



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

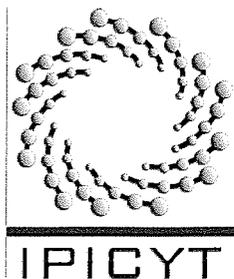
**Expresión diferencial de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*  
de *Gln3p***

Tesis que presenta  
**Gabriela Josefina Mendoza Rangel**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Directora de la Tesis:**  
**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2008



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión diferencial de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* y su relación con el dominio de activación de *Gln3p***” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gabriela Josefina Mendoza Rangel** y aprobada el **22 de agosto de 2008** 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.



---

Dr. Lina Raquel Riego Ruiz  
Directora



---

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga  
Asesor de la tesis



---

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro  
Asesora de la tesis

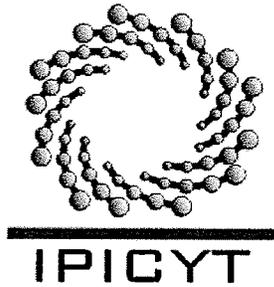


## Créditos Institucionales

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.

Este trabajo se realizó con apoyo del proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales-**SEP-2005-49039** y del Macroproyecto “**Tecnologías para la Universidad de la Información y la Computación**”, UNAM

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 210874 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# 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 057 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 12 días del mes de septiembre del año 2008, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Gabriela Josefina Mendoza Rangel**

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión diferencial de los genes TDH1, TDH2 y TDH3 y su relación con el dominio de activación de Gln3p*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

El Jurado, después de deliberar, determinó

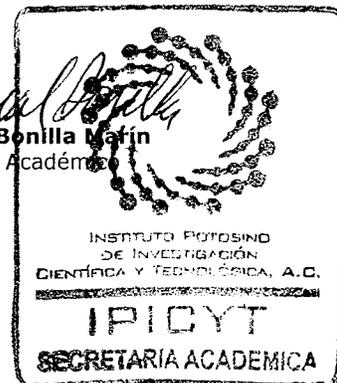
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:33 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 12 días del mes de septiembre de 2008.

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

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

A mis padres: Ma. Cristina Rangel Gutiérrez y  
Manuel Mendoza Torres

## Agradecimientos

A mis padres Ma. Cristina Rangel y Manuel Mendoza por apoyar cada uno de los proyectos que he emprendido y por todo su cariño. A mis hermanos Cris y Manolo por su cariño y apoyo incondicional.

A mis queridos compañeros y amigos de generación: Adriana B., Aída R. Andrómeda L., Ángel H., Edith U., Javier M., Lucy M., Marcela B., Mariana C., Raúl L., Ricardo R., Sergio G., Yair C., por ser excelentes amigos.

A mis compañeros y amigos del IPICYT: Omar P., Miguel Angel S., Mayte C., Eloisa H., Toño R., Juan Manuel M., Iliana T., Candy R., Alex J., Telma R., Claudia P., Jacky J., Aurora L. por su amistad.

A la Dra. Lina por haberme aceptado en su laboratorio y a la Dra. Imelda Bonifás por todos sus consejos.

## ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CREDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXÁMEN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÌNDICE	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
Introducción	
<b>I.- Bases moleculares del metabolismo nitrogenado en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	1
1.1 Metabolismo del nitrógeno	5
1.2 Represión Catabólica Nitrogenada	7
1.3 Estructura y función del factor transcripcional Gln3p	10
<b>II.- Bases Moleculares del metabolismo del carbono en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	10
2.1 Fases de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisieae</i>	11
2.2 Metabolismo de la glucosa	12
2.3 Glucólisis	14
2.4 Los genes <i>TDH1</i> , <i>TDH2</i> y <i>TDH3</i>	17
<b>III.-ANTECEDENTES</b>	

## **IV.- OBJETIVOS**

**4.1** Objetivo General

**4.2** Objetivos Específicos

## **V.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## **VI.- RESULTADOS**

## **VII.- DISCUSIÓN**

## **VIII.- CONCLUSIONES**

## **IX.- PERSPECTIVAS**

## **X.- BIBLIOGRAFÍA**

## RESUMEN

Debido a que se conoce muy poco acerca de la participación del factor transcripcional Gln3p de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la regulación de genes diferentes al catabolismo del nitrógeno, nosotros nos planteamos estudiar la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* Y *TDH3* en ausencia de este factor transcripcional y cuando se tiene a una mutante que conserva el dominio de activación funcional (*gln3AD*). La elección de genes se basó en un experimento de microarreglos que demostró que quince genes dependen del dominio de activación de Gln3p incluyendo a *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, que codifican para enzimas que participan en la glucólisis. El experimento de microarreglos se realizó en un medio SN-glutamina y glucosa comparando a la WT con la cepa *gln3D* del cuál se obtuvo una lista, y comparando a la cepa *gln3D* con la cepa *gln3<sup>-</sup>(DA)* del cuál se obtuvo otra lista independiente. Los genes comunes entre estas dos listas son los genes que dependen del dominio de activación de Gln3p.

En nuestro estudio corroboramos que cuando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza etanol como fuente de carbono no logra crecer en ausencia de *GLN3*; sin embargo, la cepa mutante que lleva el dominio de activación sí crece en el mismo medio. Adicionalmente, el estudio de la expresión de los genes *TDH1* y *TDH2* por RT-PCR demostró que en la cepa mutante nula de *GLN3* disminuye su expresión en SN-glucosa y SN-etanol, pero se recupera en la mutante que conserva al dominio de activación.

## ABSTRACT

Little is known about the relationship between *GLN3* and other genes which are not related with the nitrogen catabolism. Based on a microarray experiment, we identified a group of genes that are regulated directly or indirectly by the activation domain of *GLN3* including *TDH1*, *TDH2* and *TDH3*, whose protein products are enzymes involved in glucose catabolism.

We found that when the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is grown in SN-ethanol, the *gln3?* strain can not grow, whereas the *gln3<sup>-</sup>* strain which contains a Gln3p that conserves the activation domain, grows at similar rate than wild type strain.

Furthermore, the mRNA expression analysis showed that the expression level of *TDH1* and *TDH2* decreased in the *gln3?* strain, whereas the *gln3<sup>-</sup>* strain recovers with similar level of expression that of the wild type strain, not only in a SN-glucose medium but also in a SN-ethanol . We also observed differential expression of *TDH3* in a SN-glucose.

## INTRODUCCIÓN

### I. Bases moleculares del metabolismo nitrógenado en *Saccharomyces cerevisiae*

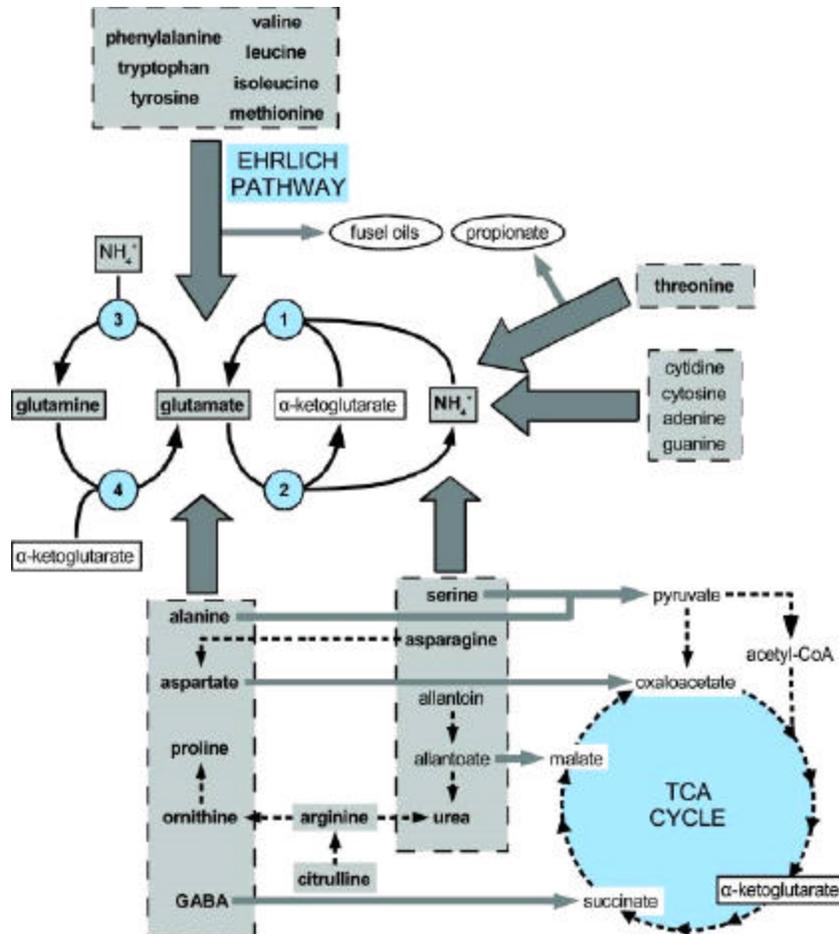
#### 1.1 Metabolismo del nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial para todas las formas de vida. La presión de selección evolutiva ha favorecido a aquellas células que son capaces de transportar y catabolizar una amplia variedad de compuestos nitrogenados, así como de sintetizarlos de manera endógena. Estas propiedades que son típicas de organismos unicelulares de vida libre, han sido bien estudiadas en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>1</sup>

La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar alrededor de treinta compuestos que contienen grupos funcionales nitrogenados que incluyen aminoácidos, urea, amonio, bases nitrogenadas y derivados de purina (Fig. 1) <sup>2</sup>. Estas moléculas entran a la célula por medio de permeasas y son inmediatamente utilizadas en reacciones biosintéticas ó bien catabolizadas para liberar al nitrógeno en forma de amonio (desaminación), de glutamato (transaminación), o ambas. La glutamina es sintetizada por la condensación del glutamato y del amonio una reacción catalizada por la glutamino sintetasa (*GNL1*).

El glutamato y la glutamina, son los principales donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas<sup>2</sup>.

Como se ilustra en la figura 1, el amonio, el glutamato y la glutamina pueden estar interrelacionados por sistemas enzimáticos específicos formando el metabolismo central del nitrógeno.



**Figura 1.** Principales reacciones involucradas en la utilización de fuentes de nitrógeno en la levadura *S. cerevisiae* (Tomado de Godard et al 2007)

El transporte de nitrógeno, su anabolismo y su catabolismo, están sujetos a un control estricto de acuerdo al nitrógeno contenido en el medio. Este control actúa sobre la transcripción de los genes, sobre la actividad en la síntesis y de proteínas sobre la degradación de enzimas y permeasas<sup>3</sup>.

El control transcripcional de genes involucrados en el anabolismo del nitrógeno puede ser de dos tipos: el que afecta a los genes en una vía metabólica específica y el control general de la biosíntesis de amino ácidos (GAAC) que afecta diversas vías biosintéticas. Este último es mediado por el factor transcripcional **Gcn4** que actúa en células carentes de una fuente exógena de aminoácidos. Cuando esto ocurre, la proteína Gcn2 (eIF2 $\alpha$  cinasa) reprime la traducción del mRNA de Gcn4<sup>4</sup>.

**Gcn4p** activa la expresión de un gran número de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos. Además, si existe alguna deficiencia en cualquier aminoácido, Gcn4p se requiere para la transcripción de diversos genes tales como **HIS3**, **ARG4**, y **ARO3**<sup>5</sup>.

Por medio de estudios genómicos, se ha identificado un grupo completo de genes blanco de **Gcn4**. En uno de estos experimentos, se identificaron con microarreglos 539 genes cuya expresión es activada de manera dependiente de Gcn4p en células carentes de aminoácidos en el medio de cultivo<sup>6</sup>.

La secuencia de reconocimiento del DNA de **Gcn4p** es 5'-TGACTC-3' y se une a este mediante un motivo de tipo cremallera de leucina. Se ha observado que la presencia de una sola caja de Gcn4p en los promotores de genes que codifican enzimas de biosíntesis de aminoácidos, es suficiente para su inducción.

En diversos estudios, se usa el compuesto 1,2,3-amino-triazol (3-AT), para simular la ausencia de amino ácidos en el medio, dado que esta molécula compite por el sustrato de una de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la histidina, generando por lo tanto un auxotrofia fenotípica que induce la expresión de Gcn4p<sup>8</sup>.

Por otra parte, muchos aminoácidos pueden ser utilizados como fuentes generales de nitrógeno; la mayoría de ellos presentes en el medio externo, son detectados por la levadura por un complejo sensor presente en la membrana (Ssy1p-Ptr3p-Ssyp5 [SPS]). Este complejo activa la transcripción de permeasas de aminoácidos vía Stp1p, Stp2p y de factores transcripcionales como Uga35p/Dal81p<sup>8</sup>.

## 1.2 Represión Catabólica Nitrogenada

Así como el control transcripcional actúa sobre los genes involucrados en el anabolismo del nitrógeno, el control que actúa en el transporte y catabolismo, puede ser de dos tipos: un control específico que afecta un número limitado de genes y la represión catabólica nitrogenada (**NCR**, por sus siglas en inglés), que actúa sobre una amplia variedad de éstos.

De esta manera, diversos compuestos nitrogenados tales como arginina, prolina, serina, treonina, urea, alantoína, ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y aminoácidos aromáticos inducen específicamente la transcripción de los genes relacionados con su utilización<sup>9</sup>. La represión catabólica nitrogenada se ejerce típicamente sobre muchos genes involucrados en la utilización de fuentes no preferenciales de nitrógeno; es decir, cuando una buena fuente de nitrógeno (Vg. amonio, glutamina, y asparagina) está disponible en el medio<sup>9</sup>.

La **NCR** actúa a través de la inhibición de dos factores transcripcionales de la familia GATA (Gln3p y Gat1p/Nil1p), los cuales se unen a las secuencias 5'-GATA-3'<sup>9</sup>.

Se ha propuesto que la vía TOR actúa a través de una cascada de señalización que implica una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones que mantienen a Gln3 fosforilado y localizado en el citoplasma, de tal manera que su desfosforilación causaría su translocación al núcleo. Sin embargo, también se ha observado que Gln3 puede estar hiperfosforilado y localizado dentro del núcleo durante el ayuno de aminoácidos<sup>11</sup>.

La inhibición Tor-dependiente de **Gln3p** involucra a la proteína Ure2 que retiene a **Gln3p** en el citoplasma, lo cual previene su entrada al núcleo<sup>10</sup>.

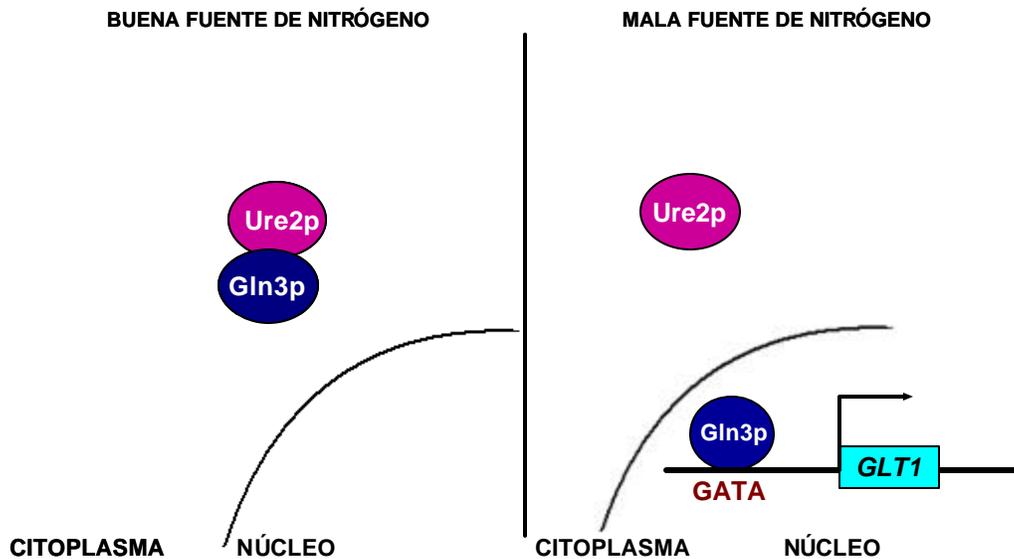


Figura 2. Regulación de Gln3p

Como se muestra en la figura 2, en presencia de una buena fuente de nitrógeno Gln3p se encuentra retenido en el citoplasma por la proteína Ure2p, mientras que cuando se utiliza una fuente pobre de nitrógeno tal como la prolina, se disocia del complejo que forma con Ure2p y se transloca al núcleo y activar a sus genes blanco.

### 1.3 Estructura y función del factor transcripcional Gln3

**GLN3** codifica al factor transcripcional que regula positivamente a los genes sujetos a la NCR por medio de un motivo del tipo dedo de cinc se une a la secuencia 5'-GATAAG-3' UAS<sub>NTR</sub> que se encuentra en los promotores de diversos genes involucrados en la utilización de malas fuentes de nitrógeno<sup>12</sup>.

La translocación de Gln3p del citoplasma al núcleo, y viceversa, depende de las proteínas Srp1p y Crm1p, respectivamente. La vía de la GTPasa Ran y un citoesqueleto de actina intacto, también son importantes para una translocación nuclear óptima de **Gln3p**<sup>13</sup>.

Se han identificado los siguientes dominios funcionales en **Gln3p** (Fig. 2); un motivo dedo de cinc ( $Cys_2/Cys_2$ ) con el cual se une a la caja **GATA**, un motivo  $\alpha$ -hélice que media la activación transcripcional, una región C-terminal que se asocia con **Tor1p**, el dominio de exportación nuclear (**NES**), el de localización nuclear (**NLS**), el dominio de unión a la proteína **Ure2p** y el dominio en el cual la proteína es fosforilada (**K/R**).



**Figura 3.** Dominios del Factor Transcripcional Gln3p. AD, dominio de activación;BD, dominio de unión; NES, señal de exportación nuclear; NLS señal de localización nuclear; Tor1p, dominio de unión a la proteína Tor1p; K/R ,sitio de fosforilación; Ure2p, dominio de unión a la proteína Ure2p.

Algunos genes característicos que son activados por **Gln3p**, son *DAL5* (permeasa de alantoato), *PUT4* (permeasa de prolina), *GAP1* (permeasa general de amino ácidos), *GDH1* (glutamato deshidrogenasa NADPH) y *GLT1* (glutamato sintasa). Se ha descrito que algunos genes en la ausencia de Gln3 resultan en un mRNA más largo porque el sitio de unión GATAAG pueden servir como un sitio de iniciación TATA<sup>14</sup>.

Las interacciones reportadas de Gln3p con otras proteínas son las siguientes:

**Tabla 1.** Interacciones físicas de la proteína Gln3p con otras proteínas

<b>Proteína Blanco</b>	<b>Tipo de interacción</b>	<b>Hit</b>	<b>Referencia</b>
Ure2p	Complejo reconstituido	Gln3p	24
Gln3p	Sistema de dos híbridos	Crm1p	25
Gln3p	Sistema de dos híbridos	Tor1p	25
Snf1p	Sistema de dos híbridos	Gln3p	26

\* Fuente: [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)

## II.- Bases moleculares del metabolismo del carbono en *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.1 Fases de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Las fases de crecimiento descritas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuando crece en un medio de cultivo como la glucosa, son una fase **lag** en la cuál las células se adaptan al medio y se preparan para dividirse, una fase logarítmica en la cuál células se duplican y generan etanol a partir de la fuente de carbono (metabolismo fermentativo) y un cambio llamado “diauxico” que es un periodo en el que las células cambian de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. Luego atraviesan por un cambio “postdiauxico” ; un periodo de tiempo para el cuál las células comienzan a utilizar el etanol generado, en tanto que en la fase estacionaria los nutrientes del medio se han agotado y las células no pueden dividirse.<sup>15</sup>

### 2.2 Metabolismo de la glucosa

La glucosa es la principal fuente de carbono y energía para la mayoría de las células. Además de ser nutriente, regula varios aspectos del crecimiento, metabolismo y desarrollo celular. Para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la glucosa es la fuente de carbono y de energía preferida. De ahí que la levadura haya desarrollado mecanismos que rápidamente señalizan la presencia de glucosa y que le aseguran un uso óptimo y exclusivo<sup>16</sup>.

En *S. cerevisiae* la presencia de glucosa modula distintos procesos celulares, como la biogénesis de las enzimas mitocondriales, pasando así de un metabolismo oxidativo a un metabolismo fermentativo<sup>17</sup>.

La regulación del metabolismo, supone controlar a distintos niveles las rutas implicadas: a corto plazo se modifica la actividad de distintas proteínas, como es el caso de la inactivación por catabolitos de los transportadores de galactosa y maltosa; mientras que a largo plazo se producen cambios en la actividad transcripcional.

En la levadura, la glucosa regula la expresión génica mediante dos vías diferentes: la ruta de inducción y la ruta de la represión. Mediante la ruta de la represión, se inactiva la expresión génica de un gran número de genes tales como los responsables de la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, como los de la gluconeogénesis y la respiración. En esta ruta, están involucrados los factores transcripcionales Mig1p, Cat8p y Sip4p, así como también el complejo cinasa Snf1p<sup>17</sup>.

Por el contrario mediante la ruta de inducción se activan los genes responsables de la utilización de la glucosa como genes que codifican para enzimas glucolíticas y transportadores de hexosas *HXT*, y los sensores de glucosa Rgt2p y Snf3p.<sup>17</sup>

### **2.3 Glucólisis**

La glucólisis es la secuencia de reacciones que convierte a la glucosa en piruvato con la producción concomitante de cantidades relativamente escasas de ATP. En los organismos aerobios, la glucólisis sirve de preámbulo al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs y a la cadena de transporte electrónico, las cuales recolectan la mayor parte de la energía de la glucosa.

Bajo condiciones aeróbicas el piruvato entra a la mitocondria donde es completamente oxidado hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  .

Si el suministro de oxígeno es insuficiente, el piruvato se convierte en lactato; pero en las levaduras, en condiciones anaeróbicas se transforma en etanol (fermentación)<sup>16</sup> .

Los intermediarios en la glucólisis tienen seis o tres carbonos. La reacción neta de la transformación de glucosa en piruvato es:

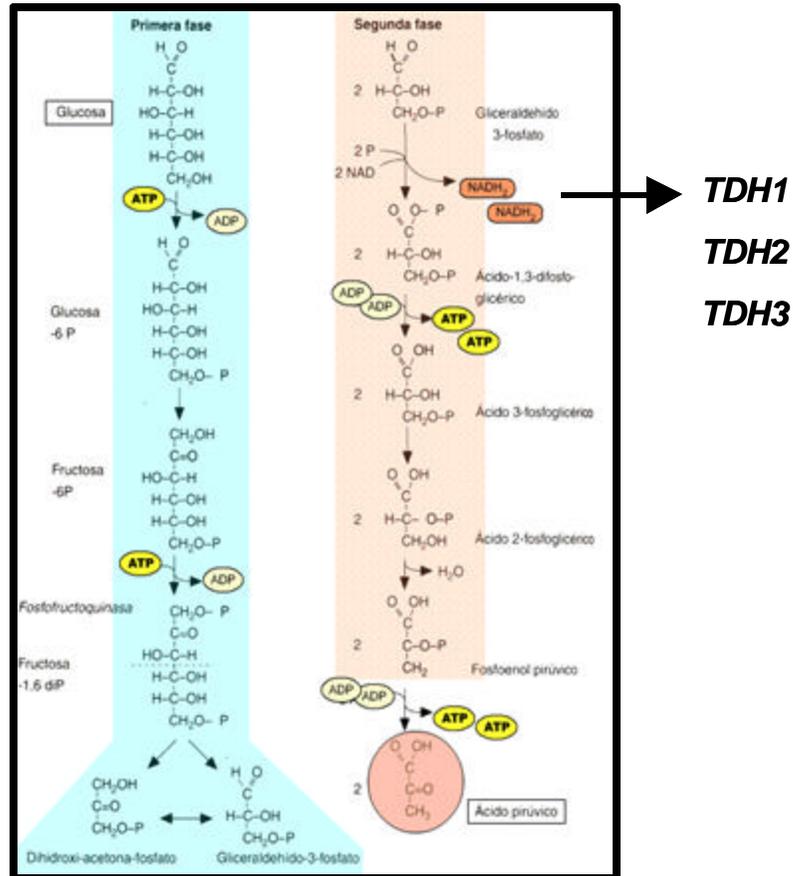
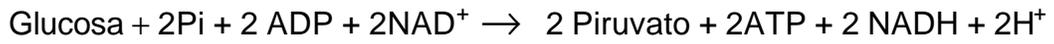


Figura 4. Esquema de la vía glucolítica (Tomado de [www.javeriana.edu.co](http://www.javeriana.edu.co))

## 2.4 Los genes *TDH1*, *TDH2*, y *TDH3*

Las enzimas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasas son de las más abundantes en las levaduras; constituyen aproximadamente el 5% de las proteínas solubles en las células cuando crecen en una fuente de carbono glucolítica<sup>18</sup>.

Estas enzimas, catalizan la conversión de **gliceraldehído 3- fosfato a ácido 1,3 difosfoglicérico** en la segunda fase de la glucólisis y se llaman gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasas.

Existen tres genes estructurales que codifican para estas enzimas en la célula haploide estos genes son : *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* de la levadura, cada uno de los cuáles se expresa en diferentes niveles<sup>22</sup>.

En algunas cepas la síntesis de la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa es inducida en presencia de glucosa, mientras que en otras cepas, la síntesis parece ser constitutiva<sup>18</sup>. Se han aislado múltiples formas activas de la gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa, lo cuál sugiere la presencia de isoenzimas. También se ha reportado que hay una forma principal de estas isoenzimas basándose en un análisis de la secuencia proteica; esta forma principal resultó ser el polipéptido de *TDH3*. *TDH3*, también llamado *GAPDH*, *GAP* y *GLD* realiza aproximadamente el 65% de la actividad enzimática<sup>18</sup>.

Se ha reportado que el nivel de expresión de *TDH3* no cambia significativamente por un intercambio de una fuente de carbono no fermentable (*v.gr* glicerol, lactato) a una fuente de carbono fermentable (*v.gr* glucosa) . Esto indica que el gen de *TDH3* se expresa constitutivamente en las células de la levadura en estas condiciones<sup>19</sup> .

Se ha sugerido que el promotor de *TDH3* esta regulado por múltiples secuencias río arriba (UAS), la mayoría de ellas no caracterizadas a nivel molecular<sup>18</sup> .

En términos de proteínas trans- activadoras, se han propuesto dos para el promotor de *TDH3*: El factor involucrado en la glucólisis (Gcr1p) y un factor de regulación general (*Grf1p*). Las mutantes nulas de *GCR1* mostraron un decremento en el nivel de expresión de hasta 50 veces menos para la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Estos estudios sugieren que Gcr1p, es ó afecta la actividad de una proteína que interactúa con el promotor de *TDH3*<sup>20</sup> .

Por otra parte, Grf1p es una proteína que se une a las UASs de los genes que codifican para las enzimas glucolíticas *ENO1*, *ENO2* y *TDH3*<sup>21</sup> . Se ha identificado también que la expresión constitutiva de *TDH3* se sustenta por dos elementos en el promotor, uno de ellos dependiente de una fuente fermentable de carbono y otro dependiente de una fuente no fermentable de carbono<sup>18</sup> .

Se ha observado, que el gen *TDH1* se expresa durante la fase estacionaria y por lo tanto, se ha sugerido que podría estar involucrado en un proceso distinto a la glucólisis<sup>23</sup>. No se tiene información sobre la regulación de *TDH2*.

### III.- ANTECEDENTES

La participación de Gln3p en la activación de los genes que codifican para enzimas y proteínas de transporte de fuentes deficientes de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*, es quizá la función más estudiada de este factor transcripcional. No obstante, experimentos realizados por Gonzalez, A. *et.al* (Datos no publicados) han demostrado que Gln3p directa ó indirectamente participa también en la activación transcripcional de genes diferentes al catabolismo del nitrógeno. En un experimento de microarreglos (Fig.1) realizado por Riego,L. y Gonzalez,A. (Datos no publicados) en el que se analizó la expresión génica en las cepas silvestre, la mutante nula de *GLN3* y una mutante del gen *GLN3* en la cual se deletó la región correspondiente a la caja GATA, y que por lo tanto únicamente dejó a la proteína con el dominio de activación funcional, se obtuvieron una lista de genes cuya expresión depende del dominio de activación de Gln3p (Fig. 2).

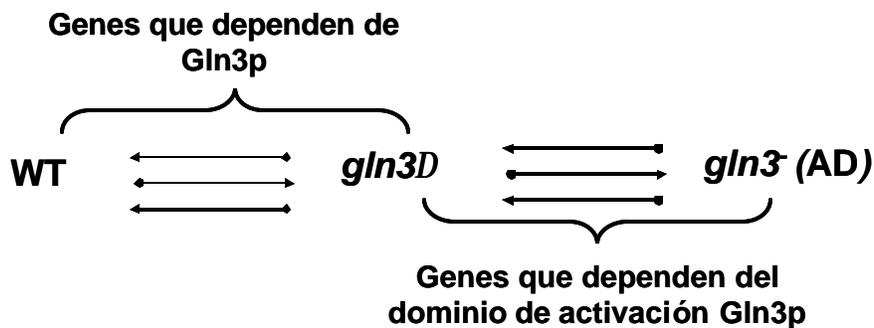


Figura 5. Diseño del experimento de microarreglos

ENZIMAS	PROTEÍNAS RIBOSOMALES	PROTEINAS FUNCION DESCONOCIDA	PROTEINA DE MEMBRANA	UBIQUITINA	HISTONA
<i>ARF2</i>	<i>RPS14b</i>	<i>YDL121c</i>	<i>ZEO1</i>	<i>UBI4</i>	<i>HHF1</i>
<i>RRP46</i>	<i>RPS31</i>	<i>YMR173w-a</i>			
<i>PHA2</i>	<i>RPL20a</i>				
<i>TDH1</i>	<i>RPL33</i>				
<i>TDH2</i>					
<i>TDH3</i>					

**Figura 6.** Genes que dependen del dominio de activación

De esta lista se desprende un gen que es activado directamente por *GCN4* (*PHA2*), proteínas de membrana (*ZEO1*), y los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, que participan en la glucólisis, gluconeogénesis. Fenotípicamente también se ha demostrado que la ausencia de *GLN3* afecta dramáticamente el crecimiento de la levadura en un medio que contiene etanol como fuente de carbono. Sin embargo, la cepa mutante que conserva el dominio de activación de Gln3p logra crecer en el mismo medio a una velocidad similar que la silvestre.

Esto apunta a la participación del dominio de activación de la proteína Gln3p en la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2*, y *TDH3*.

## **IV.- OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Contribuir al entendimiento de las redes regulatorias en las que participa el factor transcripcional Gln3p.

### **4.2 Objetivo Específico**

Determinar como se ve afectada la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, por la ausencia del factor transcripcional Gln3p o bien cuando este factor únicamente conserva su dominio de activación.

## V.- Material y Métodos

### 5.1 Cepas utilizadas en este estudio

Nombre	Genotipo	Referencia
Parental	CLA Mata <i>ura3-1 leu2-3</i>	Avendaño <i>et.al.</i> (1997)
<i>gln3D</i>	CLA Mata <i>gln3D:: kanMX</i> <i>ura3-1 leu2-3</i>	Valenzuela <i>et.al.</i> (2001)
<i>gln3<sup>-</sup></i>	CLA Mata <i>gln3:: URA3</i> <i>leu2-3</i>	Valenzuela <i>et. al.</i> (1998)

**5.2 Medios de cultivo utilizados para las curvas de crecimiento y extracción de RNA de las cepas parental y mutantes.**

**SN/glutamina/uracilo/leucina**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	
Glucosa	2%	
Glutamina	7mM	
Vitaminas	<b>Stock Vitaminas 1000x del cuál se utilizan 1mL/L</b> Biotina .0002 % Pantotenato de calcio .04 % Acido fólico .0002 % Niacina .04 % Acido <i>p</i> -aminobenzoico .02 % Piridoxina-HCl .04 % Riboflavina .02 % Tiamina-HCl .04 % Inositol .02 % Lentejas de NaOH Agua bidestilada	
Trazas	<b>Stock Trazas 1000x del cuál se utilizan 1 mL/L</b> Acido bórico .05 g .05 % Sulfato cúprico .004 g .004 % Yoduro de potasio .01 g .01 % Cloruro férrico .02 g .02 % Sulfato manganoso .04 g .04 % Molibdato de sodio .02 g .02 % Sulfato de Zinc .04 g .04 % Aforar a 100 ml Agua bidestilada	
Sales	<b>Stock Sales 50x del cuál se utilizan 20mL/L</b> Fosfato monopotásico 50 g 5 % Sulfato de Magnesio . 7 H <sub>2</sub> O 5 g .5 % NaCl 1 g .1 % CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O 1 g .1 % CHCl <sub>3</sub> (agregar al final) 5 ml Agua bidestilada Aforar a 1 lt	
Uracilo	0.002%	
Leucina	0.01%	

## SN/glutamina/uracilo/leucina/etanol

Componente	Concentración																											
Etanol	2%																											
Glutamina	7mM																											
Vitaminas	<p><b>Stock Vitaminas 1000x del cual se utilizan 1mL/L</b></p> <table> <tr> <td>Biotina</td> <td>.0002 %</td> </tr> <tr> <td>Pantotenato de calcio</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td>Acido fólico</td> <td>.0002 %</td> </tr> <tr> <td>Niacina</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td>Acido <i>p</i>-aminobenzoico</td> <td>.02 %</td> </tr> <tr> <td>Piridoxina-HCl</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td>Riboflavina</td> <td>.02 %</td> </tr> <tr> <td>Tiamina-HCl</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td>Inositol</td> <td>.02 %</td> </tr> <tr> <td>Lentejas de NaOH</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua bidestilada</td> <td></td> </tr> </table>	Biotina	.0002 %	Pantotenato de calcio	.04 %	Acido fólico	.0002 %	Niacina	.04 %	Acido <i>p</i> -aminobenzoico	.02 %	Piridoxina-HCl	.04 %	Riboflavina	.02 %	Tiamina-HCl	.04 %	Inositol	.02 %	Lentejas de NaOH		Agua bidestilada						
Biotina	.0002 %																											
Pantotenato de calcio	.04 %																											
Acido fólico	.0002 %																											
Niacina	.04 %																											
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	.02 %																											
Piridoxina-HCl	.04 %																											
Riboflavina	.02 %																											
Tiamina-HCl	.04 %																											
Inositol	.02 %																											
Lentejas de NaOH																												
Agua bidestilada																												
Trazas	<p><b>Stock Trazas 1000x del cuál se utilizan 1mL/L</b></p> <table> <tr> <td>Acido bórico</td> <td>.05 g</td> <td>.05 %</td> </tr> <tr> <td>Sulfato cúprico</td> <td>.004 g</td> <td>.004 %</td> </tr> <tr> <td>Yoduro de potasio</td> <td>.01 g</td> <td>.01 %</td> </tr> <tr> <td>Cloruro férrico</td> <td>.02 g</td> <td>.02 %</td> </tr> <tr> <td>Sulfato manganoso</td> <td>.04 g</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td>Molibdato de sodio</td> <td>.02 g</td> <td>.02 %</td> </tr> <tr> <td>Sulfato de Zinc</td> <td>.04 g</td> <td>.04 %</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Aforar a 100 ml</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua bidestilada</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Acido bórico	.05 g	.05 %	Sulfato cúprico	.004 g	.004 %	Yoduro de potasio	.01 g	.01 %	Cloruro férrico	.02 g	.02 %	Sulfato manganoso	.04 g	.04 %	Molibdato de sodio	.02 g	.02 %	Sulfato de Zinc	.04 g	.04 %		Aforar a 100 ml		Agua bidestilada		
Acido bórico	.05 g	.05 %																										
Sulfato cúprico	.004 g	.004 %																										
Yoduro de potasio	.01 g	.01 %																										
Cloruro férrico	.02 g	.02 %																										
Sulfato manganoso	.04 g	.04 %																										
Molibdato de sodio	.02 g	.02 %																										
Sulfato de Zinc	.04 g	.04 %																										
	Aforar a 100 ml																											
Agua bidestilada																												
Sales	<p><b>Stock Sales 50x del cuál se utilizan 20mL/L</b></p> <table> <tr> <td>Fosfato monopotásico</td> <td>50 g</td> <td>5 %</td> </tr> <tr> <td>Sulfato de Magnesio . 7 H<sub>2</sub>O</td> <td>5 g</td> <td>.5 %</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>1 g</td> <td>.1 %</td> </tr> <tr> <td>CaCl<sub>2</sub> . 2 H<sub>2</sub>O</td> <td>1 g</td> <td>.1 %</td> </tr> <tr> <td>CHCl<sub>3</sub> (agregar al final)</td> <td>5 ml</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Agua bidestilada</td> <td></td> <td>Aforar a 1 lt</td> </tr> </table>	Fosfato monopotásico	50 g	5 %	Sulfato de Magnesio . 7 H <sub>2</sub> O	5 g	.5 %	NaCl	1 g	.1 %	CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	1 g	.1 %	CHCl <sub>3</sub> (agregar al final)	5 ml		Agua bidestilada		Aforar a 1 lt									
Fosfato monopotásico	50 g	5 %																										
Sulfato de Magnesio . 7 H <sub>2</sub> O	5 g	.5 %																										
NaCl	1 g	.1 %																										
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	1 g	.1 %																										
CHCl <sub>3</sub> (agregar al final)	5 ml																											
Agua bidestilada		Aforar a 1 lt																										
Uracilo	0.002%																											
Leucina	0.01%																											

Nota: También se utilizó el medio YNB (0.6 gr por cada litro) ,el cual contiene Vitaminas, Trazas y Sales. A este medio se le adicionó la fuente de carbono correspondiente al 2% y la glutamina como fuente de nitrógeno a una concentración de 7 m M.

Todos los medios se esterilizaron por autoclave durante 20 minutos a una presión de 20 lb/in<sup>2</sup>.

### **5.3 Curvas de crecimiento**

Para verificar el fenotipo de la cepa silvestre, la cepa mutante nula de *GLN3* y la cepa mutante que conserva el dominio de activación funcional en las fuentes de carbono en estudio, se realizaron dos curvas de crecimiento. Las células crecieron en un medio SN que contiene glucosa-glutamina, y por otro lado se cultivaron en un medio SN etanol-glutamina. Para ello se creció un preinóculo de las células por 16 horas en tubos con 5 ml de medio mínimo con glucosa a 28°C y a una agitación de 200 r.p.m.

Después de las 16 horas se inoculó a una densidad óptica igual 0.05 en matraces con 50ml de medio mínimo ( $A_{600}$ ). Después de inocular, las células se crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación que en el pre-cultivo, y se tomó una muestra cada dos horas, considerandose el tiempo cero ( $T_0$ ) a la densidad óptica inicial de 0.05.

Los tiempos de duplicación se establecieron con la ecuación de la recta  $y=mx + b$  en donde  $y=$  logaritmo decimal de la absorbancia,  $m=$  a la pendiente,  $x=$  tiempo y  $b=$  la ordenada del origen.

#### **5.4 Oligonucleótidos utilizados en este estudio**

Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos para amplificar a los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Los oligonucleótidos sentido están diseñados en las regiones 5' no traducidas de los genes tomando como base 200pb río arriba del sitio ATG de inicio de la traducción de cada uno de los genes, mientras que los oligonucleótidos anti-sentido en las regiones codificantes. Debido a que los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* son genes parálogos muy conservados, para diseñar los oligonucleótidos antisentido se realizó un alineamiento con el software Bioedit, con el fin de identificar las regiones menos conservadas y diferenciales.

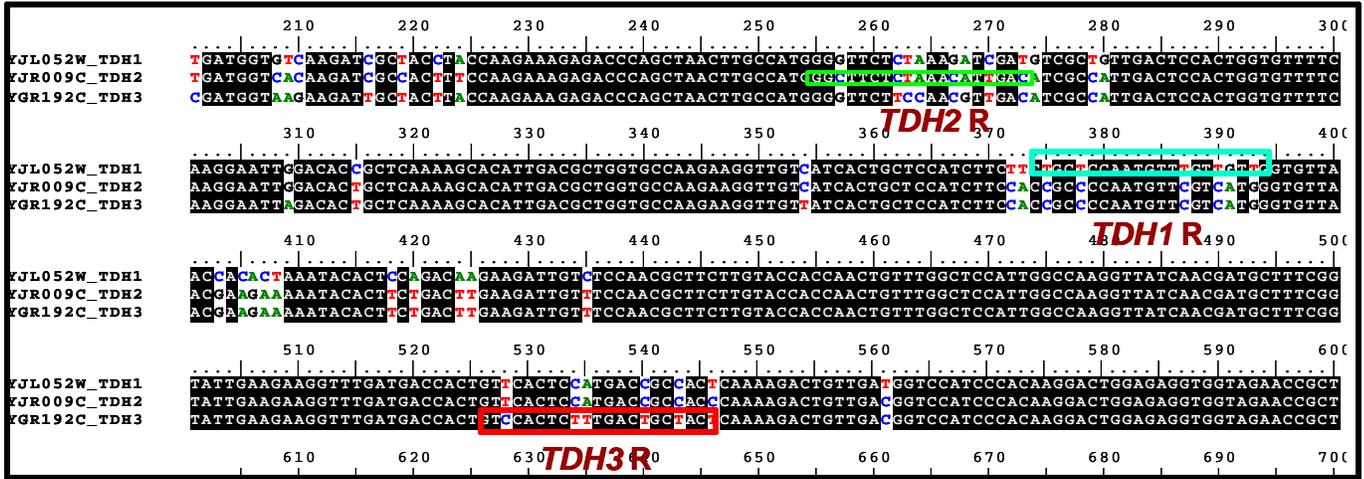


Figura 7. Alineamiento para establecer el diseño de los oligonucleótidos antisentido

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
<i>TDH1</i> Forward	TGACCAAACTGGAGTCTCGAA
<i>TDH1</i> Reverse	TTCTGCTCCAATGTTTGTTG
<i>TDH2</i> Forward	GTACCCAGTGATCGCAGACCTGCAA
<i>TDH2</i> Reverse	GGGCTTCTCTAAACATTGAC
<i>TDH3</i> Forward	GGTTGAAACCAGTTCCTGAA
<i>TDH3</i> Reverse	GTCCACTCTTTGACTGCTAC

## 5.5 Amplificación y Análisis de Restricción

Para verificar que la amplificación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* es específica, se amplificó la secuencia delimitada por estos oligonucleótidos sobre DNA geonómico y se realizó un análisis de restricción para cada uno de los genes. De este análisis se seleccionaron a las enzimas *ClaI* y *XbaI*.

El análisis de restricción se realizó basándonos en la suposición de que cada par de oligos podría amplificar a los tres genes, para ello, los pares de oligonucleotidos se superpusieron en cada una de las secuencias de los tres genes. En la siguiente tabla, se muestran los tamaños de los fragmentos esperados.

Secuencia utilizada	Oligos de <i>TDH1</i>	Oligos de <i>TDH2</i>
<i>TDH1</i>	<i>Cla I</i> 448 Y 121	<i>Xba I</i> 326 y 243
<i>TDH2</i>	<i>Cla I</i> 451 Y 3	<i>Xba I</i> 246 Y 208
<i>TDH3</i>	<i>Cla I</i> 457 y 275	<i>Xba I</i> 480 Y 252

## 5.6 Extracción de RNA y Reacción con DNAasa

Se realizó una extracción de RNA total con TRIPURE Invitrogen de la cepa silvestre, de la cepa mutante nula y la mutante que conserva el dominio de activación. La extracción se llevo a cabo en dos medios distintos: SN glutamina-glucosa y SN glutamina-etanol . Para ello se creció un preinóculo de las células por 16 horas en tubos con 5 ml de medio mínimo a 28°C y a una agitación de 200 r.p.m. Posteriormente se inoculó cada cepa en un matraz con 50ml de medio mínimo con glucosa a una densidad óptica de 0.05. Para la extracción en el medio que contiene glucosa y glutamina, las células se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0.6, y en este punto se realizó la extracción. Para aislar el RNA de las cepas, se utilizó 1ml de Tripure el cual contiene fenol y tiocianato de guanidina, 200 µL de cloroformo, 500 µL de isopropanol y etanol al 75%. Las centrifugaciones se realizaron a 13,000 g, 12,000 g, y 7000 g.

Para el caso de la extracción de las células en el medio SN etanol-glutamina, las células fueron inoculadas en un medio SN glucosa-glutamina en matraces de 50ml , y se dejaron crecer hasta una densidad óptica igual a 0.6.

Después, se lavaron las células dos veces con agua destilada estéril, y se pasaron al medio SN etanol-glutamina. Las células se dejaron crecer en este medio por seis horas, para establecer un “shock de etanol”. Esto último para permitirle a la cepa mutante nula de *GLN3* crecer, dado que en el medio que contiene etanol, no se observa crecimiento.

Después de la extracción del RNA se realizó un gel desnaturizante con el fin de verificar la calidad del RNA, y se cuantificó a una longitud de onda múltiple  $A_{260/280}$ . Se tomó la lectura de  $A_{260}$  para establecer la concentración de RNA con la ecuación:

Concentración de RNA= (Lectura a 260nm)(Coeficiente de extinción)(Factor de dilución) En donde el coeficiente de extinción es= 40 y el factor de dilución utilizado fue de 200.

Con la finalidad de eliminar al DNA que pudo haberse extraído junto al RNA, se llevó a cabo una reacción con DNA asa de acuerdo al protocolo descrito por invitrogen. Utilizándose un volumen equivalente a 1µg de RNA para esta reacción, 1µL de enzima DNAsa de una concentración 1U/ µL, 2 µL de Buffer de la enzima y agua DEPC para completar un volumen total de reacción de 10 µL

## 5.7 RT-PCR

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el volumen correspondiente 400ng de RNA y como oligonucleótido de partida para esta síntesis se usó 1µL de un stock a una concentración 50µM del oligonucleótido antisentido de cada uno de los genes.

Los ciclos utilizados se describen en la siguiente tabla:

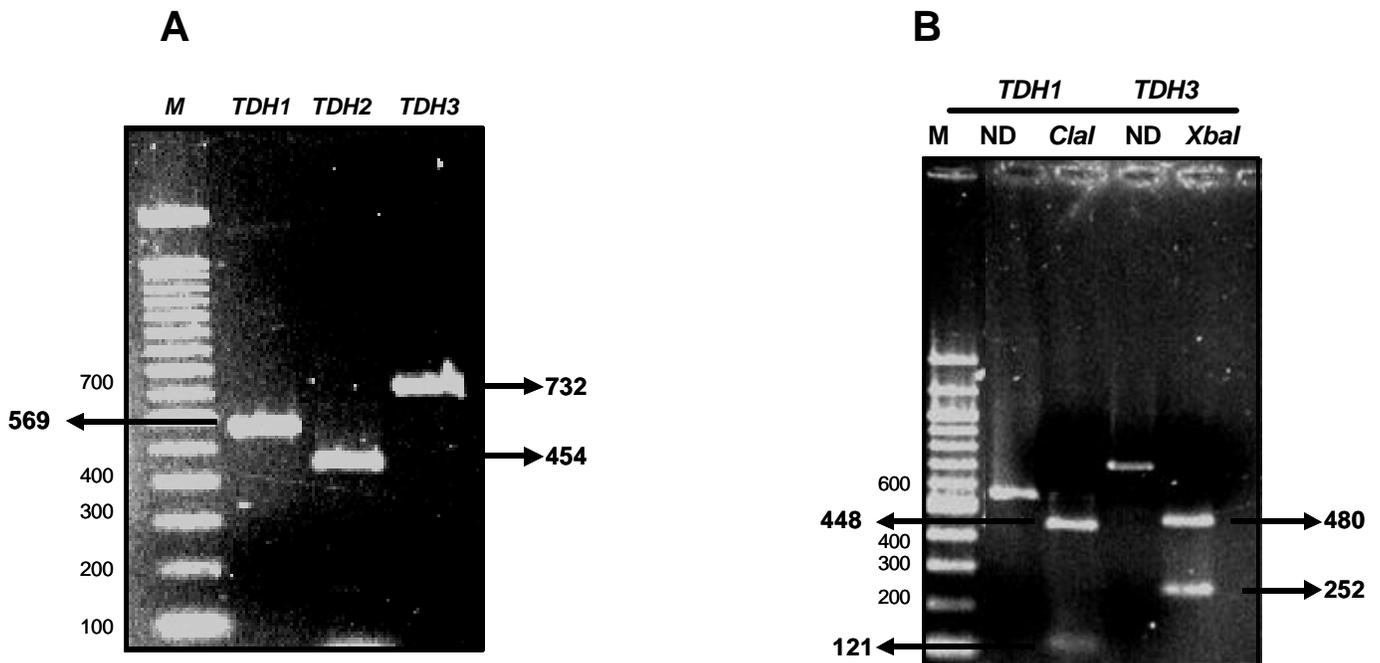
Transcripción Reversa	Desnaturalización	Enfriamiento
15 minutos 55°C Oligonucleótido antisentido	45 minutos 99°C	5 minutos 5°C

Posteriormente se realizó una PCR convencional para amplificar a los genes utilizando al cDNA como molde, variando el número de ciclos para evitar la saturación de la reacción. (30, 25 , 23 y 20 ciclos). En el programa de PCR se usaron 40 segundos y 59°C de tiempo y temperatura de alineamiento respectivamente. Se utilizó 1µl de los oligonucleótidos correspondientes a cada gen de un stock a 50µM, 0.5 µl de DNTP's que proviene de un stock de una concentración igual a 10mM , 0.25 µl de Taq polimersa (invitrogen y AB 1U/ µL) , 5 µl del buffer de la enzima, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> de un stock 25 mM y agua estéril para completar un volumen total de 50 µM.

## VI. RESULTADOS

**6.1 El análisis con enzimas de restricción confirma que los genes se amplifican de manera diferencial.**

Para confirmar que los genes parálogos *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* se amplifican diferencialmente, realizamos un análisis con enzimas de restricción que nos confirmó que los genes se amplificaron de forma diferencial de acuerdo a los fragmentos esperados (Fig. 5 panel A).

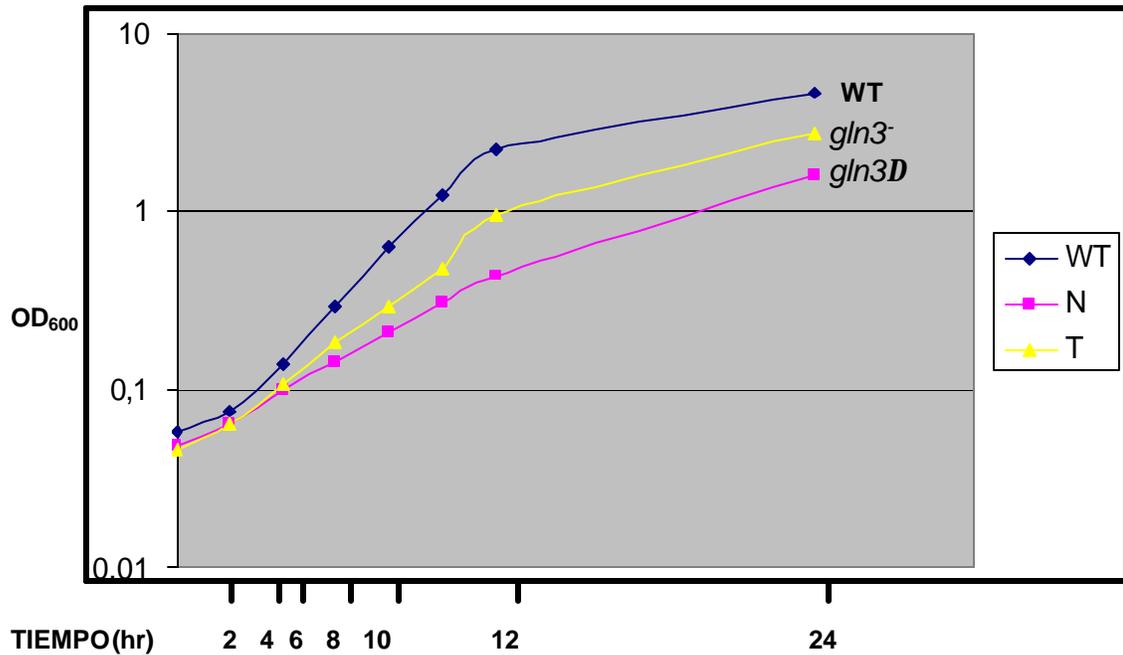


**Figura 8. Análisis de Restricción de los genes *TDH1* y *TDH3*,** Panel A: amplificación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*; *M*, marcador de peso molecular. Panel B: análisis de restricción de los genes *TDH1* Y *TDH3*; *ND*, no digerido.

El gen de TDH2 no se digirió con *XbaI* debido a que el tamaño de los fragmentos no nos permite diferenciar si hay contaminación con otro producto, y el corte con *ClaI* genera un fragmento muy pequeño no detectable de 3pb.

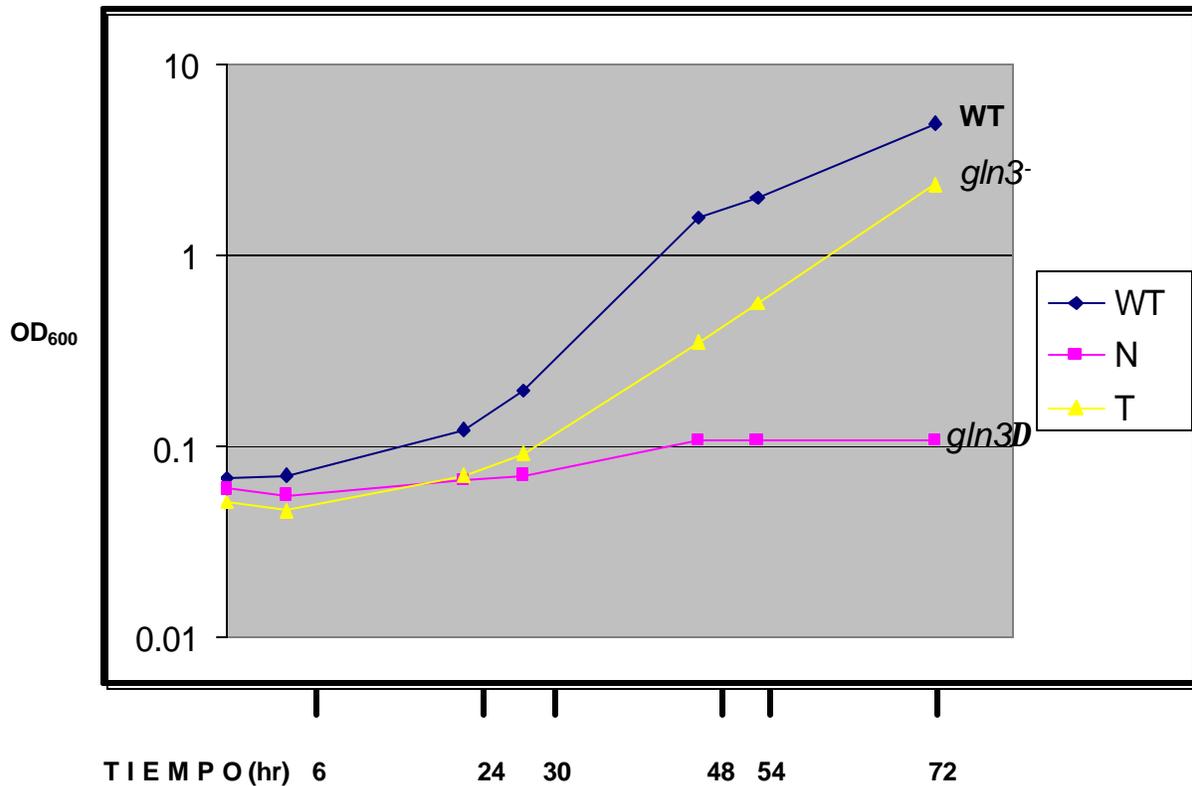
## **6.2 El fenotipo de crecimiento de las cepas WT, *gln3D* y *gln3<sup>-</sup>* en un medio SN etanol, muestra que *GLN3* actúa sobre la expresión de genes relacionados con uso de etanol como fuente de carbono.**

Un experimento que nos permite establecer el efecto fenotípico que tiene un gen mutado en una cepa, es observar la diferencia en las velocidades de crecimiento en comparación con la cepa parental. La curva de crecimiento de las cepas WT, *gln3D* y *gln3<sup>-</sup>* muestra que *GLN3* está involucrado en el crecimiento de las cepas principalmente en el medio SN-etanol y en menor medida en el uso de glucosa como se muestra en las gráficas y en los tiempos de duplicación calculados.



**Figura 9.** Curva de crecimiento de las cepas WT, *gln3D* y *gln3<sup>-</sup>* en un medio SN glucosa y glutamina; WT cepa silvestre; N mutante *gln3D*, T mutante *gln3<sup>-</sup>*

Los tiempos de duplicación calculados de las cepas WT, *gln3Δ* y *gln3<sup>-</sup>* en este medio fueron de 2, 3.6 y 2.6 horas, respectivamente. Por lo tanto, para tener un crecimiento similar al de la cepa silvestre, se requiere a *GLN3*. No obstante, si se tiene al dominio de activación de *GLN3* obtenemos una velocidad de crecimiento similar al de la cepa parental puesto que los tiempos de duplicación son 2 para la wt y 2.6 para la cepa con el dominio de activación respectivamente. Las diferencias en la velocidad de crecimiento en glucosa, no son tan evidentes como se observa en la curva de crecimiento cuando se usa etanol como fuente de carbono:



**Figura 10.** Curva de crecimiento de las cepas WT,  $\Delta gln3$  y  $gln3^-$  en un medio SN etanol y glutamina. WT cepa silvestre; N mutante  $gln3^D$ , T mutante  $gln3^-$

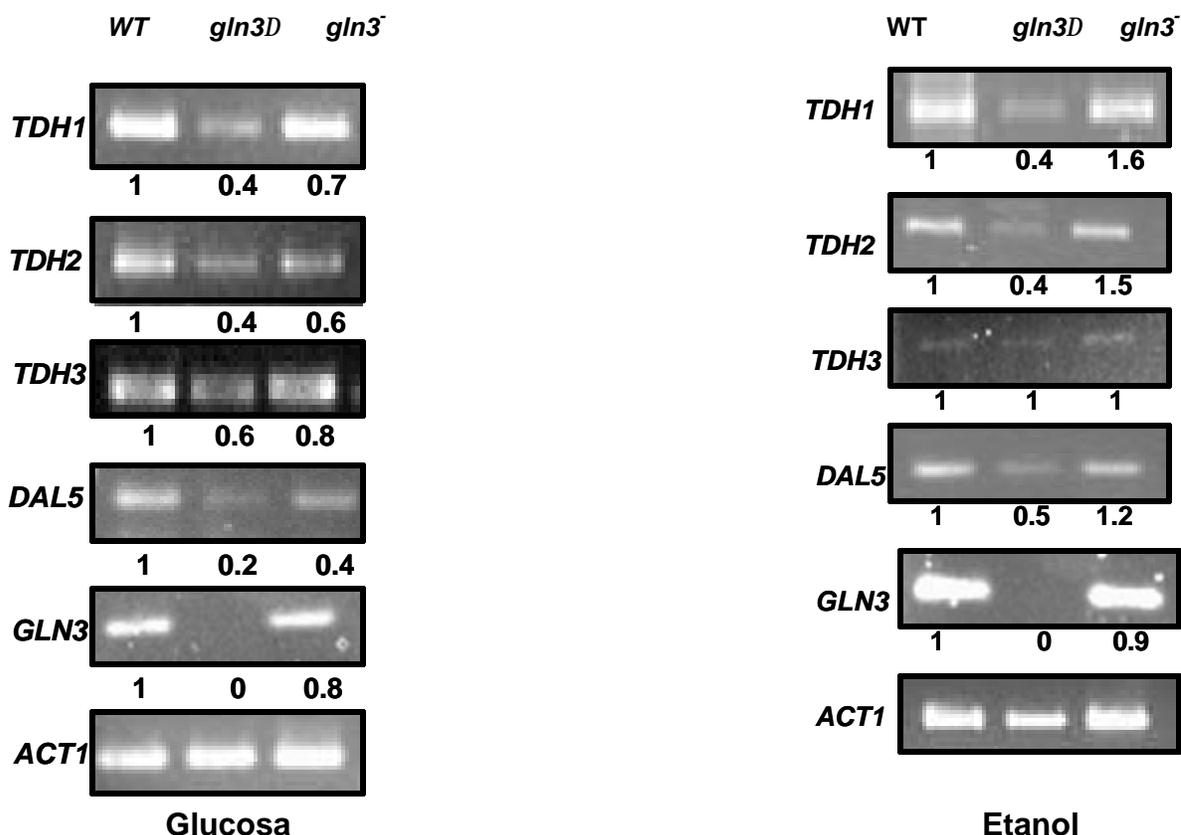
Durante el crecimiento de las células en un medio con etanol, se observa que en la cepa nula de *GLN3*, prácticamente no se observa crecimiento, mientras que la cepa que contiene al dominio de activación de *GLN3*, sí logra crecer.

De aquí se infiere que se requiere a *GLN3* ó más específicamente, al dominio de activación de *GLN3*, directa ó indirectamente, para la expresión de genes relativos al uso de etanol.

**6.3 La expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* varía en dos condiciones: si usa una fuente de carbono fermentable (glucosa) y una fuente no fermentable (etanol) y varía entre las cepas *Dgln3* y *gln3<sup>-</sup>* .**

En la figura 11, se muestran los resultados de el estudio de la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* y los genes control *DAL5* y *GLN3* por RT-PCR. *DAL5*, es un gen típicamente activado por *GLN3* y que codifica para una permeasa de alantoato.

En el panel izquierdo, evaluamos la expresión de los genes anteriores en un medio SN-glucosa, y en el panel derecho, en un medio SN-etanol



**Figura 11.** Panel Izquierdo: RT-PCR de los genes *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*, *DAL5* y *GLN3* en un medio de cultivo SN-glucosa; Panel Derecho: RT-PCR SN-etanol. El gen *ACT1* se utilizó como referencia.

En el medio SN-glucosa, la expresión del gen *TDH1* y *TDH2* en la cepa *gln3D* se reduce a menos de la mitad con respecto a la cepa silvestre, mientras que la expresión del gen *TDH3* en la cepa *gln3D* disminuye su nivel de expresión en un 33% . No obstante, en la cepa *gln3<sup>-</sup>* observamos que el nivel de expresión se recupera pero no a niveles similares al de la cepa silvestre para *TDH1* y *TDH2* . Pero para *TDH3*, se incrementa casi al mismo nivel de expresión que el que exhibe la cepa silvestre.

En el gen control *DAL5* esperábamos que la expresión en la cepa mutante nula de *GLN3* tuviera un nivel de expresión basal como se observa en la línea cuatro del panel izquierdo (Fig 11); pero en la cepa con el dominio de activación de Gln3p se tiene un nivel de expresión mayor, lo cual nos está indicando que posiblemente el dominio de activación *per se* podría regular la expresión de *DAL5* pero se observó que Gat1p afecta la expresión de *DAL5* en ausencia de *GLN3* en un estudio realizado por Dubois et.al.(2008). Esto justifica que la expresión de *DAL5* sea semejante a la cepa parental en la mutante que conserva al dominio de activación.

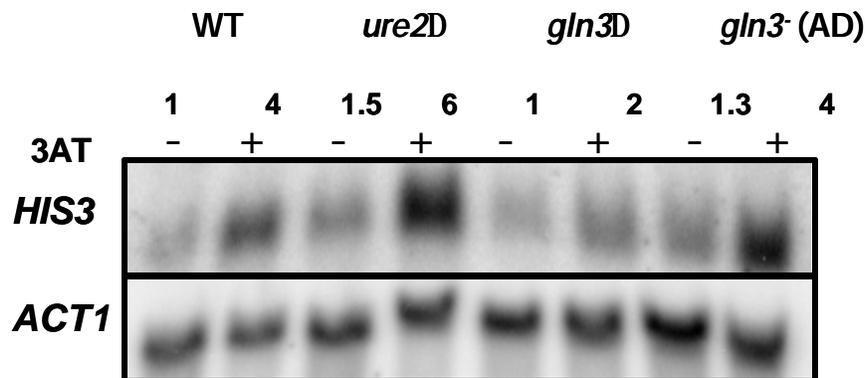
Para el medio SN-etanol observamos que el nivel de expresión de *TDH1* y *TDH2* se reduce a menos de la mitad con respecto a la cepa silvestre en la mutante nula de *GLN3*.

Dicho nivel de expresión se recupera cuando observamos a la mutante *gln3<sup>-</sup>* para ambos genes a niveles mayores que la wt. La expresión del gen *TDH3* en SN-etanol no varía para ninguna de las cepas en estudio.

De lo anterior podemos concluir que el dominio de activación participa en la expresión del gen de *TDH1* y *TDH2*, y más aún en la expresión de *TDH3* cuando utiliza glucosa como fuente de carbono, y sobre la expresión de *TDH1* y *TDH2* cuando utiliza etanol. Pero no afecta la expresión de *TDH3*, cuando utiliza etanol como fuente de carbono.

## VII . DISCUSIÓN

En trabajos anteriores, se ha observado la relación del dominio de activación de la proteína Gln3p con la expresión de genes diferentes al catabolismo del nitrógeno. Un ejemplo de ello, es el estudio de la expresión del gen *HIS3* el cuál codifica para una enzima que participa en la biosíntesis de histidina y que es activado por Gcn4p, un factor transcripcional que esencialmente activa a los genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos. En un análisis por Northern Blot, se observó que la expresión de *HIS3* disminuye dos veces en ausencia de Gln3p con respecto a la cepa silvestre, pero dicho nivel de expresión se recupera a niveles similares al de la cepa parental cuando se tiene únicamente al dominio de activación como se observa en la figura 12.

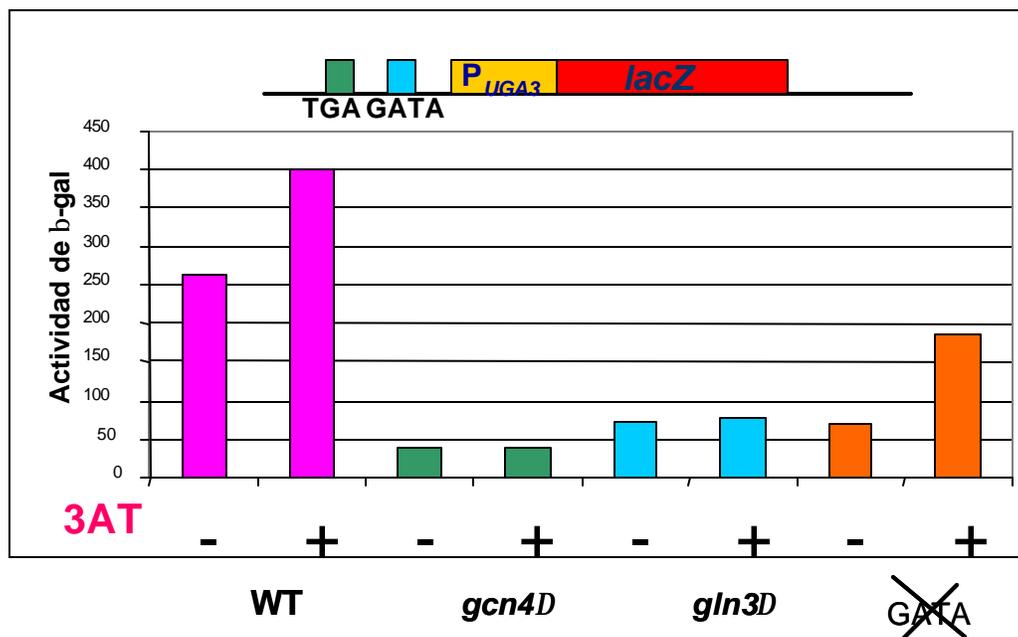


**figura 12.** Análisis de expresión por Northern Blot del gen *HIS3* en las cepas WT, *ure2D*, *gln3D*, y *gln3<sup>-</sup>*. 3AT (1,2,3 amino-triazol). Gonzalez, A. (Datos no publicados).

Cabe señalar que el estudio se hizo en un ausencia y presencia del compuesto 3-AT (1,2,3- amino-triazol), quien simula la ausencia de aminoácidos en el medio y que por lo tanto, genera una auxotrofia fenotípica. Esto permite la inducción *GCN4*.

Por lo tanto, este resultado presenta al dominio de activación de Gln3p como un posible regulador *per se*; es decir que no requiere de unirse al DNA para inducir la expresión de genes diferentes a aquellos que están involucrados en la degradación de malas fuentes de nitrógeno.

Otro trabajo que confirma el papel del dominio de activación de Gln3p como un regulador, es el estudio de la actividad del promotor de *UGA3*, que es un gen regulado por Gln3p, fusionado al gen reportero *LacZ* en las cepas WT, *gcn4?*, *gln3?* y *gln3<sup>-</sup>*.



**Figura 13.** Actividad del promotor del gen *URA3* (Ishida, C. et al 2006)

En este estudio, se plantea que la activación de la transcripción de los genes *UGA3* y *GLT1* depende de la acción combinada de los factores transcripcionales Gcn4p y Gln3p, pero como se observa en la gráfica número 13, el nivel de expresión de la cepa mutante que contiene al dominio de activación funcional incrementa con respecto a las cepas mutantes nula de *GLN3* y *GCN4*.

Nuestros resultados sugieren que Gln3p regula a los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* en un medio SN-glucosa, y a los genes *TDH1* y *TDH2* en un medio SN- etanol.

Hasta ahora, lo que se conoce de la regulación transcripcional de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* es que en su activación está involucrado el factor transcripcional *GCR1*; Holland, M. y Yokoi, T. (1987) observaron que la expresión de estos genes disminuye más de 20 veces en la cepa mutante *gcr1D*. También se conoce que la expresión de *TDH3* no varía cuando la levadura crece en un medio con una fuente no fermentable (*v.gr.* glicerol, lactato) ó una fuente fermentable como la glucosa, y que el promotor de este gen también conocido como *GAPDH* tiene tres elementos en *cis*: una secuencias UAS1 dependiente de una fuente fermentable, una secuencia represora dependiente de una fuente fermentable (URS) y una secuencia dependiente de una fuente no fermentable. (UAS2). El UAS1,y el UAS2 son los responsables de la expresión constitutiva de *TDH3*<sup>18</sup>.

Sin embargo no se conoce la relación entre el factor transcripcional Gln3p con genes de utilización de la glucosa de etanol.

De acuerdo al fenotipo obtenido en la curva de crecimiento en el medio SN-etanol, observamos que la mutante nula del *GLN3* no se duplica, por lo que muy posiblemente *GLN3* no solo este afectando la expresión de genes tales como *HIS3*, *UGA3* ó *TDH1*, *TDH2* y en menor medida de *TDH3*, relacionados con la fosforilación oxidativa dado que el etanol es una fuente no fermentable y en este medio observamos que *TDH3* no varía su expresión. Por lo tanto, *TDH3* realiza su función en este medio. El hecho de que en un medio SN-glucosa, las cepas *gln3D* y *gln3<sup>-</sup>* se dupliquen, es debido a que la levadura puede utilizar rutas alternas para el uso de la glucosa como la vía de las pentosas. Muy probablemente el papel de Gln3p a través de su dominio de activación, sea como un co-activador o una proteína mediadora de diferentes genes que participan en las redes regulatorias que implican a los fuentes de carbono y nitrógeno. Es bastante conocido que dichas redes se conectan a través de vías de señalización como la vía de TOR.

No obstante, es importante realizar otros experimentos que demuestren la interacción proteína-proteína entre Gln3p y otros factores transcripcionales.

## VII .-CONCLUSIONES

El factor transcripcional, Gln3p afecta, directa ó indirectamente la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* en un medio SN-glucosa. y el de *TDH1* y *TDH2* en un medio SN-etanol.

También afecta el crecimiento de la cepa mutante nula, por lo que puede estar involucrado en la regulación otros genes alternativos como los de la respiración.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Verificar la Expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* por PCR en tiempo real.
- Verificar la interacción de Gln3p con factores transcripcionales relacionados con la regulación de *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* tales como GCR1 con experimentos como FRET, Co-inmunoprecipitación ó por fusión con la proteína verde fluorescente.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Magasanik, B. and F.C. Neidhardt.** 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization. *Am. Soc. for Microbiol., Washington, D.C.* Vol. 2 Am p.1318-1325
- 2) **Cooper, T.G.** 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY. Vol.1 p. 39-99
- 3) **Magasanik, B. and Kaiser, C.A.** 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* Vol.290: p.1-18
- 4) **Hinnebusch, A.** 1996. Translational control of *GCN4*: gene specific regulation by phosphorylation of eIF2, In W.B. Hershey, M.B., Mathews and N. Soneberg (ed.) ,Translational control. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. p 199-244.
- 5) **Hinnebusch, A.G.** 1992. General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* In E.W Jones Pringle, and J.R Bioach (ed). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring harbor NY. p. 319-414.
- 6) **Natarajan, K.; Meyer M.R; Jackson B.M.; Slade P.; Roberts C., Hinnebusch A.G and Marton M.J.** 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell.Biol.* Vol 21 p. 4347-4368
- 7) **Hinnebusch, A.G.** 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu.Rev.Microbiol.* Vol 59 p407-450

**8) Boles, E. and Andre.** 2004. Role of transporter- like sensors in glucose and amino acid signaling in yeast. p 121-153. *In E. Boles and K. Reinhard (ed), Molecular mechanisms controlling transmembrane transport.* Springer, Berlin, Germany.

**9) Magasanik, B.** 1992. Regulation of nitrogen utilization In. J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R Broach (ed) *The molecular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, metabolisms and gene expression.* Cold spring Harbor Laboratory Press, Cols Spring Harbor. Laboratory press, cold Spring Harbor, NY. p.238-317

**10) Colfman, J.A; T. Cunningham,; V. Sveltor, and T.G Cooper.**1997. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae.* *J. Bacteriol.*Vol.179 p. 3416-3429.

**11) Cox,KH; Kulkami A; Tate J.J and Cooper, TG.** 2004. Gln3p phosphorylation and intracellular localization in nutrient limitation and starvation differ from those generated by rapamycin inhibition of Tor 1/2 in *Saccharomyces cerevisiae* . *Biol.Chem* Vol. 279 p. 10270-10278.

**12) Bysan N, et al .** 1991. Saturation mutagenesis of the UAS NTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae.* *J. Bacteriol.* Vol.173 p. 4977-4982

**13) Cox KH, et al.** 2004. Actin cytoskeleton is required for nuclear accumulation of Gln3 in response to nitrogen limitation but not rapamycin treatment in *Saccharomyces cerevisiae.* *J. Biol. Chem.* Vol 279 p.19294-301

**14) Cox KH, et al.** 2000. *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from nucleus by overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.* Vol. 275 p. 17611-17618

**15) Folch Mallol JL; et al.** 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* *Rev. Lat. de Microbiol.* Vol. 46 p.24-46

**16) Berg Jeremy M; Tymoczko John L, and Stryer , Lubert.** *Biochemistry.* Ed. W.H Freeman and company. Fifth edition. Cap.11. p. 234-254

**17) Zaman, S; Im Lippman, S; Zhao, X and Broach JR.** 2008. How *Saccharomyces cerevisiae* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* p. 789-899

**18) Kuroda, S.; Otaka, S. and Yukio Fuyisawa.**1993. Fermentable and Nonfermentable carbon sources sustain constitutive level of expression of yeast Triosephosphate Dehydrogenase three genes from distinct promoter elements.1993. *The J. Biol. Chem.*. Vol. 269 p. 6153-6162.

**19) McAlister, L. and Holland, M.J.**1985. Differential expression of the three yeast Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase genes *J. Biol. Chem.* Vol.260 p.15013-15018

**20) Holland, M.J., Yokoi, T., Holland, J.P., Myambo, K., and Innis, M.A.** 1987 The *GCR1* gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 7 p. 813-820

**21) Bitter, G.A; Chang, K.K.H. and Egan, K.M.**1991. A multi component upstream activation sequence of *Saccharomyces cerevisiae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. *Mol. and Gen Genet.* Vol 231 p.22-32

**22) McAlister, L. and Holland, M.J.** 1985. Differential expression of the three yeast Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase genes. *The J. of Biol. Chem.* Vol 260 p. 15019-15027

**23) Boucherie H. et al.** 1995. Differential synthesis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase polypeptides in stressed yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol.125 p. 127-33

**24) Beck, T. and Hall, MN.** (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* Vol.402 p.689-92

**25) Carvalho J and Zheng XF** 2003. Domains of Gln3p interacting with karyopherins, Ure2p, and the target of rapamycin protein. *J Biol Chem.* Vol. 278 p.16878-86

**26) Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Chan TF, Ai W, Zheng XF** 2002. Convergence of TOR-nitrogen and Snf1- signaling pathways onto Gln3p. *Mol Cell Biol* Vol. 22 p.1246-52