generalmente se cree que TFIID (no TBP) es la entidad funcional que se asocia con los promotores *in vivo*. Se ha observado que en promotores sin caja TATA, las TAFs son las que promueven la transcripción, y se sugiere que estas proteínas son importantes para la capacidad de los activadores transcripcionales de estimular la maquinaria de la RNAPol II. Las proteínas TAFs parecen participar en la formación/estabilidad de un complejo transcripcional activador-dependiente, un paso que ocurre después del reclutamiento de TFIID y TFIIB al promotor (Moqtaderi *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, se ha demostrado que un subgrupo de las TAFs, incluyendo las TAFs tipo histonas, forman parte de SAGA y del complejo de acetilación de histonas humano, PCAF (Grant *et al.*, 1998; Ogryzko *et al.*, 1998; Struhl and Moqtaderi, 1998). La afinidad del complejo de síntesis por los promotores generalmente es muy baja, y necesita la actividad de otras proteínas que la incrementen (Moqtaderi *et al.*, 1998).

El DNA en la cromatina está organizado en arreglos de nucleosomas. Cada nucleosoma contiene dos copias de cada histona H2A, H2B, H3 y H4, que gracias a las interacciones proteína-proteína de sus dominios globulares, se ensamblan formando un octámero con 145-147 pares de bases (pb) de DNA rodeándolo (Luger *et al.*, 1997). Fuera del nucleosoma se encuentra, realizando una especie de anclaje, la histona H1 (Felsenfeld, 2000). El nucleosoma, como unidad repetitiva de un complejo nucleoprotéico altamente conservado, se encuentra cada 200 ± 40 pb, a lo largo de todos los genomas eucariontes (McGhee y Felsenfeld, 1980).

El nucleosoma, en su función como el principal elemento de empaquetamiento de DNA dentro del núcleo, es el determinante primario de la accesibilidad al DNA (Luger *et al.*, 1997). Jerárquicamente la organización de la cromatina va ganando complejidad y densidad en el superenrollamiento del DNA, logrando una represión efectiva de la expresión génica en los que se han denominado dominios cromatínicos. Es decir, el enrollamiento del DNA alrededor del octámero de histonas es actualmente considerado el punto más importante de la regulación transcripcional (Kornberg y Lorch, 1999; Struhl, 1999; 8].

I. INTRODUCCION

Si bien, las interacciones electrostáticas entre el octámero de histonas y el DNA deben ser interrumpidas por la RNA polimerasa para transcribir DNA organizado en nucleosomas (Wasyly y Chambon, 1979), el octámero de histonas no se libera al medio, sino que es desplazado de su sitio original de unión (Felksensfeld, 2000).

La recombinación, replicación, condensación mitótica y transcripción implican a la cromatina como sustrato y por tanto afectan su estructura (Luger *et al.*, 1997). El remodelamiento de la cromatina, en general, puede definirse como cualquier evento que altere la sensibilidad a nucleasa de cierta región. Esto puede ocurrir de manera coordinada o independiente de la transcripción. Una fuente de energía, como el ATP, puede o no ser requerida; y algunos procesos, pero no todos implican la modificación covalente de las histonas (Aalfs y Kingston, 2000).

El remodelamiento de la estructura de la cromatina ha sido observado experimentalmente en combinación con la activación transcripcional de diversos promotores. Este remodelamiento implica la llegada de factores de transcripción hacia sus sitios de unión en el promotor, que pueden implicar cambios en la posición de nucleosomas específicos (deslizamiento) o cambios en la estructura tridimensional de los nucleosomas, o ambos. Todo esto puede cambiar el perfil de sensibilidad a nucleasa, y por lo tanto todos estos eventos pueden ser considerados como remodeladores (Wolfe, 1997; Aalfs y Kingston, 2000) (**Figura 5**).

No solamente las histonas, en el nucleosoma, tienen un efecto negativo sobre el acceso al DNA, existen también las proteínas no-histonas, factores de ensamblaje de la cromatina y los complejos de desacetilasas de histonas. En contraste permitiendo con su actividad, la accesibilidad de la cromatina se encuentran los complejos multiprotéicos como Swi/Snf, Srb/mediador y SAGA (Pérez-Martín, 1999).

Riego *et al.*, (2002) han encontrado que la expresión transcripcional de *GDH1* depende de algunas subunidades de SAGA, como Spt3p y Ada3p, cuando las células proliferan en medio de cultivo con glucosa y etanol como fuentes de carbono. La subunidad Ada2p parece ser necesaria sólo cuando las células se cultivan en etanol, y sorprendentemente la falta de *GCN5* no tiene ningún efecto en ninguna de las dos condiciones, lo cual hace pensar a los autores que, quizás para la expresión

I. INTRODUCCION

de este gen no sea necesaria la acetilación de su promotor. O en el caso de que sea acetilado, puede ser otra la HAT (Histone Acetyltransferase) responsable, en este caso se propone como posible candidata a TAF_{II}145, integrante de TFIID.

El complejo remodelador de la cromatina SAGA

Todas las proteínas del nucleosoma son sujeto de una gran variedad de modificaciones postranscripcionales, especialmente los sitios que se encuentran expuestos en la superficie del nucleosoma. Estos incluyen la región del N-terminal de las histonas, y el carboxilo terminal de la histona H2A, que se extiende a una distancia considerable del dominio globular y que no parece estar altamente estructurado (Luger y Richmond, 1998). Las modificaciones de las que las histonas son objeto incluyen la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y ribosilación (Owen-Hughes, 2003).

La acetilación de histonas participa en el ensamblaje de la cromatina y la transcripción. La acetilación *in vivo* tiene lugar en lisinas específicas del extremo amino terminal de estas proteínas (**Figura 6**), que no es necesario para mantener la integridad estructural del nucleosoma, pero sí participa en el ordenamiento de la estructura de la cromatina y en las interacciones con proteínas no-histona. La acetilación del N-terminal de las histonas introduce cambios alostéricos en la conformación del nucleosoma, que puede adoptar gran variedad de estados estables, e inhibe el super enrollamiento represor de la transcripción (Bauer, *et al.*, 1994; Wolfe, 1997).

Dos actividades de acetilasa de histonas, HAT (Histone Acetyltransferase) han sido descritas en células eucariontes. La primera es una enzima citoplásmica, denominada HAT-B, implicada en la acetilación de H4 relacionada a la duplicación del DNA. La segunda clase de actividad de acetiltransferasa, HAT-A, se relaciona con el núcleo y con la acetilación asociada a la transcripción (Pérez-Martín, 2000). Las acetilasas de histonas (HATs) transfieren el grupo acetil del acetil-CoA a el ϵ -grupo amino, esta reacción es revertida por las desacetilasas de histonas (HDACs) (Lusser *et al.*, 2001).

I. INTRODUCCION

Existen diversas alternativas que explican el efecto de la acetilación de las lisinas del N-terminal de las histonas sobre la estructura de la cromatina. La acetilación podría neutralizar la carga positiva de las histonas, y por lo tanto debilitar la interacción del octámero con el DNA negativamente cargado, lo que podría desestabilizar el nucleosoma, permitiendo que los reguladores transcripcionales accedan con mayor facilidad. A gran escala la acetilación podría interferir con el superenrollamiento de la cromatina y, por lo tanto, alterar la accesibilidad de grandes áreas de la cromatina para las proteínas reguladoras. De igual forma, se plantea la acetilación como una señal específica que altera las interacciones histona-proteínas (Grant, *et al.*, 1998; Lusser *et al.*, 2001).

Se ha observado que existe una correlación entre el nivel de acetilación de histonas y la actividad transcripcional en la cromatina (Jeppsen y Turner, 1993). Análisis bioquímicos revelan que la hiperacetilación de las histonas se acumula en los dominios activos transcripcionalmente (Hebbes *et al.*, 1994), y, en contraste, la hipoacetilación se presenta en dominios silenciados (Braunstein *et al.*, 1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* la actividad de HAT-A está codificada por el gen *GCN5*. Esta acetilasa de histonas, se identificó en un análisis diseñado para aislar mutantes incapaces de crecer bajo condiciones de limitación de aminoácidos (Georgakopoulos y Thireos, 1992). En una segunda búsqueda de mutantes, que revirtieran la toxicidad de la sobreproducción del activador Gal4-VP16, se obtuvieron los genes *ADA2* y *ADA3* (Piña *et al.*, 1993). Estudios genéticos y bioquímicos revelaron que Gcn5p, Ada2p y Ada3p forman parte de un complejo que se ha denominado como ADA (Marcus *et al.*, 1994, Guarente, 1995).

Gcn5p puro es capaz de acetilar las lisinas K14 en la histona H3; K8 y K16 en la histona H4 *in vitro* cuando no forman el nucleosoma (Kou, *et al.*, 1996) (**Figura 6**). En vista de lo anterior, se pensó que para la acetilación sobre la cromatina *in vivo* Gcn5p requería de otras proteínas que lo acompañaran. Un análisis bioquímico, en la búsqueda de complejos nativos que fueran capaces de acetilar *in vitro* al nucleosoma, permitió el aislamiento de dos complejos de gran masa molecular (0.8 y 1.8 MDa) (Grant *et al.*, 1997). Ambos complejos contienen a Ada2p, Ada3p y a Gcn5p, como la subunidad catalítica; y el más grande de ellos contiene también

I. INTRODUCCION

algunas proteínas Spt (Suppressor of Ty: identificadas como mutantes que revierten la incapacidad de crecer en medio sintético sin lisina e histidina) (Winston y Sudarsanam, 1998) Spt3, Spt7, Spt8 y Spt20, este complejo, por lo tanto, se ha denominado SAGA (Spt/Ada/Gcn5 Acetyltransferase), ADA es el complejo de 0.8 KDa. También se ha encontrado que SAGA contiene, además, cinco TAFs (Taf5, Taf6, Taf9, Taf10 y Taf 12p) (Grant, *et al.*, 1998).

SAGA es un complejo multifuncional coactivador conservado entre levadura y otros eucariontes. Y al parecer es reclutado a los promotores sobre los que actúa a través de su interacción con los activadores transcripcionales (Utley *et al.*, 1998). Por ejemplo: los dos complejos HATs de levadura, SAGA y NuA4, interactúan con activadores acídicos como el dominio de activación del virus del herpes VP16 y el activador transcripcional Gcn4p, pero no con dominios de activación ricos en glutamina o prolina (Ikeda *et al.*, 1999; Utley *et al.*, 1998). En contraste los complejos, ADA y NuA3, no interactúan con éstas proteínas, indicando que la interacción entre las HATs y los activadores es específica. Además, de no tener importantes consecuencias para la actividad de estas acetiltransferasas *in vitro* o *in vivo* (Brown *et al.*, 2000).

En SAGA, como ya hemos mencionado, Gcn5 es la subunidad encargada de la acetilación del extremo amino terminal de las histonas, Ada2 y Ada3 modulan esta actividad (Brownell *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 2001; Sterner *et al.*, 2002). SAGA puede atraer a TBP hacia la TATA de diversos promotores, interactuando a través de las subunidades Spt3 y Spt8 (Eisenmann, 1992; Belotserkovskaya *et al.*, 2000; Bhaumik y Green, 2001; Larschan y Winston 2001; Barbaric, 2003; Yu *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las interacciones entre SAGA y los activadores implican a Tra1, la subunidad más grande de SAGA con 400 kDa; y las subunidades con motivos tipo histona, Ada1, Taf6 y Taf12 (Brown, 2001; Hall y Struhl, 2002; Klein *et al.*, 2003; Bhaumik y Green, 2004). La integridad de SAGA requiere, adicionalmente, de dos grupos de proteínas. Las subunidades Spt7, Spt20 y Ada1 participan en el ensamblaje y son componentes de la llamada partícula núcleo o "core" de SAGA (Grant *et al.*, 1997; Horiuchi *et al.*, 1997; Roberts y Winston, 1997; Stern *et al.*, 1999; Wu y Winston, 2002). Y el segundo subgrupo, que

I. INTRODUCCION

se compone de las proteínas Taf5, Taf6, Taf9, Taf10 y Taf12, parece participar en la composición de SAGA y su integridad, indicando la importancia de estas proteínas para la estructura del complejo (Grant *et al.*, 1998; Durso *et al.*, 2001; Kirschner, 2002).

La acetilasa de histonas de *Tetrahymena*, p55, fue la primera HAT nuclear en ser aislada. Este coactivador reveló ser muy parecido a Gcn5p (Brownell *et al.*, 1996). Entre ellos existen dos extensas regiones con más del 60% de identidad. Un dominio central de 130 residuos de aminoácidos que muestra homología con otras HATs clonadas (Kleff *et al.*, 1995), y que posee la actividad de acetiltransferasa. El segundo dominio, es un segmento de 60 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal de Gcn5p, que ha sido denominado "bromodominio" (Marcus *et al.*, 1994). Este motivo se ha encontrado en muchos reguladores transcripcionales, incluyendo *SNF2/SWI2* de levadura (Tamkun *et al.*, 1992). Syntichaki *et al.*, (2000) han demostrado que el bromodominio de Gcn5p es requerido para el remodelamiento de los nucleosomas después de la acetilación de las histonas, y para activar la transcripción en pasos subsecuentes, por ejemplo, al ser necesario para la asociación estable del complejo SWI/SNF con el promotor artificial *gPHO5*.

El bromodominio que posee Gcn5p se encuentra ampliamente distribuido, se encuentra, por ejemplo, en enzimas con actividad de acetiltransferasa de histonas, desacetilasas, metiltransferasas y cinasas de histona; además, de aparecer como motivo estructural de otras proteínas asociadas a la cromatina (Filetici *et al.*, 2001). Gcn5p de *Saccharomyces cerevisiae* se une al amino terminal de las histonas H3 y H4, pero no al de H2A y H2B, la delección del bromodominio impide esta interacción. También se interrumpe la unión con la substitución por glutamina (Q) de los residuos R19 o R23 del N-terminal de la histona H4. Este fenómeno tiene lugar con Gcn5p o con el bromodominio sólo (Ornaghi *et al.*, 1999).

Desde el descubrimiento de la actividad de HAT de Gcn5p, cofactores transcripcionales en levadura y eucariontes superiores, incluyendo TAF_{II}250 (el homólogo humano de Taf_{II}145/130, de levadura), p300/CBP y PCAF (p300/CBP associated factor), han sido identificados como HATs, sugiriendo la importancia que la acetilación tiene en la activación (Sterner *et al.*, 1999).

I. INTRODUCCION

El modelo de tercera dimensión que Wu *et al.*, (2004) obtienen de SAGA ofrece una interesante descripción de la arquitectura molecular del complejo. El core de SAGA contiene la estructura que proporcionan las Tafs, rodeado por tres dominios responsables de distintas funciones: unión del activador (Tra1p, Ada1p, Taf6p, Taf12p), acetilación de histonas (Gcn5p con Ada2p y Ada3p, modulando su actividad) y regulación de TBP (Spt3p y Spt8p). En este modelo la localización de Spt7p y Gcn5p en posiciones adyacentes coloca dos bromodominios en proximidad, lo cual, permitiría múltiples interacciones con el N-terminal de las histonas. Resulta interesante que la gran hendidura que muestra el modelo (entre los lóbulos I, II y III) mantiene exactamente las dimensiones del nucleosoma (10X4.5nm), y dado que Gcn5p se encuentra en el lóbulo III, esto permitiría que esta HAT estuviera en el lugar apropiado para modificar las histonas (Wu *et al.*, 2004) (**Figura 7**).

En la contracara de la regulación por acetilación del N-terminal de las histonas, se encuentra la desacetilación de las mismas. Se entiende, entonces, que la regulación comprende el equilibrio entre estos dos procesos.

Las HDACs (Histone Desacetylases) son represores transcripcionales que reducen los niveles de acetilación de las histonas creando regiones localizadas de cromatina represora (Bernstein *et al.*, 2000).

La primera desacetilasa de histonas en ser purificada fue la que codifica el gen *HDAC1*. Esta tiene un 60 % de identidad con el regulador global, como represor transcripcional, Rpd3p (Ayer, 1999). En levadura se han encontrado al menos seis HDACs codificadas por los genes *RPD3*, *HDA1*, *HOS1*, *HOS2*, *HOS3* y *SIR2* [9].

Sir2p es una desacetilasa que se activa por NAD y que desacetila la lisina 16 del N-terminal de la histona H4, a la que el represor Sir3p, se une preferentemente. La actividad de desacetilasa de Sir2p permite que el complejo Sir actúe a lo largo de 6 a 8 kpb comenzando desde la orilla del telómero. En su función represora el complejo Sir se opone a la acción de la acetilasa Sas2p, y en menor proporción, a la acetilasa Ea1p (Martin *et al.*, 2004).

Tanto Hos1p como Hos2p interactúan con el complejo correpresor que forman Rpd3p y Ssn6p. Y en el caso de Hos2p y Rpd3 parecen interactuar con Ssn6p en dominios diferentes a los que se une Tup1p, que es un represor general en levadura

I. INTRODUCCION

que regula muchas vías fisiológicas importantes. Por lo anterior se cree que es posible que ambas desacetilasas, Hos2p y Rpd3p, se unan a Ssn6p al mismo tiempo que Tup1p (Davie *et al.*, 2003).

Se han caracterizado dos complejos de desacetilasas en *Saccharomyces cerevisiae*. El complejo tetramérico de la desacetilasa-A (HDA), de ≈ 350 kDa, al cual pertenecen Hda1p, Hda2p y Hda3p, es altamente sensible al inhibidor no competitivo Tricostatina A (TSA), en tanto que pierde hasta el 80% de su actividad en 10nM de tricostatina. En comparación con el complejo de desacetilasa de histona-B (HDB), de ≈ 600 kDa, que se compone de Rpd3p, Hos1p, Hos2p y Hos3p, que es menos sensible, ya que sólo pierde el 20% en presencia de este inhibidor (Rundlett *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001). Lo cual concuerda con las observaciones al respecto de que el tratamiento con TSA induce un estado hiperacetilado en levadura (Ekwall *et al.*, 1997). Hos3p y Sir2p son TSA-insensibles (Rundlett *et al.*, 1996).

El complejo HDA interactúa (Hda1p lo hace directamente *in vitro*) con el represor *TUP1*, que regula los genes del tipo sexual, algunos del catabolismo de la glucosa y uso de oxígeno, respuesta a estrés y daño en el DNA. Mutaciones en *tup1 Δ* y *hda1 Δ* causan un estado hiperacetilado de las histonas H3 y H2B, próximas al sitio de unión de Tup1p en el promotor de respuesta a estrés *ENA1*. Resulta interesante que en el caso del gen *ENA1*, se ha observado que mientras Hda1p actúa desacetilando las histonas H3 y H2B del promotor, Rpd3p lo desacetila las histonas H3 y H4, pero de la región codificante. Por lo que resulta evidente que aunque ambas desacetilasas actúen sobre el mismo gen desarrollan funciones diferentes (Wu *et al.*, 2001).

El complejo SWI-SNF de *Saccharomyces cerevisiae*

La transcripción de *GDH1* tiene una reducción muy importante en glucosa y etanol, en la mutante *snf2 Δ* , lo cual indica que su expresión depende de la actividad remodeladora del complejo SWI-SNF (Riego *et al.*, 2002)

El remodelamiento de los nucleosomas dependiente de ATP ha sido demostrado por una gran cantidad de complejos aislados de diversos eucariontes. El

I. INTRODUCCION

complejo SWI-SNF identificado en levadura, ha mostrado remodelar la cromatina *in vivo* e *in vitro* y estimular la unión basal y estimulada de los factores al DNA nucleosomal. Los complejos Nurf, CHRAC y ACF de *Drosophila*, y el RSC de levadura, se cree que llevan a cabo funciones similares, gracias también a la hidrólisis de ATP (Sterner *et al.*, 1999).

Los genes *SWI* fueron identificados gracias a su participación en la transcripción del gen *HO*. El gen *HO* codifica para una endonucleasa que genera un corte en la doble hebra del DNA en el locus del tipo sexual, cuya reparación, usando los genes que silencian el tipo sexual situados en otro lugar del genoma, resulta en un cambio (switch) entre el tipo sexual α y a , o viceversa (Strathern *et al.*, 1982). El propósito de este cambio a/α , es producir, a partir de una célula haploide, progenie celular de diferente tipo sexual, que posteriormente se pueda conjuguar con la célula madre y generar una célula diploide. Por otra parte, los genes SNF (Sucrose Non Fermenting) fueron identificados al ser requeridos para la transcripción del gen *SUC2*, que codifica una invertasa requerida para la utilización de sucrosa o rafinosa. La relación funcional, y traslape, entre los genes *SWI* y los SNF se estableció por estudio de la regulación de otros genes, además, después cuando se clonó y secuenció el gen *SNF2* resultó ser el mismo gen que ya se había denominado como *SWI2*. Su relación con la estructura de la cromatina se hizo evidente cuando, por medio de análisis clásicos, se observó que mutantes en componentes de la cromatina, como las histonas, eran supresores de las mutaciones *swi/snf* (Winston y Carlson, 1992).

El complejo Swi/Snf, de 2 MDa, comprende los genes *SWI1*, *SWI2/SNF2*, *SWI3*, *SNF5*, *SNF6*, *SNF12*, *SNF11*, *ARP3*, *ARP7*, *ARP9*, *ACN1*, *TGF* y *SWP82*. Las subunidades altamente conservadas entre levadura y otros eucariontes, (Snf2, Snf5 y Swi3) forman el core del complejo (Phelan *et al.*, 1999). El gen *SWI2* codifica la proteína con actividad de ATPasa, miembro de la superfamilia de DEAD/H de ATPasas estimuladas por ácidos nucleicos, que se encuentra ampliamente conservada entre varios eucariontes, incluido *Drosophila* y el hombre.

Aunque la forma en la que el complejo Swi/Snf facilita el acceso al DNA con nucleosomas no se conoce con exactitud, está claro que dicha actividad requiere la

I. INTRODUCCION

hidrólisis continua de ATP (≈ 1000 ATP/min) (Owen-Hughes, 2003). La energía del ATP es usada para interrumpir la estructura de la cromatina, estimular la unión de los factores transcripcionales, alterar el patrón de corte por DNAsal que lleva a la generación de mononucleosomas, dinucleosomas; realizar el movimiento del octámero de histonas en *cis* o en *trans*, y en general producir sitios de hipersensibilidad al corte por nucleasas (Peterson, 2000).

El DNA está unido al nucleosoma a través de más de 100 puntos de contacto muy cercanos. Una ruptura simultánea de todos sería muy desfavorable, es por esto que se cree que los mecanismos de redistribución de los nucleosomas deben darse por la interrupción de pocos contactos cada vez. Varios modelos se proponen para explicar la manera en la que SWI/SNF cambia la posición de los nucleosomas. Respecto al deslizamiento existe un modelo que plantea la rotación sobre su eje de la doble hélice que rodea el nucleosoma, con esta rotación se movería una base a la vez sobre la superficie del nucleosoma. La propagación de este efecto resulta en un giro del DNA, con el consecuente deslizamiento del nucleosoma completo. Un modelo alternativo implica la formación de un bucle o lazada, gracias a la interrupción del contacto nucleosoma-DNA, en la superficie del octámero, que puede ser transmitido como una onda alrededor del nucleosoma (Owen-Hughes, 2003; [14]).

A pesar del fenotipo de las mutantes *swi/snf*: crecimiento lento, inhabilidad para usar algunas fuentes de carbono, y defectos en la esporulación; el complejo no es necesario para mantener la viabilidad celular. Incluso, recientemente, se ha encontrado en *Saccharomyces cerevisiae*, que sólo del 1 % de aproximadamente 6000 genes, muestra una modificación de más de tres veces en su nivel de mRNA, en mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ*. Por lo que, se cree que el fenotipo de crecimiento lento, por ejemplo, puede ser resultado de que el complejo regula algunos genes esenciales como *MCM1*, que codifica para un factor transcripcional. El mismo comportamiento, de crecimiento lento, presenta la mutante *gcn5Δ* (Sudarsanam y Vishwanath, 2000). Adicionalmente, el complejo Swi/Snf no parece ser una molécula muy abundante, se ha encontrado, que existen de 100 a 200 complejos en cada célula haploide, en comparación con las aproximadamente 3000 moléculas que se han estimado para la RNA poll (Wilson *et al.*, 1996).

I. INTRODUCCION

Se cree que Swi/Snf actúa como activador y represor transcripcional *in vivo*. Y aparentemente estas funciones opuestas tienen lugar por mecanismos diferentes, donde el complejo puede actuar directa o indirectamente (Sudarsanam *et al.*, 2000).

El análisis de la secuencia de los promotores de genes que dependen del complejo Swi/Snf no ha permitido identificar un motivo común entre todos (Sudarsanam *et al.*, 2000). Por lo que, se cree que el complejo debe ser llevado hacia los promotores por los factores transcripcionales, aun cuando no se sabe de qué depende ésta interacción (Swi/Snf-activadores). Esto concuerda con lo encontrado en el caso del gen *HO*, donde el factor transcripcional Swi5 entra al núcleo al final de la anafase y recluta a Swi/Snf, con quien interacciona de manera transitoria. Posteriormente, Swi/Snf recluta a SAGA, y ambos permanecen unidos al promotor permitiendo la unión de otros factores transcripcionales y por consiguiente, la transcripción de *HO* (Cosma *et al.*, 1999). En muchos promotores estos dos complejos cooperan o se complementan, y se cree que el bromodominio podría ser el vínculo que los relaciona (Stafford *et al.*, 2001).

Cuadro 1

Cuadro 1. Genes ohnólogos que se expresan diferencialmente en presencia o ausencia de oxígeno.

Aerobiosis	Anaerobiosis	Bloque ^a	Función ^b
HYP2	ANB1	28	Factor iniciador de la traducción.
COX5a	COX5b	39	Subunidad Va de la citocromo c oxidasa.
CYC1	CYC7	28	Citocromo C, isoforma 1. Citocromo C, isoforma 2.
POR1	POR2	39	Porina mitocondrial.
NRG1	NRG2	3	Represor transcripcional. Media la represión por glucosa.
RSC30	RSC3	14	Subunidades del complejo remodelador de cromatina RSC.
PSP1	YLR177W	18	Proteína rica en Asp y Gln. Función desconocida.
PGM1	PGM2	43	Fosfoglucomutasa. Metabolismo de hexosas.
TSL1	TPS3	46	- Subunidad de la trealosa-6-fosfato-sintasa. - Subunidad reguladora.
GLG2	GLG1	41	Biosíntesis de glucógeno.

Los datos fueron tomados de Kwast *et al.*, 2002.

^a Corresponden a los bloques determinados en Seoighe *et al.*, 1999 y <http://wolfe.gen.tcd.ie/>

^b Según aparece en <http://yeastgenome.org/>

Figura 1

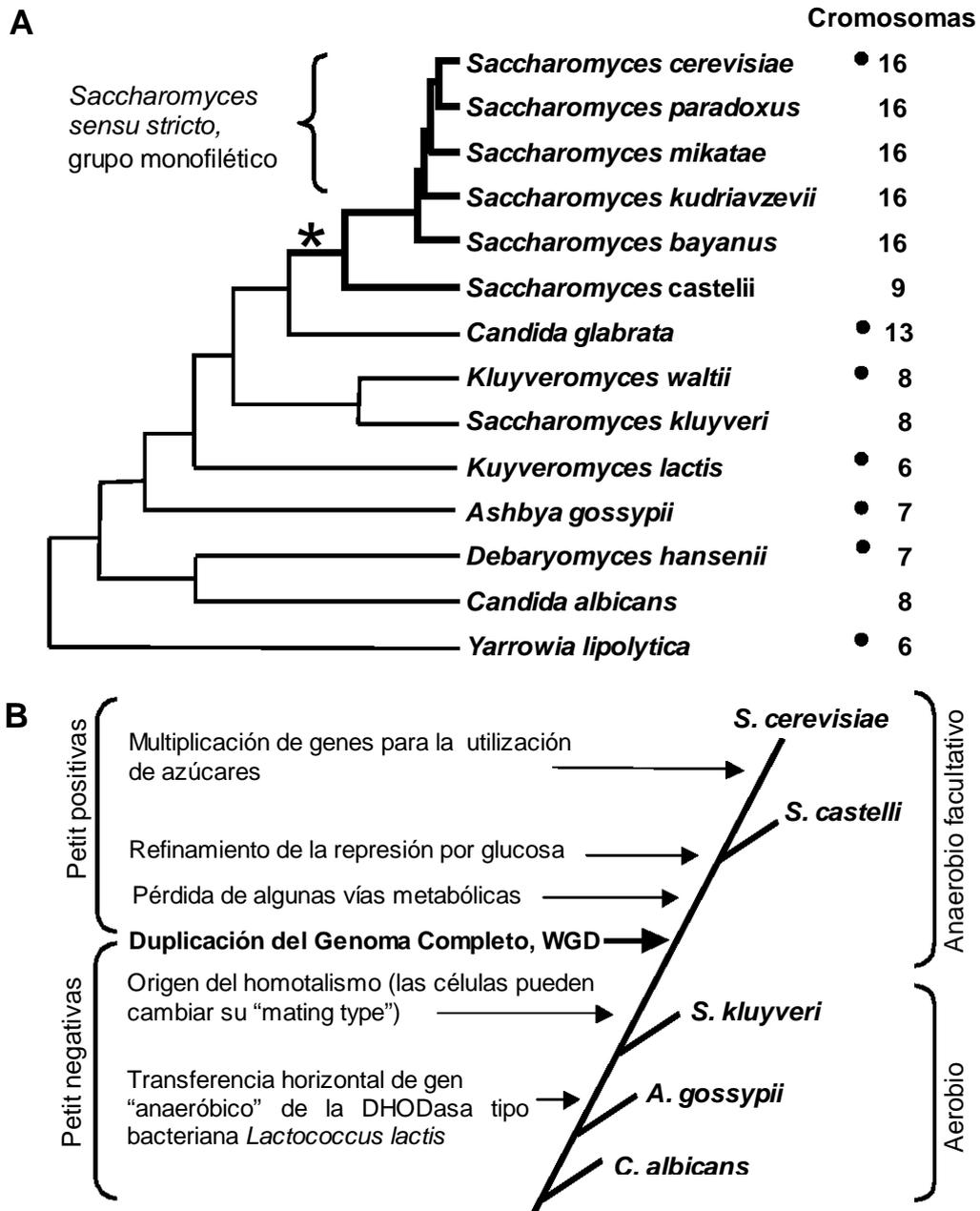


Figura 1. Filogenia aproximada y algunos eventos de la evolución metabólica de los hemiascomicetos. A) El asterisco denota el momento de la WGD. Las líneas gruesas y delgadas corresponden a las especies post y pre-duplicación, respectivamente. Los puntos señalan aquellos organismos de los que se tiene la secuencia completa del genoma (Modificado de Wolfe, K. 2004; 9;10). B) Algunos eventos de la evolución del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de Piskur y Langkjaer, 2004)

Figura 2

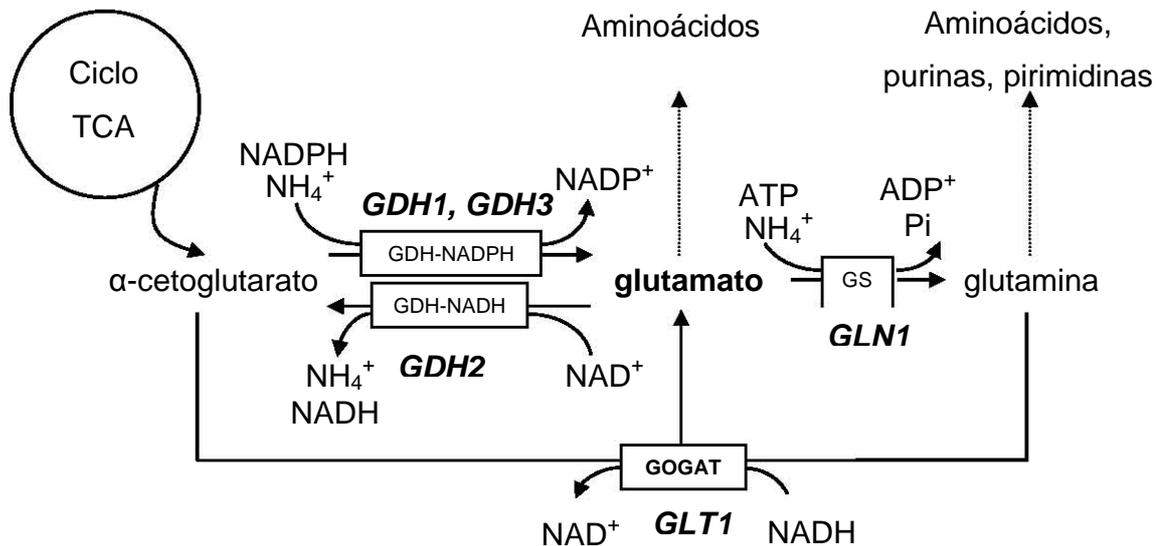


Figura 2. El Metabolismo Central de Nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.

El CNM (Central Nitrogen Metabolism) comprende las reacciones bioquímicas de la interconversión del α -cetoglutarato, el amonio, la glutamina y el glutamato. El amonio es asimilado al ser acoplado directamente al α -cetoglutarato, proveniente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, TCA, por la enzima GDH-NADP, produciendo glutamato, o usado por la enzima GS para generar glutamina. La glutamina y el α -cetoglutarato son los sustratos que GOGAT requiere para sintetizar glutamato. El glutamato, como todas las fuentes de nitrógeno, también puede ser degradado para obtener amonio. La enzima que se ocupa de este proceso es la GDH-NADH. En el CNM de *S. cerevisiae* existen dos genes, *GDH1* y *GDH3*, que codifican para dos GDH-NADP. La tercera GDH es producto del gen *GDH2*, que está separado filogenéticamente de los onólogos *GDH1* y *GDH3*. *GLN1* es el gen que codifica la GS, y la enzima GOGAT es producto del gen *GLT1*. El glutamato y la glutamina son los donadores de nitrógeno para todas las moléculas nitrogenadas de la célula (Modificado de: ter Shure *et al.*, 2000; Magasanik y Kaiser, 2002).

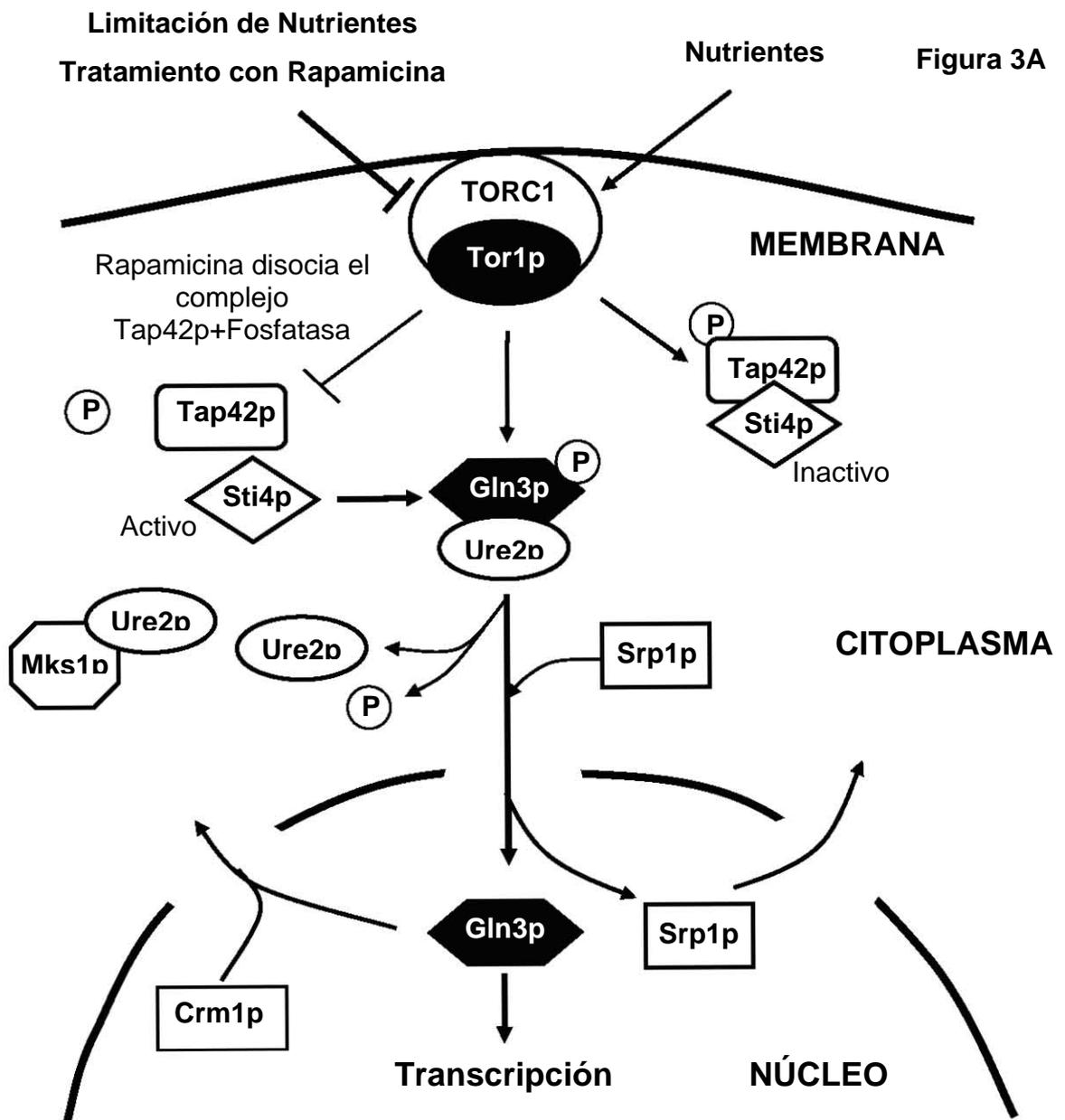


Figura 3A. Regulación de la actividad de Gln3p por la vía TOR. En un medio con alta calidad de nutrientes, Gln3p es fosforilado por el complejo TORC1 (Tor1p actúa directamente sobre Gln3p) y se localiza predominantemente en el citoplasma, unido por la fosfoproteína Ure2p. En contraste, en un medio con baja calidad de nutrientes o con rapamicina, Gln3p es desfosforilado directa o indirectamente por Sit4p, regulada por la proteína dependiente de TOR, Tap42p, y se disocia de Ure2p, que es unido por su inhibidor Mks1p. En el núcleo Gln3p se une a los sitios GATA de sus promotores blanco para activar la transcripción. La carioferina α /Srp1p (o importina) es la transportadora de Gln3p al núcleo y la β carioferina Cr1mp (o exportina) es quien lo traslada al citoplasma. (Modificado de Beck y Hall, 1999; Bertram et al., 2000; Carvalho *et al.*, 2001).

Figura 3B

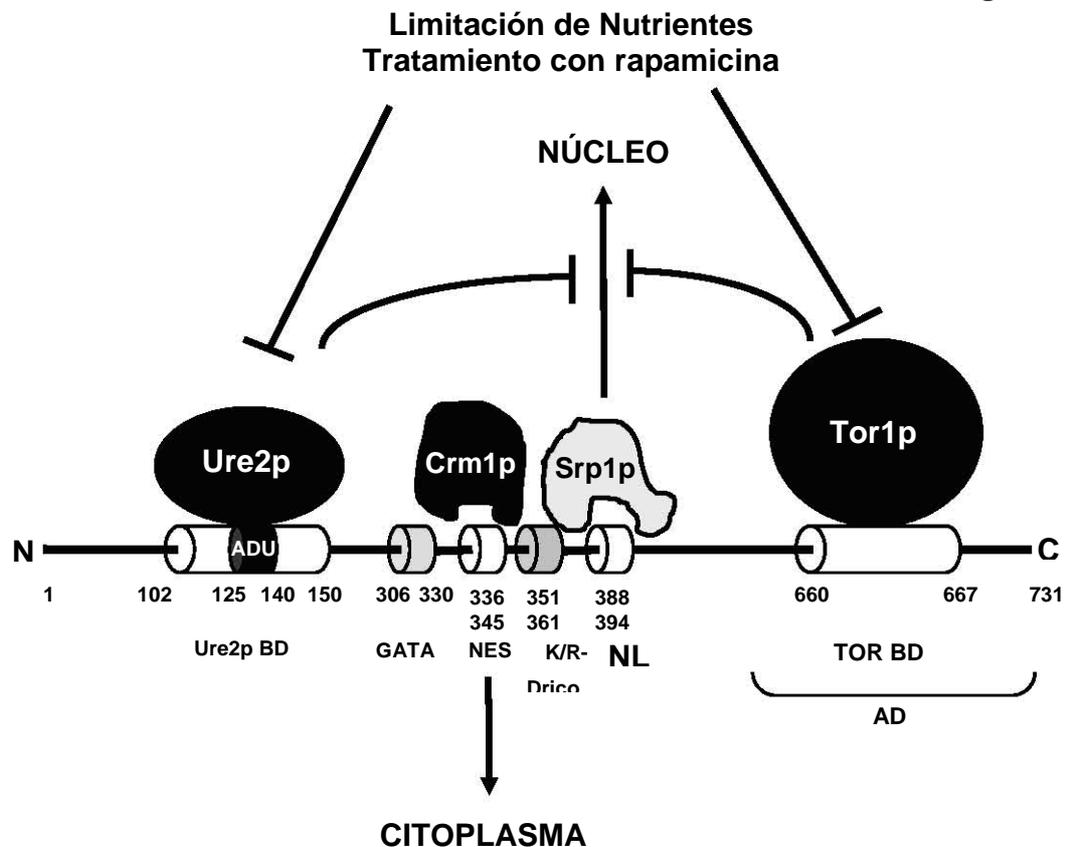


Figura 3B. Dominios estructurales de Gln3p y su regulación por TOR en respuesta a la disposición de nutrientes. En condiciones de abundancia y alta calidad de nutrientes, Gln3p pasa rápidamente del núcleo al citoplasma, mediado por la exportina Crmp1p, que reconoce la NES (Nuclear Exportation Signal). Ure2p y Tor1p se unen a su correspondiente dominio de unión (Binding Domain), Ure2p BD y TOR BD, lo que causa la retención de Gln3p en el citoplasma. En condiciones de baja calidad y abundancia nutricional o en tratamiento con rapamicina, la habilidad de TOR y Ure2p para inhibir la importación nuclear de Gln3p es bloqueada, permitiendo la acumulación de Gln3p predominantemente en el núcleo, gracias a la importina Srp1p, que interactúa con la NLS (Nuclear Localization Signal). Una vez en el núcleo, Gln3p se une a las secuencias pertinentes en los promotores de los genes que activa, gracias a su dominio de unión a DNA tipo GATA, dedo de zinc C4, el dominio de activación (AD) y posiblemente con el dominio rico en lisina y arginina (K/R) (Modificado de Carvalho y Zheng, 2003).

Figura 4

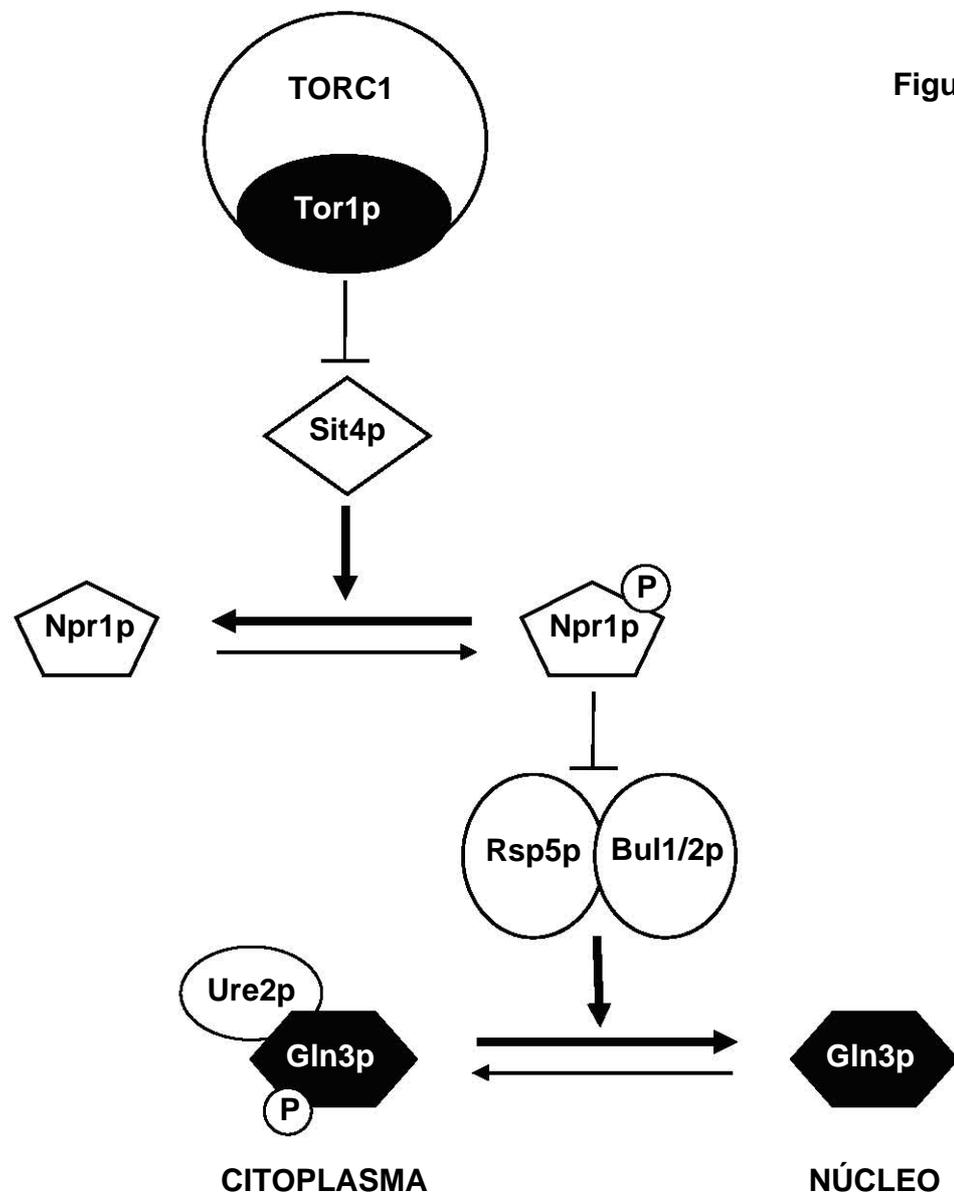


Figura 4. Regulación de Gln3p por la vía TOR y las ligasas de ubiquitina. Se ha visto que en respuesta a rapamicina, pero no a prolina, Sit4p desfosforila a la cinasa Npr1p, que es un regulador negativo de la transcripción dependiente de Gln3p. Npr1p actúa sobre las ligasas de ubiquitina E3/E4, Rsp5p y Bul1/2p, que promueven la activación por Gln3p. Npr1p parece ser específico sobre Gln3p, ya que no actúa sobre Gat1p. No se ha detectado ubiquitinación de Gln3p, por lo que es probable que los blancos de ubiquitinación sean Ure2p o la maquinaria de importación de Gln3p. Las líneas gruesas indican las partes de la vía que están activas en buenas fuentes de nitrógeno (Modificado de Crespo *et al.*, 2004).

Figura 5

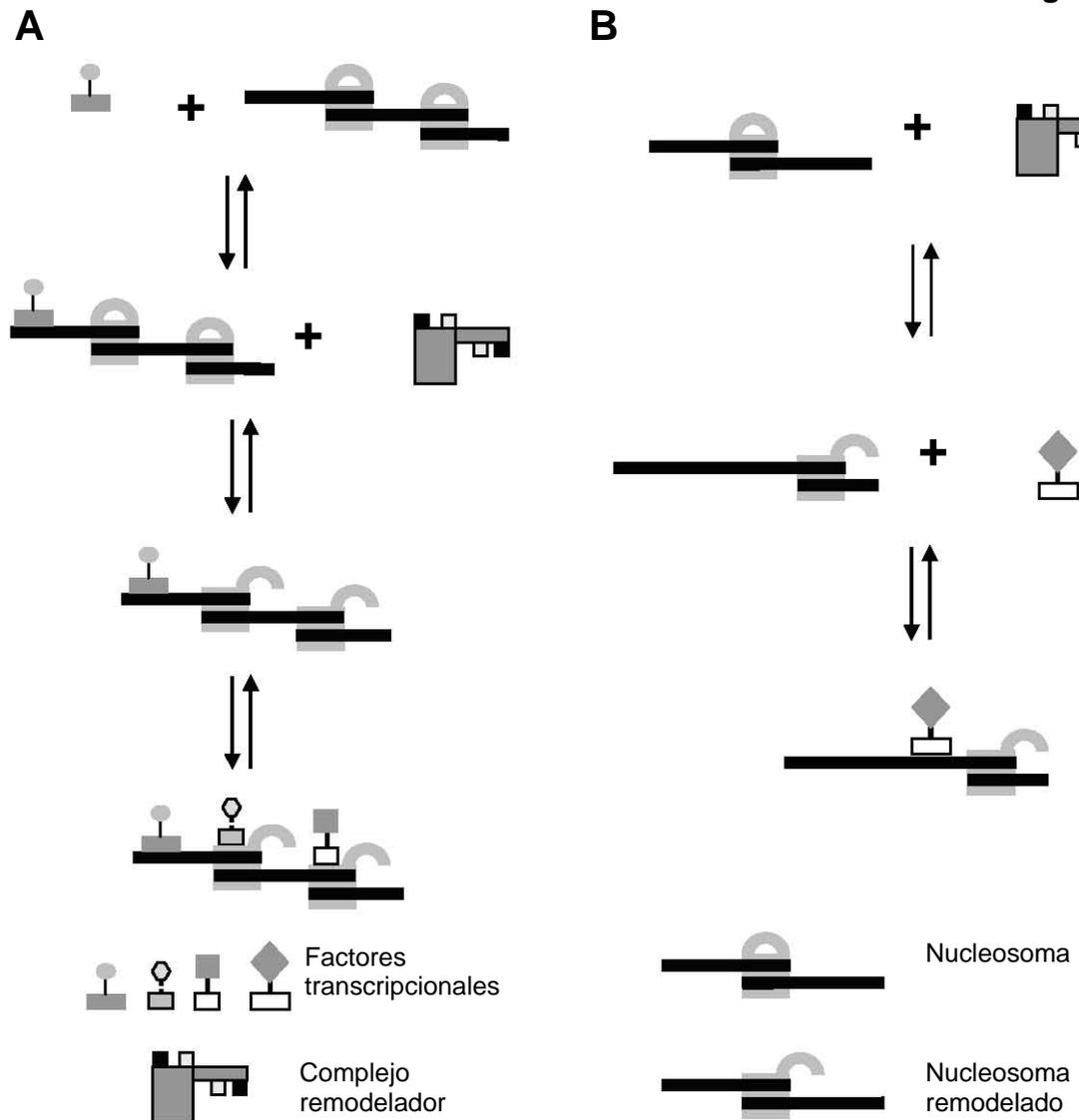


Figura 5. Modelo hipotético de la participación de los complejos remodeladores en la regulación génica. **A** Un factor transcripcional se une a una secuencia específica en el DNA, y recluta un complejo remodelador por interacción directa proteína-proteína. El complejo remodelador, entonces, altera la estructura de los nucleosomas adyacentes, incrementando la accesibilidad al DNA en la cromatina. **B** El complejo remodelador, que no es atraído al DNA por un factor transcripcional, “desliza” al nucleosoma fuera de su posición original, con lo cual permite la unión de los factores transcripcionales. Una vez unido, el factor transcripcional, bloquea el movimiento de los nucleosomas, y con esto altera también la conformación original de la cromatina (Modificado de Aalfs y Kingston, 2000).

Figura 6

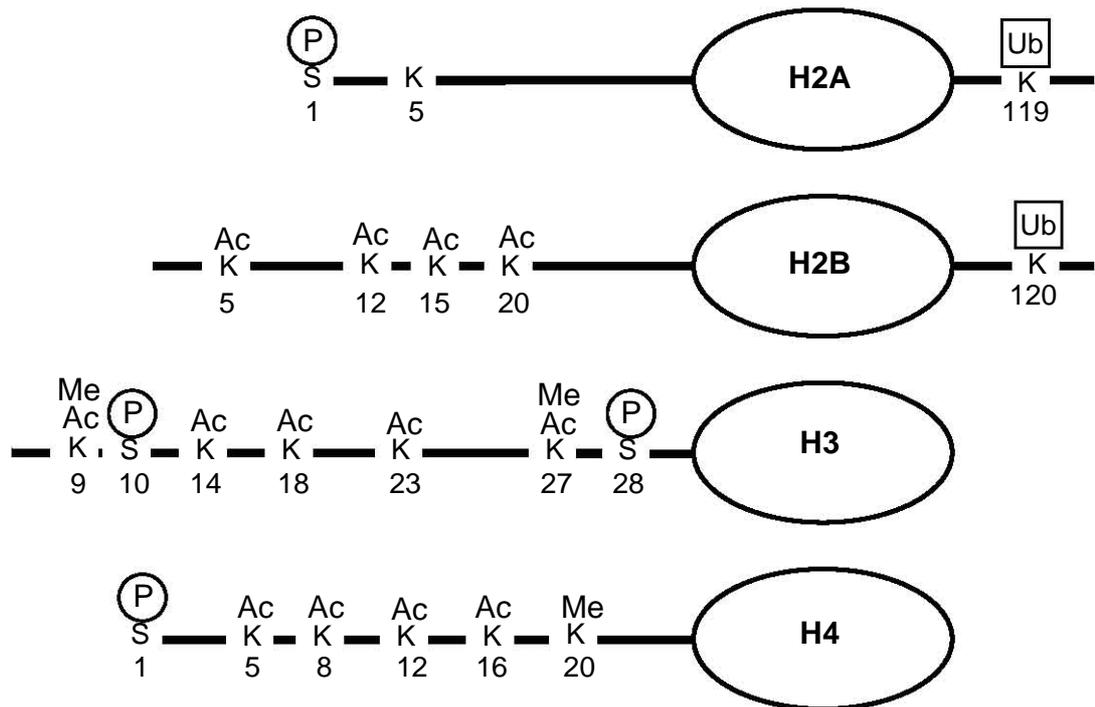


Figura 6. Posibles modificaciones postranscripcionales en el extremo N-terminal de las histonas. El extremo N-terminal de las histonas se muestra como una línea gruesa, donde se muestra la ubicación aproximada de los residuos de lisina (K) y serina (S). Las modificaciones probables están indicadas como: acetilación (AC), metilación (Me), fosforilación (P) y ubiquitinación (Ub) (Modificado de Pérez-Martín, 1999). Gcn5p acetila H3 y H2B preferentemente (Kuo *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997).

Figura 7

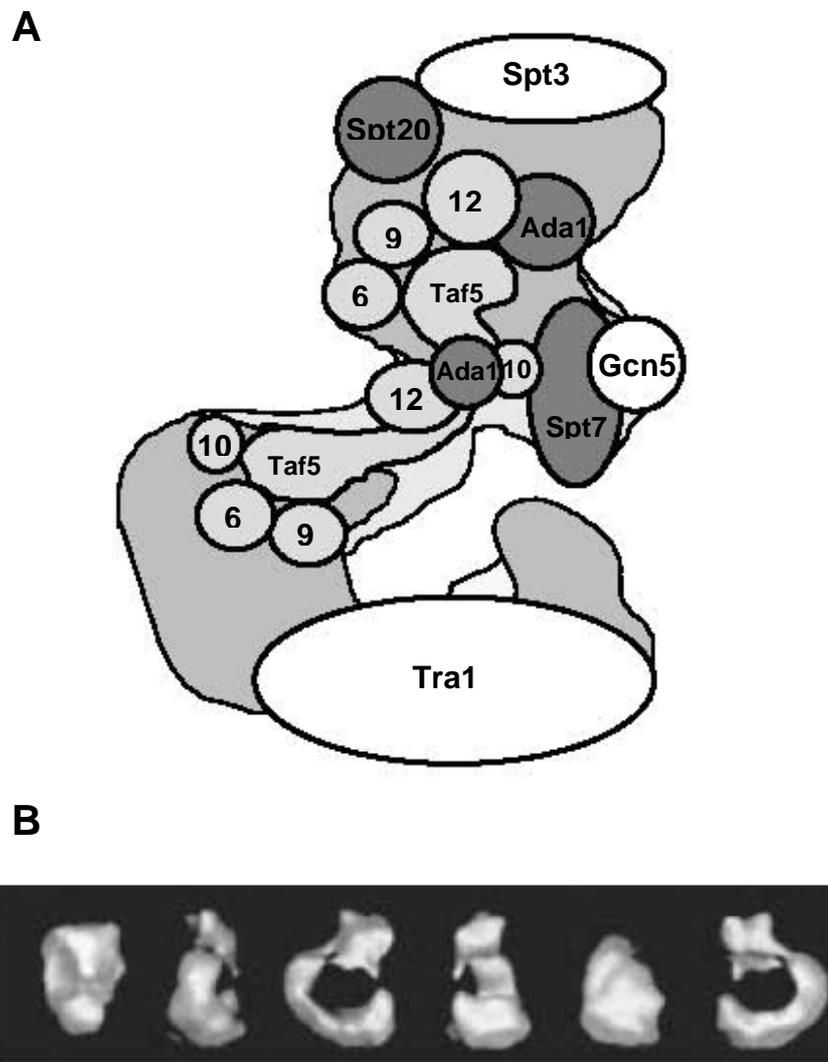


Figura 7. El complejo SAGA de *Saccharomyces cerevisiae*. **A.** Representación esquemática de la localización de las subunidades en el modelo tridimensional del complejo. Aun cuando no aparecen en el esquema se sabe que Ada2p y Ada3pp se encuentran próximos a Gcn5p. **B.** Modelo tridimensional de una mutante *ada1Δ*, donde se muestran la arquitectura de tres lóbulos, también puede apreciarse la hendidura central (Modificado de Wu, *et al.*, 2004).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glutamato y la glutamina son el punto de partida para la generación de todos los compuestos nitrogenados esenciales de la célula. Las reacciones de biosíntesis de estos dos aminoácidos constituyen el denominado CNM (Central Nitrogen Metabolism). En *Saccharomyces cerevisiae* el CNM tiene como rasgo particular que la vía NADP-GDH está constituida por dos enzimas producto de dos genes ohnólogos, *GDH1* y *GDH3*. En vista de la gran cantidad de genes duplicados que constituyen el genoma de este organismo, cerca del 45% (Wolfe y Shields, 1997; Keogh *et al.*, 1998). La hipótesis de una duplicación masiva, que habría dado como resultado la generación de copias con habilidades metabólicas nuevas, capaces de proveer diversidad y complejidad bioquímica, podría explicar la existencia de estas dos enzimas que catalizan la misma reacción pero que no resultan funcionalmente redundantes.

Siguiendo las ideas de que la duplicación génica provee de novedad evolutiva y de que los genes duplicados transitan procesos de subfuncionalización hasta la adquisición de nuevas funciones, que confieren robustez metabólica, interesados en dilucidar su importancia fisiológica; en el laboratorio de la Dra. Alicia González, se ha analizado la duplicación de las GDH-NADP, para comprender su importancia en el metabolismo nitrogenado de la levadura, abordando el problema desde diversos aspectos, entre los cuales se encuentran: i) caracterizar bioquímicamente las isoenzimas y, ii) establecer cómo es la expresión transcripcional de *GDH1* y *GDH3*.

Con la caracterización bioquímica de las isoenzimas se determinó que Gdh1p y Gdh3p son diferentes en su afinidad por α -cetoglutarato, su inhibición competitiva por fosfato inorgánico, su regulación alostérica y su estabilidad *in vitro*. Dependiendo de la proporción con la cual los monómeros producto de *GDH1* o *GDH3* se ensamblan entre sí confieren propiedades cinéticas diferentes a los hexámeros híbridos resultantes. Así mismo, se ha determinado que Gdh1p es la vía principal de provisión de glutamato durante la fermentación de glucosa, y que Gdh3p sólo está presente en células cultivadas en fuentes de carbono no fermentables. Gdh1p, además, es susceptible a la proteólisis desencadenada por

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

la privación de carbono en el medio, Gdh3p no presenta ésta regulación postranscripcional. Por lo anterior, sabemos que estas dos GDH-NADP tienen funciones no redundantes *in vivo* y que solo con la presencia de ambas se garantiza un equilibrio en la biosíntesis de glutamato y el consumo de α -cetoglutarato (DeLuna *et al.*, 2001).

Respecto de la regulación transcripcional de *GDH1* sabemos que se expresa en glucosa y se induce en etanol, donde una regulación estricta controla la abundancia del monómero. En cultivos en glucosa Gln3p regula positivamente y Dal80p reprime (Daugherty *et al.*, 1993; Riego *et al.*, 2002). Igualmente *GDH1* requiere para su activación del complejo Leu3- α -isopropilmalato (Hu *et al.*, 1995) y del complejo HAP, donde Hap4p es sólo parcialmente necesaria (Dang *et al.*, 1996; Riego *et al.*, 2002). Dado que factores que se creían exclusivos del metabolismo nitrogenado como Gln3p y Gcn4p también regulan la expresión de *GDH1* en respuesta a una fuente de carbono, como es el etanol, se ha ubicado a este gen en un punto de conexión entre el metabolismo de carbono y nitrógeno. Finalmente, algunas subunidades tanto del complejo SAGA, excepto Gcn5p, como del SWI/SNF participan en la activación transcripcional de *GDH1* (Riego *et al.*, 2002)

Nuestro objetivo principal al emprender este trabajo de investigación consistió en determinar como era la regulación transcripcional del gen *GDH3*, identificando factores transcripcionales, complejos remodeladores de la cromatina y condiciones ambientales, que infuyen en su perfil de expresión; para poder comprender importancia en la biosíntesis de glutamato en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los objetivos específicos de este trabajo, respecto a la regulación transcripcional de *GDH3*, fueron: i) la caracterización de la región promotora, ii) el perfil de expresión del gen en diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, iii) el análisis del efecto sobre la expresión de *GDH3* de mutaciones en diferentes factores transcripcionales, y iv) determinar el arreglo nucleosomal y su modificación por factores ambientales, factores transcripcionales o complejos remodeladores.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Gran parte de los resultados de este trabajo de investigación han sido publicados en el **Artículo 1**. Los datos indican que la regulación transcripcional de *GDH3* depende principalmente de la fuente de carbono y que, si bien este gen responde a Regulación Catabólica Nitrogenada (NCR), ésta queda en un segundo plano, ante la potente represión que ejerce la glucosa. De acuerdo con lo anterior, la expresión de *GDH3* es reprimida en glucosa e inducida en etanol. Esta inducción depende de Gln3p, Hap2p, Hap3p y parcialmente de Hap4p. Y de una conformación relajada o

abierta de la cromatina, resultado de la acción coordinada de SAGA y SWI/SNF. Como hemos visto (Riego *et al.*, 2002) el gen *GDH1* es la vía predominante para la biosíntesis de glutamato en glucosa, donde *GDH3* está totalmente reprimido. En cultivos prolongados en medio rico (YPD) el panorama es el opuesto. *GDH3* es un gen que se induce durante la transición diáuxica y que se expresa vigorosamente en fase estacionaria, donde *GDH1* prácticamente no existe. Esta expresión inducida está relacionada con la remodelación de la región promotora de este gen, que depende de SAGA y SWI/SNF. Al parecer la duplicación de estas enzimas confiere eficiencia metabólica a la biosíntesis de glutamato y adaptación al metabolismo facultativo, ya que, la función de *GDH1* en glucosa no puede ser suplida por la actividad del hexámero de Gdh3p aún cuando se sobreexpresa.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar la regulación transcripcional del gen *GDH3* de *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de determinar su valor fisiológico en la biosíntesis de glutamato. Al identificar las diferencias y similitudes con *GDH1*, se podría establecer que la duplicación de estos genes tiene un efecto eficientizador del proceso de biosíntesis de glutamato. De acuerdo con esto se planteó la siguiente estrategia:

1. Clonar y fusionar el promotor de *GDH3* al gen reportero *lacZ*. Mediante la técnica de PCR se obtuvo un fragmento de 1230 pb que contenía el promotor de *GDH3*. Este fragmento se fusionó con el gen *LacZ* de *Escherichia coli* en los vectores pertinentes, los cuales se utilizaron para cuantificar la actividad de β -galactosidasa, como reflejo de la expresión transcripcional de *GDH3*. Por medio del análisis de la secuencia del promotor se identificaron los elementos en *cis* contenidos en esta, y que posiblemente participen en la regulación.

2. Determinar la actividad transcripcional de *GDH3* en diferentes condiciones de cultivo. Se transformó una cepa silvestre con la fusión promotor *GDH3-lacZ* en células cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno, con glucosa y/o etanol como fuentes de carbono. Mediante ensayos de tipo Northern se confirmaron los resultados del ensayo con β -galactosidasa.

3. Establecer el efecto regulador de algunos factores transcripcionales sobre la expresión de *GDH3*. Se determinó la expresión de *GDH3* en la cepa silvestre y en mutantes de varios de los reguladores transcripcionales conocidos del metabolismo del nitrógeno y del carbono, candidatos para regular a este gen.

4. Determinar el arreglo nucleosomal del promotor de *GHD3*. Se determinó la estructura de la cromatina mediante análisis de baja resolución con la enzima

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

DNAsaI y la nucleasa micrococcal (MNasa), en medio mínimo con amonio, como fuente de nitrógeno, y con glucosa o etanol como fuente de carbono.

5. Caracterizar el papel de los complejos SAGA y SWI/SNF sobre la regulación de *GDH3*. Se determinó la expresión de *GDH3* en la cepa silvestre y en mutantes de algunas subunidades de los complejos remodeladores SAGA y SWI/SNF. Las células provenían de cultivos realizados en amonio y etanol como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. También se analizó el efecto de estas mutaciones en cultivos de diferentes fases de crecimiento en medio rico, YPD.

6. Analizar el efecto de mutaciones en factores transcripcionales o remodeladores sobre el arreglo nucleosomal del promotor de *GDH3*. Por medio de análisis de baja resolución utilizando la nucleasa micrococcal (MNasa) se determinó la estructura de la cromatina en cepas portadoras de mutaciones en *gln3Δ*, *hap2Δ*, *gcn5Δ* y *snf2Δ*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos de los datos y figuras que aparecen en el **Artículo 1** se muestran en este apartado junto con resultados adicionales que complementan este trabajo de Tesis.

1. Clonación de la región promotora de *GDH3*, e identificación de los sitios probables de unión de factores transcripcionales.

Con base en la secuencia del Cromosoma I de *S. cerevisiae*, reportada en la base de datos del genoma completo de este organismo, SGD ("Saccharomyces Genome Database"), se diseñó un par de desoxioligonucleótidos flanqueando la zona que presuntamente contenía el promotor completo de *GDH3*. Esta región comprendió 1213 pb río arriba del codón de inicio del gen y 17 pb de la región codificadora. El fragmento de 1230 pb resultante, generado mediante la técnica de PCR, se subclonó en el sitio *Hind*III de los vectores YEp353 (*URA3*) y YEp363 (*LEU2*), portadores del gen reportero *LacZ*, obteniendo las fusiones pGDH3-*URA3* y pGDH3-*LEU2*, respectivamente.

Los sitios probables para la unión de factores transcripcionales que aparecen señalados en la **Figura 8** y **Figura 9**, fueron identificados usando el programa RSA-tools (http://embnet.cifn.unam.mx/rsa-tools/RSAT_home.cgi).

Además de las secuencias identificadas como probables sitios de unión para factores transcripcionales, el promotor de *GDH3* presenta algunas zonas de composición particular. Como podemos ver en la **Figura 8**, existen largas zonas de polydA-dT.

Se ha establecido que el factor más importante que determina la posición rotacional del DNA con respecto al nucleosoma, es la secuencia local de éste, afectando su flexibilidad y curvatura (Drew y Travers, 1985). Las secuencias que fácilmente adoptan una configuración curva son incorporadas alrededor de los nucleosomas, mientras que las más rígidas tienden a ser excluidas (Pennings *et al.*, 1989). Las secuencias de polydA-dT presentan una periodicidad de la hélice que

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

puede no ser constante, cuando estas regiones repetitivas son posicionadas alrededor de los nucleosomas (Fox, 1992). Estas secuencias adoptan una configuración inusual en la cual las pares de bases forman una hélice con alta torsión que adopta una estructura rígida que es difícil de deformar. Las zonas de polydA representan regiones de sensibilidad a nucleasa (Struhl, 1985). Por lo cual, se ha propuesto que las secuencias polydA-dT pueden afectar la estructura de la cromatina, por su tendencia a excluir a los nucleosomas y permitir la entrada de las proteínas reguladoras (Struhl, 1985; Chen *et al.*, 1987).

Se realizó la secuenciación del promotor de *GDH3* y no se encontraron gran cantidad cambios de base respecto a la secuencia reportada en el SGD, y los escasos que se detectaron no se encuentran en lugares que podrían tener influencia en la unión de factores reguladores o la estructura de la hebra de DNA.

Determinación del inicio de transcripción de *GDH3*.

Implementando la técnica de “Primer Extension” a partir de preparaciones de RNA total de la cepa silvestre con y sin la fusión p*GDH3-LEU2*, cultivada en glucosa o etanol como fuente de carbono, se identificaron los sitios de inicio de la transcripción de *GDH3*. Se determinó el inicio de transcripción del gen en el cromosoma y en la fusión, p*GDH3-LEU2*. En ambos casos se identificaron numerosos sitios de inicio pero sólo uno fue predominante y estuvo presente de manera significativa en ambas cepas y condiciones de cultivo, tanto en el cromosoma como sobre el vector. Por lo cual se determinó como el sitio de inicio del gen *GDH3* (**Figura 8**).

2. Actividad transcripcional de *GDH3* en diferentes condiciones de cultivo.

Las células de levadura reconfiguran sus patrones de expresión génica para adaptarse a los cambios en la disponibilidad de nutrientes del medio en el que se encuentran. *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de proliferar en gran variedad de fuentes de carbono y utilizar diversas fuentes de nitrógeno. Además, tiene la facultad de hacerlo en condiciones fermentativas o respiratorias. Las GDH-NADP se

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

encuentran en un punto de conexión entre el metabolismo de nitrógeno y carbono, siendo el glutamato y la glutamina moléculas de gran importancia para la síntesis de muchas otras moléculas fundamentales. El glutamato, incluso, aparece como un importante regulador de flujo metabólico, al regular algunos genes del TCA y la vía RTG (Liu y Butow, 1999; DeLuna *et al.*, 2001).

Efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de *GDH3*.

La expresión del gen *GDH3* en una cepa silvestre se encuentra reprimida en glucosa y se induce 140 veces cuando las células son cultivadas en etanol (**Figura 10**). Esta inducción esta sujeta a Represión Catabólica por Carbono (CCR), ya que cuando *Saccharomyces cerevisiae* es cultivada en un medio con las dos fuentes de carbono (glucosa y etanol al 2 %), la expresión transcripcional de *GDH3* permanece reprimida (**Figura 11**). En una mutante *gdh1Δ* se presenta un ligero incremento en los valores de β-galactosidasa, en comparación con la cepa silvestre, debido probablemente a la falta de glutamato que ésta cepa experimenta, la forma de la gráfica señala el mismo comportamiento que la cepa silvestre bajo la RCC (**Figura 11**).

A pesar de la magnitud de la inducción que tiene lugar en la expresión transcripcional de *GDH3*, ésta no se refleja en un incremento en la actividad de GDH-NADP en la cepa silvestre, que tampoco se modifica cuando ambas fuentes de carbono están presentes en el medio de cultivo al mismo tiempo (**Figura 11**) (DeLuna *et al.*, 2001). En vista de que *GDH1* aumenta al doble su expresión transcripcional en etanol (Dang *et al.*, 1996; Riego *et al.*, 2002), y que esto no se refleja en un aumento en la actividad enzimática silvestre de GDH-NADP, refuerza la teoría de que existan mecanismos de regulación postranscripcional para ambos genes. Riego (2002) propone que en el caso de *GDH1*, un mecanismo posible es la inestabilidad del mRNA, al observar un transcrito de menor tamaño que el esperado, en muestras provenientes de cultivos en etanol. En el presente trabajo no encontramos evidencia para apoyar esta posibilidad en el caso de *GDH3*. Ni de una menor traducibilidad del mRNA de *GDH3*, aunque también es un mecanismo posible.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la inestabilidad de la proteína producto de *GDH3*, DeLuna *et al.*, (2001), han encontrado que los homohexámeros formados por Gdh1p son más estables que aquellos ensamblados con monómeros de Gdh3p. Por lo que es probable que en etanol, cuando *GDH3* tiene un papel más importante que aquel que desempeña en glucosa, la vulnerabilidad que sus monómeros le confieran al hexámero activo regulen delicadamente la actividad total de GDH-NADP.

Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *GDH3*.

Como ya mencionamos la glucosa ejerce una fuerte represión sobre la expresión transcripcional de *GDH3*. Esta represión es la fuerza reguladora más importante que observamos sobre este promotor, y se sobrepone a la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), que también controla este gen (**Figura 12**). Lo cual significa, que en presencia de una buena fuente de nitrógeno, como la glutamina, la asparagina o el glutamato, los genes que codifican para las proteínas que participan en el transporte o la asimilación de fuentes pobres de nitrógeno, como la prolina, se reprimen o inactivan (Cooper y Sumrada, 1983; ter Schure *et al.*, 2000). El gen *GDH3* se reprime por una buena fuente de nitrógeno, en este caso glutamina, y se induce en una mala fuente, prolina. En presencia de ambas, la expresión de *GDH3* se mantiene reprimida (**Figura 13**).

Expresión transcripcional de *GDH3* en cultivos prolongados en medio rico (YPD).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestra cinco fases de proliferación bien definidas cuando es cultivada en medios ricos, con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, la transición diáuxica, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag o de sensado de nutrientes es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo, con el cual se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio o transición diáuxica, un periodo de tiempo breve

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en el cual no hay división, y la célula transita de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica, *Saccharomyces* usa como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica, la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

En un análisis de tipo Northern blot hemos observado que la expresión transcripcional de *GDH3* se encuentra reprimida en la fase de proliferación logarítmica, ya que la señal del mRNA del gen es muy baja durante las primeras horas de cultivo en medio rico (YPD), aumenta progresivamente hasta alcanzar su máximo nivel en la transición diáuxica, y permanece con una señal fuerte en la fase estacionaria, donde observamos su permanencia hasta por ocho días. Comparativamente, la señal que da la hibridación de la sonda específica con el mRNA de *GDH1*, es muy alta durante la fase de proliferación exponencial y disminuye considerablemente en la transición diáuxica y la fase estacionaria (**Figura 14**).

Como puede apreciarse en la **Figura 15**, al hacer un seguimiento de la actividad de β -galactosidasa generada por la fusión *pGDH3-LacZ*, en medio rico (YPD), se observa un comportamiento similar al presente en el análisis de tipo Northern blot. La expresión de *GDH3* es baja en las primeras horas de cultivo (20 U β -gal mg^{-1}), al igual que la de *GDH1* y *GLT1*, que también se observan en la figura, pero sólo la primera se induce durante la transición diáuxica (1000 U β -gal mg^{-1}) y permanece en la fase estacionaria (donde puede alcanzar entre 2500 y 6000 U β -gal mg^{-1}).

Como parte de estas observaciones, se realizó también, la cuantificación de la actividad enzimática de GDH-NADP, cuyos resultados generaron la **Figura 16**. En este caso se observa la actividad enzimática de GDH-NADP en la cepa silvestre, que aumenta ligeramente con el cambio diáuxico y permanece en la fase estacionaria, hasta por 20 días de cultivo en medio rico. En la figura aparecen, también, los perfiles de actividad de GDH-NADP de las mutantes *gdh1* Δ y *gdh3* Δ . De esta forma,

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

se observa como la actividad de GDH-NADP, de la mutante *gdh1Δ*, que es sostenida exclusivamente de un hexámero de Gdh3p (DeLuna et al., 2001), está reprimida en glucosa y comienza su inducción en la transición diáuxica, para permanecer en la fase estacionaria con una actividad de magnitud semejante a la de la silvestre. En el caso de la mutante *gdh3Δ*, durante las primeras horas de cultivo presenta una actividad de GDH-NADP parecida a la de la cepa silvestre. Cuando comienza a disminuir la concentración de la glucosa en el medio de cultivo, el homohexámero de Gdh1p, que está presente en esta cepa, es objeto de un proceso de degradación (Mazón y Hemmings, 1979), que abate por completo la actividad enzimática.

En las figuras 15 y 16 se señala el momento aproximado en el cual se agota la glucosa en el medio de cultivo, que marca la transición diáuxica, y coincide con el inicio de la proteólisis de Gdh1p, alrededor de las 24 horas. También está indicado el momento en el que comienza a ser utilizado el etanol, aproximadamente a las 72 horas, lo cual es un rasgo de la primera parte de la fase estacionaria. Para ambos experimentos se tomaron como referencia los experimentos de DeLuna *et al.*, (2001).

Anteriormente se había observado la inducción en la transición diáuxica de *GDH3*, y se había identificado al factor dimérico Msn2p/Msn4p como responsable de ésta inducción (Boy-Macote *et al.*, 1998). Los activadores codificados por *MSN2* y *MSN4* son homólogos y pertenecen a la familia de las proteínas con dedos de zin, Cys2His2 (Wingender *et al.*, 2000). El factor Msn2p/Msn4p activa la transcripción de los genes que regula al unirse con secuencias en el DNA conocidas como caja STRE (5' CCCT 3'), en respuesta a diversos tipos de estrés, como por ejemplo: privación nutricional, choque térmico, daño en el DNA y estrés oxidativo u osmótico (Martínez-Pastor et al., 1996; Boy-Macote *et al.*, 1998).

El promotor de *GDH3* no posee cajas STRE en su secuencia, pero sí presenta tres elementos de un motivo muy parecido a STRE, denominada caja PDS (5' CCCCT 3') (**Figura 8**) que probablemente son unidas por Msn2p/Msn4p durante la transición diáuxica (DeRisi *et al.*, 1997; Boy-Macote *et al.*, 1998).

Con estos antecedentes e interesados en saber si este factor, Msn2p/Msn4p, estaba regulando la inducción en etanol de *GDH3*, se realizó la cuantificación de la

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

actividad de β -galactosidasa en una mutante *msn2 Δ ,msn4 Δ* . Pero no se obtuvo ningún cambio en la actividad de β -galactosidasa, en cultivos en MM con glucosa (Silvestre 91 ± 2.6 , *msn2 Δ ,msn4 Δ* 98 ± 1.4) o etanol (Silvestre 1277 ± 110 , *msn2 Δ ,msn4 Δ* 1371 ± 52) como fuentes de carbono.

Tampoco se obtuvieron resultados positivos, es decir cambio significativo en la actividad de β -galactosidasa, reflejo de la expresión de *GDH3*, cuando se realizaron pruebas donde se sometieron las células de levadura, portadoras de la fusión *pGDH3-LacZ*, a condiciones de estrés oxidativo, térmico (Lina Riego, comunicación personal) u osmótico (CLA-A1 MM s/osmotensor: 60, MM+NaCl 1M 30 min: 65, 60 min: 63; MM+Sorbitol 1M 30 min: 61, 60 min: 54 U β -galactosidasa).

3. Efecto de algunos factores transcripcionales sobre la expresión de *GDH3*.

Nuestros resultados muestran hasta aquí que *GDH3* es un gen regulado principalmente por la naturaleza de la fuente de carbono, y la fuente de nitrógeno en segundo plano. De manera similar a *GDH1*, su expresión transcripcional estaría bajo el control de sistemas regulatorios generales tanto del metabolismo de nitrógeno como del metabolismo de carbono (Dang *et al.*, 1996; DeLuna *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002).

En vista de que la expresión de *GDH3* presenta su inducción más importante cuando la fuente de carbono en el medio de cultivo es el etanol, y que a diferencia de lo que sucede en la transición diáuxica, no existía ninguna referencia al respecto de quien podría ser el efector de este cambio. Nuestro interés se enfocó, entonces, en determinar cuáles eran los factores transcripcionales que participan en este fenómeno de desrepresión de la transcripción de *GDH3* glucosa-etanol dependiente.

Factores del metabolismo de nitrógeno.

Efecto de Gln3p, Gat1p y Dal80p

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia del promotor de *GDH3* posee cuatro sitios GATA (**Figura 8**), los cuales potencialmente son unidos por los activadores transcripcionales tipo GATA de *Saccharomyces cerevisiae*, Gln3p, Gat1p/Nil1p, activadores que regulan la expresión de genes en respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno (Magasanik y Kaiser, 2002). Las secuencias GATA también pueden ser unidas por el factor, caracterizado como represor, Dal80p/Uga43p (Cunningham y Cooper, 1991; Minehart y Magasanik, 1991; Dauherty *et al.*, 1996).

En ausencia de Gln3p, la expresión de *GDH3* disminuye, tanto en glucosa como en etanol, con un efecto mayor en ésta última fuente. Ni Gat1p ni Dal80p tuvieron efecto en ninguna de las dos condiciones de cultivo (**Figura 17**). Gln3p es un factor transcripcional que se considera típico del metabolismo nitrogenado, sin embargo, como es el caso también de *GDH1* (Riego *et al.*, 2002), inesperadamente regula a *GDH3* en respuesta a la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, en este caso etanol.

Se ha observado que en respuesta a la calidad y disponibilidad de nutrientes Gln3p cambia su localización subcelular gracias a la vía de señalización TOR. En presencia de una buena fuente de nitrógeno, Gln3p se encuentra fosforilado y unido en el citoplasma con la proteína Ure2p (Minehart y Magasanik, 1991). La formación del complejo Gln3p-Ure2p depende de la inhibición, gracias a la proteína Tap42p, que es regulada por TOR, de la fosfatasa Sit4p, que directa o indirectamente es la responsable de la desfosforilación de Gln3p (Jiang y Broach, 1999; Beck y Hall, 1999; Cardenas *et al.*, 1999) (**Figura 3A**). Al cultivar las células de levadura con una fuente de nitrógeno pobre como la prolina, o en presencia del antibiótico y anticancerígeno, rapamicina, que imita el efecto de la baja calidad o la escasez de nutrientes, Gln3p se desfosforila y disocia de Ure2p (Bertram, *et al.*, 2000), por lo que puede ser transportado al núcleo por la importina α /Srp1p. Una vez en el núcleo Gln3p puede unirse a los sitio GATA de los promotores de los genes que regula (Beck y Hall, 1999) (**Figura 3A**).

Se considera que la vía de señalización TOR funciona como un regulador del crecimiento y la proliferación celular en levaduras y también en mamíferos, debido a la amplia gama de procesos en los cuales participa, entre los que se encuentran: la

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

biosíntesis de proteínas, el ciclo celular, la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el inicio de la traducción, la biogénesis ribosomal, la acumulación de glicógeno, la esporulación, el metabolismo de nitrógeno y de carbono (Mahajan, 1994; Cardenas *et al.*, 1999; Harwick *et al.*, 1999; Powers y Walter, 1999; Schmeizie y Hall, 2000; Jacinto y Hall, 2003).

Aun cuando la expresión de *GDH3* en etanol es operada de manera importante por Gln3p, ésta inducción aparentemente no depende de su localización preferencial en el núcleo, porque cuando la cepa silvestre que contiene la fusión *Gln3-myc₁₃* es cultivada con glucosa o etanol, como fuentes de carbono, Gln3p se distribuye de manera similar en el citoplasma y en el núcleo (Sergio Zonszein, comunicación personal). Es decir, Gln3p actúa sobre el promotor de *GDH3* cuando está en el núcleo independientemente de la fuente de carbono. Lo anterior se relaciona a las observaciones respecto a que la naturaleza de la fuente de carbono no actúa directamente sobre la localización subcelular de Gln3p (Cox *et al.*, 2003).

El activador Gln3p regula también la inducción de *GDH3* en la fase estacionaria (Silvestre 5953, *gln3Δ* 100 ± 21.4 , después de 7 días de cultivo en YPD). Lo cual sugería que en estas condiciones Gln3p podría estar preferentemente localizado en el núcleo. Por tal razón, se determinó la localización de la fusión *Gln3-myc₁₃* contenida en la cepa CLA-1, en cultivos prolongados en medio rico (YPD). Durante la fase exponencial, Gln3p se encontró localizado en el citoplasma. Cuando las células de levadura comenzaban a transitar hacia el cambio diáuxico se encontró parcialmente localizado en el núcleo. Lo cual se debe a la caída en los niveles intracelulares de glutamina, atribuidos a la limitación energética de esta fase de crecimiento (Cox *et al.*, 2002). En la fase estacionaria, ya plenamente establecida, Gln3p se encuentra preferentemente localizado en el núcleo, donde es capaz de activar la transcripción de *GDH3* (**Artículo**).

Efecto del activador Gcn4p.

El factor Gcn4p es el regulador positivo de la expresión de los genes de más de 30 enzimas de las vías de síntesis de aminoácidos, y se activa al comienzo de la

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

respuesta del control general de aminoácidos, GCN, ante condiciones de escasez de nutrientes (Hinnebusch,1997). A pesar de que el producto de *GDH3* es una enzima que participa en la biosíntesis de un aminoácido, el glutamato, nuestros datos indican que no está bajo el control de Gcn4p, en deprivación de aminoácidos. Al probar la mutación *gcn4Δ*, ésta no presenta cambios significativos con respecto a la cepa silvestre, en glucosa (Silvestre 17 ± 1.2 , *gcn4Δ* 14 ± 9), pero en etanol tiene un muy ligero efecto (Silvestre 5274 ± 560 , *gcn4Δ* 3738 ± 580). Sin embargo, en MM (68 ± 1.3) como en MM+3AT (59 ± 2.4), como en etanol (5970) y etanol+3AT (5600), la actividad de β -galactosidasa no tuvo modificación significativa. Estos resultados indican que la expresión de *GDH3* no es regulada por deprivación de aminoácidos. Pero al igual que *GDH1*, Gcn4p parece regularlo en respuesta a etanol aunque el efecto no es muy marcado (Riego *et al.*, 2002). Ya que en la secuencia del promotor de *GDH3* no existen ningún sitio probable de unión de Gcn4p, es posible que este factor actúe indirectamente sobre la transcripción de este gen, es decir, Gcn4p podría ser el regulador de algún factor que actúa sobre los promotores de *GDH1* y *GDH3*, en respuesta a la utilización de etanol como fuente de carbono.

Factores del metabolismo de carbono.

Efecto del complejo HAP

La secuencia del promotor de *GDH3* contiene tres sitios, CCAAT, que potencialmente pueden ser reconocidos y unidos por elementos del complejo HAP (**Figura 8**). Este complejo heteromérico, que contiene a las proteínas Hap2/3/4 y Hap5p, interviene en la activación de genes cuyos productos participan en las vías metabólicas relacionadas a la respiración (Dang *et al.*,1996).

Los genes *HAP2*, *HAP3* y *HAP5* son absolutamente necesarios para la capacidad de unión a la caja CCAAT, ya que Ha2p y Hap3p las subunidades que poseen los dominios de unión a DNA, y Hap5p parece ser quien les permite permanecer unidas (McNabb *et al.*, 1995; Gancedo, 1998).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proteína Hap4p es la subunidad que se propone como reguladora de la actividad del complejo, en respuesta a la fuente de carbono. Se ha observado, también, que el gen *HAP4* es fuertemente inducido durante la transición del metabolismo fermentativo al respiratorio (Forsburg y Guarente, 1987).

Las mutantes *hap2Δ*, *hap3Δ* y *hap4Δ* se transformaron con la fusión *pGDH3-LacZ*. Ya que estas cepas son incapaces de proliferar en un medio con una fuente de carbono no fermentable, los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente forma: Las células de las cepas pertinentes fueron cultivadas en MM con glucosa al 2%, hasta la mitad de la fase exponencial (DO_{600nm} 0.3), fueron recolectadas y transferidas a un medio con etanol (2% v/v) para permanecer ahí durante 4 h. Como se puede observar en la **Figura 19** la inducción de la expresión del gen *GDH3* se previene en las mutantes *hap2Δ* y *hap3Δ*, tanto en glucosa como en etanol. Sin embargo, el comportamiento de la mutante *hap4Δ*, resultó distinto. Si bien previene parcialmente la inducción en etanol, conservando cerca del 63% de la actividad que exhibe la cepa silvestre, ejerce una función represora sobre el promotor de *GDH3* en células cultivadas con glucosa como fuente de carbono.

El efecto como represor de *GDH3* que Hap4p tiene en glucosa es inesperado. Sin embargo, se ha observado que esta subunidad puede ejercer actividad represora sobre los genes blanco del represor Mig1p, cuando se sobreexpresa y las células son *mig1Δ* (Lascaris *et al.*, 2004).

Al participar en la regulación de la expresión de *GDH1* y *GDH3* se demuestra que la actividad reguladora del complejo HAP no está limitada a la activación de los genes requeridos para el metabolismo respiratorio. La discrepancia entre el efecto que tiene la mutación *hap4Δ* y las mutaciones en *hap2Δ* y *hap3Δ*, sobre la transcripción de *GDH3*, se presenta también en *GDH1*. La expresión de este gen depende de Hap2p y Hap3p de manera muy importante y en menor medida de Hap4p (Riego *et al.*, 2002). Un panorama similar se presenta en la regulación de los genes *ASN1* y *ASN2*, que codifican para la enzima asparagino sintasa (AS), donde Hap4p tiene un papel menor en la regulación de *ASN1*, en comparación con las otras subunidades del complejo (Dang *et al.*, 1996).

Efecto de los represores Mig1p y Mig2p.

En la secuencia del promotor de *GDH3* no hay sitios evidentes que permitan suponer que este gen sea regulado por los factores Mig1p y Mig2p, caracterizados como represores en glucosa (Gancedo, 1998). Sin embargo, las cepas mutantes para cada uno de ellos fueron transformadas con la fusión *pGDH3-LacZ*, y se determinó la actividad de β -galactosidasa en cultivos con glucosa o con etanol, como fuente de carbono. Como se esperaba estas mediciones no tuvieron modificaciones significativas, por lo cual concluimos que los factores Mig1p y Mig2p no participan en la regulación de la expresión de *GDH3*.

Otros factores que regulan la transcripción de *GDH3*.

Además de los factores transcripcionales mencionados anteriormente, la expresión del gen *GDH3* depende de la actividad de Vid30p (van de Merwe *et al.*, 2001). El gen *VID30* codifica para una proteína no esencial cuya función se relaciona a la degradación catabólica de fructosa-1,6-bifosfato en el proteosoma, y se piensa que se encuentra localizada en el núcleo y en el citoplasma [9].

Aparentemente, Vid30p regula la expresión de *GLT1*, *GDH1* y *GDH3* en bajo amonio (0.05mM de sulfato de amonio, en todos nuestros experimentos la concentración de amonio es 40mM). Y es el responsable de la inducción de *GDH3* en prolina (van de Merwe *et al.*, 2001).

Van der Merwe *et al.*, (2001) encuentran que *VID30* se cuenta entre los genes cuya expresión es sensible a la Represión Catabólica Nitrogenada, NCR, y se induce por rapamicina. Estos autores mencionan, también, que Vid30p reprime modestamente la expresión de los genes cuyos productos hacen decrecer la poza de glutamato (*GDH2* y *GLN1*) y activan marcadamente la expresión de los genes de aquellos productos que producen glutamato (*GDH3*, *GDH1* y *GLT1*). Y postulan que, cuando el amonio es la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo, Vid30p funciona cambiando el metabolismo hacia la producción de glutamato en beneficio de

muchas reacciones biosintéticas que usan el glutamato para producir macromoléculas nitrogenadas.

4. Determinación del arreglo nucleosomal del promotor de *GDH3*.

El material genético de los eucariontes comprende grandes cantidades de DNA que debe ser perfectamente empaquetado para ser contenido por el núcleo. Con este propósito, el DNA se encuentra asociado con proteínas que extensivamente lo pliegan y condensan, y que junto con él comprenden la cromatina. La cromatina tiene propiedades represoras intrínsecas, sin embargo, la eficiente condensación del DNA, debe permitir, también, su accesibilidad a factores reguladores y maquinaria transcripcional, en aquellos momentos en los cuáles sea pertinente la expresión de un gen determinado. Por lo tanto, la alteración de la estructura de la cromatina juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica (Owen-Hughes, 2003; 8).

Tomando en cuenta lo anterior, y en vista de la inducción que tiene lugar en la expresión de *GDH3*, cuando las células de levadura son cultivadas en medio mínimo con etanol como fuente de carbono; y durante la transición diáuxica y fase estacionaria, en medio rico (YPD). Decidimos probar la fusión *pGDH3-LacZ* en mutantes de algunas subunidades esenciales para el funcionamiento de los complejos remodeladores de la cromatina SAGA y SWI/SNF, en éstas condiciones de cultivo. Paralelamente se realizaron ensayos de hipersensibilidad a nucleasas, tanto DNAsal como MNasa.

Ensayo de hipersensibilidad al corte por nucleasas en el promotor de *GDH3*.

Hipersensibilidad a DNAsal alrededor del promotor de *GDH3*.

La nucleasa DNAsal introduce cortes en la doble hebra del DNA. La sensibilidad al corte por esta enzima refleja regiones donde el DNA está particularmente expuesto y no se encuentra organizado en la estructura nucleosomal típica. Gran cantidad de

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sitios de hipersensibilidad se han correlacionado con regiones importantes para el control de la expresión génica y mediante el análisis por el corte de DNAsal se pueden identificar regiones de control en zonas de 20 a 100 kpb (Lewin, 1997).

En la **Figura 20**, panel **E**, se muestra el resultado del tratamiento con DNAsal *in vivo*, de cromatina de células provenientes de cultivos con etanol como fuente de carbono. Se observa claramente la presencia de sitios de hipersensibilidad que no se encuentran en la cromatina de células cultivadas en glucosa. La zona que abarca el análisis, aproximadamente 5 kpb, comienza en la región codificante del gen *FLO9* que está río arriba del promotor de *GDH3*. Abarca toda la región intergénica y termina dentro del gen *GDH3*. Es necesario mencionar que, como se puede ver, los sitios de hipersensibilidad resultan asociados a la zona donde se ubica el promotor de *GDH3*, que contiene los sitios que probablemente sean importantes para la unión de factores transcripcionales. Este resultado nos indica que esta zona se encuentra relativamente abierta y accesible en etanol, en comparación con glucosa, donde no hay diferencia entre la región del promotor y la del gen. Dentro de las regiones codificantes de *GDH3* y *FLO9*, no hay sitios de hipersensibilidad muy evidentes, ni en glucosa ni en etanol, lo cual indicarían zonas de la cromatina más compacta.

Por último, muy cerca del inicio del gen *FLO9* se encuentra un sitio de hipersensibilidad, que asociamos al promotor de este gen. *FLO9* es un gen que pertenece a la familia de las floculinas junto con Flo1p, Flo5p y Flo10p. Estas proteínas de la pared de manera similar a las adhesinas de los hongos patógenos, promueven la adhesión célula-célula para formar cúmulos que tienen a sedimentar, lo que se denomina floculación (Bing *et al.*, 2000). Flo9p participa en floculación, y se induce en la fase estacionaria. Se sabe que el etanol y otros alcoholes promueven este proceso, mientras que la glucosa, la sacarosa, la maltosa o la manosa lo inhiben (Jin y Speers, 1998). Por lo cual no resulta extraño que su promotor adquiriera una conformación “abierta” o activa que permita la hipersensibilidad a la nucleasa que se observa en la **Figura 20**.

Hipersensibilidad al corte por nucleasa micrococcal, MNasa, en el promotor de *GDH3*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La nucleasa micrococcal es capaz de cortar la doble hebra del DNA en el espacio entre los nucleosomas o en zonas libres de ellos. Dependiendo de la concentración de la enzima libera fragmentos que corresponden a múltiplos del tamaño del nucleosoma, más la región del linker, aproximadamente de 200 pb (Noll, 1974). En concentraciones altas, la MNAsa puede generar mononucleosomas, liberando fragmentos de cerca de 147 pb (Lewin, 1997).

Gracias a las características del corte de la MNAsa, que permite un análisis más acotado al promotor de *GDH3*, como se puede observar en la **Figura 21**, se determinaron las diferencias en sensibilidad al corte de esta enzima en cromatina proveniente de células cultivadas en glucosa (**Figura 21, G**) o en etanol (**Figura 21, E**). En ambas condiciones y para ubicar con mayor exactitud los sitios de hipersensibilidad, se hibridó con dos sondas, una en el extremo 5' del promotor y otra en el 3', dentro de la región codificante de *GDH3* (ver *Experimental procedures* en el **Artículo 1**).

El ensayo de corte por MNAsa permite observar gran cantidad de sitios de hipersensibilidad en la cromatina proveniente de etanol, lo que indica una conformación relajada o abierta, en comparación con glucosa, donde la abundancia de cortes disminuye notablemente, lo que es reflejo de una organización de la cromatina compacta o cerrada. Al observar tanto la autoradiografía como el perfil densitométrico asociado a ella, se encuentran numerosos ejemplos de diferencias entre los sitios de corte entre una condición de cultivo y otra. Sin embargo, como un ejemplo, podemos mencionar el sitio de sensibilidad que aparece en la muestra de DNA desnudo, o no cromatinizado, (cercano a las 400 pb en el panel **A** de la **Figura 21** y a las 800 pb en el panel **B**). Es notable como este sitio desaparece en las muestras de glucosa, y reaparece en las muestras en etanol. El DNA “desnudo” evidencia sitios de muy alta sensibilidad al corte por MNAsa, que indican una exposición, apertura o relajación de la estructura. Al contrario su desaparición es indicio de mayor condensación y por lo consiguiente de inaccesibilidad.

Las flechas en la **Figura 21 C** marcan los sitios de hipersensibilidad presentes en etanol, que no se conservan en glucosa y que tienen el tamaño necesario para

contener un nucleosoma, que en promedio corresponde a 150pb. Es evidente al observar esta figura, que el remodelamiento genera cambios (y, por lo tanto, sitios de hipersensibilidad) en toda la extensión del promotor de *GDH3*.

5. Los complejos SAGA y SWI/SNF y la regulación de *GDH3*.

Efecto de las subunidades Gcn5, Ada2 y Ada3 del complejo SAGA, sobre la expresión del gen *GDH3*.

SAGA es un complejo coactivador conservado entre levadura y otros eucariontes, que aparentemente es reclutado hacia los promotores sobre los que actúa, a través de su interacción con los activadores transcripcionales (Utley *et al.*, 1998).

La acetilación de las lisinas del amino terminal de las histonas se propone como un importante mecanismo de regulación postraduccional del nucleosoma, que influencia su relación con el DNA y permite que la estructura de la cromatina se modifique y permita la transcripción en respuesta a diversas condiciones ambientales.

Dentro de SAGA, Gcn5 es la subunidad encargada de la acetilación del extremo amino terminal de las histonas, preferentemente H3 y H2B, cuando forman parte del nucleosoma. Las subunidades Ada2 y Ada3 aparentemente actúan como moduladores de la actividad de la acetilasa Gcn5p (Brownell *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 2001; Sterner *et al.*, 2002). El complejo SAGA puede atraer a TBP hacia la caja TATA de diversos promotores, interactuando a través de las subunidades Spt3 y Spt8. La subunidad Spt3p está implicada en el inicio de la transcripción, al regular la interacción TBP-TATA (Eisenmann, 1992; Belotserkovskaya *et al.*, 2000; Bhaumik y Green, 2001; Larschan y Winston 2001; Barbaric, 2003; Yu *et al.*, 2003).

Interesados en saber si el complejo SAGA participa en el remodelamiento que parece tener lugar en el promotor de *GDH3*, en respuesta a etanol, según indica el experimento de hipersensibilidad a la nucleasa DNAsa I, se transformaron las cepas *gcn5Δ*, *spt3Δ*, *ada2Δ* y *ada3Δ*, con la fusión *pGDH3-LacZ*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión inducida del gen *GDH3*, en cultivos con etanol como fuente de carbono, depende de las subunidades de SAGA: Gcn5, Spt3, Ada2 y Ada3. En cultivos en glucosa, aparentemente la expresión de *GDH3* es menos dependiente de Ada2p y Ada3p, que de Gcn5p. A pesar de la respuesta homogénea en etanol, aparentemente la subunidad Spt3p no actúa en la misma proporción que Ada2p, Ada3p o Gcn5p, en glucosa, pues conserva cerca del 70% de la actividad de β -galactosidasa de la cepa silvestre (**Figura 22**).

Este resultado podría señalar la especificidad de la respuesta de SAGA a diferentes condiciones ambientales, al poseer diversas subunidades que no responden necesariamente en bloque u homogéneamente a los estímulos. Y ya que Spt3p y Spt8p se encuentran relacionados a la interacción TBP-TATA, es probable que en la condición analizada por nosotros, glucosa como fuente de carbono, para el caso específico del promotor del gen *GDH3* sea Spt8p la que tenga a cargo acompañar la actividad de SAGA, y Spt3p sea relativamente prescindible.

Otra posibilidad, que explicaría la independencia parcial de la transcripción de *GDH3* de la subunidad Spt3 en glucosa, es que en esta condición de cultivo el complejo que contienen a Gcn5, Ada2 y Ada3, que sabemos son necesarios en estas condiciones, sea el complejo ADA.

Efecto de la desacetilasa de histonas Hda1p sobre el promotor de *GDH3*.

La regulación por la modificación del extremo amino terminal de las histonas comprenden, entre otros procesos, el equilibrio entre acetilación y desacetilación. Las HDACs (Histone Desacetylases) son represores transcripcionales que reducen los niveles de acetilación de las histonas creando regiones localizadas de cromatina represora (Bernstein *et al.*, 2000).

Se han caracterizado dos complejos de desacetilasas en *Saccharomyces cerevisiae*. El complejo tetramérico de la desacetilasa-A (HDA), al cual pertenecen Hda1p, Hda2p y Hda3p, altamente sensible al inhibidor no competitivo Tricostatina A (TSA), y pierde hasta el 80% de su actividad en 10nM de tricostatina. En comparación con el complejo de desacetilasa de histona-B (HDB), que se compone

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de Rpd3p, Hos1p, Hos2p y Hos3p, que es menos sensible a TSA, ya que sólo pierde el 20% en presencia de este inhibidor (Rundlett *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001).

El complejo HDA interactúa (Hda1p lo hace directamente *in vitro*) con el represor *TUP1*, que regula los genes del tipo sexual, algunos del catabolismo de la glucosa y uso de oxígeno, respuesta a estrés y daño en el DNA. Mutaciones en *tup1Δ* y *hda1Δ* causan un estado hiperacetilado de las histonas H3 y H2B, próximas al sitio de unión de Tup1p en el promotor de respuesta a estrés *ENA1* (Wu *et al.*, 20001).

Con el objeto de saber si Hda1p podría unirse y desacetilar las histonas de la cromatina del promotor de *GDH3*, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en cultivos de glucosa o etanol. Los resultados se observan en la **Figura 23**, donde se muestra que tanto Gcn5p como Hda1p se unen al promotor de *GDH3*, y muy probablemente la regulación de la expresión de éste sea producto de la acción de ambas proteínas, y los complejos a los que pertenecen.

En el caso del gen *ENA1*, se ha observado que mientras Hda1p actúa desacetilando las histonas H3 y H2B del promotor, la desacetilasa Rpd3p actúa sobre las histonas H3 y H4, de la región codificante. Ambas desacetilasas actúan sobre el mismo gen desarrollando funciones diferentes (Wu *et al.*, 20001).

Con esta información se transformó una cepa *rpd3Δ* con la fusión *pGDH3-LacZ*. Aparentemente en cultivos en glucosa o etanol como fuente de carbono, la mutación *rpd3Δ* no tuvo un efecto significativo (Glucosa: Silvestre, 38 ± 2.5 , *rpd3Δ*, 52 ± 13 ; Etanol: Silvestre, 1351 ± 411 , *rpd3Δ*, 1425 ± 227).

Por otra parte, y ya que Hda1p es una desacetilasa aparentemente sensible al inhibidor TSA. Realizamos experimentos para observar la influencia de Hda1p sobre el promotor de *GDH3*, probando el comportamiento de la expresión de *GDH3* en cultivos con 3 μ Mol de Tricostatina, sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas (Tiempo 0: 122, 120 min: 123 U β -Gal min^{-1}).

Este resultado aparentemente entra en contradicción con los experimentos de CHIPs. Sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* el silenciamiento de los genes del tipo sexual y las regiones teloméricas están en relación con la cromatina hipacetilada y tienen características asociadas con la heterocromatina. El gen

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

GDH3 se encuentra en la región subtelomérica del Cromosoma I (Robyr *et al.*, 2002). Sorprendentemente la pérdida de las desacetilasas, *hda1Δ* y *rpd3Δ*, incrementan la represión de las regiones subteloméricas. Una explicación al respecto de esta aparente contradicción es que los genes que participan en el silenciamiento de la heterocromatina también son transcritos en altos niveles, debido a la ausencia de ambas desacetilasas, y esto aumenta el silenciamiento. Entre estos reguladores negativos se encuentran *SIR3* Y *SIR4* (Rundlett *et al.*, 1996). Por lo anterior, es posible que aun cuando Hda1p se una al promotor de *GDH3*, al estar inhibida en los experimentos con TSA, permita que un presunto represor en glucosa de *GDH3* se active y mantenga reprimida la expresión de éste gen.

Efecto de *snf2Δ*, ATPasa del complejo SWI/SNF, sobre la expresión del gen *GDH3*.

El complejo SWI-SNF de *Saccharomyces cerevisiae*, ha mostrado remodelar la cromatina *in vivo* e *in vitro* y estimular la unión basal y estimulada de los factores transcripcionales al DNA nucleosomado (Sternner *et al.*, 1999).

El complejo Swi/Snf de levadura comprende los genes *SWI1*, *SWI2/SNF2*, *SWI3*, *SNF5*, *SNF6*, *SNF12*, *SNF11*, *ARP3*, *ARP7*, *ARP9*, *ACN1*, *TGF* y Swp82p. Donde las subunidades Snf2p, Snf5p y Swi3p forman la partícula núcleo del complejo (Phelan *et al.*, 1999). El gen *SWI2/SNF2* codifica la proteína con actividad de ATPasa, miembro de la superfamilia de DEAD/H de ATPasas estimuladas por ácidos nucleicos, que se encuentra ampliamente conservada entre varios eucariontes, incluido *Drosophila* y el hombre (Owen-Hughes, 2003).

Aunque la forma en la que el complejo Swi/Snf facilita el acceso al DNA con nucleosomas no se conoce con exactitud, dicha actividad requiere la hidrólisis continua de ATP (≈ 1000 ATP/min) (Owen-Hughes, 2003). La energía del ATP es usada para modificar la estructura de la cromatina, estimular la unión de los factores transcripcionales, alterar el patrón de corte por DNAsaI; realizar el movimiento del octámero de histonas en *cis* o en *trans*, y en general producir sitios de hipersensibilidad al corte por nucleasas (Peterson, 2000).

Se ha demostrado que en algunos casos la función remodeladora de SWI/SNF trabaja en conjunto con la del complejo SAGA o ADA (Syntichaki *et al.*, 2000). Por lo que interesados en saber si éste era el caso del promotor de *GDH3* se transformó con la fusión *pGDH3-LacZ*, la mutante *snf2Δ*, que pierde por completo la actividad remodeladora de SWI/SNF, y se realizaron cultivos en etanol y glucosa como fuentes de carbono.

Como se puede observar en la **Figura 22**, la ausencia del gen *SNF2* abate por completo la expresión del gen *GDH3* en glucosa y en etanol. Por lo que podemos concluir, que tanto SAGA, y quizás también ADA, así como SWI/SNF participan en la regulación transcripcional de *GDH3*, permitiendo la inducción de su expresión en cultivos con etanol como fuente de carbono.

6. Efecto de los complejos remodeladores sobre la estructura de la cromatina del promotor del gen *GDH3*.

Las mutaciones *snf2Δ* y *gcn5Δ* y el arreglo de la cromatina de *pGDH3*, en cultivos con etanol como fuente de carbono.

La cromatina obtenida de cultivos en etanol de la cepa *snf2Δ* muestra una conformación cerrada, en gran semejanza a la que se obtiene cuando los cultivos se realizan en glucosa (**Figura 24** panel **A**).

En la **Figura 24**, panel **B** se muestra la cromatina que se obtiene de células de la cepa *gcn5Δ*, cuando es cultivada en etanol. La conformación de la cromatina es abierta, pero no presenta los mismos sitios de hipersensibilidad que la cepa silvestre en las mismas condiciones de cultivo. Como se puede apreciar en la imagen las diferencias en los sitios de hipersensibilizada se ubican hacia el extremo 5' del promotor, en tanto el extremo 3' presenta un patrón de corte muy parecido al de la cepa silvestre. Este resultado sugiere que la alteración de la organización de la cromatina en el extremo 5' del promotor tiene importantes consecuencias en la actividad transcripcional del gen, recordemos que la mutante *gcn5Δ* prácticamente pierde por completo la expresión de *GDH3*. La relevancia de esta zona del promotor

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

se hace evidente, también, por el hecho de que en un análisis que comprende la ablación de la mitad del promotor hacia su extremo 5' se obtiene una disminución en la expresión de *GDH3* del 72% (**Figura 25**).

Por otra parte, estos resultados sugieren que la actividad remodeladora del complejo SWI/SNF es previa a la de SAGA, ya que sin Snf2p la cromatina del promotor se mantiene cerrada, en gran semejanza a la de la condición reprimida en glucosa. En tanto que la cromatina de la mutante *gcn5Δ* está abierta, pero con variaciones en los sitios de hipersensibilidad con respecto al patrón de la cepa silvestre.

Las mutaciones *snf2Δ* y *gcn5Δ* y el arreglo de la cromatina de *pGDH3*, en cultivos en fase estacionaria en medio rico (YPD).

En cultivos de fase estacionaria en medio rico, las mutantes *snf2Δ* y *gcn5Δ* abaten por completo la expresión de *GDH3*.

La organización de la cromatina del promotor de *GDH3* en cultivos en fase estacionaria, en medio rico, depende de Gcn5p (**Figura 26**). De manera similar a lo que se observa en la cromatina proveniente de etanol, el extremo 5' del promotor presenta la mayor cantidad de modificaciones con respecto a la cepa silvestre.

La cromatina del promotor de *GDH3* en la fase de crecimiento exponencial, en cultivos en medio rico (YPD), se muestra comparativamente menos accesible que la de la fase exponencial (**Figura 27** panel **A** y **B**, muestras WT). Al observar los resultados de la mutante *snf2Δ* (en la **Figura 27**) se muestra como la cromatina ya en fase exponencial presenta diferencias en hipersensibilidad, resalta, por ejemplo: la banda cercana a las 400pb; pero es en la fase estacionaria donde prácticamente esta mutante tiene una conformación completamente cerrada e inaccesible a la nucleasa, en comparación con la cepa silvestre. Este resultado hace evidente la importancia del remodelamiento para la expresión de *GDH3*.

La expresión de *GDH3* en fase exponencial de crecimiento es resultado de una conformación cerrada de la cromatina del promotor.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cromatina del promotor de *GDH3* en la fase de crecimiento exponencial presenta una conformación menos accesible que en la fase estacionaria (**Figura 27 A**). Como la falta de expresión de *GDH3* en esta condición de cultivo, puede atribuirse a una localización de Gln3p en el citoplasma (**Figura 18**). Se realizó un ensayo de tipo Northern blot para determinar la expresión de los genes *DAL5* y *GDH3*, en la cepa silvestre y en la mutante *ure2Δ*, en la fase de crecimiento exponencial, en cultivos en medio rico.

El gen *DAL5* codifica para el transportador de alantoato, se ha demostrado que su expresión depende de Gln3p y que es sensible a la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR). Además, experimenta una importante inducción transcripcional en la cepa *ure2Δ*, aun en condiciones represivas (Daugherty *et al.*, 1993). Gln3p es transportado al núcleo en la fase exponencial, ya que es capaz de inducir la transcripción de *DAL5*, como se muestra en la **Figura 28**. La expresión de *GDH3*, por otra parte, permanece reprimida debido a la inaccesibilidad de la estructura de la cromatina en el promotor, aún cuando Gln3p está presente en el núcleo.

Consideraciones finales

Los hermanos sean unidos.
Porque esa es la ley primera
Tengan unión verdadera
En cualquier tiempo que sea,
Porque, si entre ellos pelean,
Los devoran los de ajuera.

"El Gaucho Martín Fierro"
José Hernández.

Como ya mencionamos anteriormente *GDH1* y *GDH3* guardan entre sí un alto porcentaje de similitud e identidad. Sin embargo, aparentemente, existen diferencias entre ellos no sólo en cuanto a las propiedades de los péptidos que codifican, sino también, en la velocidad de evolución que han tendido desde la duplicación que dió origen a la pareja. Kellis *et al.* (2004) trabajando con el grupo de onólogos remanente de la WGD, calculan la tasa de divergencia entre genes postduplicación con el objetivo de discernir entre los genes ancestrales y los derivados. Estos autores

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

encuentran que existen algunas parejas de genes ohnólogos que no han evolucionado a la misma velocidad. Entre 457 pares de ohnólogos existen 32, dentro de los cuáles están *GDH1* y *GDH3*, que presentan una tasa acelerada de sustitución a nivel de nucleótidos, pero no de aminoácidos. *GDH3* parece tener una tasa de cambio al nivel de la proteína muy similar a *GDH1* y a *Kluyveromyces waltii*, como parámetro comparativo. Pero cuando se analiza la tasa de sustitución de la tercera posición del codón, ésta es dos veces mayor que *GDH1*, de la misma forma posee un CAI (Codon Adaptation Index: que es un índice al respecto de la tendencia al uso preferencial de codones) muy bajo e inusual (0.16 de *GDH3* contra 0.59 de *GDH1*), lo cuál predice un bajo nivel de expresión. Se dice que los valores de CAI son claramente paralelos a los niveles de expresión en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Sharp y Li, 1987).

Aunado a lo anterior, las diferencias entre estas enzimas van más allá de su abundancia relativa dentro de la célula. Como se presenta en el **Cuadro 2**, una cepa *gdh1Δ gdh3Δ* portadora del gen *GDH3* en multicopia, muestra una actividad de GDH-NADP 56 veces más baja que la de la cepa con *GDH1* en multicopia. Y cuando el promotor de *GDH1* dirige la transcripción de *GDH3*, genera una actividad enzimática siete veces menor que la que posee *GDH1* en las mismas circunstancias.

Estos resultados indican que el producto de *GDH3* posee una baja capacidad catalítica *in vivo* en comparación con Gdh1p. Aparentemente *GDH3*, es incapaz de suplir a Gdh1p en la biosíntesis para generar las cantidades necesarias de glutamato, que permitan niveles de proliferación normales, en cultivos con glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, ambas enzimas permiten a la levadura adaptarse a las condiciones cambiantes del ambiente. Mientras que Gdh1p es predominante en fase exponencial y glucosa, Gdh3p lo es en fase estacionaria y etanol. No redundan, eficientizan un proceso.

Proponemos que en el caso de los ohnólogos *GDH1* y *GDH3* podría ser descrito por el modelo de Neo-Sub-Función, tipo NF-III, posterior a una duplicación génica (He y Zhang 2005b). Si el gen nuevo conserva todas las funciones del gen ancestral, He y Zhang (2005b) proponen que este proceso se denomine NF-I, si no conserva ninguna NF-II y si conserva algunas NF-III. Este modelo comprende un

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proceso adaptativo donde, después de la duplicación, una copia del gen conserva la función ancestral mientras que la otra copia muta (cambiando su secuencia codificante o reguladora) hacia una función (o especialización de algún aspecto de su actividad) que no estaba presente en el gen previo a la duplicación. Este mecanismo permite la retención de ambas copias (Ohno, 1970; Sankoff, 2001; Schacherer *et al.*, 2004; Rastogi y Liberles, 2005).

La novedad adquirida por una o ambas copias puede consistir en una especialización de su actividad hacia un período del desarrollo en particular o tejidos particulares, es decir, se pierde la generalidad del gen ancestral. (Lynch y Force, 2000; Schacherer *et al.*, 2004; He y Zhang, 2005b; Rastogi y Liberles, 2005). En el caso de las GDH-NADP esto se puede ejemplificar con la expresión de *GDH3* durante la fase estacionaria.

Cuadro 2

Cuadro 2. Fenotipos de proliferación y actividades de GDH-NADP de distintas cepas portadoras de plásmidos recombinantes.

Cepa	Duplicación ^a	GDH-NADP ^b
CLA11-00 [<i>GDH1 GDH3</i> /pRS426 (2 μ URA3)]	2.5 \pm 0.11	0.93 \pm 0.106
CLA13-00 [<i>GDH1 gdh3</i> Δ /pRS426 (2 μ URA3)]	2.4 \pm 0.08	1.28 \pm 0.099
CLA13-11 [<i>GDH1 gdh3</i> Δ /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ URA3)]	2.8 \pm 0.15	8.15 \pm 1.032
CLA13-22 [<i>GDH1 gdh3</i> Δ /pLAM22 (<i>GDH3</i> 2 μ URA3)]	2.6 \pm 0.13	0.90 \pm 0.137
CLA13-44 [<i>GDH1 gdh3</i> Δ /pLAM44 (5'- <i>GDH1-GDH3</i> 2 μ URA3)]	2.8 \pm 0.18	0.79 \pm 0.114
CLA14-00 [<i>gdh1</i> Δ <i>gdh3</i> Δ /pRS426 (2 μ URA3)]	4.6 \pm 0.26	ND
CLA14-11 [<i>gdh1</i> Δ <i>gdh3</i> Δ /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ URA3)]	2.7 \pm 0.14	7.87 \pm 0.549
CLA14-22 [<i>gdh1</i> Δ <i>gdh3</i> Δ /pLAM22 (<i>GDH3</i> 2 μ URA3)]	3.8 \pm 0.16	0.14 \pm 0.031
CLA14-44 [<i>gdh1</i> Δ <i>gdh3</i> Δ /pLAM44 (5'- <i>GDH1-GDH3</i> 2 μ URA3)]	3.6 \pm 0.22	1.03 \pm 0.125

a. Tiempo de duplicación en h. Los resultados son la media de tres experimentos distintos \pm SD.

b. Actividad de GDH-NADP nmol min⁻¹

Ver detalle de la construcción de las cepas en **Artículo 1**

Figura 9

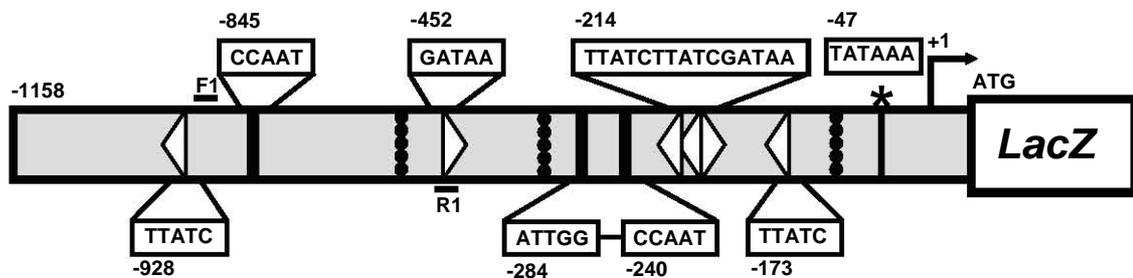


Figura 9. Representación esquemática del promotor de *GDH3*. En la figura se muestran los sitios probables de unión de Gln3p (▽), el complejo HAP (▮), el polidA-dT (⋮), la caja TATA y el inicio de transcripción (▸). También los desoxiligonucleótidos (F1) y (R1) usados para los ensayos de inmunoprecipitación.

Figura 10

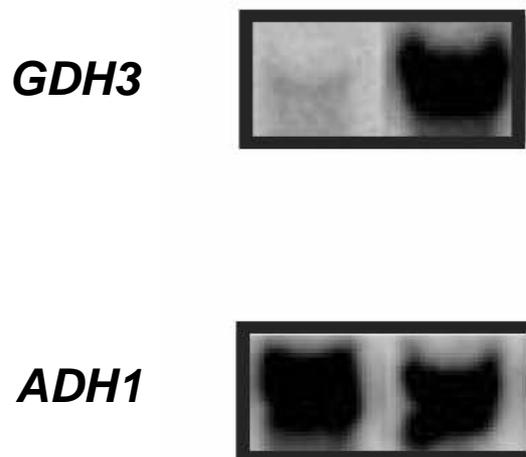


Figura 10. Efecto del etanol como fuente de carbono en la expresión de *GDH3*. Se obtuvo el RNA total de la cepa CLA-A1 cultivada en MM con glucosa (A) o etanol (B). Para revelar el mRNA de *GDH3* se utilizó como sonda radiactivamente marcada un fragmento del gen de 760pb (Avendaño *et al.*,199/). Como referente en la cuantificación de la señal radiactiva de *GDH3* se usó el valor de la hibridación del gen *ACT1* con una sonda específica de 1,100 pb

Figura 11

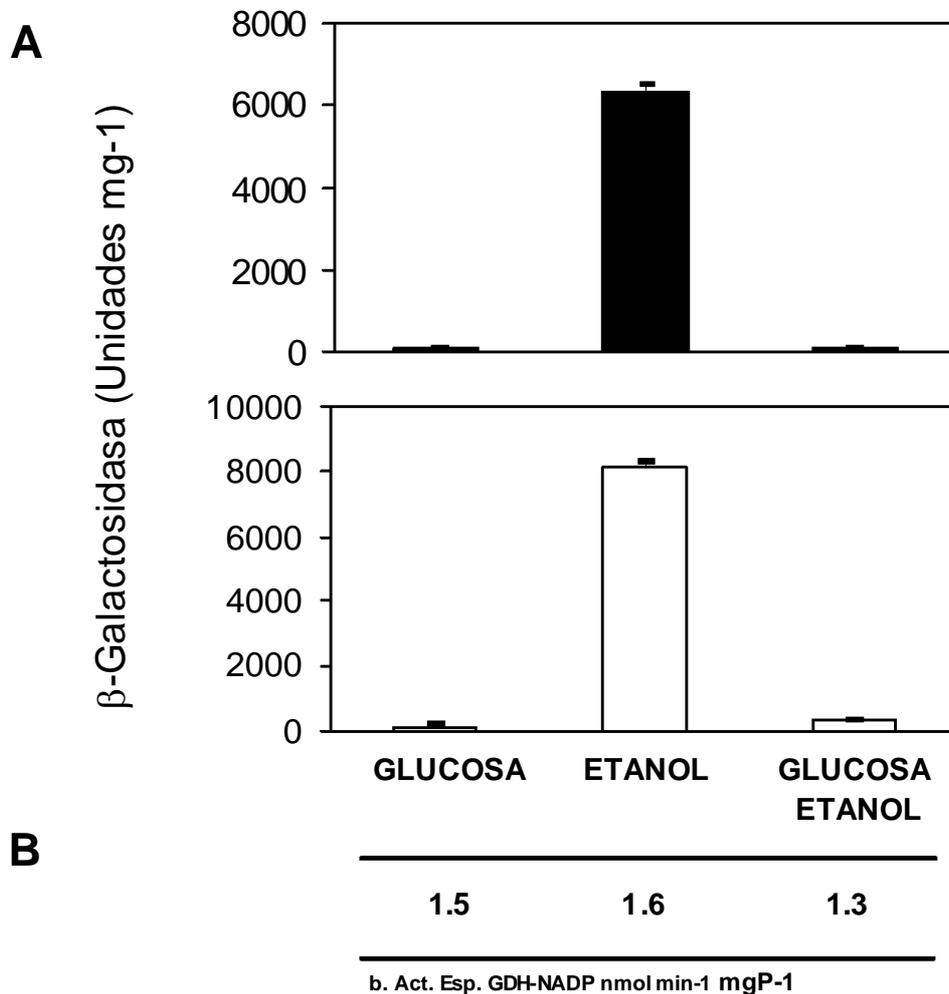


Figura 11. Efecto de la Represión Catabólica por Carbono (CCR) en la expresión de *GDH3*. La actividad enzimática de β -Galactosidasa (**A**) se determinó en la cepa silvestre, CLA-A1 (barras negras) y la cepa *gdh1* Δ (CLA6-A1) (barras blancas), las células fueron cultivadas en MM suplementado con 40 mM de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y con glucosa, etanol y glucosa junto con etanol (al 2 %) como fuente de carbono. (**B**) La actividad de GDH-NADP se determinó sólo en la cepa silvestre pero en las mismas condiciones de amonio y fuentes de carbono. Las células fueron cosechadas a una densidad óptica a 600nm de 0.3-0.4. Los promedios que se presentan son el resultado de tres experimentos independientes.

Figura 12

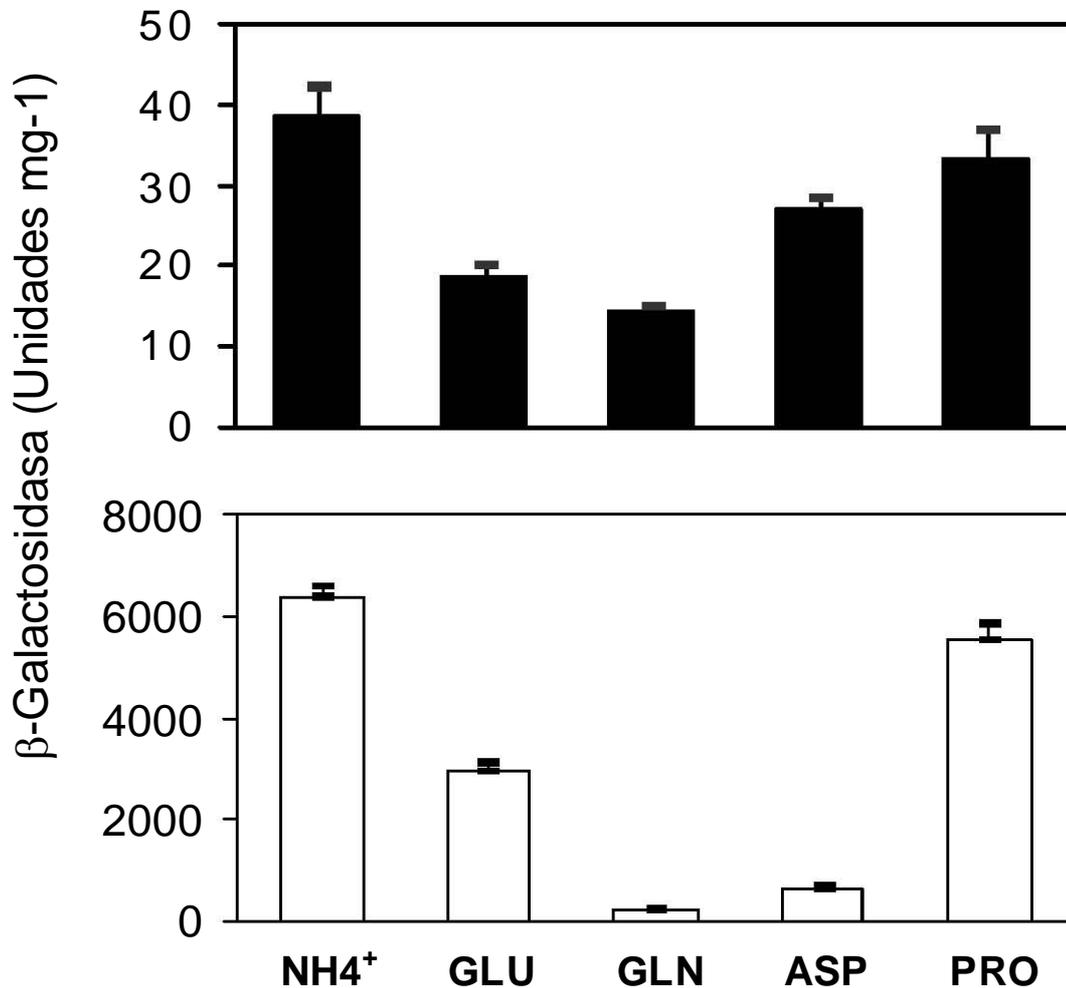


Figura 12. Efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la expresión del gen *GDH3*. Las células fueron cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno: amonio (40mM), glutamato, glutamina, asparagina y prolina, al 2 %. En glucosa (barras negras) y etanol (barras blancas) al 2 %, como fuentes de carbono. Las células se cosecharon en una densidad óptica a 600nm de 0.3-0.4 y los promedios de las actividades enzimáticas de β -Galactosidasa son el resultados de tres experimentos independientes.

Figura 13

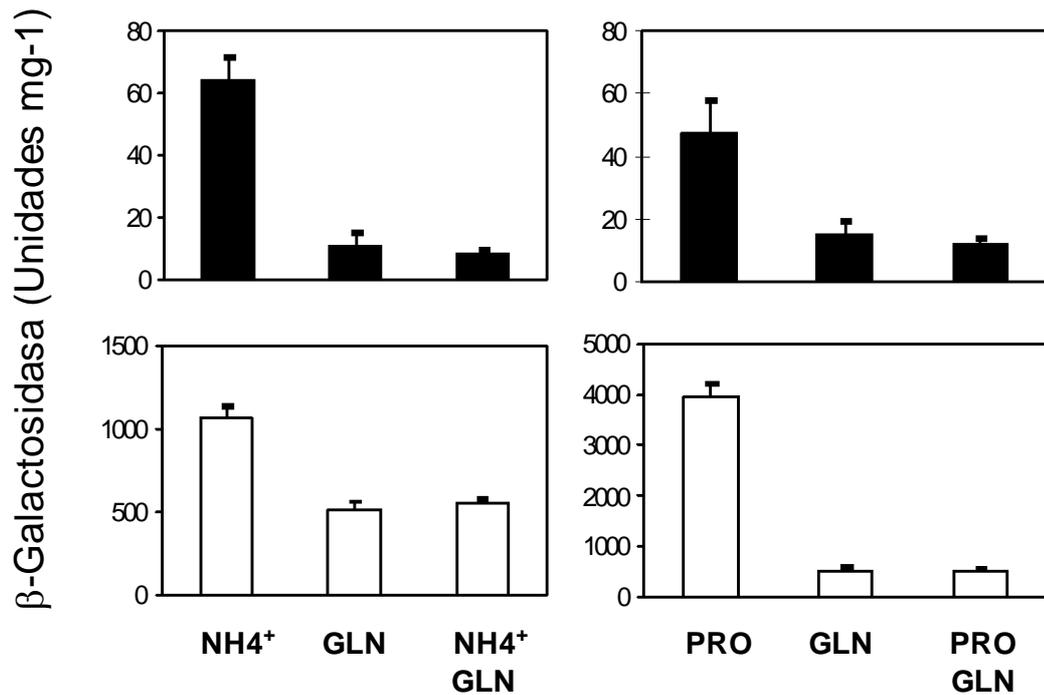


Figura 13. Efecto de la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR) sobre la transcripción del gen *GDH3*. Las células de la cepa CLA1-A1 fueron cultivadas con glucosa (barras negras) o etanol (barras blancas) al 2 % como fuente de carbono. Para valorar el efecto de la fuente de nitrógeno las levaduras se cultivaron en presencia de amonio (NH₄⁺), glutamina (GLN), y amonio junto con glutamina, por una parte; prolina (PRO), o glutamina y prolina junto con glutamina, por otra. La recuperación de las células se realizó en una densidad óptica a 600nm de 0.3-0.4 y los promedios de las actividades enzimáticas de β -Galactosidasa son el resultados de tres experimentos independientes.

Figura 14

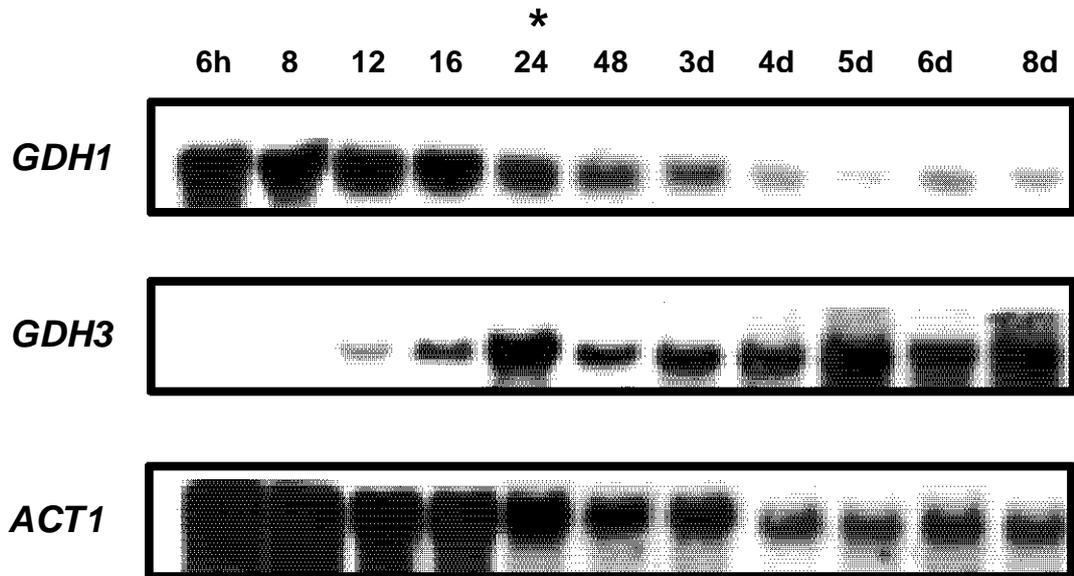


Figura 14. Ensayo tipo Northern de la expresión transcripcional de *GDH3* en cultivos prolongados en medio rico (YPD). En la figura se observa la inducción progresiva de *GDH3*, durante la transición diáuxica y la permanencia del estado inducido en la fase estacionaria, en comparación con *GDH1*, cuya señal disminuye con el tiempo. Se obtuvo el RNA total de la cepa CLA-A1 cultivada en YPD. Para revelar el mRNA de *GDH3* se utilizó como sonda radiactivamente marcada un fragmento del gen de 764 pb (Avendaño *et al.*, 1997). En el caso de *GDH1* se utilizó como sonda el gen completo, 1365 pb (Riego *et al.*, 2002). Como referente en la cuantificación de la señal radiactiva se utilizó el gen *ACT1*, con una sonda específica de 1,500 pb. El asterisco señala el momento aproximado en que se termina la glucosa en el medio (DeLuna *et al.*, 2001).

Figura 15

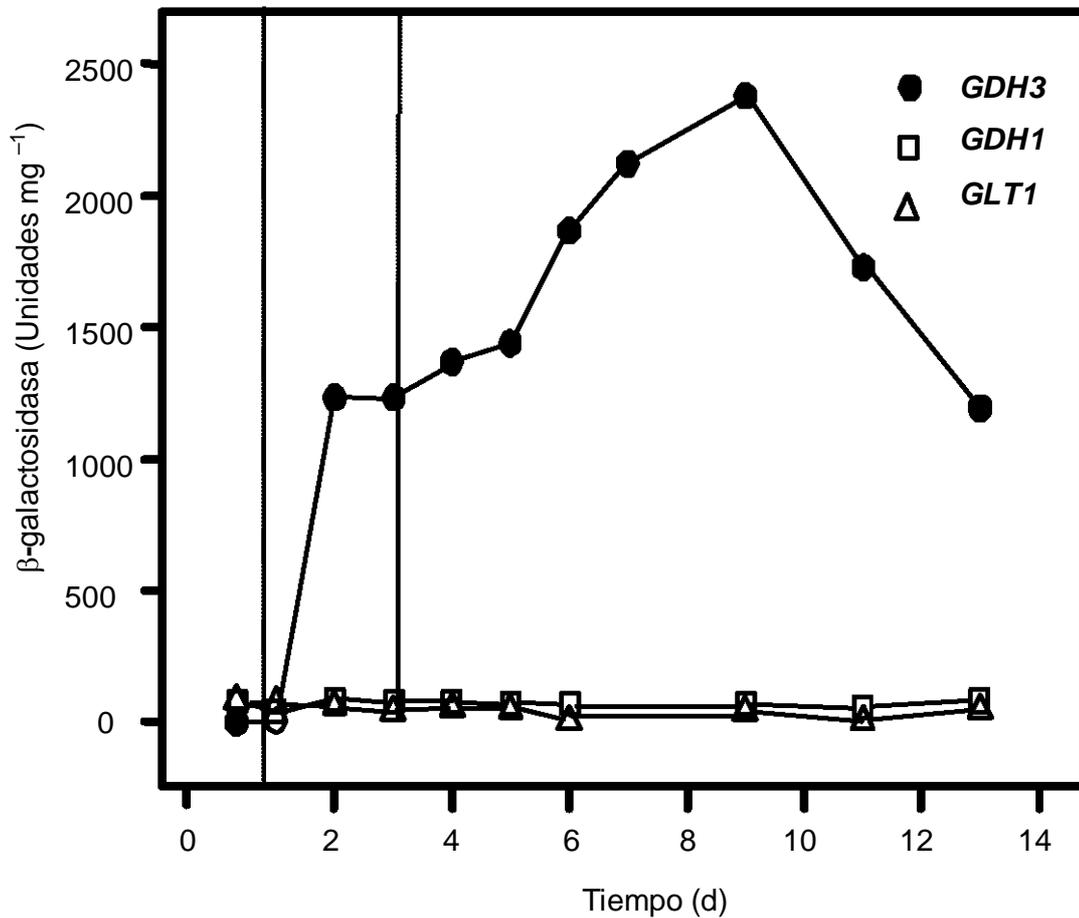


Figura 15. Perfil de expresión de *GHD3*, *GDH1* y *GLT1* en cultivos prolongados en medio rico (YPD). La figura muestra la inducción transcripcional que presenta *GDH3*, en comparación con *GDH1* y *GLT1*, durante el cambio diáuxico y la fase estacionaria. En cada punto de la gráfica se cuantificó la actividad de β -Galactosidasa ($U\ mg^{-1}$) de cada una de las fusiones p*GDH3* (que contiene la fusión de *LacZ* con el promotor de *GDH3*), pLIN1 (promotor de *GDH1*) (Riego *et al.*, 2002) y pLOU1 (que contiene al promotor de *GLT1*) (Valenzuela *et al.*, 1998). La primera línea punteada señala el tiempo aproximado en que se termina la glucosa en el medio, fase inicial del crecimiento diáuxico, la segunda línea indica el inicio de la fase estacionaria, cuando comienza a consumirse el etanol (DeLuna *et al.*, 2001).

Figura 16

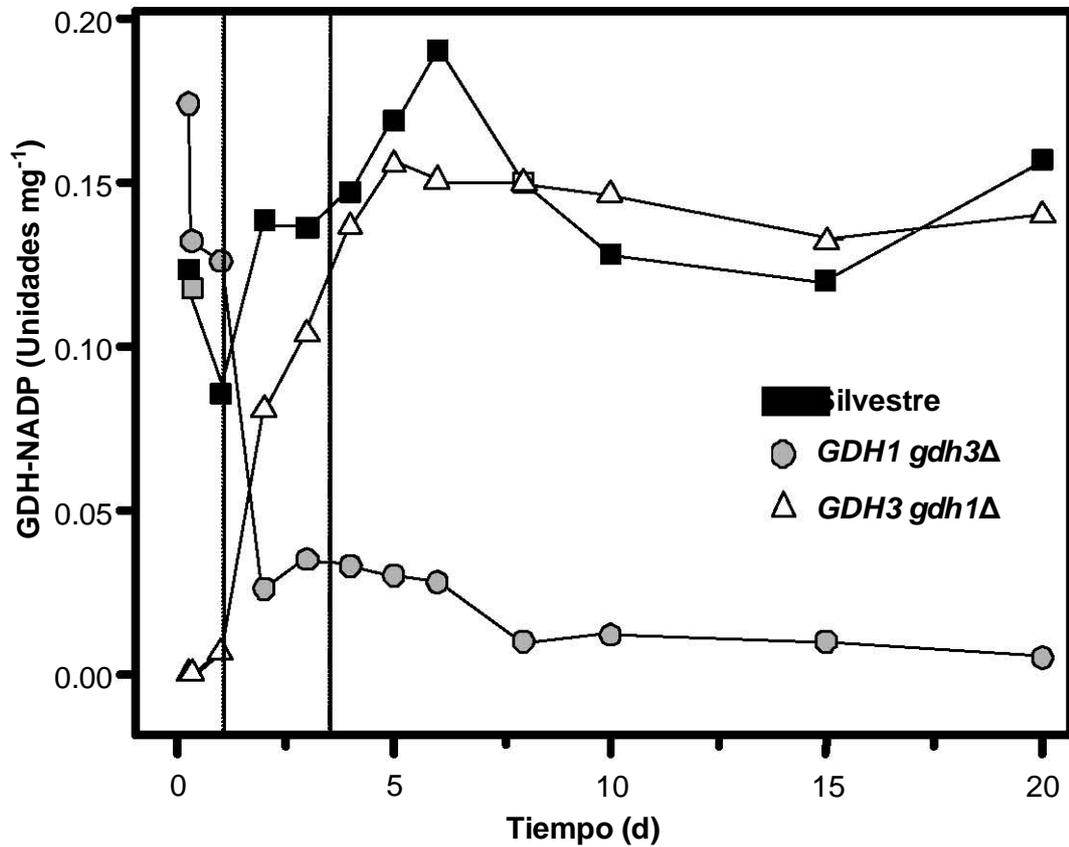


Figura 16. Actividad enzimática de GDH-NADP de la cepa silvestre y las mutantes *gdh1*Δ y *gdh3*Δ en cultivos prolongados. La actividad de GDH-NADP se determinó en cada punto de la gráfica, a partir de células cosechadas de cada una de las cepas cultivadas en medio rico (YPD). La cepa silvestre es la CLA-A1, la mutante *gdh1*Δ, es la CLA6 y la *gdh3*Δ es la CLA7 (Avendaño *et al.*, 1997). Alrededor de la primera línea punteada comienza la fase inicial del crecimiento diáuxico, cuando la glucosa es consumida. La segunda línea indica el inicio aproximado de la fase estacionaria, cuando es consumido el etanol (DeLuna *et al.*, 2002).

Figura 17

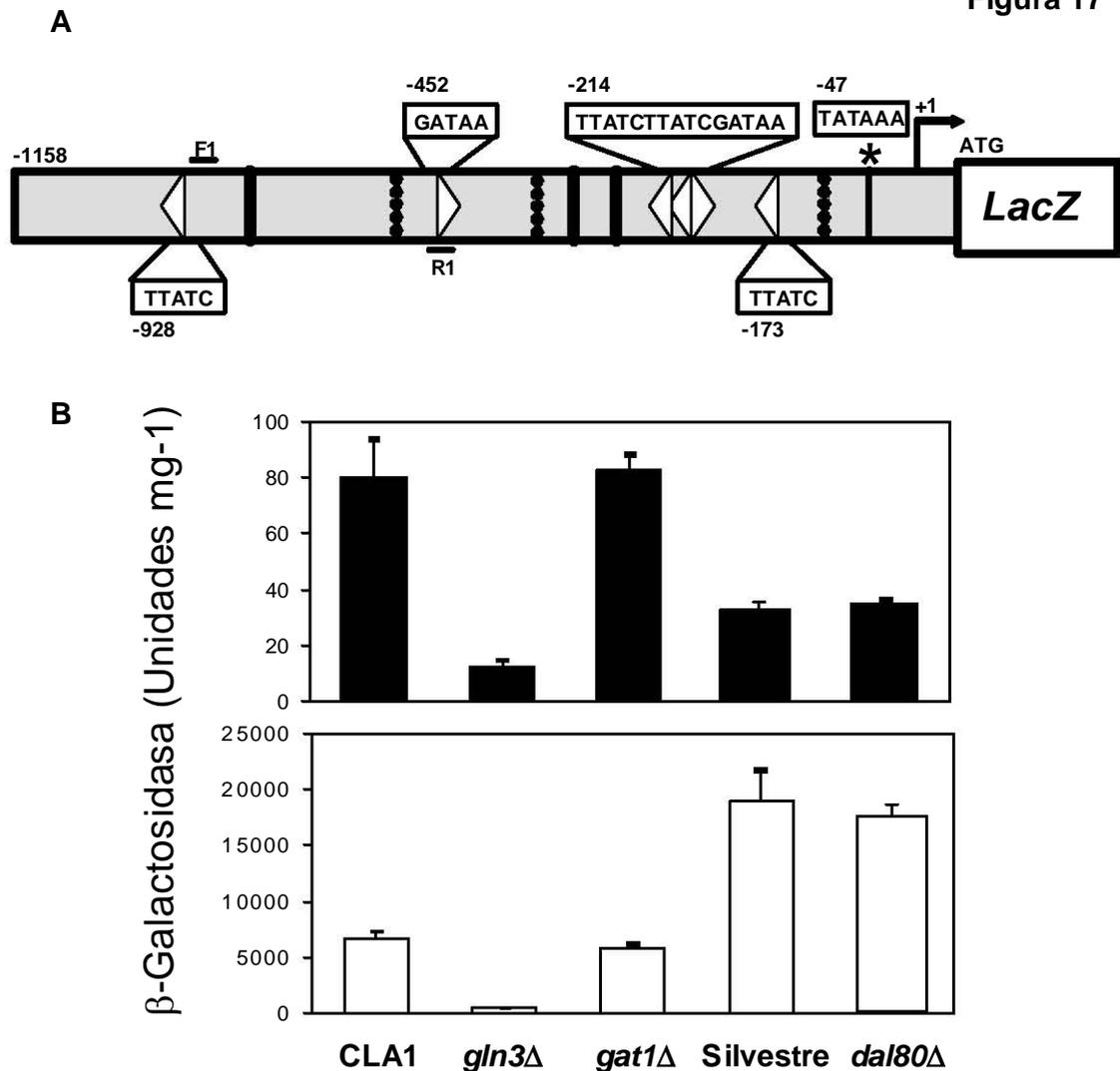


Figura 17. Expresión transcripcional de *GDH3* en mutantes afectadas en los factores tipo GATA: Gln3p, Gat1p y Dal80p. (A) Representación gráfica del promotor de *GDH3* donde se señalan las caja GATA, los sitios probables de unión para Gln3p, Gat1p o Dal80p (▷). (B) Las células se cultivaron en glucosa (barras negras) o etanol (barras blancas) al 2 %, y se cosecharon en una D.O_{600nm} de 0.3-0.4. Cepas: CLA1-A1 (silvestre/pLA1), CLA302-0-A1 (*gln3*Δ/pLA1), CLA102-A1 (*gat1*Δ/pLA1), CLA400 (Silvestre) y CLA400-A1 (*dal80*Δ/pLA1). Los promedios de β-Galactosidasa que se presentan son el resultado de tres experimentos independientes.

Figura 18

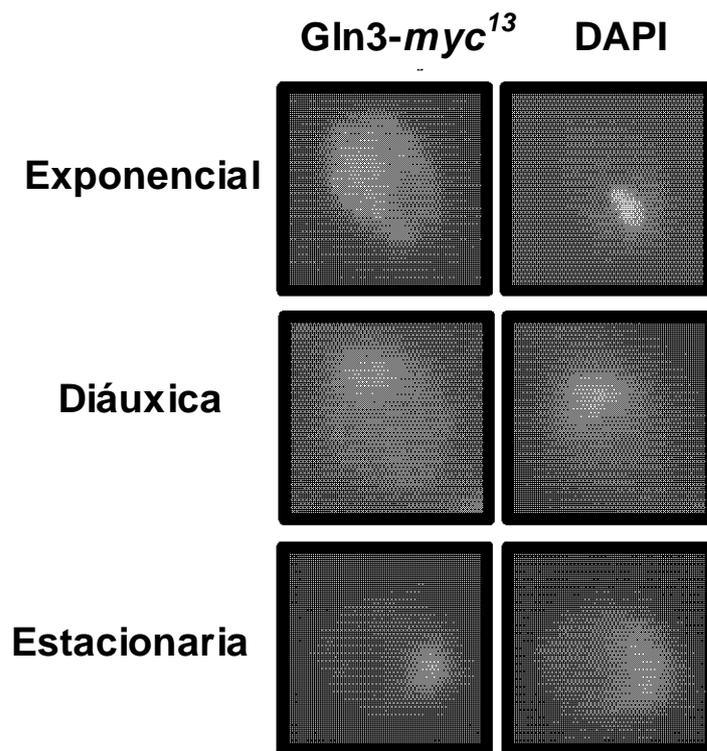


Figura 18. Localización subcelular de Gln3p. La cepa GLN3, que contiene la fusión Gln3p-*myc13*, se cultivó en medio rico (YPD). Las tres condiciones comparadas corresponden a observaciones, utilizando microscopio con inmunofluorescencia, sobre células correspondientes a la mitad de la fase esponencial (DO_{600nm} 0.3), la transición díauxica (DO_{600nm} de 1.0) y fase estacionaria (DO_{600nm} de 6.0). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Este experimento se realizó gracias al trabajo del estudiante Sergio Zonszein.

Figura 19

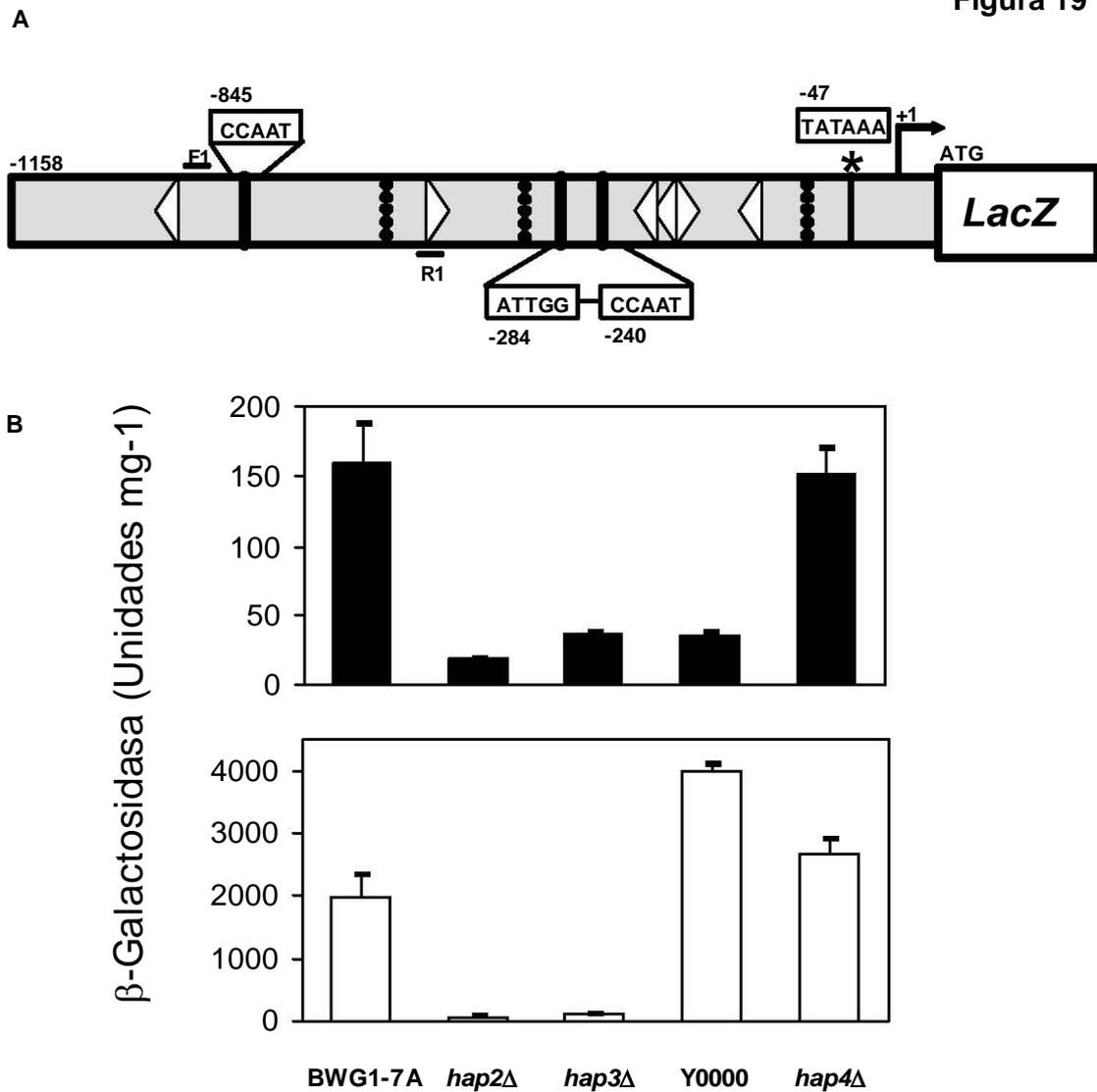


Figura 19. Expresión transcripcional de *GDH3* en mutantes afectadas en componentes del complejo HAP. (A) Representación gráfica del promotor de *GDH3* donde se señalan los sitios probables de unión para HAP (■). (B) Las células se cultivaron en MM suplementado con glucosa (barras negras) o etanol (barras blancas) al 2%, y se cosecharon en una D.O_{600nm} de 0.3-0.4. Cepas: BWG1-7A-A1 (Silvestre/pLA1), LWG1-A1 (*hap2* Δ /pLA1), JP40-A1 (*hap3* Δ /pLA1), Y0000-A1 (Silvestre/pLA1) y Y04959-A1 (*hap4* Δ /pLA1). Los promedios de β -Galactosidasa que se presentan son el resultado de tres experimentos independientes.

Figura 20

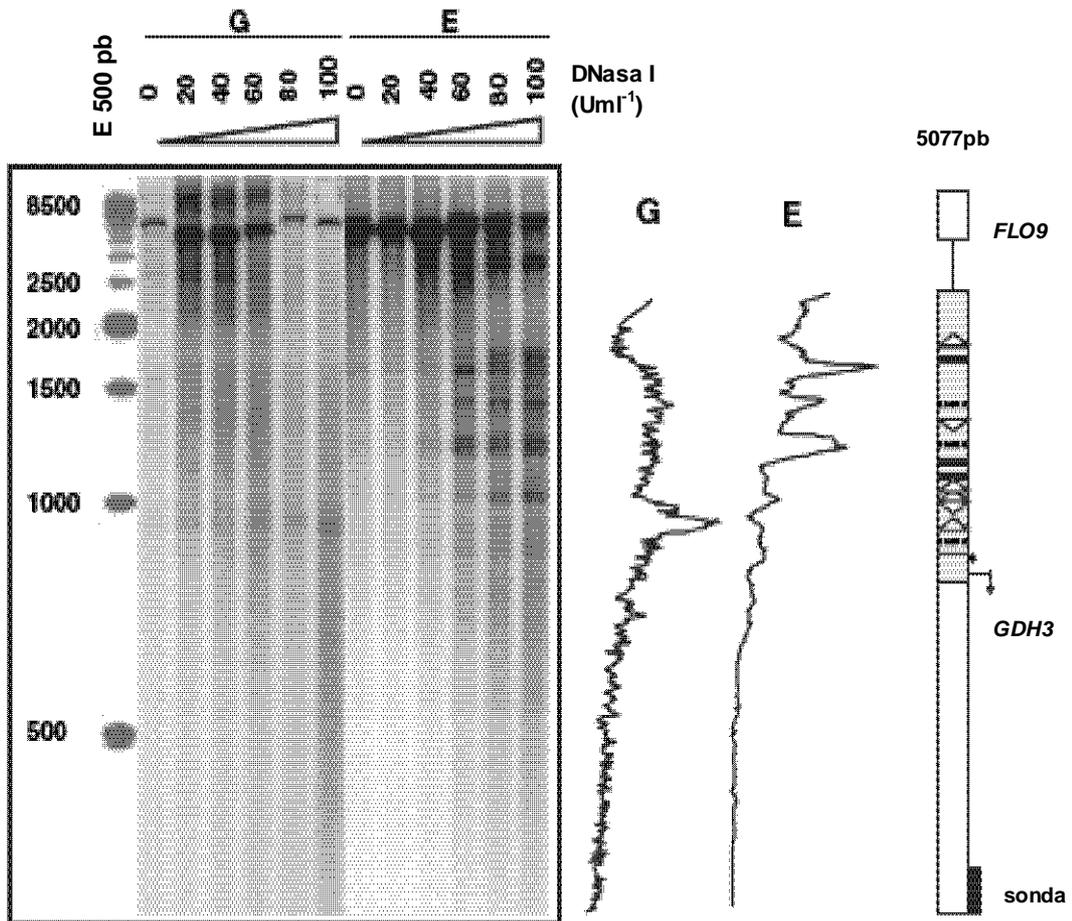


Figura 20. Análisis de baja resolución de sensibilidad al corte de DNasa I de un fragmento de 5 kpb alrededor del gen *GDH3*. Las células de la cepa silvestre CLA-A1 fueron cultivadas en MM glucosa (G) o etanol (E), al 2%, hasta una D.O._{600nm} de 0.3-0.4. Los esferoblastos permeabilizados con nistatina fueron tratados con concentraciones crecientes de DNasaI. Las muestras de cromatina fueron posteriormente digeridas con *Sa*II. En la figura se muestra el marcador de peso molecular (E 500pb), y los perfiles densitométricos de cada condición de cultivo (de 0 a 100 U de Dnasal ml⁻¹), las flechas que marcan la ubicación de los sitios de hipersensibilidad diferentes entre glucosa y etanol, en relación con el dibujo que representa el fragmento de 5 kpb, que contiene parte de los genes *FL9* y *GDH3*, y la región entre ellos. Se muestra también la ubicación hacia el extremo 3' de la sonda de 760 pb que se utilizó para revelar la hibridación (Avenidaño *et al.*, 1997).

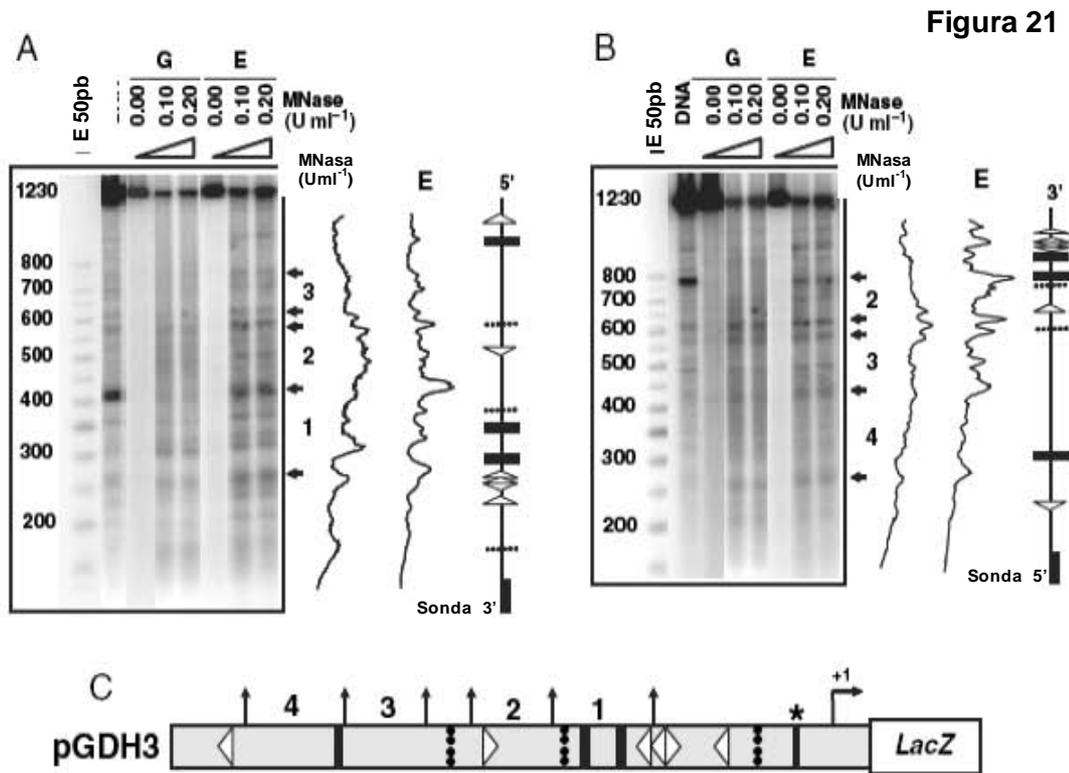


Figura 21. El promotor de *GDH3* muestra un arreglo de la cromatina abierto o cerrado, en cultivos en etanol o glucosa, respectivamente. Los esferoblastos permeabilizados con nistatina fueron tratados con concentraciones crecientes de MNasa (0 a 0.2 U ml⁻¹) luego las muestras de cromatina, fueron digeridas con 100 U de *HindIII*. La membrana de nitrocelulosa, a la que se transfirieron las muestras fue hibridada consecutivamente con la sonda 3' (A) y la 5' (B) (ver detalles **Artículo 1**). Las flechas muestran las zonas de remodelación más evidente en los cultivos en etanol, y los números denotan la ubicación probable de nucleosomas. Se muestran también los análisis densitométricos de cada condición de cultivo, glucosa (G) y etanol (E). (C) Representación diagramática del promotor de *GDH3* con los sitios probables de unión para los factores Gln3p, el complejo HAP, la caja TATA, el poli dA-dT y el inicio de transcripción. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 22

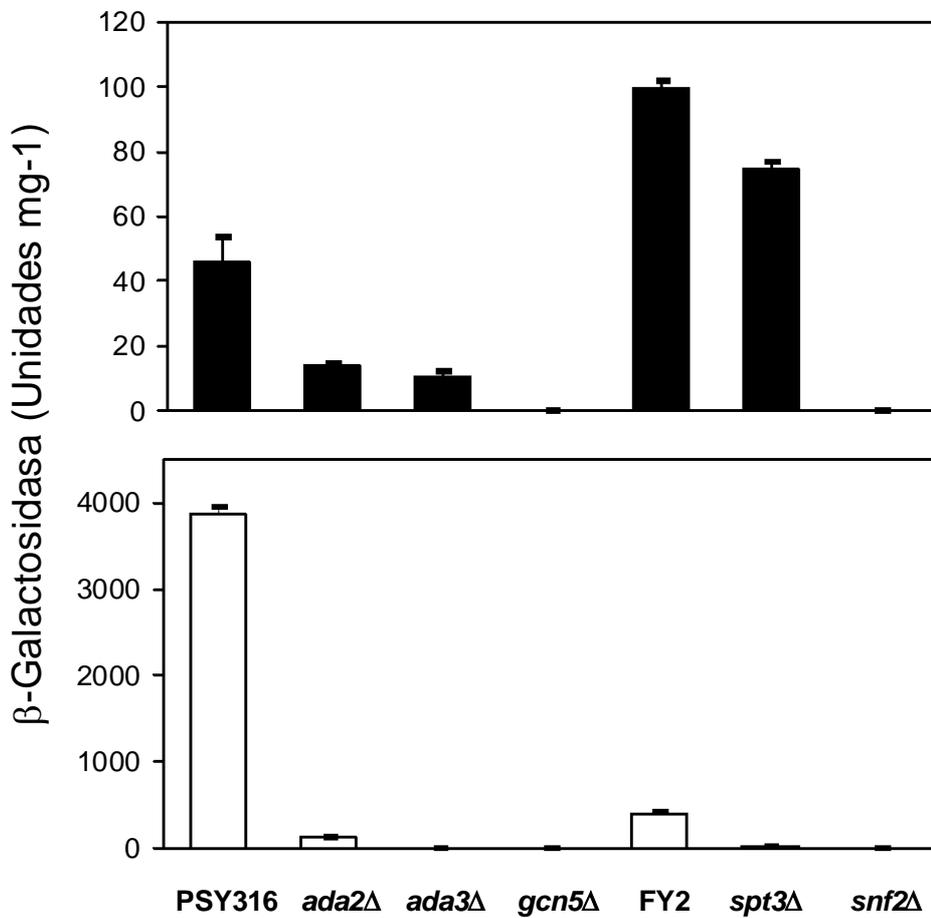


Figura 22. Expresión transcripcional del gen *GDH3* en mutantes afectadas en componentes de los complejos remodeladores de la cromatina SAGA y SWI/SNF. Se muestra la expresión del gen en células cultivadas en MM con glucosa (barras negras) o etanol (barras blancas) como fuente de carbono. Para el experimento en etanol de las cepas FY2, *spt3*Δ y *snf2*Δ, las células se cultivaron en MM con glucosa hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.3, se lavaron en dos ocasiones y se incubaron en MM con etanol por 6 horas. Cepas: PSY316 - A1 (Silvestre/pLA1), PSY316-*ada2*-A1 (*ada2*Δ/pLA1), PSY316-*ada3*-A1 (*ada3*Δ/pLA1), PSY316-*gcn5*-A1(*gcn5*Δ/pLA1), FY2-AB (silvestre/pLAB), FY293-AB (*spt3*Δ/pLAB), FY1656-AB (*snf2*Δ /pLAB). Las células de los experimentos en glucosa y etanol se cosecharon en D.O._{600nm} de 0.3-0.4. Los promedios de las actividades reportadas son el resultado de tres experimentos independientes.

Figura 23

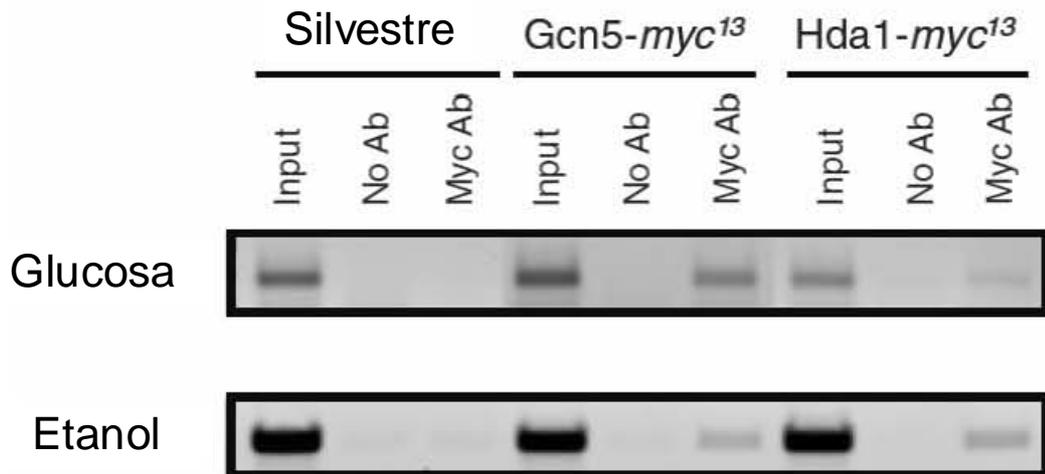


Figura 23. La acetilasa Gcn5p y la desacetilasa Hda1p se unen al promotor de *GDH3*. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina fueron realizados usando un anticuerpo anti-Myc (ver detalles en **Artículo 1**) sobre cepas que poseen el epítipo *myc*₁₃ unido a *GCN5* o *HDA1*. La cepa silvestre sin la fusión fue usada como control negativo. Las cepas se cultivaron en medio MM con glucosa al 2% y se recuperaron en la mitad de la fase de proliferación exponencial, se dividieron en dos porciones iguales. Una parte se lavó y resuspendió en MM con 2% (v/v) de etanol, y se incubó por 4h. La reacción de PCR se realizó con los fragmentos F1 y R1 que abarcan la región del -430 al -913 del promotor de *GDH3*. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes. Estos experimentos fueron realizados por Cecilia Ishida y Guillermo Romero.

Figura 24

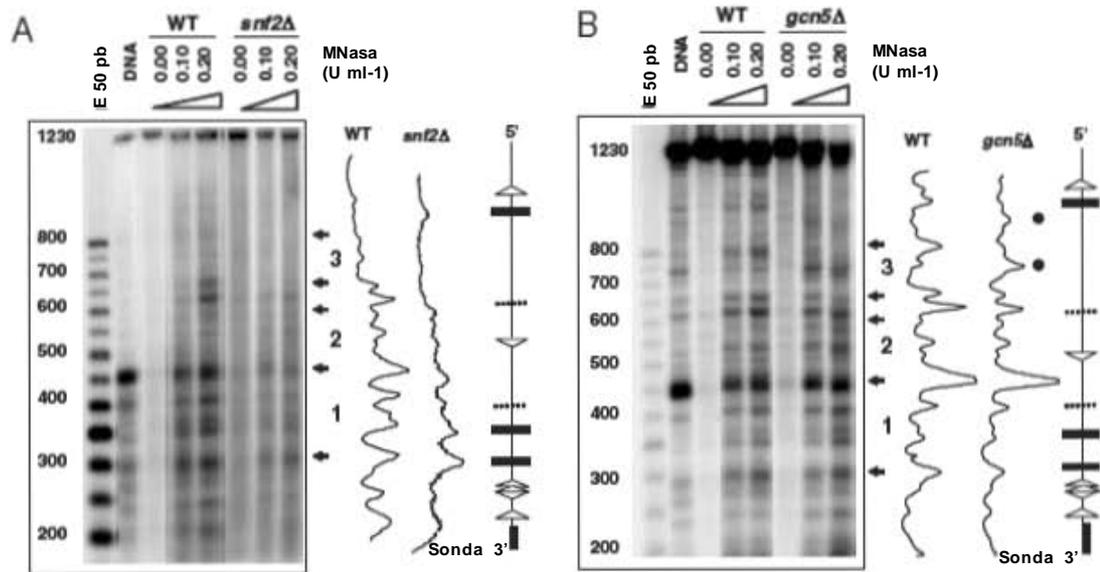


Figura 24. El remodelamiento de la cromatina del promotor de *GDH3* en cultivos en etanol depende de *Gcn5p* y de *Snf2p*. Las cepas silvestres y sus correspondientes, mutantes *snf2Δ* (A) y *gcn5Δ* (B), se cultivaron en medio MM glucosa hasta la DO_{600nm} de 0.3, se transfirieron a MM etanol al 2 % y se cultivaron durante 4 h. Las muestras de cromatina fueron preparadas a partir de esferoblastos permeabilizados con nistatina, tratadas con concentraciones crecientes de MNasa (de 0 a 0.2 U ml⁻¹) y luego digeridas con 100 U de *HindIII*. Se muestran, en la figura, los análisis densitométricos de cada cepa, y la representación esquemática del promotor de *GDH3*, donde se ubica el sitio de hibridación de la sonda 3' (ver detalle **Artículo 1**). Las flechas denotan sitios de hipersensibilidad más evidentes en la silvestre. Los puntos indican sitios de hipersensibilidad característicos de la mutante *gcn5Δ*. Los números marcan la localización probable de nucleosomas en la cepa silvestre. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Figura 25

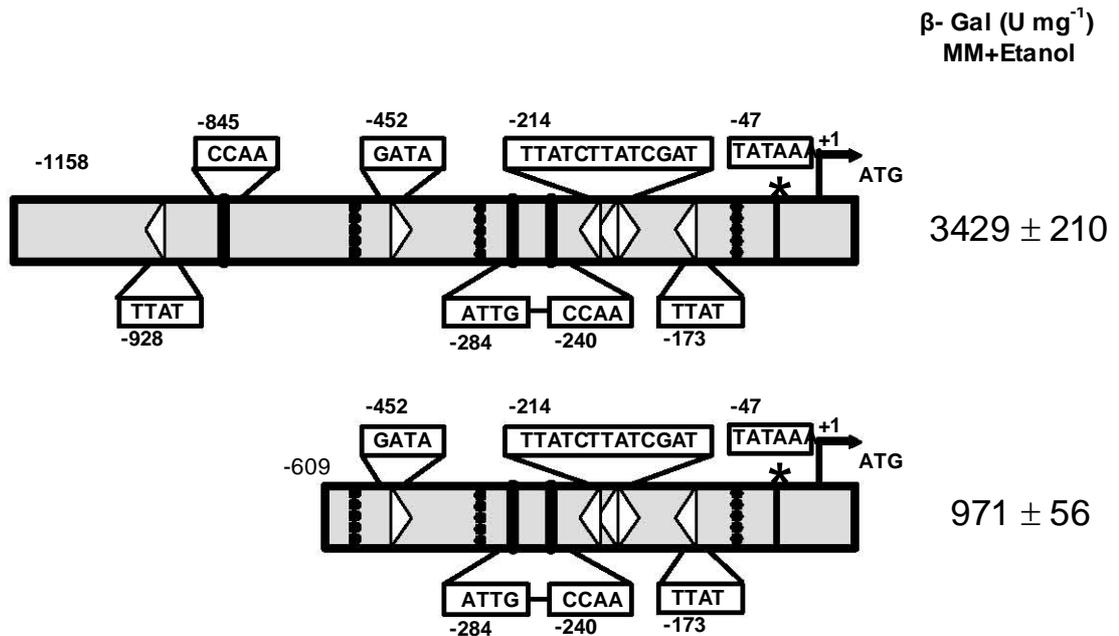


Figura 25. Actividad de β -galactosidasa de un fragmento de 600pb del promotor de *GDH3*, en etanol como fuente de carbono. El fragmento de 609 pb del promotor de *GDH3*, se fusionó con el gen *LacZ*, generando el plásmido p609-*LacZ*, con esta fusión se transformó la cepa silvestre CLA1. En la figura se observan los sitios de unión a factores que conserva la ablación: GATA (\blacktriangleright), HAP (\blacksquare) poly dA-dT (||||) y caja TATA.

Figura 26

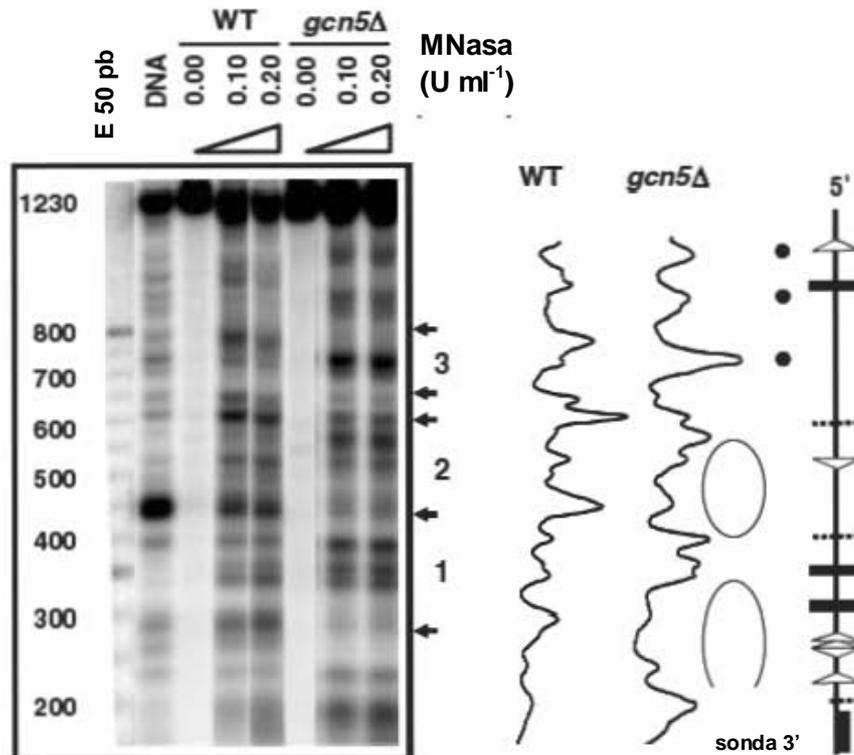


Figura 26. El remodelamiento de la cromatina del promotor de *GDH3* en la fase estacionaria depende de *Gcn5p*. Las muestras de cromatina de la cepa silvestre y la mutante *gcn5Δ* se obtuvieron de cultivos en fase estacionaria (DO_{600nm} 6). Los esferoblastos permeabilizados con nistatina, fueron expuestos a concentraciones crecientes de MNasa (de 0 a 0.2 $U\ ml^{-1}$) y luego digeridas con 100 U de *HindIII*. En la figura se muestran los análisis densitométricos de cada cepa, silvestre y mutante, se observan también las flechas que señalan sitios de hipersensibilidad predominantes en la cepa silvestre. En el extremo derecho se muestra la representación esquemática del promotor de *GDH3*, donde se ubica la sonda 3' que se usó para la hibridación (ver detalles Artículo 1). Los números indican la localización probable de nucleosomas en la cepa silvestre. Los óvalos muestran la localización probable de dos nucleosomas en la *gcn5Δ*. Los puntos señalan sitios de hipersensibilidad muy evidentes en la *gcn5Δ*. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Figura 27

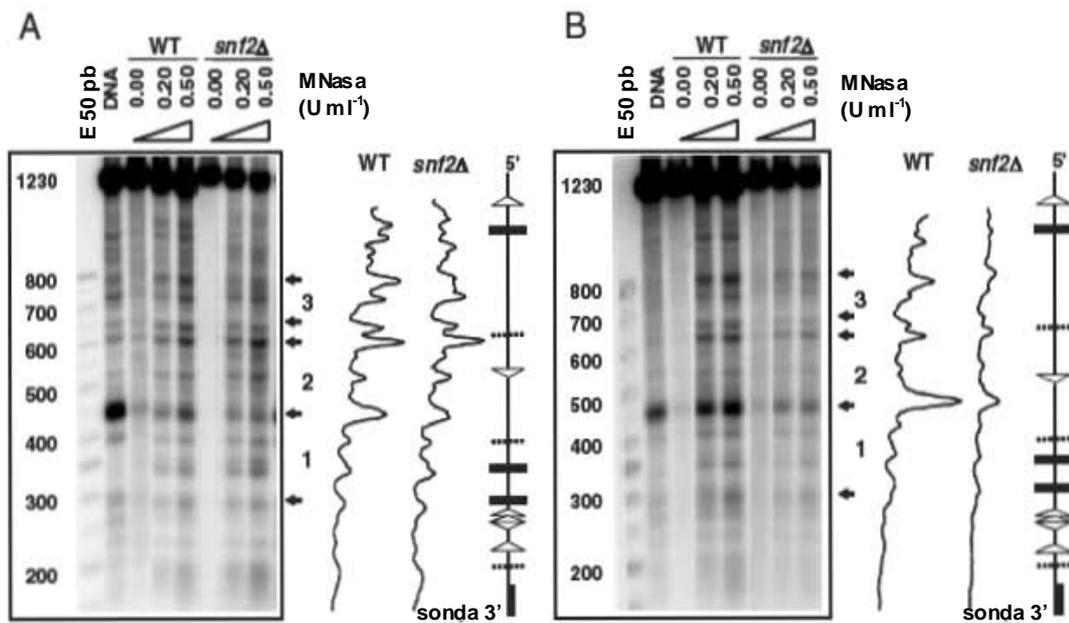


Figura 27. El remodelamiento de la cromatina del promotor del gen *GDH3* depende de *SNF2* en la fase estacionaria. Las muestras de cromatina fueron preparadas a partir de cultivos de la cepa silvestre y la *snf2Δ* en la fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} 0.3) (A) y en la fase estacionaria (DO_{600nm} 0.3) (B). Cada muestra fue tratada con concentraciones crecientes de MNasa (de 0 a 0.5 U ml⁻¹) y luego digerida con 100 U de *Hind*III. En la figura se muestran los análisis densitométricos de cada cepa en las dos condiciones probadas, se observan también las flechas que señalan sitios de hipersensibilidad predominantes en la cepa silvestre. Los números indican la localización probable de nucleosomas en la cepa silvestre. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Figura 28

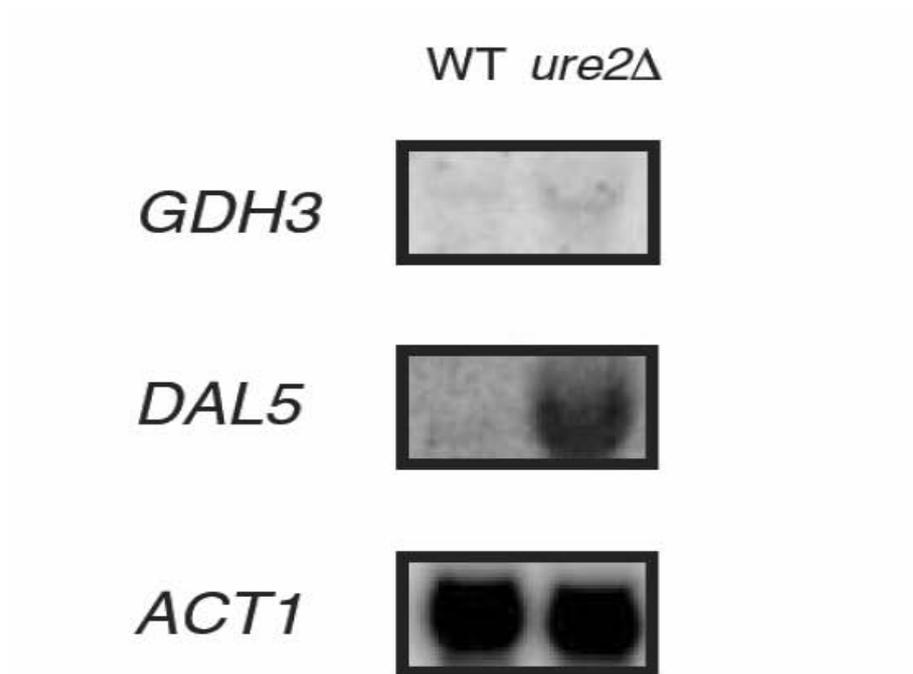


Figura 28. Expresión transcripcional de *GDH3* y *DAL5* en medio rico (YPD). Las células de la cepa silvestre, CLA1, y la mutante *ure2Δ* (Sosa *et al.*, 2003) fueron cosechadas en la fase de proliferación exponencial (DO_{600nm} 0.3). Se obtuvo RNA total de cada una de las cepas y las muestras se probaron secuencialmente con las sonda *Bam*HI-*Sall* de 764pb de *GDH3*, 940pb de *DAL5*, y un fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 1500pb del gen *ACT1*, que se usó como referencia de hibridación. Este experimento fue realizado por Beatriz Rodarte y Cristina Aranda.

V. CONCLUSIONES

1.- La expresión transcripcional del gen *GDH3* de *Saccharomyces cerevisiae* es regulada por la fuente de carbono. El gen *GDH3* es sensible a Represión Catabólica por Carbono. La expresión de *GDH3* es estrictamente reprimida cuando la glucosa esta presente en el medio de cultivo. Esta represión se impone al estímulo inductor del etanol, y es más fuerte que la regulación por la fuente de nitrógeno.

En esta condición el promotor de *GDH3* exhibe una organización cromatínica "cerrada".

2.- La inducción de la expresión transcripcional de *GDH3* en etanol está asociada a un aumento en la hipersensibilidad al corte por nucleasas en su región promotora. La apertura de la estructura de la cromatina del promotor de *GDH3* depende de la actividad de la ATPasa Snf2p, subunidad esencial del complejo remodelador SWI/SNF. Las modificaciones importantes del patrón de los sitios hipersensibles a la MNAsa, y posicionamiento de los nucleosomas localizados en el promotor, dependen de la presencia y actividad de la acetilasa de histonas Gcn5p, componente esencial de los complejos SAGA y ADA

2.- La regulación transcripcional del gen *GDH3* de *Saccharomyces cerevisiae* depende de la calidad de la fuente de nitrógeno. El gen *GDH3* es parte de la red metabólica de nitrógeno y, en tanto que su regulación transcripcional es fundamentalmente dirigida por la fuente de carbono, la Represión Catabólica Nitrogenada ejerce un papel secundario.

3.- Gln3p es un importante activador de la transcripción de *GDH3*, ante diferentes condiciones ambientales. A pesar de que Gln3p era considerado un regulador exclusivo del metabolismo nitrogenado, es capaz de ejercer control positivo sobre la transcripción de *GDH3* en respuesta a la naturaleza de la fuente de carbono

y a la fase de crecimiento, gracias a su transporte al núcleo durante la fase estacionaria.

4.- Los factores transcripcionales Hap2p, Hap3p y Hap4p componentes del complejo HAP, regulan la expresión de *GDH3* en glucosa y etanol como fuentes de carbono. El complejo HAP, y sus componentes Hap2p, Hap3p y Hap4p, regulan la expresión de *GDH3*, aun cuando la fuente de carbono sea glucosa. La subunidad Hap4p lo hace, además, de forma no convencional y homogénea con Hap2p y Hap3p. Esto sugiere una función diferente para esta subunidad y heterogeneidad en el funcionamiento del complejo HAP.

5.- Componentes de los complejos remodeladores SWI/SNF y SAGA son necesarios para la transcripción de *GDH3*. La ausencia de Snf2p abate por completo la actividad de *GDH3* en todas las condiciones de cultivo probadas. SAGA regula la expresión de *GDH3* en etanol. Existe la posibilidad de que el regulador en glucosa sea ADA, ya que Spt3p aparentemente es prescindible en esta condición de cultivo.

6.- La acetilasa Gcn5p y la desacetilasa Hda1p se unen al promotor de *GDH3*. Aparentemente la regulación del gen *GDH3*, tanto en glucosa como en etanol, por este tipo de modificación postranscripcional del extremo amino terminal de las histonas, se establece gracias a la acción coordinada de los complejos a los que estas proteínas pertenecen.

7.- Los cambios en la organización nucleosomal del promotor de *GDH3* durante la transición diáuxica permiten la expresión del gen en la fase estacionaria de cultivo. El gen *GDH3* se expresa activamente en la fase estacionaria de crecimiento. Esta expresión transcripcional depende de la actividad remodeladora de los complejos SWI/SNF y SAGA.

8.- Los genes *GDH1* y *GDH3* no son funcionalmente redundantes. A pesar de que los productos enzimáticos de ambos genes catalizan la misma reacción, las diferencias en sus tasas evolutivas, preferencia en el uso de codones, niveles de expresión, capacidades catalíticas, sensibilidad a degradación, estabilidad, remodelamiento de la estructura de la cromatina de sus promotores, marcan diferencias fundamentales entre ellos. Y enfatizan el hecho de que uno no puede suplir al otro. El proceso con el que esta duplicación ha evolucionado parece obedecer al modelo de sub-neo-funcionalidad.

VI. PERSPECTIVAS

Como se discutió en este trabajo, *GDH3* es un gen cuya regulación responde a la calidad de la fuente de carbono y nitrógeno presente en el medio de cultivo. Por lo cual está inmerso en la red de la represión metabólica nitrogenada y de carbono compartiendo factores reguladores de ambos metabolismos. Además, se observa que los efectos de esta regulación tienen blanco en la organización nucleosomal del promotor de este gen, produciendo cambios dramáticos que permiten la accesibilidad de la maquinaria transcripcional. El estudio sobre la regulación del gen *GDH3* revela un panorama amplio que permite los siguientes cuestionamientos:

- En vista de que Gln3p aparece como un regulador muy importante de la expresión de *GDH3*, y que los complejos remodeladores interactúan con los factores transcripcionales, ¿Es Gln3p el factor que interactúa con alguno de estos complejos y lo atrae hacia el promotor de *GDH3*?
- El factor transcripcional Gln3p se une a los sitios GATA de los promotores que regula ¿Cuáles son los sitios a los que se une en el promotor del gen *GDH3*?
- El complejo HAP también participa en la regulación de *GDH3*, ¿Este complejo puede reclutar a los remodeladores hacia el promotor? ¿A qué cajas CCAAT del promotor de *GDH3* se unen los componentes de este complejo.
- La represión por glucosa es la mayor fuerza reguladora que actúa sobre la expresión de *GDH3*, ¿Quién es el efector de esta represión? ¿Es la actividad de la desacetilasa Hda1p la responsable de esta represión, o algún otro factor que se relacione con el silenciamiento en la región subtelomérica de los cromosomas?
- El glutamato es un potente represor de los genes cuya expresión depende del sistema RTG. Se sabe que el factor heteromérico RTG regula genes del ciclo TCA, regulados por HAP cuando la función mitocondrial y respiratoria se encuentra reducida o es eliminada. La vía de regulación RTG se activa para asegurar cantidades óptimas de α -cetoglutarato, que permitan la síntesis de glutamato cuando el sistema HAP está apagado, en células con respiración

deficiente. También para asegurar el adecuado mantenimiento de las vías anapleuróticas y la gluconeogénesis. ¿Esta vía de control regula la expresión de *GDH3*?

- Se ha propuesto que los elementos PDS, que permiten la inducción durante la transición diáuxica, son unidos en la regulación de otros genes por el factor Msn2p/Msn4p, sin embargo, la falta de ambos genes no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *GDH3* ¿Cuál es, entonces, el factor que interacciona con estas secuencias dentro del promotor?
- La secuencia del promotor de *GDH3* presenta zonas extensas de polidA-dT que se relacionan con una arquitectura especial de la estructura de la cromatina ¿Cuál es el significado de estas secuencias en términos de la transcripción de *GDH3*?, ¿Tienen alguna influencia en la estructura del promotor?. Los sitios de hipersensibilidad que presentan grandes cambios en la mutante *gcn5Δ* en etanol y fase estacionaria ¿pueden relacionarse con éstas zonas?
- Se ha propuesto que el factor Abf1p es un regulador positivo, con capacidad de unión al DNA, y con probable actividad remodeladora de la cromatina, generando estructuras abiertas que permiten la interacción del DNA con otras proteínas. Aparentemente, el producto de *ABF1* participa en la activación transcripcional, el silenciamiento génico en la región subtelomérica, la duplicación y reparación del DNA. El promotor de *GDH3* tiene un sitio que probablemente une al factor Abf1p, ¿Es funcional este sitio? ¿Participa Abf1p en la regulación de *GDH3*? ¿Cómo se relaciona Abf1p con los remodeladores SAGA y SWI/SNF?
- El análisis de baja resolución de la estructura del promotor generó importantes resultados al respecto de la necesidad del remodelamiento para la expresión de *GDH3*. El análisis de alta resolución de hipersensibilidad al corte con MNAsa permitiría una mayor precisión acerca de la ubicación de los sitios que son accesibles a los factores transcripcionales y de la posición exacta de los nucleosomas.

Swi/SNF-*GCN5*-dependent chromatin remodelling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

Amaranta Avendaño, Lina Riego, Alexander DeLuna, Cristina Aranda, Guillermo Romero, Cecilia Ishida, Miriam Vázquez-Acevedo, Beatriz Rodarte, Félix Recillas-Targa, Lourdes Valenzuela, Sergio Zonszein and Alicia González*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, México.

Summary

It is accepted that *Saccharomyces cerevisiae* genome arose from complete duplication of eight ancestral chromosomes; functionally normal ploidy was recovered because of the massive loss of 90% of duplicated genes. There is evidence that indicates that part of this selective conservation of gene pairs is compelling to yeast facultative metabolism. As an example, the duplicated NADP-glutamate dehydrogenase pathway has been maintained because of the differential expression of the paralogous *GDH1* and *GDH3* genes, and the biochemical specialization of the enzymes they encode. The present work has been aimed to the understanding of the regulatory mechanisms that modulate *GDH3* transcriptional activation. Our results show that *GDH3* expression is repressed in glucose-grown cultures, as opposed to what has been observed for *GDH1*, and induced under respiratory conditions, or under stationary phase. Although *GDH3* pertains to the nitrogen metabolic network, and its expression is Gln3p-regulated, complete derepression is ultimately determined by the carbon source through the action of the SAGA and SWI/SNF chromatin remodelling complexes. *GDH3* carbon-mediated regulation is over-imposed to that exerted by the nitrogen source, highlighting the fact that operation of facultative metabolism requires strict control of enzymes, like Gdh3p, involved in biosyn-

thetic pathways that use tricarboxylic acid cycle intermediates.

Introduction

In *Saccharomyces cerevisiae*, ammonium assimilation can be achieved by two metabolic routes. One of them is constituted by the concerted action of the *GLN1*-encoded glutamine synthetase (GS) and the *GLT1*-encoded glutamate synthase (GOGAT) (Tempest *et al.*, 1970; Roon *et al.*, 1974; Mitchell, 1985). The other pathway is mediated by the NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) (EC 1.4.1.4), a broadly distributed enzyme that catalyses the reductive amination of α -ketoglutarate to form glutamate (Holzer and Schneider, 1957). In *S. cerevisiae*, two duplicated genes (*GDH1* and *GDH3*) encode NADP-GDH isoenzymes (Avendaño *et al.*, 1997). This gene pair is one of the 457 duplicated genes that have been found in the yeast genome, and which arose presumably from an ancestral event of whole-genome duplication (Wolfe and Shields, 1997; Kellis *et al.*, 2004).

Several experimental approaches have been focused to study whether the conservation of both *GDH1* and *GDH3* can be regarded as part of a redundancy phenomenon (DeLuna *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002). These have shown that Gdh1p and Gdh3p isoenzymes are specialized at the genetical and biochemical levels and that this duplication has been retained to improve the efficiency with which glutamate biosynthesis is carried out. Biochemical studies on the purified Gdh1p and Gdh3p showed that these two enzymes have different kinetic and allosteric regulation (DeLuna *et al.*, 2001). It was found that *GDH3* expression was null in glucose and thus, NADP-GDH activity was exclusively sustained by Gdh1p monomers. However, attributed to the unique allosteric properties and differential rates of α -ketoglutarate utilization, displayed by Gdh3p and Gdh1p, the expression of both genes is required to achieve wild-type growth on ethanol (DeLuna *et al.*, 2001). The study of the transcriptional regulation of *GDH1* showed that its expression is

Accepted 14 April, 2005. *For correspondence. E-mail amanjarr@ifc.unam.mx; Tel. (+52) 55 56225631; Fax (+52) 55 56225630.

laxly controlled on glucose, in agreement with the fact that Gdh1p is the main provider of glutamate under fermentative conditions, and that utilization of α -ketoglutarate does not impair energy provision through glycolysis (Riego *et al.*, 2002). It was also found that *GDH1* expression on ethanol is strictly controlled by a fine-tuning mechanism, which modulates the abundance of Gdh1p monomers (Riego *et al.*, 2002). Under respiratory conditions, a tight regulation is essential, as the kinetic properties of the NADP-GDH hexamers depend on the proportion of their constituting Gdh1p and Gdh3p monomers. *GDH1* regulation is also determined by transcriptional activators that have been considered as exclusive of either nitrogen or carbon metabolism (Gln3p and HAP complex) (Courchesne and Magasanik, 1988; Blinder and Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1995; 1996; De Winde and Grivell, 1995; Dang *et al.*, 1996). These observations led to suggest that a gene such as *GDH1* should be modulated by the regulatory networks that determine the metabolism of these two compounds (Dang *et al.*, 1996; Riego *et al.*, 2002). The fact that *GDH3* expression is only fully induced under carbon limitation is crucial to allow glutamate biosynthesis without compromising the energy-yielding role of the tricarboxylic acid cycle. Conversely, under fermentative conditions, in glucose excess, Gdh1p hexamers provide the main pathway for glutamate biosynthesis and Gdh3p plays no role.

To better understand the importance of the conservation of the paralogous genes *GDH1* and *GDH3*, here we undertake the study of the transcriptional regulation of *GDH3* expression. Results show that although *GDH3* is part of the nitrogen metabolic network, its transcriptional regulation is commanded by the carbon source, while nitrogen catabolite repression plays a secondary role. *GDH3* expression is glucose-repressed because of a closed chromatin organization of its promoter. Under carbon-limited conditions or in the presence of ethanol as sole carbon source, derepression is achieved through the action of the SWI/SNF and SAGA chromatin remodelling

complexes, indicating that a strict transcriptional control prevents *GDH3* expression when glucose is the main carbon source.

Results

Lack of GDH1-dependent glutamate biosynthesis is not restored by GDH3 in glucose-grown cultures

The fact that *S. cerevisiae* has conserved the two copies of the paralogous NADP-GDH encoding genes, *GDH1* and *GDH3*, poses the challenge to understand the physiological significance of this apparent redundancy (DeLuna *et al.*, 2001; Riego *et al.*, 2002). It is known that the differential abundance of Gdh1p and Gdh3p isoenzymes under fermentative or respiratory conditions determines the capacity of *S. cerevisiae* to synthesize glutamate and provides a mechanism of balanced α -ketoglutarate utilization (DeLuna *et al.*, 2001). Gdh3p monomers provide unique kinetic properties to Gdh1p/Gdh3p hexamers, regulating their capacity to utilize α -ketoglutarate. It has also been suggested that Gdh3p alone would not be able to furnish the high glutamate biosynthesis that is needed to attain wild-type growth under fermentative conditions (DeLuna *et al.*, 2001). In agreement with this proposal, we found that a *gdh1Δ gdh3Δ* double mutant harbouring the *GDH3* gene on a multicopy plasmid shows enzymatic activity that is 56-fold lower than that supported by a multicopy plasmid harbouring the *GDH1* gene (Table 1). This difference could not be solely attributed to the *GDH1* and the *GDH3* promoters, as the *GDH1* gene cloned in a multicopy plasmid (pLAM11) and expressed from its own promoter allowed a sevenfold higher NADP-GDH activity as compared to that afforded by plasmid pLAM44 harbouring the *GDH3*-coding region fused to the *GDH1* promoter (Table 1). These results indicate that Gdh3p has a lower *in vivo* catalytic capacity than that of Gdh1p to synthesize glutamate. In the conditions prevailing in glucose-grown cells, Gdh3p hexamers would be

Table 1. Growth phenotypes and NADP-GDH activity of strains harbouring recombinant plasmids.

Strain	Doubling time (h) ^a	NADP-GDH activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) ^a
CLA11-00 [<i>GDH1 GDH3</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	2.5 \pm 0.11	0.93 \pm 0.106
CLA13-00 [<i>GDH1 gdh3Δ</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	2.4 \pm 0.08	1.28 \pm 0.099
CLA13-11 [<i>GDH1 gdh3Δ</i> /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	2.8 \pm 0.15	8.15 \pm 1.032
CLA13-22 [<i>GDH1 gdh3Δ</i> /pLAM22 (<i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	2.6 \pm 0.13	0.90 \pm 0.137
CLA13-44 [<i>GDH1 gdh3Δ</i> /pLAM44 (5'- <i>GDH1</i> - <i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	2.8 \pm 0.18	0.79 \pm 0.114
CLA14-00 [<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	4.6 \pm 0.26	ND
CLA14-11 [<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM11 (<i>GDH1</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	2.7 \pm 0.14	7.87 \pm 0.549
CLA14-22 [<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM22 (<i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	3.8 \pm 0.16	0.14 \pm 0.031
CLA14-44 [<i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM44 (5'- <i>GDH1</i> - <i>GDH3</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	3.6 \pm 0.22	1.03 \pm 0.125

a. Values are presented as means from three independent experiments \pm SD.

Cells were grown on minimal medium supplemented with glucose as carbon source and ammonium sulphate as sole nitrogen source, and harvested during exponential growth ($\text{Abs}_{600} = 0.5\text{--}0.6$). ND, not detectable.

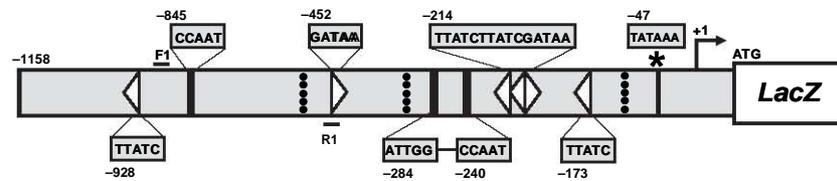


Fig. 1. The *GDH3* promoter has putative binding sites for Gln3p and the HAP complex. The *GDH3* full promoter is depicted as a rectangle with presumed *cis*-acting binding sites for: Gln3p (GATA) (\triangleright , \triangleleft), HAP complex (\blacksquare), polydA-dT (\blacksquare), putative TATA box (*), and transcription initiation site (\rightarrow). Forward deoxyoligonucleotide (F1) and reverse deoxyoligonucleotide (R1) used for the immunoprecipitation assay (see Fig. 5).

unable to fulfil the pertinent glutamate synthesis that would sustain high growth rate. Accordingly, the *gdh1Δ gdh3Δ* double mutant harbouring plasmid pLAM44 expressed *GDH3* on glucose, allowing wild-type NADP-GDH activity. However, the strain did not reach wild-type growth, indicating that Gdh3p is unable to substitute the lack of *GDH1* (Table 1). As expected, *GDH3* impairment did not affect NADP-GDH enzymatic activity or the doubling time of a *GDH1 gdh3Δ* mutant strain, indicating that the *GDH3*-encoded enzyme does not play a role in glutamate biosynthesis in glucose grown cultures (Table 1).

The above presented results indicate that *GDH3* expression should be sharply controlled in order to allow the synthesis of Gdh3p monomers only under the physiological conditions in which this enzyme would provide a biosynthetic pathway particularly fitted to the overall metabolic status of the cell.

Snf2p-dependent chromatin remodelling allows induced GDH3 expression in ethanol-grown yeast cultures

To study *GDH3* transcriptional regulation under respiratory and fermentative conditions, the 1.15 kb sequence located upstream to the determined transcription initiation site (data not shown) was considered as the full *GDH3* regulatory region, which is depicted in Fig. 1. β -Galactosidase (β -Gal) activities were determined in a wild-type strain harbouring plasmid pGDH3-1, containing the presumed *GDH3* regulatory region fused to the complete *Escherichia coli* β -Gal coding region. Extracts were prepared from cells grown on minimal medium (MM) with ethanol or glucose as carbon sources and various nitrogen sources. β -Gal activities detected in extracts obtained from ethanol-grown cultures were 140-fold higher compared with those found in extracts prepared from glucose-grown cultures, in the presence of non-repressive nitrogen sources, or 20-fold higher under nitrogen repressive conditions (Table 2).

These results were confirmed by Northern analysis (Fig. 7A) and indicate that *GDH3* expression could be glucose-repressed and induced in the presence of a non-fermentable carbon source like ethanol. A number of genes involved in the metabolism of alternative carbon

sources have been observed to be glucose-repressed and, upon glucose exhaustion, derepressed through the action of the SWI/SNF chromatin remodelling complex (Peterson and Tamkun, 1995; Kingston and Narlikar, 1999). Although expression of *GDH1* and *GDH2* are known to be affected by the carbon source (Coschigano *et al.*, 1991; Riego *et al.*, 2002), *GDH3* constitutes the first example of a gene pertaining the nitrogen metabolic network whose expression is glucose-repressed. To determine whether derepressed expression of *GDH3* was SWI/SNF-dependent, a null *snf2Δ* mutant was transformed with pGDH3-1. Only 5% of the reporter activity detected in a wild-type strain was observed in the mutant (300 versus 5970 nmol min⁻¹ mg⁻¹ respectively), suggesting that lack of Snf2p hindered *GDH3* ethanol-induced expression.

To further characterize the *GDH3* promoter, chromatin from the wild-type strain was digested *in vivo* with micrococcal nuclease (MNase). In chromatin obtained from ammonium-glucose-grown cultures, it was found that the *GDH3* promoter showed a regular nucleosome array, which hindered MNase accessibility to the hypersensitive sites observed in naked DNA. Most evident was the fact that the bands that comigrate with the 400 bp and 800 bp markers of the DNA ladder in Fig. 2A and B, respectively, were completely inaccessible in chromatin obtained from glucose-grown cultures. A relaxed chromatin configuration was observed in ethanol-grown cells, which was evidenced by the appearance of MNase hypersensitive sites

Table 2. β -Gal activity of wild-type strain grown on different nitrogen and carbon sources.

Nitrogen source	β -Gal specific activity ^a	
	Glucose (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Ethanol (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Ammonium	39.0 \pm 3.55	5500 \pm 450
Proline	33.1 \pm 3.80	5274 \pm 420
Glutamine	14.4 \pm 0.62	208 \pm 18.2
Asparagine	27.2 \pm 3.82	693 \pm 45.0

a. Values are presented as means from three independent experiments \pm SD. Cells were grown on minimal medium and harvested during exponential growth ($OD_{600} = 0.5\text{--}0.6$).

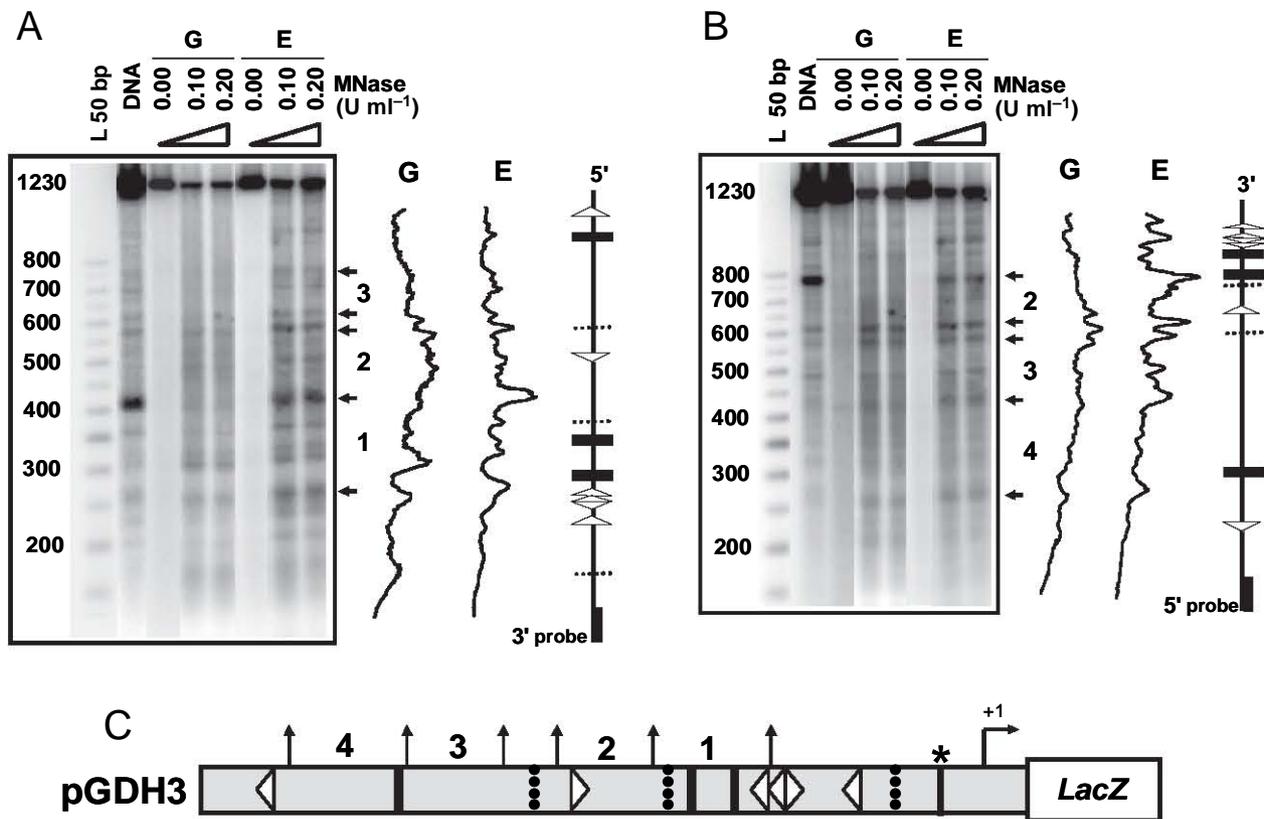


Fig. 2. The *GDH3* promoter shows a closed or open chromatin configuration when prepared from glucose or ethanol-grown cultures respectively. Chromatin samples, obtained by mild digestion of nystatin-treated spheroplasts with various concentrations of MNase, were digested with *Hind*III. Samples were electrophoresed through 1.5% agarose-TBE gels and transferred to a nitrocellulose membrane. The same filter was hybridized with probe 3' (A) or probe 5' (B). Arrows show the promoter regions in which chromatin remodelling is evident in chromatin extracted from ethanol-grown cultures. The region covering the *GDH3* promoter is shown on the right with a densitometric scan of the digestion profile. G, glucose; E, ethanol.

C. Diagrammatic representation of the *GDH3* promoter depicting putative binding sites for Gln3p (GATA) (\triangleright , \triangleleft), HAP complex (\blacksquare), polydA-dT (\circ), putative TATA box (*) and transcription initiation site (\rightarrow). Results are representative of three independent experiments.

in regions 1, 2 and 3 (Fig. 2A and B). A diagrammatic representation of the *GDH3* promoter showing regions 1, 2, 3 and 4 is depicted in Fig. 2C. Chromatin obtained from ethanol-grown cultures of a *snf2Δ* mutant, showed a closed chromatin configuration (Fig. 3A), indicating that ethanol-induced expression was accompanied by a Snf2-dependent relaxed chromatin configuration. When a DNase I sensitivity assay was performed on chromatin extracted from ammonium-grown cells with either glucose or ethanol as carbon sources, it was found that chromatin obtained from ethanol grown cells showed several DNase I hypersensitive sites that were not observed in that obtained from glucose (Fig. 4). Worthy of mention are the hypersensitive sites observed in the most 5' region of the *GDH3* promoter, in which few *cis*-acting elements were mapped (Figs 1 and 4), indicating that this region could interact with unidentified regulatory proteins, which as has been proposed earlier could be responsible of the generation of hypersensitive sites (Boyes and Felsenfeld, 1996).

These results further confirmed that a relaxed chromatin organization correlated with high *GDH3* expression in ethanol-grown cells.

GDH3 chromatin organization is SAGA-dependent

In addition to remodelling machines, the cell contains activities that can directly modify the histones. The SAGA and ADA complexes possess histone acetyltransferase activity (HAT), which may alter the dynamic properties of the nucleosome fibre creating a more accessible substrate for *trans*-activators and the general transcription machinery (Guarente, 1995). It has been shown that in some cases the SWI/SNF remodelling role is exerted in conjunction with the SAGA or ADA complexes (Syntichaki *et al.*, 2000). The wild-type strain and various null isogenic derivatives affected in genes encoding members of the ADA and SAGA complexes (Grant *et al.*, 1997; Roberts and Winston, 1997) were transformed with plasmid

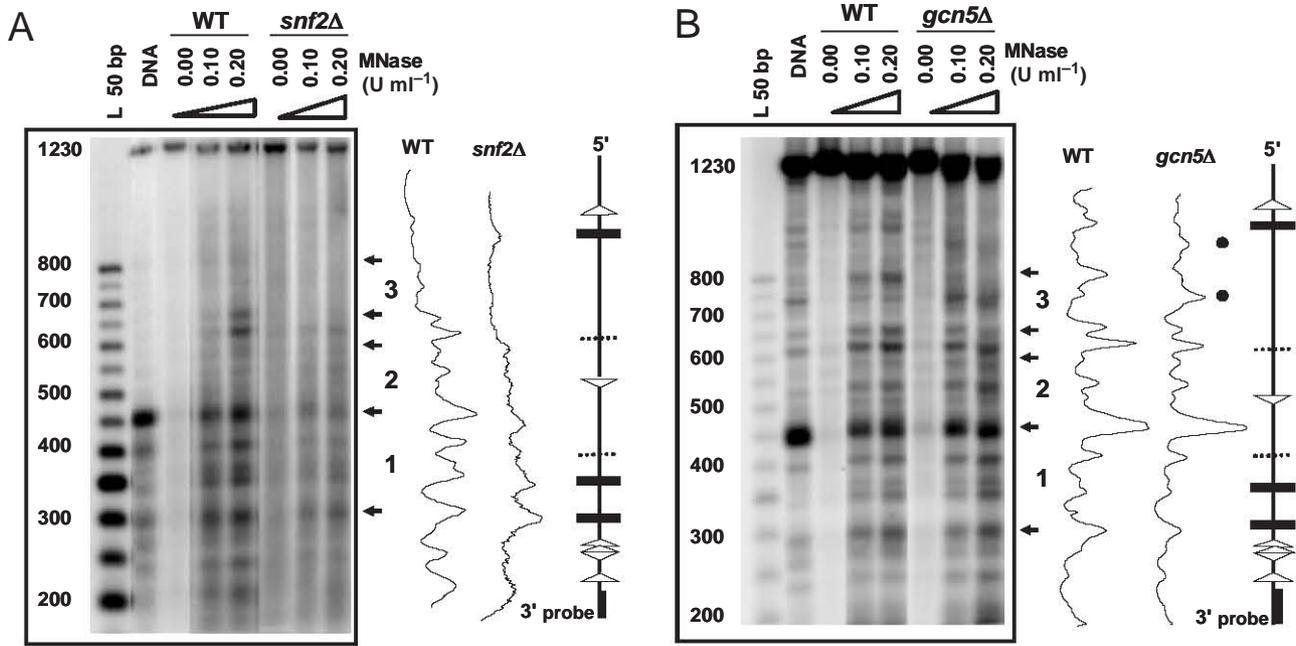


Fig. 3. Chromatin organization of the *GDH3* promoter in ethanol-grown cells is Snf2p- and Gcn5p-dependent. Chromatin samples were prepared from the *snf2Δ* (A), or the *gcn5Δ* (B) mutant grown on glucose to mid-exponential phase (OD_{600} of 0.3), transferred and incubated during 4 h in the presence of 2% (v/v) ethanol. Samples were taken and chromatin was prepared as stated in *Experimental procedures*. Nystatin-treated spheroplasts were digested with increasing concentrations of MNase, and with *Hind*III. The samples were electrophoresed through 1.5% agarose-TBE gels and transferred to a nitrocellulose membrane, and assayed with the 3' probe. The region covering the *GDH3* promoter is shown on the right with a densitometric scan of the digestion profile. G, glucose; E, ethanol. Dots mark hypersensitive sites. Results are representative of three independent experiments.

pGDH3-1. Independent mutations in *ADA2*, *ADA3*, *GCN5* or *SPT3* hindered ethanol-induced *GDH3* expression, retaining only 10% of the activity found in a wild-type strain (500–600 versus 5970 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectively).

These results indicate that the SAGA complex determines *GDH3* transcriptional activation.

In order to analyse the role of the SAGA complex in chromatin organization, extracts were prepared from

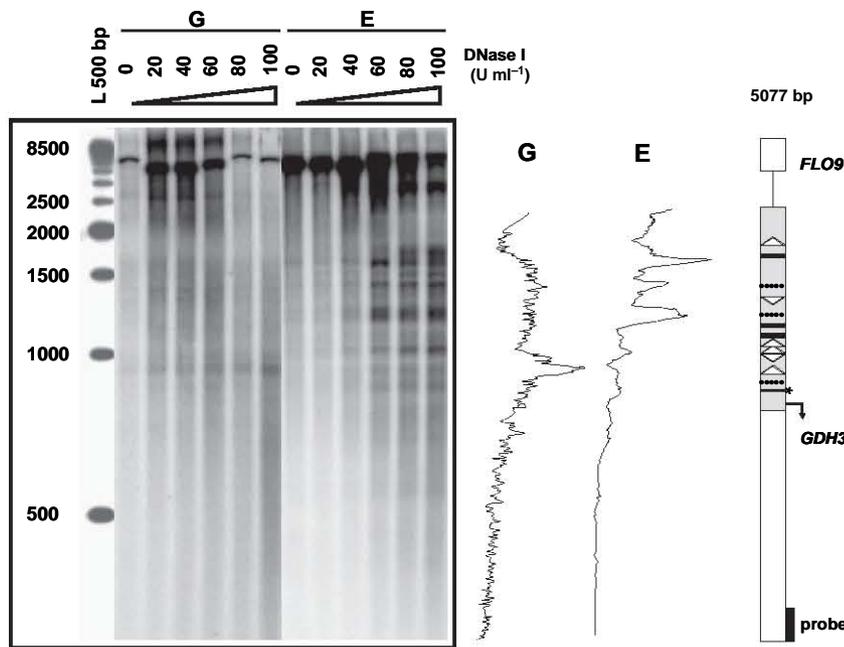


Fig. 4. Ethanol-extracted chromatin is more sensitive to DNase I treatment than that obtained from glucose. Yeast cells were grown on MM with either 2% (w/v) glucose or 2% (v/v) ethanol. Chromatin was prepared and DNase I digestions were performed as described in *Experimental procedures*. The regions covering the interval between the translation initiation site of *FLO9* and that of *GDH3*, together with the *GDH3* coding sequence, are shown on the right with a densitometric scan of the digestion profile. G, glucose; E, ethanol. Results are representative of three independent experiments.

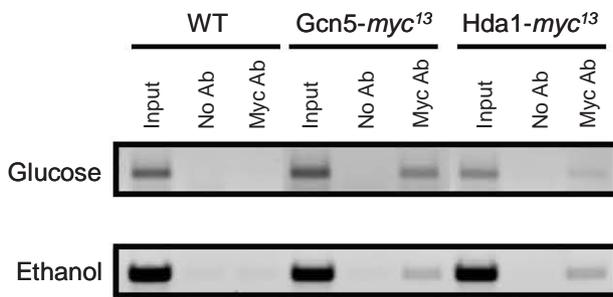


Fig. 5. Chromatin immunoprecipitation shows that Gcn5p and Hda1p bind to the *GDH3* promoter. Chromatin immunoprecipitation assays were performed using an anti-Myc antibody (9E10, Santa Cruz Biotechnology) on wild-type strains containing either *myc*¹³ epitope-tagged *GCN5* or *HDA1*. An untagged wild-type strain (WT) was used as a negative control. Strains were grown on MM with 2% (w/v) glucose to mid-exponential phase, then the culture was divided and half of it was centrifuged, washed, suspended in MM with 2% (v/v) ethanol and incubated for 4 h. Polymerase chain reaction was performed with primers F1 and R1 covering the region from –430 to –913 of the *GDH3* promoter. Results are representative of three independent experiments.

ethanol-grown cultures of a *gcn5Δ* mutant. In the mutant, hypersensitive sites were found on the 5' region of the promoter, which were absent in the wild-type strain (Fig. 3B), indicating that the nucleosome configuration was altered in a *gcn5Δ* mutant. However, the mutant showed no changes in chromatin organization of the most 3' *GDH3* promoter sequence, which harbours most of the *cis*-acting elements, suggesting that alterations in the chromatin organization of the 5' region of the promoter results in decreased *GDH3* expression (Fig. 3B). Importance of this region for *GDH3* expression is also highlighted by the fact that a deletion construct lacking the most 5' 549 bp showed β -Gal activity, which was almost fourfold lower to that observed in the wild-type construct (971 versus 3429 nmol min⁻¹ mg⁻¹).

The fact that it has been found that the *HDA1*-encoded protein deacetylates subtelomeric chromosomal domains (HAST domains) and that *GDH3* is located in a HAST domain (Robyr *et al.*, 2002) suggested that Hda1p and Gcn5p could act on the *GDH3* promoter. Chromatin immunoprecipitation experiments were carried out on *Gcn5-myc*¹³- and *Hda1-myc*¹³-tagged strains. Extracts were prepared from cells grown on MM with 2% (w/v) glucose to mid-exponential phase and from a glucose-grown culture that was washed and incubated for 4 h on MM with 2% (v/v) ethanol as carbon source. As Fig. 5 shows, these two proteins act on the *GDH3* promoter under both repressive (glucose) or induced (ethanol) conditions, suggesting that the cooperative action of Gcn5p and Hda1p could determine the acetylation status of this promoter and thus its transcriptional activation.

Ethanol-induced GDH3 expression is determined by the action of the HAP complex and GLN3 encoded transcriptional activators

The 1.15 kb promoter contained three sequences that could constitute binding sites for the heteromeric HAP complex (Hap2p–Hap5p) (Fig. 1), which is involved in carbon-dependent regulation of several genes whose expression is upregulated in respiratory conditions (Dang *et al.*, 1996). In order to analyse whether the HAP complex could be involved in *GDH3* expression, the pertinent mutants, transformed with p*GDH3*-1, were grown on 2% (w/v) glucose until mid-exponential phase. Cells were then collected, washed and incubated during 4 h on MM with 2% (v/v) ethanol as carbon source. Induced expression was prevented in the *hap2Δ* and *hap3Δ* single mutants. In a *hap4Δ* mutant, *GDH3* expression was 1.5-fold reduced as compared with the wild-type strain, retaining 63% of the β -Gal activity observed in the *HAP4* parental strain (Fig. 6).

Lowest *GDH3* expression was found in highly repressive nitrogen sources (Table 2), indicating that this gene could be regulated by nitrogen catabolite repression (NCR) (Courchesne and Magasanik, 1988; Blinder and Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1995; 1996). Inspection of the *GDH3* promoter showed that it contained six GATAA sequences (Fig. 1), which can constitute the *cis*-acting element, UAS_{NTR}, proposed as the binding site for two transcriptional activators, Gln3p and Gat1p/Nil1p and

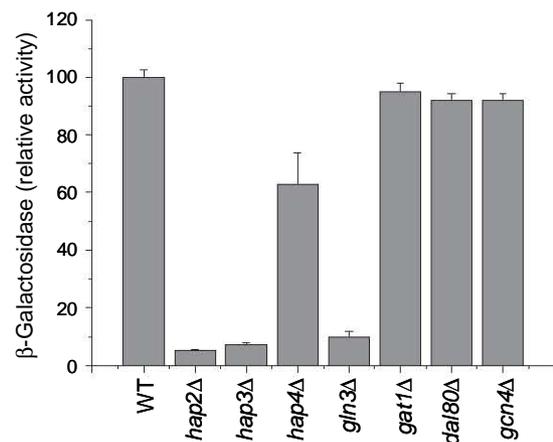


Fig. 6. *GDH3* transcriptional activation in ethanol-grown cultures is dependent upon the action of the transcriptional activators Gln3p and HAP complex. β -Gal activity was determined in extracts obtained from yeast cells harvested during exponential growth on 2% ethanol as carbon source and ammonium sulphate as the nitrogen source. Activities are reported as relative values compared with the isogenic parental strain displaying maximal activity. The various mutants harbour null mutations in genes encoding transcriptional activators, obtained as described in *Experimental procedures*. Results are average of three independent experiments and bars show standard deviation.

the *DAL80* repressor protein, which determine NCR-regulated expression (Minehart and Magasanik, 1991; Cunningham and Cooper, 1993; Blinder and Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1995; Stanbrough and Magasanik, 1996). As Fig. 6 shows, lack of Gln3p resulted in decreased β -Gal activity, indicating that *GDH3* transcriptional activation was determined by Gln3p. The fact that *gat1 Δ* and *dal80 Δ* mutants showed wild-type expression suggested that the *GAT1* and *DAL80*-encoded transcriptional modulators play no role in *GDH3* expression (Fig. 6).

Increased *GDH3* expression on ammonium plus ethanol was not the result of the preferential localization of Gln3p in the nucleus, as when the wild-type Gln3-*myc*¹³-tagged CLA-1 strain was grown on MM with ammonium as nitrogen source with either glucose or ethanol as carbon sources, Gln3p was similarly distributed in nucleus and cytoplasm under both conditions (data not shown). These results are in agreement with previous observations indicating that ammonium is not a highly repressive nitrogen source for the CLA-1 strain (Sosa *et al.*, 2003), and that the nature of the carbon source does not directly determine Gln3p subcellular localization (Cox *et al.*, 2002).

Gcn4p is the direct positive regulator of a gene expression regulatory system known as the general amino acid control that stimulates expression of genes involved in amino acid biosynthesis under starvation conditions (Hinnebusch, 1986). Although the *GDH3* gene encodes a biosynthetic enzyme, no Gcn4p presumed binding sites were found on its promoter. Accordingly, *gcn4 Δ* mutants showed no phenotype under basal conditions (Fig. 6). To address if *GDH3* expression was regulated during amino acid deprivation, β -Gal activity was determined in extracts from cultures of the wild-type strain and the *gcn4 Δ* mutant grown on ethanol in the presence and absence of 10 mM 3-aminotriazole (3-AT). β -Gal activity was the same in extracts obtained from the wild-type strain and of the *gcn4 Δ* mutant with or without 3-AT (5970 versus 5600 nmol min⁻¹ mg⁻¹). These results indicate that *GDH3* expression is not regulated by amino acid deprivation.

In YPD exponential-growth cultures, GDH3 expression is repressed because of closed chromatin organization

Long-term YPD cultures offer a model to study gene expression as the yeast traverses from fermentative to respiratory metabolism and to carbon starvation at the stationary phase. The wild-type strain CLA-1 harbouring plasmid pGDH3-1 was grown on YPD, samples were collected at different growth phases, extracts were prepared and β -Gal activity was determined. During logarithmic growth, when glucose is used as carbon source, *GDH3*

expression was repressed (Fig. 7A), accordingly, β -Gal activity was only 20 nmol min⁻¹ mg⁻¹. During the post-diauxic transition, when the ethanol produced during glucose fermentation became the main carbon source, *GDH3* expression was derepressed (Fig. 7A) and β -Gal activity increased to 1000 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Finally, during stationary phase, when glucose and ethanol were exhausted, high *GDH3* expression was observed (Fig. 7A) and β -Gal activity reached values between 3000 and 6000 nmol min⁻¹ mg⁻¹. Derepressed *GDH3* expression was Gln3p- and HAP-dependent, as β -Gal activity determined in extracts obtained from YPD stationary phase cultures of the *gln3 Δ* , *hap2 Δ* or *hap3 Δ* mutants, was only 5–15% of that found in the wild-type strain (300–600 versus 5953 nmol min⁻¹ mg⁻¹).

The fact that induced *GDH3* expression during stationary phase was Gln3p-dependent, suggested that under this condition Gln3p should be nuclearly localized thus, the wild-type Gln3-*myc*¹³-tagged CLA-1 strain was grown on YPD and Gln3p subcellular localization was determined. During exponential phase, Gln3p was mostly localized in the cytoplasm; when cells entered the diauxic phase, Gln3p was partially localized in the nucleus, as has been pointed out earlier this is the result of a drop in the intracellular level of glutamine attributed to the energy limitation (Cox *et al.*, 2002). When the stationary phase

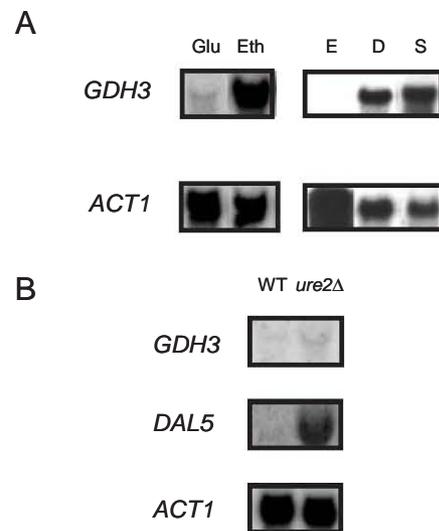


Fig. 7. *GDH3* transcriptional activation.

A. Northern analysis was carried out on total RNA obtained from strain CLA1/pGDH3-1 grown on either glucose or ethanol to an OD₆₀₀ of 0.3 or on YPD. Glu, glucose; Eth, ethanol; E, exponential growth phase; D, diauxic growth phase; S, stationary growth phase. B. Total RNA was obtained from strain CLA1 or its isogenic *ure2 Δ* derivative (Sosa *et al.*, 2003) grown on YPD to exponential phase OD₆₀₀ of 0.3. Filters were sequentially probed with a *Bam*HI-*Sal*I 764 bp *GDH3* fragment, a 940 bp PCR *DAL5* amplification fragment and a *Bam*HI-*Hind*III 1500 bp *ACT1* DNA fragment, as loading control.

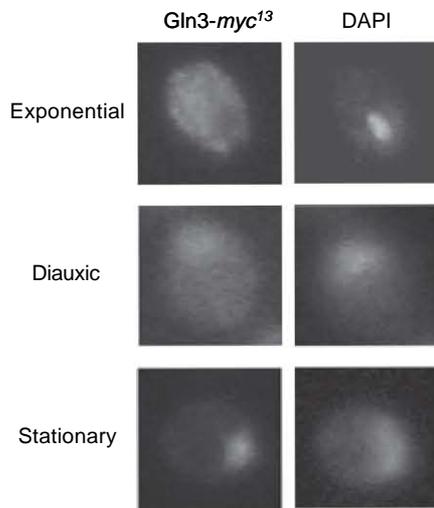


Fig. 8. Gln3p subcellular localization in the different growth phases attained on YPD long-term cultures. Yeast cultures of the Gln3-*myc*¹³-tagged CLA-1 wild-type strain were grown on YPD to mid-log (OD₆₀₀ of 0.3), diauxic shift (OD₆₀₀ of 1.0) and stationary phases (OD₆₀₀ of 6.0). Samples were collected from each condition and Gln3-*myc*¹³ was localized with immunofluorescent microscopy. Results are representative of three independent experiments.

was reached Gln3p was predominantly nuclearly localized, and thus able to support *GDH3* transcriptional activation (Fig. 8).

Extracts from the null *snf2Δ* mutant and the wild-type strain were prepared from exponential and stationary YPD-grown cultures and β-Gal was determined. Induction of *GDH3* expression during diauxic and stationary phases was prevented in the *snf2Δ* mutant and only 10% of the β-Gal activity found in the wild-type was observed. These results showed that induced *GDH3* expression was Snf2p-dependent. To further analyse this matter, MNase sensitivity was studied on chromatin prepared from YPD cultures during exponential and stationary growth phases. As Fig. 9 shows, during exponential growth, when *GDH3* expression was repressed, chromatin acquired a closed configuration, masking the hypersensitive bands that comigrate with the 400 bp marker, while under stationary phase, chromatin displayed an open configuration similar to that obtained in ethanol grown cultures (Figs 2 and 9). Chromatin prepared from exponential growth phase cultures of a *snf2Δ* mutant, showed a MNase digestion pattern similar to the one observed in the wild-type strain, indicating that a closed conformation was maintained in the *snf2Δ* strain (Fig. 9A). Conversely, the open chromatin configuration observed in preparations from stationary

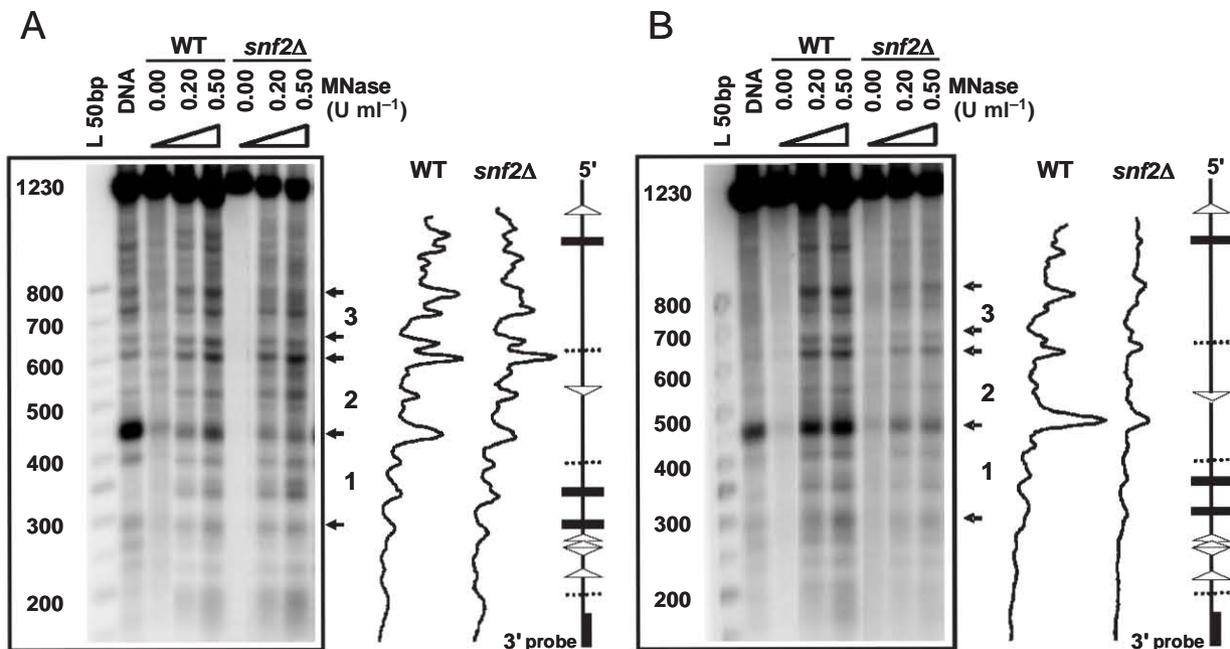


Fig. 9. Snf2-dependent chromatin remodelling during *GDH3* derepression in YPD stationary growth phase cultures. Chromatin samples were prepared from the wild-type strain and the *snf2Δ* isogenic derivative grown on YPD to (A) logarithmic growth phase (OD₆₀₀ of 0.3) and (B) stationary growth phase (OD₆₀₀ of 6.0). Samples were taken and chromatin was prepared as stated in *Experimental procedures*. Nystatin-treated spheroplasts were digested with various concentrations of MNase, and with *Hind*III. The samples were electrophoresed through 1.5% agarose-TBE gels and transferred to a nitrocellulose membrane, and assayed with the 3' probe. The region covering the *GDH3* promoter is shown on the right with a densitometric scan of the digestion profile. Results are representative of three independent experiments.

phase cultures was not attained in a *snf2Δ* mutant strain (Fig. 9B), indicating that under this condition, acquisition of a relaxed chromatin configuration was Snf2p-dependent.

As has been mentioned earlier, the SWI/SNF chromatin remodelling complex can determine chromatin organization acting in conjunction with the SAGA complex. The *gcn5Δ* mutant strain was transformed with plasmid pGDH3-1, cells were grown on YPD to stationary phase, collected and used to prepare extracts to determine β -Gal activity. Only 3% of the activity was detected in the *gcn5Δ* mutant as compared with that found on the wild-type strain. Chromatin organization was determined in stationary phase cultures of the wild-type and *gcn5Δ* mutant. As presented in Fig. 10, chromatin organization in the *gcn5Δ* null mutant was modified. Similarly to what was observed in the chromatin preparation from *gcn5Δ* ethanol-grown cultures (Fig. 3B), conspicuous hypersensitive bands were observed in the most 5' region of the *GDH3* promoter, which were absent in the wild-type strain. Additionally, two nucleosomes were clearly positioned covering the 400 bp hypersensitive site present in naked DNA, and the region where most of the *cis*-acting elements have been mapped (Fig. 10). These results show that *GDH3*

promoter chromatin organization is controlled through the action of the SWI/SNF and SAGA complexes.

Analysis of chromatin organization in the various growth phases attained on YPD suggested that a closed chromatin configuration was responsible of the lack of *GDH3* expression during the exponential growth phase. However, lack of expression could also be attributed to a cytoplasmic localization of Gln3p. In order to rule out this possibility, we determined *DAL5* expression on YPD-grown cultures during exponential growth phase in a wild-type strain and in a *ure2Δ* mutant. *DAL5* encodes the allantoin transporter, and its expression has been shown to be determined by Gln3p through the operation of nitrogen catabolite repression, and is thus fully expressed in a *ure2Δ* mutant even under repressive conditions (Daugherty *et al.*, 1993). As Fig. 7B shows, *DAL5* expression was induced in the *ure2Δ* mutant under exponentially grown cultures, indicating that translocation of Gln3p to the nucleus induced *DAL5* expression. Under these conditions, *GDH3* expression was not observed in either the wild-type strain or the *ure2Δ* mutant (Fig. 7B), showing β -Gal activities of 20 and 25 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively, indicating that even in conditions in which Gln3p was nuclearly localized, the repressive chromatin organization prevented *GDH3* expression.

It can thus be concluded that on YPD exponential cultures, *GDH3* repression is attributed to a closed chromatin configuration, when cultures reach stationary phase, chromatin is relaxed in a SWI/SNF-dependent manner, Gln3p is translocated to the nucleus and *GDH3* expression is derepressed.

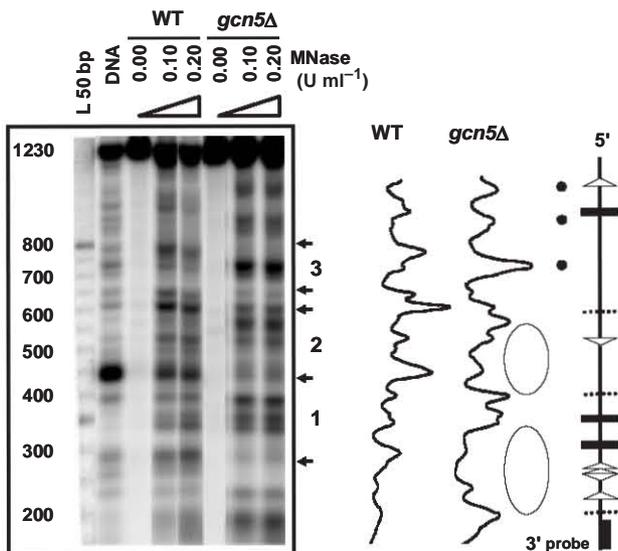


Fig. 10. Gcn5-dependent chromatin remodelling during *GDH3* derepression in YPD stationary growth phase cultures. Chromatin samples were prepared from the wild-type strain and the *gcn5Δ* isogenic derivative grown on YPD to the stationary growth phase (OD₆₀₀ of 6.0). Samples were taken and chromatin was prepared as stated in *Experimental procedures*. Nystatin-treated spheroplasts were digested with various concentrations of MNase, and with *Hind*III. The samples were electrophoresed through 1.5% agarose-TBE gels and transferred to a nitrocellulose membrane, and assayed with the 3' probe. The region covering the *GDH3* promoter is shown on the right with a densitometric scan of the digestion profile. Nucleosomes are depicted as ovals. Dots mark hypersensitive sites. Results are representative of three independent experiments.

Discussion

GDH3 expression is required to fulfil glutamate biosynthesis under respiratory conditions

The genes encoding the biosynthetic glutamate dehydrogenases have provided a model to study how a duplicated gene is retained to improve the efficiency with which a pre-existing function is carried out. As mentioned earlier, studies on the biochemical properties of the *GDH1*- and *GDH3*-encoded proteins have shown that these two enzymes differ in their allosteric regulation for α -ketoglutarate usage for amino acid synthesis. These observations could be interpreted as a subfunctionalization process through which the derived copy, *GDH3*, has differed from the ancestral copy (Kellis *et al.*, 2004), losing some essential aspect of its function and thus disabling it to fulfil some aspects of the original physiological role. In agreement with these findings, this paper presents results that indicate that the *GDH3* enzyme is unable to complement lack of *GDH1* in certain conditions. In addition, previous results (DeLuna *et al.*, 2001) indicate that the Gdh1p/

Gdh3p hybrid hexamers are suited for glutamate biosynthesis in ethanol-grown cultures, providing a means to utilize α -ketoglutarate without impairing energy provision. Thus the coexistence of *GDH1* and *GDH3* monomers is indispensable to provide a pacemaker determining carbon and nitrogen metabolic fluxes.

In this regard, global gene expression analysis has shown that genes involved in gluconeogenesis and those subject to nitrogen catabolite repression increased their transcription when ethanol was the carbon source (Wu *et al.*, 2004). This result has suggested that upregulation of genes subject to NCR may contribute anaplerotic intermediates in ethanol grown cells (Wu *et al.*, 2004). Our results could extend this finding, suggesting that the concerted regulation of *GDH1* and *GDH3* genes constitute a mechanism to preserve the pool of anaplerotic intermediates.

Functional divergence of the GDH1 and GDH3 encoded enzymes has been accompanied by gene expression changes

Gene expression changes are recognized to be of great importance in the functional divergence of duplicated genes (Kellis *et al.*, 2004). One of the most important differences between *GDH1* and *GDH3* expression is the fact that *GDH1* is considerably expressed in glucose-grown cultures (Dang *et al.*, 1996), while *GDH3* expression is completely repressed in this condition. This differential control warrants the presence of the enzyme endowed with the best capacity to furnish glutamate, allowing the exclusive formation of Gdh1p hexamers. Results presented in this work show that, under respiratory metabolism, *GDH3* is 140-fold augmented as compared with that found on glucose, while that of *GDH1* is only threefold increased (Riego *et al.*, 2002). As has been found for *GDH1* (Dang *et al.*, 1996; Riego *et al.*, 2002), *GDH3* ethanol-induced expression is determined by the HAP complex; suggesting that this regulatory instance could form part of a HAP-dependent network determining synthesis and utilization of α -ketoglutarate. Nitrogen regulation was found to play a role on *GDH3* expression, as maximal transcriptional activity was observed in the presence of non-repressive nitrogen sources. However, carbon-dependent regulation seems to be over-imposed to that exerted by nitrogen, as maximal *GDH3* expression was only observed after carbon exhaustion on YPD-grown cultures or in ethanol-grown cultures. As *GDH1* expression is also determined by the nature of the nitrogen source under respiratory conditions (Riego *et al.*, 2002), it can be concluded that the concerted action of the carbon and nitrogen sources on *GDH1* and *GDH3* expression determines the abundance of the Gdh1p and Gdh3p monomers.

GDH3 expression was not affected by Gcn4p-dependent general amino acid control, indicating that this gene does not respond to amino acid deprivation. Conversely, it has been shown that Gcn4p plays a crucial role on *GDH1* transcriptional regulation in ethanol-grown cultures (Riego *et al.*, 2002). These results are indicative of the divergent genetic regulation, which accompanies functional specialization of duplicated genes (Kwast *et al.*, 1998), and indicate that Gdh1p plays a role that is more committed to biosynthetic function than that of the paralogue Gdh3p.

Chromatin remodelling determines glucose repression of GDH3 expression

Several studies in *S. cerevisiae* have demonstrated that chromatin remodelling is required for the transcriptional activation of a variety of genes (Sudarsanam *et al.*, 2000). It has been previously shown that the transcriptional induction of the glucose-regulated *SUC2* and *ADH2* genes is afforded through SWI/SNF and SAGA chromatin remodelling complexes upon derepression by glucose starvation (Verdone *et al.*, 1996; Geng and Laurent, 2004). The results presented here show that glucose repression of *GDH3* is mainly exerted through chromatin remodelling, and that ethanol-induced expression and that observed under carbon deprivation (stationary phase) is accompanied by an important modification in nucleosome organization, which is dependent on the SWI/SNF and SAGA complexes. Most interesting was the finding that chromatin configuration was diversely modified in a *gcn5 Δ* mutant on YPD or on MM-ethanol cultures. The main difference was the fact that YPD-extracted chromatin showed the positioning of two nucleosomes covering the *GDH3* promoter region, which harbours the identified *cis*-acting elements, not observed on that extracted from ethanol-grown cultures. It could thus be considered that the differential localization of regulatory proteins on the chromatin extracted from MM-ethanol cultures versus that obtained from stationary growth phase cultures, could create a more rigid chromatin that would disenable the positioning of these two nucleosomes in a *gcn5 Δ* mutant.

Although we have no evidence indicating which mechanisms are involved in the recruitment of the remodelling machinery to the *GDH3* promoter, our results suggest that *GDH3* chromatin remodelling might underlie its subfunctionalization, which could account for the diverse physiological roles played by Gdh1p and Gdh3p. It could be considered that binding of both Gln3p and the HAP complex is likely to be the signal for chromatin remodelling. It is worth mentioning that Gcn5p does not determine *GDH1* expression in ethanol-grown cultures (Riego *et al.*, 2002). The fact that repressed *GDH3* expression on glucose can be mainly attributed to a closed chromatin organization

evokes the idea that has been put forward for higher organisms, suggesting that epigenetic silencing could shift the loss versus gain equilibrium towards functional divergence (Rodin and Riggs, 2003). In this regard it has been shown that, the *HDA1*-encoded protein deacetylates subtelomeric chromosomal domains located 10–25 kb from the telomeres (HAST domains), while Rpd3p deacetylates in a much more uniform manner with a lesser effect in the subtelomeric region. The HAST domains contain normally repressed genes that are used for growth under contrasting conditions. It has thus been proposed that a major function of these domains is to repress genes that are subsequently activated by alternate carbon sources and adverse conditions. The finding that *GDH3* is located in a HAST domain (Robyr *et al.*, 2002) is in consonance with our findings, which in addition show that Hda1p acts upon the *GDH3* promoter, confirming that closed chromatin organization plays a key role in determining *GDH3* expression. In this regard it can be speculated that Gcn5p acetylase activity counteracts Hda1p deacetylation allowing the acting of the SWI/SNF complex and thus *GDH3* expression under respiratory conditions. The study of the role of chromatin organization in the regulation of a group of paralogous genes showing divergent patterns of expression could establish whether the HAST domains could play a role in the retention of the two copies.

Concluding remarks

Genetic redundancy is a major feature of living beings. Duplication of functional genes may represent the source of genetic material for the origin of new or specialized functions of the proteins they encode (Ohta, 1989). It has long been known that the model organism *S. cerevisiae* harbours a high number of redundant genes. After analysis of the complete yeast genome sequence, several inter-chromosomal duplicated regions were identified (Wolfe and Shields, 1997) and were considered to constitute the molecular evidence of ancient whole-genome duplication. This proposition has been recently confirmed through the sequencing and analysis of *Kluyveromyces waltii*, a related yeast species that presumably diverged before the duplication (Kellis *et al.*, 2004). A single massive duplication can represent the possibility of a given organism to experiment the evolution of all proteins encoded in its genome. The finding that accelerated evolution involved only one member of a gene pair in 95% of the cases, has allowed distinguishing ancestral and derived functions, supporting the model in which one of the paralogues retains an ancestral function while the other one is free to evolve more rapidly (Kellis *et al.*, 2004); this triggered the acquisition of new and complementary capacities, which could favour the adaptation of an organism to a 'new' way

of life (Piskur, 2001). Duplication and further diversification of a biosynthetic glutamate dehydrogenase, accompanied by the evolution of the *cis*-regulatory elements and chromatin remodelling involved in its transcriptional regulation, could determine the maintenance of a duplicated gene pair.

The duplicated NADP-glutamate dehydrogenase pathway is perhaps the best understood example of a recurring pattern in the yeast metabolic network, in which individual isoenzymes are separately coregulated with distinct processes, providing a way of reducing cross-talk between pathways using a common reaction (Ihmels *et al.*, 2004; Segre, 2004). It is also relevant that the pathways here involved, namely the catabolic and anabolic use of carbon intermediates, are key to both the central nitrogen and carbon metabolic networks. This instance may be thus representative of a general mechanism through which *S. cerevisiae* acquired facultative metabolic properties.

Experimental procedures

Strains

The following strains were transformed according to the method described by Ito *et al.* (1983), with either pGDH3-*LEU2* (*GDH3-lacZ* 2 μ *LEU2*) or pGDH3-*URA3* (*GDH3-lacZ* 2 μ *URA3*): CLA1 (WT), CLA100 (*gcn4 Δ*), CLA-102 (*gat1 Δ*) (Valenzuela *et al.*, 1998), CLA-302-0 (*gln3 Δ*) (Valenzuela *et al.*, 2001), BWG1-7 A (WT), LWG1 (*hap2 Δ*), JP40 (*hap3 Δ*) (Forsburg and Guarente, 1989), FY2 (WT), FY293 (*spt3 Δ*), FY1656 (*snf2 Δ*) (Sterner *et al.*, 1999), PSY316 (WT), PSY326-*ada2 Δ* (Berger *et al.*, 1992), PSY316-*gcn5 Δ* , PSY316-*ada3 Δ* (Koleske *et al.*, 1992), Y0000 (WT), Y04959 (*hap4 Δ*) (Euroscarf Collection) and the CLA-706 *ure2 Δ* (Sosa *et al.*, 2003). Strains CLA11, CLA13 and CLA14 (DeLuna *et al.*, 2001) were independently transformed with plasmids pRS426 (2 μ *URA3*), pLAM11 (*GDH1* 2 μ *URA3*), pLAM22 (*GDH3* 2 μ *URA3*) and pLAM44 (5'-*GDH1-GDH3* 2 μ *URA3*) (DeLuna *et al.*, 2001). A *dal80 Δ* mutant was obtained from the CLA1 strain, using the polymerase chain reaction (PCR)-based gene replacement protocol described by Wach *et al.* (1994), with *kanMX4* as a resistance marker. Two deoxyoligonucleotides were designed based on the *DAL80* nucleotide sequence that the multiple-cloning site presents in the pFA6a vector (Wach *et al.*, 1994). The deoxyoligonucleotide D1 (5'-GTG ATT CGT TGA AGC TGC CCT CGC CTA CAC CTT TCA GCT GC **CGT ACG CTG CAG GTC GAC**-3') comprised 41 bp of the 5' region of the *DAL80* coding sequence (+10 to +51), and 18 bp (in boldface type) of the pFA6a multiple cloning site. The deoxyoligonucleotide D2 (5'-GTT GTG GGT GAG ATT GTA CTG AAG CTC TGG AGT GTA GTT C **ATC GAT GAA TTC GAG CTC G**-3') contained 40 bp corresponding to an internal *DAL80* fragment (+766 to +806) 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 programme: one denaturing cycle of 3 min at 94°C, followed by six cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing

at 50°C and 2 min extension at 72°C; followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 69°C and 2 min extension at 72°C, and finally 5 min extension at 72°C. The 1516 bp PCR product obtained was gel-purified and used to transform strain CLA1 generating a *dal80Δ* derivative. Correct insertion was monitored by PCR amplification on genomic DNA, using a pair of deoxyoligonucleotides designed to amplify the *DAL80* coding sequence. The *dal80Δ* derivative was transformed with plasmid pGDH3-*LEU2*, generating strain CLA 400-A1 MAT α *ura3 leu2 dal80::kanMX4/pGDH3-1 (GDH3-lacZ 2 μ LEU2)*. A *GLN3-myc¹³-(kanMX6)* was prepared as described by Longtine *et al.* (1998). One pair of deoxyoligonucleotides was designed, based on the *GLN3* coding sequence and that of the pFA6a-13Myc-*kanMX6* multiple cloning site (lower case lettering): GLN3F2 (5'-AGT TCA GCA ATT GCT GAC GAA TTG GAT TGG TTA AAA TTT GGT ATA cgg atc ccc ggg tta att aa-3') and GLN3R1 (5'-AGT AAT TAT TAA CAT AAT AAG AAT AAT GAT AAT GAT AAT ACG CGG gaa ttc gag ctc gtt taa ac-3').

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%, v/v) was used as a carbon source, and 40 mM ammonium sulphate or 0.1% (w/v) glutamate, glutamine, asparagine, or proline were used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01% (w/v). Cells were incubated at 30°C with shaking (250 r.p.m.). Amino acid deprivation experiments were conducted as previously described (Valenzuela *et al.*, 1998) on MM with 2% (v/v) ethanol as carbon source.

Construction of *lacZ* fusions

All standard molecular biology techniques were followed as previously described (Sambrook *et al.*, 1989). In order to obtain a *lacZ* fusion with the *GDH3* promoter, a 1213 bp DNA fragment upstream the start codon of *GDH3* containing the putative regulatory region and 17 bp of the coding sequence, was PCR-amplified. Deoxyoligonucleotides used for this purpose were L1 (5'-CGC GCG AAG CTT GCG GTT ATA TGA TCT TC-3') and L2 (5'-CGC GCG AAG CTT CTG GTT CGC TTG TCA T-3'). Qiagen purified pLAM2 DNA (DeLuna *et al.*, 2001) was used as template for PCR amplification with the following programme: one denaturing cycle of 3 min at 95°C, followed by 25 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 3 min annealing at 50°C, 2 min extension at 72°C and a final 5 min extension at 72°C. The 1230 bp DNA fragment was fused in frame to the *E. coli lacZ* gene in YEp363 (2 μ *LEU2*) or YEp353 (2 μ *URA3*) (Myers *et al.*, 1986), generating plasmids pGDH3-*LEU2* or pGDH3-*URA3* respectively.

Determination of NADP-GDH and β -Gal activities

Yeast total soluble protein extracts were prepared from cultures inoculated at an OD₆₀₀ of 0.05 and harvested between OD₆₀₀ of 0.40 and 0.50. Extracts were prepared by grinding

cells with glass beads in their corresponding buffer (Cogoni *et al.*, 1995). NADP-GDH was assayed by the method of Doherty (1970); one unit of activity was defined as the oxidation of 1.0 μ mol of NADPH per minute. β -Gal activities were determined as previously described (Valenzuela *et al.*, 1998); one unit of β -Gal corresponds to 1 nmol of o-nitrophenol produced per minute. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as the standard.

Micrococcal nuclease treatments

All methods are based on nuclease treatment of nystatin-permeabilized spheroplasts (Venditii and Camilloni, 1994). Cell cultures (200 or 1000 ml at OD₆₀₀ of 0.4, glucose or ethanol cultures respectively) were pelleted, washed once, resuspended in 5 ml of buffer A (1 M sorbitol, 25 mM EDTA and 600 mM β -mercaptoethanol) and incubated for 5 min at 30°C. The pelleted cells were washed with 5 ml of 1 M sorbitol, and suspended in 5 ml of buffer B (1 M sorbitol and 6 mM β -mercaptoethanol) in the presence of 10 mg of β -glucuronidase per optical density (OD₆₀₀). Incubation was carried out for 10 min for glucose, and 15–20 min for ethanol cultures, at 30°C. The spheroplasts were harvested, washed with 10 ml of 1 M sorbitol, suspended in 5 ml of Nystatin buffer (50 mM NaCl, 1.5 mM CaCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M sorbitol, 200 μ g ml⁻¹ Nystatin) and divided into 0.5 ml aliquots. MNase (0.025–1 U) was added to each aliquot of permeabilized spheroplasts; these samples were incubated at 37°C for 20 min. The reaction was stopped with 1% SDS, 5 mM EDTA (final concentrations). Proteinase K (40 μ g per sample) was added and the samples were incubated at 56°C for 45 min. The DNA was then purified by three phenol-chloroform extractions, followed by an ethanol 3 M NaOAc precipitation. The pellet was resuspended in 200 μ l of TE buffer and treated with RNase (150 μ g per sample). Naked DNA was prepared with the same treatment of nystatin-permeabilized spheroplasts. For MNase *in vitro* digestion, DNA was digested in 100 μ l of buffer C (1.5 mM CaCl₂, 50 mM NaCl and 20 mM Tris-HCl pH 8.0), MNase (0.01–0.1 U) was added and incubation was performed at 37°C for 2–5 min. Digestion was stopped by addition of 1% SDS, 5 mM EDTA (final concentrations). Naked DNA was then purified by three phenol-chloroform extractions followed by an ethanol 3 M NaOAc precipitation. RNase treatment was also performed. The samples were resuspended in 50 μ l water and a 2 μ l aliquot was electrophoresed on 1% agarose-TAE 1 \times gel to determine the extent of digestion.

DNase I sensitivity assay

Spheroplasts were obtained as described above, resuspended in 5 ml of Nystatin buffer, and divided in 0.5 ml aliquots. DNase I (10–60 U) was added to each sample and incubated for 5 min at 30°C. The reaction was stopped with 1% SDS, 5 mM EDTA (final concentrations). Proteinase K (40 μ g per sample) was added and the samples were kept at 56°C for 2 h. DNA was then purified by three phenol-chloroform extractions and ethanol precipitation, followed by RNase treatment.

Low-resolution analysis

DNase I and MNase sensitivity analyses were performed as follows: chromatin and naked DNA obtained from different strains harbouring fusion plasmids (pGDH3) were digested with *Hind*III (100 U per sample), extracted, purified and suspended in 50 µl water. All the samples were electrophoresed on 1.5% agarose-Tris-borate-EDTA (TBE 0.5×) (3.5 V cm⁻¹) gels, transferred to Hybond N⁺ nylon paper (Amersham) and hybridized by standard procedures. Two pairs of radiolabelled PCR probes for *GDH3* were generated: P5'-3 (130 bp) and P3'-3 (114 bp). These probes complement the regions near the 5' and 3' ends of the *GDH3* promoter. The deoxyoligonucleotides used for this purpose were: P5'-3R (5'- CAG CAA GAG AAC AAA CGA CG- 3'), P5'-3F (5'-CGC GCG AAG CTT GCG GTT ATA TGA TCT TC-3'), P3'-3F (5'- GGT ACA TAC ATA GGC CAC-3') and P3'-3R (5'-CGC GCG AAG CTT CTG GTT CGC TTG TCA T-3'). pGDH3 DNA was used as template for PCR amplification with the following programme: one denaturing cycle of 3 min at 95°C, followed by 26 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 52°C, 2 min extension at 72°C and a final 5 min extension at 72°C. These PCR reactions were performed in presence of 5 µl of [α -³²P]-dCTP (3000 µCi mmol⁻¹). Every gel included the Gibco 50 bp ladder (for MNase experiments) or 250 bp ladder (for DNase I experiments). Ladders were 5'-end labelled using T4 Polynucleotide kinase and [γ -³²P]-ATP, following standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). Chromatin and DNA blots were scanned using the program ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Northern blot analysis

Northern analysis was carried out as previously described by Gonzalez *et al.* (1992). Total yeast RNA was prepared as described by Struhl and Davis (1981) from 0.5 OD₆₀₀ 100 ml cultures of MM with 40 mM (NH₄)₂SO₄ as nitrogen source, with either glucose (2%, w/v) or ethanol (2%, v/v) as carbon sources, or from YPD exponentially grown cultures (OD₆₀₀ of 0.3). A *Bam*HI-*Sall* 760 bp, a 940 bp PCR-amplified fragment and a *Bam*HI-*Hind*III 1500 bp restriction fragments were used as probes for sequential hybridization of *GDH3*, *DAL5* and *ACT1* (Struhl and Davis, 1981; Avendaño *et al.*, 1997; Sosa *et al.*, 2003). Blots were scanned using the program ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Formaldehyde cross-linking and immunoprecipitations were carried out by the procedure described by Hecht *et al.* (1995). Yeast cells (200 ml; OD₆₀₀ of 0.4) were cross-linked with 1% formaldehyde for 60 min at room temperature. After addition of 125 mM glycine and incubation for 5 min, cells were harvested and washed with saline Tris-buffer. Pellet cells were suspended in spheroplast buffer (1 M Sorbitol, 50 mM Tris-Cl, 25 mM HEPES) with 600 U ml⁻¹ of lyticase and incubated at 30°C for 30 min. Spheroplasts were harvested, washed and suspended in RIPA buffer (50 mM HEPES, 137 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Na deoxycholate, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). Spheroplasts were sonicated to produce chromatin frag-

ments of 200–1000 bp, with average size of ~500 bp. Chromatin immunoprecipitation was conducted with 1 µg of anti *c-myc* antibody (9E10, Santa Cruz Biotechnology). Chromatin solution was combined with 5 µl of antiserum. The primers used for PCR analysis were the forward deoxyoligonucleotide 5'-CAA AAT GGC GAT CAT TG-3' (F1), and the reverse deoxyoligonucleotide 5'-GAT AAA ACG GAG CAC TTG-3' (R1) covering the region from -430 to -913 of the *GDH3* promoter depicted in Fig. 1.

Polymerase chain reaction products were resolved on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Gels were scanned using the program ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

Indirect immunofluorescence and immunofluorescence microscopy

Immunofluorescence staining of yeast was carried out as previously described (Harlow and Lane, 1999). Cultures from the wild-type *Gln3-myc*¹³-tagged CLA-1 were fixed by the addition of paraformaldehyde (final 3.3%, v/v) and potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5) and incubated with shaking for 90 min at 30°C. Cells were then collected by centrifugation at room temperature, washed and suspended in sorbitol buffer (1.2 M sorbitol, 0.12 M potassium phosphate and 33 mM citric acid, pH 5.9). Cell walls were digested for 45 min at 30°C using lyticase (2 mg ml⁻¹; Sigma). Spheroplasts were spread on poly-L-lysine-coated microscope slides. Slides were blocked for 1 h using 3% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (pH 7.4). All antibody incubations were performed in this buffer; all further washes were performed in 1% Triton X-100, phosphate-buffered saline. Incubation with primary antibody 9E10 (*c-Myc*) (Santa Cruz Biotechnology) at 10 µg ml⁻¹ was performed overnight at 4°C. Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (Molecular Probes) was used as the secondary antibody at a 1:100 dilution and incubated for 45 min. To visualize nuclei, 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) was added to the mounting media at a final concentration of 50 µg ml⁻¹. Cells were visualized with a Reichert-Jung Polyvar microscope (Plan Oel Ph 100× objective), photographs were taken using a Sony Cybershot DSC-717.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN221103-2), and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (U40506Q). We acknowledge D. González-Halphen for critical review of the manuscript. We are grateful to L. Ongay, G. Codiz and M. Mora (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for DNA sequencing and synthesis of deoxyoligonucleotides, and to Silvia Cordero for skillful technical assistance. A.A. received a fellowship and a grant from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

References

Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and

- Gonzalez, A. (1997) *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 5594–5597.
- Berger, S.L., Pina, B., Silverman, N., Marcus, G.A., Agapite, J., Regier, J.L., et al. (1992) Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**: 251–265.
- 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.
- Boyes, J., and Felsenfeld, G. (1996) Tissue-specific factors additively increase the probability of the all-or-none formation of a hypersensitive site. *EMBO J* **15**: 2496–2507.
- Coffman, J.A., Rai, R., and Cooper, T.G. (1995) Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 6910–6918.
- 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.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., Gonzalez-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P., and Gonzalez, A. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* **177**: 792–798.
- 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.
- Cox, K.H., Tate, J.J., and Cooper, T.G. (2002) Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 37559–37566.
- 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.
- 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., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* **276**: 43775–43783.
- De Winde, J.H., and Grivell, L.A. (1995) Regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Intricate interplay between general and specific transcription factors in the promoter of the *QCR8* gene. *Eur J Biochem* **233**: 200–208.
- Doherty, D. (1970) L-glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol* **17**: 792–798.
- 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.
- Geng, F., and Laurent, B.C. (2004) Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucose-repressible gene. *EMBO J* **23**: 127–137.
- Gonzalez, A., Membrillo-Hernandez, J., Olivera, H., Aranda, C., Macino, G., and Ballario, P. (1992) Cloning of a yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (*GUS2*) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol Microbiol* **6**: 301–308.
- Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., et al. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**: 1640–1650.
- Guarente, L. (1995) Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem Sci* **20**: 517–521.
- Harlow, E., and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. (1995) Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583–592.
- Hinnebusch, A.G. (1986) The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *CRC Crit Rev Biochem* **21**: 277–317.
- Holzer, H., and Schneider, S. (1957) Enrichment and separation of a diphosphopyridine nucleotide specific and a triphosphopyridine nucleotide specific glutamine acid dehydrogenase from yeast. *Biochem Z* **329**: 361–369.
- Ihmels, J., Levy, R., and Barkai, N. (2004) Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **22**: 86–92.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163–168.
- Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**: 617–624.
- Kingston, R.E., and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**: 2339–2352.
- Koleske, A.J., Buratowski, S., Nonet, M., and Young, R.A. (1992) A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID. *Cell* **69**: 883–894.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., and Poyton, R.O. (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol* **201**: 1177–1195.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., III, Demarini, D.J., Shah, N.G.,

- Wach, A., Brachat, A., *et al.* (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953–961.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275.
- Minehart, P.L., and Magasanik, B. (1991) Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen 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. (1985) The *GLN1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. *Genetics* **111**: 243–258.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M., and Lusty, C.J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**: 299–310.
- Ohta, T. (1989) Role of gene duplication in evolution. *Genome* **31**: 304–310.
- Peterson, C.L., and Tamkun, J.W. (1995) The SWI–SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* **20**: 143–146.
- Piskur, J. (2001) Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet* **17**: 302–303.
- Riego, L., Avendano, A., DeLuna, A., Rodriguez, E., and Gonzalez, A. (2002) *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 79–85.
- Roberts, S.M., and Winston, F. (1997) Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* **147**: 451–465.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S.K., Wang, A., Suka, N., and Grunstein, M. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**: 437–446.
- Rodin, S.N., and Riggs, A.D. (2003) Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication. *J Mol Evol* **56**: 718–729.
- Roon, R.J., Even, H.L., and Larimore, F. (1974) Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **118**: 89–95.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor.
- Segre, D. (2004) The regulatory software of cellular metabolism. *Trends Biotechnol* **22**: 261–265.
- Sosa, E., Aranda, C., Riego, L., Valenzuela, L., DeLuna, A., Cantu, J.M., and Gonzalez, A. (2003) Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 1175–1180.
- Stanbrough, M., and Magasanik, B. (1996) Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**: 2465–2468.
- Sterner, D.E., Grant, P.A., Roberts, S.M., Duggan, L.J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L.A., *et al.* (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.
- Struhl, K., and Davis, R.W. (1981) Transcription of the his3 gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **152**: 535–552.
- 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.
- Syntichaki, P., Topalidou, I., and Thireos, G. (2000) The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling. *Nature* **404**: 414–417.
- Tempest, D.W., Meers, J.L., and Brown, C.M. (1970) Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem J* **117**: 405–407.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P., and González, A. (1998) Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180**: 3533–3540.
- Valenzuela, L., Aranda, C., and González, A. (2001) TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**: 2331–2334.
- Venditii, S., and Camilloni, G. (1994) *In vivo* analysis of chromatin following nystatin-mediated import of active enzymes into *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **242**: 100–104.
- Verdone, L., Camilloni, G., Di Mauro, E., and Caserta, M. (1996) Chromatin remodeling during *Saccharomyces cerevisiae ADH2* gene activation. *Mol Cell Biol* **16**: 1978–1988.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808.
- Wolfe, K.H., and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708–713.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panutsopolou, K., and Oliver, S.G. (2004) Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3148–3153.

VIII. REFERENCIAS

1. Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española
<http://www.rae.es/>
2. MedlinePlus: Medical Dictionary.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/mplusdictionary.html>
3. On-line Medical Dictionary
<http://carcerweb.ncl.ac.uk/omd>
4. What are yeast?
http://www.yeastgenome.org/VL-what_are_yeast.html
5. TREE OF LIFE web project.
Ascomycota por Taylor J. W., Spatara J and Berbee M.
<http://tolweb.org/tree?group=Ascomycota&contgroup=Fungi>
6. University of Leicester. [Microbiology@Leicester](#)
Saccharomyces cerevisiae
<http://www-micro.mcb.le.ac.uk/video/Scerevisiae.html>
7. An Introduccion to the Genetics and Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Fred Sherman
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/Sherman_f/yeast/Index.html
8. Microbios en línea. *Saccharomyces cerevisiae*.
Dra. Alicia González Manjarrez y Lourdes Valenzuela
Eds. Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. CIFN.
CPD-DGSCA.
<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html>
9. *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database
<http://www.yeastgenome.org/>
10. Laboratorio del Dr. Kenneth H. Wolfe.
<http://wolfe.gen.tcd.ie/>
11. Poyecto Génolevures.
Genomic Exploration of the Hemiascomycete Yeast.
Saccharomyces cerevisiae and 14 other yeast species.
<http://cbl.labri.fr/Genolevures/index.php>

12. *Ashbya gossypii* Genome Database.

<http://agd.unibas.ch/>

13. *Kluyveromyces waltii* Genome Database

<http://www.broad.mit.edu/seq/Yeast>

14. Thomas Owen-Hughes Page Group

<http://www.dundee.ac.uk/biocentre/toh/interim/welcome.shtml>

Possible mechanisms for Nucleosome mobilisation

<http://www.dundee.ac.uk/biocentre/toh/mech3a.html>

<http://www.dundee.ac.uk/biocentre/toh/mech3b.html>

Aalfs, J., Kingston, R. E. (2000) Whats does 'chromatin remodeling' mean?. *TIBS*. **25**: 548-55.

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

Ayer, D. (1999) Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NURDs. *Trends in Cell Biol.* **9**: 193-198.

Balasubramanian, R., Pray-Grant, M. G., Selleck, W., Grant, P. A., and Tan, S. (2001) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **31**: 7989-7995.

Barbaric, S., Reinke, H., and Horz, W. (2003). Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the *PHO5* promoter. *Mol Cell. Biol.* **23**: 3468–3476.

Batarrachea, F., Brom, S., Covarrubias, A. A., Osorio, A. V. y Bolivar, F. (1980) Genetic characterization of mutations affecting glutamine biosynthesis and regulation in *Escherichia coli* K12. En Mora J. y R. Palacios (eds.), *Glutamine Metabolism, Enzymology and Regulation*. Academic Press, New York, pp. 213-134.

Bauer, W. R., Hayes, J. J., White, J. H., and Wolfe, A. P. (1994) Nucleosomal structural changes due to acetylation. *J. Mol. Biol.* **236**: 685-690.

VIII. REFERENCIAS

- Beck, T. and Hall, M. (1999)** The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. **402**: 689-692.
- Bell, C. D., Soltis, D. E., Soltis, P. S. (2005)** The age of the angiosperms: a molecular time scale without clock. *Evolution Int. J. Org. Evolution*. **59** (6): 1245-1258.
- Belotserkovskaya, R., Sterner, D. E., Deng, M., Sayre, M. H., Lieberman, P. M., and Berger, S. L. (2000)** Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 634–647.
- Bernstein, B. E., Tong, J. K., and Schreider, S. L. (2000)** Genome wide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **97** (25): 13708-13713.
- Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalhos, J., Ai, W., Zeng, C., Chang, T. F. and Zheng X. F. S. (2000)** Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J. Biol. Chem.* **275** (46): 35727-35733.
- Bhaumik, S. R., and Green, M. R. (2001)** SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* **15**: 1935–1945.
- Bhaumik, S. R., Raha, T., Aiello, D. P., and Green, M. R. (2004)** In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev.* **18**: 333–343.
- Bing, G., Styles, C. A., Feng, Q. and Fink, G. R. (2000)** A *Saccharomyces cerevisiae* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **97** (22): 12158-12163.
- 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**: 4190-41293
- Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuveglise, C., Munsterkotter, M., Guldener, U, Mewes, H. W., Van Helden, J., Dujon, B. and Gaillardin, C. (2003).** Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Research*. **31** (4): 1121-1135.

- Bourgarel, D., Nguyen, C. C., Bolotin-Fukuhara, M. (1999)** HAP4, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* **31** (4): 1205-1215.
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1998)** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**: 1044-1052.
- 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**(4): 592-604.
- Britton, K. L., Baker, P. J., Engel, P. C., Rice, D. W., Stillman, T. J. (1993)** Evolution of substrate diversity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. Prospects for rational chiral synthesis. *J. Mol. Evol.* **234** (4): 938-945.
- 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.
- Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L., and Workman, J. L. (2000)** The many HATs of transcription coactivators. *TIBS.* **25**: 15-19.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. (1996)** Tetrahymena acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell.* **84** (6): 843-851.
- 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. *Gene Dev.* **13**: 3271-3279.
- Carvalho, J. and Zheng, F. S. (2003)** Domains of *GLN3* interacting with carioferines, Ure2p, and target of rapamycin protein. *J. Biol. Chem.* **278** (19): 16878-16886.

- Chen, W., Tabor, S., and Struhl, K. (1987)** Distinguishing between mechanisms of eukaryotic transcriptional activation with bacteriophage T7 RNA polymerase. *Cell*. **50** (7): 1047-1055.
- Coffman, J. A., Rai, R., Cunningham T., Svetlov, V. and Cooper, T. (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.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. y 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.
- Coissac, E., Maillier, E., and Netter, P. (1997)** A comparative study of duplications in bacteria and eukaryotes: the importance of telomeres. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 1062-1074.
- 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. (1982)** Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Strathern, J. N., E. W. Jones y J. R. Broach (eds.). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, pp. 39-99.
- Cooper, T. G. y Sumrada, R. A. (1983)** What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*?. *J. Bacteriol.* **155**, 623-627.
- Cosma, M. P., Tomoyuki, T., and Nasmyth, K. (1999)** Orderer recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle-and developmentally regulated promoter. *Cell*. **97**: 299-311.
- Cox, K. H., Tate, J. J., and Cooper, T. G. (2002)** Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during carbon starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 37559-37566.

- Crespo, J. L., Daicho, K., Ushimaru, T., Hall, M. N. (2001)** The GATA transcription factor *GLN3* and *GAT1* link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276** (37):34441-34444.
- Crespo, J. L., Helliwell, S. B., Wiederkehr, C., Demougin, P. Fowler, B., Priming, M. and Hall, M. N. (2004)** *NPR1* kinase and *RSP5-BUL1/2* ubiquitin ligase control *GLN3*-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279** (36): 37512-37517.
- Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B., Hall, M. N. (2002)** The TOR-controller transcription activators *GLN3*, *RTG1* and *RTG3* are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99** (10): 6784-6789.
- 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**:6205-6115.
- 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** (7): 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.
- Davie, J. K., Edmonson, D. G., Coco, C. B., Dent, S. Y. R. (2003)** Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J. Biol. Chem.* **278** (50): 50158-50162.
- DeLuna A., Avendaño A., Riego L. and González A. (2001)** NADP-Glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 43775-43778.
- DeRisi, J. L., Vishwanath, R. I., and Brown, P. (1997)** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278**: 680-686.

- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pohlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R. A., Flavier, A., Gaffney, T. D. and Philippsen, P. (2004)** The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*. **304**: 304-307.
- Drew, H. R., and Trevers, A. A. (1985)** DNA bending and its relation to nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* **186**: 773-790.
- Dujon, B. (1996)** The yeast genome project: what did we learn?. *Trends Genet.* **12**: 263-270.
- Durso, R. J., Fisher, A. K., Albright-Frey, T. J., and Reese, J. C. (2001)** Analysis of TAF90 mutants displaying allele-specific and broad defects in transcription. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7331–7344.
- Eisenmann, D. M., Arndt, K. M., Ricupero, S. L., Rooney, J. W., and Winston, F. (1992)** SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcribed transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **6**: 1319–1331.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B. M., Cranston, G., and Allshire, R. C. (1997)** Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell.* **91**: 1021-1032.
- Felsenfeld, G., Clark, D., and Studitsky, V. (2000)** Transcription through nucleosomes. *Biophys. Chem.* **86**: 231-237.
- Filetici, P., Ornaghi, P., Ballario, P. (2001).** The bromodomain: a chromatin browser?. *Front. Biosci.* **6**: D866-D876.
- Fleet, G. H. (2003)** Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **86**:11-22.
- Floch, 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.
- Flores-Samaniego, B., Olivera, H. and González, A. (1993)** Glutamine synthesis is regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**: 77705-7706.

- Folch-Mallol, J. F., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., and Covarrubias Robles, A. A. (2004)** La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Lat. Microbiol.* **46** (1-2): 24-46.
- 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.
- Fox, K. R. (1992)** Wrapping of genomic polydA-polydT tracts around nucleosome core. *Nucleic. Acid. Res.* **20** (6): 1235-1242.
- Friedman, R. and Hughes, A. (2001)** Gene duplication and the structure of eukaryotic genome. *Genome Res.* **11**: 373-381.
- Gancedo, J. M. (1998)** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol.* **62**: 334-361.
- Georgakopoulos, T., and Thireos, G. (1992)** Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.***11**: 4145-4152.
- Goffeau, A., Aert, R., Agostini-Carbone, M. L., Ahmed, A., Aigle, M. and et al. (1997)** The Yeast Genome Directory. *Nature. Suppl.* **378**: 1-105.
- Goffeau, A., Barrell, B. G. Bussey, H., Davis, R. W. Dujon, B., Feldman, H., Galibert, F., Hoheseisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W. Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S. G. (1996)** Life with 6000 genes. *Science.* **274**: 546-567.
- Grant, P. A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., and Workman, J. L. (1997)** Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**: 1640-1650.
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., III, and Workman, J. L. (1998)** A subset of TAF_{II}s are integral components of the SAGA complex required for nucleosomal acetylation and transcription stimulation. *Cell.* **94**: 45-53.

- Grenson, M., Dubois, E. y Piotrowska, M. (1974)** Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. Evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **128**, 73-80.
- Gu, X., Zhang, Z. and Huang, W. (2005)** Rapid evolution of expression and regulatory divergences of after yeast duplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **102** (3): 707-712.
- Guarente, L. (1995)** Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **20** (12): 517-521.
- Hall, D. B., and Struhl, K. (2002)** The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein protein cross-linking in vivo. *J. Biol. Chem.* **277**: 46043–46050.
- 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**: 14966-14870.
- He, X., Zhang, J. (2005a)** Gene complexity and gene duplicability. *Curr Biol.* **15**. (11): 1016-1021.
- He, X., Zhang, J. (2005b)**. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics.* **169**: 1157-1164.
- Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994)** Core histone hypoperacetylation co-maps with generalizad DnaseI sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**(8): 1823-1830.
- Helling, R. B. (2004)** Why does *Escherichia coli* have two primary routes for synthesis of glutamate?. *J. Bacteriol.* **176**: 4664-4668.
- Hinnebusch, A. G. (1992)** General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In the Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 2, Metabolism and Gene Expression (Jones E. W., Pringle J. R., and Broach J. R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 319-414.

VIII. REFERENCIAS

- Hinnebusch, A. G. (1997)** Translational regulation of yeast *GCN4*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21661-21664.
- Horiuchi, J., Silverman, N., Pina, B., Marcus, G. A., and Guarente, L. (1997)** *ADA1*, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than *GCN5*, *ADA2*, or *ADA3*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3220–3228.
- Hu, Y., Cooper, T. G. And Koholaw, G. B. (1995)** The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 52-57.
- Hudson, R. C. and Daniel R. M. (1993)** L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B**: 767-792.
- Hugues, A. and Friedman R. (2003)** Parallel Evolution by Gene duplication in the Genomes of the Unicellular Fungi. *Genome Research.* **13**: 794-799.
- Hummelt, G. y Mora, J. (1980)** Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2333-2340.
- Ikeda, K., et al. (1999)** Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol. Cell Biol.* **19**:855-863.
- Jacinto, E. and Hall, M. N. (2003)** Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(2): 117-126.
- Jeppesen, P., and Turner, B. M. (1993)** The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell.* **74**(2): 281-289.
- Jiang, Y. and Broach J. R. (1999)** Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulated Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* **18**: 2782-2792.
- Jin, Y. L., and Speers, R. A. (1997)** Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **31** (6-7): 421-440.
- Kaback, D. B. (1995)** Yeast genome estructure. *In the Yeast.* Vol. **6** (eds. Weals, A.E., Rose, A. H. And Harrison, J. S.) 179-222 (Academic , London).

VIII. REFERENCIAS

- Kellis, M., Birren, B. W. and Lander, E. S. (2004)** Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **428**: 617-624.
- Keogh, R., Seoighe, C. and Wolfe, K. H. (1998)** Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast*. **14**: 443-457.
- Kirschner, D. B., vom Baur, E., Thibault, C., Sanders, S. L., Gangloff, Belotserkov Y. G., Davidson, I., Weil, P. A., and Tora, L. (2002)** Distinct mutations in yeast TAF(II)25 differentially affect the composition of TFIID and SAGA complexes as well as global gene expression patterns. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 3178–3193.
- Kleff, S., Andrullis, E. D., Anderson, C. W., and Sternglanz, R. (1995)** Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase *J. Biol. Chem.* **270**: 24674-24677.
- Klein, J., Nolden, M., Sanders, S. L., Kirchner, J., Weil, P. A., and Melcher, K. (2003)** Use of a genetically introduced cross-linker to identify interaction sites of acidic activators within native transcription factor IID and SAGA. *J. Biol. Chem.* **278**: 6779-6786.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999)** Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of eukaryote chromosome. *Cell*. **98**: 285-294.
- Kozul, R., Caburet, S., Dujon, B. and Fisher, G. (2004)** Eucaryotic genome evolution trough the spontaneous duplication of large chromosomal segments. *The EMBO Journal*. **23**: 234-243.
- Kuo, M. H., Browell, J. E., Sobel, R. E., ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D. (1996)** Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*. **383**: 296-272.
- Kwast, K. E., Lai, L.C. , Menda, N., James, D. T. 3erd, Aref, S., Burke, P. V. (2002)** Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.* **184**: 250-265.

- Larschan, E., and Winston, F. (2001)** The *S. cerevisiae* SAGA complex functions *in vivo* as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev.* **15**: 1946-1956.
- Lascaris, R., Piwowarski, J. Van der Spek, H., Teixeira de Mattos, J., Grivell, L., and Blom, J. (2004)** Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of the glucose-related genes. *Microbiology.* **150**: 929-934.
- Lewin, B. (1997)** Genes VI. 6a ed. New York. Oxford, University.
- Li, W. H., Gu, Z., Wang, H., Nekrutenko, A. (2001)** Evolutionary analyses of the human genome. *Nature.* **409**: 847-849.
- Liu, Z., and Butow, R. A. (1999)** A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cel. Biol.* **19** (10): 6720-6728.
- Llorente, B., Durrens, P., Malperuy, A., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., Dujon, B., de Montigny, J., Lepingle, A., Neuveglise, C., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaia, F., Toffano-Nioche, C., Wesolowski-Louvel, M., Wincker, P., Wessenbach, J., Souciet, J. and Gaillardin, C. (2000a)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeast: 18. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **487**(1): 122-133.
- Llorente, B., Malperuy, A., Neuveglise, C., de Montigny, J., Aigle M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., Durrens, P., Gaillardin, C. Lepingle, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaia, F., Toffano-Nioche, C., Wesolowski-Louvel, M., Wincker, P., Wessenbach, J., Souciet, J. and Dujon, B., (2000b)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeast: 20. Comparative analysis of chromosome maps and synteny with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **487**(1): 101-112.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M. N. (2002)** Two TOR complexes, only

VIII. REFERENCIAS

- one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell.* **10** (3): 457-468.
- 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., and Richmond, T. J. (1998)** The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8** (2): 140-146.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. R. and Richmond, T. J. (1997)** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **289** (6648): 251-260.
- Lusser, A., Kölle, D., and Loidl, P. (2001)** Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *TRENDS Plant Sci.* **6** (2): 59-65.
- Lynch, M. and Conery, J. S. (2000)** The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* **290**: 1151-1155.
- Lynch, M. and Force, A. (2000)** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics.* **154**: 459-473.
- Magasanik, B. and Kaiser, C. A. (2002)** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **290** (1-2): 1-18.
- Mahajan, P. B. (1994)** Modulation of transcription of rRNA genes by rapamycin. *Int. J. Immunopharmacol.* **16** (9): 711-721.
- Marcus W, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J., and Guarente, L. (1994)** Functional similarity and physical association between *GCN5* and *ADA2*: putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* **13**: 4807-4815.
- Marqués, S., Florencio, F. J. y Candau, P. (1992)** Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* **206**, 69-77.
- Martin, A. M., Pouchnik, D. J., Walker, J. L., Wyrick, J. J. (2004)** Redundant roles for histone H3-N-terminal lysine residues in subtelomeric gene repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **167**: 1123-1132.
- Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch (1996)** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p

VIII. REFERENCIAS

- and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-2235.
- Mazón, M. J. and Hemmings, B. A. (1979)** Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase by proteolysis during carbon starvation. *J. Bacteriol.* (2): 686-689.
- McGhee, J. D. and Felsenfeld, G. (1980)** Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 1115-1156.
- McGovern, P., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G., Moreau, R., Nuñez, A., Butrym, E., Richards, M. Wang, C., Cheng, C., Zhao, Z. and Wang, C. (2004)** Ferment beverages of pre- and proto- historic China. *PNAS.* **101** (51): 17593-17598.
- McNabb, D. S., Xing, Y. And Guarente, L. (1995)** Cloning of yeast *HAP5*: a novel subunit of the heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**: 47-58.
- Melnick, L. and Sherman, F. (1993)** The gene cluster *ARC* and *COR* on chromosomes 5 and 10, respectively, of *Saccharomyces cerevisiae* share a common ancestry. *J. Mol. Biol.* **3**: 372-388.
- Melo-Olivera, R., Olivera, I. C. and Coruzzi, G. M. (1996)** *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 4718-4723.
- Mewes, H. W., Albermann, K., Bähr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heuman, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S. G., Pfeiffer, F and Zollner, A. (1997)** Overview of the yeast genome . *Nature.* **387**: 7-8.
- Meyer, A. (2003)** Duplication, duplication. *Nature.* **421**: 31-32.
- 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. y Magasanik, B. (1983)** Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **172**, 4927-4935.

- Moqtaderi, Z., Keaveney, and Struhl, K. (1998)** The Histone H3-like TAFs is broadly required for transcription in yeast. *Mol. Cell.* **2**: 675-682.
- Noll, M. (1974)** Internal structure of the chromatin subunit. *Nucleic. Acid. Res.* **1** (11): 1573-1578.
- Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X. J., Howard, B. H., Quin, J., and Nakatani, Y. (1998)** Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell.* **94**:35-44.
- Ohno, S. (1970)** Evolution by gene duplication (George Allen And Unwin, London).
- Omichinski, J. G., Clore, G. M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Sthal, S. J., Gronenborn, A. M. (1993)** NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science.* **261**: 438-446.
- Ornaghi, P., Ballario, P., Lena, A. M., González, A., Filetici, P. (1999).** The bromodomain of Gcn5p interacts *in vitro* with specific residues in the N-terminus of H4. *J. Mol.Biol.* **287** (1): 1-7.
- Owen-Hughes, T. (2003)** Colworth memorial lecture. Pathways for remodeling chromatin. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 893-905.
- Pennings, S., Muyldermans, S., Meersseman, G., and Wyns, L. (1989)** Formation, stability and core histone positioning of nucleosomes reassembled on bent and other nucleosome derived DNA. *J. Mol. Biol.* **207** (1): 183-192.
- Pérez-Martín, J. (1999)** Chromatin and transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:503-523.
- Peterson, C. L. (2000)** ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett.* **476**: 68-72.
- Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J., and Kingston, R. E. (1999)** Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell.* **3**: 247-253.
- Piña, B., Berger., S., Marcus, G. A., Silverman, N., Agapite, J., and Guarente, L. (1993)** ADA3: a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of ADA2. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5981-5989.

- Pinkham, J. L. and L. Guarente. (1985)** Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3410-3416.
- Piskur, J. (2001)** Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* **17**: 302-303.
- Piskur, J., Langkjaer, R. B. (2004)** Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Molecular Microbiol.* **53** (2): 381-389.
- Powers, T. and Walters, P. (1999)** Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **10** (4): 987-1000
- Rastogi, S., Liberles, D. A. (2005)** Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evolutionary Biology.* **5**: 28.
- Reitzer, L. J. y Magasanik, B. (1987)** Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology* (F. C. Nehidart y cols.), pp. 302. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Riego, L. (2002)** La regulación transcripcional de *GDH1* de *Saccharomyces cerevisiae*: una conexión entre el metabolismo de nitrógeno y el metabolismo de carbono. Tesis de Doctorado, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Riego, L., Avendaño, A., DeLuna, A., Rodríguez, E. and González, A. (2002)** *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293** (1):79-85.
- Roberts, S.M., and Winston, F. (1997).** Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics.* **147**: 451–465.
- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N., and Grunstein, M. (2002)** Microarrays deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell.* **109**: 437-446.

- Rubin, G. M. et al. (2000)** Origin of duplicated regions in the yeast genome. *TRENDS in Genetics*. **17** (6):302-303.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., Grunstein, M. (1996)** HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **93**: 14503-14508.
- Sankoff, D. (2001)** Gene and genome duplication. *Current Opinion in Genetics & Development*. **11**: 681-684.
- Schacherer, J., Tourrette, Y., Souciet, J. L., Potier, S. and Montigny, J. (2004)** Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research*. **14**: 1291-1297.
- Seoighe, C., Wolfe, K. H. (1999)** Yeast genome evolution in the post. Genome era. *Curent Opinion in Microbiology*. **2**: 548-554.
- Sharp, P. M. and Li, W. H. (1987)** The codon adaptation index: a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic. Acids. Res.* **15**: 1281-1295.
- Sidow, A. (1996)** Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**: 715-722.
- 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 transcription repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near the regulatory domain 1. *FEBS Lett.* **453**: 219-223.
- Smith, E. L. (1975)** Glutamate dehydrogenases. In *The enzymes, Vol XI* (Boyer P. D., ed). Academic Press, Inc., New York, pp.293-367.
- Smith, M. M. (1987)** Molecular evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* histone gene loci. *J. Mol. Evol.* **24**: 252-259.
- Stafford, G. A., and Morse, R. H. (2001)** GCN5 dependence of chromatin remodeling and transcriptional activation by the GAL4 and VP16 activation domains in budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21** (14): 4568-4578.
- Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., BelotserkovY. skaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1999)**

VIII. REFERENCIAS

- 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.
- Sterner, D. E., Wang, X., Bloom, M. H., and Berger, S. L. (2002)** The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *J. Biol. Chem.* **2**: 8178-8186.
- Strathern, J. N., Klar, A. J., Hicks, J. B., Abraham, J. A., Ivy, J. M., Nasmyth, K. A., and McGill, C. (1982)** Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell.* **31**: 183-192.
- Struhl, K. (1985)** Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82** (23): 8419-8423.
- Struhl, K. (1999)** Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**:1-4
- Struhl, K., and Moqtaderi, Z. (1998)** the TAFs in the HAT. *Cell.* **94** (1): 1-4.
- Sudarsanam, R., Vishwanath, R. I., Brown, P. O., Winston, F. (2000)** Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**(7): 3364-3369.
- Syntachaki, P., Topalidou, I., and Thireos, G. (2000)** The Gcn5 bromodomain coordinates nucleosome remodelling. *Nature.* **404**: 414-417.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Patlatucci, A. M., Kaufman, T. C., and Kennison, J. A. (1992)** brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell.* **68**: 561-572.
- Tempest, D. W., Meers, J. L. y Brown, C. M. (1970)** Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* **117**, 405-407.
- ter Schure, E. G., Van Riel, N. A. W. y Verrips, C. T. (2000)** The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 67-83.
- Tuncher, A., Sprote P., Gehrke, A., Brakhage, A. A. (2005)** The CCAAT-binding complex of eukaryotes: Evolution of a second NLS in the HapB subunit of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* despite functional conservation at the

- molecular level between yeast, *A. nidulans* and Human. *J. Mol. Biol.* **352** (3): 517-533.
- Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Cote, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., Workman, J. L. (1998)** Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature.* **394**: 498-502.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P. and González, A. (1998)** Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding Glutamate Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180** (14): 3533-3540
- van Urk, H., Leopold Voll, W. S., Scheffers, W. A., van Dijen, J. P. (1990)** Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree negative yeast. *Applied and Environmental Microbiology.* **56**:281-287.
- Vision, T. J., Brown, D. G. and Tanksley, S. D. (2000)** The origin of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science.* **290**: 2114-2117.
- Ward, R., Durreet, R. (2004)** Subfunctionalization: How often does it occur? How long does it take?. *Theor. Popul. Biol.* **66** (2): 93-100.
- Wasyly, K., and Chambon, P. (1979)** Transcription by eukaryotic RNA polymerases A and B of chromatin assembled *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* **98** (2): 317-327.
- Wedaman, K. P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J. III, McCaffery J. M. and Powers, T. (2003)** Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 1204-1220.
- Wiame, J. M., Grenson, M. and Arst Jr. H. N. (1985)** Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **26**, 1-88.
- Wilkinson, B. M., James, C. M. and Walmsley, R. M. (1996)** Partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae GDH3* gene results in novel starvation phenotypes. *Microbiology.* **142**, 1667-1673.
- Wilson, C. J., Chao, D. M., Imbalzano, A. N., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. and Young, R. A. (1996)** RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell.* **84**: 235-244.
- Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhart, T., Prü, B. M., Reuter, I. and Schacherer, F. (2000)** TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic. Acids. Res.* **28**: 316-319.

VIII. REFERENCIAS

- Winston, F., and Carlson, M. (1992)** Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.* **8**: 387–391
- Winston, F., and Sudarsanam, P. (1998)** The SAGA of Spt proteins and transcriptional analysis in yeast: past, present, and future. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* **LXIII**: 553-561.
- Wolfe, A. P. (1997)** Sinful repression. *Nature (News and Views).* **387**: 16-17.
- Wolfe, K. H. (2001)** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet.* **2**: 333-341.
- Wolfe, K. H. (2004)** Evolutionary Genomics: Yeast Accelerate beyond BLAST. *Current Biology.* **14**: R392-R394.
- Wolfe, K. H. and Shields, D. C. (1997)** Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* **387**: 708-713.
- Wong, S., Butler, G and Wolfe, K. H. (2002)** Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *PNAS.* **99** (14): 9272-9277.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M., Grunstein, M. (2000)** *TUP1* utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell.* **7**: 117-126.
- Wu, P. Y. J., Ruhlmann, C. Winston, F. and Schultz P. (2004)** Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol. Cell* **15**: 199-208.
- Wu, P. Y., and Winston, F. (2002)** Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5367–5379.
- Yu, Y., Eriksson, P., Bhoite, L.I., and Stillman, D. J. (2003)** Regulation of TATA-binding protein binding by the SAGA complex and the Nhp6 high-mobility group protein. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 1910-1921.
- Zheng, X. F. and Schreiber, S. L. (1997)** Target of rapamycin proteins and their kinase activities are required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 3070-3075.

IX. APÉNDICE I-PROTOSCOLOS

1. OBTENCIÓN DE DNA NO CROMATINIZADO DE

*Saccharomyces cerevisiae** Utilizando β -glucoronidasa

1. Partir de un cultivo de 300 ml a una densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0.4
2. Centrifugar 5 minutos a 3,500 rpm para obtener un botón de células. Lavar con 20 ml de H₂O bidestilada estéril y centrifugar a 3,500 rpm durante 5 minutos.
3. Resuspender las células en:
 - 9.5 ml de Sorbitol 1 M
 - 500 μ l de Tris-HCl, pH 7.5
 - 7.15 μ l de β -Mercaptoetanol
4. Adicionar 10 mg de β -Glucoronidasa por densidad óptica. La β -glucoronidasa se puede resuspender en un poco de agua y luego adicionarla.
5. Incubar 10 minutos a 30°C, las células provenientes de cultivos en glucosa, y 15 o 20 minutos, las obtenidas de cultivos con etanol como fuente de carbono.
6. Centrifugar 5 minutos a 2,000 rpm.
5. Lavar con 20 ml de Sorbitol 1 M.
6. Centrifugar 5 minutos a 2,000 rpm.
7. Resuspender en 5 ml de **BUFFER DE NISTATINA**. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Cada muestra en las que se divida el cultivo debe tener 10 D.O. y un volumen de 400 μ l.

BUFFER DE NISTATINA

Tomar del stock para 5 ml

50 mM	NaCl	1.5ml	NaCl 1M
1.5 mM	CaCl ₂	1.5ml	CaCl ₂ 50mM
20 mM	Tris pH 8.0	0.6 ml	Tris-HCl 1M
1 M	Sorbitol	5 ml	Sorbitol 2M
	100 μ g/ml Nistatina		

8. Adicionar 40 μ l de **STOP MIX**.

STOP MIX Para un volumen de 10 ml

9 ml SDS 10%

1 ml EDTA 0.5 M

9. Adicionar 3.5 μ l de **PROTEINASA K**

PROTEINASA K (Se prepara menos de un ml)

Buffer para reconstituir la Proteinasa K (Para un volumen de 200 μ l)

50 mM Tris-HCl 0.004 g de Proteinasa K

3 mM CaCl₂

Proteinasa K (20 mg/ml). No se recomienda almacenarla, por lo que se prepara en el momento.

10. Incubar 1.5 h a 56 °C.

11. Hacer 3 extracciones con 500 μ l fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Dar vortex por 1 minuto y centrifugar a 14,000 rpm durante 3 minutos.

12. Precipitar con :

80 μ l de isopropanol

50 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 5.2

El isopropanol debe adicionarse al momento de dar vortex.

13. Precipitar 15 minutos a temperatura ambiente.

14. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm. Lavar con 300 μ l de etanol al 70%. Secar a temperatura ambiente.

15. Resuspender con 100 μ l de H₂O bidestilada estéril.

16. Adicionar 3 μ l de **RNAsa A**.

17. Incubar 30 minutos a 37 °C.

18. Hacer una extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.

19. Precipitar con:

250 μ l de etanol al 100%

10 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 5.2

20. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm. Lavar con 100 μ l de etanol al 70%. Secar a

temperatura ambiente.

21. Resuspender en 50µl de H₂O bidestilada estéril.

22. Correr 5µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1% con Buffer TAE 1X, para verificar la calidad de la preparación y la cantidad de DNA.

**2a. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE CROMATINA DE
Saccharomyces cerevisiae.
DIGESTIÓN *IN VIVO* CON DNAsa I**

1. Preparar 200 o 1000 ml de cultivo, con glucosa o etanol como fuente de carbono, respectivamente, a una densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0.4. La cantidad de cultivo cambia de acuerdo con el contenido de DNA de cada cepa.
2. Centrifugar el cultivo 5 minutos a 3,000 rpm. Lavar con 20 ml de H₂O bidestilada estéril.
3. Resuspender el botón de células en 5 ml de **BUFFER I**. Resuspender primero en el sorbitol y en segundo lugar agregar los otros reactivos.

BUFFER I

5 ml	Sorbitol 1 M
200 µl	EDTA 0.5 M (25 mM)
200 µl	β-mercaptoetanol 14 M (aprox. 600 mM).

4. Incubar 5 minutos con agitación a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 5 minutos a 3,000 rpm. Quitar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en los 5 ml de **BUFFER II**
Resuspender primero en el sorbitol, agregar después los otros reactivos.

BUFFER II

5 ml	Sorbitol 1 M
2 µl	β-mercaptoetanol (14 M)

Resuspender 60 mg de β-glucoronidasa en 1 ml de Sorbitol 1 M.

7. Incubar a 30 °C con agitación suave. A los 10 minutos revisar si aparecen las células agregadas, lo cual indica que la digestión de la pared celular progresa. Las células cultivadas en glucosa se incuban por 10 minutos, las células que provienen de cultivos en etanol 15 o 20 minutos, .
8. Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 minutos.

9. Lavar dos veces con sorbitol 1 M. El primer lavado con 20 ml y el segundo con 5ml. Resuspender utilizando la micropipeta con una punta de plástico cortada para hacerla más ancha.

10. Resuspender la pastilla en 5 ml de **BUFFER DE NISTATINA**. Este buffer no se almacena. La nistatina tiende a precipitarse pues nunca se disuelve completamente.

BUFFER DE NISTATINA		Tomar del stock para 5 ml	
50 mM	NaCl	0.25 ml	NaCl 1M
1.5 mM	CaCl ₂	0.25 ml	CaCl ₂ 50mM
20 mM	Tris pH 8.0	0.1 ml	Tris-HCl 1M
1 M	Sorbitol	2.5 ml	Sorbitol 2M
100 µg/ml	Nistatina	1.9 ml	H ₂ O

Incubar en este buffer 5 minutos a temperatura ambiente.

11. De la suspensión de esferoplastos tomar alícuotas de 500 µl en tubos eppendorf de 2 ml.

12. Adicionar **ADNasa I** libre de ARNasa

ADNasa I de ROCHE

10,000 U/ml Concentración: 10 U/µl

13. Incubar 5 minutos a 0 °C. Resuspender suavemente.

14. Adicionar 40 µl de **STOP MIX** (10% SDS + 50 mM EDTA). Mezclar bien.

STOP MIX (Para preparar 10 ml)

9 ml SDS 10%

1 ml EDTA 0.5 M

15. Adicionar 10 µl de la solución de **PROTEINASA K** (20 mg/ml). No se recomienda almacenarla.

PROTEINASA K

Para 200 µl de solución, pesar 0.004 g.

BUFFER PARA RECONTITUIR LA PROTEINASA K

		Tomar del stock para 5 ml	
50 mM	Tris-HCl	0.25 ml	Tris-HCl
3 mM	CaCl ₂	0.3 ml	CaCl ₂

4.5 ml H₂O

16. Incubar 1.5 h a 56 °C.
17. Extraer 3 veces con 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. En cada extracción dar vortex 30 segundos y centrifugar durante 3 minutos a 14,000 rpm.
18. Precipitar con:
 - 50 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2
 - 1 ml aprox. de etanol al 100%.
19. Dejar a -20 °C 2 h y 20 minutos a -80 °C. O toda la noche a -20 °C.
20. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm. En frío.
21. Resuspender en 200 µl de H₂O y agregar 20 µl de ARNasa A. Incubar 1 h a 37 °C.
22. Hacer una extracción con 200 µl de fenol-cloroformo y una extracción con 200 µl de cloroformo.
23. Precipitar con 20 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2 y 500 µl de etanol al 100%.
24. Dejar toda la noche a -20 °C.
25. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm.
26. Lavar el botón con 300 µl de etanol al 70%. Dejar secar.
27. Resuspender en 50 µl de H₂O bidestilada estéril, o TE 0.1X.
28. Correr 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1.5% para verificar la calidad del DNA y la eficiencia de la ADNasa I.
29. Cuantificar el DNA analizando las muestras a 260 y 280 nm con lámpara de deuterio y celdas de cuarzo.
30. Una vez cuantificado el DNA digerir toda la noche con 100 U de la enzima de restricción pertinente.
31. Precipitar con 20 µl de Acetato de Sodio 3 M pH 5.2 y 500 µl de etanol al 100%, durante 30 minutos a -80 °C, 1 h a -20 °C o toda la noche a -20 °C.
32. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm. En frío. Lavar el botón con 200 µl de etanol al 70%. Dejar secar.
33. Resuspender cada muestra en 22 µl de H₂O bidestilada estéril. Usar 1 o 2 µl para la segunda cuantificación en el espectro a 260, 280 nm.

34. Cargar en un gel de agarosa al 1% cantidades equitativas de cada muestra. Utilizar estándares de peso molecular radiactivamente marcados y sin marcar como referentes de corrida.
35. Correr a 70 V durante 16 h.
36. Fotografiar las muestras corridas.
37. Transferir a la membrana de nylon Hybond N+ por el método alcalino durante 6 h. Lavar la membrana con SSC 1X por unos segundos. Dejar secar.
38. Guardar en la una bolsa sellada. Almacenar a -20 °C