



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

**PODGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**“Papel de la proteína Gat1 en la regulación  
transcripcional de los genes que codifican para  
transportadores de zinc en *Saccharomyces cerevisiae*”**

Tesis que presenta

**Aracely Berenice Vázquez Ibarra**

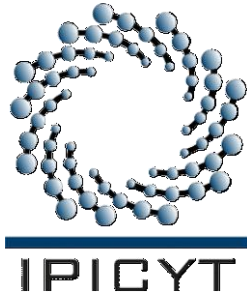
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de Tesis**

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

San Luis Potosí, S.L.P., septiembre de 2011



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Papel de la proteína Gat1 en la regulación transcripcional de los genes que codifican para transportadores de zinc en *Saccharomyces cerevisiae***” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Aracely Berenice Vázquez Ibarra** y aprobada el **23 de septiembre de 2011** 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

Directora de la tesis

---

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Asesora de la tesis

---

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Asesor de la tesis



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa 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 del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 230991) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El trabajo de investigación descrito en esta Tesis fue financiado con recursos otorgados a la Dra Lina Raquel Riego Ruiz a través de los Fondos Sectoriales CONACYT-SEP-2005-49039 y CONACYT -SEP- 2009-132377. También recibió financiamiento del proyecto ICGEB-2010:” Paralogues evolution: relocalisation and expression profiles”.



# 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 088 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 6 días del mes de octubre del año 2011, 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>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</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.

**Aracely Berenice Vázquez Ibarra**

sobre la Tesis intitulada:

*Papel de la proteína Gat1 en la regulación transcripcional de los genes que codifican para transportadores de zinc en Saccharomyces cerevisiae*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

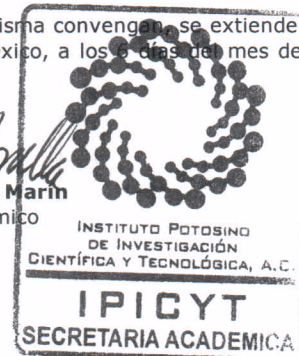
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convenga, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de octubre de 2011.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

## **Dedicatorias**

*A Dios por permitirme cumplir una vez más uno de mis objetivos.*

*A mis padres, por el esfuerzo tan grande que implica el tenerme lejos. Gracias por su apoyo incondicional, sus palabras me hacen tomar fuerzas cada día, y el amor que me brindan me dice que yo solo me tengo que ocupar en alcanzar mis sueños. ¡Los amo, sin ustedes nada de esto es posible!*

*A la Doctora Lina, porque ser una pieza crucial en mi formación académica. Te agradezco por haber compartido parte de tus conocimientos y sobre todo por enseñarme a resolver problemas.*

*A mis hermanos Isis y Mario, gracias por el amor y el permitirme formar parte de sus sueños y sobre todo las ganas que tienen de seguir adelante. Una familia estable trae como resultado una mente sana.*

## **Agradecimientos**

*Gracias al IPICYT por haberme dado la oportunidad de crecer en sus instalaciones.*

*A Luis Medina Sánchez por su apoyo y compañía en el transcurso de nuestra formación en el IPICYT.*

*A mis amigos Edith, Javier, Gema, Paquito, Claudia, Mayte, Emmanuel, Gehenna, Jackeline, Marcela, Candy, Lupita, Mariana. GRACIAS por que como siempre he dicho y seguiré diciendo: ¡Los amigos son la pieza crucial de tu formación y conocimientos en el laboratorio, los amigos comparten contigo un mundo de tips que en ningún protocolo encontraras!*

*La escalera que lleva al éxito nunca está abarrotada en su parte de arriba.*

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	i
Créditos institucionales	ii
Acta de examen	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Figuras suplementarias	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Materiales y Métodos	6
Resultados	15
Discusión	29
Conclusión	36
Perspectivas	37
Material suplementario	38
Referencias	46

## Lista de tablas

1. Cepas utilizadas en este estudio	42
2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio	43



## Lista de figuras

1. Estrategia para el reemplazo del gen <i>GAT1</i> por doble recombinación homóloga	7
2. Estrategia para el reemplazo del gen <i>URE2</i> por doble recombinación homóloga	10
3. Estrategia para el reemplazo del gen <i>GLN3</i> por doble recombinación homóloga	12
4. Tiempos de duplicación en el medio de SN glutamina de la cepa parental y las mutantes generadas	16
5. Tiempos de duplicación en el medio de SN prolina de la cepa parental y las mutantes generadas	17
6. La proteína Gat1 participa en la resistencia a cloruro de zinc al crecer en una buena fuente de nitrógeno	21
7. La proteína Gat1 participa en la resistencia a cloruro de zinc al crecer en una mala fuente de nitrógeno	26

## **Figuras suplementarias**

1. Curva de crecimiento de las cepas en el medio de SN glutamina	38
2. Tiempos de duplicación de las cepas creciendo en el medio de SN glutamina relativos a la cepa silvestre	39
3. Curva de crecimiento de las cepas en el medio de SN prolina	40
4. Tiempos de duplicación de las cepas creciendo en el medio de SN prolina relativos a la cepa silvestre	41

## Resumen

### **Papel de la proteína Gat1 en la regulación transcripcional de los genes que codifican para transportadores de zinc en *Saccharomyces cerevisiae***

El zinc es un cofactor esencial que se requiere para la estructura y la función de numerosas proteínas. Sin embargo; la acumulación de zinc en cantidades excesivas, puede ser tóxico para la célula. Por lo tanto, los organismos presentan mecanismos de homeostasis para mantener un ambiente intracelular relativamente constante, y que además les permita contender con niveles cambiantes de zinc en el medio extracelular. Los principales mecanismos en la homeostasis de zinc son: a) regular la asimilación del zinc a través de la membrana plasmática y b) el secuestro del zinc dentro de los organelos intracelulares.

El factor transcripcional Gat1 ocupa una posición central en la activación de genes sensibles a Represión Catabólica Nitrogenada (NCR). La NCR restringe la capacidad de la levadura a usar las fuentes pobres de nitrógeno cuando las fuentes ricas se encuentran disponibles. La expresión de genes sensibles a NCR es coordinada por la proteína Ure2 y cuatro factores GATA de unión a DNA: dos activadores (Gat1 y Gln3) y dos represores (Dal80 y Gzf3).

En un esfuerzo por definir la participación del factor transcripcional Gat1 en la homeostasis de zinc, hemos generado mutantes nulas de este gen (*gat1Δ*). Evaluamos el efecto crónico del cloruro de zinc en la cepa silvestre CLA1 de *S. cerevisiae* y en las mutantes *gat1Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* al crecer en una buena fuente de nitrógeno (glutamina) o en una mala fuente de nitrógeno (prolina). Observamos que la proteína Gat1 está implicada en la resistencia a zinc independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada.

**PALABRAS CLAVE:** *Saccharomyces cerevisiae*, Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), Factores GATA, Gat1, Gln3, Ure2, homeostasis de zinc

## Abstract

### The role of Gat1 in the transcriptional regulation of genes encoding zinc transporters in *Saccharomyces cerevisiae*.

Zinc is an essential cofactor required for the structure and function of many proteins. However, if zinc accumulates in excessive amounts, it can be toxic to the cell. Therefore, organisms have evolved homeostatic mechanisms in order to maintain a relatively constant intracellular environment and also this allows them to contend with changing zinc levels in the extracellular medium. The main mechanisms to maintain the zinc homeostasis are: a) control of the zinc uptake across the plasma membrane and, b) sequestering zinc within intracellular organelles.

The Gat1 transcription factor plays a central role in the activation of genes sensitive to Nitrogen Catabolite Repression (NCR). NCR restricts the ability of yeast to use poor nitrogen sources when good sources are available. Expression of NCR- sensitive genes is coordinated by Ure2 protein and four DNA-binding GATA factors: two activators (Gat1 and Gln3) and two repressors (Dal80 and Gzf3).

In an effort to define the involvement of the transcription factor Gat1 in zinc homeostasis, we generated null mutants of this gene (*gat1Δ*). We evaluated the chronic effect of zinc chloride in the CLA1 wild type strain of *S. cerevisiae* and in the *gat1Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* and, *ure2Δ gat1Δ gln3Δ* mutants grown in a good nitrogen source (glutamine) or in a poor nitrogen source (proline). Our results showed that Gat1 protein is involved in zinc resistance independently of the nitrogen source used.

KEY WORDS. *Saccharomyces cerevisiae*, Nitrogen Catabolite Repression (NCR), GATA Factors, Gat1, Gln3, Ure2, zinc homeostasis.

## Introducción

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* monitorea su entorno intracelular y extracelular asegurándose de que los nutrientes suficientes estén disponibles para completar un ciclo celular. La entrada de las células al ciclo celular es inhibida por la deficiencia de nitrógeno. Por el contrario, la esporulación requiere de condiciones de ayuno, pero es inhibida en la presencia de una buena fuente de nitrógeno (Georis *et al.*, 2009). La transcripción de genes que codifican enzimas requeridas para el catabolismo de nitrógeno también se encuentra regulada por la fuente de nitrógeno.

Los atributos de una buena fuente de nitrógeno son: a) transportarse rápidamente al interior de la célula, b) degradarse en pocos pasos a ácido glutámico y/o amonio y c) no presentar efectos tóxicos sobre la célula (Cunningham y Cooper, 1992). Para *S. cerevisiae* la asparagina, la glutamina y el ácido glutámico, son las mejores fuentes de nitrógeno. Entre los metabolitos considerados como fuentes de nitrógeno secundarias se encuentran las aminas, las purinas, las proteínas y algunos aminoácidos como la prolina. Para incorporar y degradar esta variedad de compuestos nitrogenados no preferentes, la célula utiliza permeasas y vías de degradación para estas fuentes de nitrógeno (Large, 1986).

Cuando la levadura se cultiva en medios con fuentes pobres de nitrógeno como prolina, se inducen los genes que codifican para enzimas implicadas en el catabolismo de los compuestos nitrogenados presentes en el medio. Por el contrario, en presencia de fuentes de nitrógeno de alta calidad, como glutamina, se observa una disminución en los niveles de enzimas catabólicas y en los sistemas de transporte de compuestos al interior de la célula. La disminución en la expresión de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la utilización de fuentes pobres de nitrógeno se lleva a cabo por una red de regulación conocida como represión catabólica nitrogenada (NCR, por sus siglas en inglés) o vía de discriminación de nitrógeno (Coffman *et al.*, 1995). El control de la expresión de genes sensibles a NCR es coordinada por la proteína Ure2 y por cuatro proteínas

tipo GATA de unión a DNA que poseen homología en sus dedos de zinc: dos activadores (Gln3 y Gat1) y dos represores (Dal80 y Gzf3) (Cooper, 2002).

En presencia de una buena fuente de nitrógeno, los activadores GATA Gat1 y Gln3 se encuentran secuestrados en el citoplasma por la proteína Ure2. Mientras que en una mala fuente de nitrógeno, estos factores son liberados para entrar al núcleo y transcribir sus genes blanco que codifican para permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno (Courchesne y Magasanik, 1998). Se ha demostrado además, que en una mutante en *URE2* se incrementan la expresión de algunos, pero no todos, los genes sensibles a NCR en presencia de una buena fuente de nitrógeno (Coffman *et al.*, 1997) y que una mutación en *GLN3* es epistática a la mutación en *URE2* (Courchesne y Magasanik, 1988). Además de la acción de los dos activadores GATA (Gat1 y Gln3), la modulación de la expresión de los genes de NCR también depende de los represores tipo GATA Dal80 y Gzf3. Los dos activadores Gat1 y Gln3 poseen una región homóloga rica en asparaginas localizada aproximadamente a 200 residuos de aminoácidos del amino terminal (Stanbrough *et al.*, 1995). Los represores Dal80 y Gzf3 comparten un dominio de cremallera de leucinas en su carboxilo terminal responsable de la habilidad de estas proteínas a formar homodímeros y heterodímeros (Svetlov y Cooper, 1998). Se ha confirmado que *in vitro* ambos represores se unen al DNA a la secuencia consenso GATAAG (Coffman *et al.*, 1997). Mientras que la unión del represor Dal80 requiere de la presencia de dos secuencias GATAAG separadas por 15 a 30 pb (Cunningham y Cooper, 1993). Gzf3 puede antagonizar la transcripción del gen reportero *lacZ* utilizando solo un sitio GATAAG (Rowen *et al.*, 1997). Dado que las regiones del dedo de zinc de los represores Dal80 y Gzf3 son homólogas a las de los activadores Gat1 y Gln3, se asume que Dal80 y Gzf3 compiten por los sitios GATA localizados en el promotor de los genes NCR reprimiendo la expresión de los activadores Gat1 y Gln3 (André *et al.*, 1995).

El zinc es un elemento químico esencial, el cual es un cofactor básico que se requiere para la estructura y la función de numerosas proteínas. Por ejemplo,

se estima que el 10% de las 30,000 proteínas diferentes codificadas por el genoma humano requieren zinc para su función (Andreini *et al.*, 2006). Si el zinc se acumula en cantidades excesivas, puede ser tóxico para la célula (Cai *et al.*, 2005). Por lo tanto, los organismos evolucionaron mecanismos de homeostasis para mantener un ambiente intracelular relativamente constante y que además les permita contender con niveles cambiantes de zinc en el medio extracelular. Los principales mecanismos en la homeostasis de zinc son: a) controlar la asimilación del zinc a través de la membrana plasmática y b) el secuestro del zinc dentro de los organelos intracelulares (Eide *et al.*, 2006).

La levadura *S. cerevisiae* requiere aproximadamente de  $1.5 \times 10^7$  átomos de zinc totales por célula para un óptimo crecimiento (MacDiarmid *et al.*, 2000). Este valor se conoce como la “cuota de zinc” de la levadura y probablemente representa el nivel requerido por las proteínas dependientes de zinc de la célula (Outten y Halloran, 2001). Debajo de  $1.5 \times 10^7$  átomos de zinc totales por célula, ésta crece más lentamente. Cuando los niveles de zinc caen por debajo de  $\sim 5 \times 10^6$  átomos por célula, el crecimiento cesa por completo. El factor de transcripción Zap1 ayuda a mantener los niveles de zinc intracelulares para un óptimo crecimiento mediante la regulación de varios genes en respuesta a la deficiencia de zinc (Lyons *et al.*, 2000). Estos genes incluyen a *ZRT1* el cual codifica para el transportador Zrt1 de alta afinidad encargado de incorporar zinc a la célula. 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 5 mM). Además, Zrt1 también se regula a nivel postraduccional cuando las células crecen en condiciones limitantes de zinc y se someten a un “choque de zinc” (Gitan *et al.*, 2003). Otro transportador de membrana que introduce zinc a la célula es Zrt2, que transporta al zinc con menor afinidad que Zrt1. *ZRT2* también es regulado por Zap1 (Bird *et al.*, 2004). En *S. cerevisiae* se han identificado otros dos transportadores membranales que además de transportar zinc, introducen otros iones. Tal es el caso de Fet4, un transportador de membrana que introduce hierro y cobre con baja afinidad (Waters y Eide, 2002) y Pho84 que se encarga de incorporar fosfatos al interior de la célula (Jensen *et al.*, 2003). Una mutante

*pho84*Δ confiere tolerancia al zinc y reduce su acumulación en la célula. Aunque este transportador tiene baja afinidad por el zinc, el sistema de incorporación del metal por Pho84, se induce en condiciones limitantes de fosfatos y su regulación es independiente de Zap1 (Jensen *et al.*, 2003).

En levadura, la vacuola es el organelo donde más zinc se acumula; por lo tanto, puede desintoxicar 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 (MacDiarmid *et al.*, 2003). La vacuola también sirve como un 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, Zrc1 y Zrt3 son activados por Zap1. El tercero, Cot1, transporta tanto zinc, como cobalto y es independiente de Zap1 (Eide, 2006). Zrc1 y Cot1 son miembros de la familia CDF que transportan zinc de citoplasma a vacuola. Por el contrario Zrt3 transporta zinc de vacuola a citoplasma en condiciones limitantes de zinc. 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).

Hasta el momento son pocos los trabajos en los que hay evidencia que relaciona el transporte de zinc con la represión catabólica nitrogenada y/o con las proteínas involucradas en ella. En estos trabajos que describiré a continuación, no se presenta una hipótesis clara de por qué los genes que regulan la NCR estarían regulando a los transportadores de zinc. En 1999, el grupo de Cooper mostró que en una mutante *gln3*Δ, el gen *ZRT1*, que codifica para el transportador membranal Zrt1, se encuentra reprimido cuando las cepas se cultivan con prolina como fuente de nitrógeno (Cox *et al.*, 1999). Sin embargo, en el 2006 otro grupo de investigación encontró que en una doble mutante *gln3*Δ *gat1*Δ, el gen *ZRT1* se expresó en mayor grado que en una cepa silvestre, al crecer a las células en prolina. En cambio en glutamina, 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 *ZRT1* estaban disminuidos en comparación con la cepa silvestre, al crecer en glutamina como fuente de nitrógeno (Scherens *et al.*, 2006). Por otra parte, al analizar la posible función de Ure2 como glutatión-S-transferasa, encontraron inesperadamente que una mutante *ure2Δ* es más resistente a zinc que la cepa silvestre (Rai y Cooper, 2005). De manera adicional, en nuestro laboratorio se realizó un microarreglo donde se evaluó la respuesta transcripcional de los genes en la mutante *ure2Δ* en comparación a genes de la cepa parental en asparagina, que es una buena fuente de nitrógeno, en donde observamos que los genes *ZRT3* y *ZRC1* que codifican para transportadores vacuolares, fueron inducidos en el fondo de la mutante *ure2Δ*. Esto nos indica que los genes *ZRT3* y *ZRC1* se encuentran regulados negativamente por Ure2 y que probablemente existe alguna relación entre la NCR y los transportadores de zinc (Riego *et al.*, datos no publicados).

Con el fin de investigar a fondo la participación del factor de transcripción Gat1 en la homeostasis de zinc, construimos mutantes sencillas, dobles y una triple mutante en los genes *GAT1*, *URE2* y *GLN3* por doble recombinación homóloga. Las mutantes fueron verificadas por PCR, y caracterizadas calculando su tiempo de duplicación en medios de SN glutamina o prolina como fuente de nitrógeno, y la resistencia a zinc fue evaluada mediante goteos en medio SN con diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes concentraciones de cloruro de zinc.

## **Materiales y Métodos**

### **Cepas y oligonucleótidos**

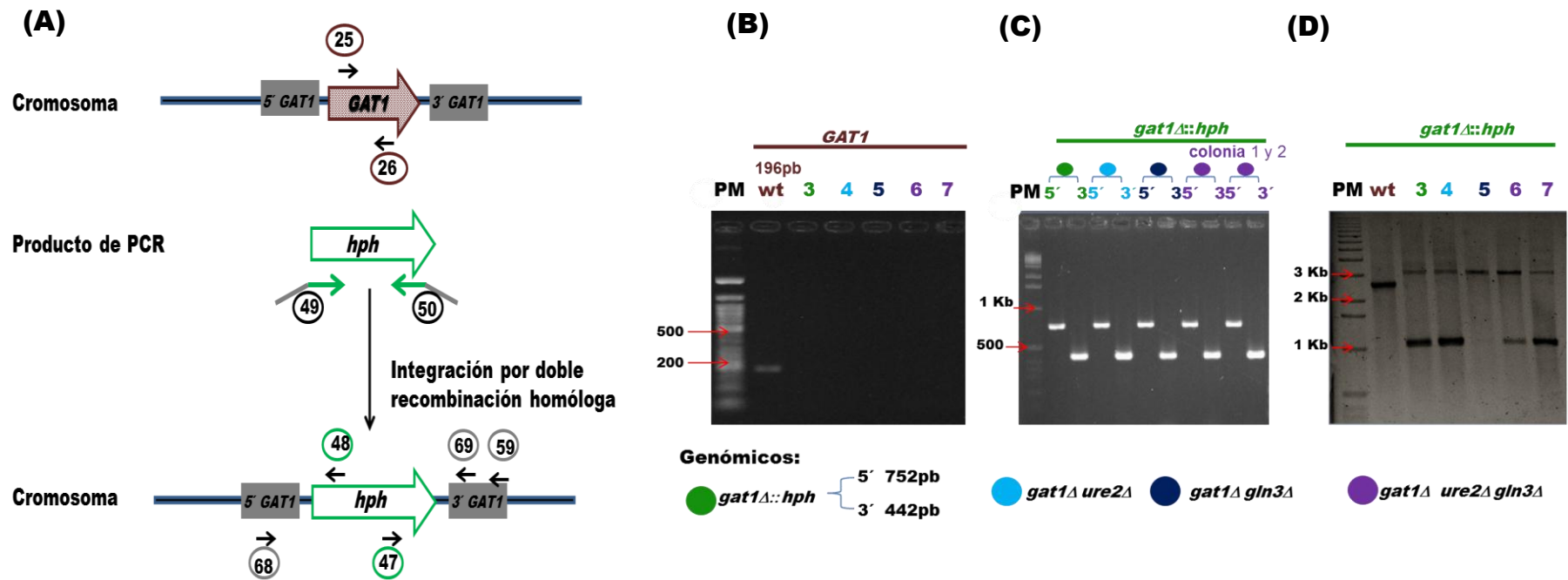
Todas las cepas y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en las Tablas Suplementarias 1 y 2.

### **Transformación genética de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Para la transformación genética de *S. cerevisiae* utilizamos el método de acetato de litio (LiAc) como se describe previamente en Gietz *et al* (1992).

### **Construcción de las cepas mutantes.**

Se construyeron mutantes sencillas, dobles y una triple mutante en los genes *GAT1*, *URE2* y *GLN3*. La interrupción del gen *GAT1* en la cepa parental CLA1 *MAT $\alpha$  ura3-1 leu2-3* (Valenzuela *et al.*, 2001) se realizó por doble recombinación homóloga intercambiando el gen endógeno *GAT1* por el marcador de selección *hph*. Se amplificó por PCR un producto de 2196 pb utilizando como DNA molde el plásmido pAP599 (Domergue *et al.*, 2005) y los oligonucleótidos GAT1 HPH REC FW (5'-ATATATATAGGTGTGTGCCACTCCCGGCCCGGTATTAGCggatccgaagttcctatac-3') (oligonucleótido 49, Tabla S2) y GAT1 HPH REC RV (5'-GTATATATATATGAAGCGGACATGGAAAGAAGCGAGTACTaagcttgaagttcctattct-3') (oligonucleótido 50, Tabla S2). Este par de oligonucleótidos cuenta con secuencias complementarias de 40 pb a las regiones 5' UTR y 3' UTR del gen *GAT1* (mayúsculas subrayadas). El producto de PCR también contiene el marco de lectura abierto del gen *hph* el cual está estructurado de la siguiente manera: *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT* (Fig.1). El gen *hph* se encuentra bajo el promotor del gen *PGK1* de *S. cerevisiae* y contiene un terminador del gen *HIS3* de *Candida glabrata*.



**Figura 1. Estrategia para el reemplazo del gen *GAT1* por doble recombinación homóloga.** **A)** El producto de PCR, que contiene la secuencia *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3' UTR<sub>HIS3</sub>::FRT* flanqueado por regiones homólogas 5' UTR y 3' UTR del gen que se va a reemplazar, se inserta por doble recombinación homóloga en el gen endógeno. Como resultado se pierde el gen endógeno y, en este caso, las células que contienen la construcción insertada en el genoma son resistentes a higromicina. Se muestra la ubicación de las parejas de oligonucleótidos para comprobar la mutación. **B)** La ausencia del gen *GAT1* en la cepa mutante se verificó con la pareja de oligonucleótidos internos al gen, 25 y 26. **C)** Verificación de la mutación del gen *GAT1* para el sitio de inserción 5' (757 pb) con los oligonucleótidos 48 y 68, y para el sitio de inserción 3' (442pb) con los oligonucleótidos 47 y 69. **D)** Finalmente, el reemplazo del gen silvestre se confirmó con los oligonucleótidos 68 y 69 (2555pb en la cepa silvestre y 3138pb en las cepas mutantes). El código de colores representa el DNA genómico de la cepa en estudio.

El producto de PCR (5' UTR *GAT1* -casete *hph*- 3' UTR *GAT1*) se purificó con el kit de Promega (PCR Clean- Up System) para posteriormente transformar las cepas de *S. cerevisiae* (ver Tabla S1) y obtener cepas mutantes en el gen *GAT1*. Las cepas resistentes a higromicina fueron seleccionadas y la delección del gen *GAT1* fue confirmada por PCR (Fig. 1).

La interrupción del gen *URE2* en la cepa parental CLA1 *MAT $\alpha$  ura3-1 leu2-3* se realizó por doble recombinación homóloga intercambiando el gen endógeno *URE2* por el marcador de selección *kanMX* el cual le confiere resistencia a la levadura a geneticina o kanamicina. Se amplificó por PCR un producto de 2062 pb con los oligonucleótidos *URE2* FW VC1 (5'-GAATACCGACTGTTGTCTGG-3') (oligonucleótido 27, Tabla S2) y *URE2* RV VC2 (5'-TGGAATTCTGTGGTTGGG-3') (oligonucleótido 28, Tabla S2). El producto de PCR contiene el marco de lectura abierto del gen *kanMX* flanqueado por regiones homólogas al 5' UTR (373 pb) y al 3' UTR (183 pb) del gen *URE2*. El gen *kanMX* se encuentra bajo el promotor del gen *TEF3* de *Ashbya gossypii*, y contiene el terminador del gen *TEF3* de *A. gossypii* (Wach *et al.*, 1994). El producto de PCR (5' UTR *URE2*- casete *kanMX*- 3' UTR *URE2*) se purificó con el kit de Promega (PCR Clean- Up System) para posteriormente transformar las cepas de *S. cerevisiae* (ver Tabla S1) y obtener cepas mutantes en el gen *URE2*. Las cepas resistentes a geneticina fueron seleccionadas y la delección del gen *URE2* se confirmó por PCR.

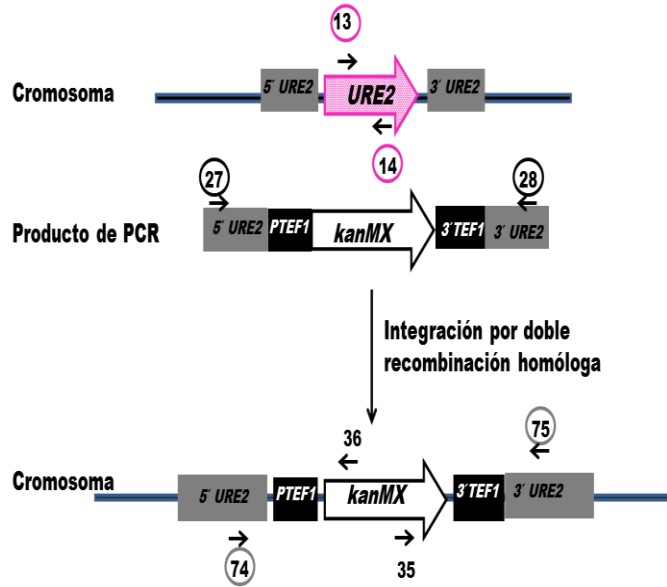
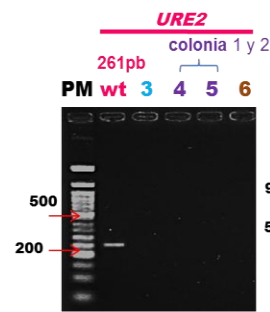
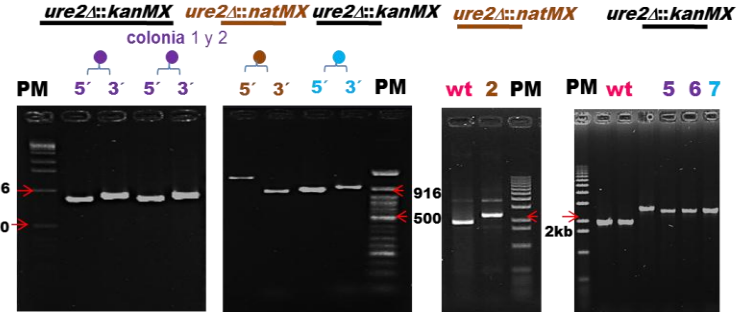
Para la construcción de las dobles mutantes y la triple mutante se transformó las cepas *gln3 $\Delta$*  y *ure2 $\Delta$*  de *S. cerevisiae* con la finalidad de intercambiar el ORF de *kanMX* por el ORF de *natMX*. El casete de *kanMX* y el de *natMX* comparten la misma región promotora y terminadora permitiéndonos el intercambio del ORF del gen de resistencia mediante recombinación homóloga. Se amplificó por PCR un producto de 1207 pb utilizando el DNA molde del plásmido p4339 (Goldstein y McCusker, 1999) con los oligonucleótidos AMP MOD-NAT FW (5'-AGATCTGTTTAGCTTGCCTCG-3') (oligonucleótido 66, Tabla S2) y AMP MOD-NAT RV (5'-TTTTCGACACTGGATGGC-3') (oligonucleótido 67, Tabla S2). El producto de PCR contiene el marco de lectura abierto del gen *natMX* flanqueado por la región promotora y terminadora del gen *TEF3* de *A. gossypii*

(Wach *et al.*, 1994). Las cepas resistentes a nuorseotricina fueron seleccionadas y la delección del gen *kanMX* se confirmó por PCR.

### **Comprobación de las mutantes por reemplazo génico**

El diagnóstico de la correcta interrupción de los genes *GAT1*, *URE2* y *GLN3*, se realizó por PCR. La inserción del casete *FRT::P<sub>PGK1</sub>::hph::3'UTR<sub>HIS3</sub>::FRT* en el locus de *GAT1* se comprobó por la amplificación de los extremos 5' y 3'. El extremo 5' se amplificó con el juego de oligonucleótidos 68 y 48 (Fig. 1A). El oligonucleótido 68 hibrida en la región no traducible 5' del gen *GAT1*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción de este gen. El oligonucleótido 48 hibrida dentro del casete *hph*. El extremo 3' se amplificó con el juego de oligonucleótidos 59 y 47. El oligonucleótido 59 hibrida en la región no traducible 3' del gen *GAT1*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción del gen *GAT1*. El oligonucleótido 47 hibrida dentro del casete *hph*. También la interrupción del gen *GAT1* se comprobó por la ausencia del producto de amplificación del marco de lectura abierto de *GAT1* con los oligonucleótidos específicos (Fig. 1A, oligonucleótidos 25 y 26).

La inserción del casete *P<sub>TEF3</sub>::kanMX::3'UTR<sub>TEF3</sub>* se comprobó por la amplificación de los extremos 5' y 3'. El extremo 5' se amplificó con el juego de oligonucleótidos 74 y 36 (Fig. 2A). El oligonucleótido 74 hibrida en la región no traducible 5' del gen *URE2*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción de este gen. El oligonucleótido 36 hibrida dentro del casete *kanMX*. El extremo 3' se amplificó con el juego de oligonucleótidos 75 y 35. El oligonucleótido 75 hibrida en la región no traducible 3' del gen *URE2*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción de este gen *URE2*. El oligonucleótido 35 hibrida dentro del casete *kanMX*. También la interrupción del gen *URE2* se comprobó por la ausencia del producto de amplificación del marco de lectura abierto de *URE2* con los oligonucleótidos específicos (Fig. 2A, oligonucleótidos 13 y 14).

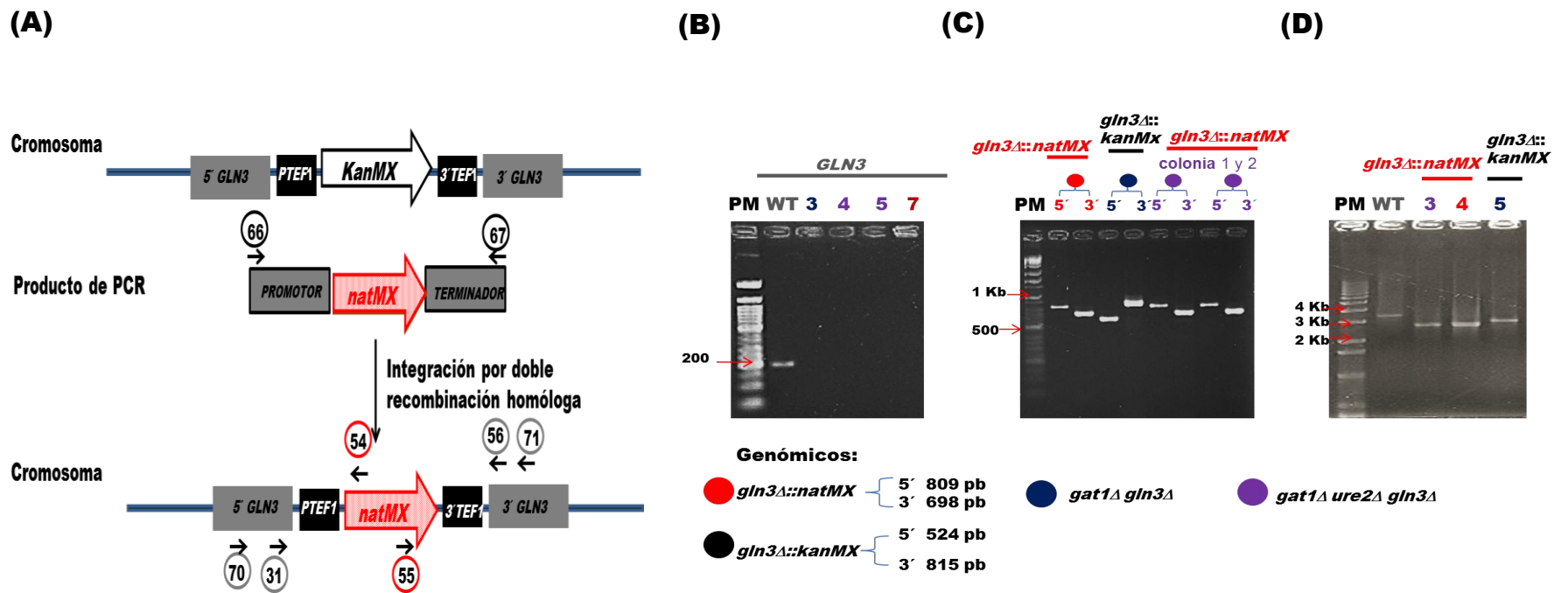
**(A)****(B)****(C)****(D)****Genómicos:**

**Figura 2. Estrategia para el reemplazo del gen *URE2* por doble recombinación homóloga.** **A)** Los productos de PCR, que contiene la secuencia  $P_{TEF3}::kanMX::3'UTR_{TEF3}$  o  $P_{TEF3}::natMX::3'UTR_{TEF3}$  flanqueados por regiones homólogas 5' UTR y 3' UTR del gen que se va a reemplazar, se insertaron por doble recombinación homóloga en el gen endógeno. Como resultado se pierde el gen endógeno y, en este caso, las células que contienen la construcción insertada en el genoma son resistentes a geneticina o nourseotricina. Se muestra la ubicación de las parejas de oligonucleótidos utilizados para comprobar la mutación. **B)** La ausencia del gen *URE2* en la cepa mutante se determinó con la pareja de oligonucleótidos internos al gen, 13 y 14. **C)** Verificación de la mutación del gen *URE2* para el sitio de inserción 5' (851 pb) con los oligonucleótidos 74 y 36, y para el sitio de inserción 3' (901 pb) con los oligonucleótidos 35 y 75 cuando el casete de resistencia es *kanMX*. Para los sitios de inserción 5' y 3', usando el marcador de selección *natMX*, se observan bandas de 987 pb (oligonucleótidos 74 y 54) y de 719 pb (oligonucleótidos 55 y 75). **D)** Finalmente, el reemplazo del gen silvestre se confirmó con los oligonucleótidos 74 y 75 (1969 pb cepa silvestre, 2410 pb mutante con *kanMX* y 2109 pb mutante con *natMX*). El código de colores representa el DNA genómico de la cepa en estudio.

El remplazo del casete  $P_{TEF3}::kanMX::3'UTR_{TEF3}$  por el casete  $P_{TEF3}::natMX::3'UTR_{TEF3}$  en las cepas  $gln3\Delta::kanMX$  y  $ure2\Delta::kanMX$  se comprobó por la amplificación de los extremos 5' y 3' del locus del gen previamente mutado. El extremo 5' se amplificó con el juego de oligonucleótidos 31 y 54 para el gen *GLN3* (Fig. 3A), en cuanto al gen *URE2* se utilizó el juego de oligonucleótidos 54 y 74. El oligonucleótido 31 hibrida en la región no traducible 5' del gen *GLN3*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción del gen *GLN3* mientras que el oligonucleótido 54 hibrida dentro del casete *kanMX*. El extremo 3' se amplificó con el juego de oligonucleótido 56 y 55 para el gen *GLN3* (Fig. 3A), en cuanto al gen *URE2* se utilizó el juego de oligonucleótidos 75 y 55. El oligonucleótido 56 hibrida en la región 3' no traducible del gen *GLN3*, fuera del fragmento que se utilizó para la interrupción de este gen, mientras que el oligonucleótido 55 hibrida dentro del casete *kanMX*. También la interrupción del gen *GLN3* se comprobó por la ausencia del producto de amplificación del marco de lectura abierto de *GLN3* con los oligonucleótidos específicos (Fig. 3A, oligonucleótidos 11 y 12).

### **Medios de crecimiento**

Las células se cultivaron en medio YPD (del inglés Yeast extract-Peptone-Dextrose), que contiene extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L, y agar 2% en caso de medio sólido. Para seleccionar las cepas transformantes, las cajas de YPD se suplementaron ya sea con higromicina (A. G. Scientific®) a una concentración final de 200 µg/ml, geneticina o nourseotricina a una concentración final de 100 µg/ml. Para la caracterización de las mutantes mediante curvas de crecimiento, se crecieron las cepas en medio SN (Yeast Nitrogen Base; sin aminoácidos y sin sulfato de amonio) con glutamina o prolina como fuente de nitrógeno. Para el medio SN glutamina se usó este aminoácido a una concentración final de 7 mM, más uracilo 30 µg/ml y leucina 110 µg/ml que cubren la auxotrofia por uracilo y leucina de las cepas. Para el medio de SN prolina se usó este aminoácido a una concentración final de 0.1%, más uracilo 30µg/ml y leucina 110 µg/ml que cubren la auxotrofia por uracilo y leucina de las cepas.



**Figura 3. Estrategia para el reemplazo del gen *GLN3* por doble recombinación homóloga.** **A)** El producto de PCR, que contiene la secuencia  $P_{TEF3}::kanMX::3'UTR_{TEF3}$  o  $P_{TEF3}::natMX::3'UTR_{TEF3}$  flanqueados por regiones homólogas 5' UTR y 3' UTR del gen que se va a reemplazar, se insertaron por doble recombinación homóloga en el gen endógeno. Como resultado se pierde el gen endógeno y, en este caso, las células que contienen la construcción insertada en el genoma son resistentes a geneticina o nourseotricina. Se muestra la ubicación de las parejas de oligonucleótidos para comprobar la mutación. **B)** La ausencia del gen *GLN3* en la cepa mutante se determinó con la pareja de oligonucleótidos internos al gen, 11 y 12. **C)** Verificación de la mutación del gen *GLN3* para el sitio de inserción 5' (524 pb) con los oligonucleótidos 31 y 36, y para el sitio de inserción 3' (815 pb) con los oligonucleótidos 35 y 56 cuando el casete de resistencia es *kanMX*. Para los sitios de inserción 5' y 3', usando el marcador de selección *natMX*, se observan bandas de 809 pb (oligonucleótidos 31 y 54) y 698 pb (oligonucleótidos 55 y 56). **D)** Finalmente, el reemplazo del gen silvestre se confirmó con los oligonucleótidos 70 y 71 (3571 pb en cepa silvestre, 3080 pb mutante con *kanMX* y 2845 pb mutante con *natMX*). El código de colores representa el DNA genómico de la cepa en estudio.



En el caso de la evaluación del efecto crónico de cloruro de zinc, las cepas fueron crecidas en medio SN sólido con glutamina (suplementado con uracilo 30  $\mu\text{g/ml}$  y leucina 110  $\mu\text{g/ml}$ ) o prolina (suplementado con uracilo 30  $\mu\text{g/ml}$  y leucina 110  $\mu\text{g/ml}$ ) más cloruro de zinc 8, 10, 12 y 14 mM.

### ***Curvas de crecimiento***

Caracterizamos las cepas mediante curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo SN glutamina (suplementado con uracilo y leucina) ó SN prolina (suplementado con uracilo y leucina). Crecimos un preinóculo de las células por 16 h en tubos con 10 ml de medio de SN prolina o medio de SN glutamina, a 30 °C y con agitación a 250 rpm. Posteriormente, inoculamos en matraces de 50 ml de SN glutamina o SN prolina a una densidad óptica de 0.03 ( $A_{600}$ ). Las células crecieron en las mismas condiciones de temperatura y agitación del preinóculo. Durante el crecimiento tomamos muestras a diferentes tiempos hasta las 20 ó 25 h de cultivo.

Para calcular los tiempos de duplicación de las mutantes en los diferentes medios de cultivo, se tomaron los puntos de la curva de crecimiento que corresponden a la fase logarítmica, obteniendo la ecuación de la recta (Figs. S1 y S3). 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.

Se realizaron tres experimentos independientes en medio de SN glutamina y en medio de SN prolina, para la obtención de desviaciones estándar de los tiempos de duplicación en cada una de las cepas evaluadas. Posteriormente se hizo un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), con un significancia estadística de ( $p < 0.05$ ) utilizando Microsoft Excel. El resultado se interpretó como la presencia o ausencia de diferencias significativas entre cepas.

### ***Ensayos de resistencia a cloruro de zinc***

Crecimos un preinóculo de la cepa parental y las mutantes *gat1Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* en tubos con 5 ml de medio SN glutamina o SN prolina (suplementado con glutamina 30  $\mu\text{g/ml}$ , dado que la cepa *gln3Δ* es auxótrofa de glutamina) a 30° C y con agitación a 250 rpm. El tiempo que dejamos crecer las células varió de acuerdo con el medio y el tiempo de duplicación de cada cepa. Posteriormente, inoculamos las células en matraces con 50 ml del mismo medio del preinóculo a una  $A_{600}=0.05$  y a las horas necesarias para que, conforme a los tiempos de duplicación, las cepas alcanzaran simultáneamente una  $A_{600}= 0.6$ . Las cepas crecieron en las mismas condiciones de temperatura del preinóculo. Del inóculo, tomamos una alícuota, llevamos a cabo 4 diluciones logarítmicas y goteamos 5  $\mu\text{l}$  en SN sólido con glutamina ó prolina (suplementado con glutamina 30  $\mu\text{g/ml}$ ) como fuente de nitrógeno más cloruro de zinc 8, 10, 12 y 14 mM. Incubamos las cajas a 28° C y las fotos fueron tomadas a diferentes tiempos de acuerdo al tiempo de duplicación de cada cepa.

## Resultados

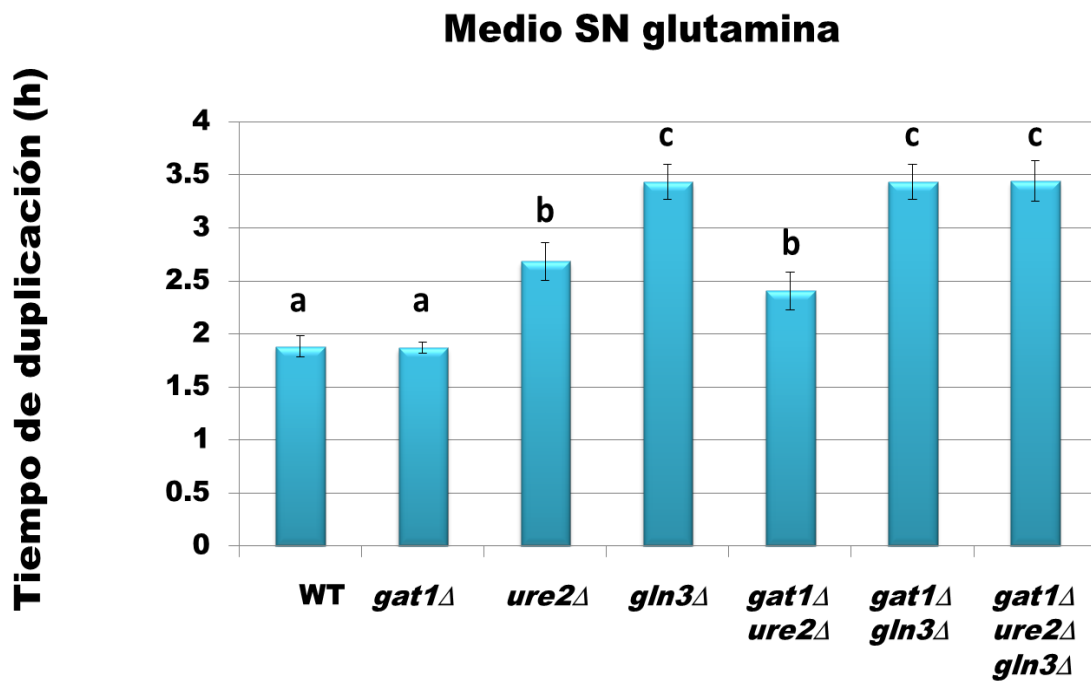
### **Generación de cepas mutantes en los genes *GAT1*, *URE2* Y *GLN3***

Estamos interesados en investigar la participación del factor de transcripción Gat1 en la homeostasis de zinc. Para ello, generamos mutantes sencillas, dobles y una triple mutante en los genes *GAT1*, *URE2* y *GLN3* por doble recombinación homóloga, intercambiando la región codificante del gen por un módulo que contiene un gen de resistencia (*hph*, *natMX* o *kanMX*) (Materiales y Métodos). Las mutantes se seleccionaron por su resistencia a higromicina, geneticina o nourseotricina y la sustitución de la región codificante del gen por el casete de selección se verificó mediante PCR (Materiales y Métodos, Figs. 1-3).

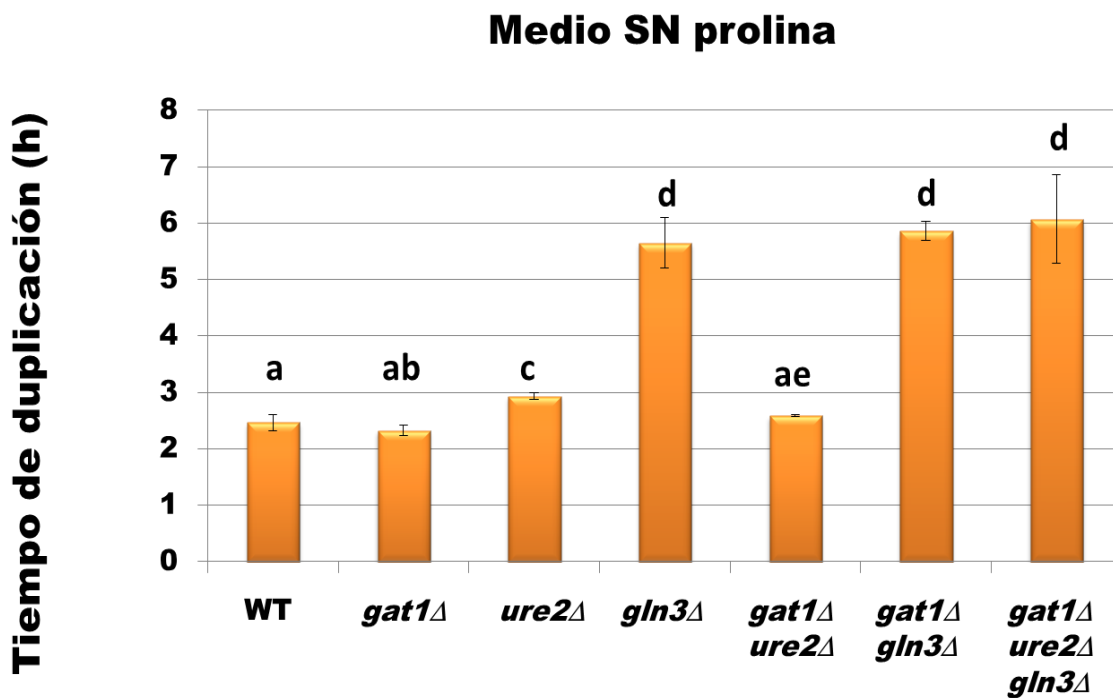
### **Crecimiento de las cepas mutantes en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno**

Después de verificar, por medio de PCR, la correcta inserción de los módulos en cada una de las mutantes, caracterizamos las cepas mediante curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (SN glutamina y SN prolina), y calculamos los tiempos de duplicación con la ecuación de la recta (Figs. S1 y S3). Se realizaron tres experimentos independientes para cada una de las mutantes en los diferentes medios de cultivo (SN glutamina o SN prolina). Para obtener la desviación estándar de los tiempos de duplicación para cada una de las cepas mutantes (Figs. 4 y 5).

En SN glutamina la cepa mutante *gat1* $\Delta$  presentó el mismo comportamiento de crecimiento que la cepa silvestre (Fig. S1) con un tiempo de duplicación de 1h 52 min  $\pm$  3 min (Fig. 4). La cepa mutante *ure2* $\Delta$  presentó un crecimiento más lento (con una diferencia de 49 min) que la cepa silvestre, pero más rápido (con una diferencia de 50 min) que la cepa *gln3* $\Delta$  (Fig. 4). El tiempo de duplicación de la cepa *ure2* $\Delta$  fue de 2 h 40min  $\pm$  10 min (Fig. 4) lo que hace que esta cepa sea 0.4 veces más lenta que la cepa silvestre (Fig. S2).



**Figura 4. Tiempos de duplicación en medio SN glutamina de la cepa parental y de las mutantes generadas.** En el eje de las Y se observan los tiempos de duplicación en horas. En el eje de las X se muestran las cepas evaluadas. Se realizaron tres experimentos independientes en medio SN glutamina para la obtención de desviaciones estándar de los tiempos de duplicación en cada una de las cepas evaluadas. Se efectuó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), con un significancia estadística de ( $p < 0.05$ ) utilizando Microsoft Excel. El resultado se interpretó como la presencia o ausencia de diferencias significativas entre cepas, representado por letras minúsculas. El análisis de varianza mostró que la cepa silvestre presenta diferencias significativas en tiempo de duplicación al compararla con las cepas *ure2*Δ, *gat1*Δ *ure2*Δ y de las cepas *gln3*Δ, *gat1*Δ *gln3*Δ y *gat1*Δ *ure2*Δ *gln3*Δ.



**Figura 5. Tiempos de duplicación en medio SN prolina de la cepa parental y las mutantes generadas.** En el eje de las Y se observan los tiempos de duplicación en horas. En el eje de las X se muestran las cepas evaluadas. Se realizaron tres experimentos independientes en medio SN prolina para la obtención de desviaciones estándar de los tiempos de duplicación en cada una de las cepas evaluadas. Se efectuó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), con un significancia estadística de ( $p < 0.05$ ) utilizando Microsoft Excel. El resultado se interpretó como la presencia o ausencia de diferencias significativas entre cepas, representado por letras minúsculas. El análisis de los datos por varianza muestra que la cepa silvestre presenta diferencias significativas en tiempo de duplicación de la cepa *ure2*Δ, y de las cepas *gln3*Δ, *gat1*Δ *gln3*Δ y *gat1*Δ *ure2*Δ *gln3*Δ.

El análisis de varianza de los tiempos de duplicación entre las cepas *gat1Δ ure2Δ* y *ure2Δ* indica que no existen diferencias significativas entre ellas. El tiempo de duplicación de la cepa *gat1Δ ure2Δ* fue de 2h 30 min  $\pm$  10 min (Fig. 4).

Las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* presentaron el mismo comportamiento de crecimiento en SN glutamina, el tiempo de duplicación de estas cepas fue de aproximadamente 3h 30 min  $\pm$  10 min (Fig. 4). Cuando evaluamos el tiempo de duplicación de las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* relativo a la cepa silvestre, observamos que éstas son alrededor de 0.8 veces más lentas que la cepa parental (Fig. S2). Se observó cómo la ausencia del gen *GLN3* es el responsable del comportamiento en las cepas *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ*, ya que estas presentan el mismo tiempo de duplicación y la tendencia de crecimiento de la cepa mutante *gln3Δ*.

En SN prolina, la cepa *gat1Δ* no presentó un comportamiento de crecimiento diferente a la cepa silvestre (Fig. S3), el análisis de varianza mostró que no existe diferencia significativa en cuanto al tiempo de duplicación respecto a la silvestre, el cual fue de 2h 15min  $\pm$  9 min (Fig. 5). La cepa *ure2Δ* tuvo un crecimiento más lento que la cepa silvestre, pero más rápido que las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* (Fig. S3), con un tiempo de duplicación de alrededor de 3h (Fig. 5). Cuando evaluamos el tiempo de duplicación de la cepa *ure2Δ* relativo a la cepa silvestre, observamos que la cepa *ure2Δ* es 0.3 veces más lenta que la cepa silvestre (Fig. S4).

La cepa *gat1Δ ure2Δ* presentó un comportamiento intermedio de crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa *ure2Δ* (Fig. S3). En cuanto a su tiempo de duplicación, el análisis de varianza muestra que no hay diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (2h 35 min), pero sí respecto a la cepa *gat1Δ* es (30 min) más lenta (Fig. 5).

Las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* presentaron el mismo comportamiento de crecimiento. El análisis de varianza de los tiempos de duplicación entre estas cepas mostró que no existen diferencias significativas entre ellas, siendo el tiempo de duplicación de alrededor de 5h 30min ± 30 min (Fig. 5). Cuando evaluamos el tiempo de duplicación de las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* relativo a la cepa silvestre, observamos que las cepas son alrededor de 1.3 veces más lentas que la cepa silvestre (Fig. S4). Para que la doble mutante *gat1Δ gln3Δ* pueda crecer, nosotros le agregamos glutamina en las cantidades necesarias para cubrir el requerimiento de auxotrofia.

El tiempo de duplicación de cada una de las cepas fue mayor en SN prolina que en SN glutamina; esto se pudo observar claramente en los valores de las pendientes (m) de las ecuaciones (Figs. S1 y S3).

Las mutantes *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* tuvieron un tiempo de duplicación mucho mayor en SN prolina que en SN glutamina comparado con el de la cepa silvestre. Estos datos indican que *GLN3* adquiere una mayor importancia cuando la célula crece en una mala fuente de nitrógeno, lo que concuerda con trabajos previamente publicados (Courchesne y Magasanik, 1988).

### ***La proteína Gat1 confiere resistencia a cloruro de zinc en S. cerevisiae al crecer en glutamina y prolina como fuentes de nitrógeno***

Nos interesa estudiar la participación del factor de transcripción Gat1 en la homeostasis de zinc. Para ello evaluamos el efecto crónico del cloruro de zinc en la cepa silvestre CLA1 de *S. cerevisiae* y en las mutantes *gat1Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ*, al crecer en una buena fuente de nitrógeno (glutamina) o en una mala fuente de nitrógeno (prolina).

Observamos que en el medio de SN glutamina con 8 mM de cloruro de zinc las cepas mutantes *ure2Δ* y *gat1Δ ure2Δ* a las 36 duplicaciones fueron más resistentes que la cepa silvestre y que las demás cepas evaluadas. Por otro lado,

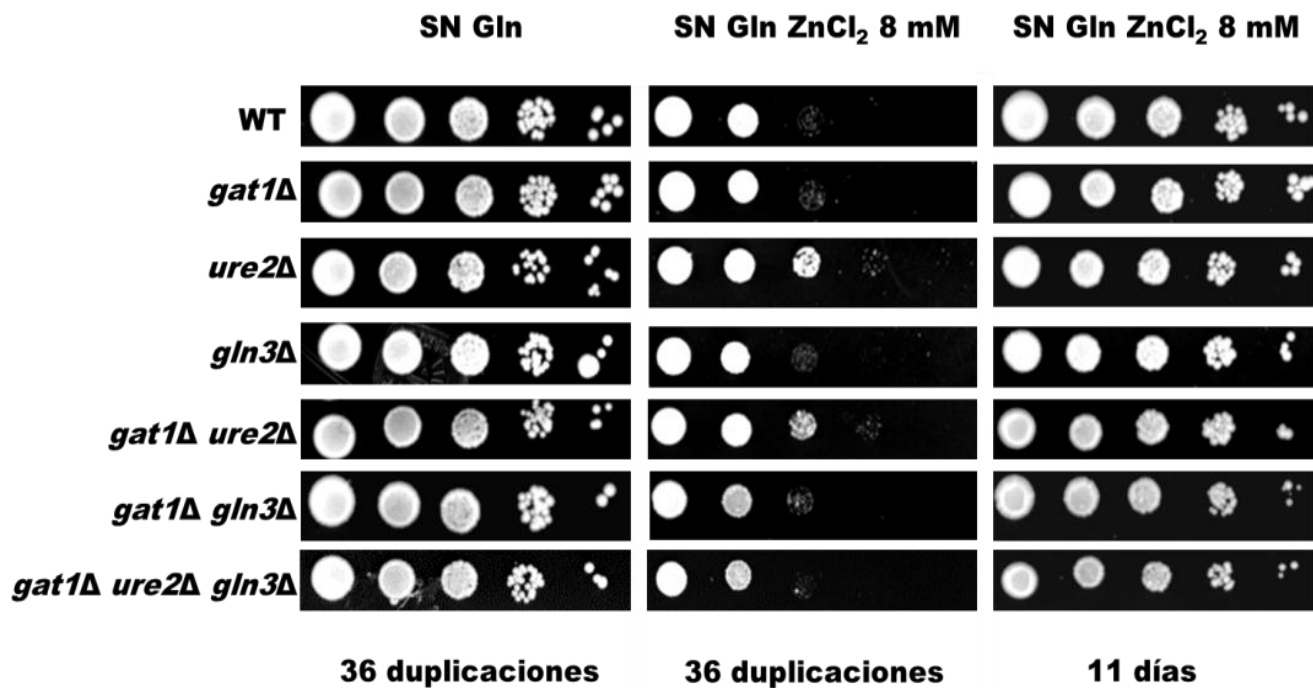
las cepas *gat1* $\Delta$  y *gln3* $\Delta$ , presentaron el mismo fenotipo de la cepa silvestre. En cambio, las cepas *gat1* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  y *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  fueron ligeramente más sensibles que la cepa silvestre. A los 11 días todas las cepas lograron crecer hasta la última dilución, lo que nos indica que las células son capaces de contender con esta concentración de cloruro de zinc (Fig. 6A).

En el medio de SN glutamina con 10 mM, de cloruro de zinc las cepas mutantes *ure2* $\Delta$  y *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  siguen presentando un fenotipo de mayor resistencia comparado con el crecimiento de la cepa silvestre y de las demás cepas evaluadas; sin embargo, la cepa *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  fue ligeramente más sensible que la cepa *ure2* $\Delta$ . Por otro lado, la cepa *gat1* $\Delta$  presentó el mismo fenotipo de la cepa silvestre mientras que, la cepa *gln3* $\Delta$  fue ligeramente más sensible que la cepa silvestre. Finalmente, las cepas *gat1* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  y *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  fueron más sensibles que la cepa silvestre. A los 11 días, se hizo más evidente el fenotipo de las cepas, ya que las cepas *ure2* $\Delta$  y *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  fueron las más resistentes de todas las mutantes evaluadas, creciendo hasta la cuarta dilución. La cepa *gat1* $\Delta$  presentó el mismo fenotipo que la cepa parental, creciendo hasta la tercera dilución. La cepa *gln3* $\Delta$  fue más sensible que la cepa parental creciendo solo hasta la segunda dilución; sin embargo, la cepa mutante *gln3* $\Delta$ , fue más resistente que las cepas *gat1* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  y *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  *gln3* $\Delta$  las cuales solo lograron crecer hasta la primera dilución (Fig. 6B).

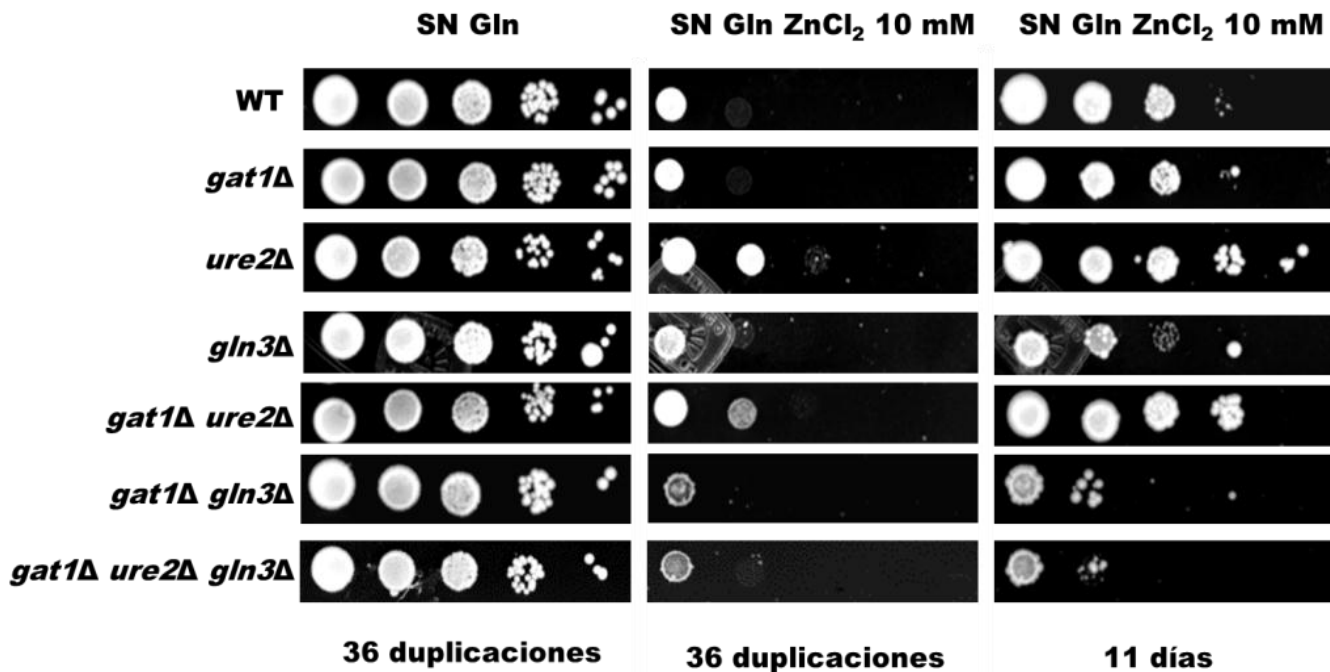
En el medio de SN glutamina con 12 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones solo la cepa mutante *ure2* $\Delta$  creció ligeramente hasta la segunda dilución, seguida de la cepa *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  la cual logró crecer solo hasta la primera dilución. A los 11 días se observó claramente como la cepa *ure2* $\Delta$  fue la más resistente de todas las mutantes evaluadas creciendo hasta la tercera dilución, seguida de la cepa *gat1* $\Delta$  *ure2* $\Delta$  que logró crecer hasta la segunda dilución. En cambio las cepas *gat1* $\Delta$  y la silvestre crecieron solo hasta la primera dilución.

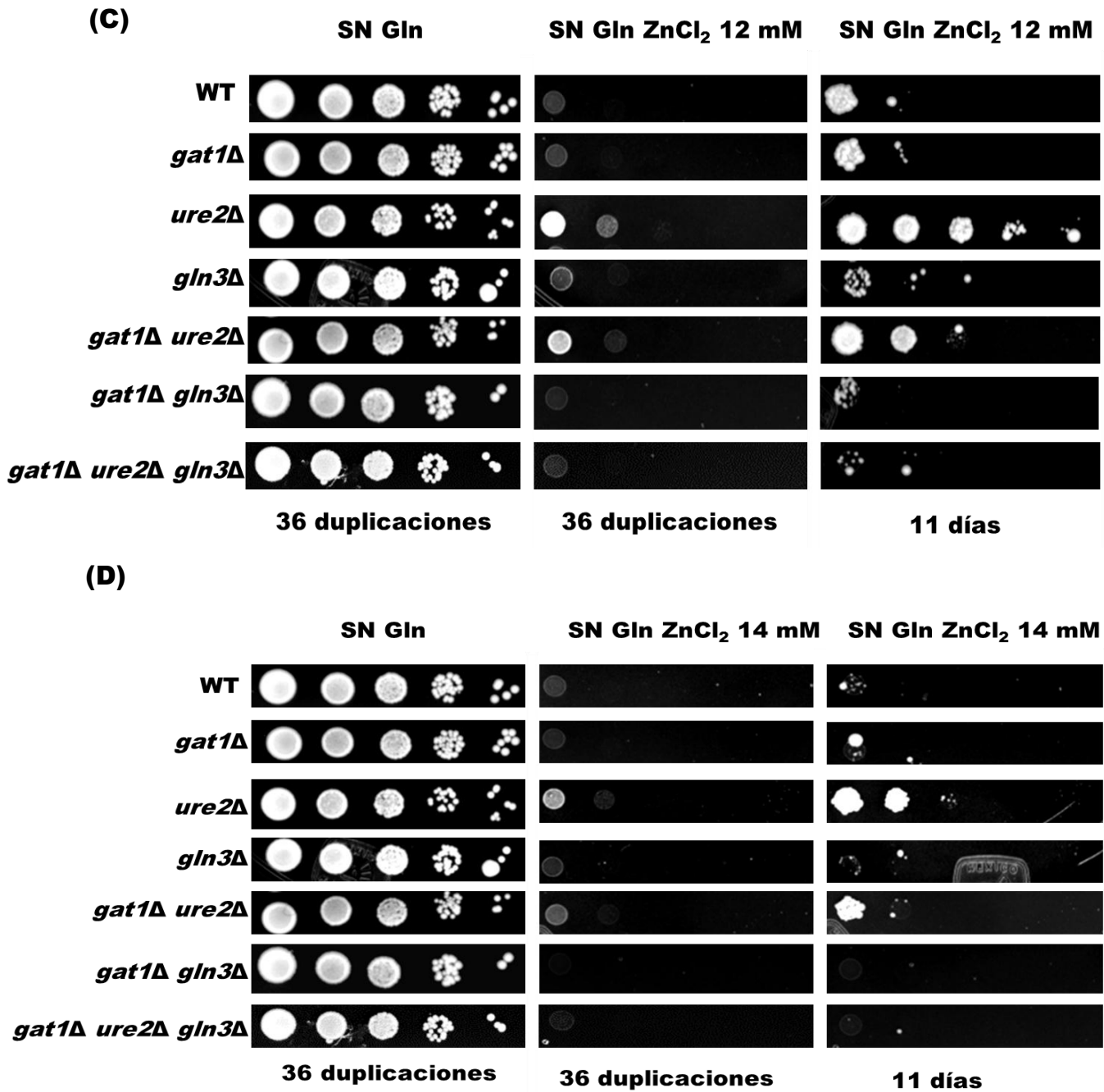


(A)



(B)





**Figura 6.** La proteína *Gat1* participa en la resistencia a cloruro de zinc al crecer en una buena fuente de nitrógeno. La primera columna (izquierda) representa el control de las cepas creciendo solo en SN glutamina sin cloruro de zinc, la columna central representa las 36 duplicaciones de cada cepa creciendo en SN glutamina más 8, 10, 12 ó 14 mM de cloruro de zinc. La tercera columna (derecha) representa los 11 días de crecimiento de cada cepa evaluada. **(A)** SN glutamina más ZnCl<sub>2</sub> 8 mM, **(B)** SN glutamina más ZnCl<sub>2</sub> 10mM, **(C)** SN glutamina más ZnCl<sub>2</sub> 12 mM, **(D)** SN glutamina más ZnCl<sub>2</sub> 14 mM. Las cepas crecieron a 28°C en medio SN con glutamina hasta alcanzar una A<sub>600</sub>=0.6, goteamos 5 μl de cada dilución logarítmica en SN glutamina más cloruro de zinc a las concentraciones indicadas. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas a diferentes tiempos de acuerdo al tiempo de duplicación de cada cepa.

Observamos la presencia de colonias aisladas en la primera dilución en las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* lo que indica que las cepas al estar en exposición constante con el cloruro de zinc, no logran contender con la presencia del metal (Fig. 6C). Para determinar si la cepa mutante *ure2Δ* puede resistir concentraciones más altas de zinc, se decidió evaluar las cepas a 14 mM de cloruro de zinc.

En el medio de SN glutamina con 14 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones solo se observó un ligero crecimiento en la primera dilución de la cepa *ure2Δ*. Las otras cepas no crecieron en esta concentración de cloruro de zinc. A los 11 días solo la mutante *ure2Δ* logró crecer hasta la segunda dilución, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ* que creció hasta la primera dilución (Fig. 6 D). Sin embargo, la concentración de 12 mM y 14 mM de cloruro de zinc resultó tóxica para las células *gat1Δ*, *gln3Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* y la cepa silvestre ya que inhibió el crecimiento.

En el medio de SN prolina con 8 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones (Fig. 7A) la cepa *gat1Δ* fue un poco más sensible que la cepa silvestre, este fenotipo resultó más claro en 10 mM. Las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* presentaron el mismo fenotipo de crecimiento que la cepa silvestre, creciendo ligeramente hasta la tercera dilución. La cepa *ure2Δ* logró crecer ligeramente hasta la cuarta dilución, siendo la cepa más resistente de todas las evaluadas, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ* la cual fue un poco más sensible que la cepa *ure2Δ*. Una observación importante fue que la cepa *gat1Δ gln3Δ* creció muy pobremente en el medio de SN prolina sin cloruro de zinc, fenotipo que era de esperarse debido a la función que desempeña como factor transcripcional, regulando la activación de genes sensibles a represión catabólica nitrogenada. A los 11 días se observó como las cepas *gat1Δ*, *ure2Δ*, y *gat1Δ ure2Δ* lograron crecer hasta la última dilución, al igual que la cepa silvestre. La cepa *gat1Δ gln3Δ* presentó mayores problemas de crecimiento, logrando crecer ligeramente hasta la tercera dilución, seguida de las cepas *gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* (Fig. 7A).

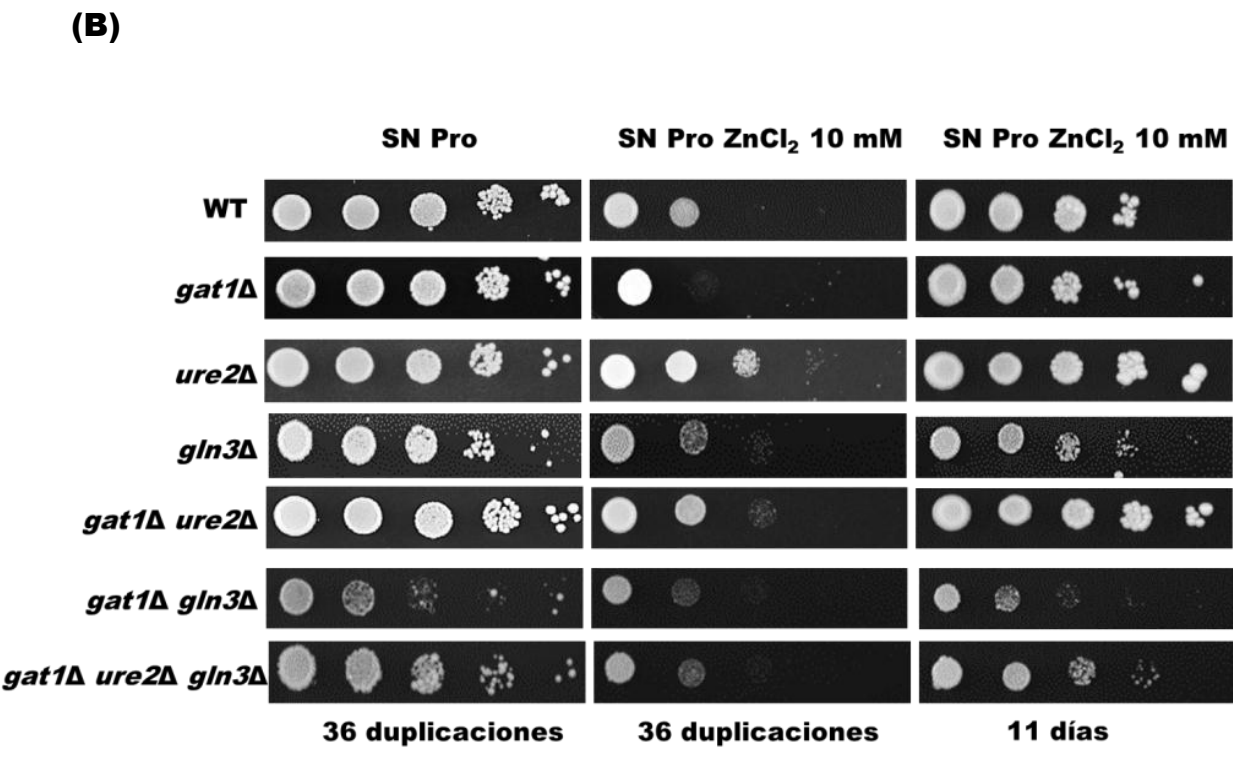
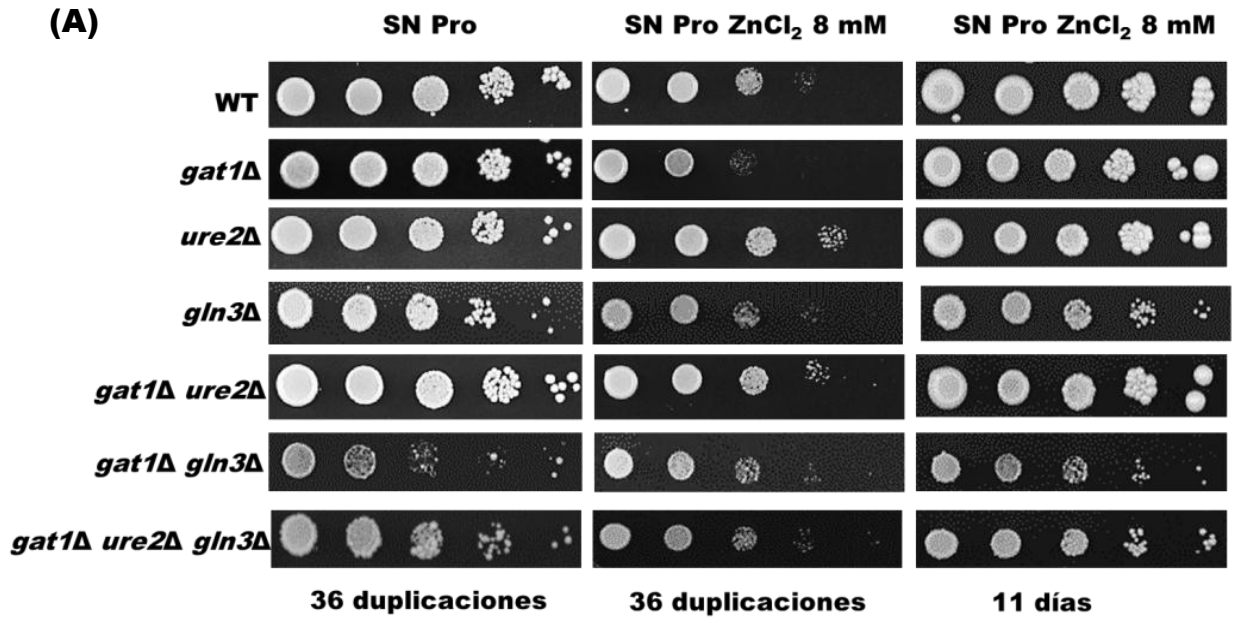
En el medio de SN prolina con 10 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones la cepa *gat1Δ* fue más sensible que la cepa silvestre y que todas las demás cepas evaluadas, logrando crecer solo hasta la primera dilución. La cepa *ure2Δ* fue más resistente que la cepa silvestre y de todas las demás cepas evaluadas, creciendo hasta la tercera dilución, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ* la cual logró crecer hasta la segunda dilución. La cepa *gln3Δ* presentó el mismo fenotipo que la cepa silvestre, creciendo solo hasta la segunda dilución. Las mutantes *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* fueron más sensibles que la cepa *gln3Δ*, pero ligeramente más resistentes que la cepa *gat1Δ*. A los 11 días, en esta condición, pudimos observar claramente el fenotipo de cada cepa. La cepa *gat1Δ* fue más sensible que la cepa silvestre. Las cepas *ure2Δ* y *gat1Δ ure2Δ* fueron las más resistentes de todas las cepas evaluadas. La cepa *gat1Δ gln3Δ* fue la cepa que presentó el fenotipo de mayor sensibilidad, seguida de las mutantes *gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ*. El fenotipo de la triple mutante a los 11 días, se observa más resistente que la cepa *gat1Δ gln3Δ*, Lo que probablemente indica, la presencia de un tercer factor implicado en ayudar a la célula a contender con esta concentración de cloruro de zinc (10 mM), y que probablemente este factor dependa de la proteína Ure2, ya que al no estar Ure2 en la cepa *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* la hace más resistente que la cepa *gat1Δ gln3Δ* (Fig. 7B).

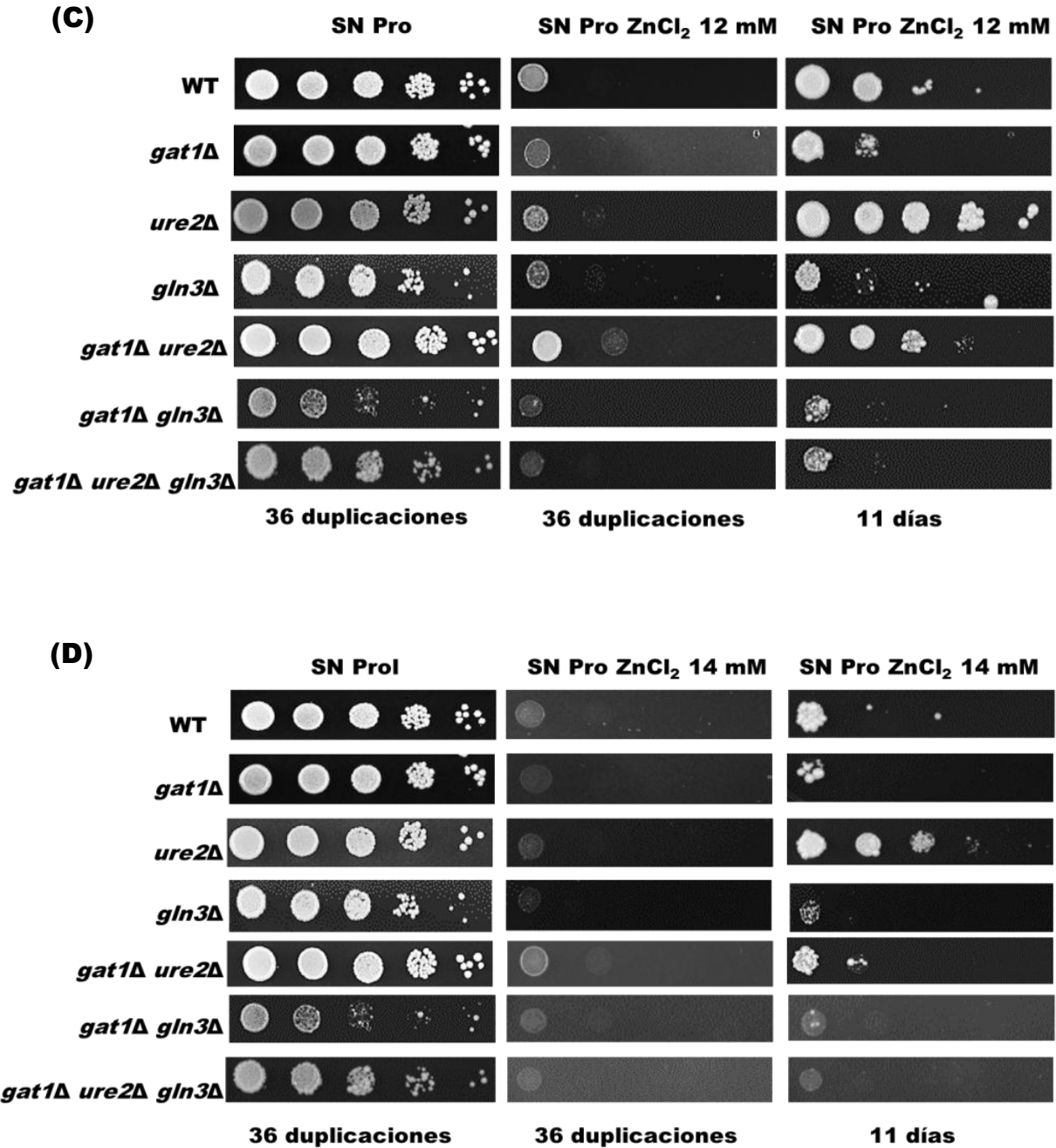
Es interesante como la cepa mutante *gat1Δ* a las 36 duplicaciones fue la cepa más sensible de todas las cepas evaluadas en 8 y 10 mM de  $ZnCl_2$ ; sin embargo, a los 11 días ya no se observó como la cepa más sensible de las cepas evaluadas. Lo que podría explicar este comportamiento, es que a estas concentraciones de cloruro de zinc, es un efecto de retraso de crecimiento de la cepa *gat1Δ*.

En el medio de SN prolina con 12 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones, solo la cepa mutante *gat1Δ ure2Δ* logró crecer hasta la primera dilución. La cepa silvestre y las mutantes *gat1Δ*, *ure2Δ*, y *gln3Δ* lograron crecer ligeramente en la primera dilución, mientras que las cepas *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ*

*ure2Δ gln3Δ* simplemente no crecieron. A los 11 días se observó que la cepa *ure2Δ* fue la más resistente de todas las cepas evaluadas, creciendo hasta la cuarta dilución, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ* que logró crecer hasta la tercera dilución. Las cepas más sensibles de todas las evaluadas fueron la *gat1Δ gln3Δ* y la *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* las cuales crecieron ligeramente solo en la primera dilución, seguidas de la cepa *gln3Δ* que sí logró un crecimiento claro en la primera dilución. Finalmente observamos que la cepa *gat1Δ* fue más sensible que la cepa silvestre pero más resistente que la cepa *gln3Δ*, logrando crecer hasta la segunda dilución (Fig. 7C).

En el medio de SN prolina con 14 mM de cloruro de zinc a las 36 duplicaciones solo se observó un ligero crecimiento en la primera dilución de la cepa *gat1Δ ure2Δ*. Las otras cepas no crecieron a esta concentración de cloruro de zinc. A los 11 días solo la mutante *ure2Δ* logra crecer hasta la tercera dilución, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ* que creció ligeramente hasta la segunda dilución. La cepa *gat1Δ* fue ligeramente más sensible que la cepa silvestre creciendo solo hasta la primera dilución. La cepa *gln3Δ* es más sensible que la cepa *gat1Δ*; sin embargo, esta concentración de cloruro de zinc fue tóxico para las cepas *gat1Δ ure2Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* ya que se observó que se inhibe el crecimiento (Fig. 7D). El fenotipo que presenta la cepa *ure2Δ*, en donde observamos el crecimiento nulo a las 36 duplicaciones, y a los 11 días crecimiento hasta la segunda dilución, se debe probablemente a que la sensibilidad aparente al metal es más acentuada cuando las células se están duplicando y tienen que contender con el metal; en cambio si la célula se mantiene un tiempo prolongado en presencia del metal, se puede observar claramente cuánto logró contender en la presencia de cloruro de zinc, para ello nosotros evaluamos el fenotipo a los 11 días de exposición de las células al cloruro de zinc.





**Figura 7. La proteína Gat1 participa en la resistencia a cloruro de zinc al crecer en una mala fuente de nitrógeno.** La primera columna (izquierda) representa el control de las cepas creciendo solo en SN prolina sin cloruro de zinc, la columna central representa las 36 duplicaciones de cada cepa creciendo en SN prolina más cloruro de zinc 8, 10, 12 ó 14 mM. La tercera columna (derecha) muestra los 11 días de crecimiento de cada cepa evaluada. **(A)** SN prolina más ZnCl<sub>2</sub> 8 mM, **(B)** SN prolina más ZnCl<sub>2</sub> 10mM, **(C)** SN prolina más ZnCl<sub>2</sub> 12 mM, **(D)** SN prolina más ZnCl<sub>2</sub> 14mM. Las cepas crecieron a 28°C en medio SN con prolina hasta alcanzar una A<sub>600</sub>=0.6, goteamos 5μl de cada dilución logarítmica en SN prolina más cloruro de zinc a las concentraciones indicadas. Incubamos las cajas a 28°C y las fotos fueron tomadas a diferentes tiempos de acuerdo al tiempo de duplicación de cada cepa.

Cuando evaluamos en el medios de glutamina y prolina la concentración de cloruro de zinc, observamos que las células fueron más resistentes a este metal en prolina que en glutamina (Figs. 6B y 7B). También pudimos observar que la cepa *ure2Δ* fue más resistente a cloruro de zinc que la cepa silvestre, independientemente de la fuente de nitrógeno evaluada.



## Discusión

### ***Crecimiento de las cepas en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno***

Caracterizamos las cepas *gat1Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* mediante curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (medio SN con glutamina y medio SN con prolina) y calculamos los tiempos de duplicación con la ecuación de la recta (Figs. S1 y S3).

En SN glutamina observamos cómo la cepa mutante *gat1Δ* presentó el mismo fenotipo que la cepa silvestre. En la cepa *gat1Δ ure2Δ*, también se observa la carencia de fenotipo de la delección del gen *GAT1*, la cual presenta el mismo tiempo de duplicación que la cepa *ure2Δ*. La carencia del fenotipo observado en la delección de *GAT1* es inexplicable; sin embargo, no se ha reportado en la literatura la participación de la proteína Gat1 con el crecimiento celular, por lo que nos lleva a pensar que probablemente podría explicar el fenotipo observado en las mutantes del gen *GAT1*.

La ausencia del gen *URE2* sí altera el tiempo de duplicación de la célula, puesto que crece 0.5 veces más lenta que la cepa silvestre. El fenotipo que presenta la cepa *ure2Δ* tanto en glutamina como en prolina, podría explicarse, si consideramos que la proteína Ure2 participa en la regulación de la progresión del ciclo celular (White *et al.*, 2009). Se sabe que mutantes en Ure2 retarda a las células en la fase G1 del ciclo celular, lo que indica que esta proteína participa también en otro proceso independiente a la función que ejerce en la regulación de genes sensibles a represión catabólica nitrogenada (White *et al.*, 2009).

Las cepas mutantes *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* presentaron el mismo fenotipo, indicando que el fenotipo observado en la cepa *gln3Δ* es epistático sobre la ausencia de los genes *URE2* y de *GAT1*. Una explicación a estos resultados, es que Gln3 participa en la regulación de la progresión del ciclo celular; pero a diferencia de Ure2, la ausencia del gen *GLN3* retarda a las células en la fase S del ciclo celular (White *et al.*, 2009). En la fase S ocurre la replicación

o síntesis del DNA, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Probablemente la proteína Gln3 esté de alguna manera interactuando con moléculas encargadas de asegurar la integridad del DNA para el correcto funcionamiento celular y por lo tanto la progresión hacia la siguiente fase del ciclo celular. También vale la pena mencionar que en mutantes en *GLN3*, se ven afectados los niveles de los genes que codifican para la NAD-glutamato deshidrogenasa y para la glutamina sintetasa cuando las células crecen en glutamina como única fuente de nitrógeno (Courchesne y Magasanik, 1988), por lo que la disminución de estas proteínas retrasa la velocidad de biosíntesis de los compuestos nitrogenados requeridos por la célula, y por lo tanto, la velocidad de crecimiento de la cepa.

En el medio de SN prolina se observa, en general, un aumento en los tiempos de duplicación de las cepas evaluadas, comparados con los tiempos de duplicación observados en glutamina. Se sabe que la prolina es una mala fuente de nitrógeno para *S. cerevisiae*. La prolina que ingresa a la célula es convertida a glutamato dentro de la mitocondria por la acción de dos enzimas que son sintetizadas en el citoplasma, la pirrolina carboxilato reductasa y la prolina oxidasa. Por lo tanto, la conversión de prolina a glutamato requiere de una serie de pasos que involucra dos compartimientos celulares y dos reacciones enzimáticas, lo que conlleva al aumento en el consumo de energía de la célula, y por lo tanto al retraso en el crecimiento celular (ter Schure *et al.*, 2000).

En SN prolina la cepa *gat1Δ* tampoco presenta fenotipo. Se ha demostrado que la falta de Gat1 no influye en la expresión, ni en la localización de Gln3 al crecer en prolina (Georis *et al.*, 2009), lo que nos lleva a pensar que Gln3 está conteniendo con su función de activador de la expresión de genes sensibles a NCR aún en ausencia de la proteína Gat1.

Por otro lado, en el mismo medio de SN prolina observamos que el tiempo de duplicación en las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* carentes del gen *GLN3* fue 1.5 veces mayor que la cepa parental; fenotipo esperado dado que Gln3 es la encargada de activar genes que se requieren para la incorporación y

degradación de este aminoácido como son, por ejemplo, *GAP1* (codifica la permeasa general de aminoácidos) y *PUT4* (permeasa de prolina). También se sabe, como previamente mencioné, que Gln3 está involucrado en la regulación de la transcripción de los genes que codifican para la NAD- glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintetasa (Courchesne *et al.*, 1988).

### ***La proteína Gat1 confiere resistencia a zinc al crecer en glutamina y prolina como fuentes de nitrógeno***

Evaluamos el efecto crónico del cloruro de zinc en la cepa silvestre CLA1 de *S. cerevisiae* y en las mutantes *gat1Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ*, al crecer en una buena fuente de nitrógeno (glutamina) o en una mala fuente de nitrógeno (prolina) con el propósito de determinar si Gat1 participa en la homeostasis de zinc en esta levadura.

Cuando se utiliza glutamina como fuente de nitrógeno, Gln3 y Gat1 se encuentran secuestradas por Ure2 en el citoplasma en este medio (Courchesne, y Magasanik., 1998); así como también se ha visto, que pequeñas cantidades de estas moléculas se encuentran en el núcleo expresándose en forma basal (Kathleen H. Cox *et al.*, 2003).

En la Figura 6 los datos demuestran que la proteína Ure2 tiene una función de regulador negativo sobre Gat1 y Gln3 al desintoxicar a la levadura del cloruro de zinc creciendo en glutamina. Esto lo podemos observar claramente en una mutante *ure2Δ*, en donde las proteínas Gat1 y Gln3 se encuentran en el núcleo, y por lo tanto logran contener con la presencia de cloruro de zinc. Es por eso que observamos que la cepa *ure2Δ* es la más resistente a cloruro de zinc de todas las cepas evaluadas.

En el medio de SN glutamina los datos muestran que la proteína Gln3 es la principal responsable de desintoxicar del zinc a la levadura, pero que se necesita de la proteína Gat1 para desempeñar eficientemente esta función (Fig. 6B a los 11

días). En cambio, Gat1 por sí sola no puede realizar la función de desintoxicar del zinc a la levadura. Esto claramente se observa en la cepa *gat1Δ*, la cual presenta el mismo fenotipo que la cepa silvestre (Fig. 6B). Sin embargo, observamos que la mutante *gat1Δ ure2Δ* es menos resistente a cloruro de zinc que la cepa *ure2Δ*, lo que indicaría que aunque se encuentre presente Gln3, la falta de Gat1 afecta la capacidad de la célula de contender con el exceso de zinc (Fig. 6C, a los 11 días). Esto podría indicarnos que, para la homeostasis del zinc, la proteína Gln3 requiere de Gat1 para poder desempeñar de manera íntegra su función. Otro resultado que corrobora la propuesta de que se requieren ambas proteínas GATA en glutamina para contender con el exceso de zinc es que la doble mutante *gat1Δ gln3Δ*, presenta un fenotipo más sensible que la cepa *gln3Δ* (Fig. 6). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las proteínas Gat1 y Gln3 actúen independientemente activando la respuesta a zinc, y que simplemente se sumen ambos efectos.

Una pregunta que nos formulamos es ¿cómo las proteínas Gat1 y Gln3 son requeridas para contender con el zinc en SN glutamina, si estas proteínas se encuentran secuestradas en el citoplasma por Ure2? Este suceso podría explicarse debido a que se ha visto que en SN glutamina pequeñas cantidades de estas moléculas (Gat1 y Gln3) se encuentran en el núcleo expresándose en forma basal (Cox *et al.*, 2003), las cuales podrían ser las responsables de contender con la presencia del cloruro de zinc en una buena fuente de nitrógeno. Esto explicaría también por qué las cepas en general son más sensibles al cloruro de zinc en glutamina que en SN prolina (condición en donde Gln3 y Gat1 se encuentran en el núcleo más activas).

La principal forma de incorporar zinc a la célula es mediante los transportadores específicos Zrt1 y Zrt2; sin embargo, Zrt1 es el principal en transportar zinc a la célula dada su alta afinidad por el metal. En *S. cerevisiae* la vacuola es el organelo donde más zinc se acumula, por lo que resulta el mecanismo de desintoxicación principal de la célula cuando las concentraciones citoplásmicas de zinc se encuentran elevadas. Sólo se han identificado tres

transportadores vacuolares de zinc: Zrc1, Zrt3 y Cot1 (Eide, 2006). Se ha reportado que la sobreexpresión de *ZRC1* y *COT1* incrementa la resistencia de las células a la presencia del metal (MacDiarmid *et al.*, 2003).

Con la finalidad de conocer si los transportadores de zinc podrían estar regulados por los factores transcripciones tipo GATA, en el laboratorio se buscaron los posibles sitios de unión de Gln3 y Gat1 para los promotores de los genes que codifican para los transportadores de zinc. Aunque el hecho de tener varias cajas GATA (GATAAG) en la región promotora no implica que dicho gen estaría regulado por Gln3 y Gat1, pero si podríamos sugerir que los genes que codifican para los transportadores de Zrt1 y Zrc1 pudieran ser blancos de algún factor GATA. Dado que *ZRT1* presenta 4 secuencias GATA en su región promotora y *ZRC1* solo tiene dos, consideramos que Gat1 y Gln3 podría unirse con mayor afinidad al promotor de *ZRT1*. Por lo que, en una buena fuente de nitrógeno, las pocas moléculas que están dentro del núcleo podrían estar reprimiendo directamente a *ZRT1* (codifica para el transportador membranal Zrt1) y por lo tanto disminuyendo considerablemente la entrada del zinc a la célula. Aunque esta posibilidad suena interesante, creemos que es poco probable dado que nunca se ha observado que Gln3 trabaje como un represor de genes. Otra posibilidad que sugerimos es que Gat1 y Gln3 podrían estar activando la transcripción de *ZRC1* (codifica para el transportador vacuolar Zrc1) de una forma directa o tal vez indirecta, activando a un gen que a su vez active la transcripción del gen *ZRC1* y por lo tanto el zinc se transportaría a vacuola desintoxicando a la célula del metal. Para que los factores GATA activadores o represores involucrados en el metabolismo del nitrógeno se unan directamente a los promotores de los genes blanco, estos deben contar con más de dos cajas GATA (Bysani *et al.*, 1991). El gen *ZRC1* presenta dos cajas GATA en sus regiones promotoras, es por eso que nos lleva a pensar que Gln3 y Gat1 podría estar interactuando directamente con este gen.

Dada la participación de Gln3 y Gat1 para la resistencia a zinc cuando las células crecen en una buena fuente de nitrógeno, suponemos que estos factores

en presencia de zinc se relocalizan en el núcleo para tolerar con la presencia del metal. Existen datos en la literatura en donde han demostrado que las células al crecer en prolina como fuente de nitrógeno y en condiciones de estrés como temperatura y pH, Gln3 y Gat1 se relocalizan al citoplasma y ejercen su función de contender con la condición de estrés (Tate y Cooper, 2007). Esto es contradictorio a lo que nosotros suponemos que pasa; sin embargo, es importante considerar que existe la posibilidad de que Gln3 y Gat1 pueden ser relocalizadas en presencia de un estrés. Es indispensable conocer si la presencia de zinc relocaliza a las proteínas Gln3 y Gat1 al núcleo donde estarían ejerciendo su función. Para esto, en el laboratorio ya se cuenta con las fusiones traduccionales de *GLN3-GFP* y *GAT1-GFP* lo que permitirá conocer si en presencia de una buena fuente de nitrógeno más cloruro de zinc, ambas proteínas se localizan en el núcleo.

Cuando se utiliza la prolina como fuente de nitrógeno, las proteínas Gat1 y Gln3 se encuentran en núcleo y transcriben sus genes blanco que codifican para permeasas y enzimas catabólicas de malas fuentes de nitrógeno (Courchesne y Magasanik, 1998).

En el medio de SN prolina observamos nuevamente que tanto Gat1 como Gln3 participan en la desintoxicación de zinc en esta condición, siendo la proteína Gln3 la encargada de desempeñar el papel más importante. La contribución de Gat1 en la homeostasis del zinc se observa en la mutante *gat1Δ ure2Δ* la cual es ligeramente menos resistente a cloruro de zinc que la cepa *ure2Δ*. Otro resultado que apoya la observación de que Gat1 tiene un papel en la desintoxicación de zinc, aunque de manera menos importante que Gln3, es que por resultados obtenidos en nuestro laboratorio sabemos que la cepa *ure2Δ gln3Δ* es más sensible que la cepa *ure2Δ gat1Δ* (Peresson Rivera *et al*, datos no publicados). Finalmente, la participación de ambas proteínas en la desintoxicación a zinc es evidente dado que la cepa *gat1Δ gln3Δ*, es más sensible que las mutantes sencillas en *gat1Δ* y en *gln3Δ* (Fig. 7C, ver a los 11 días). Este fenotipo era de esperarse dado que la ausencia de las dos proteínas altera drásticamente el crecimiento de esta cepa en presencia de zinc.

Probablemente en el medio de SN prolina más cloruro de zinc, las proteínas Gln3 y Gat1 están participando en la homeostasis del zinc de la siguiente manera: Gln3 y Gat1 presentes en núcleo reprimen la expresión del gen *ZRT1* (introduce zinc a la célula) y activan indirectamente la expresión del gen *ZRC1* (transporta zinc a la vacuola). Sin embargo, Gln3 es considerado como el mayor represor para *ZRT1* o activador de *ZRC1*. Nuestros datos concuerdan con evidencia previa en donde encontraron, que en una doble mutante *gln3Δ gat1Δ*, el gen *ZRT1* se expresó en mayor grado que en una cepa silvestre, al crecer a las células en prolina. En cambio, en glutamina, 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 *ZRT1* estaban disminuidos en comparación con la cepa silvestre, al crecer en glutamina como fuente de nitrógeno (Scherens *et al.*, 2006).

Una observación importante en los resultados en el medio de SN prolina más cloruro de zinc, es que la cepa *ure2Δ* es más resistente que las demás cepas evaluadas. Una pregunta que surge de esta observación es, si en la cepa silvestre creciendo en prolina, Gat1 y Gln3 se encuentran activas en el núcleo y no retenidas por Ure2 en el citoplasma ¿por qué una mutante *ure2Δ* es más resistente a zinc, si la proteína Ure2 en esta condición ya no estaría reteniendo a Gat1 y a Gln3 en el citoplasma? De acuerdo a lo que observamos con nuestros resultados, podemos proponer la presencia de un tercer elemento que es liberado en ausencia de Ure2 y que está ayudando a Gat1 y Gln3 a contender con la presencia de cloruro de zinc.

## Conclusiones

- En el medio de SN glutamina y en el medio de SN prolina la cepa mutante *gat1Δ* presenta el mismo fenotipo de crecimiento que la cepa silvestre.
- *Ure2* actúa como regulador negativo en la resistencia a zinc independientemente de la fuente de nitrógeno.
- En el medio de SN glutamina *Gln3* es el responsable de desintoxicar del zinc a la levadura, pero necesita de la proteína *Gat1* para desempeñar eficientemente esta función, o bien que la proteína *Gat1* actúa independientemente de *Gln3* para desintoxicar del zinc a la célula.
- En el medio de SN prolina tanto *Gat1* como *Gln3* participan en la desintoxicación de zinc en esta condición, pero la proteína *Gln3* es la encargada de desempeñar el papel más importante.



## Perspectivas

- Evaluar la expresión de los transportadores de zinc (como Zrt1, Zrt2, Zrc1, Cot1, Zrt3) en medio mínimo con glutamina o con prolina en las cepas *gat1Δ*, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ*, *gat1Δ ure2Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ*.
- Realizar los ensayos de localización de las proteínas Gat1 y Gln3, para poder observar la ubicación de estas proteínas conteniendo con el exceso de zinc. Se evaluará en una buena fuente de nitrógeno, como en una mala fuente de nitrógeno.

Datos suplementarios

Curva de crecimiento SN glutamina

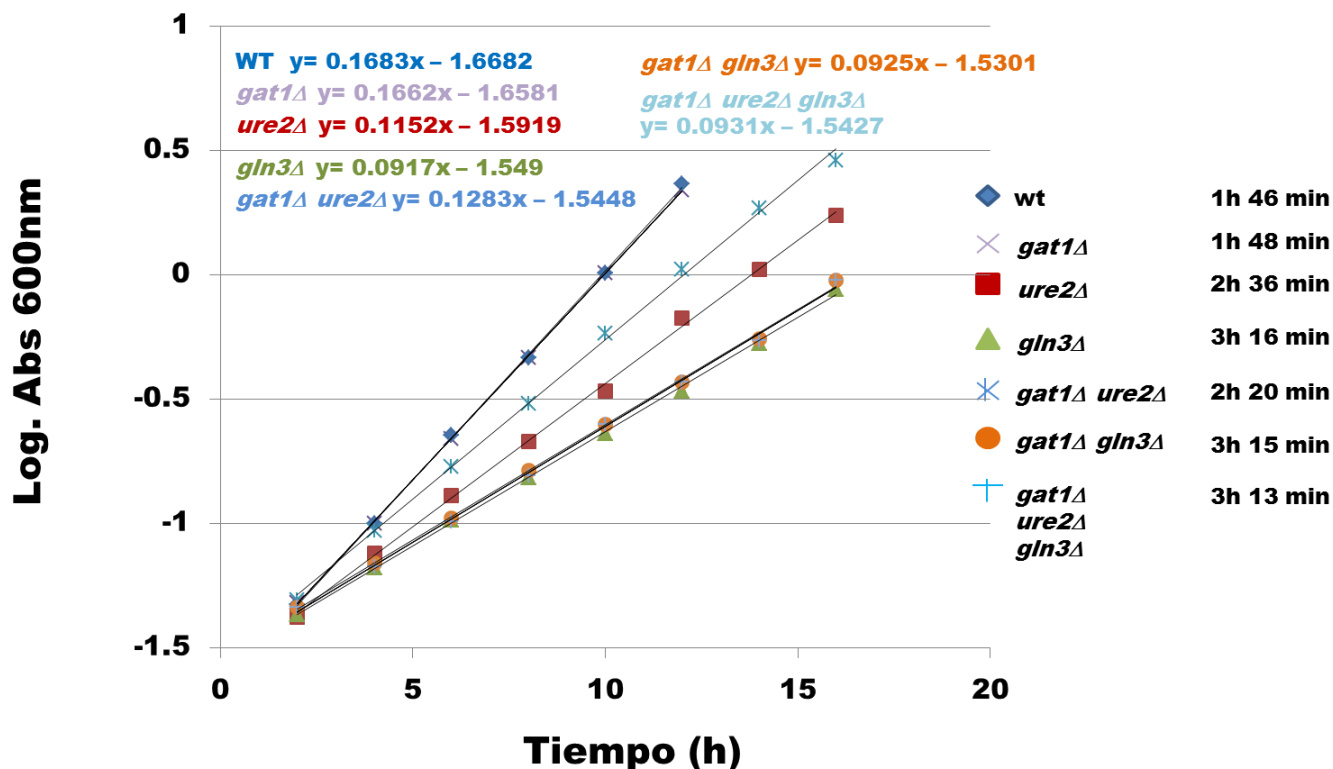
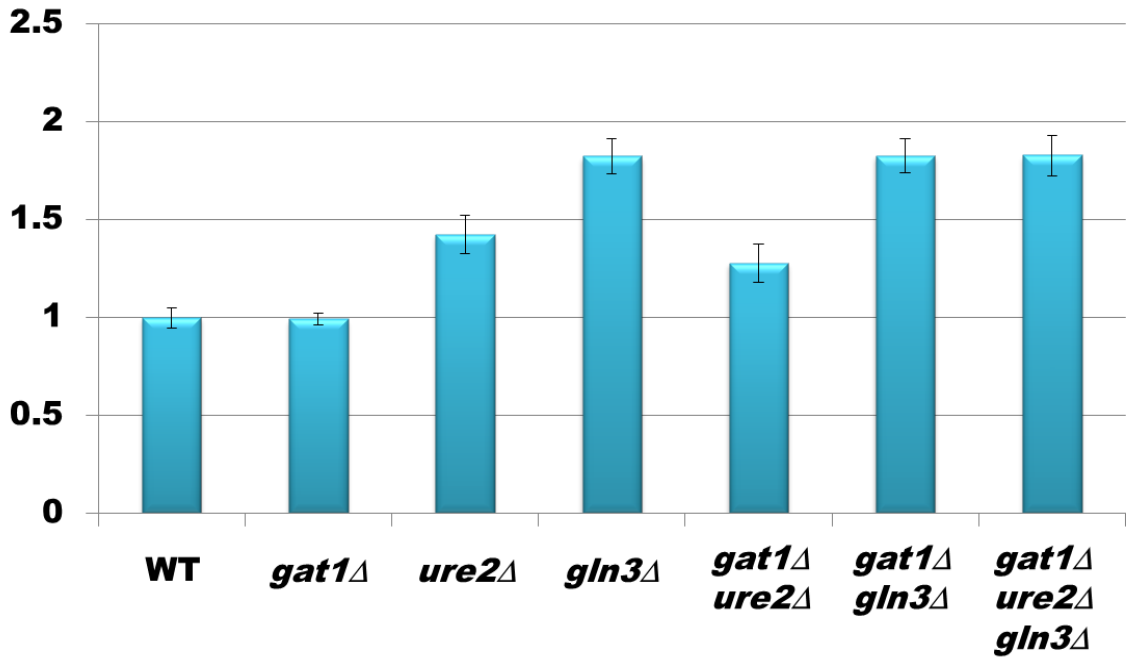


Figura S1. Curva de crecimiento de las cepas en medio SN glutamina. Los tiempos de duplicación fueron calculados a partir de la ecuación de la recta. En las gráficas se muestran las ecuaciones de las rectas de cada una de las mutantes y los tiempos de duplicación (derecha). La cepa *gat1Δ* no presenta un fenotipo diferente a la cepa silvestre. La cepa *gat1Δ ure2Δ* presenta un fenotipo intermedio entre la cepa *ure2Δ* y la cepa silvestre. Las cepas *gln3Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* presentan el mismo fenotipo. El código de colores representa la cepa en estudio.

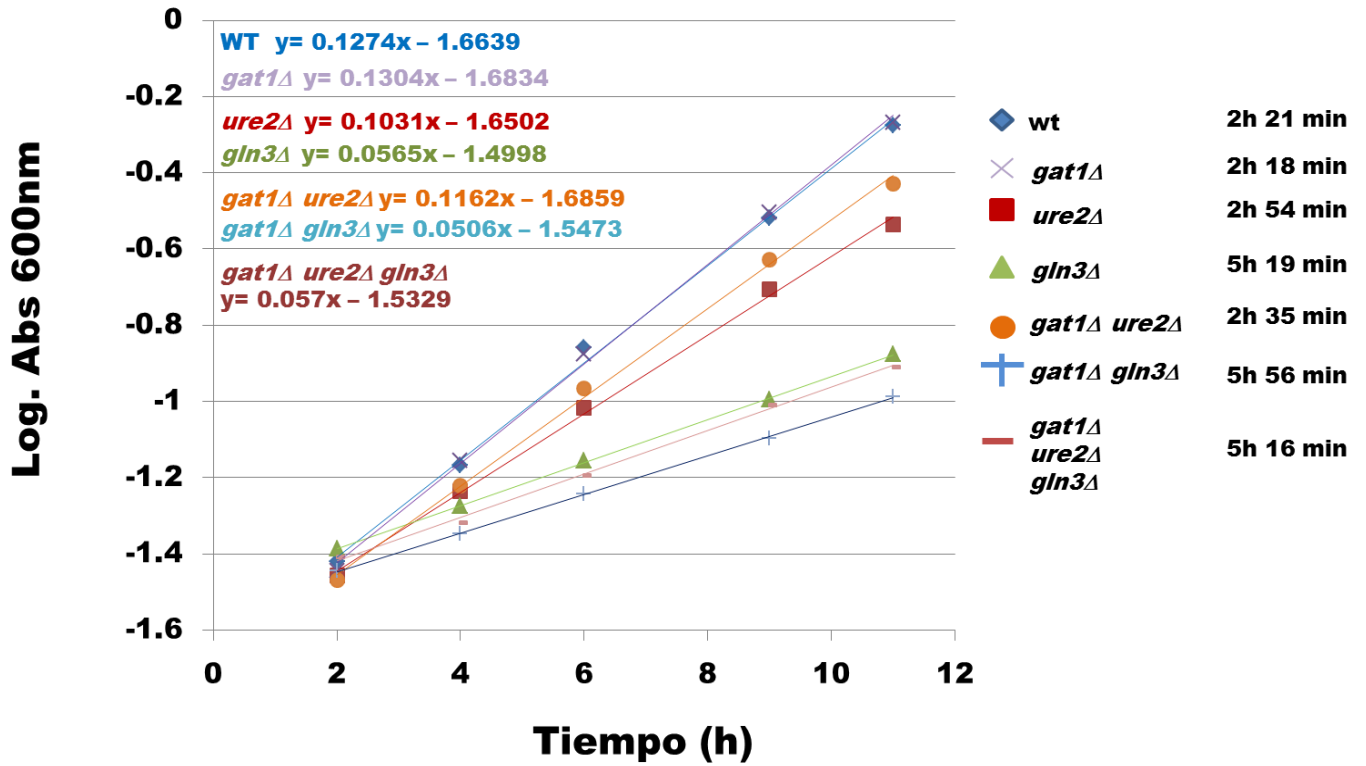
Tiempo de duplicación relativo a la WT

### Medio SN glutamina



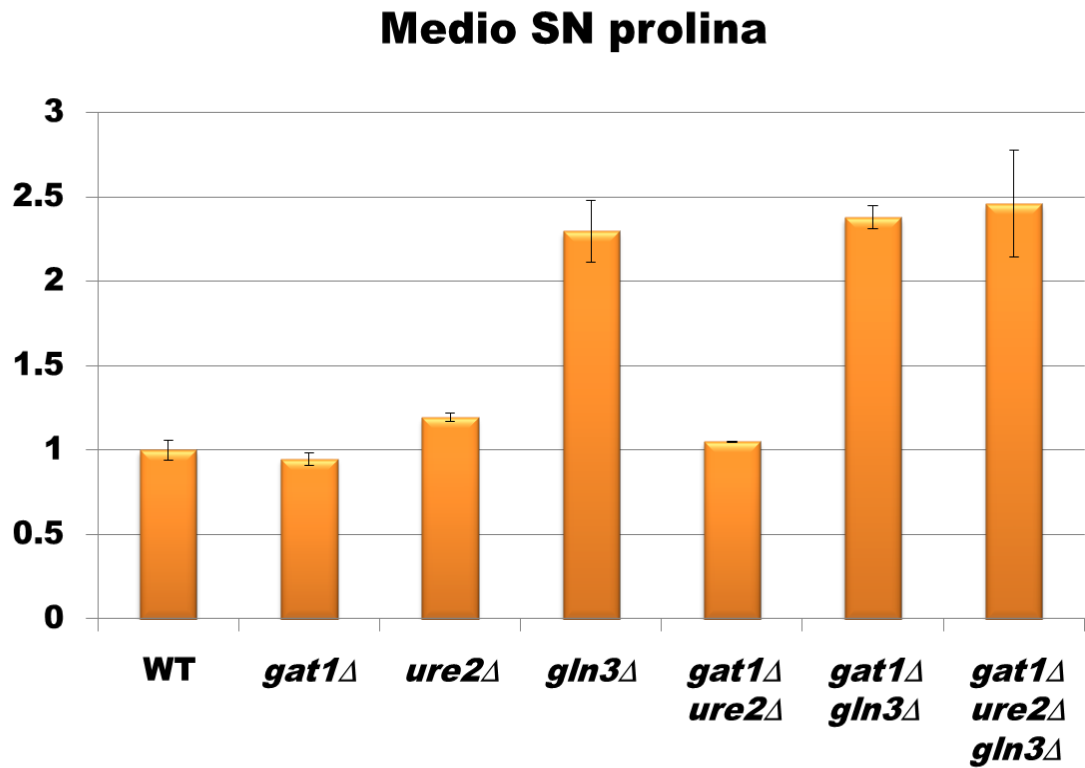
**Figura S2. Tiempos de duplicación de las cepas creciendo en medio SN glutamina relativos a la cepa silvestre.** En el eje de las Y se observan los tiempos de duplicación en unidades, tomando como una unidad a la cepa silvestre. En el eje de las X se muestran las cepas evaluadas. La cepa *gat1*Δ presenta el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre. Las cepas *ure2*Δ y *gat1*Δ *ure2*Δ son .4 veces más lentas que la cepa silvestre. El tiempo de duplicación de las cepas *gln3*Δ, *gat1*Δ *gln3*Δ y *gat1*Δ *ure2*Δ *gln3*Δ relativo a la cepa silvestre, es aproximadamente 0.8 veces más lento que la cepa silvestre.

## Curva de crecimiento SN prolina



**Figura S3. Curva de crecimiento de las cepas en medio SN prolina.** Los tiempos de duplicación fueron calculados a partir de la ecuación de la recta. En las gráficas se muestran las ecuaciones de las rectas de cada una de las mutantes y los tiempos de duplicación (derecha). La cepa *gat1Δ* no presenta fenotipo diferente a la cepa silvestre. La cepa *gat1Δ ure2Δ* presenta un fenotipo intermedio entre la cepa *ure2Δ* y la cepa silvestre. Las cepa *gat1Δ gln3Δ* es la cepa más lenta de todas las cepas evaluadas, seguida de la cepa *gat1Δ ure2Δ gln3Δ* y por último la cepa *gln3Δ*. El código de colores representa la cepa en estudio.

Tiempo de duplicación relativo a la WT



**Figura S4. Tiempos de duplicación de las cepas creciendo en medio SN prolina relativos a la cepa silvestre.** En el eje de las Y se observan los tiempos de duplicación en unidades, tomando como una unidad a la cepa silvestre. En el eje de las X se muestran las cepas evaluadas. La cepa *gat1*Δ presenta el mismo tiempo de duplicación que la cepa silvestre. La cepa *ure2*Δ es 0.3 veces más lenta que la cepa silvestre. Las cepas *gln3*Δ, *gat1*Δ *gln3*Δ y *gat1*Δ *ure2*Δ *gln3*Δ son alrededor de 1.3 a 1.5 veces más lentas que la cepa silvestre.

**Tabla S1.** Cepas utilizadas en este estudio.

**Cepas utilizadas**

CEPA	GENOTIPO RELEVANTE	REFERENCIA
Parental	CLA MAT $\alpha$ <i>ura3-1 leu2-3</i>	(Avendaño <i>et al.</i> , 1997)
<i>gat1</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>gat1</i> $\Delta$ :: <i>hph ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo
<i>ure2</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>ure2</i> $\Delta$ :: <i>nat ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo
<i>gln3</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>ure2</i> $\Delta$ :: <i>nat ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo
<i>gat1</i> $\Delta$ <i>ure2</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>gat1</i> $\Delta$ :: <i>hph ure2</i> $\Delta$ :: <i>kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo
<i>gat1</i> $\Delta$ <i>gln3</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>gat1</i> $\Delta$ :: <i>hph gln3</i> $\Delta$ :: <i>kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo
<i>gat1</i> $\Delta$ <i>gln3</i> $\Delta$ <i>ure2</i> $\Delta$	CLA MAT $\alpha$ <i>gat1</i> $\Delta$ :: <i>hph gln3</i> $\Delta$ :: <i>nat ure2</i> $\Delta$ :: <i>kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Este trabajo

**Tabla S2.** Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

NÚMERO	SECUENCIA	COORDENADAS	NOMBRE	USO
#49	5'ATATATATAGGTGTGTGCCACTCCCGGCCCGGTAT TAGC3' 5'GGATCCGAAGTTCCTATAC 3'	-40 A -1 -612 A -593	GAT1 HPH REC FW	Oligonucleótido de recombinación para la construcción del módulo de recombinación
#50	5'GTATATATATATGAAGCGGACATGGAAAGAAGCG AGTACT3' 5'AAGCTTGAAGTTCCTATTCT 3'	+1587 A +1547 +1501A+1481	GAT1 HPH REC RV	Oligonucleótido de recombinación. Construcción del módulo de recombinación
#37	5'TCATTGCGTCCGACCACAG3'	-186 A -205	GAT1 FW VC11	Construcción del módulo de recombinación
#57	5'GTCACATGGAAGCATAACGC3'	+1722 A +1702	GAT1 REV AMP MOD REV	Construcción del módulo de recombinación
#58	5'TTACGGTGTCTCACACAACCC3'	-451 A -429	GAT1 FW VC20 EXT	usado para verificar la interrupción del gen <i>GAT1</i> por el marcador <i>hph</i>
#59	5'CTTACTGAGCTTCTAGTGACGT3'	+1873 A +1851	GAT1 REV VC21 EXT	usado para verificar la interrupción del gen <i>GAT1</i> por el marcador <i>hph</i>
#68	5'CAATATGGTCGACCGGGTAAACC3'	-679 A -656	GAT1 FW EXT-ABV	usado para verificar la interrupción del gen <i>GAT1</i> por el marcador <i>hph</i>
#69	5'CATTGTTCTGACTCGCGGCTTCC3'	+1967 A +1944	GAT1 REV EXT-ABV	usado para verificar la interrupción del gen <i>GAT1</i> por el marcador <i>hph</i>
#25	5'GAACACCTCATCCAATCCG3'	896 A 915	GAT1 FW RT20	para verificar la ausencia del orf Gat1
#26	5'GTTTATCTTGGTAGACGACC3'	1092 A 1072	GAT1 FW RT21	para verificar la ausencia del orf Gat1

NÚMERO	SECUENCIA	COORDENADAS	NOMBRE	USO
#47	5'AGAAATACGCACGAACACGATATAGAGG3'	1402 A 1430	HPH FW VC17 OUT	para verificar la presencia del casete <i>hph</i>
#48	5'CGATAAGAGGCCACGTGCTTTATG3'	539 A 563	HPH RV VC18 OUT	para verificar la presencia del casete <i>hph</i>
#27	5'GAATACCGACTGTTGTCTGG3'	-373 A -353	URE2 FW VC1	Construcción del módulo de recombinación
#28	5'TGGAATTCTGTGGTTGGG3'	+1245 A +1227	URE2 RV VC2	Construcción del módulo de recombinación
#74	5'GATCGAGGTGTGCACTACATGC3'	-590 A -568	URE2-FW-EXT	usado para verificar la interrupción del gen <i>URE2</i> por el marcador <i>KanMx</i> ó <i>NatMx</i>
#75	5'CCATCGTGGCAAATGCCGAG3'	+1376 A +1356	URE2-RW-EXT	usado para verificar la interrupción del gen <i>URE2</i> por el marcador <i>KanMx</i> ó <i>NatMx</i>
#13	5'TAGAGAAGCGCTGGTGATGG3'	794 A 814	URE2 FW RT4	para verificar de la ausencia del orf <i>URE2</i>
#14	5'CCACGCAATGCCTTGATG3'	1055 A 1037	URE2 RV 4981	para verificar de la ausencia del orf <i>URE2</i>
#35	5'TGATTTTGATGACGAGCGTAAT3'	482 A 504	KANMX FW VC9	para verificar la presencia del casete <i>KanMx</i>
#36	5'CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT3'	-173 A -193	KANMX RV VC10	para verificar la presencia del casete <i>KanMX</i>
#66	5'AGATCTGTTTAGCTTGCCTCG3'	-389 A -368	AMP MOD-NAT FW	Construcción del módulo de recombinación
#67	5'TTTTCGACACTGGATGGC3'	+815 A +797	AMP MOD-NAT RV	Construcción del módulo de recombinación



NÚMERO	SECUENCIA	COORDENADAS	NOMBRE	USO
#55	<b>5'GAGGTCACCAACGTCAACGC3'</b>	<b>429 A 448</b>	<b>NAT-MT-FW1</b>	para verificar la presencia del casete NatMx
#54	<b>5'TAAGCCGTGTCGTCAAGAGTGG 3'</b>	<b>26 A 4</b>	<b>NAT-MT-RV1</b>	para verificar la presencia del casete NatMx
#31	<b>5'GTACTCTATCTCTACCTGG3'</b>	<b>-263 A -247</b>	<b>GLN3 FW VC5</b>	usado para verificar la interrupción del gen <i>GLN3</i> por el marcador <i>NatMx</i> o <i>KanMX</i>
#56	<b>5'AACAGCCAGTGTTCAATGC3'</b>	<b>+2370 A +2351</b>	<b>GLN3 AMP MOD RV</b>	usado para verificar la interrupción del gen <i>GLN3</i> por el marcador <i>NatMx</i> o <i>KanMX</i>
#70	<b>5'CCAGGTGGCCACTACAGATGAAAG3'</b>	<b>-769 A -747</b>	<b>FW-GLN3-B5</b>	usado para verificación
#71	<b>5' GCCATCCATATGCGTCAATCGC 3'</b>	<b>+2799 A +2777</b>	<b>RV-GLN3-B5</b>	usado para verificación
#11	<b>5'AACTGGTGACAGTAGGAGCC3'</b>	<b>86 A 106</b>	<b>GLN3 FW RT10</b>	para verificar de la ausencia del orf <i>GLN3</i>
#12	<b>5'GTGTCCTTGACCGTCTTAGTAG3'</b>	<b>284 A 262</b>	<b>GLN3 RV RT11</b>	para verificar de la ausencia del orf <i>GLN3</i>

- Las secuencias en negritas hibridan en el marcador de resistencia a higromicina.
- Se muestran las coordenadas en donde hibridan los oligonucleótidos. La numeración inicia a partir del ATG del marco de lectura abierta del gen en estudio. El signo negativo representa las coordenadas río arriba partiendo del ATG. El signo positivo representa las coordenadas río abajo partiendo del ATG, en cuanto a la numeración que no contiene signo, indica que las coordenadas se encuentran dentro del marco de lectura abierta del gen en cuestión.

## Referencias

- Andreini, C., L. Banci, I. Bertini, and A. Rosato. 2006. Counting the zinc proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* 5:196–201.
- André, B., D. Talibi, S. Soussi-Boudekou, C. Hein, S. Vissers, and D. Coornaert. 1995. Two mutually exclusive regulatory systems inhibit UAS-GATA, a cluster of 5-GAT(A/T)A-3 upstream from the *UGA4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23:558–564.
- Bird, A.J. Blankman E, Stillman DJ, Eide DJ and Winge DR. 2004. The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in *ZRT2*. *The EMBO journal.* 23(5):1123-1132.
- Cai, L., X. K. Li, Y. Song, and M. G. Cherian. 2005. Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr. Med. Chem.* 12:2753–2763.
- Coffman, J A, Berry, H.M. and Cooper, T. G. 1994. The Ure2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bact.* 176(24):7476-7483.
- Coffman, J.A., R. Rai, D.M. Loprete, T. Cunningham, V. Svetlov, and Cooper T. G. 1997. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bact.* 179(11):3416-3429.
- Coffman J.A., R. Rai, and Cooper, T. G. 1995. Genetic Evidence for Gln3p-Independent, Nitrogen Catabolite Repression-Sensitive Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bact.* 177(23):6910-6918.
- Cooper, T. G. 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(3):223-238.
- Courchesne, W.E. and Magasanik, B. 1988. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J Bact.* 170(2):708-713.
- Cox KH, Pinchak AB and Cooper T. G. 1999. Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast.* 15:703-713.
- Cox K. H., A. Kulkarni, J. J. Tate, and Cooper T. G. 2004. Gln3 phosphorylation and intracellular localization in nutrient limitation and starvation differ from those generated by rapamycin inhibition of Tor1/2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC.* 279:10270-10278.

- Cunningham, T.S. and Cooper, T. G. 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* DAL80 repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URSGATA). *J Bact.* 175(18):5851-5861.
- Cunningham, T.S. and Cooper, T. G. 1991. Expression of the DAL80 gene, whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. *MCB.*11(12):6205-6215.
- Domergue, R, Castaño I, De las Peñas A, Zupancic M, Lockatell, V, Hebel J.R, Johnson, and D. Cormack, B.P. 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *candida* adhesins during UTI. *Science.* 2005. 308 (5723):866-870
- Eide, D. J. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta.*1763:711–722.
- Georis, I., André Feller, Fabienne Vierendeels, and Evelyne Dubois. 2009. The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *MCB.* 29(13):3803-3815.
- Gietz, D, Jean A ST, Woods R A and SchiestL R H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids res.* 20(6):1425.
- Gitan RS, Shababi M, Kramer M, Eide DJ. 2003. A cytosolic domain of the yeast Zrt1 zinc transporter is required for its post-translation inactivation in response to zinc and cadmium. *JBC.* 278: 39558-39564.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, Van Helden J and André B. 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *MCB.* 27(8):3065-3086.
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:1541-1553.
- Jensen, L.T., Ajuja-Alemanji, M. and Culotta, V.C. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *JBC.* 278(43):42036-42040.
- Large P.J. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* 2:1-34.

- Lyons, T J, Gasch A P, Gaither L A, Botstein D, Brown P O and Eide D J. 2000. Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *PNAS*. 97(14):7957-7962.
- MacDiarmid, C.W., L.A. Gaither, and D. Eide. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*. 19:2845-2855.
- MacDiarmid, Colin W., Milanick M. and Eide, D. J. 2003. Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *JBC*. 278(17):15065-15072.
- Outten, C. E., and T. V. O'Halloran. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*. 292:2488–2492.
- Rai R, and Cooper T. G. 2005. *In vivo* specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 22:343-358
- Rowen, D.W., Esiobu, N. and Magasanik, B. 1997. Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 179(11):3761-3766.
- Scherens B, Feller A, Vierendeel F, Messenguy F and 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(5):777-791.
- Tate J. J., and Cooper, T. G. 2007. Stress-responsive Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* is separable from and can overwhelm nitrogen source regulation. *JBC*. 282:18467-18480.
- TerSchure EG, Van Riel and Verrips CT. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 24:67-83.
- Sosa E, Aranda C, Riego L, Valenzuela L, De Luna A, Cantú J, González A. 2003. Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *BBRC*. 310:1717-1180.
- Stanbrough, M. and Magasanik, B. 1995. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 177(1):94-102.

- Stanbrough, M., Rowen, D.W. and Magasanik, B. 1995. Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *PNAS*. 92(21): 9450-9454.
- Svetlov, V.V. and Cooper, T. G. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80p and Deh1p can form homo- and heterodimeric complexes. *J.Bact.* 180(21):5682-5688.
- Valenzuela L, Aranda C and González A. 2001. TOR modulates *GCN4* dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J.Bact.* 183:2331-2334
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10:1793–1808.
- Waters, B.M. and Eide, D. J. 2002. Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *JBC*. 277(37):33749-33757.
- White, M. A, Riles, L. and Cohen, B. A, 2009. A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics*. 181(2):435-446.