



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**“DOS PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REPRESIÓN
CATABÓLICA NITROGENADA ESTÁN RELACIONADAS CON
LA RESISTENCIA A ZINC EN *Saccharomyces cerevisiae* ”**

Tesis que presenta

Q.F.B. Claudia Beatriz Peresson Rivera.

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biología Molecular

Bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., 13 de julio de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**DOS PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REPRESIÓN CATABÓLICA NITROGENADA ESTÁN RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A ZINC EN *Saccharomyces cerevisiae***” para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por la **QFB Claudia Beatriz Peresson Rivera** y aprobada el **13 de julio de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

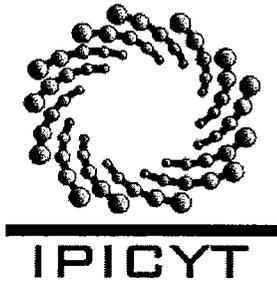
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís.



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. A.C., bajo la dirección de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 201833 y el apoyo del proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales-SEP-2005-49039 y del Macroproyecto “Tecnologías para la Universidad de la Información y la Computación”, UNAM.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 040 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2007, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Claudia Beatriz Peresson Rivera

sobre la Tesis intitulada:

Dos Proteínas que Participan en la Represión Catabólica Nitrogenada están Relacionadas con la Resistencia a Zinc en Saccharomyces cerevisiae

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

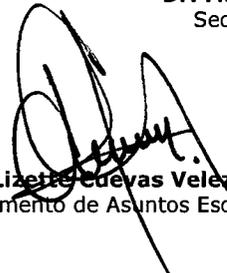
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes julio de 2007.


Dr. Marcial Borjilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
ÍNDICE	v
DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	1
2. Metabolismo de nitrógeno	1
2.1 Metabolismo central de nitrógeno en levadura	
2.2 Represión catabólica nitrogenada	
2.3 Factores transcripcionales GATA	
2.3.1 Gln3p	
2.3.1.1 Fosforilación de Gln3p y su localización nuclear	

2.3.2	Gat1p/Nil1p	
2.3.3	Los represores de las cajas GATA: Dal80p/Uga43p y Nil2p/Gzf3p/Deh1	
2.4	El quinto elemento: Ure2p	
3.	Transporte de zinc en levadura	9
3.1	Clases de transportadores de zinc en levadura	
3.1.1	El regulón Zap1	
3.1.2	Transportadores membranales de zinc	
3.1.3	Transportadores vacuolares de zinc	
II.	ANTECEDENTES	16
III.	OBJETIVO	17
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	
1.	Cepas de laboratorio	18
2.	Medios de cultivo	18
2.1	YPD	
2.2	YPD/Geneticina	
2.3	YPD/Geneticina/Nourseotricina	
2.4	SN/glutamina/uracilo/leucina	

2.5 SN/amonio/uracilo/leucina	
2.6 SN/prolina/uracilo/leucina	
3. Soluciones	21
3.1 Sales 50X	
3.2 Vitaminas 1000X	
3.3 Trazas (suspensión) 1000X	
3.4 Sulfato de zinc 1M	
4. Verificación de la presencia de los marcadores de selección en las mutantes estudiadas	22
5. Curvas de crecimiento	23
6. Resistencia a metales	24
6.1 Concentración máxima inhibitoria y concentración letal de sulfato de zinc en la cepa parental	
6.2 Evaluación de la resistencia a sulfato de zinc en las cepas cultivadas en YPD líquido	
6.3 Evaluación de la resistencia a sulfato de zinc en las cepas cultivadas en SN líquido con diferentes fuentes de nitrógeno	

V. RESULTADOS	
1. Crecimiento de las cepas en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno	28
1.1 Cálculo de los tiempos de duplicación de las cepas en diferentes fuentes de nitrógeno	
2. 4 mM y 8 mM son las concentraciones inhibitoria y letal de sulfato de zinc en la cepa parental cultivada en YPD líquido	34
3. Resistencia a zinc de las cepas cultivadas en YPD líquido y goteadas en SN con diferentes fuentes de nitrógeno	35
4. 4 mM y 8 mM son las concentraciones inhibitoria y letal de sulfato de zinc en la cepa parental cultivada en SN líquido con diferentes fuentes de nitrógeno	39
5. Las cepas <i>ure2Δ</i>, <i>gln3Δ</i>, <i>ure2Δ gln3Δ</i> y <i>gln3Δ gat1Δ</i> son resistentes a sulfato de zinc en SN/amonio y SN/prolina	40
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
1. Crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivo	46
2. Resistencia a metales	50
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. PERSPECTIVAS	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
X. ANEXOS	62

DEDICATORIA

A mis papás, Hugo y Maricarmen; a Toño, a Victoria y a mis bebés, Emilia y Diego

AGRADECIMIENTOS

Lina, por tu entrega, paciencia, disposición, disciplina, comprensión. Pero sobre todo por tu amistad. No hay palabras para expresar el infinito agradecimiento que tengo contigo por enseñarme a trabajar, a pensar, a discutir; por permitirme proponer, idear, experimentar. A medida que pasa el tiempo, me siento más satisfecha de haberte pedido que fueras mi directora de tesis.

Doctor Carlos Barajas, gracias por haberme impulsado a luchar por alcanzar mis objetivos, siempre con la frente en alto.

Ire y Cano, la vida siempre te da oportunidades que no puedes dejar pasar. Una de ellas fue haberlos tenido como mis profesores, y como un gran soporte en la realización de mi tesis. Pero la mayor oportunidad no fue haberlos conocido en el ámbito profesional, sino en el personal. Gracias por haber estado siempre abiertos a escuchar -y transmitir- tanto conocimientos, como experiencias de vida.

Al doctor Ángel Alpuche por haber formado parte de mi formación académica y de mi comité de tutores, y por hacer que una relación de trabajo fuera siempre tan amena y divertida.

Vicky, Jacinto, Lluvia, Isra, gracias por el gran equipo de estudio que formamos. Son parte importantísima de lo que he aprendido en estos últimos dos años. Gracias, sobre todo, por su amistad y entrega incondicionales.

Vero, Mayra, Marce, Candy, Gris, Javier, Gaby, y Juan Manuel por su continua disponibilidad para ayudarme en el laboratorio y escucharme en mis seminarios.

A todos mis profesores por los conceptos de ciencia transmitidos; agradezco más a aquéllos que me brindaron su amistad y cariño.

A Mireya, Cytllalic y Meche, por siempre estar dispuestas a ayudarme en todo lo que necesité para mis experimentos.

A mis suegros, Javier y Conchita; a mi negro. Sin su apoyo, esta tesis no se hubiera logrado. Los quiero.

A mis hijos, Emilia y Diego. Chiquitos, ustedes son el motor que me impulsa a seguir y seguir y seguir. Gracias por la paciencia y por aguantar el ritmo.

Papi, gracias por estar tan cerca, por enseñarme a buscar y encontrar lo que realmente me gusta hacer. Éste es el resultado de tu apoyo incondicional a mis sueños, a mis luchas, a mis logros y a mis fracasos.

Mami, tengo mucha gente a quien agradecerle, pero definitivamente tú eres el soporte de todo lo que he logrado. Éste es un escalón más que subí gracias a ti, a tu eterna entrega y a tu infinito amor por mí.

RESUMEN

DOS PROTEÍNAS QUE PARTICIPAN EN LA REPRESIÓN CATABÓLICA NITROGENADA ESTÁN RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A ZINC EN *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tiene la capacidad de crecer en diferentes fuentes de nitrógeno, pero no lo hace a la misma velocidad, y esto se debe a que existe una regulación transcripcional diferencial en ciertos grupos de genes. En una buena fuente de nitrógeno (como glutamina), los genes regulados por un mecanismo conocido como represión catabólica nitrogenada (NCR) se transcriben de manera basal; en cambio, si las células crecen en una mala fuente de nitrógeno (como prolina), estos genes, que en general codifican para permeasas y enzimas catabólicas, elevan considerablemente su expresión.

La transcripción de los genes regulados por NCR depende principalmente de dos factores transcripcionales de tipo GATA: Gln3p y Gat1p. Cuando la célula crece en una buena fuente de nitrógeno, la mayor parte de las moléculas de Gln3p, y probablemente de Gat1p, se encuentra retenida en citoplasma por una proteína llamada Ure2p. Si la levadura crece en una mala fuente de nitrógeno, Gln3p y Gat1p entran al núcleo e incrementan la transcripción de sus genes blanco.

En experimentos de microarreglos que evaluaron la respuesta de los genes a distintas fuentes de nitrógeno en mutantes *gln3Δ*, *gln3Δ gat1Δ* y *ure2Δ* se obtuvieron, de manera inesperada, un grupo de genes que codifican para transportadores de zinc, que en algunos casos fueron inducidos, y en otros reprimidos. Además, se ha descrito que una mutante *ure2Δ* es más resistente a zinc que la cepa parental al crecer en glutamina, glutamato, amonio y prolina. Sin embargo, no se conoce el mecanismo de regulación transcripcional de estos transportadores en diferentes fuentes de nitrógeno, ni el posible mecanismo de resistencia a zinc dado por Gat1p, Gln3p y/o Ure2p ya sea de manera directa o indirecta.

Los resultados de este trabajo confirman que Ure2p es un regulador negativo en la resistencia a zinc cuando *S. cerevisiae* crece en glutamina, amonio o prolina como fuente de nitrógeno. Gln3p parece no influir en la resistencia a zinc en glutamina; sin embargo, conforme la calidad de la fuente de nitrógeno va disminuyendo, este factor transcripcional adquiere una función importante como regulador negativo en la resistencia a zinc.

PALABRAS CLAVE: Represión Catabólica Nitrogenada, Factores GATA, Gln3p, Gat1p, Ure2p, Regulón Zap1

ABSTRACT

TWO PROTEINS OF THE NITROGEN CATABOLITE REPRESSION ARE INVOLVED IN ZINC RESISTANCE IN *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae grows in a wide variety of nitrogen sources, but its growth rate differs due to the regulatory systems that keep some genes in their basal states when cells grow in a good nitrogen source. In glutamine, for example, some genes are regulated by a mechanism known as NCR (Nitrogen Catabolite Repression), and their expression is low under this condition. Instead, when cells are grown in proline, a poor nitrogen source, those genes that encode for permeases and catabolite enzymes for poor nitrogen sources are generally transcribed at high levels.

NCR gene transcription depends on two GATA factors, Gln3p and Gat1p that bind to promoters in their target genes. When cells are growing in a good nitrogen source Gln3p, and probably Gat1p, is retained in cytoplasm by a protein called Ure2p. In proline, Gln3p and Gat1p enter into the nucleus and increase the transcription of their target genes.

Microarray experiments performed to analyze gene expression patterns in different nitrogen sources of *ure2Δ*, *gln3Δ* and *gln3Δ gat1Δ* mutants versus a wild type strain, showed unexpectedly that some genes encoding for zinc transporters were induced or in some cases, repressed. Furthermore, *ure2Δ* mutant grown in glutamine, glutamate, ammonia or proline is more resistant than the wild type strain to 15 mM of zinc sulphate. Nevertheless, to date the transcriptional regulation mechanism of zinc transport in response to different nitrogen sources is not known, nor the possible interaction between Gln3p, Gat1p and/or Ure2p regarding to cell zinc resistance.

The results of this work show that Ure2p is a negative regulator of zinc resistance in cells grown in all nitrogen sources analyzed. Although Gln3p seems to have no relation with zinc resistance in glutamine, this factor appears to be a negative regulator when cells grow in ammonia or proline.

KEY WORDS: Nitrogen Catabolite Repression, GATA Factors, Gln3p, Gat1p, Ure2p, Zap1 regulon.

I. INTRODUCCIÓN

1. SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO MODELO DE ESTUDIO

Saccharomyces cerevisiae es el eucariote más estudiado, ya que tiene diversas características que lo convierten en un modelo ideal para análisis genéticos y moleculares: a) es un organismo unicelular de rápido crecimiento y con un genoma relativamente pequeño (aproximadamente 6,000 genes en 16 cromosomas); b) puede dividirse sexual (apareamiento y meiosis) y asexualmente (gemación); c) los medios de crecimiento están definidos; d) se puede cultivar como haploide o como diploide; e) hacer mutaciones es relativamente sencillo ya que presenta un sistema de transformación versátil y estable.

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante ha hecho a la levadura particularmente accesible a la clonación de genes y a las técnicas de ingeniería genética. Estas metodologías se han explotado extensamente en el análisis de la regulación de la expresión génica, el estudio de la interacción, estructura y función de las proteínas, la estructura cromosomal, y otros procesos celulares altamente conservados entre los organismos eucariotes (Sherman, 1998)

2. METABOLISMO DE NITRÓGENO

Saccharomyces cerevisiae tiene la capacidad de crecer en diferentes fuentes de nitrógeno (L-aminoácidos, D-aminoácidos, pirimidinas, purinas, poliaminas, amidas, aminas y urea), pero su velocidad de crecimiento es distinta, y esto se debe a que existe una regulación transcripcional diferencial en ciertos grupos de genes.

Un compuesto nitrogenado que puede transportarse rápidamente al interior celular y degradarse en pocos pasos a glutamato y/o amonio sin causar toxicidad en la célula, es considerado como buena fuente de nitrógeno (Cooper, 1982). Las mejores fuentes de nitrógeno para *S. cerevisiae* son la glutamina, la asparagina, el glutamato, la mezcla de aminoácidos y péptidos de la Bactopeptona comercial, y en algunas cepas, el amonio. La prolina, el ácido γ -amino butírico (GABA), la urea,

las purinas y las poliaminas, entre otros, son clasificados como malas fuentes de nitrógeno (Messenguy *et al.*, 2006).

2.1 METABOLISMO CENTRAL DE NITRÓGENO EN LEVADURA

Cualquier fuente de nitrógeno que *S. cerevisiae* pueda incorporar al interior celular, siempre debe convertirse en glutamato y glutamina (Cooper, 1982), ya que estos dos aminoácidos son los donadores de nitrógeno para formar todos los compuestos nitrogenados intracelulares (Magasanik, 1992). Tanto el glutamato como la glutamina pueden sintetizarse directamente utilizando amonio. La glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (GDH-NADPH) forma glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato (Nagasu y Hall, 1985) y, la glutamino sintetasa (GS) forma glutamina a partir de glutamato y amonio (Mitchell y Magasanik, 1983). Entonces, en realidad todas las fuentes de nitrógeno tienen que convertirse en amonio y glutamato, y a partir de ellos, biosintetizar los compuestos nitrogenados necesarios. En ciertos casos, el glutamato puede degradarse a amonio y α -cetoglutarato, a través de la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD (GDH-NAD) (Cooper, 1982; Magasanik, 1992) (Fig. 1).

S. cerevisiae puede utilizar la glutamina y el glutamato como fuentes de nitrógeno. Cuando la célula crece en glutamato, la GS sintetiza glutamina, utilizando el amonio que genera la GDH-NAD a partir de glutamato (Magasanik, 1992). Cuando la glutamina es la única fuente de nitrógeno en que la célula crece, entonces el glutamato se sintetiza por medio de la glutamato sintasa (GOGAT) que utiliza como sustratos a la glutamina y al α -cetoglutarato para formar 2 moléculas de glutamato (Cogoni *et al.*, 1995) (Fig. 1). La interconversión celular entre amonio, glutamina y glutamato se conoce como metabolismo central de nitrógeno (ter Schure *et al.*, 2000).

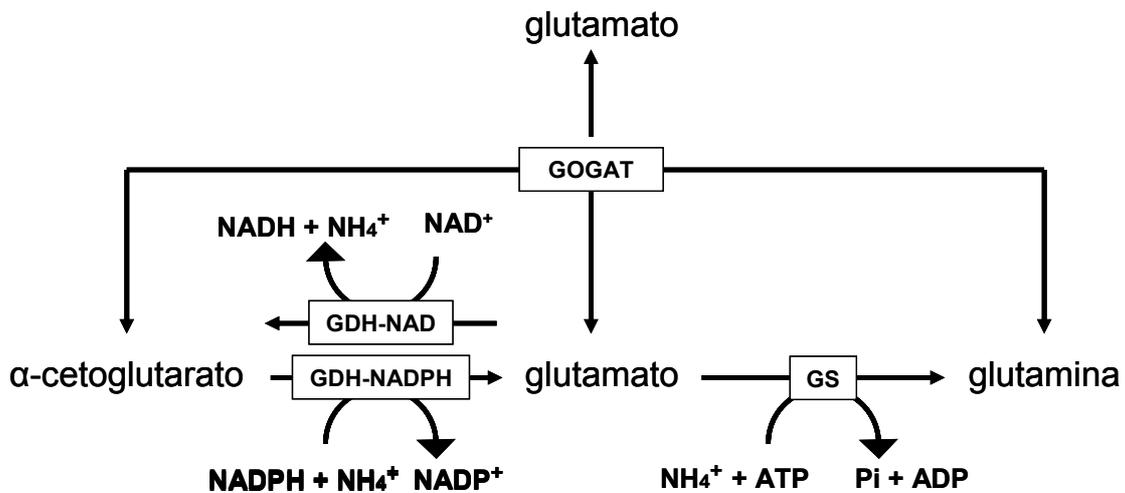


Figura 1. Metabolismo central del nitrógeno. Enzimas que participan en la interconversión de amonio, glutamato y glutamina. GS: Glutamino sintetasa. GOGAT: Glutamato sintasa. GDH-NAD: Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. GDH-NADP: Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH.

2.2 REPRESIÓN CATABÓLICA NITROGENADA

En 1965, el grupo de Holzer mostró que los niveles intracelulares de la GDH-NAD⁺ y la GS fueron mucho menores en células que crecieron en glutamina, asparagina o amonio, que en aquéllas que lo hicieron en glutamato o aspartato (Kolhaw *et al.*, 1965). Posteriormente, se descubrió la permeasa general de aminoácidos (Gap1p) en células cultivadas con prolina como fuente de nitrógeno; sin embargo, no la encontraron en las células que crecieron en amonio (Grenson *et al.*, 1970). A partir de entonces, comenzaron a estudiarse una serie de mutantes, y así se descubrieron las proteínas involucradas en la represión catabólica nitrogenada (NCR).

La represión catabólica nitrogenada es el mecanismo utilizado por la levadura cuando crece en una buena fuente de nitrógeno, para prevenir o reducir la transcripción de genes que codifican para permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno (Magasanik, 1992).

En una buena fuente de nitrógeno, conocida también como condición represora, los genes regulados por NCR se transcriben de manera basal; en cambio, si las células crecen en una mala fuente de nitrógeno, estos genes elevan considerablemente su expresión. La activación de la transcripción de los genes regulados por NCR depende principalmente de dos factores transcripcionales de tipo GATA: Gln3p y Gat1p.

2.3 FACTORES TRANSCRIPCIONALES GATA

En *S. cerevisiae* hay una familia de factores de transcripción conocidos como factores GATA. Entre ellos, existen cuatro proteínas que se unen al DNA a través de dedos de zinc que reconocen una secuencia consenso, UAS_{GATA}, localizada en la región 5' de los genes regulados por NCR. Dos factores GATA activan (Gln3p y Gat1p/Nil1p) y dos reprimen (Dal80p/Uga43p y Nil2p/Gzf3p/Deh1p) la transcripción de dichos genes. La mayor similitud en la secuencia de estas proteínas se encontró en la región donde están localizados los dedos de zinc, con una identidad del 80% entre Dal80p, Gat1p y Nil2p. La región correspondiente de Gln3p es 65% idéntica a los otros tres factores transcripcionales (Stanbrough *et al.*, 1995).

Los dos activadores, Gln3p y Gat11p, tienen una región que se encuentra a 200 aminoácidos del extremo amino terminal, y que es muy rica en asparaginas. Dal80p y Nil2p no contienen esta región, pero en su extremo carboxilo terminal tienen un cierre de leucinas, que parece ser el responsable de su dimerización y que no se encuentra en los activadores GATA (Revisado por Magasanik y Kaiser, 2002).

En *S. cerevisiae*, la presencia de una secuencia GATA en el promotor de un gen, no implica que éste sea regulado por Gln3p, Gat1p, Dal80p y/o Nil2p. Para que los factores GATA –activadores o represores- involucrados en el metabolismo de nitrógeno se unan directamente a los promotores de sus genes blanco, éstos deben tener al menos dos cajas GATAAG o múltiples cajas GATT/AA, y según el

contexto y la distancia entre ellas, serán blancos de unión para uno o varios de dichos factores (Bysani *et al.*, 1991).

2.3.1 Gln3p

GLN3 es un gen no esencial que se transcribe de manera constitutiva y codifica para un activador transcripcional de la familia GATA. La proteína, que tiene un dedo de zinc Cys_2/Cys_2 , se une a las cajas GATA localizadas en los promotores de sus genes blanco. Gln3p es el activador GATA más estudiado y al que se le ha conferido mayor importancia en la NCR. En una condición represora, Gln3p se encuentra principalmente retenido en citoplasma por una proteína llamada Ure2p. Cuando la célula crece en malas fuentes de nitrógeno como prolina, Gln3p se libera del complejo formado con Ure2p y entra al núcleo para transcribir genes que, en su mayoría, codifican para permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno (Fig. 2). Algunos de los genes regulados por Gln3p se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Nombre de algunos de los genes que son activados directamente Gln3p.

GEN	PROTEÍNA
<i>GAP1</i>	Permeasa general de aminoácidos
<i>PUT4</i>	Permeasa de prolina
<i>DAL4</i>	Permeasa de alantoína
<i>DAL5</i>	Permeasa de alantoato
<i>GLN1</i>	Glutamino sintetasa
<i>GDH1</i>	Glutamato deshidrogenasa NADPH
<i>GDH2</i>	Glutamato deshidrogenasa NAD^+
<i>GLT1</i>	Glutamato sintasa

2.3.1.1 FOSFORILACIÓN DE GLN3p Y SU LOCALIZACIÓN NUCLEAR

Beck y Hall (1999) describieron que la vía TOR (por sus siglas en inglés de Target of Rapamycin) controla la localización celular de Gln3p. Cuando la célula crece en una buena fuente de nitrógeno, la vía TOR está activa y, a través de una cascada

de señalizaciones que involucra fosforilaciones y desfosforilaciones, mantiene a Gln3p fosforilada y localizada en citoplasma. Si se añade rapamicina a las células, la vía TOR se inactiva, lo que ocasiona que un complejo formado por Tap42p y Sit4p -que es una fosfatasa- se desfosforile y se active. Sit4p a su vez desfosforila a Gln3p y entonces se deshace el complejo que ésta forma en citoplasma con Ure2p. Gln3p desfosforilada entra al núcleo y transcribe sus genes blanco. A partir de estos hallazgos, se asumió que la rapamicina mimetizaba la vía de regulación transcripcional de la célula cuando crece en una mala fuente de nitrógeno.

En 2004, Cox y col. demostraron que el nivel de fosforilación de Gln3p y su localización celular en limitación de nutrientes es diferente a aquél generado por la acción de la rapamicina al inhibir la vía TOR. La fosforilación de Gln3p no correlaciona de manera consistente con la calidad o cantidad de la fuente de nitrógeno, ni con su localización intracelular, ni con su capacidad de transcribir genes regulados por NCR. Gln3p está hiperfosforilada durante el ayuno de nitrógeno o carbono, pero esta respuesta tampoco correlaciona con su localización celular. La desfosforilación de Gln3p y su localización nuclear sólo correlaciona en etapas tempranas después del tratamiento con rapamicina.. Estos datos sugieren que, aun cuando la rapamicina y la limitación de nitrógeno promueven la transcripción de los genes regulados por NCR, lo hacen por mecanismos distintos o bien, por el mismo mecanismo que involucra otras proteínas (Cox *et al.*, 2004).

2.3.2 Gat1p/Nil1p

GAT1 es un gen que se autorregula además de estar regulado por NCR; es decir, su transcripción se incrementa cuando Gln3p y/o Gat1p están en el núcleo, sobre todo en condiciones no represoras. No hay evidencia experimental que demuestre la unión de Gat1p con alguna caja GATA en el DNA. Sin embargo, se sabe que puede activar la transcripción de genes regulados por nitrógeno que contienen secuencias GATAAG localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Además, el hecho de que contenga una secuencia con una alta identidad con los otros factores GATA que codifica para un dedo de zinc, nos sugiere que Gat1p

tiene la habilidad de unirse al DNA en las secuencias GATAA (Revisado por Magasanik y Kaiser, 2002).

En la última década, ha surgido una controversia acerca de la proteína que retiene a Gat1p en citoplasma en buenas fuentes de nitrógeno. El grupo de Boris Magasanik mostró que es Nil2p la que ejerce un efecto antagónico sobre Gat1p (Rowen *et al.*, 1997); sin embargo, Terrance G. Cooper y su grupo sugieren que es Ure2p la que mantiene en citoplasma a Gat1p, cuando la célula crece en condiciones represoras de nitrógeno (Cunningham *et al.*, 2000) (Fig. 2).

2.3.3 LOS REPRESORES DE LAS CAJAS GATA: Dal80p/Uga43p y Nil2p/Gzf3p/Deh1p

DAL80 es un gen que codifica para un regulador negativo de genes involucrados en vías de degradación de nitrógeno. Su expresión está regulada por los niveles de nitrógeno y por Gln3p. El efecto antagonista de Dal80p en la expresión de genes regulados por nitrógeno solamente se da en aquéllos que contienen múltiples secuencias GATAA, separadas entre sí al menos por veinte nucleótidos, en la región 5' del sitio de inicio de la transcripción.

NIL2 codifica para otro regulador negativo de genes catabólicos de malas fuentes de nitrógeno. Su funcionalidad requiere de fuentes represoras de carbono. Tiene la capacidad de formar heterodímeros con Dal80p. Nil2p impide que Gat1p active su propia expresión (*GAT1*), y probablemente, también es la encargada de retener a Gat1p en citoplasma en buenas fuentes de nitrógeno (Rowen *et al.*, 1997).

2.4 EL QUINTO ELEMENTO: Ure2p

Ure2p fue la primera proteína que se relacionó con la represión catabólica nitrogenada, pues una mutante *ure2Δ*, sometida a condiciones represoras de nitrógeno, presentó un fenotipo pleiotrópico en donde los niveles de algunas permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno se encontraron elevados (Coschigano y Magasanik, 1991; Coffman *et al.*, 1995; Stanbrough y Magasanik, 1995).

Actualmente, se conocen tres funciones de la proteína: a) Ure2p forma un complejo estable con Gln3p y la cantidad de este complejo disminuye cuando Gln3p está en el núcleo (Fig. 2) (Beck y Hall, 1999; Bertram *et al.*, 2000); b) Ure2p es un preprion, lo que constituye un sistema modelo para estudiar la formación de priones (Wickner, 1994); c) Aunque no se ha demostrado su actividad, Ure2p tiene homología con las glutatión-S-transferasas de levadura (Gtt1p, Gtt2p, Grx1p, Grx2p) no sólo en secuencia, sino en estructura (Coschigano y Magasanik, 1991; Bousset *et al.*, 2001 b; Umland *et al.*, 2001).

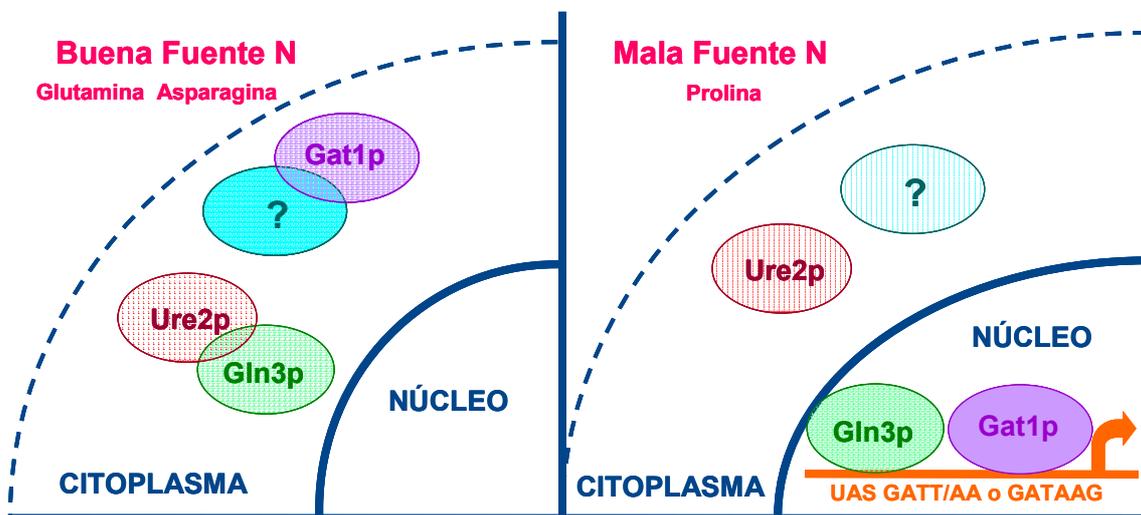


Figura 2. Localización de los activadores GATA en diferentes fuentes de nitrógeno. Cuando la célula crece en una buena fuente de nitrógeno, los factores GATA están retenidos en el citoplasma. En una mala fuente de nitrógeno, estos factores entran al núcleo, se unen a secuencias GATT/AA o GATAAG y transcriben sus genes blanco.

Además, Ure2p se requiere para proteger a la célula del peróxido de hidrógeno, del cumeno, del arsénico (III y V), del cadmio (II), del cromo (III y VI), del hierro (II), del níquel (II), del selenio (IV) y de otros metales donde el fenotipo es menos fuerte [cobre (II), cobalto (II), plata (I) y mercurio (I)] (Rai *et al.*, 2003; Rai y Cooper, 2005). Sin embargo, Ure2p no protege a la célula del zinc (II) y del molibdato (IV), pues una mutante *ure2Δ* es más resistente a estos metales que la cepa silvestre (Rai y Cooper, 2005).

3. TRANSPORTE DE ZINC EN LEVADURA

El zinc es un cofactor esencial que se requiere para la estructura y la función de muchas proteínas. El estudio de la biología celular del zinc se remonta a los años cincuenta, con el descubrimiento de la metalotioneína citosólica que se une al zinc (Margoshes y Vallee, 1957). Por más de treinta años, el estudio de esta proteína fue el único campo con el que se relacionó al zinc dentro de la célula. Hasta mediados de los noventa se describieron los primeros transportadores de membrana de zinc en levadura (Zhao y Eide, 1996 a; 1996 b; Zhao y Eide, 1997), y en los últimos años ha habido grandes avances en este tema.

Para que la célula crezca de manera óptima, requiere de cierta cantidad de zinc a la que se le denomina “zinc quota”, y ésta es de 0.1-0.5 mM. La mayoría del zinc que la célula acumula se encuentra unido a proteínas y tiene funciones catalíticas o estructurales. Las proteínas que acumulan zinc con mayor afinidad en levadura son la superóxido dismutasa (5×10^5 moléculas de zinc por célula) y la isoenzima predominante de la alcohol deshidrogenasa (Adh1p) (7.5×10^5 moléculas de zinc por célula). Además, seis átomos de zinc están unidos a cada ribosoma, lo que significa que existen 1.5×10^6 átomos de zinc ribosomal por célula. El zinc también se une a otras moléculas, pero con menor afinidad; entre ellas están lípidos, DNA, aniones orgánicos, aminoácidos y el glutatión. Por lo tanto, la cantidad de zinc libre intracelular debe ser muy baja, aunque ésta ha sido difícil de cuantificar; no obstante, las afinidades de unión de las metalotioneínas están en el rango de 1 pM a 1 nM, lo que podría indicar que el zinc libre se

encuentra en el mismo rango. En levadura, 1 nM corresponde a 30 átomos de zinc, que corresponden al 0.001% del zinc celular total. Estos datos sugieren que el transporte de zinc en membrana y en organelos debe estar finamente controlado, para que siempre haya un balance adecuado entre el zinc libre, el zinc unido a proteínas y el zinc retenido en los organelos (Revisado por Eide, 2006).

3.1 CLASES DE TRANSPORTADORES DE ZINC EN LEVADURA.

Aunque los transportadores de zinc pertenecen al menos a seis familias, en eucariotes las más importantes son la familia ZIP (por sus siglas en inglés de Zrt-Irt- like Protein) y la familia CDF (por sus siglas en inglés de Cation Difussion Facilitator).

La familia ZIP transporta zinc y/u otros metales del espacio extracelular o del lumen de los organelos, al citoplasma. La mayoría de los transportadores ZIP tienen ocho dominios transmembranales, y tanto el extremo amino, como el extremo carboxilo terminal, se sitúan en el espacio extracitoplásmico. Muchas de las proteínas de la familia ZIP contienen un asa rica en histidinas que está localizada entre los dominios transmembranales 3 y 4 (Fig. 3A). El mecanismo de transporte de estas proteínas todavía no es claro.

Los transportadores que pertenecen a la familia CDF transportan zinc y/u otros metales del citoplasma al espacio extracelular o al lumen de los organelos. La mayoría de estas proteínas tiene seis dominios transmembranales. Al igual que los transportadores ZIP, contienen secuencias ricas en histidinas, pero entre los dominios 4 y 5 (Fig. 3B). El mecanismo de transporte de las proteínas CDF parece ser antiporte vía zinc/H⁺ o K⁺ (MacDiarmid *et al.*, 2002). Por lo tanto, a pesar de su nombre, estos transportadores no funcionan como proteínas que transportan iones por difusión facilitada, sino que lo hacen mediante transporte activo, utilizando el gradiente de otros iones para transportar al zinc.

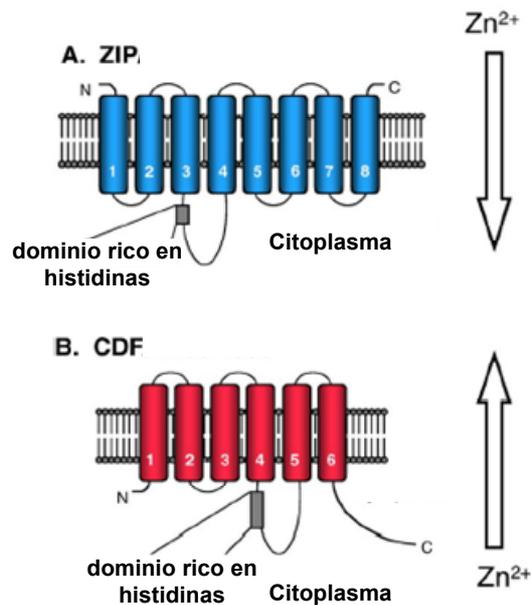


Figura 3. Clases de transportadores de zinc en levadura. Los transportadores de la familia ZIP transportan zinc del exterior celular o del lumen de los organelos hacia el citoplasma. En cambio, los transportadores de la familia CDF, transportan zinc del citoplasma al exterior celular o al lumen de los organelos (Modificado de Eide, 2006).

3.1.1 EL REGULÓN ZAP1

Zap1p es un factor transcripcional que responde a la concentración intracelular de zinc, incrementando su transcripción y la de sus genes blanco en respuesta a la deficiencia de este metal (Fig. 4). Zap1p se une a una secuencia consenso de once nucleótidos llamada ZRE (por sus siglas en inglés de Zinc Responsive Element): 5'ACCYYNAAGGT 3' (Zhao *et al.*, 1998; MacDiarmid *et al.*, 2000). La presencia de un elemento ZRE en el promotor de un gen es suficiente para que Zap1p pueda activar su transcripción. En la actualidad, se han identificado 46 genes que están potencialmente regulados por Zap1p. Seis de estos genes que se relacionan con el transporte de zinc son *ZRT1*, *ZRT2*, *ZRT3*, *ZRC1*, *FET4* y *ZAP1* (Lyons *et al.*, 2000).

3.1.2 TRANSPORTADORES MEMBRANALES DE ZINC

La identificación de transportadores de zinc en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* ha avanzado rápidamente en los últimos diez años. Hasta ahora se han identificado al menos cuatro proteínas que tienen que ver con la introducción del metal al interior celular.

La principal forma de incorporar zinc a la célula es mediante un transportador de alta afinidad llamado Zrt1p (Zhao y Eide, 1996a). El gen *ZRT1* se expresa cien veces más en condiciones limitantes de zinc que lo que se transcribe cuando la célula crece con concentraciones más altas del metal (hasta 5mM). Además, Zrt1p se regula también a nivel postraduccional; cuando la célula ha crecido en condiciones limitantes de zinc y se somete a un “choque de zinc”, dos proteínas, Ubc4p y Ubc5p, reconocen y ubiquitinan a un dominio citosólico de Zrt1p, la cual es endocitada y posteriormente degradada en vacuola (Gitan *et al.*, 2003) (Fig. 4).

Otro transportador de membrana que introduce zinc a la célula es Zrt2p, que transporta al zinc con mucha menor afinidad que Zrt1p. *ZRT2* también se regula por Zap1p (Fig. 4); sin embargo, el promotor de *ZRT2* tiene tres elementos ZRE que reconoce Zap1p, y uno de ellos (ZRE3) está entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción. Zap1p tiene poca afinidad por la caja ZRE3, pero se une a ella en condiciones limitantes de zinc y reprime la transcripción de Zrt2p. En cambio, cuando la limitación de zinc no es tan severa Zap1p se une a los otros dos elementos ZRE que reconoce en el promotor de *ZRT2* y activa la transcripción del gen (Bird *et al.*, 2004).

Existen otros dos transportadores de zinc en la membrana que han sido identificados en *S. cerevisiae*, pero que además del zinc, transportan otros iones. Fet4p es un transportador de membrana que introduce hierro y cobre con baja afinidad (Waters y Eide, 2002) (Fig. 4). En un microarreglo en el que evaluaron genes regulados por Zap1, además de los ya conocidos [*ZRT1*, *ZRT2* y *ZRT3* (ver

más adelante)], la expresión de *FET4* fue 2.4 veces mayor en una cepa silvestre que en una mutante *zap1Δ*, ambas cultivadas en condiciones limitantes de zinc (Lyons *et al.*, 2000). Esta proteína sólo se ha identificado en hongos del género Ascomycete.

Pho84p es un transportador membranal que incorpora fosfatos al interior celular (Jensen *et al.*, 2003) (Fig. 4). Una mutante *pho84Δ* confiere tolerancia y reduce la acumulación celular de zinc. Aunque este transportador tiene una baja afinidad por el zinc, el sistema de incorporación del metal por Pho84p, se induce en condiciones limitantes de fosfato y su regulación es independiente de Zap1p. Fet4p y Pho84p no pertenecen a la familia ZIP.

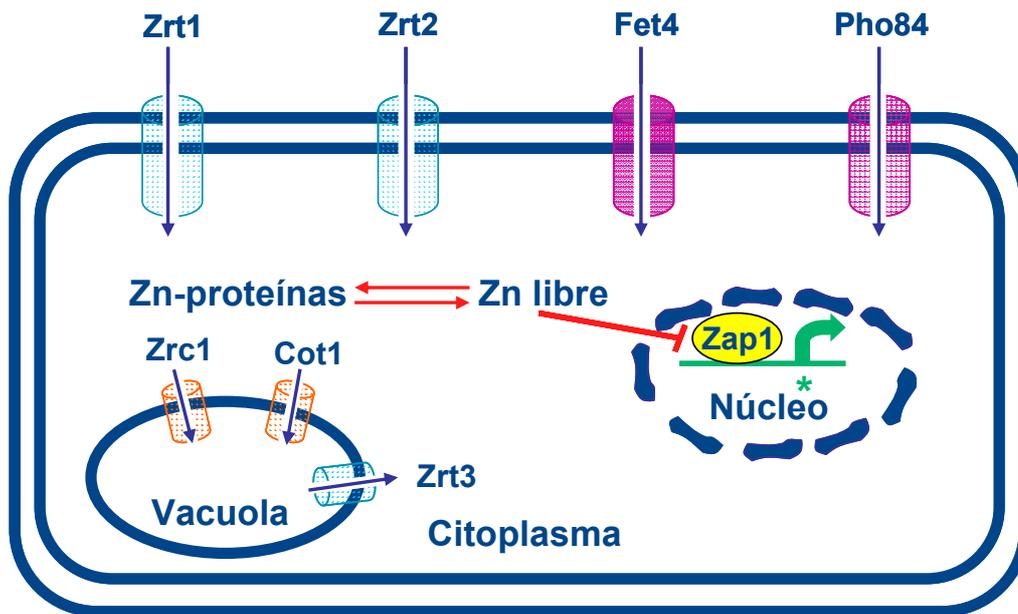
A diferencia de otros organismos eucariotes, en *S. cerevisiae* no se han descrito sistemas de transporte de zinc al exterior de la célula.

3.1.3 TRANSPORTADORES VACUOLARES DE ZINC

En levadura, la vacuola es el organelo donde más zinc se acumula; por lo tanto, puede detoxificar a la célula del metal cuando las concentraciones citoplásmicas están elevadas. Se sabe que la acumulación de zinc en vacuola es más importante en un choque de zinc que en una exposición crónica al metal. La vacuola también sirve como almacén de zinc, de manera que éste puede ser movilizado hacia citoplasma cuando sus concentraciones son limitantes. Hasta el momento, sólo se han identificado tres transportadores vacuolares de zinc. Dos de ellos, Zrc1p y Zrt3p son activados por Zap1p. El tercero, Cot1p, transporta tanto zinc, como cobalto y es independiente de Zap1p (Revisado por Eide, 2006).

Zrc1p y Cot1p son miembros de la familia CDF que transportan zinc de citoplasma a vacuola (Fig. 4). Además, se ha relacionado a estas proteínas con la resistencia a zinc, pues la sobreexpresión de *ZRC1* y/o *COT1* incrementa la resistencia al metal, mientras que la delección de cualquiera de estos genes disminuye la tolerancia a zinc a tan sólo 0.1 μM (MacDiarmid, *et al.*, 2003).

Cuando a una célula que ha crecido en condiciones limitantes de zinc, se le añaden pequeñas cantidades del metal, éste se acumula en citoplasma porque los transportadores de membrana se encuentran muy activos. Para que la célula pueda destoxificarse del choque de zinc, se requiere de Zrc1p. Sin embargo, la expresión de *ZRC1* se induce cuando la célula crece en condiciones limitantes de zinc y es dependiente de Zap1p (MacDiarmid *et al.*, 2003).



•Genes regulados por Zap1p: *ZAP1*, *ZRT1*, *ZRT2*, *ZRT3*, *FET4*, *ZRC1*

Figura 4. Transporte de zinc en *S. cerevisiae* y regulación transcripcional de estos transportadores. Las proteínas de color azul pertenecen a la familia ZIP y transportan zinc del exterior celular o del lumen de los organelos hacia el citoplasma. Las proteínas de color naranja son miembros de la familia CDF y transportan zinc del citoplasma a la vacuola. Los transportadores de color rosa transportan zinc del exterior de la célula al citoplasma y no pertenecen ni a la familia ZIP ni a la familia CDF. Las concentraciones elevadas de zinc libre en el citoplasma reprimen la transcripción de *ZAP1* y de sus genes blanco.

Por el contrario, existe una proteína que transporta zinc de vacuola a citoplasma en condiciones limitantes de zinc, llamada Zrt3p (Fig. 4). Aunque no tiene alta identidad con las secuencias proteínicas de Zrt1p y Zrt2p, sí cuenta con ocho dominios transmembranales y tiene un asa rica en histidinas entre los

dominios 3 y 4, lo que sugiere que este transportador pertenece a la familia ZIP (MacDiarmid *et al.*, 2000).

Como mencionamos en párrafos anteriores, la homeostasis de zinc en *S. cerevisiae* debe ser finamente controlada. El zinc entra a la célula principalmente por Zrt1p y Zrt2p. Una vez en citoplasma, el metal se une a metaloproteínas o se dirige a vacuola, donde es transportado por Zrc1p o Cot1p. En vacuola, queda almacenado en una forma reusable y menos tóxica para la célula. El factor de transcripción Zap1p se reprime por una concentración elevada de zinc libre en citoplasma. Cuando la cantidad de zinc es limitante, Zap1p incrementa la transcripción de *ZRT1*, *ZRT2* y *ZRT3*. La producción elevada de Zrt3p permite una introducción de zinc a citoplasma, proveniente de vacuola. Paradójicamente, *ZRC1* también se induce por Zap1p, lo que sugiere que el flujo de zinc dentro de la vacuola debe ser finamente controlado. Por lo tanto, la homeostasis de zinc requiere de un balance entre los sistemas regulatorios transcripcionales y postranscripcionales, y las proteínas que éstos controlan.

II. ANTECEDENTES.

Hasta el momento son pocos los trabajos que han relacionado el transporte de zinc con la represión catabólica nitrogenada y/o con las proteínas involucradas en ella. En 1999, el grupo de Cooper mostró que en una mutante *gln3Δ*, el gen *ZRT1*, que codifica para el transportador membranal Zrt1p, se subexpresó que en la cepa silvestre, cuando las cepas se cultivaron con prolina como fuente de nitrógeno. (Cox *et al.*, 1999). Sin embargo, en 2006 otro grupo de investigación encontró que en una doble mutante *gln3Δ gat1Δ*, gen *ZRT1* se expresó en mayor grado que en una cepa silvestre, al crecer a las células en prolina. En cambio, en glutamina o en glutamina con rapamicina, los niveles de expresión de *ZRT1* en la doble mutante fueron similares a los de la cepa silvestre. Además, se observó que en una mutante *ure2Δ* los niveles de expresión de este gen estaban disminuidos en comparación con la cepa silvestre (Scherens, 2006).

Por otra parte, al analizar la posible función de Ure2p como glutatión-S-transferasa, encontraron –inesperadamente- que una mutante *ure2Δ* es más resistente a zinc que la cepa silvestre (Rai y Cooper, 2005).

Recientemente, en un análisis de microarreglos que evaluó el perfil de transcripción de los genes en 21 fuentes de nitrógeno diferentes, se encontró que en urea la expresión de 26 genes regulados por Zap1p (Lyons *et al.*, 2000) disminuye en comparación con el nivel de transcripción que encontraron en valina. (Godard *et al.*, 2007).

En nuestro laboratorio se diseñó un microarreglo que evaluó la respuesta de los genes en una mutante *ure2Δ* vs. la cepa parental en asparagina, que es buena fuente de nitrógeno. En la mutante se encontraron sobreexpresados los genes *ZRT3* y *ZRC1*, que codifican para dos transportadores vacuolares (Riego *et al.*, datos no publicados).

III. OBJETIVO

Dado que no es clara la relación entre:

- a. las proteínas que participan en la NCR y el transporte de zinc;
- b. las proteínas que participan en la NCR y la resistencia a zinc;

en este trabajo estamos interesados en conocer la participación de los activadores GATA y de Ure2p en la resistencia a sulfato de zinc cuando la célula crece en diferentes fuentes de nitrógeno.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS DE LABORATORIO

Las cepas con las que trabajamos fueron donadas por el laboratorio de la Doctora Alicia González Manjarrez, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas usadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo Relevante	Referencia
Parental	CLA MAT α <i>ura3-1 leu2-3</i>	Avendaño <i>et al.</i> , (1997)
<i>ure2Δ</i>	CLA MAT α <i>ure2Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Sosa <i>et al.</i> , (2003)
<i>gln3Δ</i>	CLA MAT α <i>gln3Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Valenzuela <i>et al.</i> , (2001)
<i>gat1Δ</i>	CLA MAT α <i>gat1Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Ceparío González, A.
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	CLA MAT α <i>ure2Δ::kanMX4 gln3Δ::natMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Ceparío González, A.
<i>gln3Δ gat1Δ</i>	CLA MAT α <i>gat1Δ::kanMX4 gln3Δ::natMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Ceparío González, A.

2. MEDIOS DE CULTIVO

YPD es un medio rico en el que una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un tiempo de duplicación de 1.5 h. Utilizamos este medio con uno o dos antibióticos (nourseotricina y/o geneticina) para garantizar que las cepas mutantes mantuvieran los marcadores de selección con que se reemplazaron los genes *GLN3*, *URE2* y/o *GAT1*.

Los medios para evaluar el comportamiento de la cepa parental y de las mutantes en diferentes fuentes de nitrógeno fueron SN/uracilo/leucina con glutamina, amonio o prolina como fuente de nitrógeno.

2.1 YPD

Extracto de levadura al 1%

Peptona de caseína al 2%

Glucosa al 2%

Agar al 2% (medio sólido)

2.2 YPD/Geneticina

Extracto de levadura al 1%

Peptona de caseína al 2%

Glucosa al 2%

Geneticina al 0.02%

Agar al 2% (medio sólido)

2.3 YPD/Geneticina/Nourseotricina

Extracto de levadura al 1%

Peptona de caseína al 2%

Glucosa al 2%

Geneticina al 0.02%

Nourseotricina al 0.01%

Agar al 2% (medio sólido)

2.4 SN/glutamina/uracilo/leucina

Glucosa al 2%

Glutamina al 0.1%

Vitaminas 1X

Trazas 1X

Sales 1X

Uracilo al 0.002%

Leucina al 0.01%

Agar al 2% (medio sólido)

2.5 SN/amonio/uracilo/leucina

Glucosa al 2%

Sulfato de amonio al 0.5%

Vitaminas 1X

Trazas 1X

Sales 1X

Uracilo al 0.002%

Leucina al 0.01%

Agar al 2% (medio sólido)

2.6 SN/prolina/uracilo/leucina

Glucosa al 2%

Prolina al 0.1%

Vitaminas 1X

Trazas 1X

Sales 1X

Uracilo al 0.002%

Leucina al 0.01%

Agar al 2% (medio sólido)

Todos los medios se esterilizaron por autoclave durante 15 min. a una presión de 15 lb/in². La glutamina fue la única fuente de nitrógeno que se esterilizó por filtración (filtro de 0.22µm).

3. SOLUCIONES

3.1 Sales 50X

Fosfato monopotásico al 5%

Sulfato de magnesio·7H₂O al 0.5%

Cloruro de sodio al 0.1%

Cloruro de calcio·2H₂O al 0.1%

Cloroformo al 0.5%

Agua destilada para completar el volumen requerido.

3.2 Vitaminas 1000X

Biotina al 0.0002%

Panteonato de calcio al 0.04%

Ácido fólico al 0.0002%

Niacina al 0.04%

Ácido *p*-aminobenzoico al 0.02%

Piridoxina-HCl al 0.04%

Riboflavina al 0.02%

Tiamina-HCl al 0.04%

Inositol al 0.02%

Lentejas de Hidróxido de sodio 6 piezas/L

Agua destilada para completar el volumen requerido.

3.3 Trazas (suspensión) 1000X

Ácido bórico al 0.05%

Sulfato cúprico al 0.004%

Yoduro de potasio al 0.01%

Cloruro férrico al 0.02%

Sulfato de manganeso (II) al 0.04%

Molibdato de sodio al 0.02%

Sulfato de zinc al 0.04%

Agua destilada para completar el volumen requerido.

3.4 Sulfato de zinc 1M

Preparamos una solución 1 M de sulfato de zinc (14.375 mg / 50 mL de agua destilada estéril). Después de que los medios se esterizaron por autoclave y se enfriaron hasta una temperatura aproximada de 55°C, agregamos el volumen necesario para obtener la concentración deseada de la sal.

4. VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS MARCADORES DE SELECCIÓN EN LAS MUTANTES ESTUDIADAS

Después de un preinóculo de las cepas Parental, *ure2Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ*, *gln3Δ gat1Δ* y *gat1Δ* por 16 h en YPD a 30°C y con agitación a 250 rpm, las inoculamos nuevamente en YPD a una densidad óptica de 0.05 (A_{600}); las células crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo durante 6.5 h. Cuando alcanzaron una densidad óptica entre 0.6 y 0.8 (A_{600}), tomamos 5 μ L y goteamos en YPD/Geneticina, YPD/Geneticina/Nourseotricina y SN/amonio/uracilo/leucina. Incubamos a 28°C durante 3 días (72h) (Fig. 5).

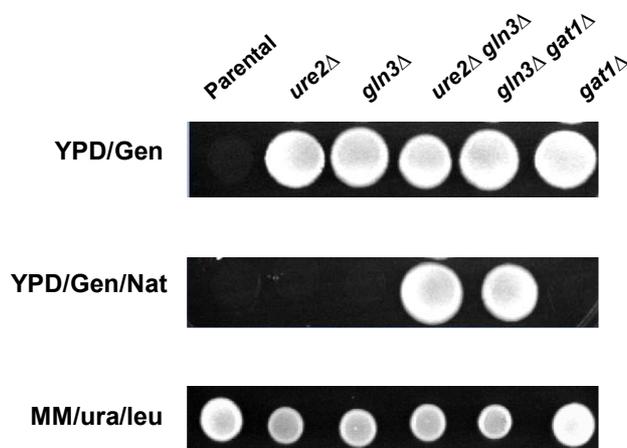


Figura 5. Comprobación de la resistencia de las cepas a los antibióticos de selección. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica entre 0.6 y 0.8 (A_{600}), tomamos 5 μ l del inóculo y goteamos en YPD/Geneticina (Gen), YPD/Geneticina (Gen)/Nourseotricina (Nat) y SN/amonio/uracilo/leucina (MM/ura/leu). Las fotos fueron tomadas a los 3 días (72 h).

En la Figura 5 se observa que sólo las mutantes que tienen insertado el cassette *kanMX4*, que confiere resistencia a geneticina, crecieron en

YPD/Geneticina: *ure2* Δ , *gln3* Δ , *ure2* Δ *gln3* Δ , *gat1* Δ y *gln3* Δ *gat1* Δ ; y sólo las dobles mutantes *ure2* Δ *gln3* Δ y *gln3* Δ *gat1* Δ , que tienen insertados tanto el cassette *kanMX4*, como el gen que degrada nourseotricina (*natMX4*), crecieron en YPD/Geneticina/Nourseotricina. La cepa parental sólo creció en SN/amonio/uracilo/leucina.

5. CURVAS DE CRECIMIENTO

Caracterizamos las cepas mediante una curva de crecimiento en diferentes medios de cultivo (YPD, SN con glutamina, amonio o prolina como fuente de nitrógeno). Crecimos un preinóculo de las células por 16 h en tubos con 10 mL de YPD a 30°C y con agitación a 250 rpm. De estos preinóculos, hicimos dos lavados con agua destilada estéril, previos al inóculo de las cepas en matraces con 50 mL de YPD, SN/glutamina, SN/amonio o SN/prolina a una densidad óptica de 0.05 (A_{600}). Después de inocular, las células crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo. Durante el crecimiento tomamos muestras en diferentes tiempos hasta las 28 h, 28.5 h o 30 h. El inóculo inicial a 0.05 de densidad óptica fue tomado como tiempo cero ($t=0$). En cada toma de muestra leímos su absorbancia a 600 nm.

Los tiempos de duplicación se calcularon con la ecuación de la recta $y=mx+b$, donde y = logaritmo decimal de la absorbancia, x = tiempo, m = pendiente de la recta y b = ordenada al origen. Tomamos 5 puntos de la curva de crecimiento en fase logarítmica para obtener la ecuación. Con cada punto, se calculó un tiempo de duplicación y después se obtuvo un promedio de estos tiempos para cada cepa en los diferentes medios de cultivo.

6. RESISTENCIA A METALES

6.1. CONCENTRACIÓN MÁXIMA INHIBITORIA Y CONCENTRACIÓN LETAL DE SULFATO DE ZINC EN LA CEPA PARENTAL

Para establecer la concentración máxima inhibitoria y la concentración letal de sulfato de zinc en los medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno para la cepa parental:

- a) Crecimos un preinóculo de 16 h en tubos con 10 mL de YPD a 28°C y con agitación a 200 rpm; a partir de éste, inoculamos nuevamente en tubos con 10 mL de YPD a una $A_{600}=0.05$. Las células crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo hasta que alcanzaron una $A_{600}=0.6$. Del inóculo tomamos una alícuota, llevamos a cabo 4 diluciones logarítmicas y goteamos 5 μL en medio sólido con amonio como fuente de nitrógeno más sulfato de zinc a la concentración indicada. Las cajas se incubaron a 28°C durante 3 días (72 h). El intervalo de concentraciones de sulfato de zinc que seleccionamos para evaluar la resistencia de la cepa parental fue de 1 mM a 15 mM.

- b) Crecimos un preinóculo en tubos con 10 mL de SN/glutamina, SN/amonio o SN/prolina a 28°C y con agitación a 200 rpm; el tiempo de incubación de las células varió de acuerdo con el medio de cultivo (14 h en glutamina; 17 h en amonio; 24 h en prolina). Inoculamos las células en tubos con 10 mL del mismo medio del preinóculo a una $A_{600}=0.05$ y esperamos hasta que alcanzaran una $A_{600}=0.6$. La cepa creció en las mismas condiciones de agitación y temperatura del preinóculo. Tomamos una alícuota del inóculo, llevamos a cabo 4 diluciones logarítmicas y goteamos 5 μL en medio sólido con glutamina, amonio o prolina (en el mismo medio en que crecieron) como fuente de nitrógeno más sulfato de zinc a la concentración indicada. Las cajas se incubaron a 28°C durante 2 días (48 h) en glutamina, 3 días (72 h) en amonio, y 3.5 días (80 h) en prolina. El

intervalo de concentraciones de sulfato de zinc que seleccionamos para evaluar la resistencia de la cepa parental en estos medios fue de 1 mM a 8 mM.

6.2. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A SULFATO DE ZINC EN LAS CEPAS CULTIVADAS EN YPD LÍQUIDO

Crecimos un preinóculo de la cepa parental y de las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ* y *ure2Δ gln3Δ* en tubos con 10 mL de YPD a 28°C y con agitación a 200 rpm durante 12-16 horas; inoculamos nuevamente en tubos con 10 mL de YPD a la densidad óptica necesaria para que, conforme a los tiempos de duplicación, las cepas alcanzaran simultáneamente una $A_{600}=0.6$. Las células se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo. Tomamos una alícuota del inóculo, llevamos a cabo 4 diluciones logarítmicas y goteamos 5 μ L en medio sólido con glutamina, amonio o prolina como fuente de nitrógeno, más sulfato de zinc 4 mM. Incubamos las cajas a 28°C por 6 días (144 horas) (Tabla 3).

Tabla 3. Día y tiempo de incubación de los preinóculos, los inóculos y las diluciones logarítmicas en YPD.

Cepa	Día1	Día2
Parental	t=0	t=11 h / t=22 h
<i>ure2Δ</i>	t=0	t=11 h / t=22 h
<i>gln3Δ</i>	t=0	t=12.5 h / t=22 h
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	t=0	t=12.5 h / t=22 h

- Preinóculo
- Inóculo
- Diluciones logarítmicas

6.3. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A SULFATO DE ZINC EN LAS CEPAS CULTIVADAS EN SN CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Crecimos un preinóculo de la cepa parental y las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ*, *ure2Δ gln3Δ*, *gat1Δ* y *gln3Δ gat1Δ* en tubos con 10 mL de SN/glutamina, SN/amonio o SN/prolina a 28°C y con agitación a 250 rpm. El tiempo que dejamos crecer a las células varió de acuerdo con el medio y con la cepa. Inoculamos las células en tubos con 10 mL del mismo medio del preinóculo a una $A_{600}=0.05$ y a la hora necesaria para que, conforme a los tiempos de duplicación, las cepas alcanzaran simultáneamente una $A_{600}=0.6$ (Tablas 4, 5 y 6). Las células crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo. Del inóculo, tomamos una alícuota, llevamos a cabo 4 diluciones logarítmicas y goteamos SN sólido con glutamina, amonio o prolina como fuente de nitrógeno más sulfato de zinc 4 mM, 5 mM y 6 mM. Incubamos las cajas a 28°C durante el tiempo necesario para que el crecimiento de cada cepa mutante fuera similar al de la cepa parental.

Tabla 4. Día y tiempo de incubación de los preinóculos, los inóculos y las diluciones logarítmicas en SN/glutamina.

Cepa	Día1	Día2	Día3
Parental	-----	t=0	t=14 h / t=23 h
<i>ure2Δ</i>	-----	t=0 / t=14 h	t=28.5 h
<i>gln3Δ</i>	t=0	t=20.5 h	t=34 h
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	t=0	t=20.5 h	t=36.5 h
<i>gat1Δ</i>	-----	t=0	t=14 h / t=23 h
<i>gat1Δ gln3Δ</i>	t=0	t=20.5 h	t=34 h

- Preinóculo
- Inóculo
- Diluciones logarítmicas

Tabla 5. Día y tiempo de incubación de los preinóculos, los inóculos y las diluciones logarítmicas en SN/amonio.

Cepa	Día1	Día2	Día3	Día4
Parental	-----	-----	t=0	t=17h / t=25.5 h
<i>ure2</i> Δ	-----	t=0	t=30.5	t=57.5 h
<i>gln3</i> Δ	t=0	-----	t=41.5	t= 65.5 h
<i>ure2</i> Δ <i>gln3</i> Δ	t=0	-----	t=41.5	t= 65.5 h
<i>gat1</i> Δ	-----	-----	t=0	t=17h / t=25.5 h
<i>gat1</i> Δ <i>gln3</i> Δ	t=0	-----	t=41.5	t= 65.5 h

- Preinóculo
- Inóculo
- Diluciones logarítmicas

Tabla 6. Día y tiempos de incubación de los preinóculos, los inóculos y las diluciones logarítmicas en SN/prolina

Cepa	Día1	Día4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
Parental	-----	-----	t=0	t=22 h	t=36 h	XXXX
<i>ure2</i> Δ	-----	-----	t=0	t=24 h	t=38 h	XXXX
<i>gln3</i> Δ	t=0	t=76.5 h	-----	-----	-----	t=167 h*
<i>ure2</i> Δ <i>gln3</i> Δ	t=0	t=72 h	-----	-----	t=142 h	-----
<i>gat1</i> Δ	-----	-----	t=0	t=22 h	t=36 h	-----
<i>gat1</i> Δ <i>gln3</i> Δ	t=0	t=76.5 h	-----	-----	XXXX	NO CRECIÓ

-
- Preinóculo
- Inóculo
- Diluciones logarítmicas.
- *Las diluciones y el goteo de esta cepa se hicieron 24 horas después de lo previsto porque no creció en el tiempo calculado.

V. RESULTADOS

1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN MEDIOS DE CULTIVO CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Caracterizamos las cepas mediante curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (YPD, SN/glutamina, SN/amonio o SN/prolina) para poder calcular los tiempos de duplicación, que nos servirían en experimentos posteriores (Figs. 6 a 9 y Tabla 8).

En la Figura 6 se observa que la cepa parental es la que tiene un menor tiempo de duplicación en YPD, seguida de la mutante *ure2Δ*. El fenotipo de las cepas *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* es similar, con una velocidad de crecimiento menor a la cepa parental (Tabla 8). Las mutantes *gat1Δ* y *gln3Δ gat1Δ* no fueron caracterizadas en este medio.

En SN/glutamina, el fenotipo que presenta la cepa parental y la mutante *gat1Δ* es similar. La cepa *ure2Δ* crece más lento que la parental, pero más rápido que la mutante *gln3Δ*, que a su vez, tiene un tiempo de duplicación menor que las dobles mutantes *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* (Fig. 7 y Tabla 8).

La Figura 8 muestra que en medio mínimo (SN/amonio) la cepa parental es la que tiene una mayor velocidad de crecimiento, seguida de la mutante *ure2Δ*. Las cepas *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* presentan el mismo fenotipo: crecen a una velocidad menor que la cepas parental y *ure2Δ* (Tabla 8). Las mutantes *gat1Δ* y *gln3Δ gat1Δ* no fueron caracterizadas en este medio.

En SN/prolina la diferencia entre la velocidad de crecimiento de la cepa parental y las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* se hace mucho más evidente (Fig. 9 y Tabla 8). La cepa *gat1Δ* creció con el mismo tiempo de duplicación que la cepa parental. La mutante *ure2Δ* crece más lento que la cepa

parental, pero más rápido que las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ*, que a su vez, presentan el mismo fenotipo de crecimiento.

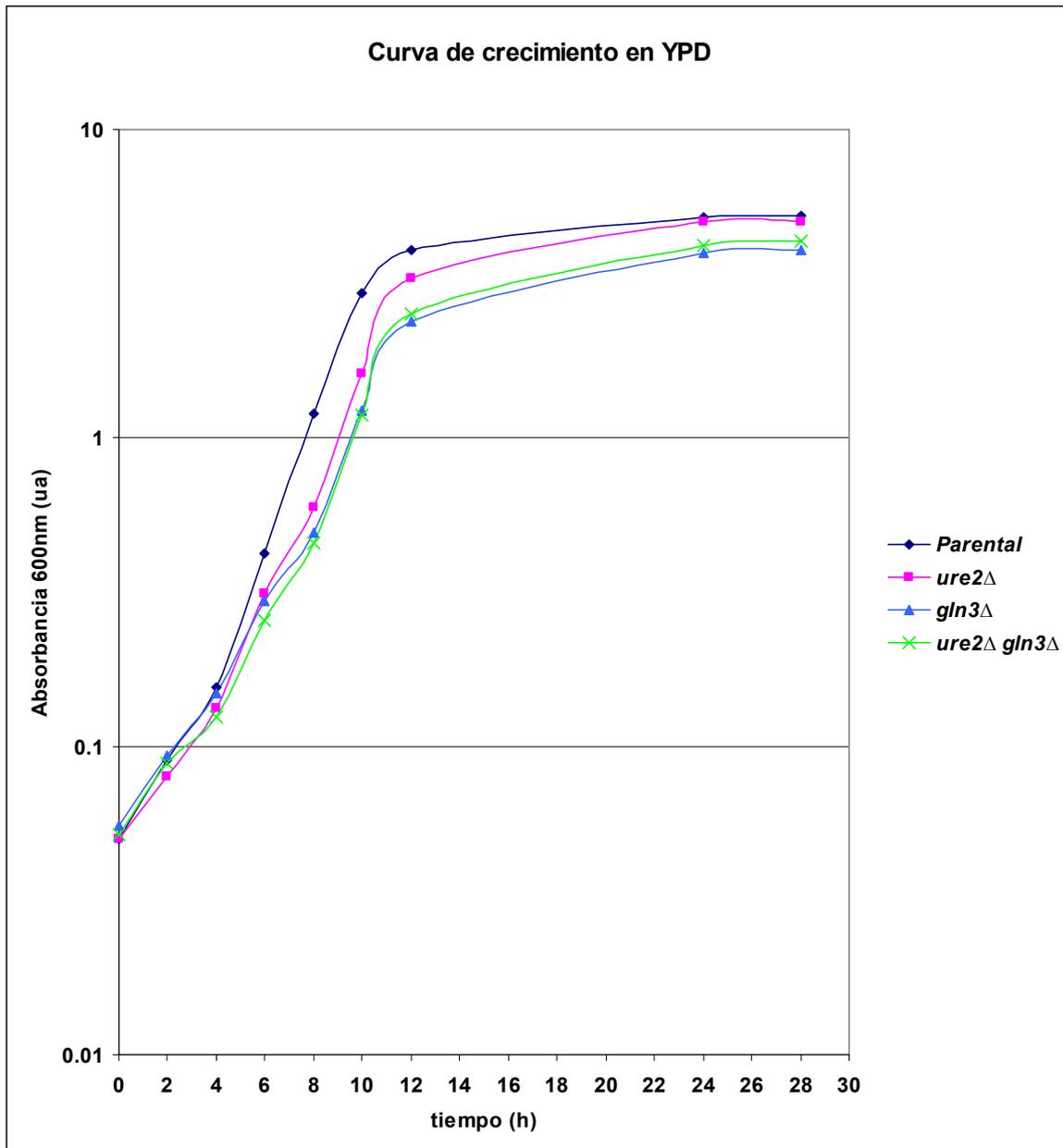


Figura 6. Curva de crecimiento de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ*, y *ure2Δ gln3Δ* en YPD. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm. Durante el crecimiento tomamos muestras a distintos tiempos hasta las 28 h y leímos su absorbancia a 600 nm.

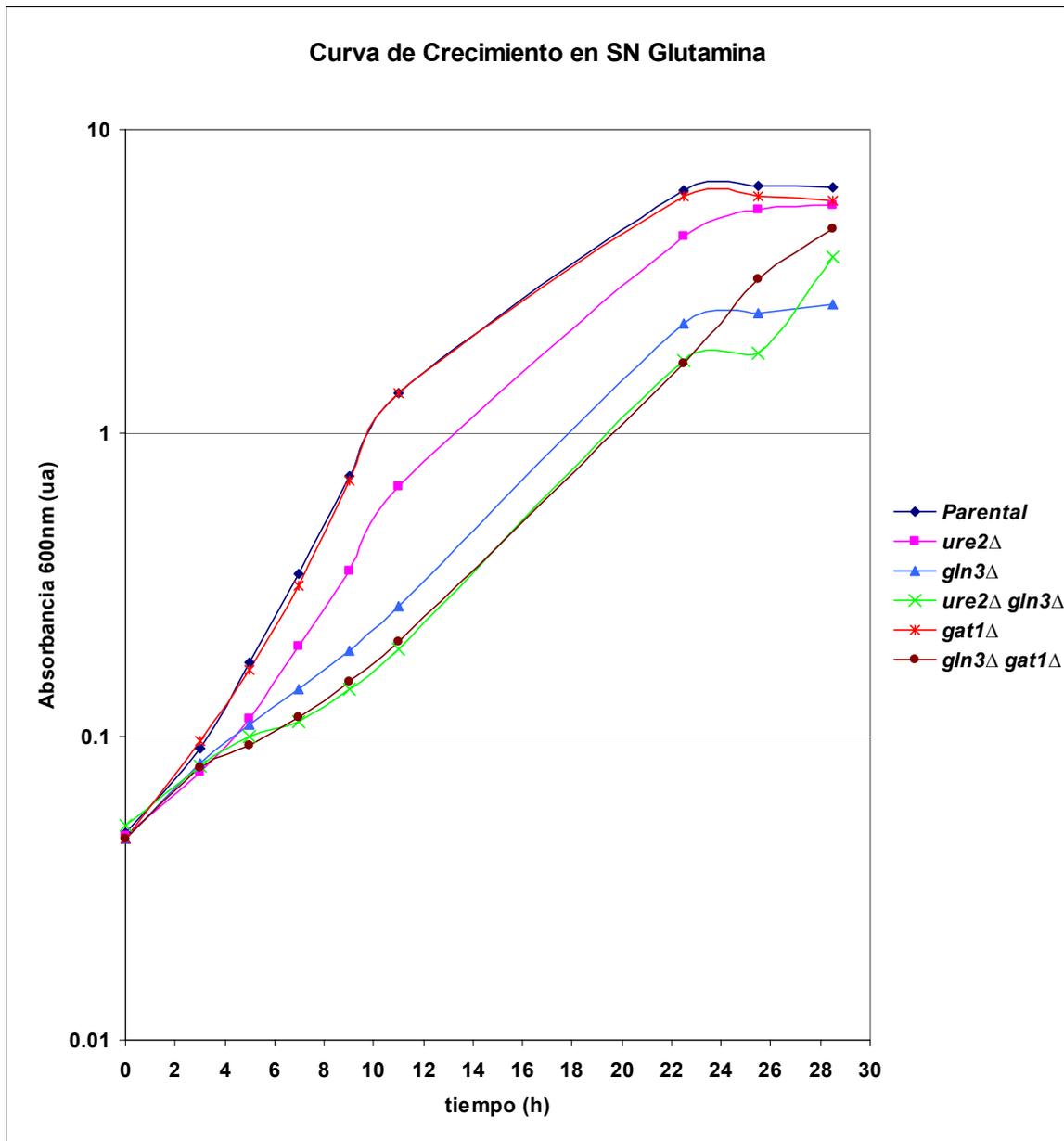


Figura 7. Curva de crecimiento de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2*Δ *gln3*Δ, *gat1*Δ y *gln3*Δ *gat1*Δ en SN/glutamina. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm. Durante el crecimiento tomamos muestras a distintos tiempos hasta las 28.5 h y leímos su absorbancia a 600 nm.

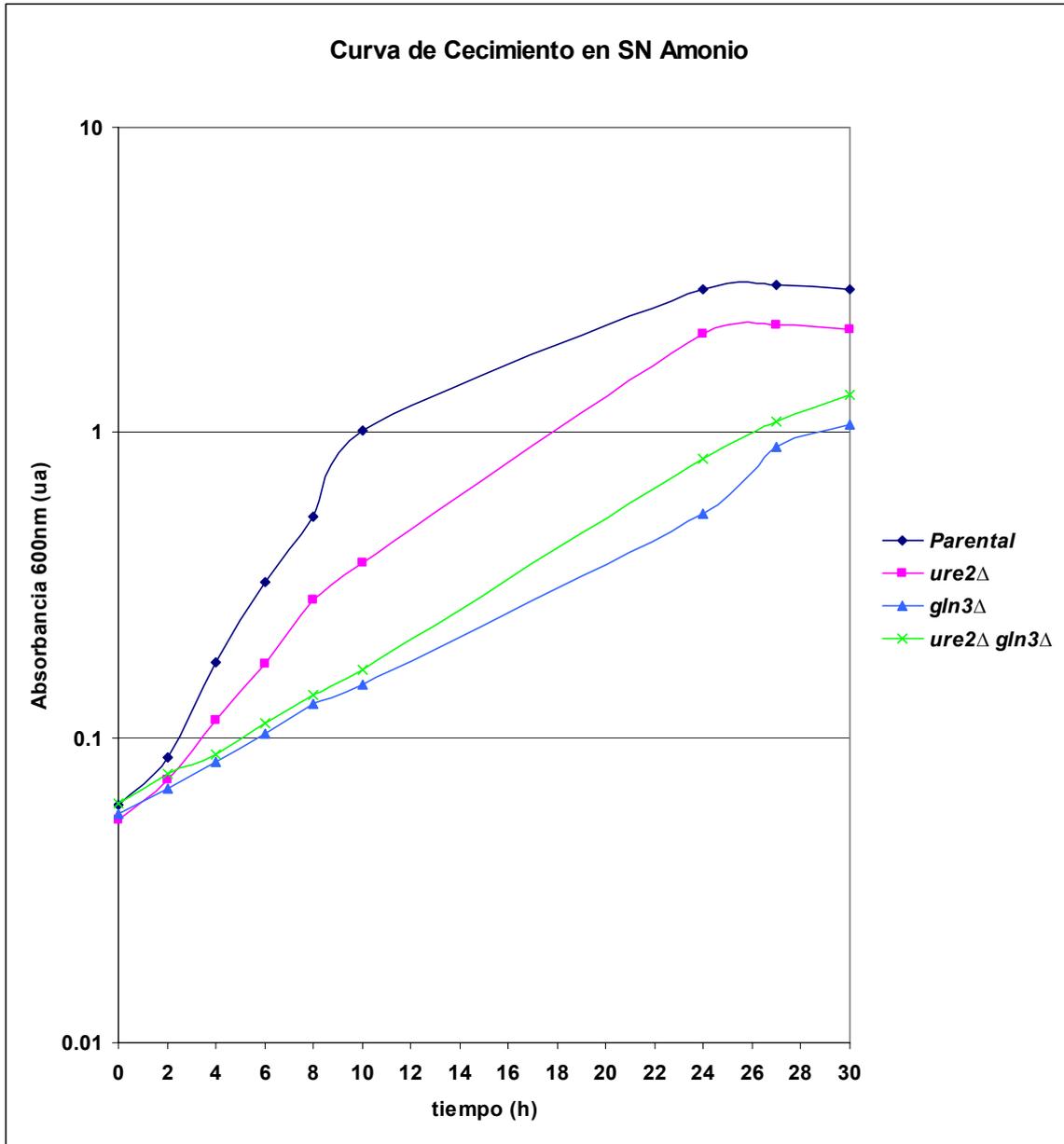


Figura 8. Curva de crecimiento de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* en SN/amonio. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm. Durante el crecimiento tomamos muestras a distintos tiempos hasta las 30 h y leímos su absorbancia a 600 nm.

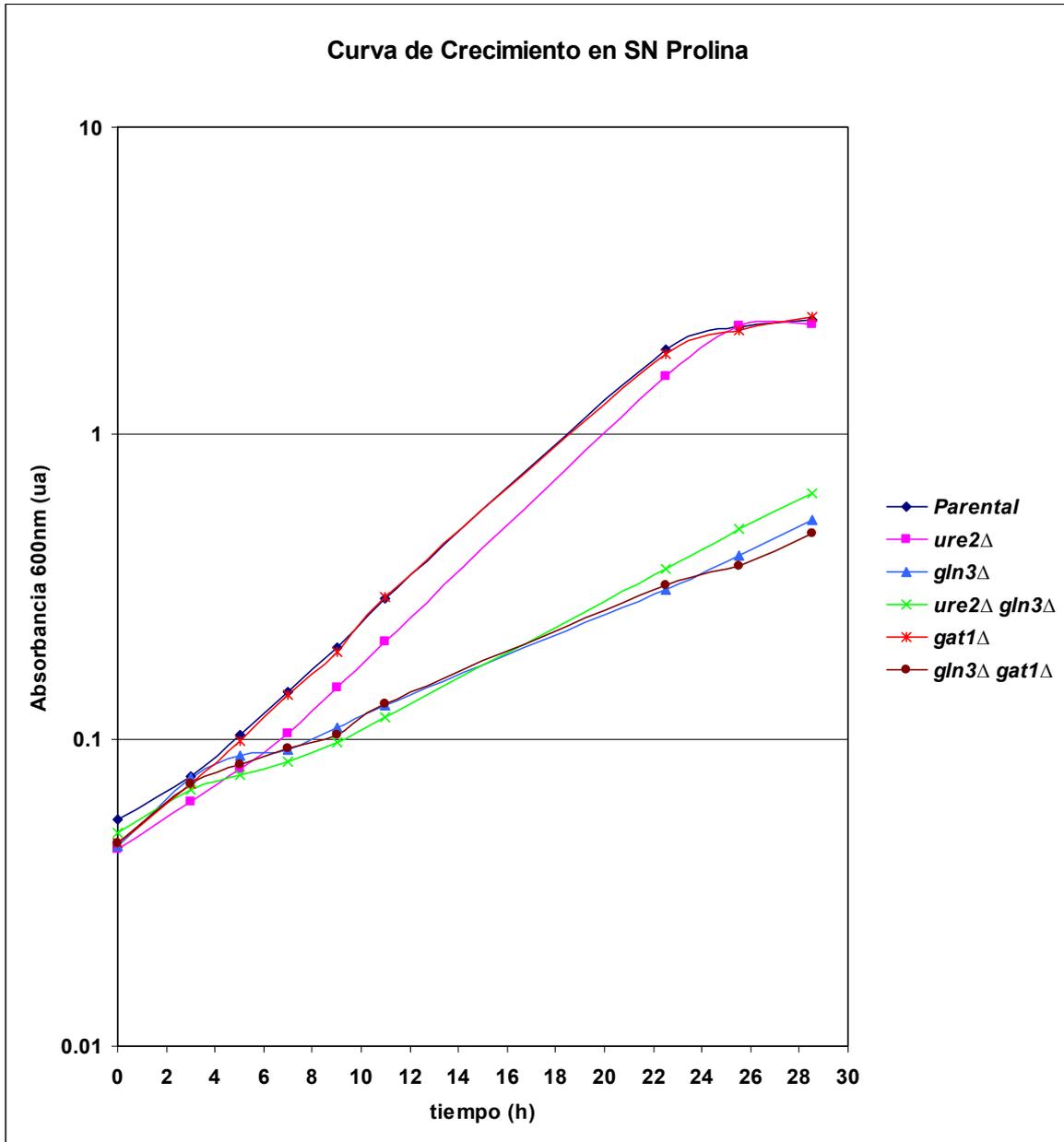


Figura 9. Curva de crecimiento de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2*Δ *gln3*Δ, *gat1*Δ y *gln3*Δ *gat1*Δ en SN/prolina. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm. Durante el crecimiento tomamos muestras a distintos tiempos hasta las 28.5 h y leímos su absorbancia a 600 nm.

1.1. CÁLCULO DE LOS TIEMPOS DE DUPLICACIÓN DE LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Una vez que caracterizamos las cepas en los diferentes medios de cultivo, escogimos cinco puntos de la curva de crecimiento de cada cepa en fase logarítmica, para obtener la ecuación de la recta, y a partir de ella, calcular el tiempo de duplicación de las cepas. En la Tabla 7 se muestran las ecuaciones de cada curva en los medios de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno.

Tabla 7. Ecuación de la recta a partir de las curvas de crecimiento de las Figuras 6 a 9.

Cepa	YPD ^a	Glutamina ^a	Amonio ^a	Prolina ^a
Parental	$y = 0.2145x - 1.6599$	$y = 0.1482x - 1.491$	$y = 0.1313x - 1.3036$	$y = 0.0721x - 1.3411$
<i>ure2</i> Δ	$y = 0.1752x - 1.5777$	$y = 0.1169x - 1.5054$	$y = 0.0907x - 1.3074$	$y = 0.0658x - 1.4167$
<i>gln3</i> Δ	$y = 0.1515x - 1.4509$	$y = 0.0639x - 1.2838$	$y = 0.0439x - 1.2534$	$y = 0.0285x - 1.2098$
<i>ure2</i> Δ <i>gln3</i> Δ	$y = 0.1637x - 1.5818$	$y = 0.0462x - 1.2446$	$y = 0.044x - 1.2171$	$y = 0.0285x - 1.2562$
<i>gat1</i> Δ	no determinada	$y = 0.1461x - 1.4867$	no determinada	$y = 0.0754x - 1.3774$
<i>gln3</i> Δ <i>gat1</i> Δ	no determinada	$y = 0.0521x - 1.2782$	no determinada	$y = 0.0309x - 1.2395$

^a A partir de cinco puntos de la curva de crecimiento en fase logarítmica de cada cepa, obtuvimos la ecuación general de la recta $y = mx + b$, donde y = logaritmo decimal de la absorbancia; x = tiempo; m = pendiente de la recta, y b = ordenada al origen. La calidad de la fuente de nitrógeno disminuye de izquierda a derecha. Todas las R^2 de las ecuaciones de la recta fueron mayores a 0.974 (Anexo 1).

Claramente se observa que el valor de la pendiente (m) es menor conforme disminuye la calidad de la fuente de nitrógeno (de izquierda a derecha), lo que demuestra que tanto la cepa parental, como las mutantes evaluadas crecen más rápido en buenas fuentes de nitrógeno.

Tabla 8. Tiempos de duplicación de las cepas, calculados a partir de las curvas de crecimiento.

Cepa	YPD ^a	Glutamina ^a	Amonio ^a	Prolina ^a
Parental	1 h 25min	2 h 02 min	2 h 17min	4 h 09 min
<i>ure2</i> Δ	1 h 48min	2 h 35 min	3 h 19 min	4 h 34 min
<i>gln3</i> Δ	2 h 06 min	4 h 43 min	6 h 51 min	10 h 33 min
<i>ure2</i> Δ <i>gln3</i> Δ	2 h 09 min	6 h 31 min	6 h 47 min	10 h 34 min
<i>gat1</i> Δ	no determinada	2 h 04 min	no determinada	4 h 00 min
<i>gln3</i> Δ <i>gat1</i> Δ	no determinada	5 h 46 min	no determinada	9 h 45 min

^a Los tiempos de duplicación se calcularon a partir de la ecuación de la recta. El tiempo de duplicación presentado en la tabla es el promedio de los calculados con cinco puntos de la recta. La calidad de la fuente de nitrógeno disminuye de izquierda a derecha.

Los resultados de la Tabla 8 muestran que el tiempo de duplicación de las cepas fue mayor conforme disminuyó la calidad de la fuente de nitrógeno. La diferencia entre la velocidad de crecimiento de la cepa parental y la de las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* se hizo más evidente en SN/prolina que en YPD o SN/glutamina. Sin embargo, en SN/amonio la diferencia en la velocidad de crecimiento entre la cepa parental y todas las mutantes evaluadas es mucho mayor que en cualquier otro medio. La velocidad de crecimiento de la cepa *ure2Δ* en amonio fue 43% menor que la de la silvestre, mientras que el tiempo de duplicación de las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* fue 3 veces mayor que el de la cepa parental. La mutante *gat1Δ* presentó un fenotipo similar a la cepa parental en los medios en los que fue caracterizada.

Dado que las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* tienen un tiempo de duplicación mucho mayor en SN/prolina que en YPD y SN/glutamina comparado con el de la cepa parental, estos datos sugieren que Gln3p adquiere mayor importancia cuando la célula crece en malas fuentes de nitrógeno, lo que concuerda con trabajos previamente publicados (Courchesne *et al.*, 1988). Además, la velocidad de crecimiento de las células en SN/prolina no se ve afectada al mutar *URE2* o *GAT1* cuando el gen *GLN3* está ausente, mientras que en SN/glutamina las dobles mutantes son claramente más lentas que la cepa *gln3Δ*. Por otra parte, los datos demuestran que, el hecho de mutar *GAT1* en las células, no afecta su velocidad de crecimiento, independientemente de la calidad de la fuente de nitrógeno.

2. 4 mM Y 8 mM SON LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIA Y LETAL DE SULFATO DE ZINC EN LA CEPA PARENTAL CULTIVADA EN YPD LÍQUIDO

Después de determinar las condiciones de cultivo de las cepas en distintas fuentes de nitrógeno, evaluamos la resistencia de la cepa parental al zinc. En trabajos previos estaba reportado un amplio intervalo de concentraciones letales de zinc para *S. cerevisiae* (MacDiarmid *et al.* 2003; Rai y Cooper, 2005); entonces,

decidimos establecer la concentración máxima inhibitoria y la concentración letal de sulfato de zinc en nuestra cepa parental (Fig. 10).

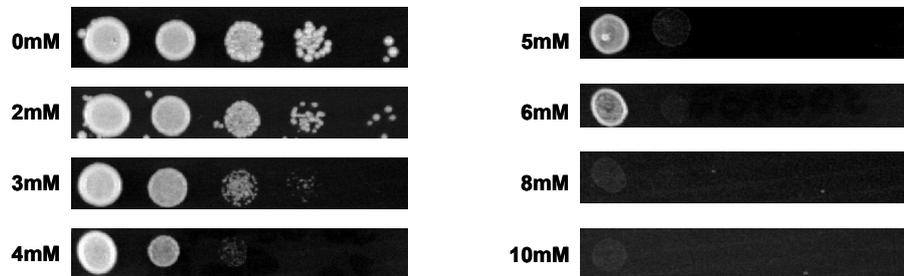


Figura 10. Crecimiento de la cepa parental en medio sólido con amonio a distintas concentraciones de sulfato de zinc. La cepa creció en YPD a 28°C hasta alcanzar una $A_{600}=0.6$. Goteamos 5 μL de cada dilución logarítmica en medio sólido con amonio más sulfato de zinc a la concentración indicada. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas 3 días (72 h) después del goteo.

Como se observa en la Figura 10, las concentraciones inhibitorias de la velocidad de crecimiento de las células con sulfato de zinc son 3 mM, 4 mM y 5 mM. Estas concentraciones no matan a las células sólo disminuyen su tiempo de duplicación; en cambio, el sulfato de zinc 6 mM inhibe el crecimiento de las células en alguna de las 4 diluciones logarítmicas, es decir, sí mata a las células. La concentración letal de sulfato de zinc para la cepa parental es 8 mM.

3. RESISTENCIA A ZINC DE LAS CEPAS CULTIVADAS EN YPD LÍQUIDO Y GOTEADAS EN SN CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Dado que en trabajos previos está reportado que la cepa *ure2 Δ* es más resistente a sulfato de zinc con glutamina, glutamato o prolina como fuentes de nitrógeno (Rai and Cooper 2005), y que en una mutante *gln3 Δ* el gen *ZRT1*, que codifica para un transportador membranal de zinc, se reprime (Cox *et al.*, 1999), decidimos evaluar la resistencia o sensibilidad de las cepas *ure2 Δ* , *gln3 Δ* , y *ure2 Δ gln3 Δ* a sulfato de zinc en medios con diferentes fuentes de nitrógeno y así probar si la resistencia a zinc está relacionada con la represión catabólica nitrogenada o con las proteínas involucradas en este proceso (Fig. 11).

En un experimento previo en las mismas condiciones, probamos la resistencia de las cepas a ZnSO_4 a una concentración 6 mM y ninguna cepa creció en los primeros 3 días (datos no mostrados); así que solamente evaluamos resistencia o sensibilidad de las cepas a sulfato de zinc 4 mM, que es una concentración inhibitoria de la velocidad de crecimiento de la cepa parental.

En la Figura 11A podemos observar que todas las cepas crecieron hasta la última dilución (10^{-4}) en SN/glutamina que es una buena fuente de nitrógeno, pero en la cepa parental las colonias se observan mucho más grandes que las de las mutantes; sin embargo, en SN/glutamina con sulfato de zinc 4 mM, el crecimiento de la cepa parental y de la mutante *ure2* Δ es muy similar. Por lo tanto, los datos sugieren que la cepa *ure2* Δ es más resistente que la parental. La resistencia de las mutantes *gln3* Δ y *ure2* Δ *gln3* Δ es difícil de evaluar porque las colonias se ven muy pequeñas en el medio sin metal, comparadas con las de la cepa silvestre. No obstante, los datos sugieren que estas mutantes son más sensibles a sulfato de zinc en estas condiciones de crecimiento (inóculo en YPD líquido goteo en SN/glutamina).

La diferencia en la velocidad de crecimiento entre las mutantes y la cepa parental fue más evidente en SN/amonio que en SN/glutamina (Fig. 11A y 11B). Las colonias de la cepa silvestre están mucho más crecidas que las de las mutantes. Al igual que en SN/glutamina, la cepa *ure2* Δ parece ser más resistente que la parental. La resistencia de las mutantes *gln3* Δ y *ure2* Δ *gln3* Δ a sulfato de zinc es difícil de evaluar, pues su velocidad de crecimiento en SN/amonio sin metal es mucho menor que la de la cepa parental. Sin embargo, parecen ser más sensibles a zinc que la cepa *ure2* Δ . Por otra parte, si comparamos la resistencia de las cepas *gln3* Δ y *ure2* Δ *gln3* Δ a sulfato de zinc en SN/glutamina (Fig. 11A) con la resistencia de las mismas en SN/amonio (Fig. 11B), los datos sugieren que ésta es mayor en SN/amonio.

En SN/prolina, el crecimiento de la cepa silvestre y la cepa *ure2* Δ parece similar, pero el crecimiento de la mutante *ure2* Δ *gln3* Δ es menor, y el de la cepa

gln3Δ es casi nulo (Fig. 11C), pues en una mala fuente de nitrógeno (p.e. prolina) el factor transcripcional Gln3p se requiere para transcribir permeasas que puedan transportar la fuente de nitrógeno al interior. En presencia de sulfato de zinc 4 mM, la cepa parental y la mutante *ure2Δ* presentan un fenotipo similar, lo que indica que Ure2p no es tan importante para la resistencia a zinc en prolina; en cambio, en glutamina y amonio, parece adquirir una función como regulador negativo en la resistencia al metal. La resistencia a sulfato de zinc de las cepas *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* es difícil de evaluar porque la velocidad de crecimiento en el medio sin metal (SN/prolina) es mucho menor que la de la cepa silvestre.

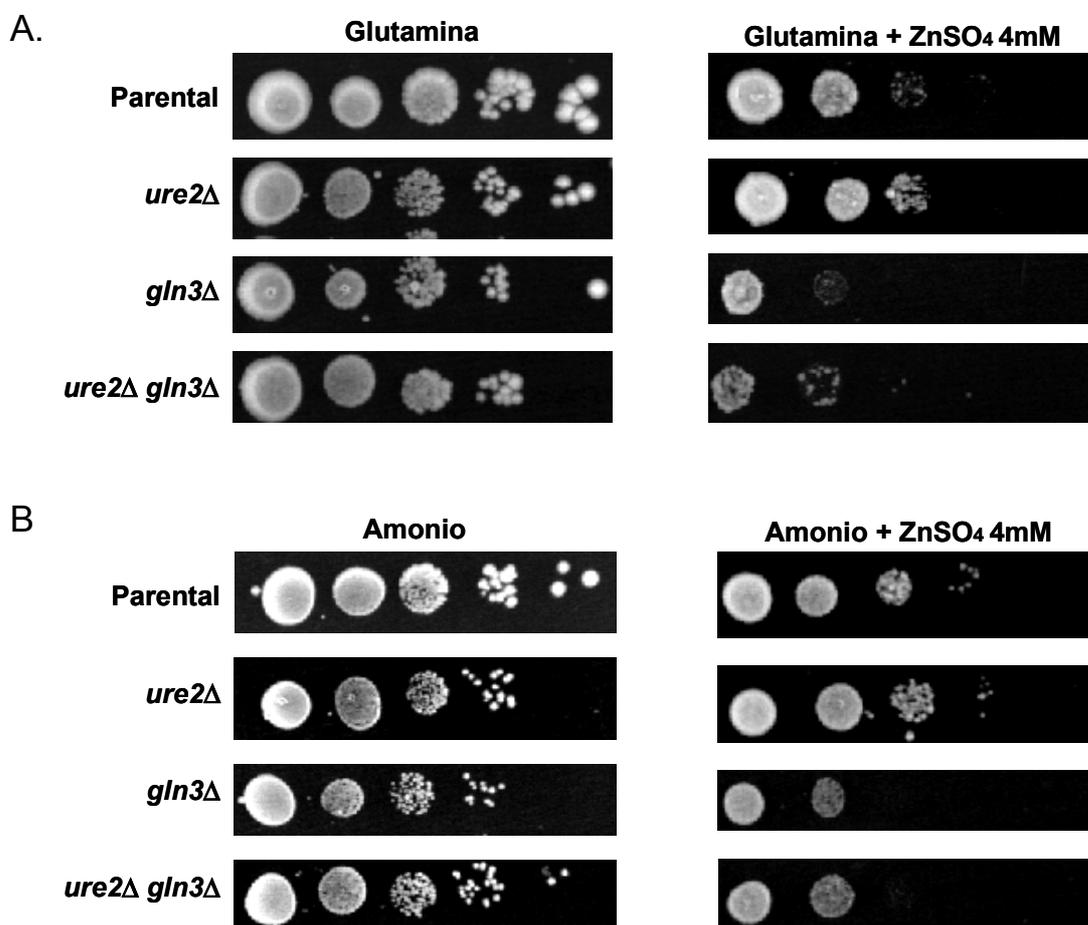


Figura 11. Resistencia de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* a sulfato de zinc. Las cepas crecieron a 28°C en YPD hasta alcanzar una hasta alcanzar una $A_{600}=0.6$. Goteamos 5 μ L de cada dilución logarítmica en medio sólido con la fuente de nitrógeno especificada más sulfato de zinc 4mM. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas a los 6 días (144 horas) después del goteo.

C.

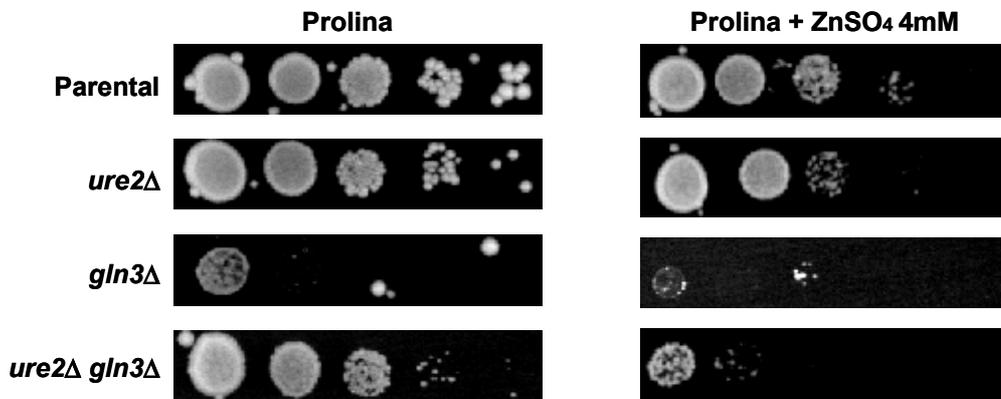


Figura 11 (Cont.). Resistencia de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* a sulfato de zinc.

En presencia de sulfato de zinc, la cepa parental parece ser más resistente en prolina que en glutamina (Fig. 11A y 11C). Estos resultados demuestran que la fuente de nitrógeno modifica la resistencia a zinc tanto en la cepa parental, como en las mutantes evaluadas. Por otra parte, los goteos de la Figura 11 muestran que el crecimiento de las células a los 6 días (144h) en los medios con sulfato de zinc 4 mM, es mayor que lo que se observa en la Figura 10 a los 3 días (72h), lo que indica que esta concentración de la sal no está matando a las células, sino que disminuye su velocidad de crecimiento.

Después de estos resultados, había que resolver 4 cuestiones:

a) La resistencia de las cepas a sulfato de zinc no podía ser evaluada en un solo tiempo; las imágenes deberían ser captadas a diferentes días, y comparar aquéllas en donde todas las cepas tuvieran el mismo nivel de crecimiento en los medios sin metal con su respectiva resistencia o sensibilidad a zinc en ese momento.

b) Probablemente el fenotipo observado de las cepas en la resistencia a zinc, no se debiera únicamente al efecto del metal, sino a un cambio drástico en la fuente de nitrógeno entre el inóculo y el goteo.

c) Dado que la concentración 4mM de sulfato de zinc sólo inhibe la velocidad de crecimiento de las células, pero no las mata, las cepas tendrían que ser evaluadas en concentraciones más altas y con un tiempo mayor a 3 días, pues ya habíamos evaluado previamente la sensibilidad de las cepas a 6mM, y hasta las 80h (3días), no había crecido ninguna cepa.

d) Existía la posibilidad de que el otro activador GATA (Gat1p) estuviera relacionado con la resistencia o sensibilidad a zinc, pues los resultados sugerían que la fuente de nitrógeno influía en el nivel de resistencia de las cepas. Entonces, adquirimos dos nuevas mutantes: *gat1Δ* y *gln3Δ gat1Δ*.

Por lo tanto, primero decidimos reevaluar la concentración máxima inhibitoria y la concentración letal de sulfato de zinc en la cepa parental, ahora creciéndola desde el preinóculo en el mismo medio de cultivo donde sería goteada.

4. 4 mM y 8 mM SON LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIA Y LETAL DE SULFATO DE ZINC EN LA CEPA PARENTAL CULTIVADA EN SN LÍQUIDO CON DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO

Dado que las células crecieron en la misma fuente de nitrógeno en la que fueron goteadas, pudimos garantizar que no existiera un cambio brusco en la localización celular de Gln3p y/o Gat1p, y que el fenotipo observado se debiera exclusivamente al efecto del zinc. Evaluamos entonces la resistencia de la cepa parental a sulfato de zinc en diferentes fuentes de nitrógeno (Fig. 12).

En la Figura 12 podemos observar que la concentración máxima de sulfato de zinc que inhibe la velocidad de crecimiento de la cepa parental es 4 mM, la concentración inhibitoria es 6 mM y la concentración letal de la sal es 8 mM. Por lo tanto, decidimos probar la resistencia o sensibilidad de las 6 cepas en estudio a concentraciones 4 mM, 5 mM y 6 mM de sulfato de zinc. Los goteos muestran que la cepa parental tiene una mayor sensibilidad a sulfato de zinc en las diferentes

fuentes de nitrógeno (medio sólido) cuando crece en SN líquido con glutamina, amonio o prolina que cuando crece en YPD líquido. Los resultados sugieren que en el experimento que muestra la Figura 10, los fenotipos que presenta la cepa parental se debe tanto al efecto del zinc, como al efecto del choque de nutrientes. Nuevamente se ve una mayor resistencia de la cepa parental en SN/prolina con ZnSO₄ (3 mM) que en SN/glutamina con ZnSO₄ (3 mM) (Fig.12).

5. LAS CEPAS *ure2Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* Y *gln3Δ gat1Δ* SON RESISTENTES A SULFATO DE ZINC EN SN/AMONIO Y SN/PROLINA.

Crecimos a las cepas en una sola fuente de nitrógeno desde el preinóculo hasta el goteo, para garantizar que el fenotipo observado se debiera únicamente al efecto del zinc.

En SN/glutamina, todas las cepas alcanzaron el mismo nivel de crecimiento a diferentes tiempos [2 días (48h), 3 días (72h) y 4 días (96h)]. Las cepas parental, *gln3Δ*, *gat1Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* presentaron el mismo fenotipo en presencia de sulfato de zinc a las tres concentraciones evaluadas. En cambio, la mutante *ure2Δ* parece más resistente al metal (Fig. 13A). Los datos sugieren que, en una buena fuente de nitrógeno, la proteína Ure2p es un regulador negativo en la resistencia a zinc; al quitar *GLN3* en ausencia de *URE2*, la doble mutante es igual de sensible al sulfato de zinc que la cepa parental, lo que muestra que el fenotipo de *GLN3* es epistático sobre *URE2* en SN/glutamina.

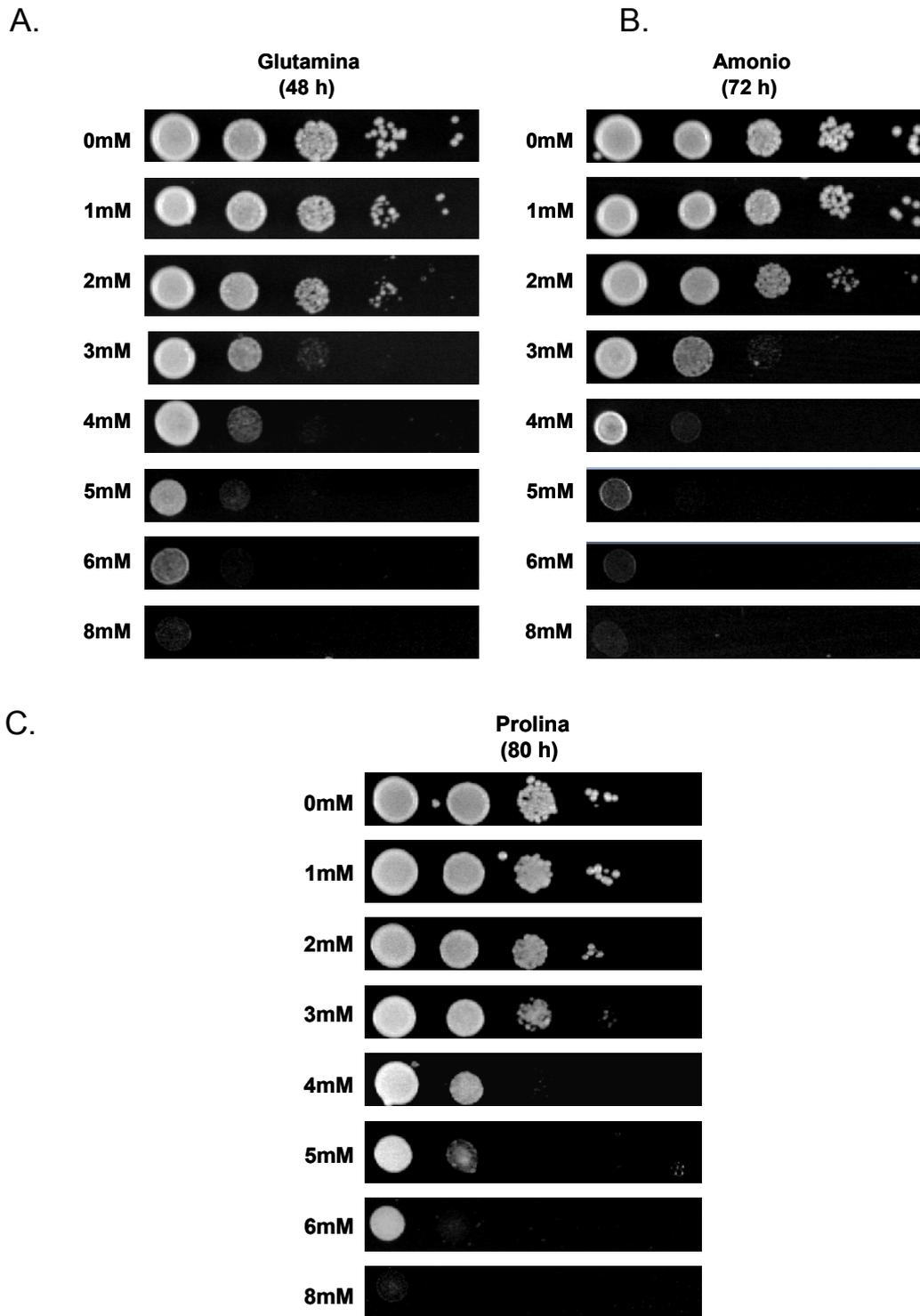


Figura 12. Crecimiento de la cepa parental en medio sólido con glutamina (A), amonio (B) o prolina (C) a distintas concentraciones de sulfato de zinc. La cepa creció a 28°C en SN con glutamina, amonio o prolina hasta alcanzar una $A_{600}=0.6$. Goteamos 5 μL de cada dilución logarítmica en SN/glutamina, SN/amonio o SN/prolina más sulfato de zinc a la concentración indicada. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas a diferentes tiempos.

La Figura 13B nos muestra que, con amonio como fuente de nitrógeno, el crecimiento de las cepas en las fotos mostradas es menor que en SN/glutamina, ya que el nivel de crecimiento observado de la mutante *gln3Δ* fue el máximo alcanzado después de 7 días de incubación, así que seleccionamos las imágenes del resto de las cepas que se ajustaran a ese nivel de crecimiento. En el medio con sulfato de zinc, sólo la mutante *gat1Δ* es igualmente sensible que la cepa parental. Las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ gln3Δ* y *gln3Δ gat1Δ* parecen más resistentes al metal a una concentración de 4 mM; el fenotipo no es tan fuerte en las otras dos concentraciones de zinc. El nivel de resistencia entre estas tres cepas es similar en todas las concentraciones de sulfato de zinc evaluadas, lo que sugiere que la ausencia de *GLN3* es lo que las hace resistentes. Sin embargo, la mutante *ure2Δ* es claramente más resistente al metal que el resto de las cepas en las 3 concentraciones de sulfato de zinc evaluadas. Los datos demuestran que en SN/amonio, el fenotipo de *GLN3* es epistático sobre *URE2* y sobre *GAT1*.

En SN/prolina, la mutante *gln3Δ gat1Δ* no creció en el inóculo. El máximo nivel de crecimiento que tuvo la cepa *gln3Δ* en medio sólido fue a los 7.5 días (176 h) y no logró igualar el crecimiento de las demás cepas, que alcanzaron a crecer hasta la última dilución en diferentes tiempos (desde 3.5 días (80 h) hasta 8.5 días (190 h)). En presencia de sulfato de zinc 4 mM, las mutantes *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* son más resistentes que la cepa parental; sin embargo, la cepa *ure2Δ* es menos resistente que las las cepas *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* (Fig. 13C); estos datos sugieren que Ure2p no tiene la misma importancia como regulador negativo en la resistencia a zinc en prolina y glutamina, que en amonio (Fig. 13) y que Gln3p adquiere esta función de regulador negativo en la resistencia a zinc conforme va disminuyendo la calidad de la fuente de nitrógeno (Fig. 13).

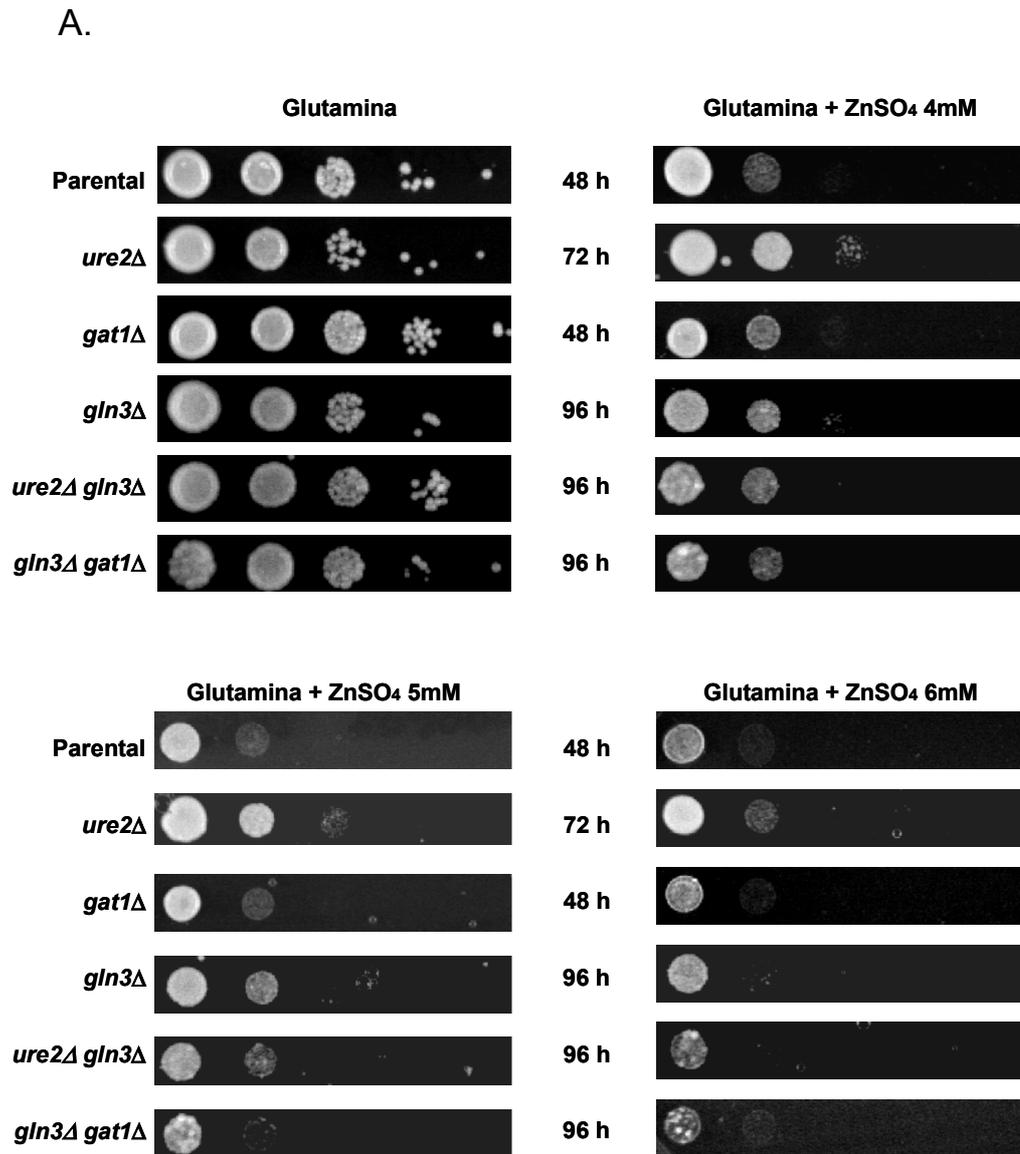


Figura 13. Resistencia de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* a sulfato de zinc en medio sólido con glutamina, amonio o prolina. Las cepas crecieron a 28°C hasta alcanzar una $A_{600}=0.6$. Goteamos 5μl de cada dilución logarítmica en medio sólido con glutamina, amonio o prolina más sulfato de zinc a la concentración indicada. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas a diferentes tiempos.

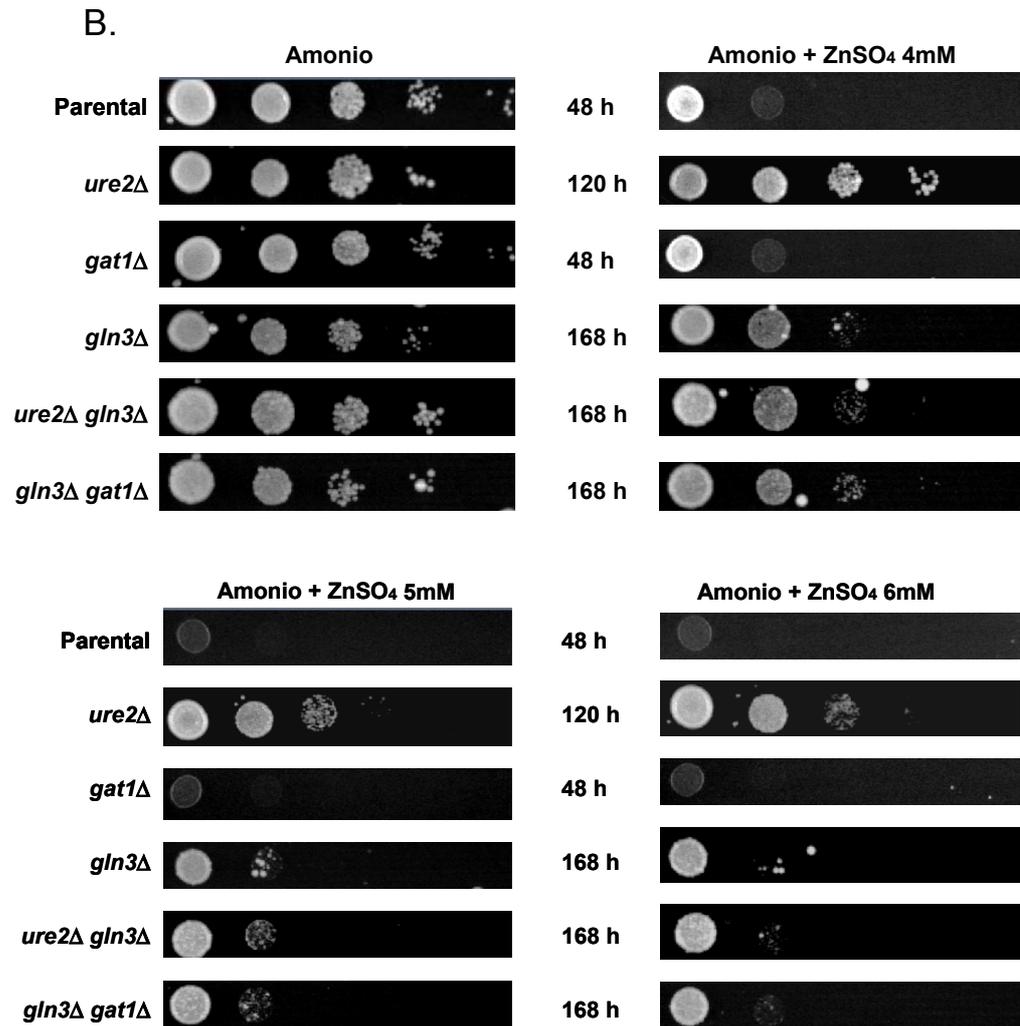


Figura 13B (Cont.). Resistencia de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* a sulfato de zinc en medio sólido con glutamina, amonio o prolina .

C.

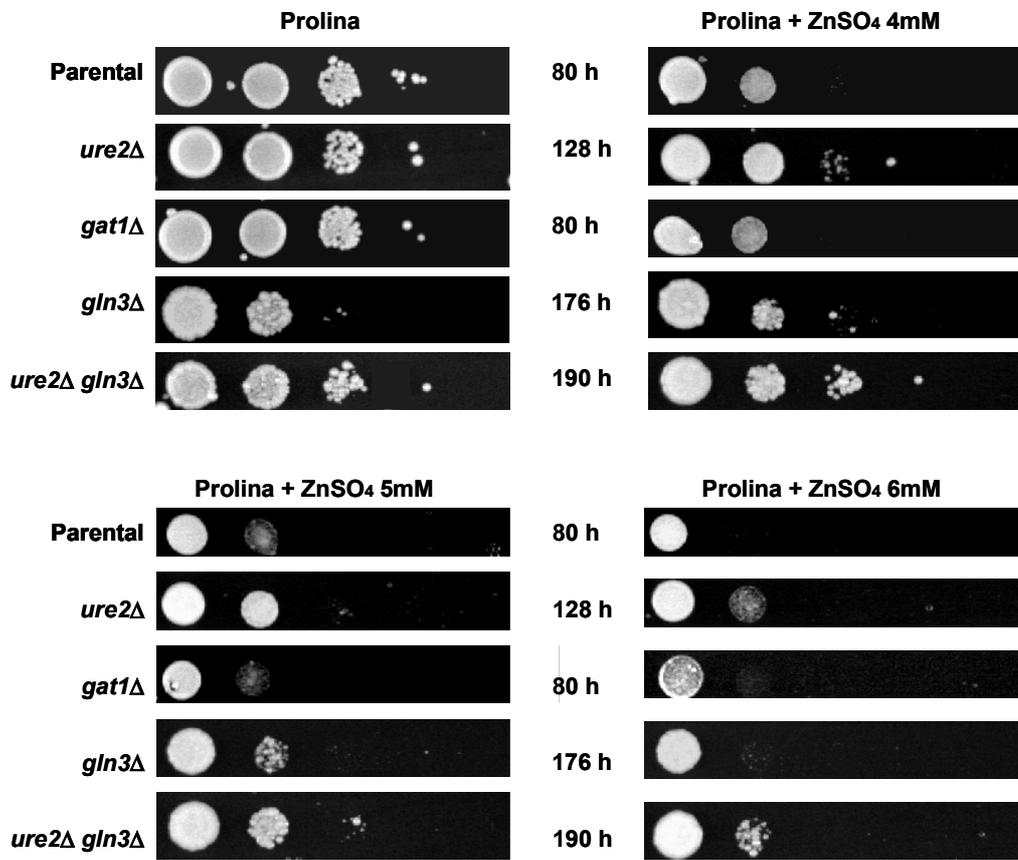


Figura 13 (Cont.). Resistencia de las cepas parental, *ure2Δ*, *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* a sulfato de zinc en medio sólido con glutamina, amonio o prolina.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

En las Figuras 6 a 9 claramente se observa que, conforme disminuye la calidad de la fuente de nitrógeno, el tiempo de duplicación de las cepas aumenta. Ya que YPD es un medio completo que tiene más nutrientes que el medio SN, el fenotipo de las cepas observado no se debe únicamente a que crezcan en una buena o mala fuente de nitrógeno; por lo tanto, no se pueden comparar los fenotipos que las cepas presentan en este medio con los fenotipos que se observan en medio SN con diferentes fuentes de nitrógeno. En cambio, el crecimiento de las cepas en los otros tres medios (SN/glutamina, SN/amonio y SN/prolina) sí es comparable ya que las cepas crecieron bajo las mismas condiciones de carbono, vitaminas, sales, trazas, uracilo y leucina, y lo único que varió fue la fuente de nitrógeno. Comenzaremos comparando los resultados entre la mejor (glutamina) y la peor (prolina) fuente de nitrógeno, y dejaremos al amonio en otro apartado por razones que explicaremos más adelante.

Glutamina es la mejor fuente de nitrógeno; en este medio, la mayor parte de las moléculas de Gln3p y Gat1p están retenidas en citoplasma y no tienen una función importante como activadores transcripcionales. Actualmente, no se ha podido demostrar que Gat1p se una a las cajas GATA; sin embargo, hay evidencia de que este factor regula positivamente a las permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno (Revisado por Magasanik and Kaiser, 2002). Nuestros datos sugieren que en SN/glutamina, Gat1p no tiene ninguna función que merme el crecimiento de las células (Tabla 8)

Aunque a Ure2p sólo se le han conferido 3 funciones: a) como regulador negativo de Gln3p, y probablemente de Gat1p (Coschigano y Magasanik, 1991; Coffman *et al.*, 1994; 1995); b) como molécula precursora de priones (Wickner, 1994; Bousset *et al.*, 2001 a); c) como probable glutatión-S-transferasa, (Bousset *et al.*, 2001 b; Umland *et al.*, 2001; Rai *et al.*, 2003), el fenotipo que presenta la cepa *ure2Δ* tanto en SN/glutamina como en SN/amonio, y en mucho menor

proporción en SN/prolina, sugiere que Ure2p tiene alguna otra función que se requiere para el crecimiento celular y que es independiente de Gln3p y Gat1p (Tabla 8). Otra posibilidad es que en una mutante *ure2Δ*, los factores GATA Gln3p y Gat1p que entran al núcleo, no son tan activos como en una mala fuente de nitrógeno, donde normalmente se localizan en el núcleo.

Si asumimos que en SN/glutamina algunas moléculas de Gln3p se encuentran en el núcleo, y que los genes que codifican las enzimas por las cuales se sintetiza glutamato son dependientes en gran medida de Gln3p (Courchesne y Magasanik, 1988), entonces, la ausencia de esta proteína disminuye la velocidad de biosíntesis de los compuestos nitrogenados requeridos por la célula, y por lo tanto, la velocidad de crecimiento de la cepa. Esto puede ser parte del efecto del fenotipo de crecimiento; sin embargo, ya que el tiempo de duplicación de la mutante es más del doble que el de la parental (Tabla 8), seguramente hay otras razones que se deban a efectos pleiotrópicos.

La velocidad de crecimiento de la cepa *ure2Δ gln3Δ* es menor que la de la cepa *gln3Δ* (Tabla 8), lo que nos demuestra con mayor contundencia que Ure2p tiene al menos una función independiente de Gln3p y/o Gat1p, que se requiere para el crecimiento de las células en una buena fuente de nitrógeno. Aunado a esto, se sabe que una delección en *URE2* no permite que Gat1p active sus genes blanco en células que crecen con glutamina como fuente de nitrógeno (Stanbrough y Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1994).

Prolina es una mala fuente de nitrógeno para *S. cerevisiae*, en la que, para convertirse en glutamato, se requieren una serie de pasos que involucran dos compartimentos celulares y dos reacciones enzimáticas (Revisado por ter Schure *et al.*, 2000). En malas fuentes de nitrógeno, Ure2p libera al activador GATA Gln3p, y probablemente a Gat1p. Éstos entran al núcleo a transcribir permeasas y enzimas catabólicas de las malas fuentes de nitrógeno (Coschigano y Magasanik, 1991; Stanbrough y Magasanik, 1995 b; Coffman *et al.*, 1994; 1995).

En SN/prolina, la cepa parental y la mutante *gat1* Δ tuvieron una velocidad de crecimiento similar, que es tres veces menor que en SN/glutamina (Tabla 8), lo que indica que, a pesar de la entrada de los factores GATA al núcleo para inducir la expresión de permeasas y enzimas que permiten utilizar prolina como fuente de nitrógeno, el consumo de energía de la célula debe ser considerablemente mayor, tanto que le impida duplicarse a la misma velocidad de lo que lo hace en una buena fuente de nitrógeno. Además, tenemos resultados en el laboratorio que muestran que, en prolina, la viabilidad de las células disminuye conforme transcurre el tiempo. Por otra parte, demostramos que tanto en una buena como en una mala fuente de nitrógeno, el efecto de Gat1p sobre el crecimiento óptimo de las células es nulo.

La proteína Ure2p parece tener muy poca importancia cuando la célula crece en SN/prolina, pues el tiempo de duplicación de la cepa *ure2* Δ es tan sólo 9.9% mayor que el de la cepa parental, mientras que en SN/glutamina la diferencia en la velocidad de crecimiento entre ambas cepas es de 27.26% (Tabla 8). Estos resultados sugieren que la probable función desconocida de Ure2p en glutamina, se pierde al cultivar las células con prolina como fuente de nitrógeno. Por lo tanto, esta función putativa de Ure2p parece ser dependiente de la fuente de nitrógeno, pero independiente de los activadores GATA. La velocidad de crecimiento de la cepa *gln3* Δ y la doble mutante *ure2* Δ *gln3* Δ es idéntica, lo que confirma la hipótesis de que Ure2p no tiene una función que se requiera para la duplicación de las células cultivadas en SN/prolina.

El hecho de que la doble mutante *gln3* Δ *gat1* Δ tenga un tiempo de duplicación menor que la cepa *gln3* Δ nos resulta inexplicable hasta el momento, pues en ausencia de estos dos factores transcripcionales en una mala fuente de nitrógeno, no hay manera de activar la transcripción de *GAP1* y *PUT4*, que codifican para la permeasa general de aminoácidos y para la permeasa de prolina y son los únicos dos transportadores membranales que pueden incorporar prolina al interior de la célula (Jauniaux *et al.*, 1987 ; 1990).

A diferencia de otras cepas en donde el amonio es una de las mejores fuentes de nitrógeno (Messenguy *et al.*, 2006) trabajos previos del laboratorio de la Dra. Alicia González demuestran que para la cepa CLA1, el gen *DAL5*, que codifica para la permeasa de alantoato y que está regulado por NCR, se expresa 3 veces más en amonio que en glutamina o asparagina, pero 6 veces menos que en prolina; por lo tanto, el amonio se considera como fuente de nitrógeno de calidad intermedia (Sosa, 2003). No obstante, el comportamiento de algunas de nuestras cepas no sigue el patrón de crecimiento esperado en una fuente intermedia de nitrógeno. La cepa silvestre, por ejemplo, tiene un tiempo de duplicación en SN/amonio sólo 12% mayor que en SN/glutamina, lo que sugiere que esta cepa crece como si amonio fuera una buena fuente de nitrógeno; en cambio, las mutantes *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* crecen tan lento, que los datos sugieren que Gln3p es necesaria para que las células puedan crecer con amonio como fuente de nitrógeno, como si éste fuera de mala calidad.

En esta condición de crecimiento, Ure2p parece adquirir una mayor importancia para el óptimo crecimiento de la célula, pues la mutante en *URE2* tiene un tiempo de duplicación 43% menor al de la cepa parental, pero ésta a su vez crece 3.3 veces más rápido que la mutante *gln3Δ* y que la doble mutante *ure2Δ gln3Δ*; lo sorprendente de estos datos es que, por un lado, la diferencia entre la velocidad de crecimiento de la cepa parental y la de estas mutantes se hace más grande en esta condición, inclusive más que en prolina. Por otro lado, la función de Ure2p que se requiere para que la célula se duplique parece depender de Gln3p, lo que no sucede ni con glutamina, ni con prolina como fuentes de nitrógeno.

Para la cepa CLA1, el amonio genera respuestas en la célula que aún no podemos explicar; probablemente Gat1p y/o Gln3p puedan entrar al núcleo como respuesta a NCR y también lo hagan de forma independiente. Esto podría explicar el fenotipo de crecimiento de las cepas evaluadas en SN/amonio.

2. RESISTENCIA A METALES.

Para evaluar la resistencia a zinc en la cepa parental y las mutantes en estudio, el diseño de los experimentos se hizo con dos enfoques:

a) Evaluar la capacidad de adaptación de las células al zinc, cuando crecen en medio rico líquido y se gotean en SN sólido con diferentes fuentes de nitrógeno. Una aproximación inicial para saber si el metal tenía algún efecto fue determinar la posible función de las proteínas involucradas en NCR independientemente de la fuente de nitrógeno, pues se ha descrito que una mutante *ure2Δ* es más resistente a zinc que la cepa parental en glutamina, glutamato, amonio y prolina (Rai y Cooper, 2005), lo que permite suponer que Gln3p activa a los genes que ejercen resistencia a zinc en todas las fuentes de nitrógeno. Por ello, la resistencia a zinc de la cepa parental solamente se evaluó en SN/amonio. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los factores GATA y/o Ure2p tengan una función como reguladores en la resistencia a zinc, que dependa de la calidad de la fuente de nitrógeno en la que crecen las células.

b) Evaluar la resistencia a zinc sin variar la fuente de nitrógeno y carbono entre el crecimiento en medio líquido y el goteo en medio sólido. Dado que al evaluar la adaptación de las cepas al zinc, el fenotipo que presentan las cepas también se debe al cambio de nutrientes, medir el efecto exclusivamente del metal implica crecer a las células en la misma fuente de nitrógeno y carbono en la que son goteadas. Por otra parte, existe evidencia que demuestra que en *Candida glabrata* el número de duplicaciones de las células después de pasar por fase estacionaria influye en la resistencia a peróxido de hidrógeno (Cañas-Villamar y De Las Peñas, comunicación personal). Por lo tanto, al inocular las cepas en SN con diferentes fuentes de nitrógeno, todas tuvieron el mismo número de duplicaciones al momento del goteo. Un tercer factor que influye en la interpretación de los datos es la diferencia en la velocidad de crecimiento entre la cepa parental y las mutantes. Por ello, la mejor manera de entender correctamente la función de las proteínas involucradas en NCR en la resistencia a zinc, es registrando las

imágenes a diferentes tiempos, en los que el nivel de crecimiento de todas las cepas sea el mismo en los medios sin metal.

Al crecer a las células en YPD líquido y gotearlas en SN sólido con diferentes fuentes de nitrógeno y con sulfato de zinc 4 mM, una mutante *gln3Δ* y una doble mutante *ure2Δ gln3Δ* parecen más sensibles al metal que la cepa parental al incubar las cepas a 28°C durante 3.5 días (80 h) (datos no mostrados); a tiempos más largos de incubación, (6 días: 144 h) en las mismas condiciones, todas las cepas crecen al menos una dilución más en los medios con zinc; por lo tanto, la concentración 4 mM de sulfato de zinc es inhibitoria de la velocidad de crecimiento, pero no mata a las células. Probablemente, la “sensibilidad” observada en las mutantes *gln3Δ* y *ure2Δ gln3Δ* se debe al lento crecimiento de las cepas tanto en los medios sin zinc, como en los medios con metal (Fig. 12). O bien, es posible que este fenotipo se deba al choque de nutrientes, al que estas mutantes no pudieron adaptarse.

Al evaluar nuevamente la resistencia a zinc de la cepa parental en diferentes fuentes de nitrógeno, se observa que el choque de nutrientes sí tiene un efecto en el fenotipo que la cepa presenta en presencia del metal, pues ésta es más resistente cuando las células crecen en YPD líquido (Fig. 10), que cuando crecieron en SN/amonio líquido desde el preinóculo (Fig. 12). Probablemente lo que sucede es que, cuando la célula detecta un cambio repentino de nutrientes, activa de manera transitoria los sistemas de respuesta a estrés. Si nos referimos exclusivamente a Gln3p/Gat1p, posiblemente los factores entren al núcleo, transcriban una serie de genes que codifican para permeasas de fuentes de nitrógeno, y luego regresen al citoplasma. En estas condiciones, las células crecen más rápido, y se enmascara la verdadera sensibilidad de éstas al metal. El fenómeno de entrada transitoria de los activadores GATA a núcleo se ha descrito cuando se añade rapamicina a una cepa silvestre (Cox *et al.*, 2004).

En la Figura 17, los datos demuestran que Ure2p tiene una función de regulador negativo sobre una proteína, ya sea Gln3p u otra que, de manera directa o indirecta, detoxifica a la célula del exceso de zinc. La resistencia observada en una mutante *ure2Δ* se presenta en todas de las fuentes de nitrógeno evaluadas y por alguna razón que todavía no podemos explicar, el fenotipo es más fuerte en amonio.

Por otra parte, Gln3p parece funcionar como regulador negativo en la resistencia a zinc con prolina como fuente de nitrógeno de mala calidad; sin embargo, en SN/glutamina, que es la mejor fuente de nitrógeno, el fenotipo de resistencia no se observa en una cepa *gln3Δ*. Estos resultados sugieren que cuando Gln3p entra al núcleo con las modificaciones necesarias para estar activo, induce la expresión de los genes que introducen zinc a la célula. Nuestros datos concuerdan con evidencia previa que muestra que una en una mutante *gln3Δ* el gen *ZRT1* que codifica para el transportador que incorpora zinc al interior celular con alta afinidad, no se transcribe (Cox *et al.*, 1999). Se ha visto que los niveles de fosforilación de Gln3p y su localización celular en malas fuentes de nitrógeno son diferentes a aquéllos producidos por rapamicina (Cox *et al.*, 2004); nosotros proponemos que en una mutante *ure2Δ* donde Gln3p está libre en núcleo, las modificaciones postraduccionales, ya sean fosforilaciones u otras, no son las mismas que cuando Gln3p entra a núcleo en forma activa en una mala fuente de nitrógeno (Sosa, 2003). Estas modificaciones están asociadas con la calidad de la fuente de nitrógeno. Por lo tanto, creemos que Gln3p es menos activo en una mutante *ure2Δ*, independientemente de la fuente de nitrógeno en la que la célula haya crecido.

Con la finalidad de saber si los transportadores de zinc pudieran estar regulados por los factores GATA, se buscaron los posibles sitios de unión de Gln3p y Gat1p en los promotores de los genes que codifican para los transportadores de zinc y para el activador Zap1p, usando el programa RSA-tools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>). Las secuencias de búsqueda son GATWA donde W es

A o T y la secuencia GATAAG (Anexo 3). Aunque el hecho de tener varias cajas GATA en la secuencia promotora no implica que un gen esté regulado por Gln3p, Gat1p, Dal80p y/o Nil2p, sí podemos sugerir que los genes que codifican para los transportadores de zinc Zrt1p, Zrc1p, Pho84, YKE4p (que codifica para un transportador de zinc de retículo endoplásmico) estén regulados directamente por algún factor GATA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, proponemos que Gln3p, al entrar al núcleo con las modificaciones postraduccionales necesarias, activa la transcripción de *ZRT1* que introduce zinc a la célula, pero también activa al gen *ZRC1* que transporta zinc a la vacuola y destoxifica a la célula de este metal. Dado que *ZRT1* tiene cuatro secuencias GATA en su región promotora y *ZRC1* sólo tiene dos, Gln3p pudiera unirse con mayor afinidad a *ZRT1*, de manera que, en una buena fuente de nitrógeno, las pocas moléculas de Gln3p que están dentro del núcleo, activarían sólo este gen y no lo harían con *ZRC1*. En cambio, en SN/prolina, donde la mayoría de moléculas de Gln3p están dentro del núcleo en forma activa, éstas tendrían la capacidad de incrementar la transcripción tanto de *ZRT1*, como de *ZRC1*. Esto explicaría por qué la cepa parental es más sensible en glutamina que en prolina. Sin embargo, para comprobar lo que proponemos, se requieren de experimentos que muestren datos sobre los niveles de expresión de los genes que codifican para transportadores de zinc en las cepas en estudio.

VII. CONCLUSIONES

1. Ure2p actúa como regulador negativo en la resistencia a zinc independientemente de la fuente de nitrógeno.
2. Gln3p no participa en la resistencia al metal cuando la célula crece en una buena fuente de nitrógeno.
3. Conforme la calidad de la fuente de nitrógeno disminuye, Gln3p tiene una función de regulador negativo de las proteínas que destoxifican a la célula del zinc, o bien de activador de los transportadores que incorporan zinc a la célula.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la resistencia o sensibilidad a zinc de las mutantes *ure2Δ gat1Δ* y de la triple mutante *ure2Δ gln3Δ gat1Δ* en las diferentes fuentes de nitrógeno.
2. Evaluar el comportamiento de las cepas en un choque de zinc, de manera que podamos conocer la injerencia que tienen las proteínas Gln3p, Gat1p y Ure2p en estas condiciones.
3. Determinar los niveles de transcripción de los transportadores de zinc en la cepa silvestre y en las mutantes, cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno con y sin sulfato de zinc.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Avendaño A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L y González A (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 5594-5597.
- Beck T y Hall MN (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF and Zheng XF (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J Biol Chem* **275**: 35727-35733.
- Bird AJ, Blankman E, Stillman DJ, Eide DJ y Winge DR (2004). The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in *ZRT2*. *EMBO J* **23**: 1123-1132.
- Bousset L, Belrhali H, Janin J, Melki R y Morera S (2001 a). Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Structure* **9**: 39-46.
- Bousset L, Belrhali H, Melki R y Morera S (2001 b). Crystal structures of the yeast prion Ure2p functional region in complex with glutathione y related compounds. *Biochemistry* **40**: 13564-13573.
- Bysani N, Daugherty JR y Cooper TG (1991). Saturation mutagenesis of the UASNTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 4977-4982.
- Coffman JA, elBerry HM y Cooper TG (1994). The Ure2 protein regulates nitrogen catabolic gene expresión through GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **176**: 7476-7483.
- Coffman JA, Rai R y Cooper TG (1995). Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 6910-6918. Erratum in: *J Bacteriol* **178**: 2159.

- Cogoni C, Valenzuela L, González-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P y Gonzalez A (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* **177**: 792-798.
- Cooper TG (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. (Strathern JN, Jones EW y Broach JR, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 39-99.
- Coschigano PW y Magasanik B (1991). The *URE2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source y has homology to glutathione s-transferases. *Mol Cell Biol* **11**: 822-832.
- Cox KH, Pinchak AB y Cooper TG (1999). Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* **15**: 703-713.
- Cox KH, Kulkarni A, Tate JJ y Cooper TG (2004). Gln3 phosphorylation and intracellular localization in nutrient limitation and starvation differ from those generated by rapamycin inhibition of Tor1/2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 10270-10278.
- Courchesne WE y Magasanik, B (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J Bacteriol* **170**: 708-713.
- Cunningham TS, Andhare R y Cooper TG (2000). Nitrogen catabolite repression of *DAL80* expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 14408-14414.
- Eide DJ (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 711-722.
- Gitan RS, Shababi M, Kramer M y Eide DJ (2003). A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *J Biol Chem* **278**: 39558-39564.

- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J y Andre B (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**: 3065-3086.
- Grenson M, Hou C y Crabeel M (1970). Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a general amino acid permease. *J Bacteriol* **103**: 770-777.
- Jauniaux JC, Vandenbol M, Vissers S, Broman K y Grenson M (1987). Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the *PUT4* gene and study of *PUT4* RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur J Biochem* **164**: 601-606.
- Jauniaux JC y Grenson M (1990). *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur J Biochem* **190**: 39-44.
- Jensen LT, Ajua-Alemanji M y Culotta VC (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem* **278**: 42036-42040.
- Kolhaw G, Draegert W y Holzer H (1965). Parallel repression of the synthesis of glutamine synthetase and DPN-Dependent Glutamate dehydrogenase in yeasts. *Biochem Z* **341**: 224-238.
- Lyons TJ, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown PO y Eide DJ (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 7957-7962.
- MacDiarmid CW, Gaither LA y Eide DJ (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 2845-2855.
- MacDiarmid CW, Milanick MA y Eide DJ (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 39187-39194.

- MacDiarmid CW, Milanick MA y Eide DJ (2003). Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *J Biol Chem* **278**: 15065-15072.
- Magasanik B (1992). Regulation of nitrogen utilization. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. (Strathern JN, Jones EW y Broach JR, Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.pp: 283-317.
- Magasanik B y Kaiser CA (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**: 1-18.
- Margoshes M y Vallee BL (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* **79**: 4813-4814.
- Messenguy F, André B y Dubois E (2006). Diversity of Nitrogen Metabolism Among Yeast Species : Regulatory and Evolutionary Aspects. In: *The Yeast Handbook: "Biodiversity and Ecophysiology of Yeast"* (Rosa C y Gábor P , Eds). Springer Verlag. pp:123-154.
- Mitchell, AP y Magasanik B (1983). Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **258**: 119-124.
- Nagasu T y Hall BD (1985). Nucleotide sequence of the *GDH* gene coding for the NADP- specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **37**: 247-253.
- Rai R, Tate JJ y Cooper TG (2003). Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects *Saccharomyces cerevisiae* cells from heavy metal ion and oxidant toxicity. *J Biol Chem* **278**: 12826-12833.
- Rai R y Cooper TG (2005). *In vivo* specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces crevisiae*. *Yeast* **22**: 343-358.
- Rowen DW, Esiobu N y Magasanik B (1997). Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 3761-3766.
- Scherens B, Feller A, Vierendeel F, Messenguy F y Dubois E. (2006). Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by

transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS Yeast Res* **6**: 777-791.

- Sherman F (1998) An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Modificado de F. Sherman, Yeast genetics. The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, pp. 302-325, Vol. 6. Edited by R. A. Meyers, VCH Pub., Weinheim, Germany, 1997.
- Sosa, E (2003). Determinación de la función de Gcn4p sobre la expresión del gen *DAL5* en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura de la Carrera de Biología de la Universidad de Guadalajara, México.
- Sosa E, Aranda C, Riego L, Valenzuela L, DeLuna A, Cantú JM y González A (2003). Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 1175-1180.
- Stanbrough M y Magasanik B (1995). Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 94-102.
- Stanbrough M, Rowen DW y Magasanik B (1995). Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 9450-9454.
- ter Schure EG, van Riel NA y Verrips CT (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. **24**: 67-83.
- Umland TC, Taylor KL, Rhee S, Wickner RB y Davies DR (2001). The crystal structure of the nitrogen regulation fragment of the yeast prion protein Ure2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 1459-1464.
- Valenzuela L, Aranda C y González A (2001). TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**: 2331-2334.
- Waters BM y Eide DJ (2002). Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* **277**: 33749-33757.

- Wickner RB (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**: 566-569.
- Zhao H y Eide DJ (1996 a). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 2454-2458.
- Zhao H y Eide DJ (1996 b). The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 23203-23210.
- Zhao H y Eide DJ (1997). Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **17**: 5044-5052.
- Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S y Eide DJ (1998). Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J Biol Chem* **273**: 28713-28720.

X. ANEXOS

ANEXO 1

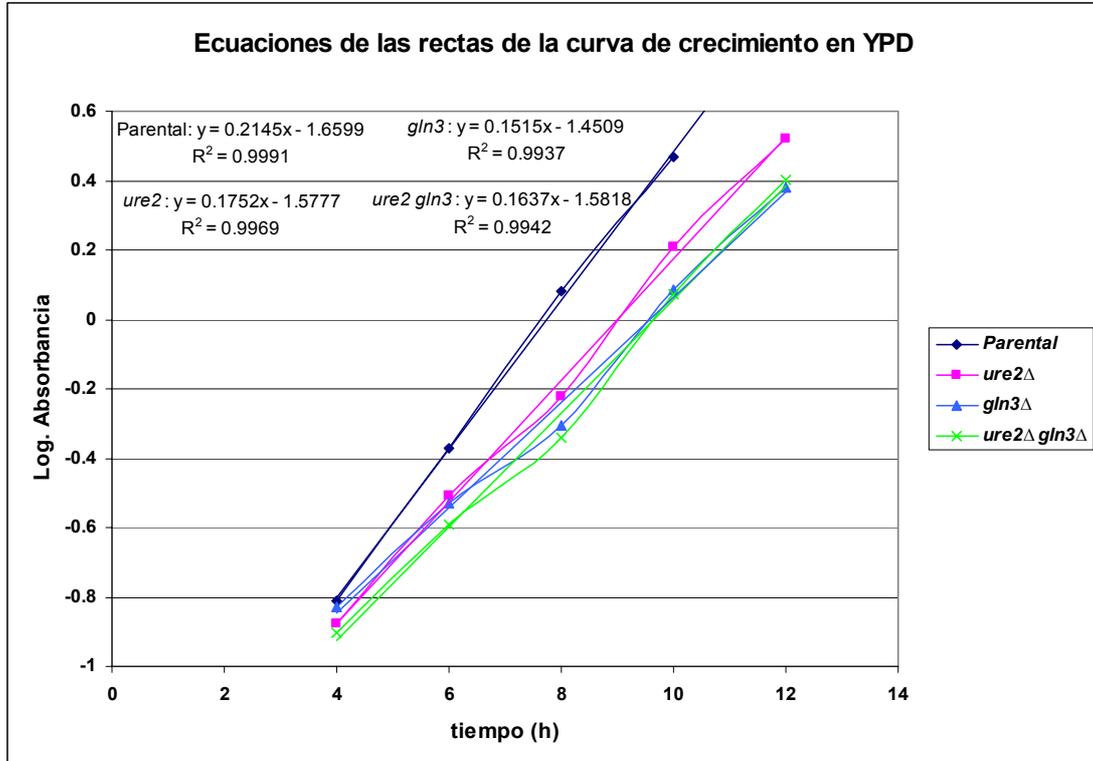


Figura 14. Ecuación de la recta de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2*Δ *gln3*Δ en YPD. La ecuación se calculó con cinco puntos de la fase logarítmica de crecimiento. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm.

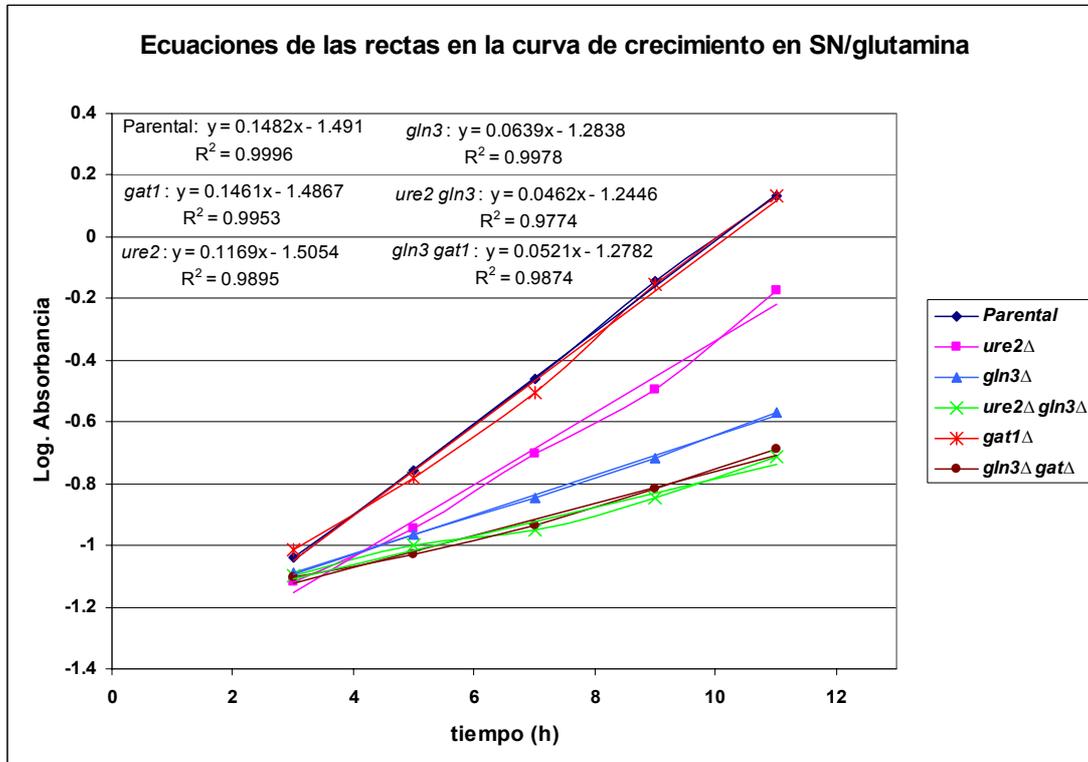


Figura 15. Ecuación de la recta de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2*Δ *gln3*Δ, *gat1*Δ y *gln3*Δ *gat1*Δ en SN/glutamina. La ecuación se calculó con cinco puntos de la fase logarítmica de crecimiento. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm.

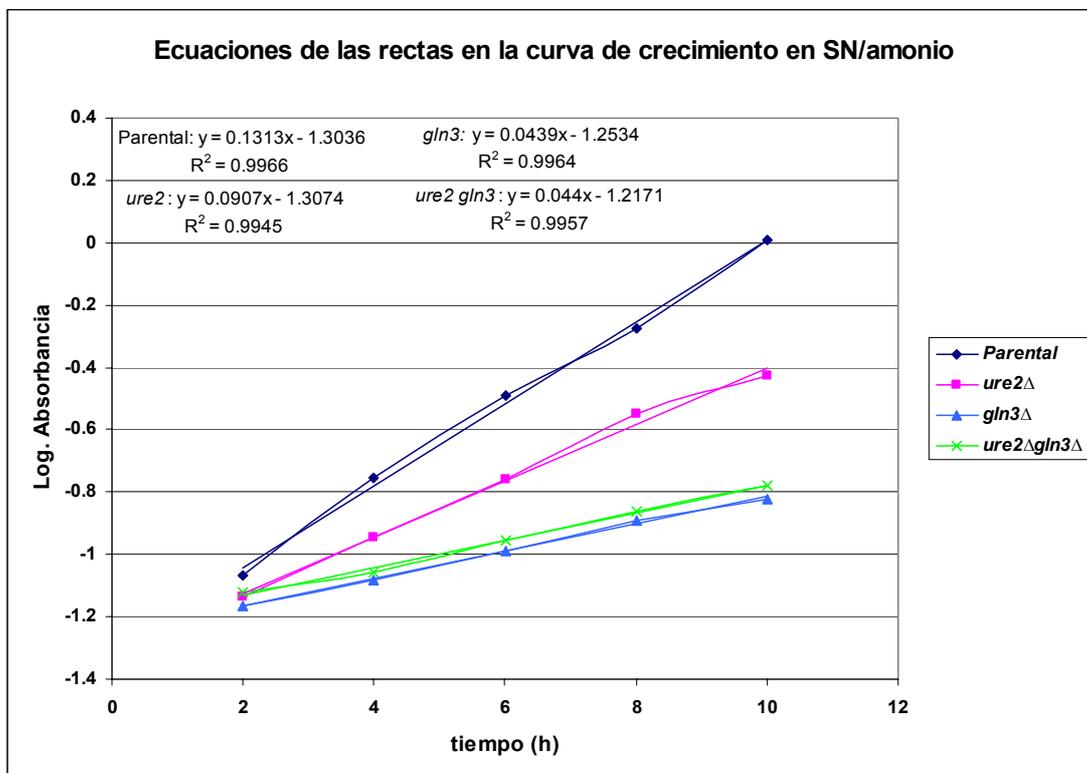


Figura 16. Ecuación de la recta de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2*Δ *gln3*Δ en SN/amonio. La ecuación se calculó con cinco puntos de la fase logarítmica de crecimiento. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm.

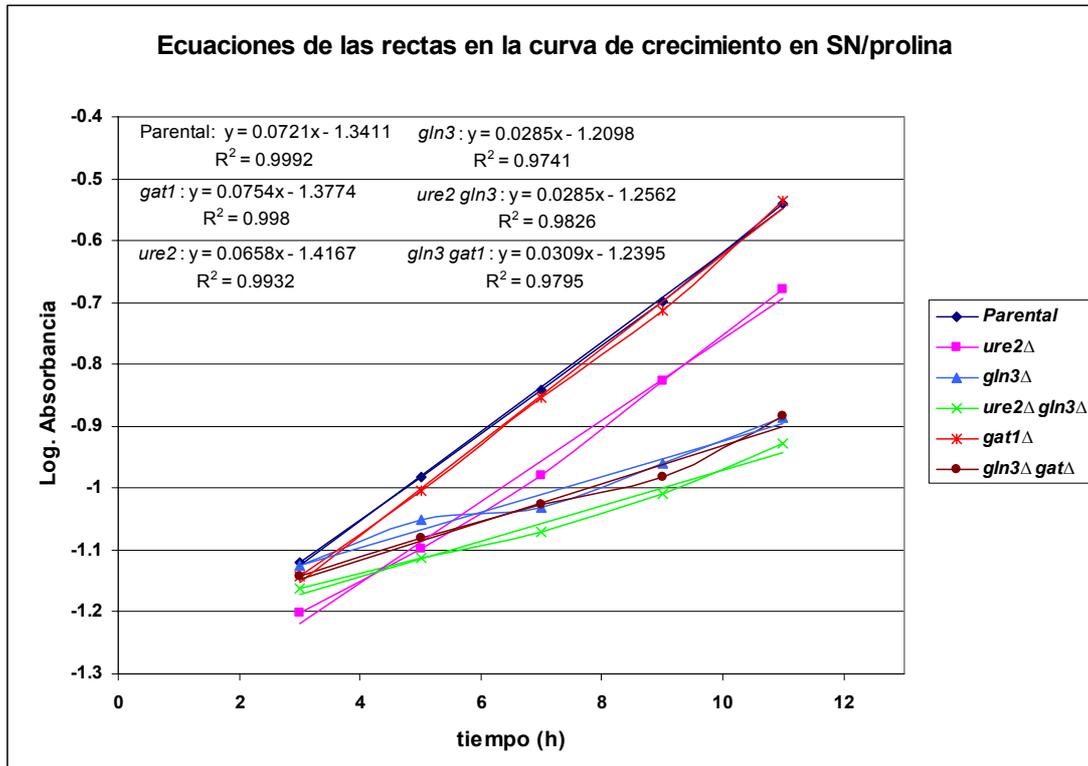


Figura 17. Ecuación de la recta de las cepas parental, *ure2*Δ, *gln3*Δ, *ure2 gln3*Δ, *gat1*Δ y *gln3 gat1*Δ en SN/prolina. La ecuación se calculó con cinco puntos de la fase logarítmica de crecimiento. Las cepas crecieron a 30°C y con agitación a 250 rpm.

ANEXO 2

Tabla 9. Absorbancias de las cepas cultivadas en YPD líquido y número de duplicaciones para alcanzar una absorbancia $A_{600}=0.6$.

YPD	Lectura del preinóculo	Lectura inicial inóculo	Lectura final inóculo	Número de duplicaciones	Lectura de cepas ajustadas a 0.6
Parental	5.12	0.03	0.92 *	7	0.77
<i>ure2Δ</i>	5.08	0.04	0.83 *	5.5	0.77
<i>gln3Δ</i>	0.114	0.039	0.67	4	0.67
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	0.228	0.075	0.67	3	0.67

* Dilución 1:2 extra durante el experimento.

Tabla 10. Absorbancias de las cepas cultivadas en SN/glutamina líquido y número de duplicaciones para alcanzar una absorbancia $A_{600}=0.6$.

GLUTAMINA	Lectura del preinóculo	Lectura inicial inóculo	Lectura final inóculo	Número de duplicaciones	Lectura de cepas ajustadas a 0.6
Parental	2.64	.04	0.7	4	0.62
<i>ure2Δ</i>	1.93	.059	0.6	3.5	0.6
<i>gln3Δ</i>	1.66	.048	0.59	3.5	0.59
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	2.27	.04	0.58	3.5	0.58
<i>gat1Δ</i>	1.49	.04	0.78	4.5	0.63
<i>gat1Δ gln3Δ</i>	1.34	.049	0.59	3.5	0.59

Tabla 11. Absorbancias de las cepas cultivadas en SN/amonio líquido y número de duplicaciones para alcanzar una absorbancia $A_{600}=0.6$.

AMONIO	Lectura del preinóculo	Lectura inicial inóculo	Lectura final inóculo	Número de duplicaciones	Lectura de cepas ajustadas a 0.6
Parental	1.44	0.049	0.65	3.5	0.61
<i>ure2Δ</i>	2.45	0.05	0.83	4	0.58
<i>gln3Δ</i>	1.59	0.04	0.56	3.5	0.56
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	2.04	0.052	0.6 *	4.5	0.6
<i>gat1Δ</i>	1	0.051	0.72	3.5	0.56
<i>gat1Δ gln3Δ</i>	2.2	0.046	0.62	3.5	0.62

- Dilución 1:2 extra durante el experimento.

Tabla 12. Absorbancias de las cepas cultivadas en SN/prolina líquido y número de duplicaciones para alcanzar una absorbancia $A_{600}=0.6$.

PROLINA	Lectura del preinóculo	Lectura inicial inóculo	Lectura final inóculo	Número de duplicaciones	Lectura de cepas ajustadas a 0.6
Parental	1.87	.05	0.58	3.5	0.58
<i>ure2Δ</i>	1.56	.049	0.58	3.5	0.58
<i>gln3Δ</i>	1.50	.053	0.59	3.5	0.59
<i>ure2Δ gln3Δ</i>	2.30	.04	0.57	3.5	0.57
<i>gat1Δ</i>	1.67	.05	0.57	3.5	0.57
<i>gat1Δ gln3Δ</i>	1.25	.054	-----	-----	-----

ANEXO 3

PatID	Strand	Pattern	SeqID	Start	End	matching_seq	Score
SEQ_START	DR	-	ZRT1	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	ZRT1	-1	-1	-	0.00
GATWA	D	gatwa	ZRT1	-651	-647	gtctGATTAtggc	1.00
GATWA	D	gatwa	ZRT1	-617	-613	cggcGATTAcggc	1.00
GATWA	D	gatwa	ZRT1	-404	-400	gcccaGATAActaa	1.00
GATWA	R	gatwa	ZRT1	-262	-258	atctGATAAttt	1.00
SEQ_START	DR	-	ZRT2	-447	-447	-	0.00
SEQ_END	DR	-	ZRT2	-1	-1	-	0.00
GATWA	R	gatwa	ZRT2	-440	-436	cataGATAAatgt	1.00
SEQ_START	DR	-	ZRT3	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	ZRT3	-1	-1	-	0.00
GATWA	D	gatwa	ZRT3	-387	-383	caatGATTActta	1.00
GATWA	R	gatwa	ZRT3	-248	-244	ttatGATTaactt	1.00
SEQ_START	DR	-	ZRC1	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	ZRC1	-1	-1	-	0.00
GATWA	D	gatwa	ZRC1	-595	-591	atgaGATAAactt	1.00
GATWA	R	gatwa	ZRC1	-630	-626	cpgaGATAActtt	1.00
SEQ_START	DR	-	COT1	-170	-170	-	0.00
SEQ_END	DR	-	COT1	-1	-1	-	0.00
SEQ_START	DR	-	ZAP1	-283	-283	-	0.00
SEQ_END	DR	-	ZAP1	-1	-1	-	0.00
GATWA	D	gatwa	ZAP1	-187	-183	acatGATTAtata	1.00
SEQ_START	DR	-	MSC2	-201	-201	-	0.00
SEQ_END	DR	-	MSC2	-1	-1	-	0.00
GATWA	R	gatwa	MSC2	-185	-181	gagaGATAAaagt	1.00
SEQ_START	DR	-	YKE4	-738	-738	-	0.00
SEQ_END	DR	-	YKE4	-1	-1	-	0.00
GATAAG	R	gataag	YKE4	-660	-655	ttggGATAAGaggg	1.00
GATAAG	R	gataag	YKE4	-445	-440	ttacGATAAGtaaa	1.00
GATWA	D	gatwa	YKE4	-123	-119	tccgGATTAttat	1.00
GATWA	R	gatwa	YKE4	-659	-655	ttggGATAAGaggg	1.00
GATWA	R	gatwa	YKE4	-444	-440	ttacGATAAgtaa	1.00
GATWA	R	gatwa	YKE4	-402	-398	ttatGATTAggta	1.00
GATWA	R	gatwa	YKE4	-262	-258	atatGATAActtt	1.00
SEQ_START	DR	-	FET4	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	FET4	-1	-1	-	0.00
GATWA	D	gatwa	FET4	-360	-356	aactGATTAggtc	1.00
GATWA	R	gatwa	FET4	-95	-91	ttatGATAAaaga	1.00
GATWA	R	gatwa	FET4	-10	-6	atttGATTAcgga	1.00
SEQ_START	DR	-	PHO84	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	PHO84	-1	-1	-	0.00
GATAAG	R	gataag	PHO84	-307	-302	gaggGATAAGgaaa	1.00
GATWA	D	gatwa	PHO84	-384	-380	aattGATTAtggt	1.00
GATWA	D	gatwa	PHO84	-269	-265	gctaGATTaaaa	1.00
GATWA	R	gatwa	PHO84	-729	-725	ggctGATAAatta	1.00
GATWA	R	gatwa	PHO84	-714	-710	ggtGATAAcga	1.00
GATWA	R	gatwa	PHO84	-306	-302	gaggGATAAggaa	1.00
GATWA	R	gatwa	PHO84	-66	-62	gaaaGATAAaatt	1.00
SEQ_START	DR	-	DAL5	-800	-800	-	0.00
SEQ_END	DR	-	DAL5	-1	-1	-	0.00
GATAAG	D	gataag	DAL5	-393	-388	tgctGATAAGgtgc	1.00
GATAAG	D	gataag	DAL5	-347	-342	tttcGATAAGgagtc	1.00
GATAAG	R	gataag	DAL5	-171	-166	taatGATAAGtatt	1.00
GATWA	D	gatwa	DAL5	-611	-607	cattGATAAcaag	1.00
GATWA	D	gatwa	DAL5	-393	-389	tgctGATAAggtg	1.00
GATWA	D	gatwa	DAL5	-347	-343	tttcGATAAgagt	1.00
GATWA	D	gatwa	DAL5	-270	-266	tggtGATTAtcgg	1.00
GATWA	D	gatwa	DAL5	-33	-29	caagGATAAtcaa	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-527	-523	acctGATTaaggt	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-268	-264	ccccGATAAtcca	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-229	-225	tggtGATAAcggt	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-170	-166	taatGATAAgat	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-164	-160	accaGATAAtgat	1.00
GATWA	R	gatwa	DAL5	-31	-27	atttGATTAtcct	1.00

Figura 18. Posición de las posibles cajas GATAAG y GATWA presentes en los promotores de los genes que codifican para transportadores de zinc. El gen *DAL5* se usó como control positivo del análisis.

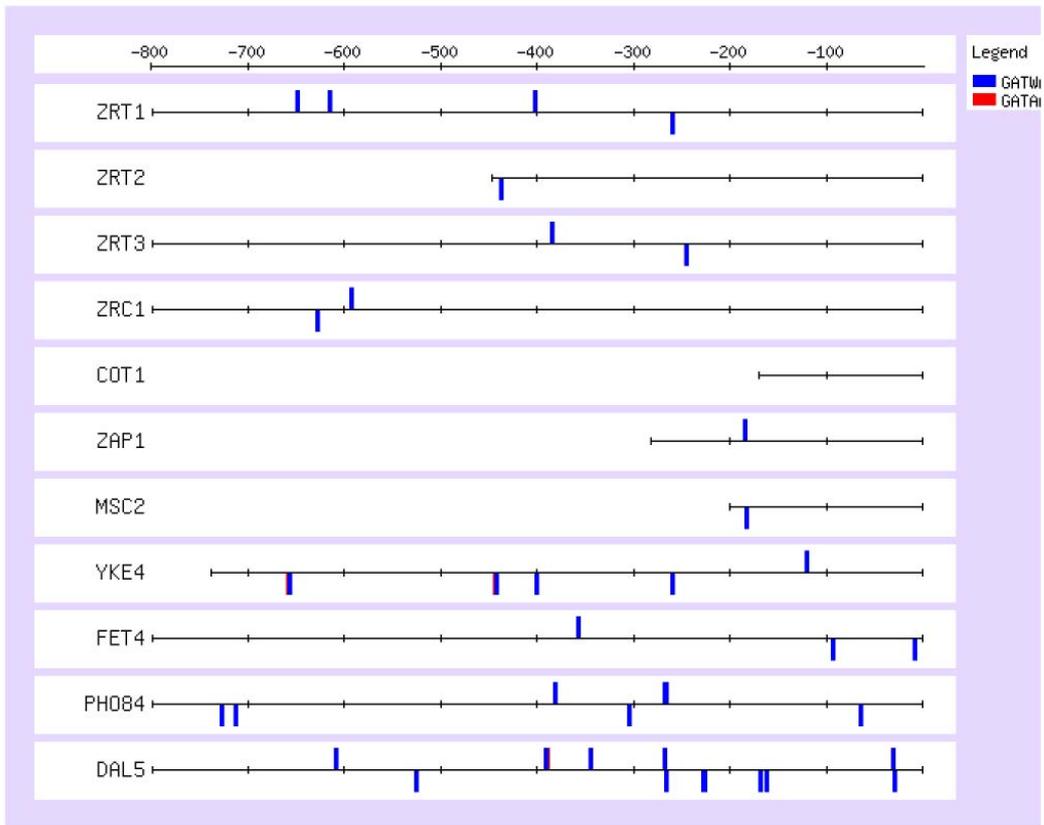


Figura 19. Representación gráfica de las posibles cajas GATAAAG (rojo) y GATWA (azul) presentes en los promotores de los genes que codifican para transportadores de zinc. El gen *DAL5* se usó como control positivo del análisis.