



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Participación de *PUT3* y *LEU3* en la  
regulación transcripcional de los  
parálogos *BAT1* y *BAT2* de la levadura  
*Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A:  
JUAN CARLOS MARTÍNEZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. James Enrique González Flores



2014



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.

## Hoja de datos de jurado

### 1. Datos del alumno

Martínez  
Morales  
Juan Carlos  
50447839  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306284261

### 2. Datos del tutor

M. en C.  
James Enrique  
González  
Flores

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Laura  
Kawasaki  
Watanabe

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Alfonso José  
Vilchis  
Peluyera

### 7. Datos del trabajo escrito

Participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional  
de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de la levadura  
*Saccharomyces cerevisiae*  
62 pp.  
2014

---

---

# Dedicatoria

---

---

A mis padres Hilaria Morales y Heladio Martínez por educarme y estar al pendiente de cualquier cosa día a día.

A mis hermanos Maribel, Gregorio y José por compartir grandes momentos en esta vida.

A mis sobrinas Naomi e Isis por los momentos de diversión.

A mi novia Edith por hacer que conociera el amor, por ser mi amiga y estar siempre a mi lado.

A todos, gracias.

---

---

# Reconocimientos

---

---

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del M. en C. James Enrique González Flores en el laboratorio 301 Oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural a cargo de la Dra. Alicia González Manjarrez, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Durante el desarrollo del trabajo experimental se reconoce la asesoría técnica de la Q. F. B. Cristina Aranda Fraustro.

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

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) a través del donativo 152446 y el donativo del International Center For Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) a través del donativo CRP/MEX10-03, además fui beneficiado con una beca otorgada por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la referencia IN204412.

El jurado de examen profesional de licenciatura estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Víctor Manuel Valdés López

Vocal: Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Secretario: M. en C. James Enrique González Flores

Suplente: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Suplente: M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

---

---

# Agradecimientos

---

---

A mi madre Hilaria Morales y a mis hermanos José Alberto y Maribel que me acompañaron a lo largo de la carrera y me apoyaron de manera incondicional. A mi padre Heladio Martínez y a mi hermano Gregorio que a pesar de la distancia, nunca faltaron palabras de aliento en momentos difíciles durante la carrera. A mi novia quien me brinda palabras de ánimo, por su inmenso amor y por estar ahí en el momento y tiempos pertinentes.

Agradezco a la Dra. Alicia González Manjarrez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y la confianza para poder desenvolverme en él, siendo una guía fundamental para la sistematización y aplicación del conocimiento. Su desempeño como tutora fue inigualable, gracias.

Agradezco a James por tener el tiempo y la paciencia de instruirme durante cada experimento y por apoyarme en cada momento durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a Cristi por su tiempo para ayudarme en cualquier duda referente al protocolo experimental, por las conversaciones de cada día.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio 301-Oriente. A Alan que me acompañó a lo largo de toda la carrera y por todos los consejos que me brindó. A Dariel, Eduardo (Lalo) y José Carlos (Charly) con quienes pasé horas de diversión y por todos los consejos que me ofrecieron. A Geovani por las pláticas, sin saber que siempre fueron muy emotivas para mí. A Mariana, Susana, Citlati, Ximena, Eréndira, Mijail, Uriel y Joao por las horas de diversión y compañía que me brindaron. A Maritrini por sus consejos y por las horas de pláticas que tuvimos.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio del Taller de Animales I. A Alicia y Rafael por sus consejos, las pláticas de cada día, por su tiempo, enseñanzas y pasión por los artrópodos. A Mauricio, Julio, Aurora, Benjamín y Carlos por los

momentos de diversión en el laboratorio. Agradezco a mis queridos amigos de la carrera que me apoyaron y me permitieron formar parte de sus vidas. Por los momentos que convivimos dentro y fuera del salón de clases, por la discusión en dudas, por contagiarme de su amor por la biología y por su agradable amistad. Alan, Miguel, Julio (Lucyo), Sergio, Tadeo y Jenny, muchas gracias.

Agradezco a los miembros de mi jurado de examen profesional. Al Dr. Víctor, Dra. Claudia, Dra. Laura y M. en C. Alfonso por las sugerencias y observaciones acertadas en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a Rocío (Chio) por la ayuda técnica y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis. Agradezco a Alejandra (Ale) por las conversaciones de cada día, gracias.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Ciencias.

---

---

# Índice general

---

---

<b>Reconocimientos</b> .....	II
<b>Agradecimientos</b> .....	III
<b>Resumen</b> .....	VII
<b>Índice de figuras</b> .....	VIII
<b>Índice de tablas</b> .....	IX
<b>Abreviaturas</b> .....	X
<b>1. Introducción</b>	
1.1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.....	2
1.2. La duplicación génica.....	2
1.3. El 30% del genoma de <i>S. cerevisiae</i> está constituido por genes duplicados.....	4
1.4. Conservación de genes duplicados.....	5
1.5. Divergencia funcional de genes a través de la expresión.....	8
1.6. Metabolismo de nitrógeno en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	10
1.7. Los genes parálogos <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
1.8. Regulación de la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> .....	14
1.9. Los factores transcripcionales Leu3 y Put3 participan en el metabolismo de aminoácidos.....	18
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	20
<b>3. Objetivos</b>	
3.1. Objetivo general.....	23
3.2. Objetivos particulares.....	23
<b>4. Metodología</b>	
4.1. Construcción de mutantes.....	25

4.2. Obtención de DNA genómico. . . . .	27
4.3. Confirmación de mutantes. . . . .	27
4.4. Condiciones de crecimiento y caracterización fenotípica de las mutantes. . . . .	30
4.5. Extracción y electroforesis de RNA total. . . . .	31
4.6. Transferencia por capilaridad. . . . .	32
4.7. Síntesis y verificación de sondas radiactivas. . . . .	32
4.8. Hibridación de la sonda radiactiva. . . . .	33
4.9. Obtención y análisis de datos. . . . .	33
 <b>5. Resultados y Discusión</b>	
5.1. Confirmación de mutantes. . . . .	34
5.2. Caracterización fenotípica de las mutantes sencillas <i>put3Δ</i> , <i>leu3Δ</i> y la doble <i>put3Δleu3Δ</i> . . . . .	36
5.3 La expresión de <i>BAT2</i> depende de la calidad de la fuente de nitrógeno. . . . .	39
5.4. <i>PUT3</i> y <i>LEU3</i> regulan la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de manera antagónica. . . . .	41
6. Conclusiones. . . . .	47
6.1. Perspectivas. . . . .	49
 <b>7. Apéndice</b>	
7.1. Genotipo de las construcciones, plásmidos y oligonucleótidos utilizados. . . . .	51
7.2. Medios de cultivo y soluciones utilizadas. . . . .	53
 <b>Referencias.</b> . . . . .	 56

---

---

# Resumen

---

---

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* codifican para las aminotransferasas de cadena ramificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estas aminotransferasas catalizan el primer paso de la biosíntesis y el último del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), esto mediante la transferencia del grupo amino entre los aminoácidos de valina, isoleucina, leucina, y el  $\alpha$ -ceto ácido. La regulación de *BAT1* y *BAT2* no ha sido muy bien estudiada. En la actualidad se ha propuesto que *BAT1* y *BAT2* tienen una expresión diferencial en diferentes fuentes de nitrógeno. La región regulatoria de ambos genes contiene sitios de unión a los factores transcripcionales Put3 y Leu3. En este trabajo nos propusimos determinar la participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*. Nuestros datos sugieren; i) la expresión de *BAT1* en fuentes de nitrógeno primarias y secundarias depende positivamente de *LEU3*, ii) la expresión de *BAT1* se reprime en presencia de los tres aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina), *BAT1* se desreprime en un fondo *put3* $\Delta$ , iii) el perfil de expresión de *BAT1* corresponde al de un gen biosintético, iv) la expresión de *BAT2* depende de la fuente de nitrógeno: en fuentes secundarias se induce y en fuentes primarias se reprime, v) la inducción en presencia de los tres aminoácidos (valina, leucina, isoleucina) depende positivamente de *PUT3* y *LEU3*, mientras que la represión en glutamina es aliviada en un fondo *leu3* $\Delta$ , vi) la expresión de *BAT2* alcanza su nivel más alto en presencia de los tres aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina), vii) el perfil de expresión de *BAT2* corresponde al de un gen catabólico, viii) *BAT1* y *BAT2* han diversificado su expresión mediante la regulación positiva y/o negativa de *PUT3* y *LEU3*.

---

---

# Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Filogenia de la familia Saccharomycetaceae. ....	3
<b>Figura 2.</b> Modelo de la duplicación del genoma completo seguido de una pérdida masiva de genes .....	4
<b>Figura 3.</b> Posible destino evolutivo de las duplicaciones de genes individuales. ....	7
<b>Figura 4.</b> Reordenamiento de los elementos <i>cis</i> de un gen. ....	9
<b>Figura 5.</b> Distintos arreglos del promotor en la levadura. ....	10
<b>Figura 6.</b> Metabolismo central de nitrógeno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	11
<b>Figura 7.</b> Represión catabólica nitrogenada (NCR) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ...	12
<b>Figura 8.</b> Ruta de biosíntesis de BCAAs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	14
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de la región 5' UTR de <i>BAT1</i> y sus ortólogas. ....	16
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de la región 5' UTR de <i>BAT2</i> y sus ortólogas. ....	17
<b>Figura 11.</b> Leu3 regula el metabolismo de la leucina. ....	18
<b>Figura 12.</b> Put3 regula el catabolismo de la prolina. ....	19
<b>Figura 13.</b> Transformación de levadura por acetato de litio. ....	26
<b>Figura 14.</b> Esquema de la caracterización fenotípica. ....	29
<b>Figura 15.</b> Confirmación de las mutantes sencillas <i>put3Δ</i> , <i>leu3Δ</i> y la doble <i>put3Δleu3Δ</i> . ....	35
<b>Figura 16.</b> Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas <i>put3Δ</i> , <i>leu3Δ</i> y <i>put3Δleu3Δ</i> . ....	39
<b>Figura 17.</b> Perfil de expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> en glutamina y GABA como fuentes de nitrógeno. ....	40
<b>Figura 18.</b> La expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> está regulada de manera antagónica por Put3 y Leu3. ....	43
<b>Figura 19.</b> Modelo de regulación de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> por Put3 y Leu3. ....	46

---

---

# Índice de tablas

---

---

<b>Tabla I.</b> Componentes para una PCR de confirmación. . . . .	27
<b>Tabla II.</b> Programa de PCR para confirmar las mutantes. . . . .	28
<b>Tabla III.</b> Velocidad específica de crecimiento de las mutantes sencilla <i>put3Δ</i> , <i>leu3Δ</i> y <i>put3Δleu3Δ</i> . . . . .	36

## Apéndice

<b>Tabla I.</b> Construcciones utilizadas en este trabajo. . . . .	51
<b>Tabla II.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo. . . . .	51
<b>Tabla III.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. . . . .	52

---

---

# Abreviaturas

---

---

$\alpha$ -CIC	$\alpha$ -cetoisocaproato.
$\alpha$ -CMV	$\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato.
$\alpha$ -IPM	$\alpha$ -isopropilmalato.
$\alpha$ -KIV	$\alpha$ -cetoisovalerato.
aa	aminoácidos.
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada (Branched Chain Aminoacids).
BCAT	Aminotransferasas de cadena ramificada (Branched Chain Aminotransferase).
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (Chromatin Immunoprecipitation).
ChIP-Seq	Secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing).
DDC	Modelo de duplicación, degeneración y complementación (Duplication, Degeneration Complementation).
DO	Densidad óptica.
EAC	Modelo de escape del conflicto adaptativo (Escape from Adaptive Conflict).
FT	Factores de transcripción.
G418	Geneticina.
GABA	Ácido gamma aminobutírico.
I	Isoleucina.
kb	Kilobases.
L	Leucina.
NCR	Represión catabólica nitrogenada (Nitrogen Catabolite Repression).

NAT	Nourseotricina.
ORF	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame).
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
PLP	Piridoxal fosfato (Pyridoxal phosphate).
Q	Glutamina.
qChIP	Inmunoprecipitación de cromatina cuantitativa (Quantitative Chromatin Immunoprecipitation).
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero.
RNA-Seq	Secuencia total de RNA (RNA Sequencing).
rpm	Revoluciones por minuto.
UAS	Secuencias de activación río arriba (Upstream Activation Sequences).
URS	Secuencias de represión río arriba (Upstream Repression Sequences).
V	Valina.
VIL	Valina, isoleucina y leucina.
WGD	Duplicación de todo el genoma (Whole Genome Duplication).
YPD	Medio rico para levadura compuesto por extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa (Yeast extract-Peptone-Dextrose).



---

---

# Introducción

---

---

## **1.1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio**

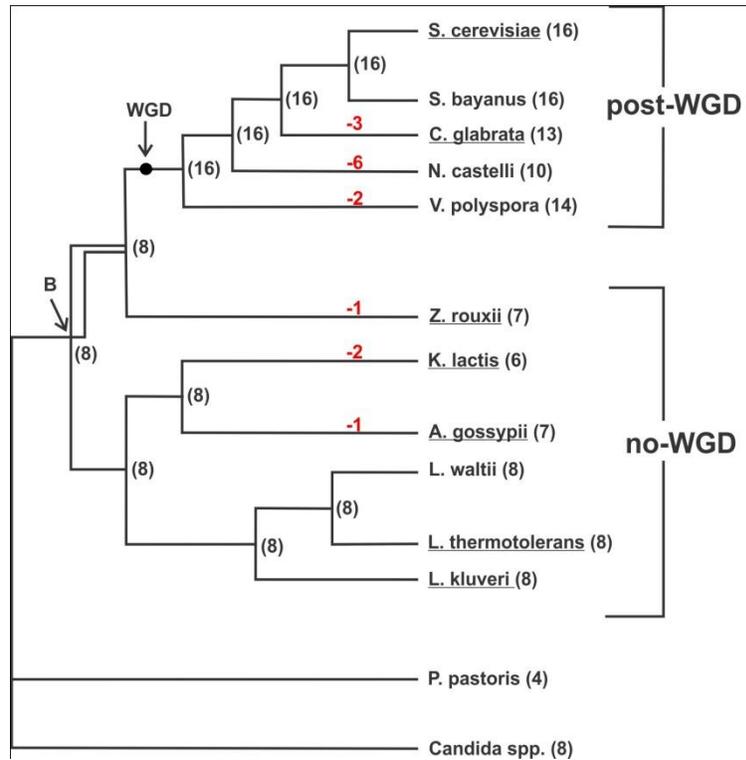
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en un modelo de sistema versátil y robusto en la genética de la célula eucariota. Las levaduras pertenecen al reino de los hongos (Phylum ascomycota). Algunas ventajas que permiten usar a la levadura para estudios biológicos son las siguientes: es un organismo unicelular no patógeno, el tiempo generacional es muy corto (aproximadamente 90 minutos), facilidad de réplica en placas permitiendo aislamiento de mutantes, secuenciación de todo su genoma (Dujon, 1996), facilitando su cultivo y manipulación en el laboratorio, etc. A diferencia de la mayoría de los otros microorganismos, la levadura *S. cerevisiae* presenta una fase haploide y una diploide. Por tanto, las mutaciones recesivas pueden ser convenientemente aisladas (Sherman F, 1998). Además el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante ha permitido que la levadura sea un modelo para la clonación de genes y el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética (Mell y Burgess, 2002).

## **1.2. La duplicación génica**

La duplicación génica ha sido considerada como una de las principales fuentes en la creación de nuevos genes. La redundancia génica es producida por la duplicación de genes, la cual puede ocurrir en grandes segmentos de cromosoma (duplicación segmental), en un cromosoma completo (aneuploidía) y por o en todo el genoma (WGD, por sus siglas en inglés) (Ohno, 1970). La duplicación de genes es muy importante porque provee genes parálogos que pueden adquirir nuevas funciones o especializarlas con el paso del tiempo (Paul *et al.*, 2006).

La duplicación de un gen o grupo de genes puede ocurrir por diferentes mecanismos moleculares que incluyen la repetición en tándem, la conversión génica, el deslizamiento de la DNA polimerasa durante los procesos de recombinación y replicación, el entrecruzamiento no equivalente, las retrotransposiciones o la duplicación cromosómica (Zhang, 2003). Por otro lado, la duplicación del genoma completo puede ocurrir mediante una meiosis aberrante que genera gametos diploides, mismos que al fusionarse resultan en una progenie autopoliplóide o alopoliplóide.

Hasta ahora se han secuenciado genomas de muchas especies de la familia Saccharomycetaceae. Estas múltiples secuencias de genomas representan linajes que divergieron antes y después de WGD que ocurrió hace aproximadamente cien millones de años (figura 1). Estas especies son conocidas como no-WGD y post-WGD, respectivamente (Dujon *et al.*, 2004).



**Figura 1. Filogenia de la familia Saccharomycetaceae.** Entre paréntesis se muestra el número de cromosomas de las especies existentes y los números inferidos en los nodos del árbol. Los números negativos en rojo muestran reducciones en el número de cromosomas. El punto negro indica el evento de la WGD. El nodo 'B' es el antepasado en común más antiguo de todas las especies sin la duplicación WGD y post-WGD. Las especies cuyos nombres están subrayados son aquellas cuyos genomas están secuenciados (imagen modificada de Gordon *et al.*, 2011).

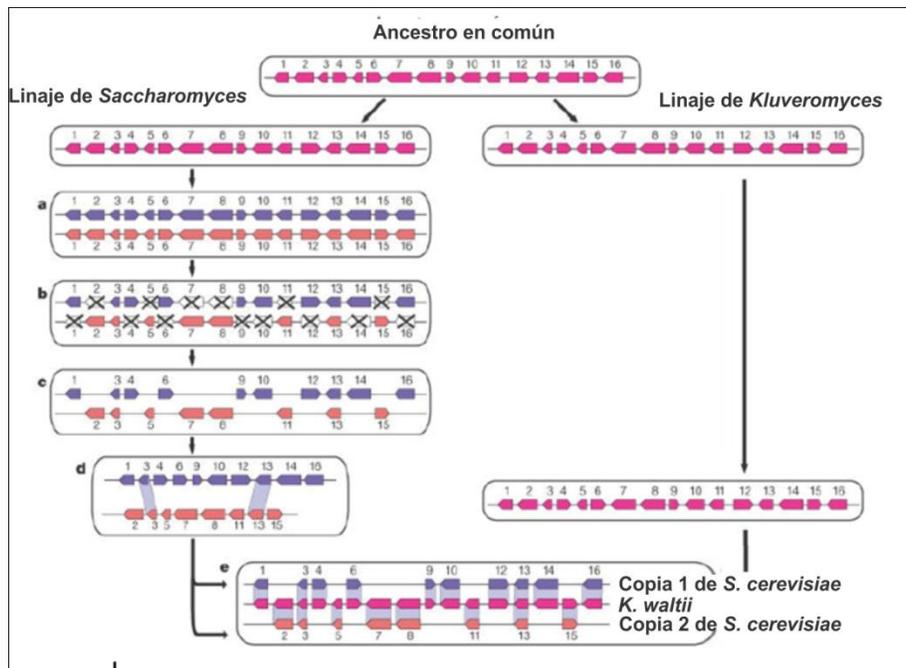
El orden de los genes y la estructura del genoma de las especies ancestrales que existieron inmediatamente antes de la WGD, contienen aproximadamente 4700 genes distribuidos en ocho cromosomas. El evento WGD produjo 16 cromosomas; sin embargo, muchas de las especies post-WGD no tienen exactamente 16 cromosomas, por ejemplo *C. glabrata* tiene sólo 13. De manera similar, algunas de las especies sin la WGD tienen menos de 8 cromosomas, tales como *Kluyveromyces lactis* con 6 cromosomas. Los cambios en el número de cromosomas se deben a diversos tipos de

mutaciones cromosómicas como deleciones, fusiones, inserciones, etc. (Gordon *et al.*, 2011).

### 1.3. El 30% del genoma de *S. cerevisiae* está constituido por genes duplicados

*S. cerevisiae* tiene un genoma de 12052 kb distribuidos en 16 cromosomas con un tamaño que oscila desde 200 - 2200 kb. A diferencia de otros organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto. El 72% de su genoma corresponde a marcos abiertos de lectura (ORF's, por sus siglas en inglés) y sólo un 3.8% de los ORF's contiene intrones (Sherman F, 1998).

El modelo de la duplicación del genoma completo propone que los linajes que dieron origen a *S. cerevisiae* y *K. waltii* divergieron a partir de un ancestro en común posterior a la separación de linajes, el ancestro de *Saccharomyces* experimentó una duplicación de genoma completo seguida de una pérdida masiva de algunos genes (figura 2).



**Figura 2. Modelo de la duplicación del genoma completo seguido de una pérdida masiva de genes.** Los linajes que dieron origen a los ancestros de *S. cerevisiae* y *K. waltii* divergieron a partir de un ancestro en común. Posterior a la separación de linajes, *S. cerevisiae* experimentó una duplicación genómica (a), seguida de una pérdida masiva de genes (b). Los cromosomas generados a partir de la duplicación retuvieron algunos genes en copia doble (c). *K. waltii* no experimentó una duplicación del genoma, como se observa en la figura, los genes presentes en un solo cromosoma en esta levadura se redistribuyeron en dos cromosomas en *S. cerevisiae* (d y e) (imagen tomada de Kellis *et al.*, 2004).

La secuencia del genoma de *S. cerevisiae* muestra evidencias del evento de WGD (Paul *et al.*, 2006). Otros estudios bioinformáticos han permitido la identificación de 52 bloques duplicados en el genoma de *S. cerevisiae* revelando la existencia de 500 pares de genes duplicados que representan el 30% de su genoma (Kellis *et al.*, 2004; Seoighe y Wolfe 1999). Estos análisis permitieron identificar que la mayoría de los bloques duplicados tienen la misma orientación con respecto al centrómero (sintenia) y el orden de los genes en las especies emparentadas de *S. cerevisiae* que no experimentaron la WGD como: *K. lactis*, *K. waltii* y *Ashbya gossypii* (Seoighe *et al.*, 1998).

#### **1.4. Conservación de genes duplicados**

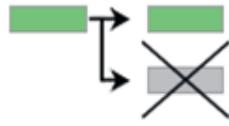
Los genes que se originan de un evento de duplicación están expuestos a diferentes destinos. En algunos casos una de las copias de los genes es rápidamente perdida por deleciones a través de mutaciones (pérdida de función) (figura 3a). En otros casos, ambos duplicados pueden conservarse a pesar de su redundancia inicial y llegar a fijarse en el genoma. La retención de ambos duplicados implica que confieran una ventaja de tal manera que la eliminación de una de las copias puede causar una reducción en el *fitness* (capacidad que tiene una clase de organismos con respecto a otras de perpetuarse en la siguiente generación) (Tirosh y Barkai, 2007).

La ventaja de la retención de genes duplicados es difícil de corroborar, se han propuesto algunos modelos (Prince y Pickett, 2002). Primero, los genes duplicados pueden ser retenidos debido a que fueron seleccionados por robustez mediante redundancia génica, la selección por una alta dosis de proteína puede favorecer la retención de ambas copias del gen (figura 3b) (Sugino e Innan, 2006). Segundo, la neofuncionalización en donde uno de los genes duplicados puede retener la función ancestral, mientras que el otro evoluciona para desarrollar una nueva función. La fijación del gen duplicado puede ser por selección direccional o por deriva génica (figura 3c) (Conant y Wolfe, 2008). Según Piskur y colaboradores un ejemplo de neofuncionalización se puede encontrar durante la fermentación (aerobia o anaerobia) donde la levadura *S. cerevisiae* recicla NADH en la conversión de acetaldehído-etanol.

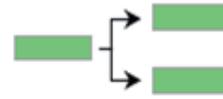
Si hay condiciones aerobias, el etanol acumulado es convertido a acetaldehído nuevamente. Esta conversión es llevada a cabo por la alcohol deshidrogenasa (Adh), que puede llevar a cabo la reacción de manera reversible, aunque con diferentes eficiencias catalíticas. En *S. cerevisiae*, la actividad citoplasmática Adh está codificada por dos genes que surgieron por un evento de duplicación génica, *ADH1* se expresa constitutivamente y produce etanol a partir de acetaldehído, mientras que *ADH2* se expresa sólo cuando la concentración de glucosa disminuye y produce acetaldehído a partir de etanol. La actividad de *ADH2* se considera como un ejemplo de neofuncionalización (Piskur *et al.*, 2006).

Tercero, la subfuncionalización en donde cada uno de los duplicados puede especializarse en una de las funciones ancestrales, la función ancestral requiere la actividad de ambos genes. Existen dos modelos para explicar este proceso: 1) Duplicación, Degeneración, Complementación (DDC) donde el gen bifuncional se duplica, posteriormente ocurren mutaciones en ambas copias del gen, que van en detrimento de una de las funciones. Cada una de estas mutaciones es neutral, no deletérea, ya que la función se sigue realizando por la otra copia del gen. 2) Escape del Conflicto Adaptativo (EAC), aquí la fijación del gen duplicado depende de mutaciones adaptativas, no de mutaciones neutrales como en el DDC. EAC ocurre cuando una mutación en una de las copias optimiza una función, pero en detrimento de la otra. De este modo cada una de las copias puede especializarse en una de las funciones ancestrales (Conant y Wolfe, 2008). Además puede que los duplicados conserven la función ancestral, pero que su expresión dependa de una condición fisiológica en particular, es decir, especialización (figura 3c) (Tirosh y Barkai, 2007).

a) Pérdida de genes: no funcionalización

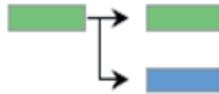


b) No divergencia funcional: mayor robustez genética

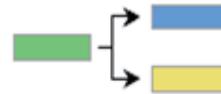


c) Divergencia funcional

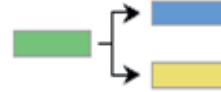
Neofuncionalización



Subfuncionalización



Especialización



**Figura 3. Posible destino evolutivo de las duplicaciones de genes individuales.** La duplicación de genes individuales generalmente resulta en que una de las copias del gen es perdida (pseudogenización) (a). Los genes duplicados pueden ser retenidos debido a que fueron seleccionados por redundancia génica (b). En casos raros, la copia funcional del gen duplicado y el gen ancestral divergen en la función; neofuncionalización significa que uno de los dos genes conserva la función original, mientras que el otro se desarrolla en una nueva función, a menudo beneficiosa. Subfuncionalización implica que los genes duplicados cumplen funciones complementarias ya presentes en el gen ancestral (c) (imagen modificada de Conrad y Stelbrink 2007).

De acuerdo con Colón y colaboradores, un ejemplo de subfuncionalización se encuentra en *Kluyveromyces lactis* y *S. cerevisiae*. El linaje que dio lugar a *K. lactis* divergió antes del evento WGD. En *K. lactis* el gen *KIBAT1* es una enzima bifuncional que participa en la biosíntesis y catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs, por sus siglas en inglés). El gen *KIBAT1* constituye el único ortólogo de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*, estos parálogos intervienen en el último paso en la biosíntesis y el primer paso en el catabolismo de BCAAs. *BAT1* es expresado en condiciones biosintéticas, mientras que *BAT2* en condiciones catabólicas (Colón *et al.*, 2011).

Por último, un ejemplo de especialización se puede encontrar en *S. cerevisiae* donde dos glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP<sup>+</sup> (GDHs-NADP<sup>+</sup>) codificadas por *GDH1* y *GDH3*, catalizan la síntesis de glutamato tomando como sustrato amonio y 2-oxoglutarato. La expresión de *GDH3* se induce en etanol y se reprime en glucosa como fuente de carbono, mientras que *GDH1* se induce en ambas fuentes de carbono (DeLuna *et al.*, 2001).

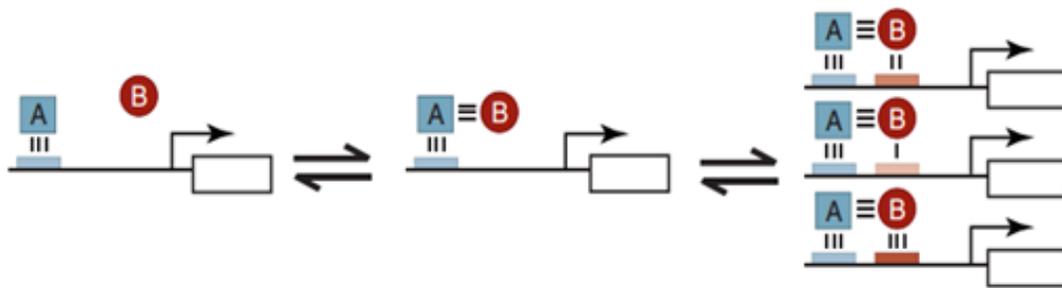
## 1.5. Divergencia funcional de genes a través de la expresión

La divergencia de los elementos regulatorios que controlan la expresión génica juega un papel importante en la divergencia de la expresión (Thompson y Regev, 2009). La expresión de genes es regulada de varias maneras; iniciación y elongación de la transcripción, procesamiento del RNA mensajero, traducción y transporte de las proteínas. Sin embargo se cree que la regulación ocurre a nivel del inicio de la transcripción. Los genes transcritos contienen dos tipos de elementos *cis* que actúan en la regulación transcripcional: (a) promotor, compuesto por un núcleo regulatorio mínimo y elementos regulatorios próximos, y (b) elementos regulatorios distantes como enhancers y silenciadores (Glenn *et al.*, 2006). Estos elementos *cis* contienen sitios de reconocimiento para factores de transcripción que inducen o reprimen la expresión de genes (Jacob, M. y Monod, J. 1961).

La regulación de la transcripción génica comienza con secuencias únicas de reconocimiento (elementos *cis*) por los factores transcripcionales (FT) que se unen río arriba a las secuencias de activación (UAS, por sus siglas en inglés). Cuando el FT (elemento *trans*), se une a su sitio (*cis*) en el promotor, éste es capaz de reclutar la maquinaria general de la transcripción al sitio de inicio de la transcripción. Por el contrario, cuando los factores transcripcionales se unen río arriba de las secuencias represoras (URS, por sus siglas en inglés), se recluta la maquinaria que reprime la expresión genética (Hahn y Young, 2011).

Numerosos experimentos han demostrado que los genes divergen en su expresión rápidamente después de una duplicación. Se ha demostrado que ciertas propiedades de los elementos *cis* son importantes en la divergencia de la expresión; por

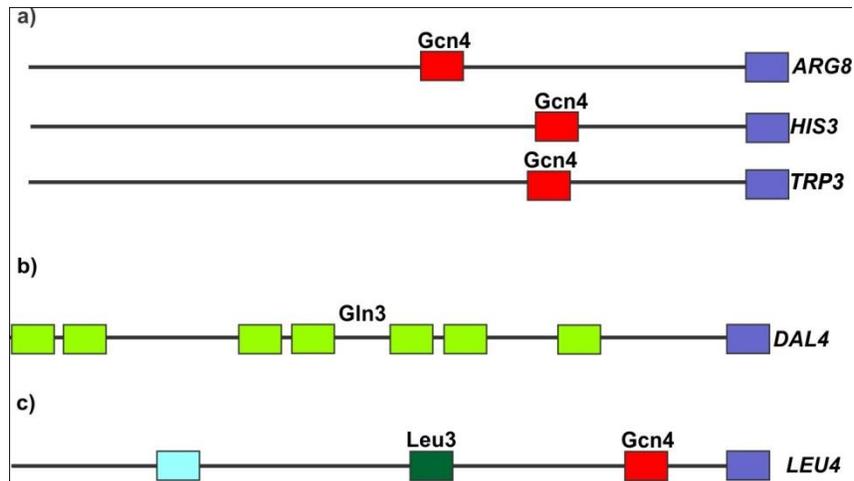
ejemplo, su tamaño (cortos, generalmente de 5 a 10 nucleótidos) y el ser degenerados (secuencias consenso similares confieren un sitio equivalente de unión para FT) (Tuch *et al.*, 2008). Las mutaciones en los elementos *cis* y *trans* pueden contribuir en la divergencia de la expresión. Los cambios en los elementos *cis* pueden afectar la expresión génica, mediante la alteración de los sitios de unión a FTs en la región promotora, el cambio de organización de la cromatina o afectar la estabilidad del RNA mensajero (RNAm) (Thompson y Regev, 2009), o indirectamente, mediante la modificación de la concentración del producto génico, cambios en la interacción con otros cofactores y/o proteínas (figura 4).



**Figura 4. Reordenamiento de los elementos *cis* de un gen.** Se ha propuesto que el reordenamiento de un elemento *cis* ocurre por la pérdida o ganancia de un factor transcripcional. Las mutaciones en los elementos *cis* y *trans* pueden contribuir en la divergencia de la expresión. Los cambios en los elementos *cis* pueden afectar la expresión génica, mediante la alteración de los sitios de unión a factores de transcripción en la región promotora. Los factores transcripcionales se representan por A y B. La interacción entre A y B favorece mutaciones en los elementos *cis* (imagen modificada de Tuch *et al.*, 2008).

El arreglo específico de los elementos *cis* en el promotor de levadura puede sugerirnos pistas sobre los mecanismos de regulación de un gen (figura 5). Por ejemplo, la presencia de algún elemento *cis* en la región regulatoria de un conjunto de genes indica que posiblemente estos genes tienen una función biológica en común. Otra posibilidad es la repetición de un elemento *cis* varias veces que permite la unión estable al FT y generar una respuesta transcripcional gradual dependiendo del número de FTs. Sin embargo, las regiones regulatorias también pueden contener varios elementos *cis* que reconocen múltiples FTs. Esta disposición indica que el promotor del gen está sujeto a

una combinación de FTs que permiten distintas respuestas a diferentes condiciones de crecimiento (Harbison *et al.*, 2004).

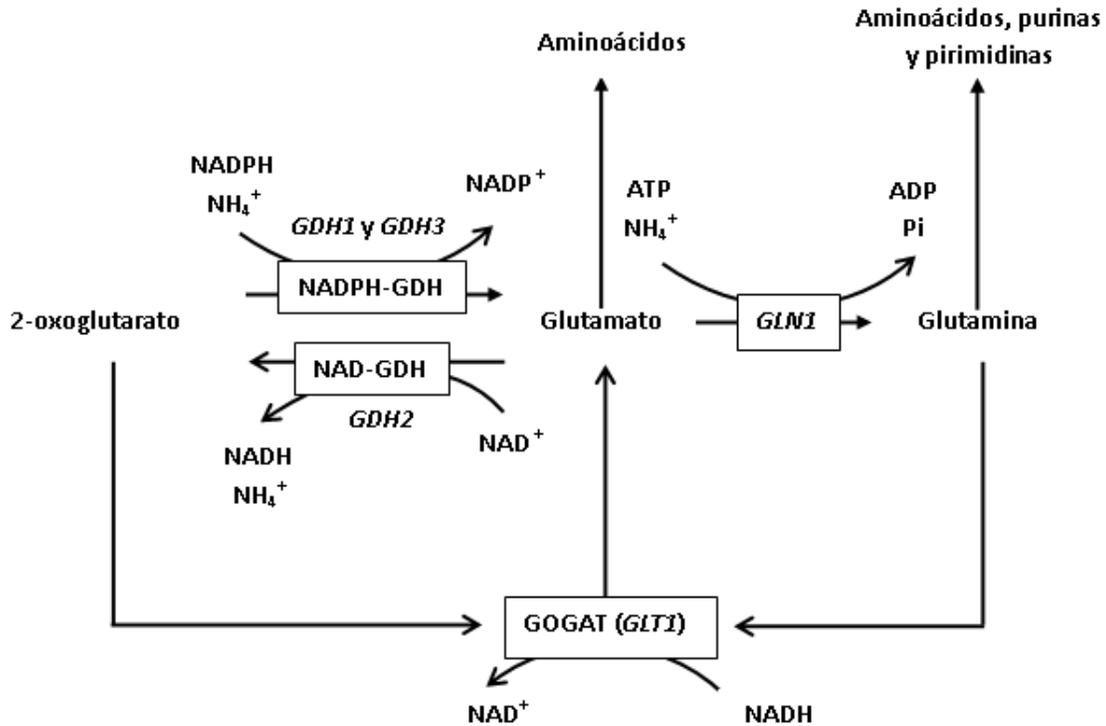


**Figura 5. Distintos arreglos del promotor en la levadura.** a) Promotores con un sólo elemento *cis* para un factor transcripcional. b) Promotores con varios elementos *cis* repetidos, requeridos para una respuesta gradual. c) Promotores con diferentes elementos *cis*, están sujetos a diferentes factores transcripcionales y a una regulación más modulada (imagen modificada de Harbison *et al.*, 2004).

## 1.6. Metabolismo de nitrógeno en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En su hábitat natural la levadura *S. cerevisiae* se encuentra con una amplia variedad de fuentes de nitrógeno (Cooper, 1982). La levadura puede utilizar más de 30 compuestos nitrogenados, incluyendo aminoácidos, amonio, urea, bases nitrogenadas y derivados de purinas (Godard *et al.*, 2007). Sin embargo, cada fuente de nitrógeno permite diferentes tasas de crecimiento, por ejemplo, en fuentes primarias de nitrógeno como amonio, glutamina y asparagina, la tasa de crecimiento de la levadura es mayor que en fuentes secundarias de nitrógeno como GABA, prolina y urea (Eelko *et al.*, 2000). Para utilizar una molécula como fuente de nitrógeno, la levadura tiene que convertir esta molécula en glutamato y glutamina. Estos dos aminoácidos sirven como donadores de nitrógeno para todos los compuestos que contienen nitrógeno en la célula (Wiame *et al.*, 1985). El glutamato y la glutamina pueden sintetizarse directamente utilizando amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) como el donador del grupo amino. La glutamato deshidrogenasa, dependiente de

NADPH codificada por los genes *GDH1* y *GDH3*, convierte el amonio y 2-oxoglutarato en glutamato y la glutamina sintetasa, codificada por el gen *GLN1* produce glutamina en una reacción dependiente de ATP a partir del amonio y glutamato (Magasanik, 2002). Cuando la glutamina es la única fuente de nitrógeno para el crecimiento, el glutamato es producido por la glutamato sintasa (GOGAT, codificada por el gen *GLT1*) o por medio de la NADPH-GDH (figura 6) (Ljungdahl y Fournier, 2012).

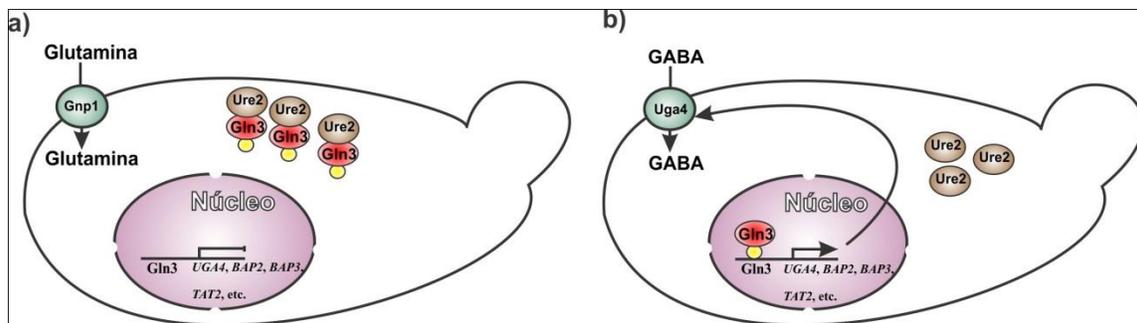


**Figura 6. Metabolismo central de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.** El amonio puede ser convertido en glutamato mediante dos rutas. Acoplando el 2-oxoglutarato para formar glutamato por la NADPH-GDH. El glutamato generado puede ser convertido a glutamina por *GLN1* con un costo de un ATP. Glutamina y 2-oxoglutarato pueden ser convertidos en glutamato por GOGAT (*GLT1*). Glutamato puede ser degradado a 2-oxoglutarato y amonio vía NAD-GDH (imagen modificada de Eelko *et al.*, 2000).

El transporte de nitrógeno, su biosíntesis y catabolismo son procesos altamente regulados que responden tanto a la calidad como a la cantidad de la fuente de nitrógeno. Cuando se cultiva a la levadura en fuentes primarias de nitrógeno, la transcripción de algunos genes implicados en la utilización de fuente secundarias de nitrógeno es reprimida y sus correspondientes productos son inactivados y degradados (Wiame *et al.*, 1985). A este fenómeno se le conoce como represión catabólica nitrogenada o NCR por

sus siglas en inglés (*Nitrogen Catabolite Repression*). La represión catabólica nitrogenada consiste en reprimir la expresión de genes implicados en el metabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno (Zaman *et al.*, 2008).

En la represión catabólica nitrogenada se expresan 90 genes regulados por la interacción de cuatro factores de transcripción de la familia GATA: 2 activadores transcripcionales, Gln3 y Gat1 y 2 represores, Dal80 y Gzf3 (Cooper, 2002). Los genes sujetos a represión catabólica nitrogenada están regulados principalmente por la localización subcelular de los activadores transcripcionales. Al cultivar la levadura en fuentes de nitrógeno secundarias, los factores Gln3 y Gat1 están localizados en el núcleo en donde se unen a secuencias GATA de los promotores de genes que se regulan por represión catabólica nitrogenada. Sin embargo, al crecer la levadura en amonio o glutamina como única fuente de nitrógeno, el activador Gln3 reside en el citoplasma (figura 7). La proteína Ure2 secuestra a Gln3 en el citoplasma, en tanto que en una mutante *ure2Δ*, Gln3 reside en el núcleo y activa la transcripción de genes NCR independientemente de la fuente de nitrógeno (Zaman *et al.*, 2008).



**Figura 7. Represión catabólica nitrogenada (NCR) en *Saccharomyces cerevisiae*.** La NCR está regulada por dos activadores transcripcionales, Gln3 y Gat1. (a) En presencia de fuentes primarias de nitrógeno Gln3 reside en el citoplasma secuestrada por Ure2, en (b) fuentes secundarias de nitrógeno Gln3 se localiza en el núcleo activando genes relacionados con el catabolismo de fuentes secundarias.

## 1.7. Los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*

Las aminotransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido, usando como donador o receptor de amonio al

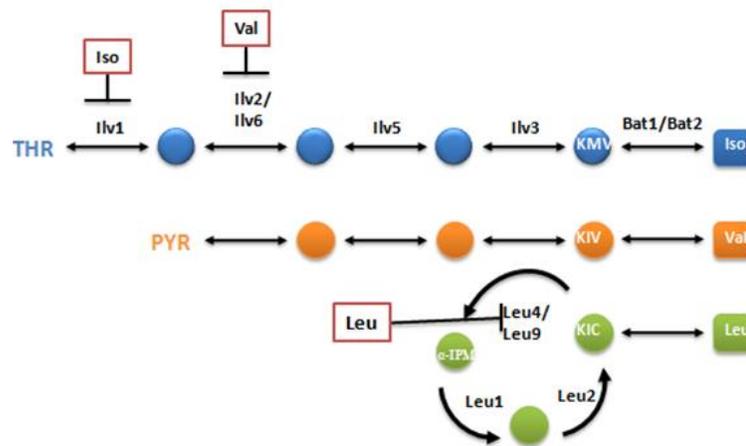
glutamato o 2-oxoglutarato, respectivamente. Las aminotransferasas utilizan como cofactor al piridoxal 5' fosfato (PLP, por sus siglas en inglés), derivado de la vitamina B6, que es uno de los cofactores biológicos más utilizados por enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Jansonius, 1998).

En la levadura *S. cerevisiae*, el último paso en la biosíntesis y el primer paso en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), es llevado a cabo por la acción de aminotransferasas de cadena ramificada (BCATs, por sus siglas en inglés), codificadas por los genes parálogos *BAT1* y *BAT2*.

Las isoenzimas Bat1 y Bat2 presentan un 77% de identidad. Bat1 es una proteína de 393 residuos de aminoácidos (aa) con un peso molecular de 43,596 daltons y un punto isoeléctrico de 8.7 (Eden *et al.*, 1996). En el extremo amino terminal presenta un péptido señal de 16 residuos de aa que la dirige a la matriz mitocondrial (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996). Bat2 es una proteína citosólica de 376 residuos de aa con un peso molecular de 41, 624 daltons y un punto isoeléctrico de 6.9 (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996).

La biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada: valina (V), isoleucina (I) y leucina (L), se lleva a cabo en una ruta metabólica común. La ruta de la valina comparte todas sus enzimas (Iiv2, Iiv5 e Iiv3) con la ruta de la isoleucina, que posee específicamente su primera enzima Iiv1. Por otro lado, el último intermediario (KIV: cetoisovalerato) de la biosíntesis de la valina, es el precursor inicial de la biosíntesis de la leucina (figura 8) (Kohlhaw, 2003).

El catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada mediante la ruta de Ehrlich genera alcoholes aromáticos conocidos como alcoholes fusel. Estos alcoholes en altas concentraciones presentan un sabor desagradable, pero en bajas concentraciones aportan un sabor y aroma esencial en los alimentos y bebidas fermentadas (Hazelwood *et al.*, 2006).



**Figura 8. Ruta de biosíntesis de BCAAs en *Saccharomyces cerevisiae*.** Los precursores treonina (THR), piruvato (PYR) y cetoisovalerato (KIV), están en letras de colores que corresponden a la isoleucina (azul), valina (anaranjado) y leucina (verde). Las proteínas de la vía marcan las reacciones enzimáticas. La inhibición catalítica por producto final se indica en los cuadros en rojo. La regulación específica de BCCAs se lleva a cabo por el factor transcripcional Leu3 y el coactivador  $\alpha$ -IPM. A partir de la reacción de aminotransferasa a través de *BAT1* y *BAT2* se produce el cetometilvalerato (KMV), cetoisovalerato (KIV) y cetoisocaproato (KIC) a partir de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L), respectivamente (imagen modificada de Kohlhaw, 2003).

## 1.8. Regulación de la expresión de *BAT1* y *BAT2*

La expresión de *BAT1* y *BAT2* en *S. cerevisiae* se observa durante la fase logarítmica y fase estacionaria de crecimiento. *BAT1* es altamente expresado durante la fase logarítmica y reprimido en la fase estacionaria, mientras que *BAT2* se expresa en la fase estacionaria y se reprime durante la fase logarítmica (Eden *et al.*, 1996). Estudios realizados por Boer proponen que *BAT1* y *BAT2* tienen una expresión diferencial (Boer *et al.*, 2006). De igual forma, estudios de expresión mediante microarreglos indican que *BAT2* se sobre transcribe en etanol como fuente de carbono (Schoondermark-Stolk *et al.*, 2005). Por otra parte, también se ha determinado que la regulación transcripcional de *BAT1* requiere del factor Gcn4 (Gcn4 está involucrado en la activación de genes que participan en la biosíntesis de aminoácidos ante una privación de éstos mismos), este estudio demuestra que Gcn4 puede regular positivamente a *BAT1*. Sin embargo, el papel que juegan otros reguladores transcripcionales en la expresión de *BAT1* y *BAT2* aún no ha sido determinado.

Análisis *in silico* de los promotores de *BAT1* y *BAT2* evidencian los posibles sitios de unión que regulan la expresión de estos genes (figuras 9 y 10). Ambos promotores presentan sitios de unión para los siguientes factores transcripcionales: Leu3 (activador de la transcripción de los genes que biosintetizan o catabolizan V, I, L), Gcn4 (activador general de la transcripción de los genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos), Put3 (activador de la transcripción de los genes que catabolizan la prolina), Hap2 (activador de la transcripción de los genes que participan en el metabolismo respiratorio), Gln3 (activador de la transcripción de los genes que responde a NCR), Abf1 (factor estructural que delimita los nucleosomas en un promotor) y la proteína de unión a caja TATA (TBP). Estos sitios de unión también están presentes en los promotores ortólogos de las levaduras *sensu stricto* (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikatae* y *Saccharomyces paradoxus*). En la figura 10 las cajas señaladas en rojo son aquellas cuya secuencia está conservada en las levaduras *sensu stricto*. Una observación interesante de este estudio es que los sitios de unión para los factores Put3 y Leu3 del promotor de *BAT2*, comparten el triplete CCG que forma parte del palíndromo 5'-CCGN4CGG-3' que reconoce Leu3 o 5' CGGN{10}CCG-3', que reconoce Put3, ambos sitios están conservados en las levaduras *sensu stricto*, indicando su importancia evolutiva (figura 10). Posiblemente Put3 y Leu3 compiten por el sitio de unión.

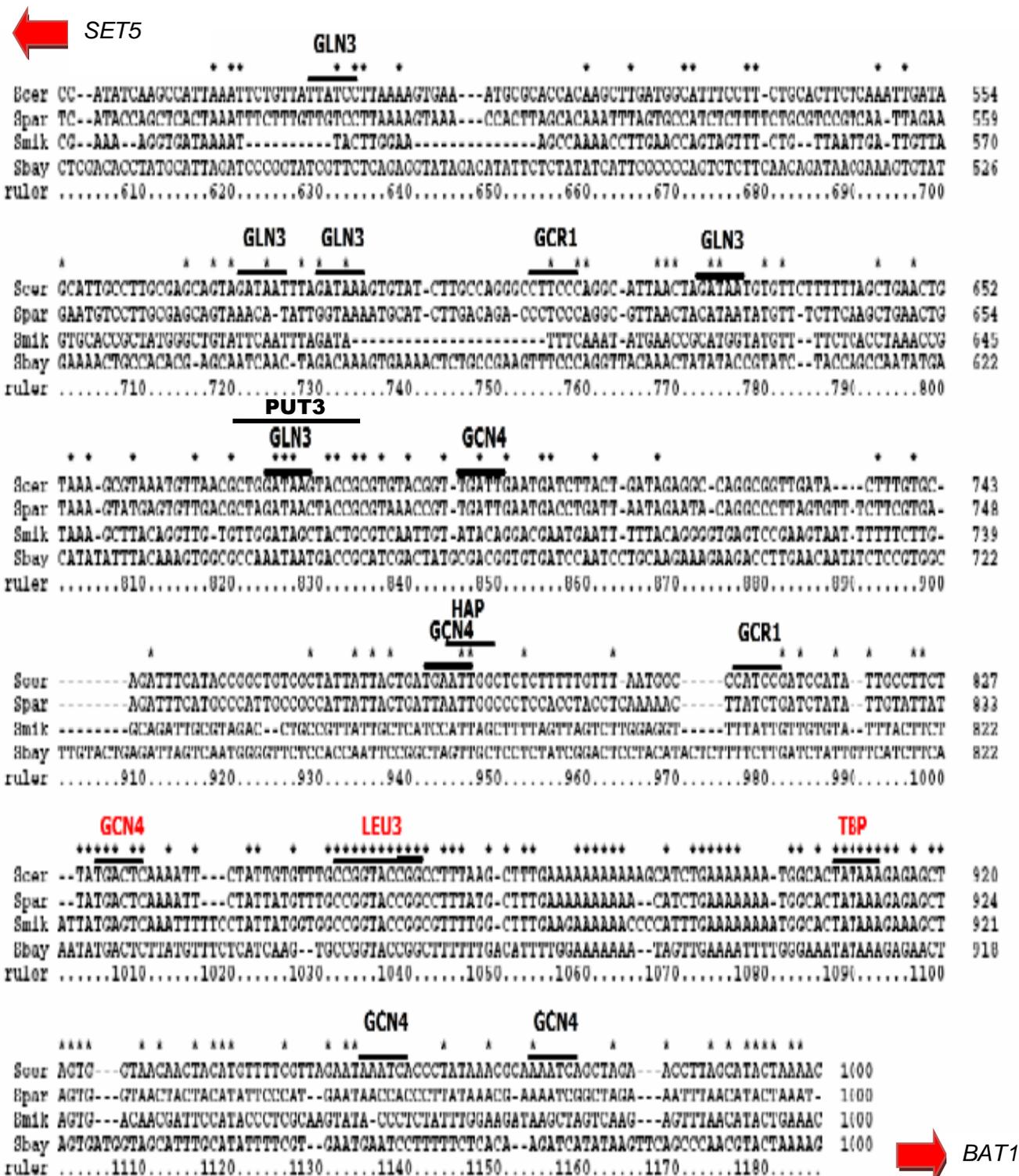
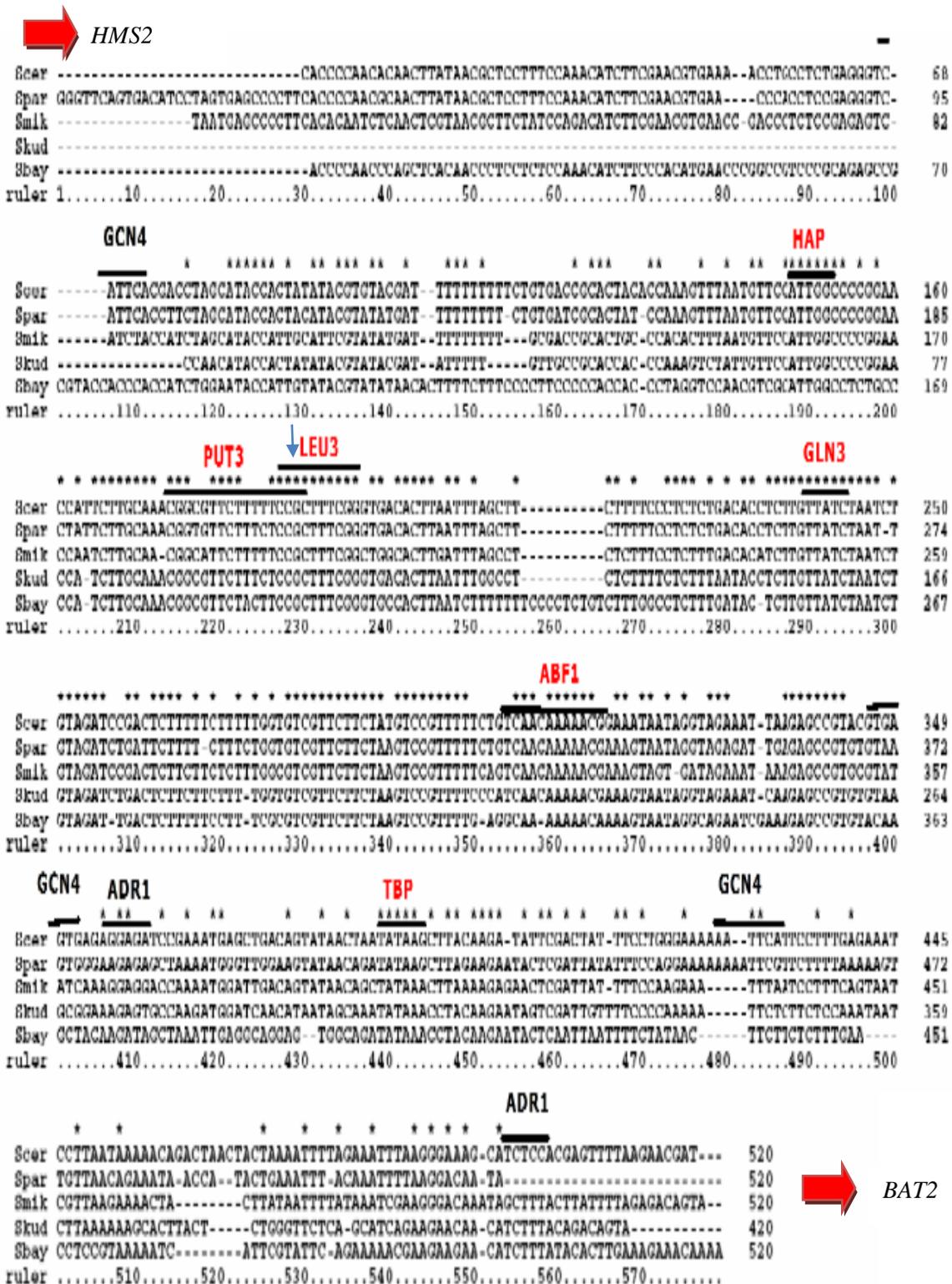


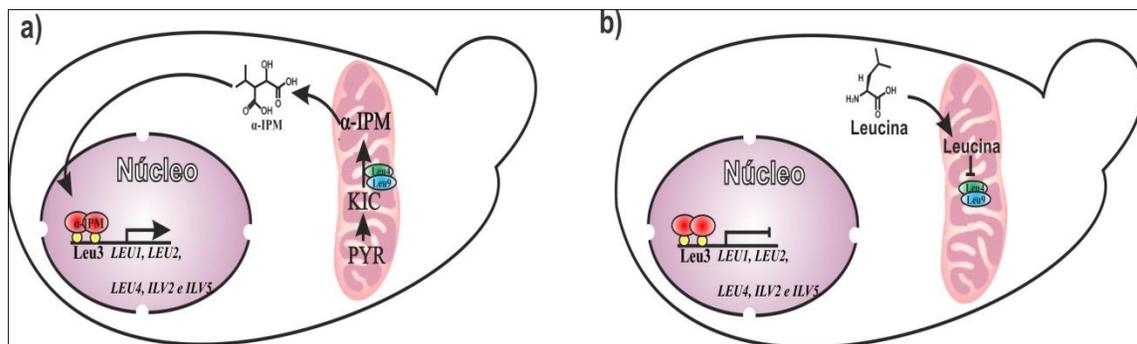
Figura 9. Alineamiento de la región 5' UTR de *BAT1* y sus ortólogos. En el alineamiento se usaron las secuencias de las *Saccharomyces sensu stricto*. Los nombres de los sitios de unión se encuentran subrayados en el esquema, en rojo se muestran los sitios conservados y consenso entre las *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae* y *Saccharomyces bayanus*).



**Figura 10.** Alineamiento de la región 5'UTR de *BAT2* y sus ortólogos. En el alineamiento se usaron las secuencias de las *Saccharomyces sensu stricto*. Los nombres de los sitios de unión se encuentran subrayados en el esquema, en rojo se muestran los sitios conservados y consenso entre las *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae* y *Saccharomyces bayanus*). Obsérvese que los sitios de unión para Put3 y Leu3 comparten 3 nucleótidos, se indica con una flecha azul.

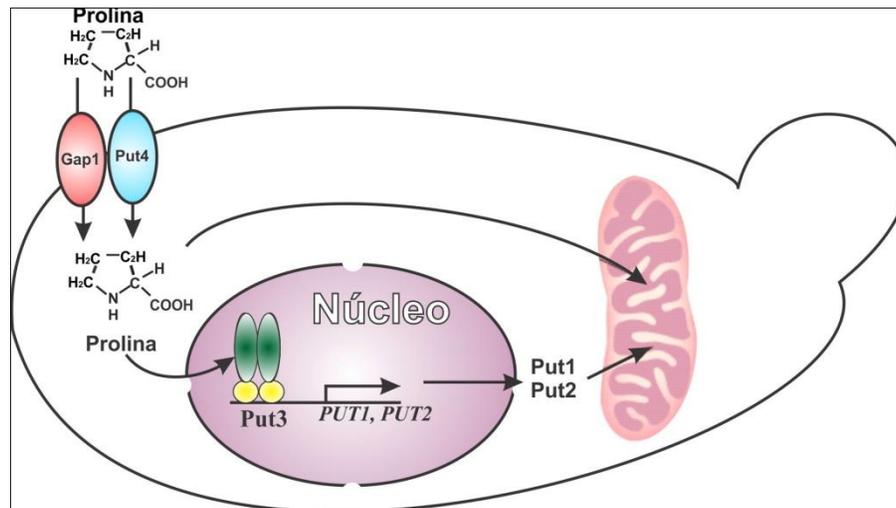
## 1.9. Los factores transcripcionales Leu3 y Put3 participan en el metabolismo de aminoácidos

El factor transcripcional Leu3 es un regulador transcripcional que interviene en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Posee un dominio de unión al DNA y pertenece a los factores transcripcionales que unen dos átomos de zinc en la sexta cisteína ( $\text{Cys}_6 \text{Zn(II)}_2$ ), interactúa con sus secuencias de activación ( $\text{UAS}_{LEU}$ ) que se encuentran río arriba en las regiones promotoras de *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2* e *ILV5* (Friden y Schimmel, 1987). Leu3 se une al DNA como homodímero, reconoce la secuencia 5'-CCGN{4}CGG-3' y es capaz de unir una mitad evertida con cuatro pares de bases de espacio (se ha demostrado que este tipo de proteínas reconocen un par de tripletes CGG orientados ya sea de manera directa: CGGN{4}CGG, invertida: CGGN{4}CCG o evertida: CCGN{4}CGG, donde N4 indica 4 nucleótidos) (Fitzgerald *et al.*, 2006). Cuando Leu3 reconoce su sitio de unión al promotor, éste puede actuar como activador o represor transcripcional. Su acción como activador depende de la concentración del coactivador  $\alpha$ -isopropilmalato  $\alpha$ -IPM producido por las isopropilmalato sintetetas Leu4 y Leu9 (Marobbio *et al.*, 2008). La ausencia del  $\alpha$ -IPM permite que Leu3 actúe como represor (Sze, *et al.*, 1992) (figura 11).



**Figura 11. Leu3 regula el metabolismo de la leucina.** a) La regulación específica de la síntesis de leucina se lleva a cabo por el factor transcripcional Leu3 y el coactivador  $\alpha$ -IPM. Las isoenzimas mitocondriales Leu4 y Leu9 utilizan como sustrato el cetioisocaproato (KIC) para producir  $\alpha$ -IPM, el cual se transporta al núcleo y se une al factor Leu3 e induce la expresión de *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2* e *ILV5*. b) La presencia de leucina inhibe a la Leu4-Leu9 y, por tanto, la producción del coactivador  $\alpha$ -IPM que requiere Leu3 para la activación de la transcripción de sus genes blanco (imagen modificada de Friden y Schimmel, 1988).

En la levadura *S. cerevisiae* la prolina es transportada dentro de la célula por la permeasa general de aminoácidos Gap1 y por Put4, un transportador específico para prolina. En el núcleo, la prolina se une al factor Put3 provocando un cambio conformacional en su estructura y la inducción de la expresión de los genes *PUT1* y *PUT2* (Marczak y Brandiss, 1991). La prolina es convertida a glutamato en la mitocondria por la prolina oxidasa Put1 y  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa Put2 (Brandis, 1987; Sellick y Reece, 2003) (figura 12).



**Figura 12. Put3 regula el catabolismo de la prolina.** La prolina es transportada por Gap1 y Put4, en el núcleo la prolina se une a Put3 provocando un cambio conformacional en su estructura y la inducción de *PUT1* y *PUT2*. La prolina es convertida a glutamato en la mitocondria por los productos de los genes *PUT1* y *PUT2* (Imagen modificada de Sellick y Reece, 2003).

El factor transcripcional Put3 es un regulador que interviene en el catabolismo de la prolina. Posee un dominio de unión al DNA en el N-terminal y pertenece a los factores transcripcionales que unen dos átomos de zinc en la sexta cisteína (Cys<sub>6</sub> Zn(II)<sub>2</sub>). Interactúa con sus secuencias de activación (UAS<sub>PUT3</sub>) que se encuentran río arriba en las regiones promotoras de los genes blanco *PUT1* y *PUT2* (Sellick y Majors, 1987). Put3 se une como homodímero, reconoce la secuencia 5'-CGGN{10}CCG-3' y es capaz de unir una mitad evertida (polaridad opuesta e invertida) de CGG con diez pares de bases de espacio (Swaminathan *et al.*, 1997).

---

---

# Planteamiento del problema

---

---

En *Saccharomyces cerevisiae*, el último paso en la biosíntesis y el primero en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) valina, isoleucina y leucina (VIL) se lleva a cabo por las aminotransferasas de cadena ramificada (BCATs) codificadas por los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* (Colón *et al*, 2011).

La regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2* ha sido poco estudiada, sin embargo análisis *in silico* de sus secuencias promotoras sugieren que contienen elementos *cis* consenso y conservados con respecto a las levaduras *Saccharomyces sensu stricto*. La región regulatoria de *BAT1* contiene sitios de unión para los factores transcripcionales: Gcn4, **Leu3**, Adr1 y **Put3**, mientras que la región regulatoria de *BAT2* contiene sitios de unión para los factores: **Leu3**, Gln3, Abf1, **Put3**, Nrg1 y Hap. Resulta interesante que ambos promotores hayan conservado los sitios de unión para los factores Put3 y Leu3. Es posible que la conservación de estos elementos *cis* sea la clave en la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*. Estudiar la participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2* en condiciones biosintéticas y catabólicas, representa un buen modelo para determinar dicha coordinación regulatoria.

---

---

# Objetivos

---

---

### 3.1. Objetivo general

Determinar la participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.2. Objetivos particulares

1.- Construir las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* mediante recombinación homóloga.

2.- Determinar la velocidad específica de crecimiento en las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* en medio mínimo con glutamina (Q), ácido gamma-aminobutírico (GABA) o valina (V), isoleucina (I) y leucina (L) como única fuente de nitrógeno.

3.- Analizar la expresión de *BAT1* y *BAT2* en diferentes densidades ópticas (0.3, 0.6, 1.3 y 2.4) mediante ensayos tipo northern blot.

4.- Determinar la expresión de *BAT1* y *BAT2* en las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* en medio mínimo con glutamina (Q), ácido gamma-aminobutírico (GABA) o valina (V), isoleucina (I) y leucina (L) como única fuente de nitrógeno.

---

---

# Metodología

---

---

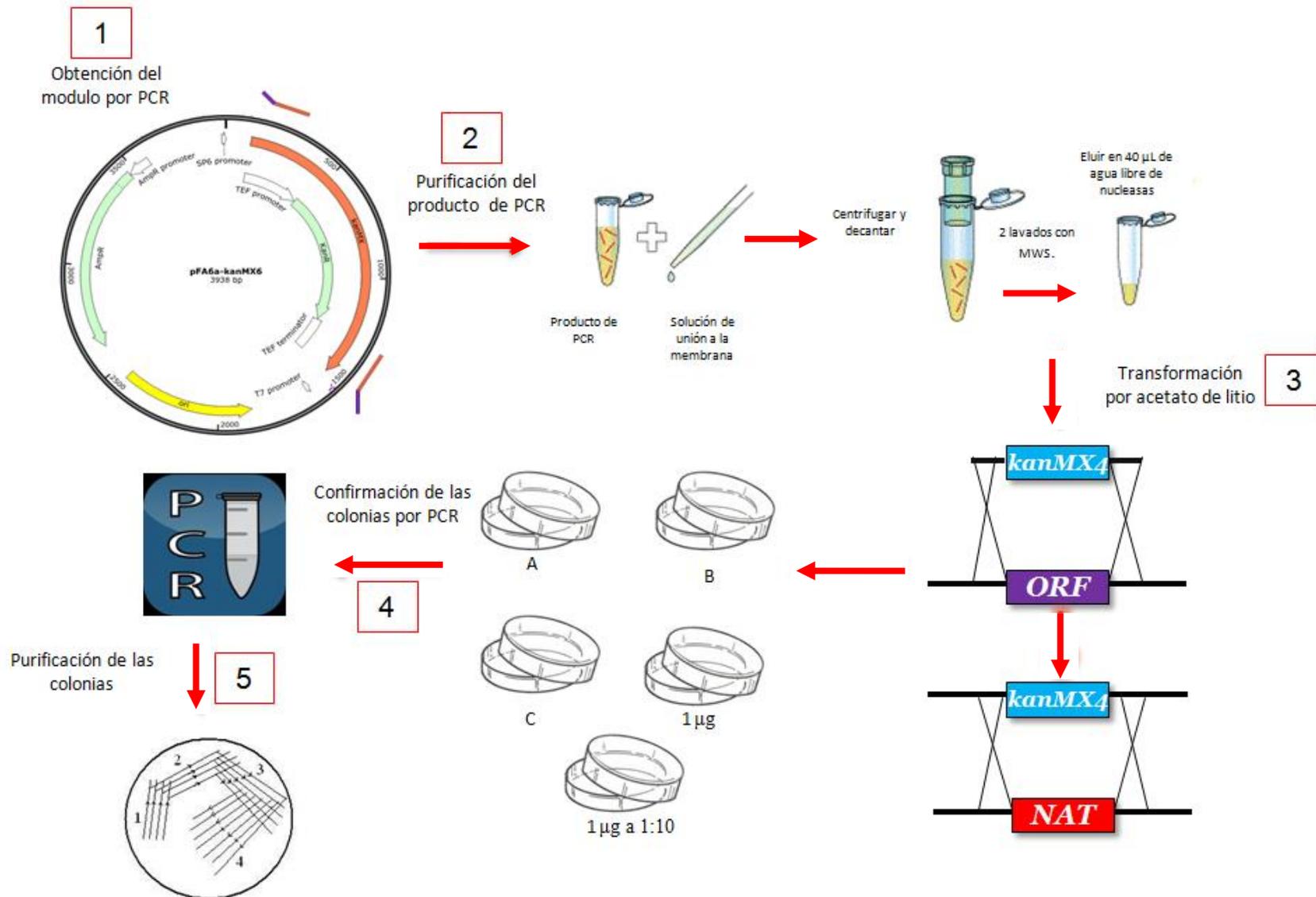
## 4.1. Construcción de mutantes

Con el propósito de analizar la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2* por *PUT3* y *LEU3*, se construyeron las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ*. La construcción de mutantes se realiza mediante el protocolo de transformación de acetato de litio (Gietz y Woods, 2002).

La construcción de las mutantes se realiza mediante recombinación homóloga en el gen de interés con los módulos *kanMX4* o *NAT*, que confieren resistencia a los antibióticos geneticina (G418) o NAT/nourseotricina, respectivamente.

Para construir la mutante sencilla *put3Δ* se lleva a cabo una PCR con los oligonucleótidos J1 y J2 (ver apéndice), utilizando como molde el plásmido pFA6a-*kanMX6* (ver apéndice). El producto de PCR (módulo) contiene el casete *kanMX4* flanqueado por 50 pb del UTR 5' y 52 pb del UTR 3' del gen *PUT3* (ver tabla III). El módulo obtenido tiene un tamaño de 1840 pb y se purifica con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de PROMEGA. Una vez purificado, se transforma la cepa CLA1-2 siguiendo el protocolo de transformación de levadura con acetato de litio (Gietz *et al.*, 2002). Las transformantes son seleccionadas en medio sólido YPD-geneticina, a una concentración de 200 µg/mL. Se dejan crecer a una temperatura de 30 °C por 48 h. Al terminar este tiempo se toman 5 colonias candidatas y se confirman por PCR, después se realiza el proceso de purificación que consiste en reestriar 3 veces las colonias en medio sólido YPD-geneticina (figura 13).

Para obtener la doble mutante *put3Δleu3Δ*, primero se sustituye el módulo *kanMX4* de la mutante *leu3Δ* por el casete *NAT*, mediante recombinación homóloga. La sustitución del módulo se confirma por PCR. El módulo de *NAT* se obtiene mediante la digestión del plásmido p4339 con la enzima de restricción *EcoR1*. El módulo se purifica por el kit descrito anteriormente. Posteriormente, la mutante *leu3::NAT* se transforma con el módulo *kanMX4* flanqueado por las regiones homólogas del gen *PUT3*, siguiendo el mismo procedimiento que para la construcción de la mutante sencilla *put3Δ*. La doble mutante se selecciona en medio sólido YPD-geneticina (200 µg/mL) y nourseotricina (100 µg/mL).



**Figura 13. Transformación de levadura por acetato de litio.** 1) El módulo se obtiene a partir del plásmido pFA6a-kanMX6 por PCR. Los oligonucleótidos contienen ~50 pb homólogos a la región de recombinación (color morado). 2) El módulo se purifica con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de PROMEGA. 3) La transformación se realiza con 1 µg del módulo. 4) Para la confirmación de las mutantes se toman 5 colonias, se obtiene el DNA total y se confirman por PCR. 5) Se realizan 3 pases de purificación al estriar colonias aisladas.

## 4.2. Obtención de DNA genómico

Para obtener DNA total de levadura se sigue el protocolo descrito por Hoffman y colaboradores (Hoffman *et al.*, 1987). Se toma una colonia de las cepas isogénicas CLA1-2, *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ* colocándose en medio líquido YPD por 16 horas, con una agitación de 250 revoluciones por minuto (rpm), a una temperatura de 30 °C. Las células se colectan por centrifugación, se realizan 3 lavados con agua bidestilada estéril, se transfirieren a tubos de polipropileno y se resuspenden con Tritón X-100 y fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se lisan las células por choque mecánico al agregar perlas de vidrio y se agitan vigorosamente en el vortex. El DNA se resuspende en agua bidestilada estéril y se mide su concentración en el Nanodrop 2000 de Thermo Scientific.

## 4.3. Confirmación de mutantes

Para confirmar la inserción de los módulos *kanMX4* o *NAT* en el locus correspondiente, se verifican mediante PCR con la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) (tabla I).

**Tabla I.** Componentes para una PCR de confirmación.

Elemento	Concentración del Stock	Cantidad (μL)
Agua	-	34 μL
DMSO	-	1.5 μL
Buffer Phusion 5X	5X	10 μL
Oligo forward	100 ng/μL	0.5 μL
Oligo reverse	100 ng/μL	0.5 μL
dNTP's	10 mM	1 μL
DNA genómico	100 ng/μL	0.5 μL
Polimerasa	2 unidades/μL	2 μL
Volumen total		50 μL

Se utilizan oligonucleótidos que hibridan con la región UTR 5' y 3' del locus de interés. Para verificar la mutante *put3Δ* se utilizan los oligonucleótidos J3 y J4 (ver apéndice), en el caso de la inserción del módulo *NAT* en la doble mutante *put3Δleu3Δ* se utilizan los oligonucleótidos J5 y J14, para ambas confirmaciones se emplea el programa de PCR de la tabla II.

**Tabla II.** Programa de PCR para confirmar las mutantes.

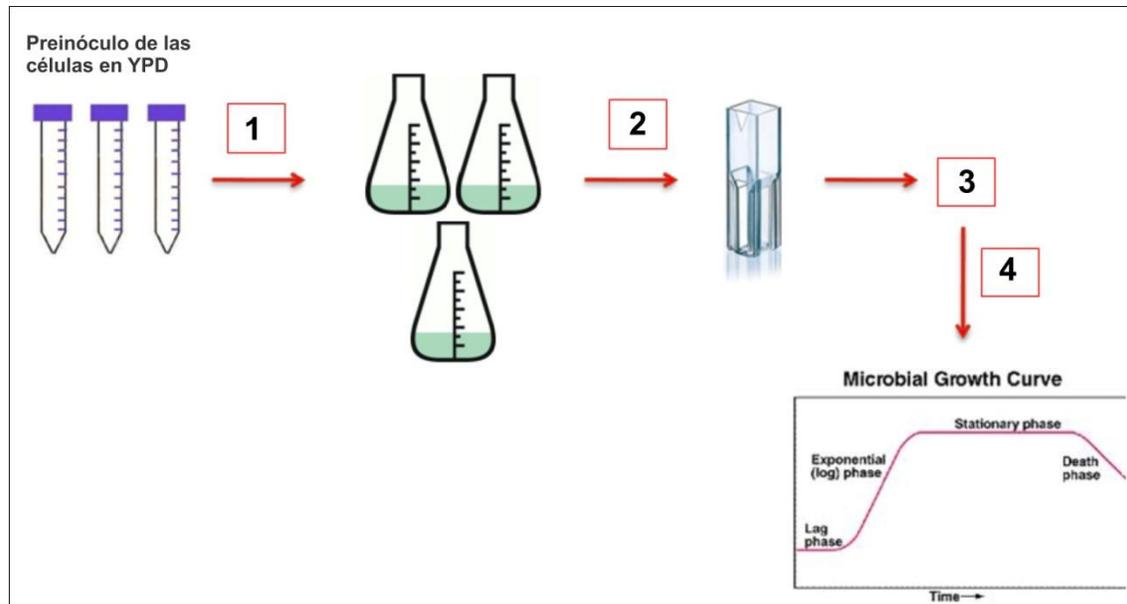
Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
98	5	1
98	20''	30
63	2	
72	2	
72	10	
4	∞	∞

Al producto de PCR se le realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el buffer de corrida TAE 1X y el marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder para comparar el tamaño del fragmento amplificado de las construcciones y el gen silvestre.

## 4.4. Condiciones de crecimiento y caracterización fenotípica de las mutantes

Con la finalidad de caracterizar a las mutantes fenotípicamente, se realizan curvas de crecimiento. Las cepas se crecen en medio mínimo (MM) con sales (2%), elementos traza (0.1%) y vitaminas (0.1%) usando como fuente de carbono dextrosa al 2%. Dependiendo del experimento, la fuente de nitrógeno usada es glutamina (3%), GABA (3%), valina (0.15%), isoleucina (0.03%) y leucina (0.1%). Se adiciona uracilo (0.02%) para complementar la auxotrofia. Todos los cultivos se incuban a 30 °C a 250 rpm.

Para la caracterización fenotípica de las mutantes *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ* se inoculan 3 réplicas biológicas de cada cepa por 16 horas en un volumen de 50 mL de MM, uracilo (20 mg/Lt), glucosa al 2% y glutamina (3%), GABA (3%), valina (0.15%), isoleucina (0.03%), leucina (0.1%), a una densidad óptica inicial ( $DO_{I 600\text{ nm}}$ ) de 0.05. Se lee la DO cada 2 horas por 12 horas, después se lee cada 4 horas hasta que la curva de crecimiento refleje la fase estacionaria. Al finalizar este tiempo se obtiene la curva y la velocidad específica de crecimiento (figura 14).



**Figura 14. Esquema de la caracterización fenotípica.** 1) Las tres réplicas biológicas de cada cepa se inoculan a una  $DO_I$  de 0.05. 2-3) Se lee la DO cada 2 horas hasta que la curva de crecimiento refleje la fase estacionaria. 4) Se obtiene la curva y la velocidad específica de crecimiento.

## 4.5. Extracción y electroforesis de RNA total

Para determinar la participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*, se cuantificó su expresión en un fondo *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ* mediante northern blot (Sambrook y Russell, 2001).

Las cepas isogénicas se inoculan en medio mínimo con glutamina, GABA o VIL, como únicas fuentes de nitrógeno y se extrae el RNA total por el método de fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 2006). Las células se obtienen a una DO de 0.5 y se colectan por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y se realiza un lavado con agua DEPC (0.1%). Las células se colocan en agitación por 60 minutos a 65 °C con 400 μL de solución TES (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM, pH 8 y SDS 0.5%) y 400 μL de fenol ácido. Al finalizar los 60 minutos los tubos de polipropileno se colocan en hielo por 10 minutos y se centrifugan a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se transfiere la fase acuosa a otro tubo y se agrega 400 μL de cloroformo, después se centrifugan a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se transfiere la fase acuosa a otro tubo, se agrega acetato de sodio (NaCH<sub>3</sub>COO 3M pH 5.3) y etanol absoluto frío. Las muestras de RNA obtenidas se dejan precipitando a -20 °C durante 16 horas. Posteriormente se centrifugan los tubos a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos, el etanol absoluto se decanta y se deja evaporar durante 15 minutos, se resuspende la pastilla en 40 μL de agua con DEPC y se mide su concentración en el Nanodrop 2000 de Thermo Scientific.

Para preparar el gel de formaldehído se mezcla 1 g de agarosa con 84 mL de agua, 10 mL de MAE10X y 6 mL de formaldehído. Las muestras de RNA se preparan mezclando 25 μL de tampón de muestra de RNA (formamida desionizada, formaldehído, MAE 10X, glicerol al 80% y azul de bromofenol al 2%), 1.5 μL de bromuro de etidio (1%) y 20 μg de RNA. Las muestras se incuban a 65 °C durante 15 minutos y se colocan en el gel previamente descrito. La electroforesis se realiza a 65 volts por 6 horas.

## 4.6. Transferencia por capilaridad

Una vez obtenido el gel, se hacen dos lavados de 20 minutos con SSC 10X, a continuación se coloca el sistema de transferencia. En este sistema se coloca un papel filtro de 14 cm x 40 cm, previamente humedecido con SSC 10X, permitiendo que las orillas queden sumergidas en el SSC 10X. Se coloca el gel y se humedece la membrana de Hybond-Nylon con agua bidestilada, después se sumerge en SSC 10X y se coloca encima del gel. Se colocan dos papeles filtro previamente humedecidos con SSC 10X encima de la membrana de Hybon-Nylon, por último, se coloca una pila de servitoallas y algún objeto que pese aproximadamente 1 kilo. Se deja transferir por 8-16 horas. Al concluir la transferencia se retira la membrana y se fijan los RNA en el Stratalinker (Autocrosslinker).

## 4.7. Síntesis y verificación de sondas radiactivas

Se realiza una PCR a partir de DNA genómico con la finalidad de obtener el DNA templado para el marcaje de sondas radiactivas. Los oligonucleótidos utilizados para cada PCR fueron *BAT1* (J6 y J7), *BAT2* (J8 y J9), *PUT3* (J10 y J11) y *ACT1* (J12 y J13). Las sondas se sintetizan usando el kit Prime-It Random Primer Labeling Kit de Stratagene. Para preparar la PCR se usan 25 ng de templado de DNA, se añade agua libre de DNAsas y 10 µL de random oligonucleotide primers.

Se calienta el tubo de la reacción por 5 minutos en un baño de agua hirviendo, después se deja enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente y se añade 10 µL de dCTP primer buffer 5X, 3 µL de [ $\alpha^{32}$  P] dCTP y 1 µL de enzima Exo (-) Klenow (5 unidades/µL). Se mezcla la reacción y se incuba el tubo de la reacción a 37 °C por 15 minutos. Al concluir este tiempo se detiene la reacción añadiendo 2 µL de stop mix y se agrega 50 µL de agua libre de DNAsas.

De la sonda radiactiva se realiza una dilución 1:100, de esta dilución se toman 2 µL y se colocan sobre un papel filtro con carga iónica, se repite este proceso para 2 papeles filtro y se marcan como lavado y no lavado. Se lava el filtro marcado como lavado 3 veces por 5 minutos en 25 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M, 2 veces por 1 minuto en 25 mL de agua desionizada y 2 veces por 1 minuto en 25 mL de etanol industrial.

Cuando se termina de evaporar el etanol se coloca cada filtro en un vial y se agrega 10 mL de líquido de centelleo y se cuantifica en el contador de centelleo. Se calcula el porcentaje de incorporación de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Número de cuentas filtro lavado}}{\text{Número de cuentas filtro no lavado}} \times 100 = \% \text{ de incorporación}$$

#### **4.8. Hibridación de la sonda radiactiva**

La membrana de Hybond-Nylon se incuba en 30 mL de solución de prehibridación (SDS 10%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M pH 7.2 y EDTA 0.5 M) durante 1 hora. Posteriormente se agrega la sonda radiactiva por 12 horas. Se retira la sonda radiactiva y se hacen 2 lavados de bajo rigor (SSC 2X y SDS 0.1%) y 2 de alto rigor (SSC 0.15X y SDS 0.1%), ambos a 65 °C, uno durante 5 minutos y otro por 15 minutos. Al finalizar los lavados la membrana se envuelve en plástico autoadherible y se deja en un caset de exposición auto radiográfico. Para reutilizar la membrana se hacen los lavados necesarios para eliminar la radiactividad con SDS 0.5% hirviendo por 5-15 minutos hasta que ya no se detecta señal con el contador Geiger.

#### **4.9. Obtención y análisis de datos**

La obtención de datos se realiza en un Typhoon 9400 Variable Mode Imager con el software Typhoon Scanner Control v5.0 con las siguientes características:

Modo de adquisición: Almacenamiento de fósforo

Modo de fósforo: Mejor sensibilidad y tamaño del pixel: 100 microns

El análisis de datos se realizó con el software Image Quant 4.2.

---

---

# Resultados y Discusión

---

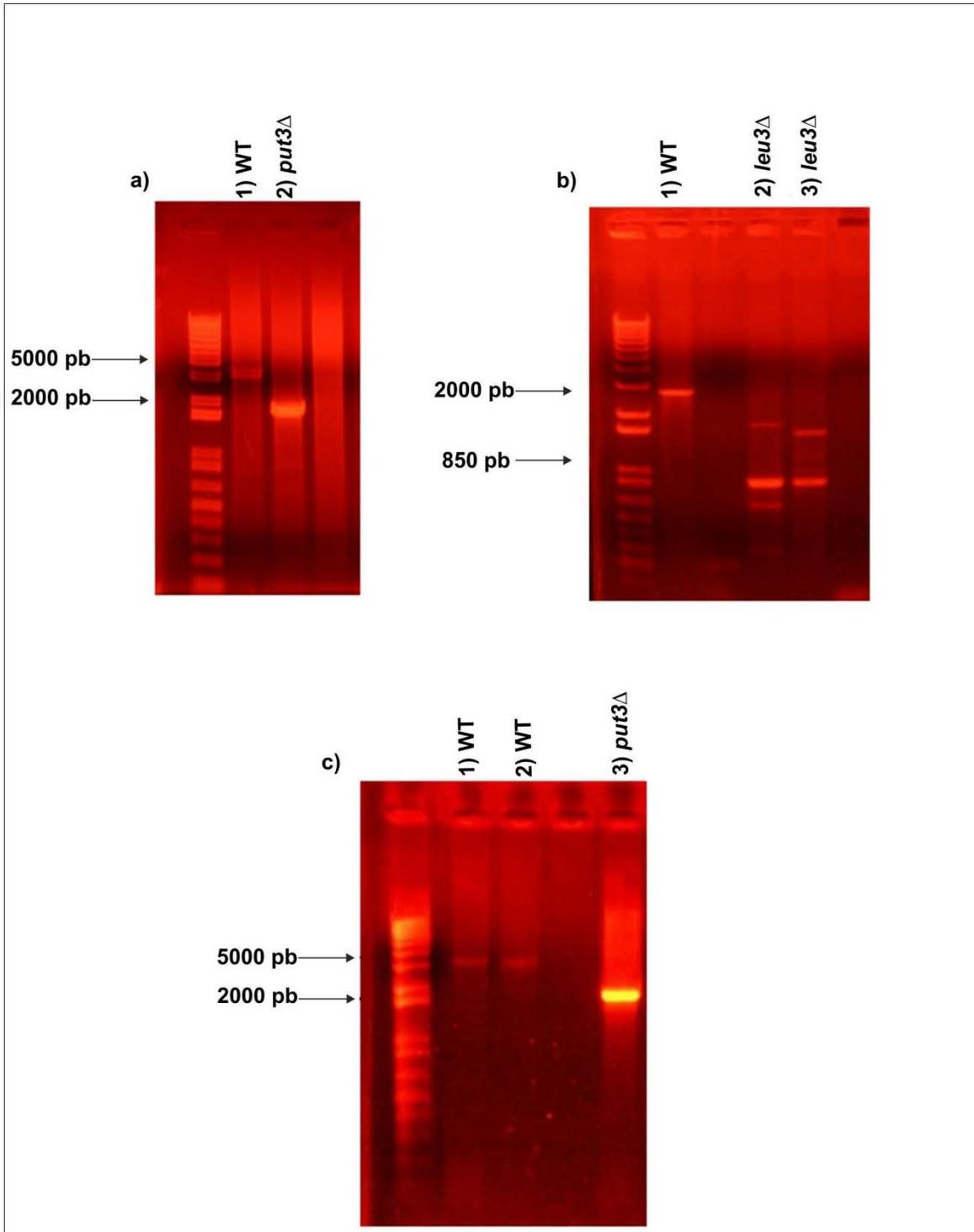
---

## 5.1. Confirmación de mutantes

Con el propósito de analizar la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*, se construyeron las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ*. La construcción de mutantes se realiza mediante el protocolo de transformación de acetato de litio (Gietz y Woods, 2002).

La construcción de las mutantes se realiza mediante recombinación homóloga en el gen de interés con los módulos *kanMX4* o *NAT*, que confieren resistencia a los antibióticos geneticina (G418) o NAT/nourseotricina, respectivamente.

El gen silvestre *PUT3* tiene un tamaño de 2930 pb, al realizar la transformación se espera un tamaño de 1500 pb. En la figura 15 se muestra la confirmación de la mutante *put3Δ*. En el carril 1 (figura 15a) se observa el tamaño de la cepa silvestre de 2930 pb y en el carril 2 la mutante *put3Δ* de 1500 pb. De igual forma se generó la mutante *leu3::NAT*, como se observa en la figura 15b, en el carril 1 se muestra el tamaño del gen *LEU3* silvestre de 2661 pb y en el carril 2 y 3, el de la mutante *leu3::NAT* de 800 pb. Para la construcción de la doble mutante *put3Δleu3Δ*, se confirmó la inserción del módulo *kanMX4* a partir de la mutante sencilla *leu3::NAT*. En la figura 15c se muestra la confirmación de la doble mutante *put3Δleu3Δ*.



**Figura 15. Confirmación de las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ*.** Las construcciones fueron confirmadas mediante PCR. a) El tamaño esperado para *put3Δ* es de 1500 pb comparado con el gen silvestre de 2930 pb. b) Para la mutante *leu3Δ* el tamaño esperado es de 800 pb comparado con el gen silvestre de 2661 pb. c) La doble mutante *put3Δleu3Δ* se construye a partir de la mutante *leu3::NAT*. Se eliminó el gen *PUT3* (2930 pb) con el módulo de KanMX (1500 pb).

## 5.2. Caracterización fenotípica de las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ*

Las aminotransferasas son enzimas que catalizan reacciones reversibles que permiten la biosíntesis y/o el catabolismo de aminoácidos. En particular, las aminotransferasas Bat1 y Bat2 participan en el metabolismo de valina, isoleucina y leucina (VIL) (Colón *et al.*, 2011). Sin embargo, la regulación transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2* ha sido poco estudiada. En este trabajo se determinó la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2* a través de *PUT3* y *LEU3*. Para determinar el papel de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*, se generaron las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ*, y la doble *put3Δleu3Δ* como se describe en el apartado 4.1. Las mutantes obtenidas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante curvas de crecimiento. En la tabla III se muestran las velocidades específicas de crecimiento de la cepa silvestre (WT), las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ* cultivadas en medio mínimo con glucosa + glutamina, GABA o VIL como fuentes de nitrógeno.

**Tabla III.** Velocidad específica de crecimiento de las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ*.

Cepa	Fuente de nitrógeno		
	Glutamina	GABA	VIL
WT	0.35	0.20	0.14
<i>put3Δ</i>	0.4	0.23	0.17
<i>leu3Δ</i>	0.25	0.17	0.12
<i>put3Δleu3Δ</i>	0.24	0.16	0.11

En glutamina, la mutante sencilla *put3Δ* aumentó su velocidad de crecimiento un 15% con respecto a la WT, mientras que en las mutantes *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ* reducen su velocidad de crecimiento hasta un 30% con respecto a la cepa silvestre. En GABA o VIL, la cepa WT, las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ* reducen su velocidad de crecimiento con respecto a glutamina (figura 16). Este fenotipo se debe a que la glutamina es una mejor fuente de nitrógeno que GABA y VIL. A partir

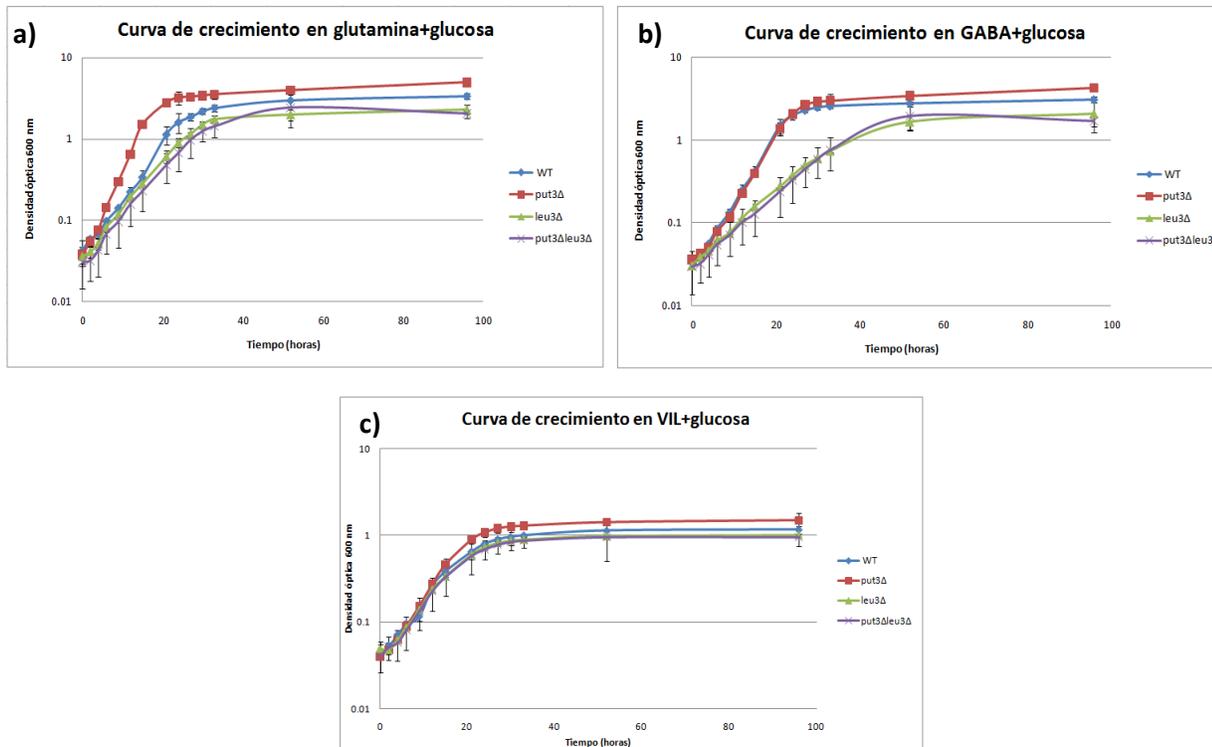
del catabolismo de la glutamina se puede sintetizar asparagina, triptófano, glutamato, purinas y pirimidinas (Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012; Cooper, 1982). Otro dato que resulta interesante en este estudio es el incremento en la velocidad de crecimiento de la mutante sencilla *put3Δ* con respecto a la cepa silvestre en glutamina, GABA y VIL (tabla III y figura 16a, b y c). De acuerdo a literatura, la mutante sencilla *put3Δ* tiene efectos en el periodo de vida, este fenómeno se conoce como *lifespan* (Schleit *et al.*, 2013). El término *lifespan* es usado para definir el número finito de células hijas capaz de producir una célula “madre” antes de salir irreversiblemente del ciclo celular (Mortimer y Johnston, 1959). En la actualidad, el *lifespan* ha sido estudiado en el envejecimiento celular de la levadura *S. cerevisiae* permitiendo identificar los genes que están implicados en el proceso de envejecimiento (Sinclair *et al.*, 1998; Garay *et al.*, 2014).

Este tipo de estudios han sido utilizados por Schleit y colaboradores para demostrar que 166 mutantes sencillas (incluyendo a *put3Δ*) tienen efecto en el *lifespan*. El estudio de Schleit concluye que la mutante sencilla *put3Δ* disminuye el *lifespan* de *S. cerevisiae* (Schleit *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado que las mutantes que reducen el *lifespan* están relacionadas con la función mitocondrial, la biosíntesis de purinas *de novo*, función vacuolar y autofagia (Garay *et al.*, 2014). Actualmente se sabe que el factor transcripcional Put3 reprime y/o activa la expresión de *PUT1* y *PUT2* que codifican para las enzimas mitocondriales Put1 y Put2 involucradas en el catabolismo de la prolina (Marczak y Brandiss, 1991). Por tanto, el aumento de la velocidad de crecimiento y/o la disminución de *lifespan* en la mutante *put3Δ*, podría estar relacionado con la desregulación de la homeostasis mitocondrial de la célula.

Por otra parte, la disminución de la velocidad de crecimiento de la mutante sencilla *leu3Δ* en glutamina, GABA o VIL con respecto a la cepa silvestre (tabla III y figura 16a, b y c) puede deberse a que el factor transcripcional Leu3 está involucrado en la regulación transcripcional de los genes que participan en la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina, por tanto, la mutante sencilla *leu3Δ* es bradítrofa (auxotrofa parcial) de estos tres aminoácidos VIL (Kolhaw, 2003). Además, estudios de Alvers y colaboradores demostraron que la mutante sencilla *leu3Δ* también está involucrada en el efecto *lifespan* de *S. cerevisiae*, en

el estudio se observó la importancia de la relación entre la mutante *leu3Δ* y la autofagia, concluyendo que la delección de *LEU3* resulta en una gran extensión del *lifespan* (Alvers *et al.*, 2009). Finalmente, estudios de Garay y colaboradores confirman que la mutante *leu3Δ* aumenta el *lifespan*, es decir cada célula madre produce más células hijas en una mutante sencilla *leu3Δ* con respecto a la cepa silvestre. Por tanto, la disminución de la velocidad de crecimiento y/o el aumento del *lifespan* en la mutante *leu3Δ*, podría deberse a que; i) Leu3 es el factor transcripcional de los genes *ILV2*, *ILV5*, *LEU4*, *LEU9*, *LEU1*, *LEU2* y *BAT1* que codifican para las enzimas mitocondriales involucradas en la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada: valina, isoleucina y leucina, generando una auxotrofia parcial por estos mismos, ii) la ausencia de Leu3 provoca una desregulación de la homeostasis mitocondrial que permite la expansión del *lifespan*. Con respecto a la velocidad de crecimiento de la doble mutante *put3Δleu3Δ*, se puede inferir que este fenotipo se debe a la mutante sencilla *leu3Δ*. El fenotipo *leu3Δ* predomina sobre el de la *put3Δ*.

Otro dato interesante es que la fase *lag* de la mutante sencilla *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* es más largo respecto a la WT y la derivada isogénica *put3Δ* en glutamina y GABA como fuentes de nitrógeno (figura 16a y b), sugiriendo que en un fondo *leu3Δ* la adaptación de la célula al medio de crecimiento se afecta de manera negativa en ausencia de *LEU3*, esto puede deberse a que como se mencionó anteriormente Leu3 está involucrado en la regulación transcripcional de los genes que participan en la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (Kolhaw, 2003). Por otra parte en VIL como fuente de nitrógeno la fase *lag* de la mutante sencilla *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* es similar a la WT y *put3Δ* (figura 16c), esto se debe a que la ausencia de *LEU3* es “complementada” (recupera el fenotipo de la cepa WT) al estar VIL en el medio de crecimiento como fuente de nitrógeno. Por el contrario la fase exponencial en la WT y la mutante sencilla *put3Δ* es alcanzada en menor tiempo respecto a la mutante *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* en glutamina y GABA como fuentes de nitrógeno (figura 16a y b). En VIL la fase exponencial de la mutante sencilla *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* es similar a la WT y la mutante sencilla *put3Δ* (figura 16c).



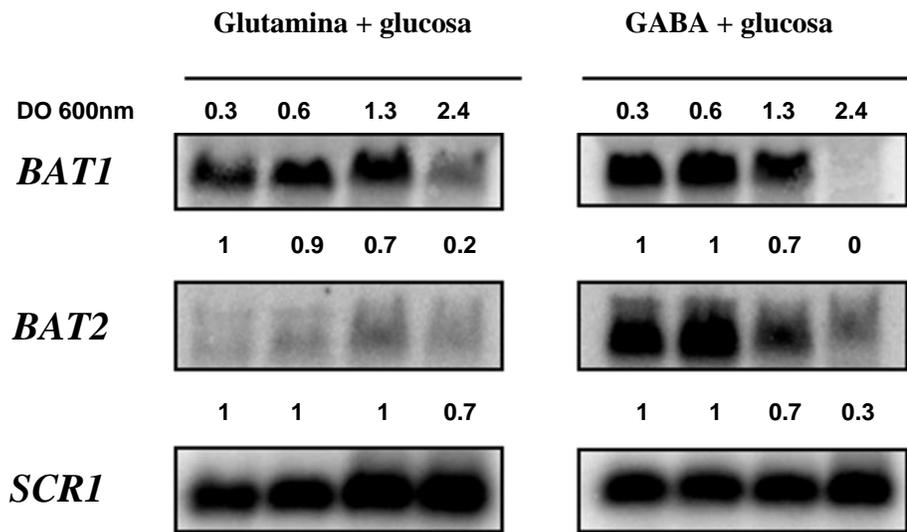
**Figura 16. Curvas de crecimiento de las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ*.** La curva de crecimiento fue determinada en la cepa WT y sus derivadas isogénicas *put3Δ*, *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ*. Las cepas fueron cultivadas en medio mínimo glucosa (2%) como fuente de carbono y glutamina (3%), GABA (3%) o valina (0.15%), isoleucina (0.03%) y leucina (0.1%) (VIL) como fuente de nitrógeno. Los resultados representan el promedio de 3 réplicas biológicas.

### 5.3. La expresión de *BAT2* depende de la calidad de la fuente de nitrógeno

Se determinó la expresión en los transcritos de *BAT1* y *BAT2* en relación a la calidad de la fuente de nitrógeno. Para ello se crecieron cultivos de la cepa silvestre CLA1-2 a 0.3, 0.6, 1.3 y 2.4 de densidad óptica en presencia de una fuente de nitrógeno primaria (glutamina) y secundaria (GABA). Posteriormente se analizó la cantidad de transcrito de ambos genes mediante northern blot.

La cinética de expresión de *BAT1* y *BAT2* se muestra en la figura 17. En glutamina, la expresión de *BAT1* se induce en la fase exponencial y se reprime en la fase estacionaria, mientras que *BAT2* no se expresa en esta condición. En GABA, la expresión de *BAT1* y *BAT2* se induce durante la fase exponencial y se reprime en la fase estacionaria. Por tanto, la expresión de *BAT1* no depende de la calidad de la fuente de

nitrógeno, se expresa tanto en glutamina como en GABA. Sin embargo, la expresión de *BAT2* depende de la calidad de la fuente de nitrógeno, en glutamina se reprime y en GABA se induce, sugiriendo que la expresión de *BAT2* está sujeta a la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR). Los genes regulados por NCR responden a la calidad de la fuente de nitrógeno mediante 4 factores transcripcionales de la familia GATA: Gln3, Gat1, Dal80 y Gzf3 (Cooper, 2002). En presencia de fuentes secundarias de nitrógeno como GABA, prolina y VIL, los factores Gln3 y Gat1 están localizados en el núcleo unidos a sus secuencias GATA, esto permite la activación de genes relacionados con el catabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno. Por el contrario, en fuentes primarias de nitrógeno como amonio o glutamina, el activador Gln3 permanece secuestrado en el citoplasma por la proteína Ure2; los represores Dal80 y Gzf3 residen en el núcleo reprimiendo la expresión de genes relacionados con el catabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno (Zaman *et al.*, 2008). Uno de los genes estudiados y sujetos a NCR es *UGA4*, este gen codifica para la permeasa de gamma-aminobutirato (GABA). Cuando se crece la levadura en ausencia de GABA, la expresión de *UGA4* se reprime por Dal80, mientras que en presencia de GABA, Gln3 entra al núcleo y se une a su secuencia GATA permitiendo la expresión de *UGA4* (Soussi-Boudekou *et al.*, 1997; Cardillo *et al.*, 2010). Al igual que *UGA4*, la expresión de *BAT2* depende de la calidad de la fuente de nitrógeno, se reprime en fuentes primarias y se induce en fuentes secundarias de nitrógeno, además la región regulatoria de *BAT2* contiene secuencias GATA conservadas con las levaduras *Saccharomyces sensu stricto*. Esto sugiere que el mecanismo de regulación transcripcional de *BAT2* está sujeto a NCR.

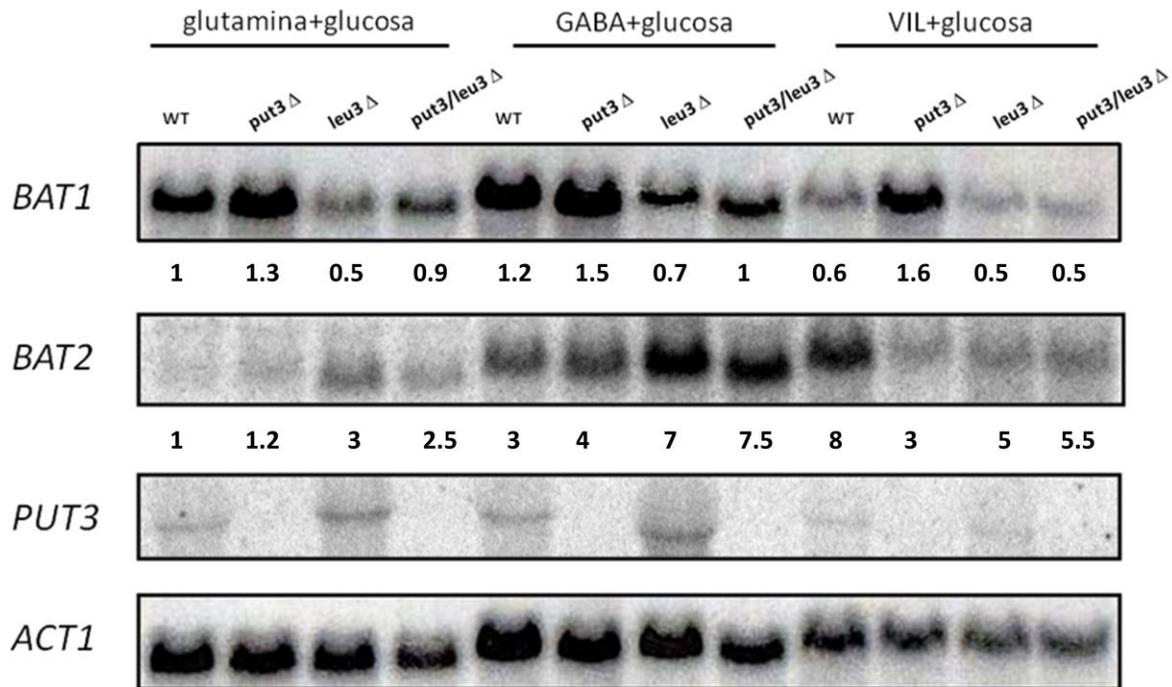


**Figura 17. Perfil de expresión de *BAT1* y *BAT2* en glutamina y GABA como fuente de nitrógeno.** Se obtuvieron muestras de RNA total de la cepa WT cultivada en glucosa como fuente de carbono y glutamina o GABA como fuentes de nitrógeno. Las muestras se obtuvieron a 0.3, 0.6, 1.3 y 2.4 de densidad óptica. Como control de carga, la membrana se hibridó con la sonda *SCR1*. Los números indican el nivel de expresión relativo respecto a la cepa silvestre.

#### 5.4. *PUT3* y *LEU3* regulan la expresión de *BAT1* y *BAT2* de manera antagónica

Para determinar los posibles factores transcripcionales que regulan la expresión de *BAT1* y *BAT2*, se realizó un análisis *in silico* con la región reguladora de ambos genes para identificar los sitios de unión a represores y/o activadores. El promotor de *BAT1* tiene sitios de unión para los reguladores transcripcionales Gcn4, Leu3, Gln3, Adr1 y Put3, mientras que el promotor de *BAT2* tiene sitios para Leu3, Gln3, Abf1, Put3, Nrg1 y Hap. Una observación interesante en el promotor de *BAT2*, es el triplete CCG que comparten las secuencias *UAS<sub>PUT3</sub>* y *UAS<sub>LEU3</sub>* (figura 10). Estos sitios de unión, además, son consenso y conservados en las levaduras *sensu stricto* (figura 9 y 10) sugiriendo su importancia en la regulación de *BAT1* y *BAT2*. En este trabajo nos enfocamos en estudiar la participación de *PUT3* y *LEU3* en la regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*. Con este fin, se construyeron las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ* como se describe en el apartado 4.1 (figura 14). Para determinar la expresión de *BAT1* y

*BAT2* en las mutantes sencillas *put3Δ*, *leu3Δ* y la doble *put3Δleu3Δ* se realizaron ensayos tipo northern blot en glutamina, GABA y VIL, como fuentes de nitrógeno (figura 18). La expresión de *BAT1* se induce en glutamina o GABA y se reprime por su producto final VIL. En un fondo *put3Δ*, la expresión de *BAT1* no es afectada en glutamina y GABA, en tanto que en VIL aumenta la expresión de *BAT1* comparada con la WT cultivada en glutamina, mientras que en un fondo *leu3Δ* o *put3Δleu3Δ*, la expresión de *BAT1* disminuye en glutamina o GABA (figura 18). Por tanto, la expresión de *BAT1* se regula negativamente por la acción de *PUT3* y positivamente por *LEU3*. Estudios recientes mediante inmunoprecipitación de cromatina por PCR en tiempo real (qChIP), han demostrado que Leu3 y Gcn4 se unen al promotor de *BAT1* y activan su transcripción (datos no publicados, González J. *et al.*, 2014). Hasta ahora, no se ha comprobado la unión de Put3 al promotor de *BAT1* mediante qChIPs, sin embargo, es importante demostrar su papel represor en la regulación transcripcional de *BAT1* de manera directa. En la actualidad, se ha determinado que Put3 activa la transcripción de los genes que codifican para las enzimas Put1 y Put2 involucradas en el catabolismo de prolina (Selleck y Majors, 1987). Nuestros datos indican que en un fondo *put3Δ*, la expresión de *BAT1* aumenta significativamente, sugiriendo por primera vez que Put3 actúa como represor.



**Figura 18. La expresión de *BAT1* y *BAT2* se regula de manera antagónica por *PUT3* y *LEU3*.** Se obtuvieron muestras de RNA total de las cepas isogénicas cultivadas en glucosa como fuente de carbono y glutamina, GABA y VIL como fuentes de nitrógeno. Las muestras se obtuvieron en fase de crecimiento exponencial (DO 600 nm 0.4-0.6). Como control de carga, la membrana se hibridó con la sonda de actina *ACT1*. Los números indican el nivel de expresión relativo respecto a la cepa silvestre cultivada en glucosa + glutamina.

La expresión de *BAT2* se reprime en glutamina y se induce en GABA o VIL (figura 18). La represión y la inducción de *BAT2* en glutamina y GABA en un fondo *put3Δ* no son afectadas, sin embargo, la inducción de *BAT2* por VIL disminuye significativamente. Estos datos sugieren que *PUT3* tiene un efecto antagónico en la expresión de *BAT1* y *BAT2*, reprime la expresión de *BAT1* e induce la expresión de *BAT2* bajo la misma condición (VIL). Hasta ahora, Huang y Brandiss, han propuesto que Put3 es una fosfoproteína cuyo estado de fosforilación varía dependiendo de la calidad de la fuente de nitrógeno presente en el medio. Sus experimentos demuestran que los estados de fosforilación de Put3 están correlacionados con la expresión de sus genes blanco, es decir, la mayor expresión de *PUT1* y *PUT2* se presenta en prolina y con ello el mayor

estado de fosforilación de Put3, mientras que en GABA y arginina la expresión de *PUT1* y *PUT2* disminuye, acompañado de un estado menor de fosforilación de Put3 (Huang y Brandiss, 2000). Sin embargo, nuestros datos indican que en VIL, *PUT3* regula negativamente la expresión de *BAT1* y regula positivamente la expresión de *BAT2*, es decir bajo la misma condición fisiológica donde Put3 tiene el mismo estado de fosforilación, para un caso activa y para el otro reprime. Por tanto, Put3 no sólo puede activar la expresión de un gen dependiendo de su estado de fosforilación, sino que también puede activar y reprimir la expresión de genes en la misma condición fisiológica.

La expresión de *BAT2* en glutamina o GABA aumenta significativamente en un fondo *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ*, indicando que *LEU3* regula de manera negativa (figura 18). Sin embargo, la inducción de *BAT2* por VIL, disminuye significativamente en los mismos fondos genéticos, sugiriendo que *LEU3* regula negativamente y/o positivamente la expresión de *BAT2* dependiendo de la condición fisiológica. De acuerdo a la literatura, Leu3 puede actuar como represor o activador dependiendo de la concentración del coactivador  $\alpha$ -IPM producido por las  $\alpha$ -isopropilmalato sintetasas Leu4 y Leu9 (figura 11) (Marobbio *et al.*, 2008). En presencia de  $\alpha$ -IPM, Leu3 actúa como activador, mientras que en ausencia de  $\alpha$ -IPM Leu3 actúa como represor (Sze *et al.*, 1992). En nuestro estudio uno de los principales hallazgos fue dilucidar que *LEU3* regula positivamente y/o negativamente la expresión de *BAT1* y *BAT2* bajo la misma condición fisiológica (figura 18). Por tanto, *LEU3* codifica para una proteína que puede activar y/o reprimir independientemente del  $\alpha$ -IPM, sugiriendo que debe existir otro mecanismo molecular de activación-represión alterno al propuesto por Sze y colaboradores (Sze *et al.*, 1992). Nosotros proponemos que la activación y/o represión de Leu3 podría depender de la acción combinada de varios factores transcripcionales que responden a una señalización particular y que se unen a los promotores de genes que codifican para enzimas que participan en una vía metabólica específica. En este caso, la expresión de *BAT2* corresponde a un perfil de expresión de un gen catabólico que responde a la calidad de la fuente de nitrógeno, se reprime en glutamina y se induce por GABA y VIL. Además, estudios recientes mediante qChIP han demostrado que la expresión de *BAT2* depende de la acción de Leu3 y Gln3. Es probable que Leu3 esté interaccionando con

otras proteínas que le permitan activar o reprimir la expresión de un gen. Otra posibilidad es que Leu3 reclute proteínas y/o complejos remodeladores de cromatina que permiten la activación o represión de la expresión de un gen. Un ejemplo de este tipo en *S. cerevisiae* es la proteína Rap1, que actúa como activador y represor. Su función como activador está relacionada con todos los promotores de genes que codifican proteínas ribosomales y enzimas implicadas en la glicólisis y síntesis de aminoácidos. Sin embargo, cuando Rap1 se une a regiones teloméricas promueve la formación de heterocromatina (Marcand P. *et al.*, 1994; Devlin, C. *et al.*, 1991).

Hasta aquí nuestros datos sugieren que *PUT3* y *LEU3* tienen efectos antagónicos en la expresión de *BAT1* y *BAT2*. De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo y la literatura, se propone el siguiente modelo de regulación transcripcional (figura 19). Los genes *PUT3* y *LEU3* codifican para los factores Put3 y Leu3 que actúan como activadores y/o represores en la expresión de *BAT1* y *BAT2*. En glutamina, Leu3 activa la expresión de *BAT1* y reprime la expresión de *BAT2* (figura 19), en tanto que en VIL Leu3 activa a *BAT2* y Put3 reprime la expresión de *BAT1* e induce la expresión de *BAT2* (figura 19). Resulta interesante que los parálogos *BAT1* y *BAT2* en *S. cerevisiae* se subfuncionalizaron a través de la divergencia de su expresión coordinada por la acción de Put3 y Leu3.

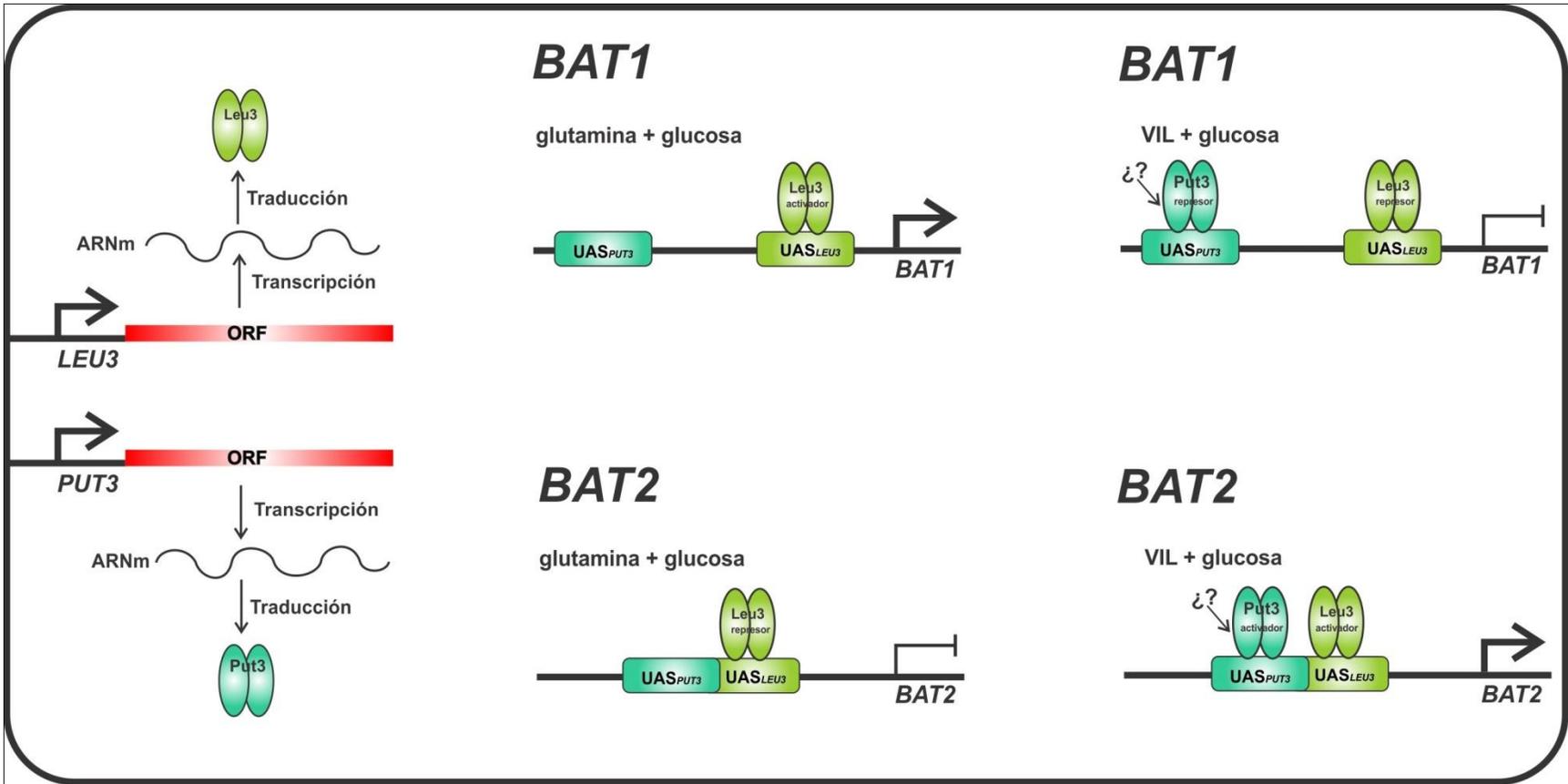


Figura 19. Modelo de la regulación de *BAT1* y *BAT2* por *Put3* y *Leu3*.

---

---

# Conclusiones

---

---

- La velocidad de crecimiento de la mutante sencilla *put3Δ* es mayor respecto a la cepa WT, *leu3Δ* y la doble mutante *put3Δleu3Δ* en glutamina, GABA y VIL.
- La fase *lag* de la curva de crecimiento es mayor en un fondo genético *leu3Δ* y *put3Δleu3Δ* en glutamina y GABA.
- La fase exponencial de la curva de crecimiento se alcanza más rápido en la cepa WT y *put3Δ* en glutamina y GABA.
- La expresión de *BAT1* en fuentes de nitrógeno primarias y secundarias depende positivamente de *LEU3*.
- La expresión de *BAT1* se reprime en presencia de los tres aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), *BAT1* se desreprime en un fondo *put3Δ*.
- El perfil de expresión de *BAT1* corresponde al de un gen biosintético.
- La expresión de *BAT2* depende de la fuente de nitrógeno: en fuentes secundarias se induce y en fuentes primarias se reprime. La inducción en presencia de los tres aminoácidos (valina, leucina e isoleucina) depende positivamente de *PUT3* y *LEU3*, mientras que la represión en glutamina es aliviada en un fondo *leu3Δ*. Esta activación-represión posiblemente depende de cambios en la organización de la cromatina.
- La expresión de *BAT2* alcanza su nivel más alto en presencia de los tres aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina).
- El perfil de expresión de *BAT2* corresponde al de un gen catabólico.
- *BAT1* y *BAT2* han diversificado su expresión mediante la regulación positiva y/o negativa de *PUT3* y *LEU3*.

## 7.1. Perspectivas

### **Determinación de la unión de Put3 y Leu3 en los promotores de *BAT1* y *BAT2* bajo diferentes condiciones fisiológicas**

En este trabajo se determinó únicamente si *PUT3* y *LEU3* regulan la expresión de *BAT1* y *BAT2*. Sería interesante determinar bajo qué condiciones fisiológicas Put3 y Leu3 se unen al promotor de *BAT1* y *BAT2* mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

### **Identificación de los genes blanco que se activan y/o reprimen por Put3 y Leu3**

Sería interesante identificar qué otros genes blanco son regulados por Put3 y Leu3. Para ello se podría analizar el transcriptoma de *S. cerevisiae* en las mutantes *put3Δ* y *leu3Δ* mediante secuenciación total del RNA (RNA-Seq). También sería interesante analizar la unión de Put3 y/o Leu3 en el genoma de *S. cerevisiae* mediante secuenciación total de los productos obtenidos por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-Seq).

---

---

# Apéndice

---

---

## 7.1. Genotipo de las construcciones, plásmidos y oligonucleótidos utilizados

**Tabla I.** Construcciones utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
Cla1-2	MAT $\alpha$ <i>PUT3 LEU3 ura3 leu2::LEU2</i>	Quezada <i>et al.</i> , 2008.
<i>put3</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ <i>put3</i> $\Delta$ :: <i>kanMX4 LEU3 ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
<i>leu3</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ <i>leu3</i> $\Delta$ :: <i> nat PUT3 ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
<i>put3</i> $\Delta$ <i>leu3</i> $\Delta$	MAT $\alpha$ <i>put3</i> $\Delta$ :: <i>kanMX4 leu3</i> $\Delta$ :: <i>nat ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo

**Tabla II.** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pFA6a-kanMX6	Plásmido que contiene un módulo de resistencia para la selección de transformantes en <i>S. cerevisiae</i> . Este módulo <i>KanMX</i> contiene el ORF <i>kan<sup>r</sup></i> de <i>E. coli</i> . Permite la selección eficiente de transformantes resistentes al antibiótico geneticina (G418).	Wach <i>et al.</i> , 1994.
p4339	Plásmido que contiene un módulo de resistencia para la selección de transformantes en <i>S. cerevisiae</i> . Este módulo <i>KanMX</i> contiene un gen de resistencia que permite la selección eficiente de transformantes resistentes al antibiótico nourseotricina (NAT).	Goldstein y McCusker, 1999.

**Tabla III.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

<b>Código</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
J1	Fo kan-h <i>PUT3</i>	5' GGT CCA ACT AAC TCA TTG ATA GGA TAA TTG CAG TGA TCT TAA CGA GTT TAC GTA CGC TGC AGG TCG AC 3'
J2	Re kan-h <i>PUT3</i>	5' CAT AAG AAA ACA AAG AAA TCA GTA TTT TCT TCT TTG TCT TTG TAA TGG TGA TCG ATG AAT TCG AGC TCG 3'
J3	Fo conf- <i>PUT3</i>	5' GGC AAT GAG GTG GCG AAT ATT 3'
J4	Re conf- <i>PUT3</i>	5' AGG CTA CGT AAA TGA GCT GTC 3'
J5	Fo conf- <i>LEU3</i>	5' GCA ATT TGA GGA ACC TTC AAC C 3'
J6	Fo sonda <i>BAT1</i>	5' ATC AAT AGT AAG GCT CGC AAA CCG CCC 3'
J7	Re sonda <i>BAT1</i>	5' CAT GTA AAG TCC AGC GAG ATA CCT TGG C 3'
J8	Fo sonda <i>BAT2</i>	5' CAA ACA TCT TCG AAC GTG AAA ACC TGC CTC TGA GGG 3'
J9	Re sonda <i>BAT2</i>	5' GTC CTT GAT ACC GAT AGG CCA GC 3'
J10	Fo sonda <i>PUT3</i>	5' GGT CCA ACT AAC TCA TTG ATA GGA TAA TTG CAG TGA TCT TAA CGA GTT TA 3'
J11	Re sonda <i>PUT3</i>	5' CAC CAT TAC AAA GAC AAA GAA GAA AAT ACT GAT TTC TTT GTT TTC TTA TG 3'
J12	Fo sonda <i>ACT1</i>	5' GTT TTG CCG GTG ACG AC 3'
J13	Re sonda <i>ACT1</i>	5' CTT TCG GCA ATA CCT GGG 3'
J14	Re conf-NAT	5' TAA GCC GTG TCG TCA AGA GTG G 3'

## 7.2. Medios de cultivo y soluciones utilizadas

### 4. 1. Medio YPD

Extracto de levadura	1%
Peptona de caseína	2%
Dextrosa anhidra	2%
Agar (medio sólido)	2%

### 4. 2. Medio mínimo (para preparar 1 L)

Vitaminas 1000X	1 mL
Trazas 1000X	1 mL
Sales	20 mL
Dextrosa	20 g
Sulfato de amonio	5 g
Agar (medio sólido)	25 g

### 4. 3. Solución A para extracción de DNA

Tritón X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8	10 mM
Na-EDTA	1 mM

### 4.4. Solución B para extracción de DNA. Se prepara al momento.

Fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)

### 4. 5. Agua DEPC (agua libre de RNAsas)

Dietilpirocarbonato 0.1%

Se agita al menos 4 horas y se esteriliza en autoclave.

### 4. 6. Solución TES

Tris-HCl 10 mM, pH 7.5

EDTA 10 mM, pH 8

SDS 0.5%

Preparar a partir de las soluciones stock (en agua DEPC), aforar y esterilizar en autoclave.

4. 7. Acetato de sodio 3M, pH 5.3

Disolver en agua con DEPC, ajustar pH y esterilizar en autoclave.

4. 8. MAE 10X

MOPS

Acetato de sodio 50 mM

EDTA 10 mM

Ajustar pH con NaOH 10N, esterilizar por filtración y conservar en refrigeración protegido de la luz.

4. 9. Tampón de muestra RNA 1.25x

Formamida desionizada     2.2 mL

Formaldehido                 0.8 mL

MAE 10X                         0.5 mL

Glicerol al 80%                0.4 mL

Azul de bromofenol al 2%   100 µL

Mezclar y conservar a -20 °C.

4. 10. Bromuro de etidio al 1%

Disolver en agua con DEPC y conservar a temperatura ambiente.

4. 11. SSC 20X

NaCl                                175.3 g

Citrato de sodio                88.2 g

Aforar a un litro con agua bidestilada y conservar a temperatura ambiente.

4. 12. Solución de prehibridación

SDS 10%                            7 mL

NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M, pH 7.2            3 mL

EDTA 0.5M                         10 µL

4. 13. Buffer de bajo rigor

SSC 2x

SDS 0.1%

4. 14. Buffer de alto rigor

SSC 0.15%

SDS 0.1%

4. 15. Buffer TE 10X, pH 7.5

Tris-HCl 100 mM, pH 7.5      10 mL

EDTA 10 mM, pH 8.0          2 mL

---

---

# Referencias

---

---

- Alvers L. Ashley, Fishwick K. Laura, Wood S. Michael, Hu Doreen, Chung Sun Hye, Dunn A. William y Aris P. John. 2009. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 8: 353-369.
- Boer Viktor M, Daran Jean-Marc, Almering Marinka J. H., Winde Johannes H y Pronk Jack T. 2006. Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen-and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research*. 5: 885-897.
- Brandis, M. C. 1987. Evidence for positive regulation of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 117:429-435.
- Cardillo Sabrina Beatriz, Moretti Mariana Bermúdez y García Correa Susana. 2010. Uga3 and Uga35/Dal81 Transcription Factors Regulate UGA4 Transcription in Response to Aminobutyri Acid and Leucine. *Eukaryotic cell*. 9:1262-1271.
- Chomczynski. P. y Sacchi. N. 2006. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocynato-phenol-chloroform extraction: Tewnty-something years on. *Nature Protocols*. 2: 581-585.
- Colón Maritrini, Hernández Fabiola, López Karla, Quezada Héctor, González James, López Geovani, Aranda Cristina y González Alicia. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases. Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. *Plos One*. 6:1-13
- Conant, C. Gavin. Y Wolfe. H. Kenneth. 2008. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature. Reviews*. 9: 938-950.
- Conrad Bernard y E. Anronarakis Stylianos. 2007. Gene Duplication: A Drive for Phenotypic Diversity and Cause of Human Disease. *Annu. Rev. Genom. Human. Genet*. 8: 174-35.
- Cooper TG. 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev*. 26: 223-38.

- Cooper, T. G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (Strathern, J. N., Jones, E. W. y Broach, J. R., Eds), pp 39-99. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- DeLuna Alexander, Avendaño Amaranta, Riego Lina y González Alicia. 2001. NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC*. 276: 43775-43783.
- Devlin, C. Tice-Baldwin K. Shore D. y Arndt KT. 1991. RAP1 is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast HIS4 gene. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3642–3651.
- Dujon B, 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends. Genetics.* 7: 263-270.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S. 2004. Genome evolution in yeast. *Nature*. 430: 35-44.
- Eden Amir, Simchen Giora y Benvenisty. 1996. Two Yeast Homologs of ECA39, a Target for c-Myc Regulation, Code for Cytosolic and Mitochondrial Branched-chain Amino Acid Aminotransferases. *JBC*. 271: 20242- 20245.
- Eelko, G. ter Schure., Natal. A. W. van Riel y Theo. Verrips. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 27: 67-83.
- Fitzgerald Mary X, Rojas Jeannir R, Kim John M. y Kohlhaw Gunter B. 2006. Structure of a Leu3-DNA Complex: Recognition of Everted CGG Half-Sites by a Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> Binuclear Cluster Protein. *FEMS Letters*. 14: 725-735.
- Friden, P., y P. Schimmel. 1988. LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2690-2697.
- Friden, P., y Schimmel P. 1987. LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a factor for control of RNA levels of a group of leucine-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2708-2717.
- Garay Erika, Campos E. Sergio, González de la Cruz Jorge, Gaspar P. Ana, Jinich Adrian y DeLuna Alexander. 2014. High-Resolution Profiling of Stationary-Phase

Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLOS GENETICS*. 10:1-17.

- Gietz R. D. y Woods R. A. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Meth. Enzymol.* 350: 87-96.
- Glenn A. Maston, Sara K. Evans, y Michael R. Green. 2006. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:29-59.
- Godard, Patrice., Urrestarazu, Antonio., Vissers, Stéphan., Kontos, Kevin., Bontempi, Gianluca., van Helden, Jacques., y Andre Bruno. 2007. *Molecular and Cellular Biology.* 27:3065-3086.
- Goldstein Alan L. y McCusker John N. 1999. Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:1541-1553.
- Gordon Jonathan L., Kevin P. Byrne y Kenneth H, Wolfe. 2011. Mechanisms of Chromosome Number Evolution in Yeast. *Plos Genetics.* 7:1-13.
- Hahn Stefen y T. Young Elton. 2011. Transcriptional Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription Factor Regulation and Function, Mechanisms of Initiation, and Roles of Activators and Coactivators. *Genetics.* 189: 705-736.
- Harbison CT<sup>1</sup>, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, Jennings EG, Zeitlinger J, Pokholok DK, Kellis M, Rolfe PA, Takusagawa KT, Lander ES, Gifford DK, Fraenkel E, Young RA. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature.* 431:99-104
- Hazelwood Lucie A. Daran Marc Jean, Van Maris Antonius J. A., Pronk, Jack T. y Dickinson Richard J. 2006. The Ehrlich Pathway for fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology.* 74: 2259-2266.
- Hoffman Charles S. y Winston Fred. 1987. A ten-minute preparation from yeast efficiently releases autonomus plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57: 267-272.

- Huang HL y Brandiss MC. 2000. The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source. *Mol Cell Biol.* 20: 892-899
- Jacob F. y Monod J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-356.
- Jansonius, J. N. 1998. Structure, evolution and action of vitamin B6 dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol* 8: 759-769.
- Kellis M. Birren BW. Lander ES. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 428: 617-624.
- Kispal Gyula, Steiner Harald, Court Deborah A. Rolinski Boris y Lill Roland. 1996. Mitochondrial and Cytosolic Branched-chain Amino Acid Transaminases from Yeast, Homologs of the myc Oncogene-regulated Eca39 Protein. *JBC.* 271: 24458-24464.
- Kohlhaw, G. B. 2003. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 1-15.
- Ljungdahl O. Perr y Daignan-Fornier Bertrand. 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190:885-929.
- Magasanik B y Kaiser CA. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 290: 1-18.
- Marcand, P. Gilson E. y Shore D. 1994 A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science.* 275: 986-990
- Marczak, J. E. y Brandiss, M. C. 1991. Analysis of constitutive and noninducible mutations of the PUT3 transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2609-2619.
- Marobbio Carlo M. T., Giannuzzi Giulia, Paradies Eleonora, Pierri Ciro L. y Palmieri Ferdinando. 2008.  $\alpha$ -Isopropylmalate, a Leucine Biosynthesis Intermediate in Yeast, Is Transported by the Mitochondrial Oxacetate Carrier. *JBC.* 283:28445-28453.
- Mell Chang Joshua y M Burgess Sean. 2002. Yeast as a Model Genetic Organism. *Nature.* 1-8.

- Mortimer RK, Johnston JR. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature*. 183: 1742-1751.
- Ohno. 1970. *S. Evolution by Gene Duplication*. Allen and Unwin. London.
- Paul F. Cliften, S. Fulton Robert, K. Wilson Richard y Johnston Mark. 2006. After the duplication: Gene Loss and Adaptation in *Saccharomyces* Genomes. *Genetics*. 172: 863-872.
- Piskur Jure, Rozpedowska Elzbieta, Polakova Silvia, Merico Annamaria y Compagno Concetta. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in genetics*. 22: No 4.
- Prince VE y Pickett FB. 2002. Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet*. 3: 827-837.
- Quezada Héctor, Aranda Cristina, DeLuna Alexander, Hernández Hugo, Calcagno Mario L, Marín-Hernández y González Alicia. 2008. Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 154:1656-1667.
- Sambrook. J. y Russell. D. W. 2001. Northern blotting, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 7.42-7.45. CSHL New York. USA. USA 3rd ed.
- Schleit Jennifer, Johnson C. Simon, Bennett F. Christopher, Simko Marissa, Trongtham Natalie, Castanza Anthony, Hsieh J. Edward, Moller M. George, Wasko M. Brian, Delaney R. Joe, Sutphin L. George, Carr Daniel, Murakami J. Christopher, Tocchi Autumn, Xian Bo, Chen Weiyang, Yu Tao, Goswami Sarani, Higgins Sean, Homberg Mollie, Jeong Ki-Soo, Kim R. Jin, Klum Shannon, Liao Eric, Lin S. Michael, Lo Winston, Miller Hillary, Olsen Brady, Peng J. Zhao, Pollard Tom, Pradeep Prarthana, Pruett Dillon, Rai Dilreet, Ros Vanessa, Singh Minnie, Spector L. Benjamin, Wende Helen Vander, An H. Elroy, Fletcher Marissa, Jelic Monika, Rabinovitch S. Peter, MacCoss J. Michael, Han, J. Jing-Dong, Kennedy K. Brian y Kaeberlein Matt. 2013. Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction. *Aging Cell*. 12: 1050-1061
- Schoondermark-Stolk Sung A. Tabarnero Maria, Chapman John, ter Schure Eelko G, Verrips Theo, Verkleij Arie y Boonstra Johannes. 2005. Bat2p is essential in

*Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Research*.5:757-766.

- Selleck, S. B. y Majors, J. E. 1987. In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol. Cell Biol.* 7: 3260-3267.
- Sellick Christopher A. y Richard J. Reece. 2003. Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline. *EMBO journal.* 22: 5147-5153.
- Seoighe Cathal y Kenneth H Wolfe. 1999. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Elsevier.* 2: 548-554.
- Seoighe Keogh, R. S. and K. H. Wolfe. 1998. Evolution of gene order and Chromosome Number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and Related Fungi. *Yeast.* 14: 443-457.
- Sherman F. (1998). An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
- Sinclair David, Mills Kevin y Guarante Leonard. 1998. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 533-560.
- Soussi-Boudekou. 1997. Gzf3, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 23(6):1157-1168.
- Swaminathan Kunchithapadam, Flynn Paul, Reece J, Richard y Marmo Ronen. 1997. Crystal structure of a PUT3-DNA complex reveals a novel mechanism for DNA recognition by a protein containing a ZN2Cys6 binuclear cluster. *Nature.* 4:751-759.
- Sugino RP e H. Innan. 2006. Selection for more of the same product as a force to enhance concerted evolution of duplicated genes. *Trends Genet.* 22: 642-644.
- Sze, J., M. Woontner, J. Jaehning y G. B. Kohlhaw. 1992. *In vitro* transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on  $\alpha$ -isopropylmalate. *Science.* 258: 1143-1145.
- Thompson Dawn Anne y Aviv Regev. 2009. Fungal regulatory evolution: cis and trans in the balance. *FEBS Letters.* 583:3959-3965.
- Tirosh Itay y Naama Barkai. 2007. Comparative analysis indicates regulatory neofuncionalization of yeast duplicates. *Genome Biology.* 8: R50.

- Tuch Brian B., Halo Li y Alexander D. Johnson. 2008. Evolution of Eukaryotic Transcription Circuits. *Science*. 319: 1797-1799.
- Wach Achim, Brachat Arndt, Pohlmann Rainer y Philippsen Peter. 1994. New Heterologous Modules for Classical or PCR-based Gene Disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10:1792-1808.
- Wiame, J. M., Grenson, M. y Arst Jr., H. N. 1985. Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 20: 1-88.
- Zaman. Shadia., Im Lippman. Soyeon., Zhao. Xin., y Broach. James. 2008. How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42: 2.1-2.55.
- Zhang, J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol.* 18: 292-298.