



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL: SU PAPEL EN LA DIVERSIFICACIÓN  
FUNCIONAL DE LOS PARÁLOGOS *BAT1* Y *BAT2***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA:**

**JAMES ENRIQUE GONZÁLEZ FLORES**

Tutora: **Dra. Alicia González Manjarrez.**

Instituto de Fisiología Celular. UNAM

Miembros del comité tutor:

Dra. Viviana Valadez Graham, Instituto de Biotecnología. UNAM

Dra. Gloria Soberón Chávez, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

MÉXICO, CDMX., 11 DE DICIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL: SU PAPEL EN LA DIVERSIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS PARÁLOGOS *BAT1* Y *BAT2***

## **RECONOCIMIENTOS**

El trabajo de esta tesis doctoral se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Tutora principal: Dra. Alicia González Manjarrez                      Instituto de Fisiología Celular UNAM

Dra. Viviana Valadez Graham    Instituto de Biotecnología UNAM

Dra. Gloria Soberón Chávez    Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Se reconoce el apoyo técnico otorgados por la Q.F.B. Beatriz Aguirre López. Asimismo, se reconoce la asistencia secretarial de Rocío Romualdo M., a lo largo de todo este trabajo doctoral.

Se reconoce a la Dra. Laura Ongay-Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta por el préstamo de servicios y la asesoría constante en el uso de los equipos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), donativo CB-2014-239492; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo 201015.

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT, número de becario: 326475

Además, el alumno fue beneficiado con las siguientes Becas:

-Beca Mixta de Movilidad en el extranjero otorgada por el CONACyT (Viena, Austria 13.01.13 - 130713; Roma, Italia 01.05.15 -30.05.16).

-Beca de Movilidad Internacional México-Italia 01.05.15 -30.05.16, número de proyecto: MX14MO08.

Se reconoce la ayuda del “Posgrado en Ciencias Bioquímicas” y “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP), por el apoyo brindado para asistir a congresos donde se presentaron los resultados de este trabajo.

El jurado de examen doctoral fue integrado por los siguientes doctores:

**Presidente:** Guadalupe Elda Espín Ocampo Instituto de Biotecnología, UNAM.

**Secretario:** Bertha María Josefina González Pedrajo Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

**Vocal:** Lina Raquel Riego Ruiz Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

**Vocal:** Jorge Luis Folch Mallol Centro de Investigación en Biotecnología, UACM.

**Vocal:** Roberto Hernández Fernández Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

***Lo más importante es no dejar de interrogarse. La curiosidad tiene su propia razón de existir. Uno no puede evitar asombrarse cuando contempla los misterios de la eternidad, de la vida, de la maravillosa estructura de la realidad. Es suficiente si uno trata simplemente de comprender un poco de este misterio cada día. No hay que perder jamás la sagrada curiosidad.***

**Albert Einstein**

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la razón que me impulsa a tratar de entender la realidad de la vida en este bello universo.
- ❖ A mi madre y padre que me dieron la vida y su amor. A mi hermano por su cariño y compañía. A mi abuela Elena por su amor y apoyo infinito. El amor de mi familia y sus enseñanzas formaron una parte muy importante en mi personalidad.
- ❖ A Nallely por su amor y compañía a lo largo de todo este trabajo. Gracias por tu confianza y todo tu apoyo, sin ello hubiera sido difícil terminar este gran logro.
- ❖ A mi mentora Alicia González por mostrarme que la investigación científica se ejerce con dedicación, honestidad y tenacidad. Trabajar a su lado fue una gran aventura llena de enseñanzas que me permitieron crecer académicamente. Su apoyo me permitió hacer una maravillosa estancia en el laboratorio del Dr. Joseph Strauss, que sin duda, repercutió en mi formación científica. Durante mi doctorado tuvimos muchas discusiones enriquecedoras, pero una de las más significativas fue el 29 de enero de 2016 después de la feria de carteles del IFC, esa tarde discutimos y replanteamos una nueva hipótesis sobre el mecanismo regulatorio de Leu3 y su papel como “represor”. Ese día entendimos y ensamblamos una pieza clave en esta investigación. Gracias por su cariño y todo el apoyo constante.
- ❖ A Lina Riego por su cariño y confianza. Gracias por todo el apoyo que me brindaste para finalizar este trabajo.
- ❖ A mis colaboradores y amigos; Geovani, Stefy, Ximena, Carlos y Eréndira por su amistad y compañerismo durante el doctorado. Al buen Dariel por su compañerismo y apoyo en los NuSAs de *K. lactis* y *L. kluyveri*. Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de mis colaboradores y amigos, su participación en los experimentos fue fundamental para comprobar y llevar al límite esta investigación.
- ❖ A los miembros de mi comité tutor Gloria Soberón y Viviana Valadez por sus críticas constructivas a lo largo de esta investigación.

- ❖ A Rocío por su amistad, y su apoyo tan eficiente con los alumnos y los seminarios de investigación. Tu ayuda incondicional permitió que mi estancia en laboratorio fuera muy agradable.
  
- ❖ A Beatriz por su amistad y su gran apoyo en el laboratorio para que todo marche bien. Tu conocimiento en el mundo de las proteínas nos ha permitido llevar a cabo una mejor investigación en las BATS.
  
- ❖ A Estefany, Angélica, Jaqueline y Elena por sus buenos deseos, charlas amenas y risas. Gracias por sus porras chicas!
  
- ❖ A mis amigos del colegio invisible, gracias por sus pláticas enriquecedoras y sus buenos consejos.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	12
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVO GENERAL .....	22
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5. RESULTADOS .....	32
6. DISCUSIÓN.....	50
7. CONCLUSIONES.....	54
8. PERSPECTIVAS.....	56
9. INVESTIGACIONES REALIZADAS EN PARALELO A ESTA TESIS.....	58
10. REFERENCIAS.....	60
11. APÉNDICE.....	66
12. ANEXO.....	72
13. PUBLICACIONES.....	96

## RESUMEN

La función de Bat1 en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina (VIL) se induce en una fuente primaria de nitrógeno, como la glutamina (Gln), mediante la activación transcripcional del gen *BAT1* por los activadores Gcn4 y Leu3 unido al metabolito  $\alpha$ -IPM (Leu3- $\alpha$ -IPM). *BAT1* se reprime por VIL a través de la inhibición de la síntesis de  $\alpha$ -IPM. La represión de *BAT1* también requiere del factor Put3 que impide que opere una vía alternativa para la síntesis de  $\alpha$ -IPM, que se produce a través del catabolismo de leucina. La función catabólica de Bat2 en VIL depende de la activación transcripcional del gen *BAT2* por los activadores Gln3 y Put3. La represión de *BAT2* en Gln requiere de la inactivación de Gln3 por Ure2; sin embargo, Leu3 también se requiere para prevenir la deprivación de aminoácidos que activa la traducción del mensajero de Gcn4 y este determina la activación transcripcional de *BAT2*. De esta manera, una red compleja que regula la expresión o actividad de Leu3, Gcn4, Gln3 y Put3 restringe la expresión de *BAT1* y *BAT2* en condiciones que conducen respectivamente a la biosíntesis o el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

## **ABSTRACT**

The function of Bat1 in biosynthesis of branched-chain amino acids valine, isoleucine and leucine (VIL) is induced on a primary nitrogen source, like glutamine (Gln), due to *BAT1* transcriptional activation by activators Gcn4 and Leu3 bound to its metabolite  $\alpha$ -IPM. *BAT1* is repressed by VIL through the inhibition of  $\alpha$ -IPM synthesis. *BAT1* repression also requires the factor Put3, which impedes an alternative pathway for  $\alpha$ -IPM synthesis that occurs via leucine catabolism. The catabolic function of Bat2 in VIL is dependent on *BAT2* transcriptional activation by Gln3 and Put3. Repression of *BAT2* on Gln requires Ure2-inactivation of Gln3, but unexpectedly, Leu3 is also required to prevent amino acids starvation that activates Gcn4 and attend *BAT2* transcriptional activation. Thus, a complex network regulating the expression or activity of Leu3, Gcn4, Gln3 and Put3 restricts *BAT1* and *BAT2* expression to conditions allowing either branched chain amino acid biosynthesis or catabolism.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-KIC</b>	$\alpha$ -cetoisocaproato sustrato de las BCATs
<b><math>\alpha</math>-KIV</b>	$\alpha$ -cetoisovalerato sustrato de las $\alpha$ -IPMS.
<b><math>\alpha</math>-KMV</b>	$\alpha$ -cetometilvalerato sustrato de las BCAT.
<b><math>\alpha</math>-IPM</b>	$\alpha$ -isopropilmalato, producto de la reacción catalizada por las $\alpha$ -IPMS, intermediario en la biosíntesis de leucina y coinductor de Leu3.
<b><math>\alpha</math>-IPMS</b>	$\alpha$ -isopropilmalato sintasa (s), hace referencia a ambas isoenzimas Leu4 y Leu9 o a cada una por separado.
<b>BAT1</b>	Gen que codifica para la enzima aminotransferasa de cadena ramificada Bat1 (mitocondrial).
<b>BAT2</b>	Gen que codifica para la enzima aminotransferasa de cadena ramificada Bat2 (citoplasmática).
<b>BCAT</b>	Aminotransferasa (s), hace referencia a ambas enzimas Bat1 y Bat2 o a cada una por separado.
<b>ENO2</b>	Gen que codifica para la enzima enolasa Eno2.
<b>ENO2pr</b>	Promotor del gen que codifica para enzima enolasa Eno2
<b>GCN4</b>	Gen que codifica para el factor de transcripción Gcn4.
<b>GDH1</b>	Gen que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa Gdh1.
<b>Gln</b>	Glutamina.
<b>GLN3</b>	Gen que codifica para el factor de transcripción Gln3.
<b>GRS1</b>	Gen que codifica para la enzima glicil-tRNA sintetasa Grs1
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración media máxima inhibitoria
<b>ILV5</b>	Gen que codifica para la enzima acetohidroxiácido reductoisomerasa Ilv5.
<b>LEU1</b>	Gen que codifica para la enzima $\alpha$ -isopropilmalato isomerasa Leu1.
<b>LEU2</b>	Gen que codifica para la enzima $\beta$ -isopropilmalato deshidrogenasa Leu2.
<b>LEU3</b>	Gen que codifica para el factor de transcripción Leu3.
<b>LEU4</b>	Gen que codifica para la enzima $\alpha$ -isopropilmalato sintasa Leu4.
<b>LEU9</b>	Gen que codifica para la enzima $\alpha$ -isopropilmalato sintasa Leu9.
<b>MM</b>	Medio mínimo.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
<b>PUT3</b>	Gen que codifica para el factor de transcripción Put3.
<b>qChIP</b>	Ensayo cuantitativo de inmunoprecipitación de cromatina.
<b>VIL</b>	Valina+Isoleucina+Leucina.
<b>YPD</b>	Medio rico de crecimiento para levadura (Yeast extract, Peptone, Dextrose).
<b>UTR</b>	Región no traducida de un gen (UnTranslated Region).

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Esquema de dos modelos comunes de la duplicación génica.
- Figura 2.** Representación del árbol de la vida junto con el porcentaje de genes duplicados en varias especies.
- Figura 3.** Representación esquemática de la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae*.
- Figura 4.** El perfil de expresión opuesto de *BAT1* y *BAT2* es parcialmente determinado por la organización de la cromatina.
- Figura 5.** Identificación de sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de *BAT1* y *BAT2*.
- Figura 6.** Papel de Gcn4 y Gln3 en la activación transcripcional de *BAT1* o *BAT2*.
- Figura 7.** Papel de Put3 y Leu3 en la activación transcripcional de *BAT1* o *BAT2*.
- Figura 8.** La expresión de *BAT1* está determinada por los niveles del metabolito  $\alpha$ -IPM.
- Figura 9.** La inducción de la expresión de *BAT2* está determinada indirectamente por la ausencia de Leu3 o Ure2.
- Figura 10.** La transcripción de *BAT1* se activa mediante el  $\alpha$ -IPM que se genera vía Bat2-Leu2-Leu1 en una mutante *put3* $\Delta$ .
- Figura 11.** Representación esquemática del perfil de expresión regulatorio de *BAT1/BAT2* y los factores de transcripción que actúan directa o indirectamente sobre condiciones biosintéticas y catabólicas.
- Figura 12.** La expresión de *KIBAT1* y *LkBAT1* no depende de la organización de la cromatina, sino de la sensibilidad a la leucina de las  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas.
- Figura 13.** Representación esquemática e hipotética de la sensibilidad a leucina de las  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas que determina la activación transcripcional de los genes que codifican BCATs en las levaduras *K. lactis* y *L. kluyveri*.
- Tabla 1.** Cepas utilizadas en este trabajo.
- Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este trabajo.
- Tabla 3.** En la mutante *leu3* $\Delta$  se observa deprivación de aminoácidos cuando los cultivos se crecen en Gln.

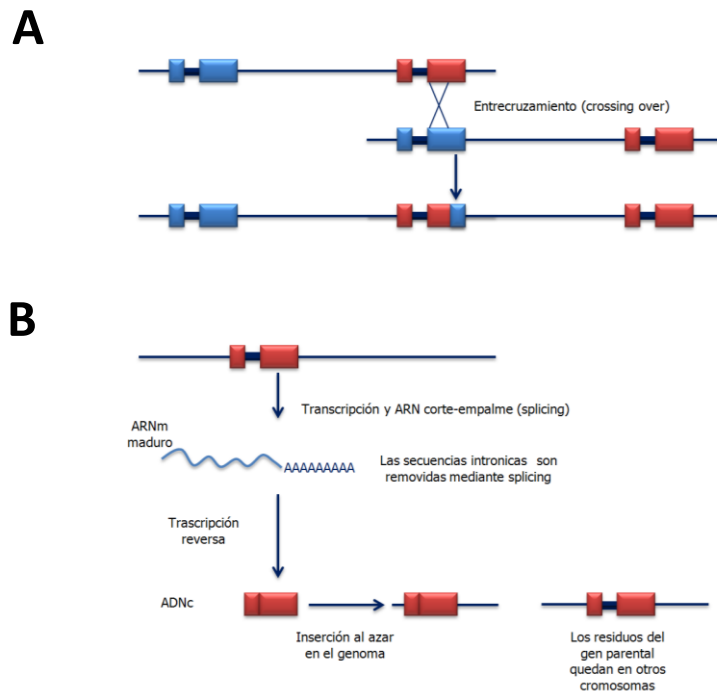
## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

- Figura S1.** Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia 5'-UTR de *BAT1*.
- Figura S2.** Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia 5'-UTR de *BAT2*.
- Figura S3.** Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia 5'-UTR de *KIBAT1* y *LkBAT1*.
- Figura S4.** Identificación de regiones protegidas por nucleosomas en el ORF de los genes control *KIVCX1* y *LkVCX1*.
- Figura S5.** Alineamiento de las secuencias promotoras de *BAT1* o *BAT2* de una cepa tipo silvestre y las mutantes en *cis*.
- Figura S6.** La expresión de *BAT1* y *BAT2* no se ve afectada en las mutantes *nrg1Δ*, *gat1Δ*, *hap2Δ* y *mot3Δ*.
- Figura S7.** La expresión de *BAT1* y *BAT2* no se ve afectada en las cepas etiquetadas con el epítipo *myc<sup>13</sup>* o *TAP*.
- Figura S8.** El sitio de unión a *PUT3* está presente en la secuencia 5'-UTR de *LEU1*.
- Tabla S1.** Oligonucleótidos utilizados para construir las mutantes nulas.
- Tabla S2.** Oligonucleótidos utilizados para construir las cepas marcadas con el epítipo *myc<sup>13</sup>*.
- Tabla S3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar las sondas para el análisis de Northern.
- Tabla S4.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes control *ScVCX1*, *KIVCX1* y *LkVCX1*.
- Tabla S5.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *BAT1*.
- Tabla S6.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *BAT2*.
- Tabla S7.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *KIBAT1*.
- Tabla S8.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *LkBAT1*.
- Tabla S9.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de qChIP.
- Tabla S10.** Oligonucleótidos utilizados para construir las mutantes en *cis*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El origen de los genes duplicados

Una de las preguntas más importantes que se ha planteado la genética molecular es ¿cómo surgen nuevos genes y qué repercusión tienen en la fisiología de los organismos? La respuesta a esta interrogante puede encontrarse justamente en el estudio de los genes duplicados, o genes parálogos, los cuales pueden originarse a través de los siguientes procesos: a) entrecruzamiento de regiones homólogas del genoma (proceso también denominado *crossing over*), b) retrotranscripción (proceso también denominado retroposición), y c) duplicaciones cromosómicas o genómicas (Ohno 1970; Force, A., 1999). En el caso de la duplicación de genes mediante entrecruzamiento, se suelen generar genes repetidos en “tándem”; esto es, varios genes duplicados que se encuentran en posiciones adyacentes en el genoma. Dependiendo del posicionamiento del entrecruzamiento, la región duplicada puede contener parte del gen, el gen entero o varios genes (Figura 1A).



**Figura 1.** Esquema de dos modelos comunes de la duplicación génica. **(A)** El entrecruzamiento o crossing over, es un mecanismo que resulta de un evento de recombinación entre dos sitios recombinantes en dos moléculas parentales de ADN. **(B)** La retroposición ocurre cuando el ARN mensajero (ARNm) es retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) y, posteriormente, se inserta dentro del genoma. Los cuadros rojos representan exones y las líneas acentuadas representan intrones.

Por otra parte, la duplicación por retrotranscripción ocurre cuando un ARN mensajero (ARNm) es retrotranscrito a ADN complementario (ADNc), y después es insertado en el genoma. La retrotranscripción suele generar pérdida o ganancia de segmentos de ADN, los cuales pueden ser insertados e interrumpir de manera aleatoria cualquier secuencia del genoma (Figura 1B). Por último, la duplicación de cromosomas o del genoma puede ocurrir durante la división celular, después de la replicación del ADN. Este tipo de duplicación a gran escala es muy frecuente en plantas, pero rara vez se presenta en animales.

## **1.2. Destino evolutivo de los genes duplicados**

Otra interrogante interesante que se planteó después de la década de los 70 fue sobre el destino evolutivo de los genes duplicados. El modelo de diversificación funcional propuesto por Ohno, plantea que los pares de genes duplicados evolucionan a diferentes velocidades, que una de las copias evoluciona lentamente, manteniendo la función original, mientras que la otra copia cambia rápidamente, adquiriendo con ello una nueva función. Este modelo ha sido analizado con gran detalle y se ha comprobado que estos escenarios únicamente se cumplen en ciertos casos (Ohno 1970). Un modelo alternativo conocido como duplicación / degeneración / complementación (DDC) (Force 1999), predice que dado que muchos genes pueden tener más de una función, después de la duplicación ambas copias pueden mutar libremente, dando lugar a dos genes degenerados y necesarios para llevar a cabo la función ancestral que realizaba el gen original (gen ancestral) antes de la duplicación.

En términos generales, los genes duplicados pueden tener cuatro posibles destinos evolutivos:

*Conservación de la función ancestral:* esta ocurre, cuando la dosis adicional representa una ventaja y se mantienen ambas copias por conversión génica constante. Es común en proteínas que forman complejos macromoleculares y en donde es importante mantener la estequiometría de las subunidades del complejo.

*Pseudogenización:* una de las copias se pierde, ya sea porque se acumularon mutaciones sobre su región regulatoria que impiden la expresión del gen, o bien, por mutaciones en la región codificante que imposibilitan la generación de un producto funcional. Tras una duplicación génica, los procesos de pseudogenización son los que ocurren con mayor frecuencia y en algunas especies como *Saccharomyces cerevisiae* llegan a ser cerca del 90% de los casos.

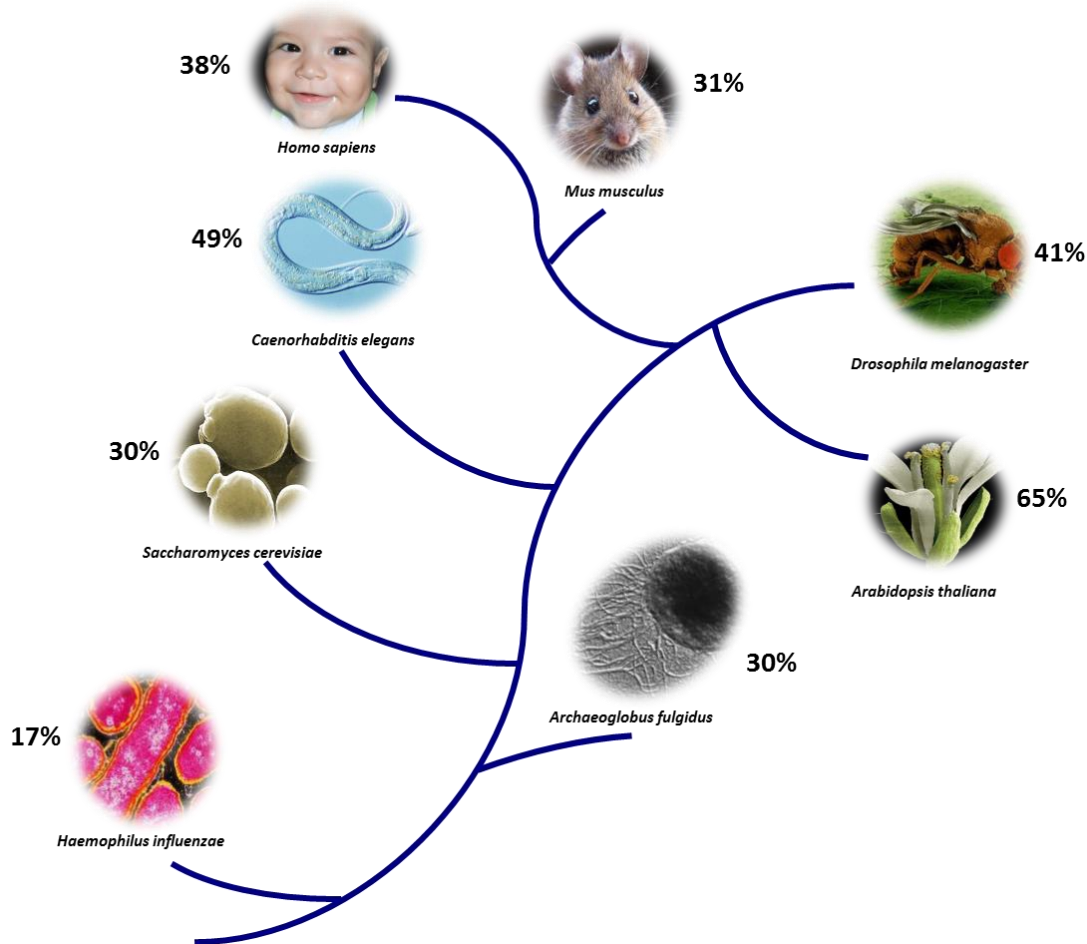


*Subfuncionalización*: ambos genes son necesarios para llevar a cabo la función original debido a que han acumulado mutaciones sobre la región codificante y/o regulatoria; es decir, la función que previamente llevaba un solo gen, se reparte entre ambas copias que resultan de esa duplicación. Esta división de funciones tiene múltiples implicaciones y hay ocasiones en que sólo es evidente bajo un contexto metabólico peculiar (Lynch y Conery, 2000; DeLuna, *et al* 2001; Contreras-Shannon, 2005).

*Neofuncionalización*: mutaciones a lo largo de la región regulatoria y/o codificante, inciden directamente sobre los patrones de expresión y/o sobre las propiedades bioquímicas del producto, facilitando la adquisición de nuevas funciones. Los procesos de neofuncionalización de proteínas regulatorias (factores de transcripción), incluyen el surgimiento de nuevos sitios de unión al ADN (elementos *cis*). Así mismo, la modificación de residuos que alteren la especificidad, afinidad o propiedades cinéticas de las enzimas, así como la generación de nuevas interacciones entre proteínas, por cambios en la secuencia codificante o secuencias de localización que determinen la relocalización subcelular de las proteínas (Dittmar y Lieberles 2010).

### **1.3. La importancia de la duplicación génica**

La duplicación génica es un evento que está presente en los tres dominios del árbol de la vida: bacterias, arqueas y eucariontes (Figura 2), por lo que es una característica vigente y concurrente en todos los seres vivos (Zhang 2003). Además, la duplicación génica es considerada como una de las principales fuerzas en la aparición de nuevos genes que permiten a los seres vivos adaptarse durante la evolución (Conant y Wolfe 2008; Ohno 1970; Zhang 2003).



**Figura 2.** Representación del árbol de la vida junto con el porcentaje de genes duplicados en varias especies. Tomada de González *et al* 2016 (revista *ciencias*).

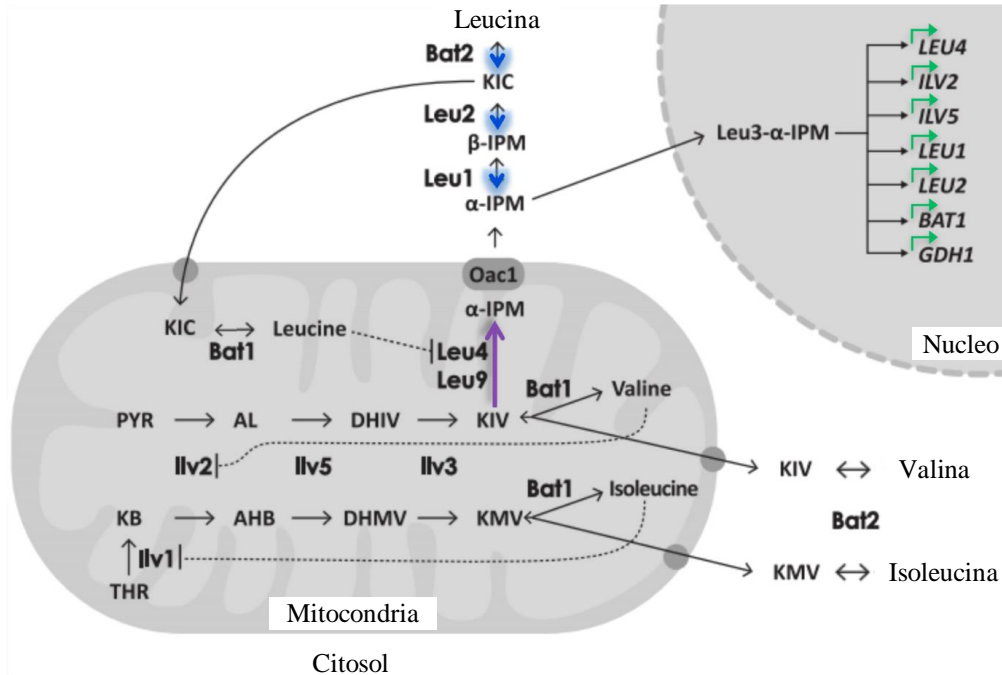
En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se ha planteado que su genoma proviene de una hibridización entre especies y la duplicación del genoma completo (WGD) (Wolfe y Shields 1997; Marcet-Houben y Gabaldón 2015), seguido de una subsecuente pérdida del 90% de los genes duplicados (Mewes *et al.* 1997). Se ha propuesto que la retención selectiva de genes parálogos fue acompañada por subfuncionalización, dando lugar a una diversificación funcional que resulta en que cada parálogo lleva a cabo una de las funciones que llevaba a cabo el gen ancestral (DeLuna *et al.* 2001; Quezada *et al.* 2008; Colón *et al.* 2011; López *et al.* 2015). Se han descrito varios modos de diversificación funcional, que incluyen la modificación de la organización oligomérica y las propiedades cinéticas de las enzimas parálogas, la relocalización subcelular de las proteínas parálogas (DeLuna *et al.* 2001; Quezada *et al.* 2008; Colón *et al.* 2011; López *et al.* 2015), y la diversificación del perfil de expresión de genes parálogos (DeLuna *et al.* 2001; Avendaño *et al.* 2005).

#### **1.4. Mecanismos involucrados en la divergencia de la expresión de genes parálogos en *S. cerevisiae***

Se ha planteado que la divergencia de la expresión entre genes duplicados podría ser el primer paso para conservar los genes redundantes. En *S. cerevisiae*, los patrones de expresión de genes duplicados han demostrado que la divergencia de la expresión ocurre a una tasa rápida en tiempo evolutivo (Gu *et al.*, 2002, 2005; Makova y Li 2003). Esto sugiere que las alteraciones en la transcripción son esenciales para la dispersión funcional de parálogos y, posteriormente, su retención a largo plazo. De manera intuitiva, la divergencia de la expresión entre genes duplicados debe ser observable en la configuración diferencial de los sitios de unión a factores de transcripción que se encuentran en las regiones río arriba de genes duplicados; sin embargo, se ha reportado que sólo el 2-3% o el 8% de la variación de la expresión entre parálogos, podría ser explicada mediante la identificación de elementos *cis* que reconocen los factores de transcripción (Zhang *et al.*, 2004; Leach *et al.*, 2007). Estos análisis llevaron a la hipótesis de que la divergencia en la expresión génica, está influenciada mayoritariamente por los factores en *trans* (Zhang *et al.*, 2004); sin embargo, estudios globales demostraron que sólo el 10% de la variación de la expresión entre parálogos ocurre a través de la divergencia de los factores en *trans* (Leach *et al.*, 2007). Estos estudios han llevado a pensar que la divergencia de la expresión entre parálogos, no sólo ocurre a través de cambios en los elementos *cis* y/o sus interactores *trans*, sino que también puede influir la estructura de la cromatina, que a través de cambios en la región promotora, permite la expresión diferencial entre parálogos. Se ha propuesto que la estructura de la cromatina en las regiones regulatorias debe ser sometida a un proceso de remodelación, y en consecuencia los nucleosomas son deslizados o desplazados de estas regiones permitiendo el acceso a los factores regulatorios (Jiang y Pugh 2009). Otra instancia que podría desempeñar un papel importante en la divergencia de la expresión entre parálogos, puede atribuirse a la regulación diferencial de los flujos metabólicos, que determinan la concentración intracelular de metabolitos específicos que afectan a la activación o represión de genes. En muchos casos, los metabolitos pueden funcionar como co-activadores o moléculas cuya concentración intracelular determina la activación de determinados moduladores de la expresión génica (Sze *et al* 1992; Hinnebusch *et al* 1984).

### 1.5. *S. cerevisiae* retuvo los parálogos *BAT1* y *BAT2* que codifican para aminotransferasas de cadena ramificada

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* codifican para las aminotransferasas de cadena ramificada Bat1 y Bat2 (BCATs), que catalizan el primer paso de la síntesis y el último del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) mediante la transferencia del grupo amino entre valina, isoleucina, leucina (VIL) y el  $\alpha$ -ceto ácido correspondiente (Figura 3) (Kispal G, *et al.*, 1996; Eden *et al.* 2001). Los ortólogos de *BAT1* y *BAT2* también han sido identificados en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis. elegans*, *Mus musculus* y *Homo sapiens* (Kispal *et al.* 1996; Eden 1999). De estos estudios se ha confirmado que las BCATs catalizan reacciones reversibles; es decir, son capaces de llevar a cabo la reacción biosintética y la catabólica.



**Figura 3.** Representación esquemática de la ruta biosintética de los aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae*. Las proteínas que participan en la vía son: Leu4/Leu9 ( $\alpha$ -isopropilmalato sintasas, que constituyen la vía biosintética de  $\alpha$ -isopropilmalato sensible a leucina), Oac1 (transportador mitocondrial de membrana interna), Leu1 (isopropilmalato isomerasa), Leu2 ( $\beta$ -isopropilmalato deshidrogenasa), Bat1 (aminotransferasa de cadena ramificada mitocondrial), Bat2 (aminotransferasa de cadena ramificada citoplásmica), Ilv1 (treonina desaminasa), Ilv2 (acetolactato sintasa), Ilv5 (acetohidroxiácido reductoisomerasa), Ilv3 (dihidroxiácido deshidratasa), KIC ( $\alpha$ -cetoisocaproato),  $\alpha$ -IPM ( $\alpha$ -isopropilmalato), PYR (piruvato), AL (acetolactato), DHIV ( $\alpha$ ,  $\beta$ -dehidroxi isovalerato), KIV ( $\alpha$ -cetoisovalerato), KB ( $\alpha$ -cetobutanoato), AHB ( $\alpha$ -ceto-2-hidroxi butirato), DHMV (dihidroximetilvalerato), KMV ( $\alpha$ -cetometilvalerato), THR (treonina). Las flechas indican la dirección de las reacciones para cada vía. Los círculos grises representan los transportadores putativos. Las líneas punteadas indican los sitios de retroinhibición por cada aminoácido. En el núcleo, la expresión de los genes *LEU4*, *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *GDH1*, está regulada positivamente por el complejo Leu3- $\alpha$ -IPM (flechas verdes indican activación transcripcional). La vía biosintética de  $\alpha$ -IPM sensible a leucina se indica con una flecha morada, mientras que la vía resistente a leucina se indica en azul. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* provienen de la hibridación que se mencionó anteriormente (Marcet-Houben y Gabaldón 2015), y del evento de duplicación del genoma completo (WGD) que ocurrió alrededor de 100-150 millones de años (Wolfe y Shields 1997; Kellis *et al.*, 2004). Se ha planteado que las levaduras *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) y *Lachancea kluyveri* (*L. kluyveri*) descienden del antepasado pre-WGD, y tienen un único gen que codifica para BCAT (*KIBATI* o *LkBATI*). Actualmente, se ha demostrado que *KlBat1* y *LkBat1* también son enzimas bifuncionales que están implicadas en la síntesis y catálisis de VIL (Colón *et al.*, 2011; Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015). Se ha propuesto que esta función dual de síntesis y catálisis de la *KlBat1* tipo ancestral se dividió entre las proteínas parálogas *Bat1* y *Bat2* de *S. cerevisiae*, y por lo tanto, la especialización funcional se produjo a través de la divergencia de expresión de *BAT1* y *BAT2* (Colón *et al.*, 2011). *BAT1* se expresa en condiciones biosintéticas (glutamina como única fuente de nitrógeno, Gln), mientras que *BAT2* se expresa en condiciones catabólicas (valina+isoleucina+leucina como única fuente de nitrógeno, VIL) (Colón *et al.*, 2011). *KIBATI* muestra una respuesta de expresión similar a la encontrada para el parálogo *BAT1* de *S. cerevisiae* (Colón *et al.*, 2011), mientras que *LkBATI* tiene un perfil de expresión constitutivo en Gln y VIL (Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015).

### **1.6. El complejo Leu3- $\alpha$ -IPM activa la transcripción de *BAT1***

Actualmente, se sabe que la expresión de *BAT1* se regula a través del  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM) que sintetizan las  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas *Leu4/Leu9* ( $\alpha$ -IPMS) (Kohlhaw 2003; Boer *et al.*, 2005; Chin *et al.*, 2008) (Figura 3). La concentración de leucina controla la vía mediante la inhibición de *Leu4/Leu9* (Chang LF, *et al.*, 1984). El factor transcripcional *Leu3* regula la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de leucina (Friden P, *et al.*, 1988, Wang D, *et al.*, 1999; Kohlhaw GB, 2003; Boer *et al.*, 2005), y la del gen *GDHI* que codifica para la glutamato deshidrogenasa (Hu *et al.*, 1995). El mecanismo canónico propuesto es que *Leu3* puede actuar como activador o represor, dependiendo de los niveles del metabolito  $\alpha$ -IPM producido por *Leu4/Leu9*. La vía es activa a altos niveles de  $\alpha$ -IPM, y se inactiva a bajos niveles de  $\alpha$ -IPM (Wang *et al.*, 1999, Chin *et al.*, 2008). El modelo propuesto indica que la acumulación y unión del  $\alpha$ -IPM a *Leu3* (*Leu3- $\alpha$ -IPM*) desenmascara un dominio de activación, permitiendo la activación transcripcional de sus genes blanco (Kohlhaw GB, 2003).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) codifican para las aminotransferasas de cadena ramificada Bat1 y Bat2. La reacción que catalizan es reversible y son capaces de sintetizar y catabolizar valina, isoleucina y leucina (VIL). Los resultados obtenidos por Colón *et al.* 2011, mostraron que existe una expresión diferencial de *BAT1* y *BAT2*; sin embargo, no se identificaron los elementos que determinan la expresión de cada uno de estos genes en condiciones biosintéticas y catabólicas. Por lo tanto, en este trabajo hemos analizado el papel de la organización de la cromatina junto con la acción de los elementos en *cis/trans*, y el estado metabólico de la célula, como las fuerzas motrices involucradas en la subfuncionalización transcripcional de parálogos.

La divergencia de la expresión de *BAT1* y *BAT2* en condiciones biosintéticas y catabólicas resultó en la diversificación funcional de sus productos (Colón *et al.*, 2011). Actualmente, no son claros los mecanismos regulatorios que permitieron la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2*. Se desconoce si la organización de la cromatina y la configuración de los elementos en *cis* de cada promotor están involucradas en la expresión opuesta de *BAT1* y *BAT2*.

En este estudio estamos interesados en identificar los cambios en la estructura de la cromatina, los interactores *trans* y los elementos en *cis* que determinan la expresión diferencial, y por tanto, la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*.

## HIPÓTESIS

Considerando los resultados publicados por Colón *et al.* 2011, se puede hipotetizar que deben existir mecanismos de regulación específicos que determinen la expresión de *BAT1* en ausencia de VIL (condiciones biosintéticas), y de *BAT2* en presencia de VIL como única fuente de nitrógeno (condiciones catabólicas). Por lo tanto, la diversificación funcional de Bat1 y Bat2 dependerá de que *BAT1* y *BAT2* se transcriban y el ARNm se traduzca, produciéndose una enzima que funcione hacia la biosíntesis o el catabolismo dependiendo de los substratos que estén presentes, como ocurre para todas las aminotransferasas. Por lo tanto, también se puede hipotetizar que la concentración intracelular de algunos metabolitos jugará un papel crucial favoreciendo la función biosintética o catabólica de Bat1 y/o Bat2.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos de regulación transcripcional que resultaron en la subfuncionalización de la expresión y diversificación de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el perfil de expresión de *BAT1* y *BAT2* mediante análisis tipo Northern en células crecidas en condiciones biosintéticas (Gln) y catabólicas (VIL).
- Determinar el arreglo nucleosomal de la región 5' de los promotores *BAT1* y *BAT2* mediante ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) en células crecidas en Gln y VIL.
- Identificar *in silico* los elementos en *cis* consenso y conservados de la región 5' de los promotores *BAT1* y *BAT2* mediante alineamiento múltiple de secuencias.
- Analizar el papel de los factores de transcripción (TFs) Gcn4, Gln3, Leu3 y Put3 en la expresión de *BAT1* y *BAT2* mediante análisis tipo Northern en mutantes nulas crecidas en Gln y VIL.
- Determinar la interacción de Gcn4, Gln3, Leu3 y Put3 en el promotor de *BAT1* y *BAT2*, mediante ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de cromatina (qChIP) en cepas portadoras de genes marcados con un epítipo y crecidas en diferentes fuentes de nitrógeno.
- Analizar el papel de los elementos en *cis* que determinan la regulación directa en el promotor *BAT1* y *BAT2*, mediante análisis tipo Northern en cepas que contienen mutaciones específicas en los sitios de unión a TFs.
- Determinar la participación del complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM en la expresión de *BAT1* y *BAT2*, mediante análisis tipo Northern en una cepa sobreproductora de  $\alpha$ -IPM, y en una no productora de  $\alpha$ -IPM.

- Medir las pozas de aminoácidos en la cepa *leu3Δ* crecida en Gln hasta fase exponencial.
- Determinar la participación indirecta de Leu3 en la “represión” de *BAT2*, a través de qChIP y análisis tipo Northern en una cepa que contiene el sitio *LEU3* mutado (promotor *BAT2*) crecida en Gln.
- Determinar la interacción de Gcn4 en el promotor de *BAT2* en ausencia de Leu3 (*leu3Δ*), mediante qChIP en una cepa que contiene el sitio *LEU3* mutado (promotor *BAT2*) crecida en Gln.
- Determinar la participación directa de Gcn4 en la activación transcripcional de *BAT2*, mediante análisis tipo Northern en la doble mutante *leu3Δ gcn4Δ* crecida en Gln.
- Determinar la participación de Put3 en la represión de una vía de síntesis de  $\alpha$ -IPM que activa la transcripción de *BAT1*, *LEU1* y *LEU2*, mediante análisis tipo Northern en la doble mutante *put3Δ leu3Δ* crecida en presencia de leucina.
- Probar la participación de una nueva vía de síntesis de  $\alpha$ -IPM a través de la acción consecutiva de Bat2-Leu2-Leu1, mediante análisis tipo Northern en las dobles mutantes *put3Δ leu1Δ* y *put3Δ bat2Δ* crecidas en presencia de leucina.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas

Las cepas *S. cerevisiae*, *K. lactis*, y *L. kluyveri* utilizadas en esta tesis se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
Y155 <i>K. lactis</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2 his3 ura3</i>	Colón <i>et al.</i> , 2011
Y156 <i>L. kluyveri</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3</i>	Montalvo <i>et al.</i> , 2015
CLA11-700 <i>S. cerevisiae</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2::LEU2</i>	DeLuna <i>et al.</i> , 2001
Y155-1 <i>Klleu4bis<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> Klleu4bis::kanMX4 ade2 his3 ura3</i>	Ceparío Mijaíl
Y155-2 <i>Klleu4<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> Klleu4::kanMX4 ade2 his3 ura3</i>	Ceparío Mijaíl
Y156-1 <i>Lkleu4bis<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> Lkleu4bis::kanMX6 ura3</i>	Ceparío Lina
Y156-2 <i>Lkleu4<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> Lkleu4::natMX4 ura3</i>	Ceparío Lina
BY4741 <i>PUT3-TAP</i>	<i>S. cerevisiae ura3 leu2 his3 met5 PUT3-TAP</i>	Colección TAP
CLA11-706	<i>MAT<math>\alpha</math> ENO2pr-LEU4 ENO2-prLEU9 leu2::LEU2</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA11-708 <i>gcn4<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> gcn4::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
C1LA1-709 <i>leu3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> leu3::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-710 <i>gln3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> gln3::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-711 <i>put3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> put3::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-712 <i>ure2<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ure2::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-713 <i>nrg1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> nrg1::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-714 <i>gat1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> gat1::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-715 <i>hap2<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> hap2::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-716 <i>mot3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> mot3::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-717 <i>leu3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> leu3::natMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-719 <i>put3<math>\Delta</math>leu1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> put3::kanMX4 leu1::URA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-720 <i>gcn4<math>\Delta</math>leu3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> gcn4::kanMX4 leu3::natMX4 ure3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-721 <i>put3<math>\Delta</math>leu3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> put3::kanMX4 leu3::natMX4 ure3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-722 <i>ure2<math>\Delta</math>gln3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> ure2::kanMX4 gln3::natMX4 ura3 leu2</i>	Este estudio
CLA11-723 <i>GCN4-myc<sup>13</sup></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> GCN4-myc<sup>13</sup>::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-724 <i>GLN3-myc<sup>13</sup></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> GLN3-myc<sup>13</sup>::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-725 <i>LEU3-myc<sup>13</sup></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> LEU3-myc<sup>13</sup>::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-726 <i>gataboxes</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT1</sub> GATAAT::GcaAAT, GATAAA::GcaAAA, GATAAT::GcaAAT, GATAAG::GcaAAG ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-727 <i>leu3<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT1</sub> GCCGGTACCGGC::aaaGGTACCa<sub>aa</sub> ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-728 <i>put3<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT1</sub> CGCTGGATAAGTACCG::aaaTGGATAAGT<sub>aaaa</sub> ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-729 <i>gata<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT2</sub> GTTATC::GTTtgc ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-730 <i>leu3<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT2</sub> CCGCTTTCGG::CCGCTT<sub>taaa</sub> ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-731 <i>put3<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT2</sub> CGGCGTTCCTTTTCGG::aaaCGTTCCTTTTCGG ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-732	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>ENO2</sub>LEU4 P<sub>ENO2</sub>LEU9 leu1::URA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-733 <i>leu4<math>\Delta</math>leu9<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> leu4::URA3 leu9::kanMX4 leu2::LEU2</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA11-734 <i>GCN4-myc<sup>13</sup>leu3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> GCN4-myc<sup>13</sup>::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-735 <i>LEU3-myc<sup>13</sup>leu3<sub>box</sub></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> P<sub>BAT2</sub> CCGCTTTCGG::CCGCTT<sub>taaa</sub> LEU3-myc<sup>13</sup>::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-736 <i>leu4<math>\Delta</math>leu9<math>\Delta</math>leu1<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> leu4::kanMX4 leu9::natMX4 leu1::URA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-737 <i>put3<math>\Delta</math>bat2<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math> put3::kanMX4 bat2::natMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este estudio

Se utilizaron las cepas tipo silvestre *K. lactis* y *L. kluyveri* de los trabajos previamente descritos (Colón *et al.*, 2011; Montalvo *et al.*, 2015) para el estudio que se muestra en el APÉNDICE. Todas las cepas isogénicas de *S. cerevisiae* son derivadas de la CLA11-700 (*ura3 leu2::LEU2*) que previamente se describió (DeLuna *et al.*, 2001). Las mutantes sencillas; *gcn4Δ* (CLA11-708), *leu3Δ* (CLA11-709), *gln3Δ* (CLA11-710), *put3Δ* (CLA11-711), *ure2Δ* (CLA11-712), *nrg1Δ* (CLA11-713), *gat1Δ* (CLA11-714), *hap2Δ* (CLA11-715) y *mot3Δ* (CLA11-716) fueron obtenidas de la cepa CLA11-700 mediante la sustitución completa de las regiones codificantes de cada gen. Se amplificó un módulo de *kanMX4* mediante PCR a partir del plásmido pFA6a (Tabla 2) siguiendo el método previamente descrito (Longtine *et al.*, 1998) usando los oligonucleótidos que se describen en la Tabla S1 (J1 a J18, ver ANEXO).

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Referencia
pFA6a-kanMX4	Longtine MS <i>et al.</i> 1998
p4339	Goldstein and McCusker, 1999
pKT175	Sheff MA and Thorn KS, 2004
pFA6a-myc13-kanMX6	Longtine MS <i>et al.</i> 1998
pCORE	Storici F and Resnick MA, 2003

Las dobles mutantes se construyeron de la siguiente manera. El módulo *kanMX4* de la CLA11-709 (*leu3::kanMX4*) se reemplaza por el casete de *natMX4*, que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina (Goldstein y McCusker 1999). El casete de *natMX4* usado para la transformación, se obtuvo de la digestión del plásmido p4339 (Tabla 2) con la enzima de restricción *EcoRI*. La cepa *leu3::natMX4* (CLA11-717) se transformó siguiendo el método previamente descrito (Ito *et al.*, 1983). Se prepararon las dobles mutantes *put3Δ leu1Δ* (CLA11-719) y *put3Δ bat2Δ* (CLA11-737) transformando la mutante sencilla *put3Δ* (CLA11-711) con un módulo de PCR amplificado del plásmido pKT175 (Tabla 2) que contenía el gen *URA3* (Sheff y Thorn, 2004), o un módulo de PCR amplificado del plásmido p4339 (Tabla 2) que contenía el casete de *natMX4*. Los oligonucleótidos usados para reemplazar a *LEU1* y *BAT2* se describen en la Tabla S1 (J19-J20 o J20A-J20B, ver ANEXO). Las dobles mutantes *gcn4Δ leu3Δ* (CLA11-720) y *put3Δ leu3Δ* (CLA11-721) se prepararon transformando la mutante sencilla *leu3Δ* (CLA11-717) con módulos de *kanMX4* que sustituyen respectivamente a *GCN4* o *PUT3*, usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla S1 (J1-J2 o J7-J8, ver ANEXO). La doble mutante

*gln3Δ ure2Δ* (CLA11-722) se construyó reemplazando a *GLN3* y *URE2* por los módulos de *natMX4* y *kanMX4* como se describió anteriormente. Las transformantes se seleccionaron en placas con medio rico (extracto de levadura-peptona-dextrosa, YPD) que contenía G418 (200 mg/l, Life Technologies, Inc.) y nourseotricina (100 mg/l, Werner Bio Agents). Todas las mutantes seleccionadas se verificaron por PCR.

La triple mutante *leu4Δ leu9Δ leu1Δ* (CLA11-736) se obtuvo a partir de la cepa CLA11-700 mediante sustitución génica. Se prepararon tres módulos de PCR (*kanMX4*, *natMX4* y *URA3*) a partir de los plásmidos; pFA6a, p4339 y pKT175 (Tabla 2) siguiendo el método previamente descrito (Longtine *et al.*, 1998) usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla S1 (J20C-J20D, J20E-J20F y J19-J20, ver ANEXO). Las regiones codificantes de los genes *LEU4*, *LEU9* y *LEU1* se reemplazaron por los módulos *kanMX4*, *natMX4* y *URA3*, respectivamente. Las transformantes se seleccionaron simultáneamente con G418 y nourseotricina como se describió anteriormente. Las transformantes resistentes a G418 y nourseotricina se seleccionaron en placas que contenían medio mínimo (MM) con glucosa y sin uracilo. La triple mutante se verificó por PCR. La cepa CLA11-732 (*MAT $\alpha$  P<sub>ENO2</sub>LEU4 P<sub>ENO2</sub>LEU9 leu1::URA3 leu2::LEU2*) se preparó a partir de la cepa isogénica CLA11-706 (*MAT $\alpha$  ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9 leu2::LEU2*) (López *et al.*, 2015), insertando en la región codificante de *LEU1* un módulo de PCR que contenía el gen *URA3* como se describió anteriormente usando los oligonucleótidos descritos en la Tabla S1 (J19-J20, ver ANEXO). La cepa BY4741 (*PUT3-TAP ura3 leu2 his3 met5*) se obtuvo de la colección de *Saccharomyces* de las cepas etiquetadas con *TAP*.

#### **4.1. Condiciones de crecimiento**

Las cepas se cultivaron en MM que contenía sales, elementos traza y vitaminas de acuerdo a la fórmula descrita para la base de nitrógeno de levaduras (Difco). Se utilizó glucosa (2% p/v) como fuente de carbono y glutamina (Gln, 7 mM), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, 7mM), o valina (V, 150 mg/l) + leucina (L, 100 mg/l) + isoleucina (I, 30 mg/l) (VIL) como únicas fuentes de nitrógeno. El uracilo (20 mg/l) y la leucina (L) (100 mg/l) se añadieron sólo cuando fue necesario (auxotrofías). Las células se incubaron a 30 °C con agitación (250 rpm).

#### **4.2. Análisis *in silico* de secuencias promotoras**

Se indentificaron los sitios de unión a factores de transcripción al examinar las regiones intergénicas (1000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción, +1 ATG) de los genes que codifican para las aminotransaminasas de cadena ramificada (BCATs) del genoma de *S. cerevisiae*, *K. lactis* y *L. kluyveri* (Figuras S1, S2 y S3, ver ANEXO). A través de un análisis *in silico* se buscaron las secuencias consenso de los motivos de interés en Yeastract (yeastract.org) en el sitio TF-Consensus. Después se utilizó la herramienta Yeastract “Search by DNA motifs” para indentificar los motivos en cada promotor y ubicar su coordenada. Posteriormente, se realizó un alineamiento con las secuencias promotoras del gen ortólogo (BAT) de las levaduras *Sensu Stricto* mediante CLUSTALW y BOXShade). La identificación del motivo *PUT3* en el promotor de *LEU1* se realizó como se mencionó anteriormente.

#### **4.3. Análisis tipo Northern**

El análisis de transferencia de Northern se realizó como se describió previamente (Valenzuela *et al.*, 1998). El ARN total se extrajo siguiendo el método de Struhl y Davis (1981). Los cultivos se crecieron hasta 0.5 de OD<sub>600</sub> en MM con glucosa como fuente de carbono y glutamina (Gln) o valina + isoleucina + leucina (VIL) como fuentes de nitrógeno (ver 4.1. Condiciones de crecimiento). Se usaron alícuotas de 50 ml para obtener el ARN total. A partir de ADN genómico se generaron productos de PCR específicos para los genes; *BAT1*, *BAT2*, *ACT1*, *KIBAT1*, *LkBAT1*, *18S*, *SCR1*, *HIS4*, *DAL5*, *LEU1* y *LEU2*, marcados radioactivamente con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP con Random Primer Labeling Kit (Agilent Cat # 300385) usando los oligonucleótidos que se describen en la Tabla S3 (J27 a J50). Estos productos radiactivos se utilizaron respectivamente como sondas de hibridación para el ARNm de *BAT1*, *BAT2*, *ACT1*, *KIBAT1*, *LkBAT1*, *18S*, *SCR1*, *HIS4*, *DAL5*, *LEU1* y *LEU2*. La señal obtenida se escaneó con el programa Image Quant 5.2 (Molecular Dynamic). Los resultados que se muestran son la representación de al menos tres experimentos independientes.

#### **4.4. Ensayo de escaneo de nucleosomas (NuSA)**

Los experimentos de NuSA se llevaron a cabo adaptando el método que se describió previamente (Biddick *et al.* 2008; Infante *et al.*, 2012). Las cepas de *S. cerevisiae*, *K. lactis* y *L. kluyveri* se crecieron en 50 ml de MM a 0.4 - 0.6 de densidad óptica (O.D<sub>600</sub>). Las células se trataron con

formaldehído (concentración final al 1%) durante 20 min a 37 °C, y después se les adicionó glicina (concentración final al 125 mM) durante 5 min a temperatura ambiente sin agitación. Las células tratadas con formaldehído y glicina se recolectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con 20 ml de solución salina tamponada con Tris, y después se incubaron en tampón Z2 (1M de Sorbitol, 50 mM de Tris-Cl a pH 7.4, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), al tampón se le adicionó 2,5 mg de zimolasa 20T durante 20 min a 30 °C. Los esferoplastos se sedimentaron por centrifugación durante 5 min (3000 G) y se resuspendieron en 1.5 ml de tampón NPS (0.5 mM de espermidina, 0,075 % de NP-40, 50 mM de NaCl, 10 mM de Tris a pH 7.4, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). A 500  $\mu$ l de la muestra se le agregó 25 U de MNasa (Nucleasa S7 de Roche) durante 50 min a 37 °C. La reacción de la digestión se detuvo con 12  $\mu$ l de tampón STOP (50 mM de EDTA y 1% de SDS), se trataron con 100  $\mu$ g de proteinasa K a 65 °C durante toda la noche. El DNA se extrajo dos veces con fenol/cloroformo, se precipitó con 20  $\mu$ l de NaCl al 5 M y un volumen igual de isopropanol durante al menos 30 min a -20 °C. Los precipitados se resuspendieron en 40  $\mu$ l de TE y se incubaron con 20 mg de RNasa A durante 1 h a 37 °C. Las digestiones de DNA se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % (Figura S4A, ej. *K. lactis* y *L. kluyveri*). Las bandas monosomales (fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 150 pb) se cortaron y se purificaron con el kit Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega, REF A9282). Las muestras de DNA se diluyeron en agua miliQ a 1:30 y se utilizaron en las reacciones de PCR cuantitativas (qPCR) para medir la protección de MNasa relativa de cada muestra en los promotores correspondientes. El análisis de qPCR se realizó con la máquina 6000 Corbett Life Science Rotor Gene. En cada reacción se utilizó SYBR Green (2  $\times$  KAPA SYBR FAST qBioline and Platinum SYBR Green de Invitrogen) como señal de detección. La programación del qPCR se describe a continuación: 94 °C durante 5 min (1 ciclo), 94 °C por 15 seg, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 20 segundos (35 ciclos). La protección relativa se calculó al dividir el valor obtenido de cada reacción con el valor obtenido de la región de los genes control *VCX1* (YDL128W), *KIVCX1* (KLLA-ORF439) y *LkVCX1* (SAKL-ORF13243), respectivamente. La región protegida por un nucleosoma bien posicionado en el gen control *VCX1* se describió previamente (Reiter *et al.*, 2013). Sin embargo, para encontrar una región protegida en *KIVCX1* y *LkVCX1* se diseñaron los oligonucleótidos que se describen en la Tabla S4. Los oligonucleótidos utilizados para analizar las regiones promotoras de los genes *BAT1*, *BAT2*, *KIBAT1* y *LkBAT1*, van del -650 al +250 pb, cuyas coordenadas se dan

en relación con el ATG (+1) como se enumeran en las Tablas S5, S6, S7 y S8. Todos los ensayos de protección de nucleosomas se representan como el promedio y error estándar de al menos dos réplicas biológicas independientes, donde cada réplica biológica implica dos réplicas técnicas (total n=4).

#### **4.5. Ensayo cuantitativo de inmunoprecipitación de cromatina (qChIP)**

Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron adaptando los métodos que se describieron previamente (Hecht *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2010). Se crecieron células en 200 ml de MM a 0.5 OD<sub>600</sub> y se agregó formaldehído (concentración final 1%) durante 20 min a temperatura ambiente con agitación constante a 50 rpm. Se adicionó glicina al 125 mM y se incubó durante 5 min. Las células se recolectaron por centrifugación (3000 rpm por 5 min a 4 °C) y se lavaron con tampón PBS frío al 1X (2 veces). Las células sedimentadas se resuspendieron en tampón de lisis (140 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 50 mM de HEPES/KOH, 1% de Triton X-100, 0.1% de desoxicolato de sodio) con coctel de inhibidor de proteasas (Complete Mini, Roche). Las células se lisaron con perlas de vidrio, y se recolectaron por centrifugación (14000 rpm por 5 min). Los extractos se sometieron a sonicación con el aparato Bioruptor Diagenode (pulsos de 20 seg / potencia al 60 % / durante 4 ciclos), logrando producir fragmentos de cromatina de tamaño promedio (300 pb). Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se realizaron al incubar (3 h a 4 °C) 1 mg de anticuerpo Myc (9E 11, Santa Cruz Biotechnology) y 20 µl de perlas magnéticas que contienen la proteína A, después se lavó, y se resuspendió en tampón TE/SDS al 1% y se incubaron durante toda la noche a 65 °C con el fin de revertir el entrecruzamiento del formaldehído. Las inmunoprecipitaciones se incubaron con proteinasa K (marca Roche) durante 3 h, seguido por dos extracciones de fenol/cloroformo/isoamilico. Las muestras se precipitaron y se resuspendieron en 30 µl de tampón de TE. Las muestras de ADN total (Input) se diluyeron 1:100, mientras que las muestras de las inmunoprecipitaciones se diluyeron 1:2. La amplificación de ADN basada en PCR en tiempo real (qPCR) se realizó usando oligonucleótidos específicos, los cuales fueron previamente seleccionados sin la posibilidad de formar dímeros o hibridación entrecruza (se utilizó la herramienta oligocalculator de la página <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Posteriormente, los oligonucleótidos se verificaron mediante curvas estándar por qPCR utilizando el Input como molde. Se seleccionaron y utilizaron los pares de oligonucleótidos (Tabla S9) que tuvieron una eficiencia alta = 0.9

(tomando en cuenta que  $1.0 = 100\%$  de eficiencia) durante la curva estándar. Los análisis de qChIP se realizaron utilizando la máquina Corbett Life Science Rotor Gene 6000. Se calcularon las veces de enriquecimiento del material inmunoprecipitado (IP) y la muestra del Input para cada región amplificada por qPCR siguiendo la fórmula  $IP/Input = (2^{InputCt} - IPCt)$  que se describió previamente (Litt *et al.*, 2001). Los resultados que se muestran representan los valores del promedio y error estándar de al menos dos o tres réplicas biológicas independientes, donde cada réplica biológica implica dos réplicas técnicas (total  $n = 4$  ó  $6$ ).

#### 4.6. Construcción de las mutaciones en *cis*

A partir del análisis *in silico* de la secuencia promotora de *BAT1* y *BAT2* (Figuras S1 y S2, ver ANEXO) se identificaron los posibles elementos en *cis* funcionales para construir las mutantes de manera individual y simultáneamente mediante *Delitto Perfetto* (Storici y Resnick, 2003). Las mutantes en *cis* se construyeron al transformar la cepa CLA11-700 con un fragmento de 3,2 kb obtenido mediante PCR del plásmido pCORE que alberga los módulos *kanMX4* y *URA3 CORE* (Storici y Resnick, 2003). La transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describió previamente (Ito *et al.*, 1983). Las colonias se seleccionaron en YPD y G418 (200 mg / l). Las inserciones correctas se verificaron mediante PCR. Los transformantes seleccionados se volvieron a transformar con los IROs (Integrative Recombinant Oligonucleotides) que albergaban los módulos mutagenizados (Tabla S10, ver ANEXO). Después de la segunda transformación, las colonias se seleccionaron por resistencia al ácido fluoroorótico (5-FOA), y las candidatas se analizaron por PCR. A continuación se enlistan los elementos en *cis* que fueron modificados en cada promotor: *gata<sub>box</sub> P<sub>BAT1</sub>* (mutante cuádruple en el promotor de *BAT1* en las posiciones -424 / -415 / -374 / -324, se sustituyeron las cajas: GATAAT, GATAAA, GATAAT, y GATAAG por GcaAAT, GcaAAA, GcaTAAT, y GcaAAG); *leu3<sub>box</sub> P<sub>BAT1</sub>* (mutante en el promotor de *BAT1* en la posición -150 / -141, se sustituyó el palíndromo GCCGGTACCGGC por aaaGGTACCaaa); *put3<sub>box</sub> P<sub>BAT1</sub>* (mutante en el promotor de *BAT1* en la posición -163 / -150, se sustituyó el palíndromo CGCTGGATAAGTACCG por aaaTGGATAAGTAAAA); *gata<sub>box</sub> P<sub>BAT2</sub>* (mutante en el promotor de *BAT2* en la posición -282, se sustituyó la caja GTTATC por GTTtgC); *leu3<sub>box</sub> P<sub>BAT2</sub>* (mutante en el promotor de *BAT2* en la posición -327, se sustituyó el palíndromo CCGCTTTCGG por CCGCTTTaaa); *put3<sub>box</sub> P<sub>BAT2</sub>* (mutante en el promotor de *BAT2* en la posición -347, se sustituyó la secuencia CGGCGTTCTTTTCGG por

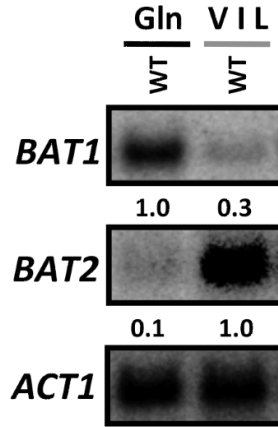
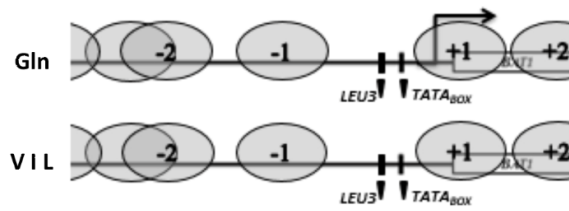
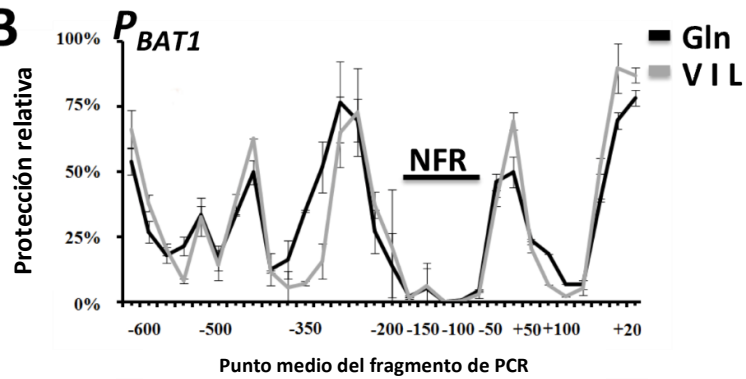
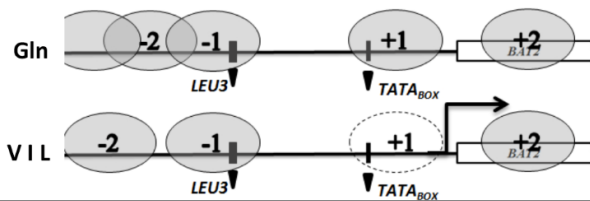
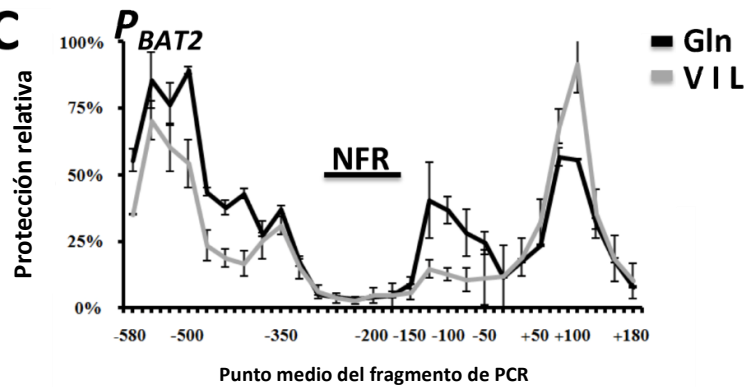
aaaCGTTCTTTTTCGG) (Tabla S10, ver ANEXO). Finalmente, la inserción correcta y el cambio de bases nitrogenadas se confirmó mediante secuenciación con el aparato Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer.



## 5. RESULTADOS

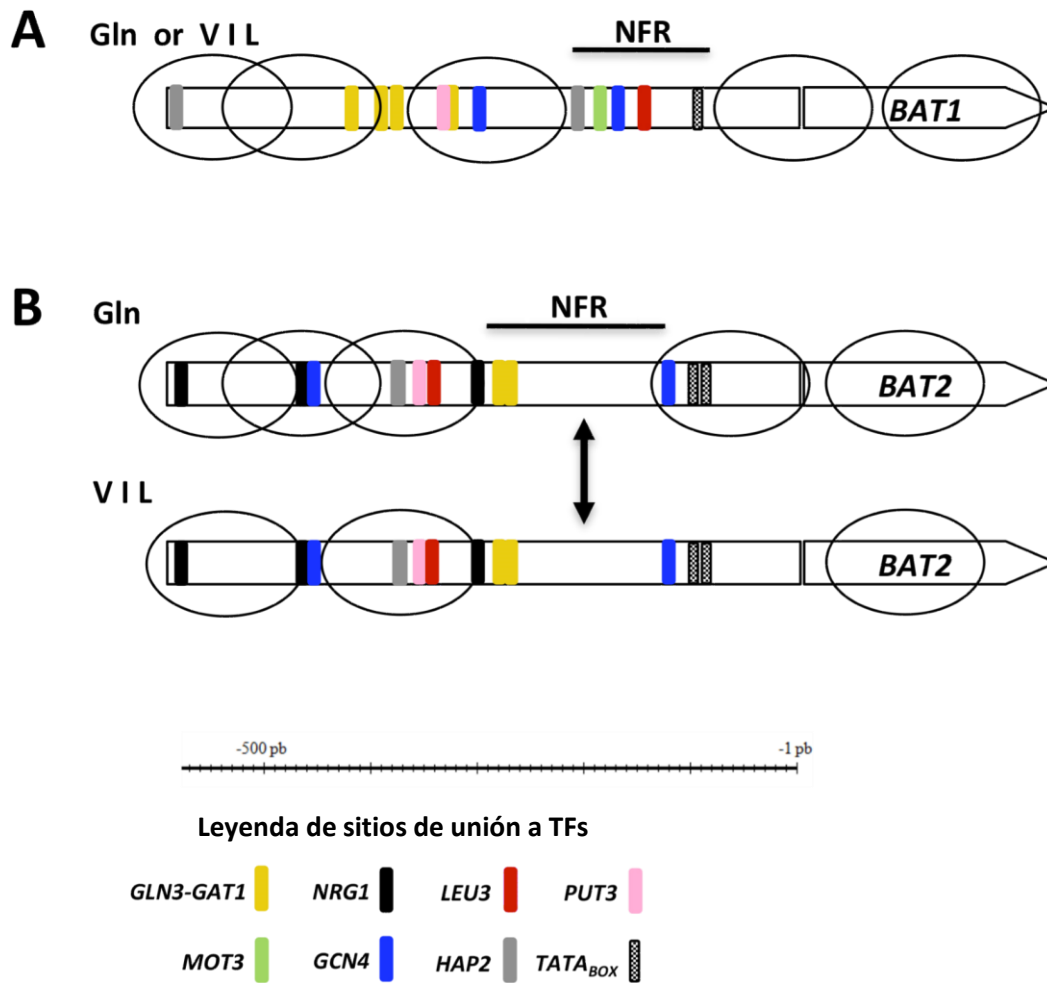
### 5.1. *BAT1* y *BAT2* muestran un perfil de expresión diferencial que es parcialmente determinado por la estructura de la cromatina

Estudios previos de nuestro grupo indican que la expresión de *BAT1* se induce cuando *S. cerevisiae* crece en glutamina (Gln), y se reprime cuando se cultiva en valina, isoleucina y leucina (VIL) como única fuente de nitrógeno. Por el contrario, la expresión de *BAT2* se induce en VIL, y se reprime en Gln como única fuente de nitrógeno (Colón *et al.*, 2011). Para determinar el papel de la estructura de la cromatina en la expresión diferencial de *BAT1* y *BAT2*, se analizó el posicionamiento de nucleosomas en ambos promotores en cultivos crecidos en Gln y VIL como única fuente de nitrógeno (Figura 4). Se extrajo ARN total de cada cultivo y se midió la expresión de ambos genes mediante análisis tipo Northern. En la Figura 4A se muestra el perfil de expresión opuesto de *BAT1* y *BAT2*. A partir de los cultivos anteriormente descritos se realizaron ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) como se describe en Materiales y Métodos. Los cultivos se trataron con formaldehído, se formaron esferoplastos y se incubaron con MNasa para digerir las regiones de ADN libres de nucleosomas. Se aislaron los fragmentos de ADN de ~150 pb que corresponden a los mononucleosomas. El ADN obtenido se utilizó para medir la protección relativa de cada promotor en ambas condiciones. La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo respectivamente con 30 o 29 pares de oligonucleótidos en los genes *BAT1* o *BAT2* (Tablas S5 y S6, ver ANEXO), para amplificar independientemente las regiones solapadas de ambos promotores. La cuantificación se realizó tomando en cuenta la relación entre el molde presente del ADN digerido por la MNasa sobre el ADN sin digerir de la región protegida del gen control *VCXI* como se describe en Materiales y Métodos. Utilizando este método se identificaron los picos de protección relativa a MNasa y la región libre de nucleosomas (NFR) del promotor de *BAT1* y *BAT2* (Figuras 4B-C). El posicionamiento de nucleosomas en el promotor (-1) y ORF (+1) comprende la región ~ -600 a +200 del gen *BAT1* (Figura 4B), y ~ -580 a +180 del gen *BAT2* (Figura 4C). Los picos de protección relativa indican que en Gln o VIL, cuatro nucleosomas están posicionados de forma similar alrededor del ATG de *BAT1* (-2, -1, +1 y +2) (Figura 4B), indicando que la expresión diferencial de *BAT1*, no requiere remodelación de la cromatina. El análisis de NuSA en el promotor *BAT2* en Gln reveló cuatro regiones protegidas por nucleosomas (-2, -1, +1 y +2) (Figura 4C).

**A****B****C**

**Figura 4.** El perfil de expresión opuesto de *BAT1* y *BAT2* es parcialmente determinado por la organización de la cromatina. **(A)** El análisis de Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa tipo silvestre (WT) de *S. cerevisiae* (Tabla 1). Los cultivos de levadura se crecieron a 0.5 de densidad óptica (OD<sub>600</sub>) en glucosa al 2% y glutamina (Gln, 7 mM) o Valina (V, 150 mg/l) + Isoleucina + (I, 30 mg/l) + (L, 100 mg/l) (VIL) como única fuente de nitrógeno. Los filtros fueron secuencialmente sondeados con los productos de PCR específicos del gen *BAT1* y *BAT2* como se describe en Materiales y Métodos. Un fragmento del gen *ACT1* de 1500 pb fue usado como control de carga. Los valores de los números representan la normalización (cociente) de la señal de *BAT1* o *BAT2* entre la señal del control de carga *ACT1*. **(B-C)** Para los ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA), se prepararon mononucleosomas de la cepa WT a partir de cultivos que fueron crecidos en Gln (línea negra) o VIL (línea gris) como se describe en la sección A de ésta figura. **(B)** El NuSA para *BAT1* incluye el 5' -600 pb de la región intergénica y el 3' +200 pb del ORF, **(C)** mientras que el NuSA para *BAT2* incluye el 5' -580 pb de la región intergénica y el 3' +180 pb del ORF. El ADN monucleosomal fue preparado y analizado mediante qPCR usando oligonucleótidos que se sobrepone uno en seguida del otro cada 50 pb aproximadamente cubriendo toda la región que se describió anteriormente. La protección relativa a MNasa de cada templado fue calculada con el valor obtenido de la región del gen control *VCX1*. Cada punto en la gráfica muestra el valor  $\pm$  del error estándar del promedio (SEM) de los últimos tres experimentos independientes que se muestran como el punto medio de cada producto de PCR. Las barras de error representan los rangos de los datos. Debajo de cada gráfica se esquematizan las regiones analizadas mediante NuSA, indicando el posicionamiento de los nucleosomas (óvalos grises), y la posición relativa (óvalos transparentes con el borde punteado) extrapolada de los datos obtenidos de la protección de MNasa. La región libre de nucleosomas se denota con NFR. Los rectángulos negros sobre cada promotor indican los sitios de unión a *LEU3* y *TATA<sub>BOX</sub>*. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

En Gln, el nucleosoma +1 (comprende la región -150 a -1) está posicionado sobre la *TATA<sub>BOX</sub>* y correlaciona con la represión de la expresión, mientras que en VIL, el nucleosoma +1 deja libre el acceso a la *TATA<sub>BOX</sub>* sugiriendo la inducción de la expresión en esta condición (Figura 4A y C). Los sitios de unión a TFs putativos que podrían actuar en el promotor *BAT1* y *BAT2*, se identificaron a través de un análisis *in silico* como se describe en Materiales y Métodos (Figuras S1 y S2, ver ANEXO). En la NFR del promotor de *BAT1* se identificaron los sitios de unión para *HAP2*, *MOT3*, *GCN4* y *LEU3* (Figura 5A). En el promotor de *BAT2* se encontró que los sitios *NRG*, *HAP2*, *LEU3*, *PUT3* están protegidos por nucleosomas tanto en Gln como en VIL, mientras que los sitios *GLN3-GATI* están expuestos en ambas condiciones, y sólo el sitio *GCN4* está accesible en VIL (Figura 5B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que sólo la regulación diferencial de *BAT2* en Gln o VIL puede verse afectada por la remodelación de la cromatina.



**Figura 5.** Identificación de sitios de unión a factores de transcripción en el promotor de *BAT1* y *BAT2*. El promotor de *BAT1* (A) y *BAT2* (B) contiene los sitios de unión a factores de transcripción (TFs) para; *HAP2*, *GLN3-GAT1*, *GCN4*, *LEU3*, *PUT3*, etc. En la parte inferior de la figura se observa la leyenda de los sitios de unión a TFs (rectángulos coloreados). Los óvalos sobre cada promotor corresponden a los nucleosomas posicionados fijamente en la condición de Gln o VIL. La flecha de doble cabeza indica que la estructura de la cromatina del promotor de *BAT2* puede estar cerrada (Gln) o abierta (VIL) dependiendo de la fuente de nitrógeno. La región libre de nucleosomas se denota con NFR. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

## 5.2. Los factores Gln3, Gcn4, Leu3 y Put3, determinan el perfil de expresión de *BAT1* y/o *BAT2*

Para analizar si los factores de transcripción (TFs) se unen a los sitios anteriormente descritos y juegan un papel en la expresión de *BAT1* y *BAT2*, se construyeron las mutantes nulas de los genes correspondientes: *GLN3-GAT1* (Blinder y Magasanik, 1995), *NRG1* (Zhou y Winston, 2001), *LEU3* (Kohlau 2003; Friden y Schimel, 1988), *PUT3* (Siddiqui y Brandriss 1989), *MOT3* (Martínez-Montanes *et al*, 2013), *GCN4* (Hinnebusch y Fink 1983; Hinnebusch 1984) y *HAP2* (Guarente *et al.*, 1984). El análisis de tipo Northern se llevó a cabo en muestras obtenidas a partir

de cultivos en los que se utilizaron Gln, GABA o VIL como únicas fuentes de nitrógeno. Como se muestra en la Figura S6 (ver ANEXO), las cepas mutantes *nrg1Δ*, *gat1Δ*, *hap2Δ* y *mot3Δ* mostraron perfiles de expresión de tipo silvestre *BAT1* y *BAT2*, lo que indica que bajo estas condiciones, estos TFs no desempeñaron ningún papel en la regulación transcripcional de *BAT1* o *BAT2*. Por el contrario, las mutantes *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *leu3Δ*, y *put3Δ* mostraron un efecto en la expresión de *BAT1* y *BAT2* (Figuras 8A y 9A).

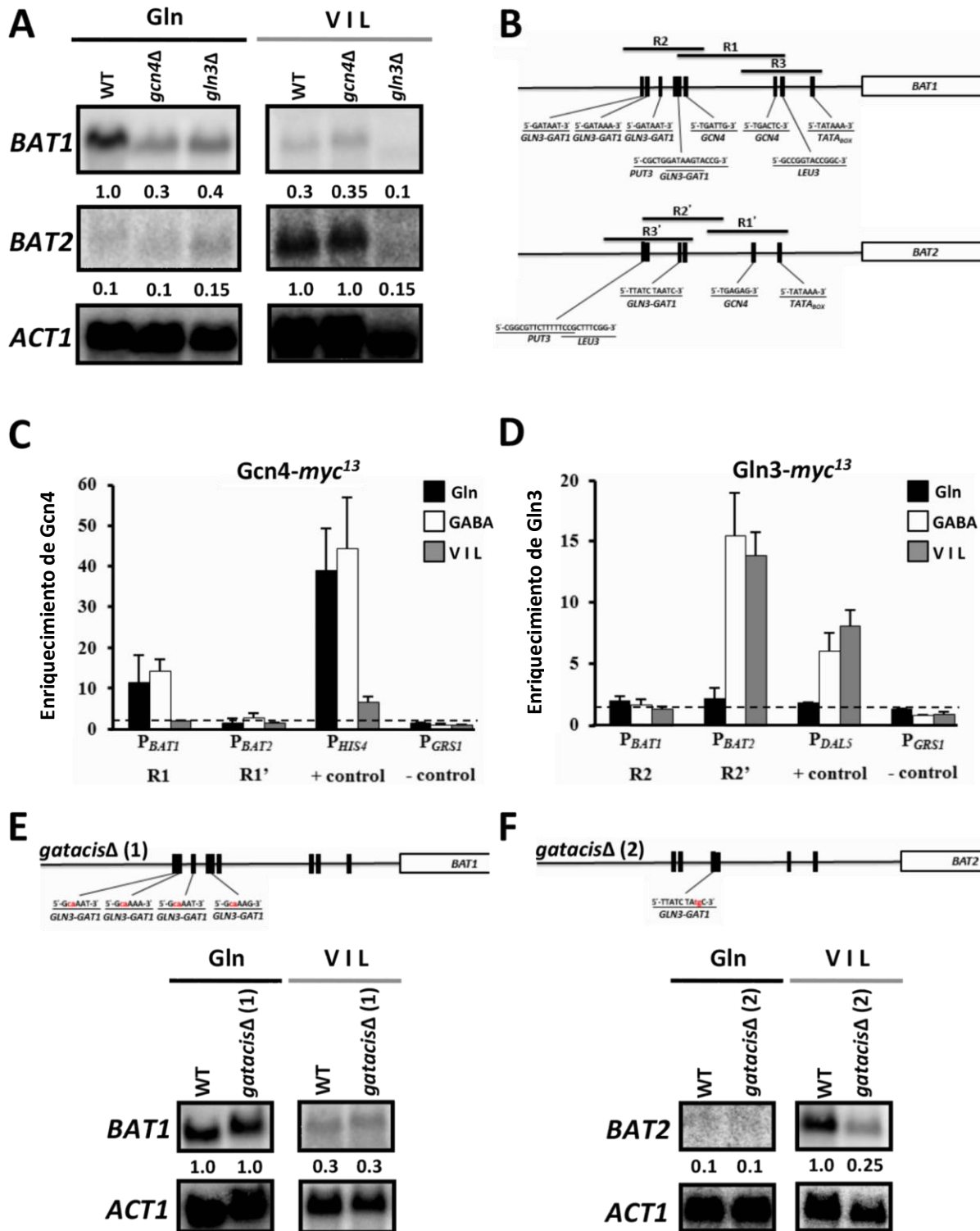
### 5.3. El papel de los factores Gcn4 y Gln3 en el perfil de expresión de *BAT1* y/o *BAT2*

Se realizó un análisis tipo Northern en muestras de ARN total de células cultivadas en Gln. Se encontró que Gcn4 y Gln3 muestran un efecto positivo sobre la activación transcripcional de *BAT1*, sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la expresión de *BAT2* (Figura 6A). Cuando los cultivos se crecen en VIL, Gln3 desempeñó un papel positivo en la expresión de *BAT1*; pero no mostró ningún efecto sobre la expresión de *BAT2*. Por otra parte, Gcn4 no mostró ningún efecto en la expresión *BAT1* o *BAT2* en esta misma condición (Figura 6A).

Para determinar si Gln3 y Gcn4 actúan de manera directa en el promotor *BAT1* y *BAT2*, se realizaron ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de cromatina (qChIP) como se describe en Materiales y Métodos. Para este propósito, se construyeron las cepas isogénicas *Gcn4-myc<sup>13</sup>* y *Gln3-myc<sup>13</sup>* (ver Materiales y Métodos), y se evaluó su capacidad para sostener la misma expresión que la de tipo silvestre (Figura S7, ver ANEXO). Se amplificaron tres regiones distintas en el promotor de *BAT1* (Figura 6B, R1-R3) o de *BAT2* (Figura 6B, R1'-R3) mediante qChIP. Los resultados mostraron que *Gcn4-myc<sup>13</sup>* se une al promotor de *BAT1*, pero no al promotor de *BAT2* bajo esta condición (Figura 6C), estos datos correlacionan con lo que se observó en el análisis de expresión de *BAT2* en la mutante *gcn4Δ* (Figura 6A). Sin embargo, más adelante se demuestra que Gcn4 sí se une al promotor de *BAT2* a consecuencia del aumento de la concentración de Gcn4, provocado por una deprivación de aminoácidos que se genera en la mutante *leu3Δ* (Figura 9B y Tabla 3). Como control positivo, se verificó el pegado de *Gcn4-myc<sup>13</sup>* al promotor de *HIS4*. Se observó que *Gcn4-myc<sup>13</sup>* se une al promotor de *HIS4* en extractos de cultivos crecidos Gln y GABA; no obstante, en VIL la unión fue escasa en comparación con Gln o GABA. Se ha demostrado que la concentración de Gcn4 está estrechamente regulada a través de la acción combinada de un mecanismo complejo de control de la traducción, que induce la síntesis de Gcn4 cuando las células están en inanición, y la vía de fosforilación y

ubiquitinación que media su rápida degradación por el proteasoma (Hinnebusch 2005; Rawal *et al.*, 2014). Sin embargo, la abundancia de Gcn4 no se ha determinado en cultivos crecidos en VIL como única fuente de nitrógeno, y no hay evidencia que sugiera la degradación preferencial de Gcn4 bajo esta condición. Por lo tanto, la observación descrita en la Figura 6C en VIL podría atribuirse al hecho de que en presencia de leucina, la traducción del ARN mensajero de *GCN4* dependiente de TOR1C está alterada (Valenzuela *et al.*, 2001; Kingsbury *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros resultados indican que Gcn4-*myc*<sup>13</sup> está unido a los promotores de *BAT1* y *HIS4* en Gln y GABA, lo que confirma que el promotor de *BAT1* es blanco directo de Gcn4.

Como era de esperarse, se encontró que Gln3-*myc*<sup>13</sup> se une al promotor de *BAT2* sólo en presencia de fuentes secundarias de nitrógeno como GABA o VIL (Figura 6D) (Courchesne y Magasanik 1988). Lo anterior se correlaciona con la disminución de la expresión de *BAT2* en la mutante *gln3Δ* (Figura 6A). Por el contrario, Gln3 no se une al promotor de *BAT1* en ninguna de las condiciones probadas; no obstante, la expresión de *BAT1* se regula positivamente por Gln3 tanto en Gln como VIL (Figuras 8A y D), sugiriendo una regulación indirecta. Se utilizó la estrategia de *DELITTO PERFETTO* para analizar a detalle la regulación indirecta de Gln3 sobre la expresión de *BAT1*. Se realizaron mutaciones específicas en los sitios de unión a *GLN3* en los promotores de *BAT1* y *BAT2*. La mutación en el sitio de unión a *GLN3* (GATAAG) (Byasani *et al.*, 1991) situado en el promotor de *BAT2* dio como resultado la disminución de la expresión *BAT2* (Figura 6F). Para el promotor de *BAT1*, se realizó una mutante simultánea en los cuatro sitios de unión a *GLN3*; sin embargo, la expresión de *BAT1* no disminuyó (Figura 6E). Por lo tanto, la activación transcripcional de *BAT1* en Gln o VIL es indirectamente mediada por Gln3, mientras que la activación transcripcional de *BAT2* es regulada directamente a través de Gln3 (Figura 6A).



**Figura 6.** Papel de Gcn4 y Gln3 en la activación transcripcional de *BAT1* o *BAT2*. (A) El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *gcn4Δ* y *gln3Δ* (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln y VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR del gen *BAT1* y *BAT2* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. (B) Representación esquemática de las regiones promotoras seleccionadas para amplificar mediante PCR cuantitativo (qPCR) después de realizar los ensayos de

inmunoprecipitación de cromatina (qChIP). Las regiones amplificadas en el qChIP se señalan con R1, R2, R3 para el promotor de *BAT1*, y R1', R2', R3' para el promotor de *BAT2*. (C-D) Los ensayos qChIP se realizaron usando el anticuerpo anti-Myc en los extractos obtenidos de las cepas WT que contienen al gen *Gcn4* o *Gln3* fusionado a la secuencia que codifica para el epítipo myc13 (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln (barra negra), GABA (barra blanca) y VIL (barra gris) como se describe en Materiales y Métodos. El enriquecimiento de Gcn4 (C) y Gln3 (D) en cada promotor se analizó como se describe en Materiales y Métodos. El promotor *GRS1* se utilizó como control negativo, mientras que los promotores *HIS4* y *DAL5* se utilizaron como controles positivos, respectivamente. Los datos representados con su error estándar, son el promedio de tres experimentos independientes. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. (E-F) Representación esquemática de los elementos en *cis* (*Gln3-GAT1*) mutados en el promotor de *BAT1* o *BAT2*. El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *gln3cisΔ* (Tabla 1). Las cepas se cultivaron en Gln (línea negra) o añadiendo VIL (línea blanca) como se describe en Materiales y Métodos. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

#### **5.4. Los factores Put3 y Leu3 juegan un papel fundamental en la regulación opuesta de *BAT1* y *BAT2***

Para analizar el papel de Put3 y Leu3 en la expresión de *BAT1* y *BAT2*, se preparó ARN total a partir de células cultivadas con Gln. Se encontró que Leu3 determina la activación transcripcional de *BAT1* (Figura 7A) como previamente se había descrito (Boer *et al.*, 2005). Sin embargo, se detectó que la falta de Leu3 induce la expresión de *BAT2* (Figura 7A), sugiriendo que Leu3 podría reprimir la expresión de *BAT2* en Gln. En esta misma condición, se encontró que Put3 no juega un papel en el perfil de expresión de *BAT1* o *BAT2* (Figura 7A).

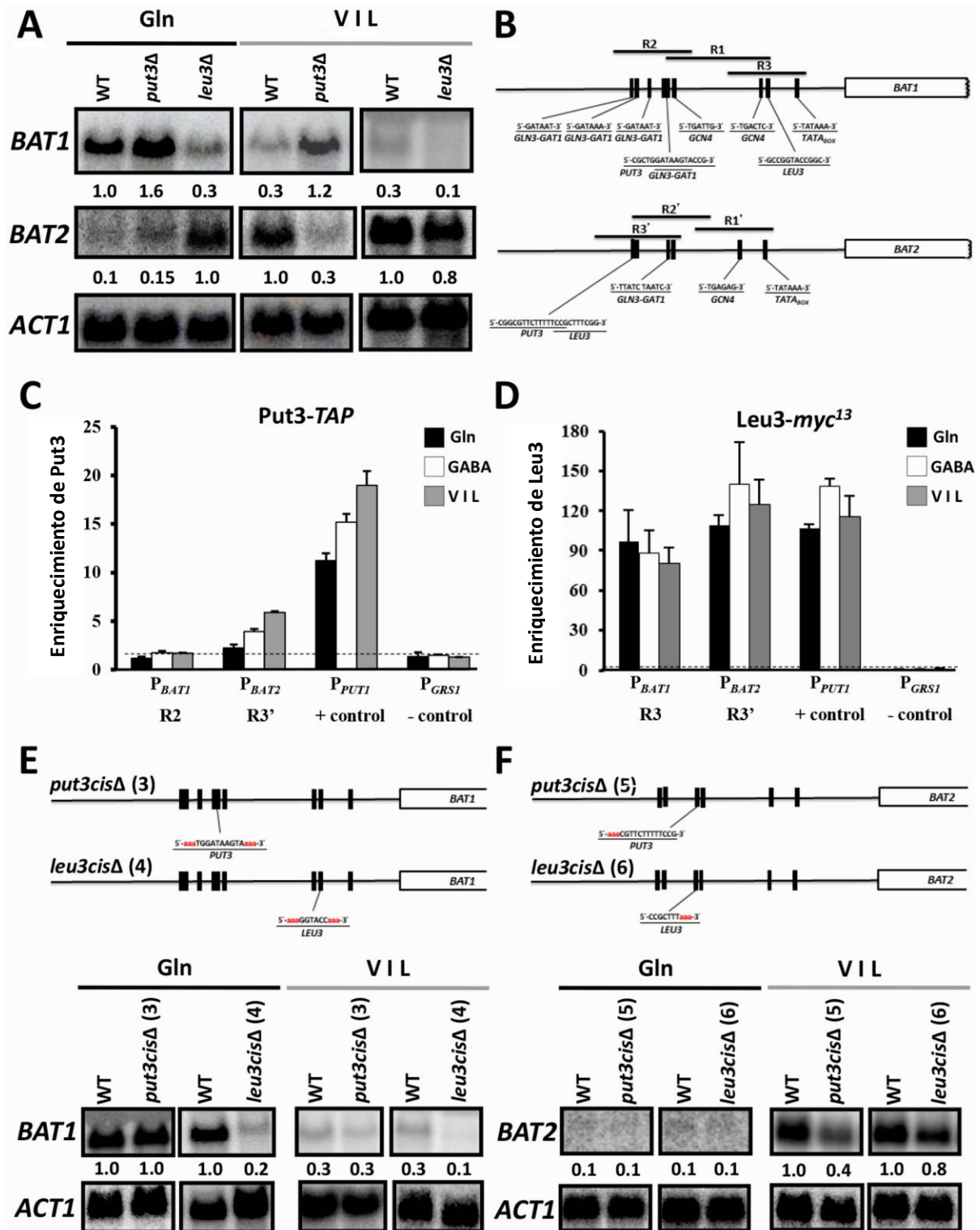
Por otra parte, el análisis de Northern en VIL mostró que la expresión de *BAT1* se reprime. Sin embargo, la expresión de *BAT1* se induce hasta cuatro veces en una mutante *put3Δ* en comparación con la WT, indicando que este factor puede desempeñar un papel negativo en la activación transcripcional de *BAT1* (Figura 7A). De manera opuesta, la expresión de *BAT2* se activa por Put3 (Figura 7A).

Para analizar si Put3 y Leu3 actúan de manera directa en los promotores de *BAT1* y *BAT2*, se llevaron a cabo ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de cromatina (qChIP) como se describe en Materiales y Métodos. Se construyó la cepa *Leu3-myc<sup>13</sup>* (Materiales y Métodos), y la cepa *Put3-TAP* se obtuvo de la colección *TAP* de *S. cerevisiae* (Tabla 1). En ambas cepas se evaluó la capacidad para mantener la misma expresión que se observó en la WT (Figura S7, ver ANEXO). Tal como se describió para los ensayos qChIPs de Gcn4 y Gln3, se seleccionaron tres regiones diferentes en el promotor de *BAT1* (Figura 7B, R1 - R3) y *BAT2* (Figura 7B, R1' - R3') para analizar el pegado de Put3 y Leu3. Se encontró que *Put3-TAP* se une al promotor de *BAT2* en GABA y VIL (Figura 7C), indicando que la activación transcripcional de *BAT2* depende de la



acción directa de Put3. Sin embargo, Put3 no se une al promotor de *BAT1* en ninguna de las condiciones probadas (Figura 7C), lo que indica que el efecto negativo que ejerce este factor sobre la expresión de *BAT1* es indirecto (Figura 7A). Como control positivo, se verificó el pegado de Put3 en el promotor de *PUT1* como se describe previamente (Siddiqui y Brandriss 1989). El promotor de *GRS1* se utilizó como control negativo en el qChIP de Put3-TAP. Por otra parte, se analizó el pegado de Leu3 en el promotor de *BAT1* y *BAT2* en Gln, GABA y VIL (Figura 7D), indicando que Leu3 permanece pegado en ambos promotores en cualquiera de las condiciones probadas. Como control positivo, se verificó el pegado de Leu3 al promotor de *ILV5* como se describe previamente (Friden y Schimmel 1988), y el promotor de *GRS1* se usó como control negativo.

Para analizar a detalle si los factores Put3 y Leu3 actúan directamente en el promotor de *BAT1* y *BAT2*, también se utilizó la estrategia de *DELITTO PERFETTO* para realizar mutaciones puntuales en los sitios de unión a TFs de los promotores *BAT1* y *BAT2* como se describe en Materiales y Métodos. La mutación en el sitio de unión a *LEU3* del promotor de *BAT1* mostró un fenotipo idéntico al de la mutante *leu3Δ*; es decir, ambas mutaciones disminuyen la expresión de *BAT1* en Gln y VIL (Figuras 9A y E). Por el contrario, la mutación en el sitio de unión a *LEU3* del promotor de *BAT2*, no resultó igual que el de la mutante *leu3Δ* en Gln, lo que sugiere un efecto indirecto (Figuras 9A y F). Por otra parte, la mutación en el sitio de unión a *PUT3* del promotor de *BAT1*, no resultó como en la mutante *put3Δ* en VIL, lo que indica un efecto indirecto (Figuras 9A y E). Sin embargo, una mutación en el sitio de unión a *PUT3* del promotor de *BAT2* resultó en la disminución de la expresión de *BAT2* al igual que en la mutante *put3Δ* indicando regulación directa (Figuras 9A y F). Estos resultados permiten concluir que la regulación negativa de *BAT1* y *BAT2* mediante la acción de Put3 o Leu3, respectivamente, es indirecta, mientras que la regulación positiva de *BAT1* y *BAT2* por Leu3 y Put3 es directa.



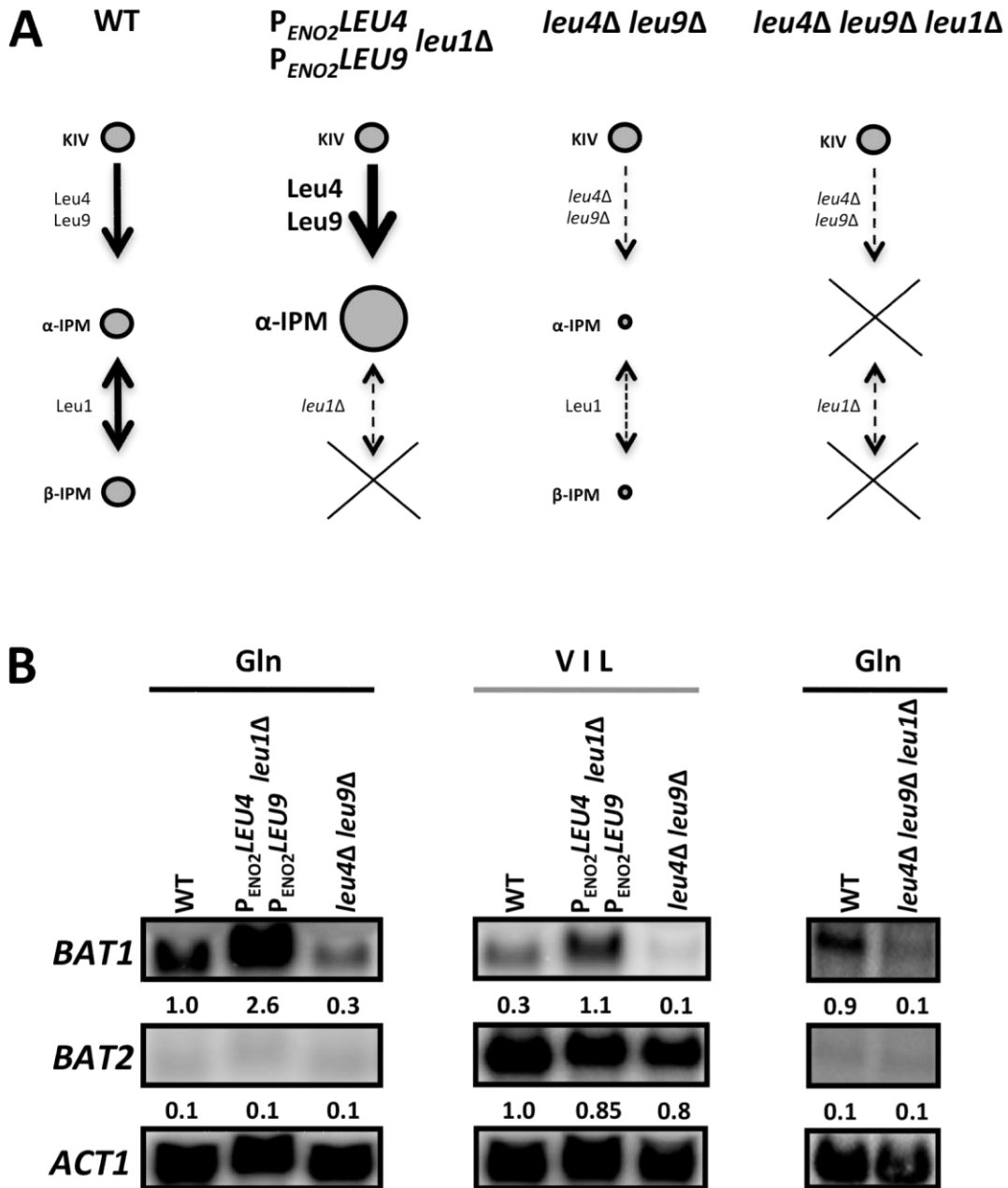
**Figura 7.** Papel de Put3 y Leu3 en la activación transcripcional de *BAT1* o *BAT2*. (A) El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *put3Δ* y *leu3Δ* (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln y VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR del gen *BAT1* y *BAT2* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. (B) Representación esquemática de las regiones

promotoras seleccionadas para amplificar mediante PCR cuantitativo (qPCR) después de realizar los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (qChIP). Las regiones amplificadas en el qChIP se señalan con R1, R2, R3 para el promotor de *BAT1*, y R1', R2', R3' para el promotor de *BAT2*. (C-D) Los ensayos qChIP se realizaron usando el anticuerpo anti-TAP en el extracto obtenido de la cepa WT que contiene al gen *PUT3* fusionado a la secuencia que codifica para el epítipo TAP (Tabla 1). Los ensayos de qChIP en la cepa *Leu3-myc* se realizaron como se describe en la Figura 4C-D. Los cultivos celulares se crecieron en Gln (barra negra), GABA (barra blanca) y VIL (barra gris) como se describe en Materiales y Métodos. El enriquecimiento de Put3 (C) y Leu3 (D) en cada promotor se analizó como se describe en Materiales y Métodos. El promotor *GRS1* se utilizó como control negativo, mientras que los promotores *PUT1* e *ILV5* se utilizaron como controles positivos, respectivamente. Los datos representados con su error estándar, son el promedio de tres experimentos independientes. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. (E-F) Representaciones esquemáticas de los elementos en *cis* (*PUT3* o *LEU3*) mutados en el promotor de *BAT1* o *BAT2*. El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *put3cisΔ* y *leu3cisΔ* (Tabla 1). Las cepas se cultivaron en Gln (línea negra) o añadiendo VIL (línea blanca) como se describe en Materiales y Métodos. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

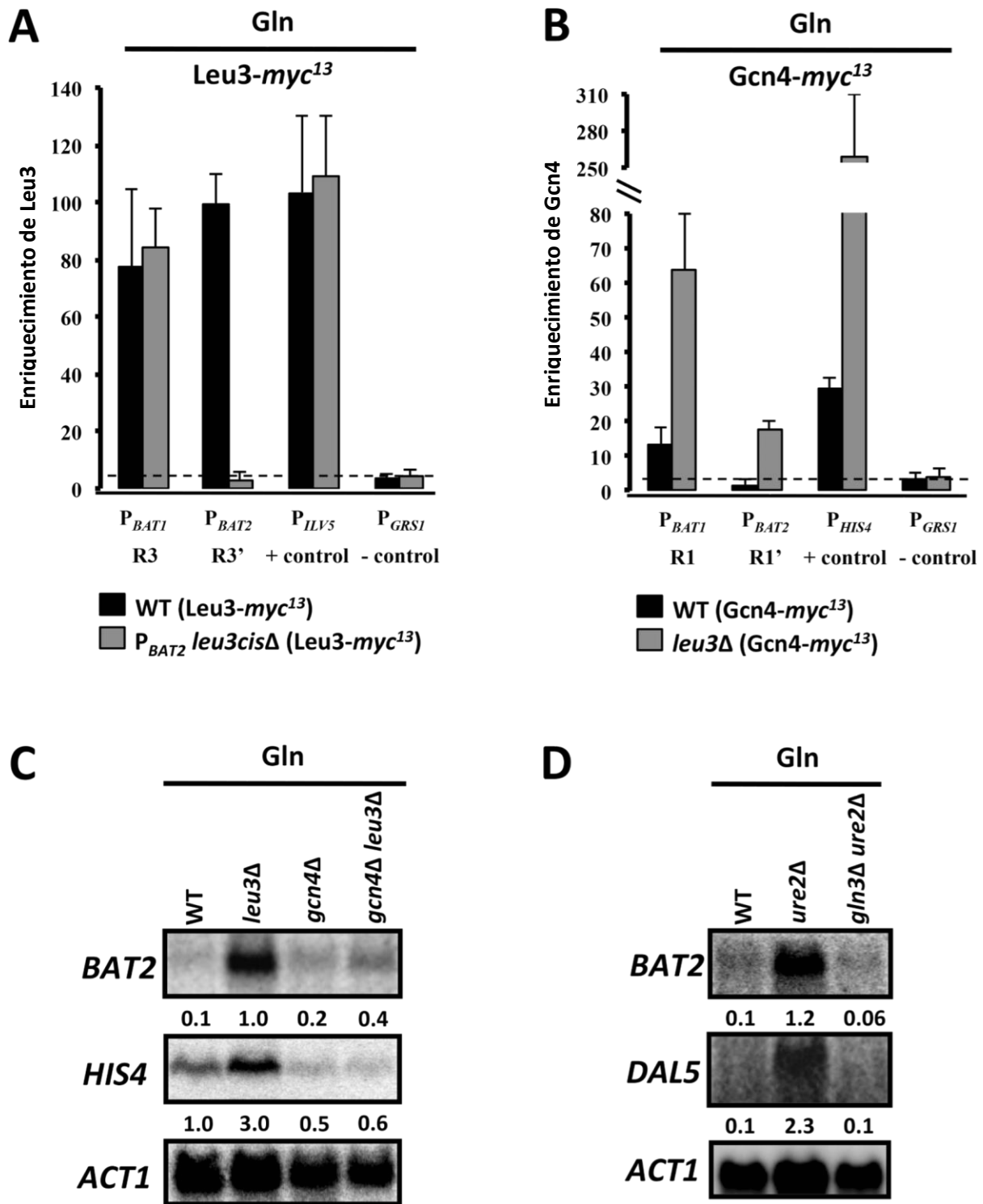
### **5.5. En condiciones biosintéticas (Gln) el complejo Leu3- $\alpha$ -IPM activa la expresión de *BAT1*, mientras que el factor Gcn4 y/o Gln3 activa la expresión de *BAT2***

Nuestros resultados plantean una paradoja interesante en relación con el papel de Leu3 en la regulación transcripcional opuesta de *BAT1* y *BAT2*. Se mostró que en presencia de Gln como única fuente de nitrógeno, Leu3 puede activar o reprimir la expresión de génica (Figura 7A). Estos resultados aparentemente contradicen el modo de acción propuesto para Leu3 como regulador transcripcional (Sze *et al.*, 1992). El modelo considera que en una condición fisiológica dada, la formación del dímero Leu3 actúa como represor de la transcripción, mientras que la presencia de  $\alpha$ -IPM permite la formación del complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM, que determina la inducción de sus genes blanco (Figura 3). Sin embargo, nuestros resultados muestran que en Gln, la ausencia de Leu3 provoca una respuesta opuesta en la expresión de *BAT1* y *BAT2* (Figura 7A). Para analizar lo anterior, se utilizó una cepa que sobreproduce  $\alpha$ -IPM (López *et al.*, 2015). Para evitar el catabolismo de  $\alpha$ -IPM en la cepa que sobreproduce  $\alpha$ -IPM, se mutó el gen *LEU1* que codifica para la  $\beta$ -isopropilmalato sintasa ( $\beta$ -IPM) (Figura 8A), la única enzima que realiza esta función en *S. cerevisiae*. Además, se construyó la doble mutante *leu4Δ leu9Δ* que no sintetiza  $\alpha$ -IPM (Figura 8A), y la triple mutante *leu4Δ leu9Δ leu1Δ* que no sintetiza, ni cataboliza  $\alpha$ -IPM (Figura 8A) a través de la vía Bat2-Leu2-Leu1 (Figura 3). La expresión de *BAT1* y *BAT2* se analizó en estas cepas mediante Northern (Figura 8B). Cuando los cultivos se crecen en Gln, la expresión de *BAT1* incrementa en la cepa que sobreproduce  $\alpha$ -IPM (*P<sub>ENO2</sub>LEU4 P<sub>ENO2</sub>LEU9 leu1Δ*) en comparación con la tipo silvestre (WT). En VIL, la expresión de *BAT1* se reprime (WT) por la presencia de leucina que inhibe las  $\alpha$ -IPMS (Figura 3); no obstante, la

inducción de *BAT1* sólo se logra en la cepa  $P_{ENO2}LEU4 P_{ENO2}LEU9 leu1\Delta$  bajo esta misma condición (Figura 8B). Las mutantes *leu4* $\Delta$  *leu9* $\Delta$  y *leu4* $\Delta$  *leu9* $\Delta$  *leu1* $\Delta$  son incapaces de sintetizar  $\alpha$ -IPM, y por lo tanto, la transcripción de *BAT1* no se activa (Figura 8B). Estos resultados demuestran que la activación transcripcional de *BAT1* es dependiente de la formación del complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM. Por el contrario, *BAT2* se reprime en Glu en cualquiera de las cepas construidas ( $P_{ENO2}LEU4 P_{ENO2}LEU9 leu1\Delta$ , *leu4* $\Delta$  *leu9* $\Delta$  y *leu4* $\Delta$  *leu9* $\Delta$  *leu1* $\Delta$ ) sin ningún cambio aparente con respecto a la WT. En VIL, se demostró que *BAT2* se induce (WT) y no hay cambios en su expresión en las cepas construidas. Lo anterior indica que la regulación transcripcional de *BAT2* no depende del modelo canónico que se ha propuesto para Leu3 (Sze *et al.*, 1992), dado que la expresión de *BAT2* en Glu o VIL no responde a los niveles de  $\alpha$ -IPM. Estos resultados en conjunto sugieren que la abundancia de  $\alpha$ -IPM permite la formación del complejo Leu3- $\alpha$ -IPM que determina directamente la expresión de *BAT1*, mientras que la regulación negativa dependiente de Leu3 en *BAT2* (Figura 7A), podría ser indirecta y provocada por la acción de un regulador positivo cuya función sólo es evidente en la mutante *leu3* $\Delta$ . Para demostrar que Leu3 regula indirectamente la represión de *BAT2* en Glu, se realizaron ensayos de qChIP usando anticuerpos anti-Myc en extractos preparados a partir de cultivos de la cepa *LEU3-myc*<sup>13</sup> *leu3*<sub>box</sub> como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 9A se muestra que Leu3 no se une al promotor de *BAT2* al mutar sitio de unión a *LEU3*, confirmando la acción indirecta de Leu3 en la expresión de *BAT2*.



**Figura 8.** La expresión de *BAT1* está determinada por los niveles del metabolito  $\alpha$ -IPM. (A) Representación esquemática de los niveles del  $\alpha$ -IPM en las cepas; WT,  $P_{ENO2}LEU4$   $P_{ENO2}LEU9$  *leu1Δ*, *leu4Δ leu9Δ*, y *leu4Δ leu9Δ leu1Δ*. (B) El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes  $P_{ENO2}LEU4$   $P_{ENO2}LEU9$  *leu1Δ*, *leu4Δ leu9Δ*, y *leu4Δ leu9Δ leu1Δ* (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln y VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR del gen *BAT1* y *BAT2* descritos en Materiales y Métodos. Se utilizó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.



**Figura 9.** La inducción de la expresión de *BAT2* está determinada indirectamente por la ausencia de Leu3 o Ure2. (A-B) Los ensayos qChIP se realizaron usando el anticuerpo anti-Myc en los extractos obtenidos de las cepas; WT (*Leu3-myc<sup>13</sup>*) y *P<sub>BAT2</sub> leu3cisΔ* (*Leu3-myc<sup>13</sup>*), WT (*Gcn4-myc<sup>13</sup>*) y *leu3Δ* (*Gcn4-myc<sup>13</sup>*) (Tabla 1). Las regiones analizadas en cada qChIP están señaladas con R3, R3', R1 y R1' como se indican en la Figura 6B y Figura 7B. (C-D) Los ensayos de qChIP se realizaron como se describe en la Figura 6C y Figura 7D. Los cultivos celulares se crecieron en Gln como se describe en Materiales y Métodos. El enriquecimiento de Leu3 (A) o Gcn4 (B) en cada

promotor se analizó en la cepa WT (barras negras) y en las mutantes (barras grises) como se describe en Materiales y Métodos. El promotor *GRS1* se utilizó como control negativo, mientras que los promotores *ILV5* y *HIS4* se utilizaron como controles positivos, respectivamente. Los datos representados con su error estándar son el promedio de tres experimentos independientes. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. (C-D) El análisis de Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *leu3Δ*, *gcn4Δ*, *gcn4Δ leu3Δ* (C), o WT y *ure2Δ*, *gln3Δ ure2Δ* (D) (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR de los genes *BAT2*, *HIS4* o *DAL5* descritos en Materiales y Métodos. Se usó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

Para analizar el papel indirecto de Leu3 en la represión de *BAT2* en Gln, se construyó la doble mutante *gcn4Δ leu3Δ* como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó un análisis de Northern en muestras de ARN total preparadas a partir de células crecidas en Gln. La Figura 9C muestra que *BAT2* se desreprime en una mutante *leu3Δ*; no obstante, este efecto se anula en la doble mutante *gcn4Δ leu3Δ*. Por tanto, el efecto de “represión” en la expresión de *BAT2* dependiente de Leu3 es el resultado de la acción positiva de Gcn4 cuyo fenómeno ocurre exclusivamente en una mutante *leu3Δ*. Teniendo en cuenta que el complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM regula positivamente varios genes biosintéticos como *BAT1*, *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV5* (Boer *et al.*, 2005) y *GDH1* (Hu *et al.*, 1995) (Figura 3), es probable que en una mutante *leu3Δ* se provoque una deprivación de aminoácidos, y en efecto, como se muestra la Tabla 3, las pozas de valina, leucina, ácido glutámico, alanina e histidina disminuyen en una mutante *leu3Δ* (OD<sub>600</sub>= 0,3) en comparación con las pozas de la cepa WT.

**Table 3.** En la mutante *leu3Δ* se observa deprivación de aminoácidos cuando los cultivos se crecen en Gln.

Pozas de aminoácidos (nmol x 10 <sup>8</sup> células)	OD <sub>600</sub> 0.3		OD <sub>600</sub> 0.6	
	WT	<i>leu3Δ</i>	WT	<i>leu3Δ</i>
Valina	1,4	0,64	0,71	0,97
Isoleucina	0,62	0,51	0,41	0,57
Leucina	1,07	0,73	0,69	0,72
Glutámico	30,63	8,89	16,26	15,25
Alanina	25,08	5,99	13,58	6,39
Histidina	8,21	4,09	4,23	5,74
Asparagina	0,39	0,43	0,25	0,43
Arginina	1,91	2,44	1,37	2,62
Lisina	1,77	4,5	1,22	9
Triptófano	0,23	0,23	0,19	0,17

Por otra parte, se observó que la expresión de *BAT2* se reprime en Gln, y se induce en VIL, sugiriendo que *BAT2* puede ser un gen regulado por represión catabólica nitrogenada (NCR) (Blinder y Magasanik 1995, Coffman *et al.*, 1995, Courchesne y Magasanik 1988, Minehart y Magasanik 1991). Teniendo en cuenta que los genes que están sujetos a NCR están regulados negativamente por Ure2, se analizó si este factor juega un papel en la expresión *BAT2*. Como se muestra en el análisis de Northern de la Figura 9D, *BAT2* se desreprime en la mutante *ure2Δ*; sin embargo, la desrepresión de *BAT2* no se observa en la doble mutante *gln3Δ ure2Δ*, lo que indica que la represión de *BAT2* está mediada por el modulador negativo Ure2 a través del regulador positivo Gln3. Como control positivo, medimos la expresión de *DAL5* (un gen regulado por NCR). Lo anterior indica que NCR controla el perfil de expresión de *BAT2* (Figura 9D).

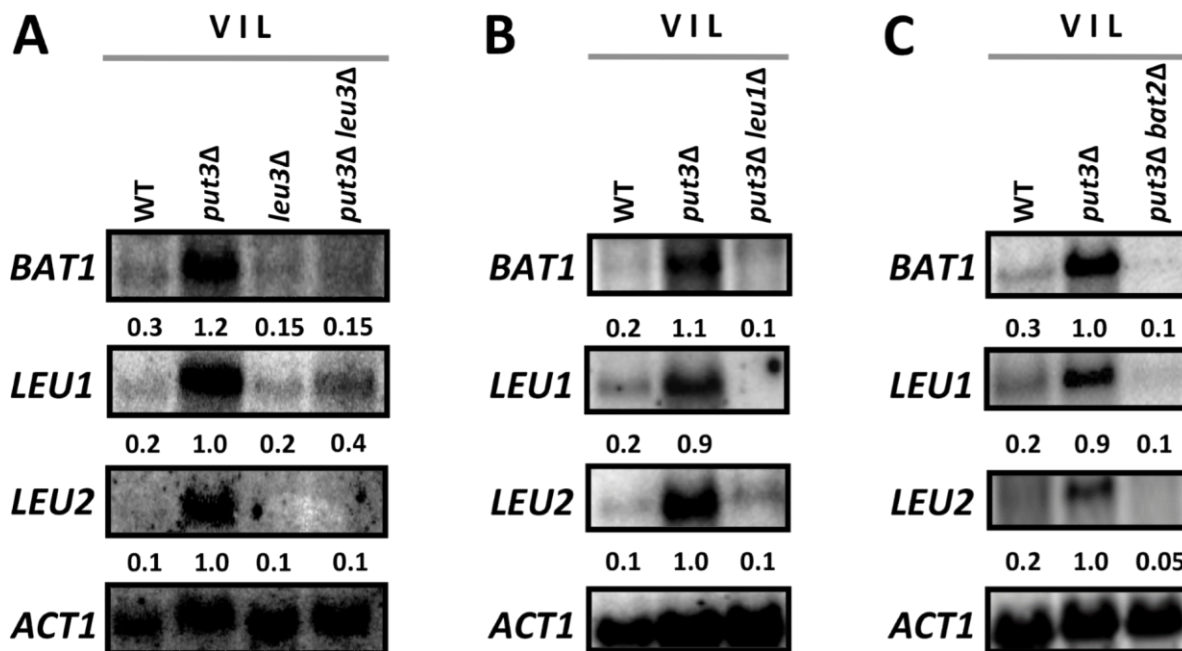
### **5.6. En condiciones catabólicas (VIL) el factor Put3 reprime la expresión de *BAT1* a través de un efecto indirecto negativo**

Los resultados que se muestran en la Figura 7 indican que Put3 puede actuar como un regulador positivo (*BAT2*) o negativo (*BAT1*). El mecanismo canónico de regulación transcripcional que se ha reportado para Put3, es que activa o reprime los genes implicados en la utilización de prolina. Se ha demostrado que Put3 está constitutivamente unido a los promotores de *PUT1* y *PUT2* independientemente de la fuente de nitrógeno (Brandriss 1987). Sin embargo, Put3 sólo activa a estos genes en presencia de prolina u otras fuentes secundarias de nitrógeno mediante un cambio conformacional (Axelrod *et al.*, 1991). Por otra parte, se ha comprobado que Put3 tiene diferentes niveles de fosforilación en función de la calidad de la fuente de nitrógeno que mejoran su capacidad de activación (Huang y Brandriss 2000).

Nuestros resultados indican que la acción negativa de Put3 en la expresión de *BAT1* es indirecta dado que Put3 no se une al promotor *BAT1* (Figura 7C), ni se afecta la expresión cuando se muta el sitio de unión a *PUT3* en el promotor de *BAT1* (Figura 7E). Por lo tanto, Put3 regula de manera indirecta la activación transcripcional de *BAT1* en condiciones catabólicas (VIL). Teniendo en cuenta que el complejo Leu3- $\alpha$ -IPM activa la transcripción de *BAT1* preferentemente en la condición biosintética (Figura 8B) y que esto podría constituir la señal positiva que activa la transcripción de *BAT1* en la mutante *put3Δ* en VIL, se construyó la doble mutante *put3Δ leu3Δ* como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó un análisis de



Northern de muestras de ARN total preparadas a partir de células crecidas en VIL como única fuente de nitrógeno. Se demostró que la desrepresión de *BAT1* dependiente de Put3, ya no se observa en la doble mutante *put3Δ leu3Δ* (Figura 10A). Por lo tanto, es probable que la ausencia de Put3 permita la formación del complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM. Como control positivo, se midió la expresión de *LEU1* y *LEU2* (genes que se activan mediante el complejo Leu3- $\alpha$ -IPM) en las mismas mutantes. Se observó que *LEU1* y *LEU2* se desreprimen en una mutante *put3Δ*, y que esta desrepresión también es dependiente de Leu3 (Figura 10A). Estos datos sugieren que en una mutante *put3Δ* en presencia de VIL, la leucina podría metabolizarse hasta  $\alpha$ -IPM a través de la acción consecutiva de Bat2-Leu2-Leu1 (Figura 3, flechas azules), permitiendo recuperar la formación del complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM.



**Figura 10.** La transcripción de *BAT1* se activa mediante el  $\alpha$ -IPM que se genera vía Bat2-Leu2-Leu1 en una mutante *put3Δ*. (A-C) El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *put3Δ*, *leu3Δ*, *put3Δ leu3Δ* (A), *put3Δ leu1Δ* (B), *put3Δ bat2Δ* (C) (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR de los genes *BAT1*, *LEU1* y *LEU2* descritos en Materiales y Métodos. Se usó un fragmento de PCR del gen *ACT1* de 1500 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

Para abordar la cuestión del mecanismo que determina el papel negativo de Put3 en VIL, decidimos verificar si el promotor de *LEU1* tiene un sitio de unión a *PUT3* mediante el cual pudiera regular la expresión de *LEU1* de manera negativa (Figura S8), y en efecto, se encontró

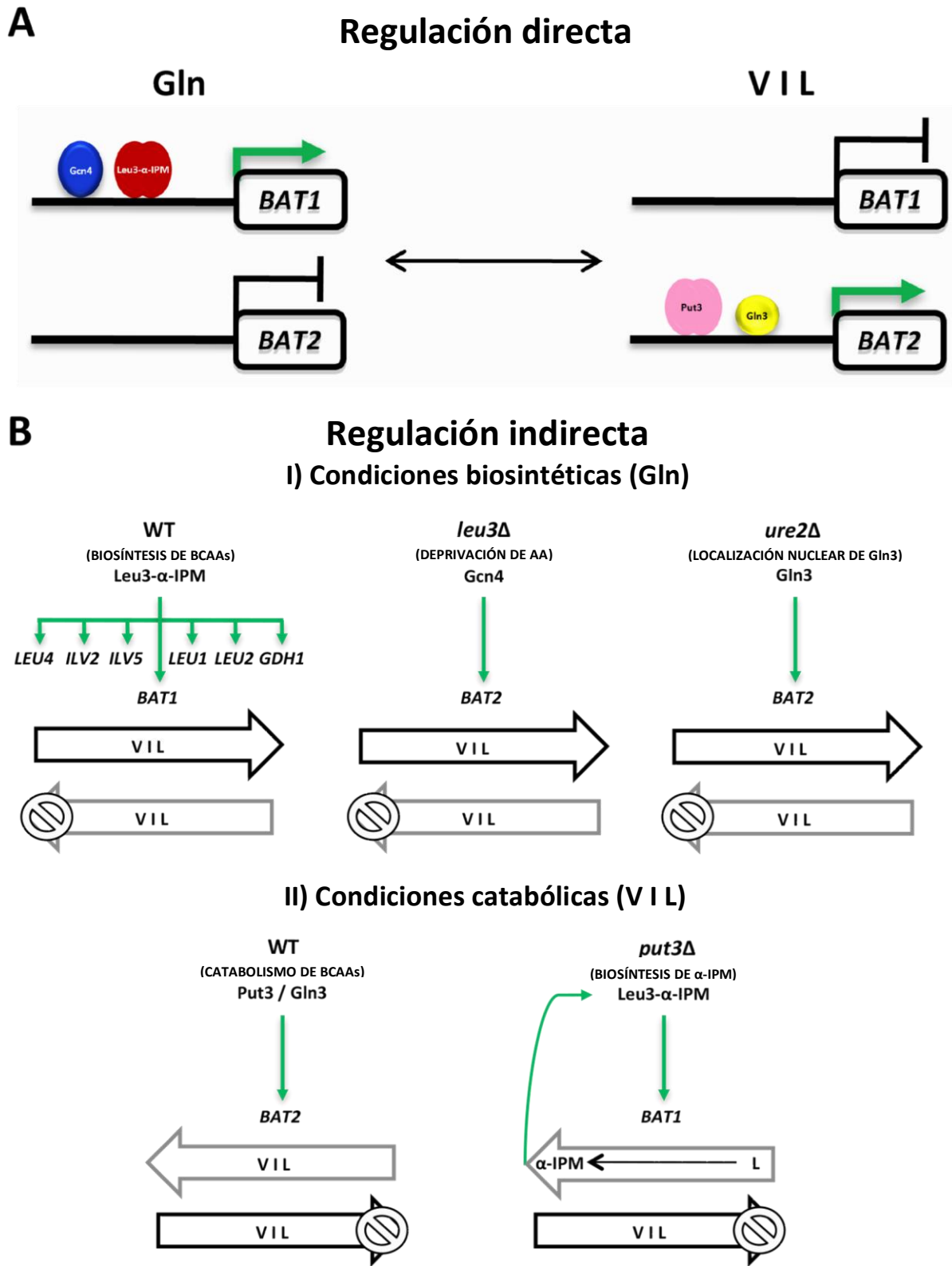
un sitio consenso para *PUT3* sugiriendo que la expresión de *LEU1* posiblemente sea modulada negativamente por Put3. Se ha demostrado que la isomerasa de isopropilmalato codificada por *LEU1* puede determinar la biosíntesis del  $\alpha$ -IPM de manera reversible (Kohlhaw 1988), esto podría permitir la formación de Leu3- $\alpha$ -IPM, influyendo en la activación transcripcional de *LEU2* y promoviendo la biosíntesis de  $\alpha$ -IPM al catabolizar la leucina mediante la acción de la vía Bat2-Leu2-Leu1 (Figura 3, flechas azules). Para probar esta hipótesis se construyeron las dobles mutantes *put3 $\Delta$  leu1 $\Delta$*  y *put3 $\Delta$  bat2 $\Delta$*  como se describe en Material y Métodos. En la Figura 10B-C, se muestra que en las dobles mutantes no se desreprimen *BAT1* ni *LEU2*, lo que sugiere que las actividades de las enzimas Leu1 y Bat2 son necesarias para el funcionamiento de la vía biosintética de  $\alpha$ -IPM en presencia de VIL.

Estos resultados permiten concluir que, en presencia de leucina, Put3 ejerce un efecto negativo indirecto sobre la expresión de *BAT1* mediante la prevención del complejo Leu3- $\alpha$ -IPM.

## 6. DISCUSIÓN

Las aminotransferasas de cadena ramificada (BCATs) catalizan una reacción reversible cuya dirección está determinada exclusivamente por un solo sitio catalítico y la concentración intracelular de los reactantes ( $\alpha$ -cetoácidos o aminoácidos) (Karmen *et al.*, 1955). Después de la duplicación de *S. cerevisiae*, la diversificación funcional de cada una de las copias parálogas no se logró a través de la especialización diferencial de las propiedades cinéticas, ya que la función de biosíntesis o catabolismo de cada enzima depende de un solo sitio catalítico. En este caso, la especialización funcional se logra a través de la expresión diferencial de cada parálogo, mientras que cuando sólo se tiene un gen, se prefiere un perfil de expresión biosintético (*K. lactis*) o constitutivo (*L. kluyveri*). *KIBat1* tiene un papel especializado en la biosíntesis, mientras que *LkBat1* tiene un papel en ambas funciones (biosíntesis y catabolismo) que está determinado exclusivamente por la concentración intracelulares de los reactantes (Colón *et al.*, 2011; Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015). *S. cerevisiae* conservó el parálogo *BAT1* con un perfil de expresión biosintético como el de *KIBAT1*, mientras que *BAT2* adquirió dos sistemas reguladores independientes que le confirieron un perfil de expresión catabólico.

Los resultados que se presentan en esta tesis indican que la retención de *BAT1/BAT2* y su diversificación regulatoria han promovido la adquisición de dos sistemas independientes que responden al estado metabólico de la célula: la activación de la expresión de *BAT1* a través de Leu3- $\alpha$ -IPM está determinada por la vía sensible (Leu4/Leu9) e insensible (Bat2-Leu2-Leu1) a leucina, mientras que la expresión de *BAT2* está determinada por la calidad de la fuente de nitrógeno (Gln3) y la disponibilidad de aminoácidos (Gcn4) (Figura 11A-B).



**Figura 11.** Representación esquemática del perfil de expresión regulatorio de *BAT1/BAT2* y los factores de transcripción que actúan directa o indirectamente sobre condiciones biosintéticas y catabólicas. (A) Factores de transcripción (TFs) que regulan directamente la expresión de *BAT1/BAT2* en glutamina (Gln) o valina, isoleucina y

leucina (VIL) como únicas fuentes de nitrógeno. Las flechas verdes indican activación transcripcional sobre locus *BAT1* y *BAT2* (rectángulos). (B) Se muestran diferentes escenarios para la biosíntesis o catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) en la cepa tipo silvestre (WT), y varias mutantes cuando se crecen en condiciones biosintéticas (Gln) o catabólicas (VIL). Las flechas verdes hacia abajo indican la activación transcripcional del gen diana a través de la acción de los TFs. Las flechas horizontales en negro o en gris indican BIOSÍNTESIS o CATABOLISMO de VIL. El panel inferior de esta figura resalta el hecho de que en un mutante *put3Δ* en presencia de VIL, la leucina se cataboliza preferentemente a  $\alpha$ -isopropilmalato ( $\alpha$ -IPM) y no a KIC, a través de la vía Bat2-Leu2-Leu1, mientras que valina e isoleucina se catabolizan a KIV o KMV (véase la Figura 3, flechas azules). Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

### **6.1. Las vías de biosíntesis de $\alpha$ -IPM sensible e insensible a la leucina determinan el papel de Leu3 como represor o activador y la regulación transcripcional de *BAT1***

El papel de Leu3 en la activación transcripcional de *BAT1* depende de la biosíntesis y la concentración intracelular de  $\alpha$ -IPM que determina su función como represor (Leu3) o activador (Leu3- $\alpha$ -IPM) (Chin *et al* 2008; Wang *et al*, 1999). Con este propósito, *S. cerevisiae* tiene dos vías de biosíntesis de  $\alpha$ -IPM que contribuyen a la poza intracelular. En ausencia de VIL, Leu4 y Leu9 (vía sensible a leucina) desempeñan el papel principal de la biosíntesis de  $\alpha$ -IPM (Figura 3, flecha morada), mientras que en presencia de VIL en una mutante *put3Δ*, la acción consecutiva de Bat2-Leu2-Leu1 (vía insensible a leucina) determina la biosíntesis de  $\alpha$ -IPM alternativa (Figura 3, flechas azules). Cuando se adiciona o se acumula VIL, se excluye la biosíntesis de  $\alpha$ -IPM a través de la inhibición de las isoformas Leu4-Leu4 o Leu4-Leu9, lo que limita la capacidad de activación de Leu3 (López *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 1999). La represión de *BAT1* en VIL podría considerarse como un mecanismo determinante que regula la biosíntesis de leucina. Es probable que el mecanismo de activación transcripcional de *BAT1* dependiente de Leu3- $\alpha$ -IPM sea eficaz dado que la configuración de la cromatina favorece la localización del sitio de unión a *LEU3* en la región libre de nucleosomas (NFR) en este promotor (Figura 4B).

Los resultados que se muestran en esta tesis evidencian que en *S. cerevisiae* hay una vía alternativa de biosíntesis de  $\alpha$ -IPM que puede operar a través de Bat2-Leu2-Leu1 mediante el catabolismo de leucina, lo que resulta en una vía de biosíntesis de  $\alpha$ -IPM insensible a leucina (Figura 11B, condición catabólica). El funcionamiento de esta vía sólo se produce en una mutante *put3Δ* crecida en VIL, en esta condición, *LEU1* se desreprime resultando en la transcripción de la enzima reversible que cataliza la biosíntesis de  $\alpha$ -IPM a partir de  $\beta$ -IPM (Figura 3) (Kohlhaw, 1988; Yang *et al*, 2005). En consecuencia, la formación del complejo Leu3- $\alpha$ -IPM activa la expresión de *LEU2* y *BAT1*. Por consiguiente, la expresión de *BAT1*, *LEU1*

y *LEU2* no se desreprime en la doble mutante *put3Δ leu3Δ* (Figura 10A), ni en las dobles mutantes *put3Δ leu1Δ* / *put3Δ bat2Δ* (Figura 10B-C).

## **6.2. La calidad de la fuente de nitrógeno y la disponibilidad de los aminoácidos determinan la regulación transcripcional de *BAT2***

Cuando *S. cerevisiae* crece Gln o VIL como únicas fuentes de nitrógeno, el sitio de unión a *LEU3* en el promotor *BAT2* está oculto entre los nucleosomas; no obstante, en VIL los sitios de unión a *GLN3* y *GCN4* están accesibles, mientras que en Gln están protegidos (Figura 5B). La expresión de *BAT2* se regula a través del control NCR mediante la localización nuclear de Gln3 en presencia de fuentes secundarias de nitrógeno como VIL (Figura 9D) (Blinder y Magasanik, 1995; Coffman *et al*, 1995; Courchesne y Magasanik 1988; Minehart y Magasanik 1991). Además, se encontró que hay otro mecanismo independiente de NCR que contribuye a la activación de *BAT2* en condiciones biosintéticas (Gln). Cuando una mutante *leu3Δ* se crece en Gln, hay una deprivación de aminoácidos que provoca el aumento de la traducción de Gcn4 que resulta en la activación de la expresión de *BAT2* (Figura 9B-C, Tabla 3). Por consiguiente, en una doble mutante *gcn4Δ leu3Δ* no se observó la activación de *BAT2* ni la de *HIS4* (Figura 9C). Por lo tanto, la activación transcripcional de *BAT2* depende de las fuentes de nitrógeno secundarias como VIL, permitiendo que la función de Bat2 sea preferentemente catabólica. Sin embargo, la acción independiente de los reguladores Gln3 (catabólico) y Gcn4 (biosintético) puede activar la transcripción de *BAT2* en ambas condiciones, lo que indica que la calidad de las fuentes de nitrógeno y la variación o la disponibilidad de aminoácidos, desencadenan la activación de *BAT2*, y por tanto, la biosíntesis de VIL a través de Bat2 (Figura 11B, condiciones biosintéticas). La función de biosíntesis de VIL a través de Bat1 y Bat2 podría ser redundante en determinado momento dado que la activación transcripcional mediante Leu3 y/o Gln3/Gcn4 converge en presencia de fuentes secundarias de nitrógeno. En esta condición, la biosíntesis de VIL a través de la acción de Bat1 y Bat2, también podría representar una ventaja de dosis génica que permite una mayor capacidad biosintética. Por lo tanto, la adquisición de sistemas reguladores que permiten la expresión de *BAT1* y *BAT2* en condiciones biosintéticas y catabólicas ofrece la posibilidad de que Bat1 y Bat2 puedan desempeñar un papel biosintético o catabólico dependiendo de la concentración intracelular de los reactantes.

## 7. CONCLUSIONES

Las aminotransferasas constituyen un ejemplo interesante en la diversificación de parálogos mediante la divergencia de la expresión génica, lo que permite que alguna de las enzimas codificantes esté presente bajo cierta condición dada. En los parálogos *BAT1* y *BAT2*, la subfuncionalización ha resultado de mecanismos que permiten la represión o activación genética, de manera que la función biosintética y/o catabólica de la enzima puede conservarse y sólo depender de la presencia o ausencia de la enzima mediante la adquisición de reguladores adicionales. Sin embargo, bajo ciertas condiciones específicas los reguladores pueden convergir permitiendo la activación génica de ambas enzimas, de manera que la función biosintética y/o catabólica de cada enzima puede ser aditiva representando una ventaja de dosis génica.

Existe una vía alternativa de biosíntesis de  $\alpha$ -IPM que opera a través de Bat2-Leu2-Leu1 mediante el catabolismo de leucina, lo que permite la activación de un nuevo circuito génico a través de Leu3- $\alpha$ -IPM en condiciones catabólicas, logrando tanto el anabolismo como la síntesis de BCAA de manera simultánea a través de Bat1 y Bat2. Por otra parte, la deprivación de aminoácidos activa la transcripción de *BAT2* a través de Gcn4 en condiciones biosintéticas, permitiendo la síntesis de BCAA mediante Bat2.

La expresión diferencial de *BAT1* en condiciones biosintéticas o catabólicas no depende de cambios en la estructura de la cromatina; sin embargo, el arreglo nucleosomal del promotor de *BAT1* favorece que los sitios de unión a *GCN4* y *LEU3* estén en la NFR, lo que permite la accesibilidad a estos sitios en ambas condiciones. De manera contraria, la expresión diferencial de *BAT2* está acompañada de remodelación de cromatina en la condición biosintética (cromatina cerrada) y catabólica (cromatina abierta). El arreglo nucleosomal del promotor de *BAT2* favorece que el sitio de unión a *GLN3* esté en la NFR, lo que permite que la activación transcripcional dependa exclusivamente de la disponibilidad del factor Gln3 en fuentes secundarias de nitrógeno.

Los TFs que activan la transcripción de *BAT1* son Gcn4 y Leu3- $\alpha$ -IPM (Figura 11A). *BAT1* se reprime en VIL, debido a la ausencia de  $\alpha$ -IPM; no obstante, la síntesis de  $\alpha$ -IPM mediante la vía insensible a VIL, permite el funcionamiento de la vía biosintética en condiciones catabólicas (Figura 11B). Los TFs que activan la transcripción de *BAT2* son Gln3 y Put3 (Figura

11A). *BAT2* es reprimido Gln; sin embargo, si se produce deprivación de aminoácidos, la expresión de *BAT2* se induce incluso en condiciones biosintéticas (Figura 11B).

Por lo tanto, la retención de *BAT1/BAT2* y su diversificación regulatoria han promovido la adquisición de dos sistemas independientes que responden al estado metabólico de la célula: la activación de la transcripción de *BAT1* a través de los niveles de  $\alpha$ -IPM está determinada por la vía sensible e insensible a leucina, mientras que la transcripción de *BAT2* está determinada por la disponibilidad de aminoácidos y la calidad de la fuente de nitrógeno.



## 8. PERSPECTIVAS

Este trabajo muestra que la subfuncionalización de *BAT1* y *BAT2* mediante la expresión diferencial en condiciones biosintéticas y/o catabólicas se logra a través de la adquisición de sistemas regulatorios independientes; no obstante, quedan varias incógnitas por resolver.

Este estudio logró elucidar los mecanismos regulatorios que permiten que el perfil de expresión de *BAT1/BAT2* haya divergido en condiciones biosintéticas y catabólicas; sin embargo, el hábitat natural de la levadura *S. cerevisiae* es la uva donde predominan las fuentes secundarias de nitrógeno como la prolina. Por lo tanto, sería muy interesante estudiar los mecanismos regulatorios de *BAT1/BAT2* y el papel fisiológico de las enzimas Bat1/Bat2 bajo esta condición (prolina como única fuente de nitrógeno).

La secuencia promotora de *BAT1* y *BAT2* contiene una configuración de sitios unión a TFs peculiar que permite activar o reprimir su expresión de manera opuesta en la condición biosintética o la catabólica, sería interesante construir quimeras al intercambiar las secuencias promotoras y analizar la respuesta fisiológica en estas mutantes. Lo anterior nos permitiría entender si el papel fisiológico de ambas enzimas es equivalente o ha divergido; es decir, la enzima Bat2 citosólica podrá suplir la función de Bat1 mitocondrial en condiciones biosintéticas, y la enzima Bat1 mitocondrial podrá suplir la función de Bat2 citoplásmica en condiciones catabólicas, cuando los genes que las codifican han intercambiado los promotores.

Por otra parte, se encontró que la represión o activación de *BAT2* está acompañada de remodelación de cromatina; sin embargo, queda pendiente identificar cuáles son los reguladores de la organización de la cromatina que determinan la organización nucleosomal. Es posible que participen remodeladores de cromatina y/o acetilasas de histonas que en conjunto logran el estado de cromatina cerrado o abierto en el promotor de *BAT2*.

En condiciones biosintéticas, el complejo Leu3- $\alpha$ -IPM activa la transcripción de un circuito de genes (*BAT1*, *LEU2*, *LEU1*, *LEU4*, *ILV5*, *ILV2* y *GDH1*) que codifica para enzimas que biosintetizan VIL y glutamato. En una mutante *leu3 $\Delta$* , la biosíntesis de algunos aminoácidos disminuye y se provoca una deprivación de aminoácidos, que resulta en el incremento de Gcn4

que restablece las pozas de aminoácidos. Dado que Leu3 regula la biosíntesis de VIL y glutamato, no se ha descifrado si la respuesta a privación se debe a la falta de VIL y/o glutamato. Es importante señalar que en una mutante *leu3Δ*, el glutamato es el aminoácido que más disminuye con respecto a la tipo silvestre; por tanto, es posible que esta sea la señal de privación de aminoácidos que desencadena una respuesta de este tipo. Sin embargo, la señal de privación también podría generarla la falta de otros aminoácidos que en combinación logran este efecto. Otra posibilidad a esta respuesta podría ser el balance intracelular entre la leucina y el metabolito KIC, ya que ambos niveles regulan la señalización de la cascada TORC1 (proliferación celular). Se ha observado que la disminución de los niveles de KIC promueve la inhibición de TORC1, lo que resulta en la activación de la respuesta de control general de biosíntesis de aminoácidos a través de Gcn4. Sería crucial que en un futuro se midieran otros metabolitos como KIC.

Otro hallazgo interesante que también resultó de este estudio fue la participación del factor de transcripción Put3 en la regulación opuesta de *BAT1* y *BAT2*. Estudios anteriores a este, sólo habían documentado que Put3 regula a genes que codifican enzimas involucradas en el catabolismo de prolina; no obstante, en este estudio se estableció que Put3 participa en el control transcripcional de *BAT1/BAT2*, y por tanto en la biosíntesis y/o catabolismo de los BCAAs. Es probable que Put3 también regule la activación o represión de otros genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos.

## 9. INVESTIGACIONES REALIZADAS EN PARALELO A ESTA TESIS

Una investigación que abordamos en paralelo durante el estudio de los genes *BAT* de *S. cerevisiae*, fue el de los genes ortólogos de las levaduras tipo ancestral *K. lactis* y *L. kluyveri* que contienen una aminotransferasa bifuncional de cadena ramificada (*KlBat1/LkBat1*) codificada por *KIBAT1* y *LkBAT1*. *KlBat1* y *LkBat1* participan en la biosíntesis y el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada valina, isoleucina y leucina (VIL). Este estudio tuvo como objetivo comprender qué factores determinan el perfil de expresión de *KIBAT1* y *LkBAT1*. Nuestros resultados nos condujeron a plantear la hipótesis de que el perfil de expresión de *KIBAT1* depende de la presencia de Leu3- $\alpha$ -IPM, y por lo tanto, es dependiente de la síntesis de  $\alpha$ -IPM (datos no publicados, ver APÉNDICE). *LkBAT1* mostró un perfil de expresión constitutivo en condiciones biosintéticas y catabólicas debido a la insensibilidad de leucina de las *LkLeu4* y *LkLeu4bis* (datos no publicados, ver APÉNDICE). Por otra parte, se estudió el arreglo nucleosomal del promotor de *KIBAT1* y *LkBAT1*, y se encontró que la organización de la cromatina favorece que el sitio de unión a *LEU3* se encuentre en la región libre de nucleosomas (NFR), lo que sugiere que la activación transcripcional es dependiente de la disponibilidad del  $\alpha$ -IPM de cada condición (datos no publicados, ver APÉNDICE). Nuestros resultados nos permitieron plantear que probablemente la sensibilidad a leucina de las  $\alpha$ -IPMS determina la expresión de los genes ortólogos BCATs en las levaduras *K. lactis* y *L. kluyveri*.

Otra investigación relevante que se podría abordar en el futuro y que se interconecta con los mecanismos regulatorios que se elucidaron en este trabajo; es el estudio del papel de Leu3 en la extensión de la vida cronológica (CLS) en *S. cerevisiae*. Actualmente, existen evidencias de que en otros organismos como *C. elegans*, el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada se conserva y regula la extensión de la vida del gusano. Se ha reportado que la ausencia del gen *LEU3* (*leu3* $\Delta$ ) extiende la CLS de *S. cerevisiae*. Nosotros encontramos que en la mutante *leu3* $\Delta$  se provoca una deprivación de aminoácidos que activa la traducción del mensajero de Gcn4 y este determina la activación transcripcional del gen *BAT2* (catabólico). Además, los análisis de RNA-seq (Trabajo desarrollado como tesis de Maestría de Stefany Argueta) nos permitieron identificar los circuitos génicos que se activan y se reprimen en una mutante *leu3* $\Delta$  bajo diferentes fuentes de nitrógeno durante la fase exponencial (datos no publicados). Los análisis globales indican que los transcritos de genes activados son principalmente blanco de Gcn4. Por

lo tanto, se plantea la hipótesis de que la extensión de la CLS que se observa en una mutante *leu3Δ* se debe al circuito de genes que activa Gcn4 en *S. cerevisiae*.

## 10. REFERENCIAS

- Avendaño, A., L. Riego, A. DeLuna, C. Aranda, G. Romero, C. Ishida *et al.*, 2005 Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 57 (1): 291-305.
- Axelrod, J. D., J. Majors, M. C. Brandriss, 1991 Proline-independent binding of *PUT3* transcriptional activator protein detected by footprinting in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 11: 564-567.
- Biddick, RK, G.L. Law, E. T. Young, 2008 Adr1 and Cat8 mediate coactivator recruitment and chromatin remodeling at glucose-regulated genes. *PLoS One.* 3.
- Blinder, D. and B. Magasanik, 1995 Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J Bacteriol.* 177: 4190-4193.
- Boer, V. M., J. M. Daran, M. J. Almering, J. H. de Winde, J. T. Pronk, 2005 Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res.* 5: 885-897.
- Brandriss, M. C., 1987 Evidence for positive regulation of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 117:429-35.
- Byrne KP and Wolfe KH, 2005 The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* 15:1456-1461.
- Bysani, N., J. R. Daugherty, T. G. Cooper, 1991 Saturation mutagenesis of the UASNTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173:4977-82.
- Chin, C. S., V. Chubukov, E. R. Jolly, J. DeRisi, H. Li, 2008 Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biol.* 17.
- Coffman, J. A., R. Rai, T. G. Cooper, 1995 Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 6910-6918.
- Colón, M., F. Hernández, K. López, H. Quezada, J. González *et al.*, 2011 *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS One.* 6(1).
- Contreras-Shannon. V., Lin A.P., McCammon, M.T., y McAlister-Henn, L., 2005 Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP<sup>+</sup>-specific isocitrate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 280: 4469-4475.

- Conant, G. C., and K. H. Wolfe, 2008 Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nature Rev. Genet.* 9: 938-950.
- Courchesne, W. E., and B. Magasanik, 1988 Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J. Bacteriol.* 170: 708-713.
- De Boer C. G., T. R. Hughes, 2012 YeTFaSCo: a database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan; 40 (Database issue):D169-79.
- DeLuna, A., A. Avendano, L. Riego, A. Gonzalez, 2001 NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276: 43775-43783.
- Dittmar K, y Lieberles D, Eds. (2010). *Evolution after Gene Duplication*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
- Eden, A, L. Van Nedervelde, M. Drukker, N. Benvenisty, A. Debouq, 2001 Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 296-300.
- Eden A, Benvenisty N., 1999 Involvement of branched-chain amino acid aminotransferase (Bcat1/Eca39) in apoptosis. *FEBS Lett.* 457: 255-61.
- Eden A, Simchen G, y Benvenisty N, 1996 Two Yeast Homologs of ECA39, a Target for c-Myc Regulation, Code for Cytosolic and Mitochondrial Branched-chain Amino Acid Aminotransferases. *J Biol Chem.* 271: 20242-5.
- Force, A., Lynch, M., Pickett F. B., Amores, A, Yan, Y. L. *et al.* Lowly expressed genes in *Arabidopsis thaliana* bear the signature of possible pseudogenization by promoter degradation (1999). *Genetics.* 151: 1531-1545.
- Friden, P., and P. Schimmel, 1988 *LEU3* of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2690-2697.
- Gavin C. Conant and Kenneth H. Wolfe, 2008 Probabilistic Cross-Species Inference of Orthologous Genomic Regions Created by Whole-Genome Duplication in Yeast. *Genetics.* 179: 1681–1692.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J, André B, 2007 Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 27: 3065-86.
- Goldstein, A. L., and J. H. McCusker, 1999 Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15: 1541-1553.

- Gu, Z., S. A. Rifkin, K. P. White, W. H. Li, 2004 Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species. *Nat. Genet.* 36: 577-579.
- Gu, X., Z. Zhang, W. Huang, 2005 Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 707-712.
- Guarente, L., B. Lalonde, P. Gifford, E. Alani, 1984 Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. *Cell.* 36: 503-11.
- Hernández, H., C. Aranda, G. López, L. Riego, A. González, 2011 Hap2-3-5-Gln3 determine transcriptional activation of *GDH1* and *ASN1* under repressive nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 157: 879-889.
- Hinnebusch, A. G., and G. R. Fink, 1983 Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5374-8.
- Hinnebusch, A.G., 1984 Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6442-6446.
- Hinnebusch, A. G., 2005 Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:407-50.
- Hu, Y., T. G. Cooper, G. B. Kohlhaw, 1995 The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol. Cell. Biol.* 15: 52-57.
- Huang, H. L., and M. C. Brandriss, 2000 The regulator of the yeast proline utilization pathway is differentially phosphorylated in response to the quality of the nitrogen source. *Mol. Cell. Biol.* 20: 892-899.
- Infante, J.J., G. L. Law, E. T. Young, 2012 Analysis of nucleosome positioning using a nucleosome-scanning assay. *Methods Mol. Biol.* 833: 63-87.
- Jiang C, Pugh BF. 2009 Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet.* 10:161-72.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura, 1983 Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS., 1955 Transaminase activity in human blood. *J Clin Inves.* 34: 126-131.
- Kellis, M., B. W. Birren, E. S. Lander, 2004 Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 428: 617-624.

- Kerkhoven, E. J., Y. Kim, A. Wei, C. D. Nicora, T. L. Fillmore *et al*, 2017 Leucine biosynthesis is involved in regulating high lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *mBio*. 8: 1-12.
- Kingsbury, J. M., N. D. Sen, M. E. Cardenas, 2015 Branched-Chain aminotransferases control TORC1 Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics* DOI: 10.1371/journal.pgen.1005714.
- Kispal, G., H. Steiner, D. A. Court, B. Rolinski, R. Lill, 1996 Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J. Biol. Chem.* 271: 24458-24464.
- Kohlhaw, G. B., 1988 Beta-isopropylmalate dehydratase from yeast. *Methods in Enzymol.* 166: 429-435.
- Kohlhaw, G. B., 2003 Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 1-15.
- Leach, L. J., Z. Zhang, C. Lu, M. J. Kearsey, Z. Luo, 2007 The role of *cis*-regulatory motifs and genetical control of expression in the divergence of yeast duplicate genes. *Mol. Biol. Evol.* 24: 2556-2565.
- Litt, M.D., M. Simpson, M. Gaszner, C. D. Allis, G. Felsenfeld, 2001 Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* 293: 2453-2455.
- Longtine, M.S., A. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach *et al.*, 1998 Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 953-961.
- López, G., H. Quezada, M. Duhne, J. González, M. Lezama *et al.*, 2015 Diversification of Paralogous  $\alpha$ -Isopropylmalate Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-Oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.* 14: 564-577.
- Lynch, M y Conery, J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science.* 290: 1151-1155.
- Makova, K.D., and W. H. Li, 2003 Divergence in the spatial pattern of gene expression between human duplicate genes. *Genome Res.* 13: 1638-1645.
- Marcet-Houben, M., and T. Gabaldón, 2015 Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLoS Biol.* 13:8.
- Martinez-Montanes, F., A. Rienzo, D. Poveda-Huertes, A. Pascual-Ahuir, M. Proft, 2013 Activator and repressor functions of the Mot3 transcription factor in the osmostress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 12: 636-647.



- Mewes, H. W., K. Albermann, M. Bahr, D. Frishman, A. Gleisner *et al.*, 1997 Overview of the yeast genome. *Nature*. 387: 7-65.
- Minehart, P. L., and B. Magasanik, 1991 Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 11: 6216-6228.
- Montalvo-Arredondo, J., Á. Jiménez-Benítez, M. Colón-González, J. González-Flores, M. Flores-Villegas *et al.*, 2015 Functional roles of a predicted branched chain aminotransferase encoded by the *LkBAT1* gene of the yeast *Lachancea kluyveri*. *Fungal Genet. Biol.* 85: 71-82.
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ, 2001 Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol.* 21: 4347-68.
- Ohno, S., 1970 *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag. New York, USA.
- Ohno S., 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-99. *Cell & developmental biology* 10: 517-522.
- Quezada, H., C. Aranda, A. DeLuna, H. Hernández, M. L. Calcagno *et al.*, 2008 Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 154: 1656-1667.
- Rawal, Y., H. Qiu, A.G. Hinnebusch, 2014 Accumulation of a threonine biosynthetic intermediate attenuates general amino acid control by accelerating degradation of Gcn4 via Pho85 and Cdk. *PLoS Genet.* 10:7.
- Schoondermark-Stolk SA, Taberero M, Chapman J, Ter Schure EG, Verrips CT, Verkleij AJ, *et al.*, 2005 Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Res.* 5: 757-66.
- Siddiqui, A. H., and M. C. Brandriss, 1989 The *Saccharomyces cerevisiae* *PUT3* activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4706-4712.
- Sheff, M. A., and K. S. Thorn, 2004 Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21: 661-670.
- Storci, F., and M. A. Resnick, 2003 *Delitto perfetto* targeted mutagenesis in yeast with oligonucleotides. *Genet Eng.* 25: 189-207.
- Struhl, K., and R. W. Davis, 1981 Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 152: 535-552.

- Sze, J.Y., M. Woontner, J. A. Jaehning, G. B. Kohlhaw, 1992 *In vitro* transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science*. 258: 1143-1145.
- Thomas-Chollier, M., O. Sand, J. V. Turatsinze, R. Janky, M. Defrance *et al.*, 2008 RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 36:119–127.
- Thomas-Chollier, M., M. Defrance, A. Medina-Rivera, O. Sand, C. Herrmann *et al.*, 2011 RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 39:86–91.
- Turatsinze, J. V., M. Thomas-Chollier, M. Defrance, J. Van Helden, 2008 Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and *cis*-regulatory modules. *Nat. Protoc.*, 3:1578–1588.
- Valenzuela, L., P. Ballario, C. Aranda, P. Filetici, A. González, 1998 Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180: 3533-3540.
- Valenzuela, L., C. Aranda, A. González, 2001 TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol* 183-2331-2334.
- Van Helden, J., 2003 Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 31: 3593–3596.
- Wang, D., F. Zheng, S. Holmberg, G. B. Kohlhaw, 1999 Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J. Biol. Chem.* 274: 19017-19024.
- Wolfe, K. H., and D. C. Shields, 1997 Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*. 387: 708-713.
- Yang, C. R., B. E. Shapiro, S. P. Hung, E. D. Mjolsness, G.W. Hatfield, 2005 A mathematical model for the branched chain amino acid biosynthetic pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 280: 11224-11232.
- Zhang, J., 2003 Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* 18: 292-298.
- Zhang, Z., J. Gu, X. Gu, 2004 How much expression divergence after yeast gene duplication could be explained by regulatory motif evolution? *Trends Genet.* 20: 403-407.
- Zhou, H., and F. Winston, 2001 *NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 2:5.
- Wolfe KH, Shields DC., 1997 Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708-13.

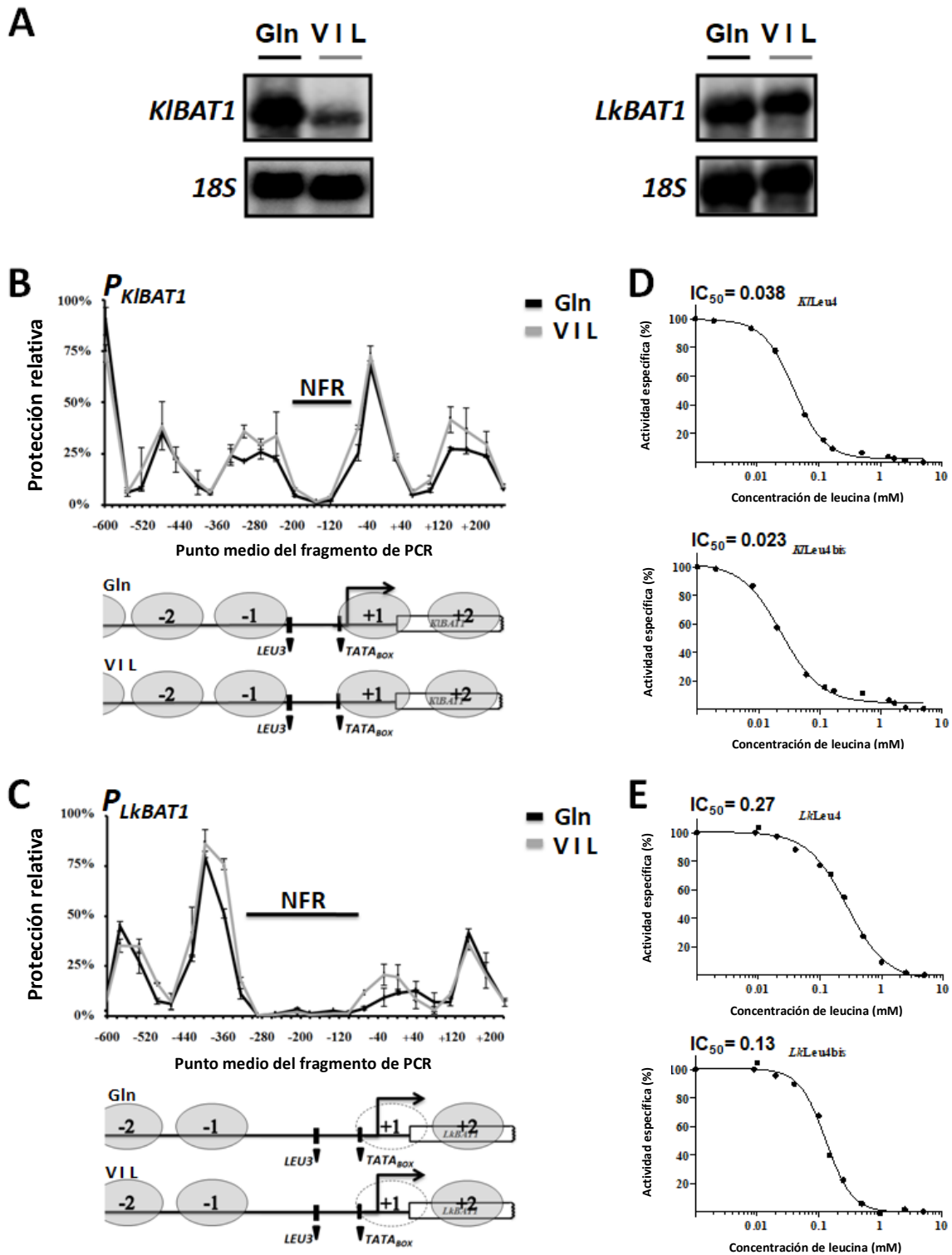
## 11. APÉNDICE

### RESULTADOS QUE COMPRENDEN UN ESTUDIO ADICIONAL

#### 11.1. La expresión de *KIBATI* y *LkBATI* no depende la organización de la cromatina

Se analizó la expresión de *KIBATI/LkBATI* y la organización de la cromatina en sus promotores en glutamina (Gln) o adicionando valina, isoleucina y leucina (VIL) como únicas fuentes de nitrógeno. Se realizaron análisis tipo Northern y ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) en muestras obtenidas de cultivos en 0.5 de densidad óptica (OD<sub>600</sub>) como se describe en Materiales y Métodos. Nuestros resultados confirman el perfil de expresión biosintético de *KIBATI*, y la expresión constitutiva de *LkBATI* (Figura 12A) (Colón *et al.*, 2011; Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015). Para *KIBATI*, la represión se observó en presencia de leucina (VIL) sugiriendo que la regulación transcripcional de *KIBATI* puede estar controlada por retroalimentación negativa como se muestra para *BATI* en la Figura 3. Sin embargo, *LkBATI* mostró un perfil de expresión constitutivo en Gln o VIL, sugiriendo que su transcripción no está controlada por retroalimentación negativa (Figura 12A). Con el fin de averiguar si la estructura de la cromatina juega un papel importante en la expresión de *KIBATI* y *LkBATI*, se realizaron ensayos NuSA en Gln y VIL como únicas fuentes de nitrógeno. El ADN aislado de la digestión con MNasa se examinó por primera vez en los genes control *KIVCX1* (KLLA-ORF439) y *LkVCX1* (SAKL0F09878g) con el fin de encontrar una región protegida y normalizar nuestros datos. Se observó una región con protección significativa en *KIVCX1* y *LkVCX1* (Figura S4). Se realizó PCR cuantitativa (qPCR) para amplificar las regiones sobrepuestas de los promotores *KIBATI* y *LkBATI* usando 25 o 26 pares de oligonucleótidos, respectivamente (Tablas S7 y S8). Los picos de protección relativa indicaron que en Gln o en VIL, cuatro nucleosomas se posicionaron alrededor del promotor *KIBATI* (-2, -1, +1 y +2) (Figura 12B). Los nucleosomas -1 y +1 constituyen el borde de la región libre de nucleosomas sensible a MNasa de 150 bp (NFR), que se extiende desde alrededor de -200 a -100 con respecto al +1 ATG de *KIBATI* (Figura 12B). Por lo tanto, se encontró que el promotor *KIBATI* tiene la estructura de la cromatina similar en Gln o en VIL, sugiriendo que no se requiere remodelación de cromatina para lograr la represión dependiente de VIL. El análisis de NuSA en el promotor *LkBATI*, reveló que en Gln o en VIL, al menos tres nucleosomas (-2, -1 y +2) están posicionados (Figura 12C). La región que podría constituir el nucleosoma +1 contiene la *TATA<sub>BOX</sub>*, esta región se detectó con baja protección relativa en ambas condiciones. La región NFR de *LkBATI* varía de -280 a -50 pb. Como se esperaba, *LkBATI* mostró similar organización

de la cromatina en Gln o en VIL (Figura 12C), de acuerdo con la expresión constitutiva observada (Figura 12A). Por lo tanto, los perfiles de expresión de *KIBAT1* y *LkBAT1* no dependen de la remodelación de la cromatina en ninguna de las condiciones. Sin embargo, en ambos promotores en la región NFR se localiza un sitio de unión a *LEU3* (Figura 12B-C) sugiriendo que podría desempeñar un papel importante como en la regulación transcripcional de *BAT1* (Boer *et al.*, 2005), es posible que Leu3 esté posicionado permanentemente en la NFR, y así la activación transcripcional depende exclusivamente de la concentración subcelular de  $\alpha$ -IPM que producen las  $\alpha$ -isopropilmalato sintetas (*KlLeu4/KlLeu4bis* o *LkLeu4/LkLeu4bis*). Por lo tanto, la expresión de *KIBAT1* y *LkBAT1* posiblemente dependa de la disponibilidad de  $\alpha$ -IPM que se une a Leu3 formando el complejo activo (Leu3- $\alpha$ -IPM) en cada promotor.



**Figura 12.** La expresión de *KIBAT1* y *LkBAT1* no depende de la organización de la cromatina, sino de la sensibilidad a la leucina de las  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas. (A) El análisis de Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa tipo silvestre (WT) de *K. lactis* y *L. kluyveri* (Tabla 1). Los cultivos se crecieron a 0.5 de densidad óptica ( $OD_{600}$ ) en glucosa al 2% y glutamina (Gln, 7 mM) o Valina (V, 150 mg/l) + Isoleucina + (I, 30 mg/l) + (L, 100 mg/l) (VIL) como única fuente de nitrógeno. Los filtros fueron secuencialmente sondeados con los productos de PCR específicos del gen *KIBAT1* o *LkBAT1* como se describe en Materiales y Métodos. El gen *18S*

fue usado como control de carga. Los valores de los números representan la normalización (cociente) de la señal de *KIBATI* o *LkBATI* entre la señal del control de carga *18S*. **(B-C)** Para los ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA), se prepararon mononucleosomas de la cepa WT de *K. lactis* y *L. kluyveri* a partir de cultivos que fueron crecidos en Gln (línea negra) o VIL (línea gris) como se describe en la sección A de ésta figura. **(B-C)** El NuSA para *KIBATI* o *LkBATI* incluye el 5' -600 pb de la región intergénica y el 3' +200 pb del ORF. El ADN monucleosomal fue preparado y analizado mediante qPCR usando oligonucleótidos que se sobreponen uno en seguida del otro cada 50 pb aproximadamente cubriendo toda la región que se describió anteriormente. La protección relativa a MNasa de cada templado fue calculada con el valor obtenido de la región del gen control *KIVCXI* o *LkBATI*, respectivamente. Cada punto en la gráfica muestra el valor  $\pm$  del error estándar del promedio (SEM) de los últimos tres experimentos independientes que se muestran como el punto medio de cada producto de PCR. Las barras de error representan los rangos de los datos. Debajo de cada gráfica se esquematizan las regiones analizadas mediante NuSA, indicando el posicionamiento de los nucleosomas (óvalos grises), y la posición relativa (óvalos transparentes con el borde punteado) extrapolada de los datos obtenidos de la protección de MNasa. La región libre de nucleosomas se denota con NFR. Los rectángulos negros sobre cada promotor indican los sitios de unión a *LEU3* y la *TATA<sub>BOX</sub>*. **(D-F)** Análisis de la sensibilidad a la leucina ( $IC_{50}$ ) de los extractos crudos obtenidos de las mutantes *Klleu4bisΔ*, *Klleu4Δ*, *Lkleu4bisΔ* y *Lkleu4Δ* (Tabla 1), crecidas en MM con 2% de glucosa más sulfato de amonio (7 mM) (ver Materiales y Métodos).

## **11.2. La expresión diferencial de *KIBATI* (inducible) y *LkBATI* (constitutiva) podría depender de los niveles intracelular de Leu3- $\alpha$ -IPM**

La expresión de *KIBATI* se reprime en VIL sugiriendo que esto podría ser causado por la sensibilidad a leucina de las *KlLeu4* y *KlLeu4bis*, que a su vez restringen la actividad de  $\alpha$ -isopropilmalato sintasa ( $\alpha$ -IPMS), lo que reduce la síntesis  $\alpha$ -IPM. Por el contrario, *LkLeu4* y *LkLeu4bis* podrían ser resistentes a leucina; por lo tanto, la síntesis de  $\alpha$ -IPM podría llevarse a cabo incluso en presencia de leucina, permitiendo que Leu3 siempre esté en su forma activa Leu3- $\alpha$ -IPM. En *S. cerevisiae*, se determinó previamente que las isoformas predominantes Leu4/Leu4 y Leu4/Leu9 presentes en la condición biosintética son sensibles a la leucina, apoyando así esta última proposición (López *et al*, 2015). Para confirmar esta posibilidad en *K. lactis* y *L. kluyveri*, se midió la concentración de leucina inhibitoria ( $IC_{50}$ ) de *KlLeu4* (isoforma sinténica *LEU4*), *KlLeu4bis* (isoforma no sinténica *LEU4*), *LkLeu4* (isoforma sinténica *LEU4*) y *LkLeu4bis* (isoforma no sinténicas *LEU4*) en extractos celulares obtenidos a partir de cultivos de las mutantes sencillos *Klleu4bisΔ*, *Klleu4Δ*, *Lkleu4bisΔ* y *Lkleu4Δ* como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 12D-E se muestran las curvas de inhibición de cada mutante. Las isoformas *KlLeu4* y *KlLeu4bis* mostraron una sensibilidad extrema a la leucina ( $IC_{50}$ = 0,038 mM y 0,023 mM), mientras que las isoformas *LkLeu4* y *LkLeu4bis* mostraron una  $IC_{50}$  de 0,27 mM y 0,13 mM, indicando menor sensibilidad a la leucina. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la represión o no inducción de *KIBATI* en VIL podría deberse a la falta de  $\alpha$ -IPM que provoca la inhibición de la actividad de las  $\alpha$ -IPMS en presencia de leucina. Así, Leu3 podría estar posicionado permanentemente en la región NFR en ambas condiciones; sin embargo, en

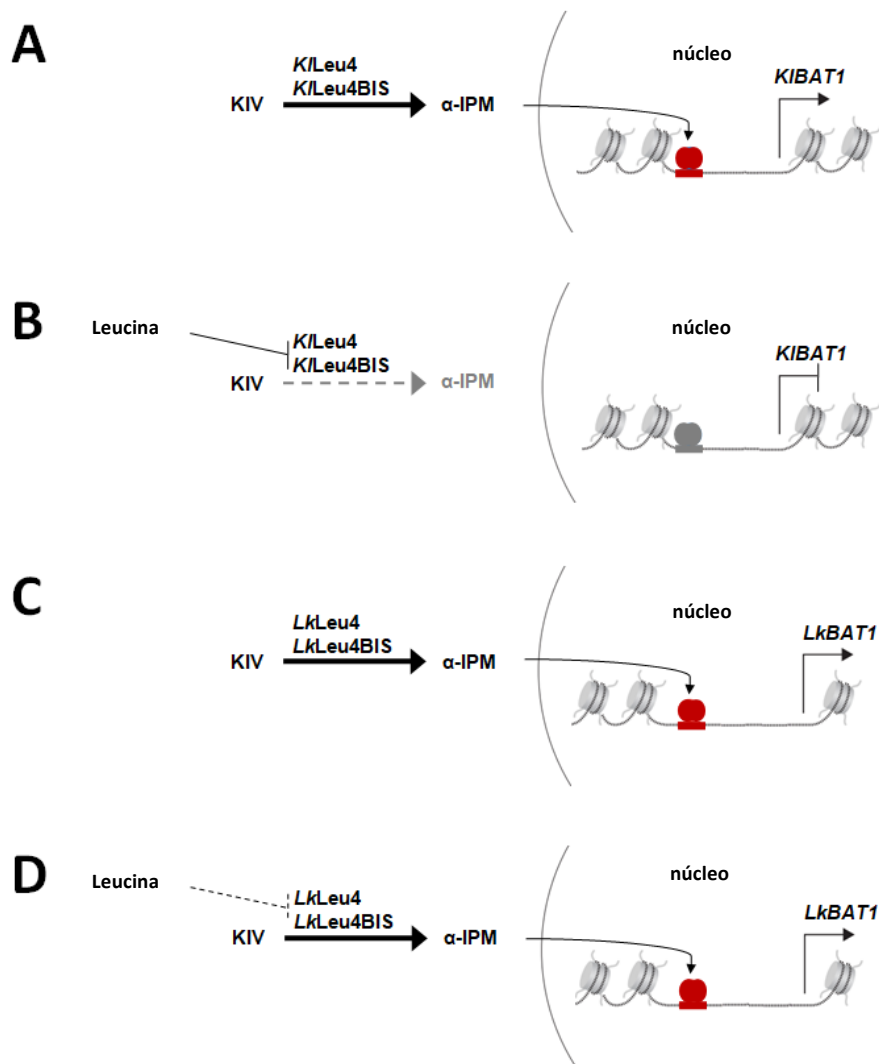
VIL no se forma el complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM (Figura 13A-B). Por el contrario, la expresión de *LkBAT1* es constitutiva debido a que en ambas condiciones se sintetiza  $\alpha$ -IPM dado que las isoformas *LkLeu4* y *LkLeu4bis* son resistentes a leucina, y por tanto, el complejo activador Leu3- $\alpha$ -IPM prevalece en el promotor de *LkBAT1* (Figura 13C-D).

## CONCLUSIONES

*KIBAT1* y *BAT1* adquirieron un perfil de expresión biosintético, mientras que la expresión de *LkBAT1* es constitutiva, sugiriendo que el perfil de expresión de *LkBat1* puede ser biosintético y catabólico (Figura 12). Es probable que *KIBAT1* y *LkBAT1* hayan conservado el mecanismo de activación Leu3- $\alpha$ -IPM, y por tanto, sus perfiles de expresión están determinados exclusivamente por los niveles de  $\alpha$ -IPM que producen las  $\alpha$ -IPMS de acuerdo a su sensibilidad por la leucina (Figura 13).

### Experimentos sugeridos para completar este estudio

Aparentemente, la sensibilidad a la leucina de las  $\alpha$ -IPMS controla la activación transcripcional de los genes que codifican para BCATs en las levaduras *K. lactis* y *L. kluyveri* (Figura 13). En presencia de VIL como única fuente de nitrógeno, las enzimas *KlLeu4* y *KlLeu4bis* (sensibles a leucina) se inhiben evitando la síntesis de  $\alpha$ -IPM, mientras que las enzimas *LkLeu4* y *LkLeu4bis* (resistentes a leucina) sintetizan  $\alpha$ -IPM en esta condición. La ausencia de  $\alpha$ -IPM convierte a Leu3 en represor de la activación transcripcional del gen *KIBAT1* o *LkBAT1*. Para probar esta hipótesis y completar este trabajo, se complementará la doble mutante *Klleu4 $\Delta$  Klleu4bis $\Delta$*  con los genes de *LkLEU4* y/o *LkLEU4bis* (codifican para las enzimas insensibles a leucina), y la doble mutante *Lkleu4 $\Delta$  Lkleu4bis $\Delta$*  con los genes de *KILEU4* y/o *KILEU4bis* (codifican para las enzimas sensibles a leucina). Con estos experimentos se pretende demostrar que el perfil de expresión de *KIBAT1* se convertirá en constitutivo, y que ahora el perfil de expresión de *LkBAT1* se reprimirá en presencia de leucina (VIL). Adicionalmente para demostrar que la presencia o ausencia de  $\alpha$ -IPM modula directamente la activación transcripcional de *KIBAT1* y *LkBAT1*, se medirá la expresión de estos genes en las dobles mutantes *Klleu4 $\Delta$  Klleu4bis $\Delta$*  y *Lkleu4 $\Delta$  Lkleu4bis $\Delta$* , respectivamente, en cultivos con y sin  $\alpha$ -IPM sintético.

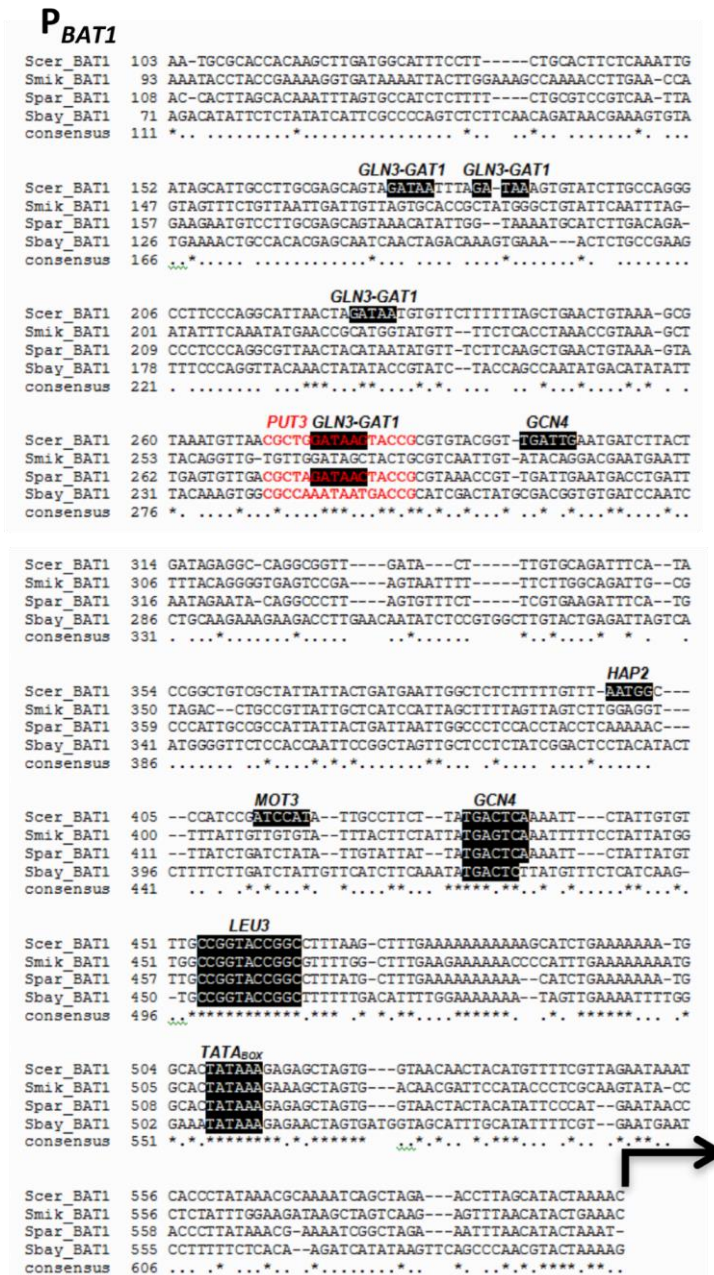


**Figura 13.** Representación esquemática e hipotética de la sensibilidad a leucina de las  $\alpha$ -isopropilmalato sintasas que determina la activación transcripcional de los genes que codifican BCATs en las levaduras *K. lactis* y *L. kluyveri*. **(A)** Cuando se cultiva a *K. lactis* en Gln como única fuente de nitrógeno; las enzimas sensibles a leucina *KILeu4* y *KILeu4bis* biosintetizan  $\alpha$ -IPM a partir del KIV ( $\alpha$ -cetoisovalerato). El  $\alpha$ -IPM entra al núcleo y forma el complejo activo Leu3- $\alpha$ -IPM (dímero rojo) en la región libre de nucleosomas del promotor *KIBAT1*. La formación del complejo Leu3- $\alpha$ -IPM permite la activación transcripcional del gen *KIBAT1*. **(B)** En presencia de VIL como única fuente de nitrógeno; la leucina inhibe a *KILeu4* y *KILeu4bis* evitando la síntesis de  $\alpha$ -IPM. En ausencia de  $\alpha$ -IPM, Leu3 actúa como represor (dímero gris) de la activación transcripcional del gen *KIBAT1*. **(C-D)** Cuando se cultiva a *L. kluyveri* en Gln o VIL como única fuente de nitrógeno; las enzimas resistentes a leucina *LkLeu4* y *LkLeu4bis* biosintetizan  $\alpha$ -IPM a partir del KIV ( $\alpha$ -cetoisovalerato). En ambas condiciones (Gln o VIL), el  $\alpha$ -IPM entra al núcleo y forma el complejo activo Leu3- $\alpha$ -IPM (dímero rojo) en la región libre de nucleosomas del promotor *LkBAT1*. La formación del complejo Leu3- $\alpha$ -IPM permanente permite la activación transcripcional del gen *LkBAT1*, y por lo tanto su perfil de expresión es constitutivo.



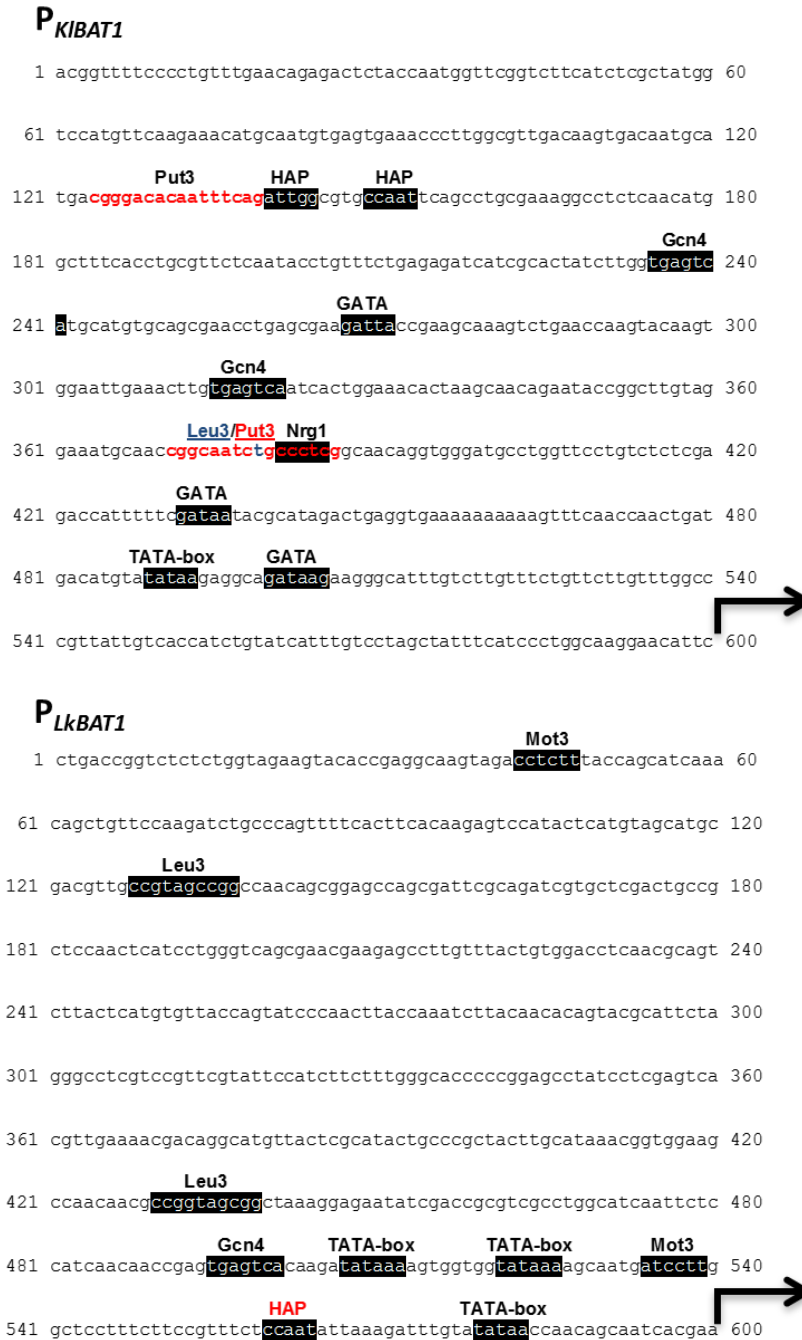
## 12. ANEXO

### 12.1 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

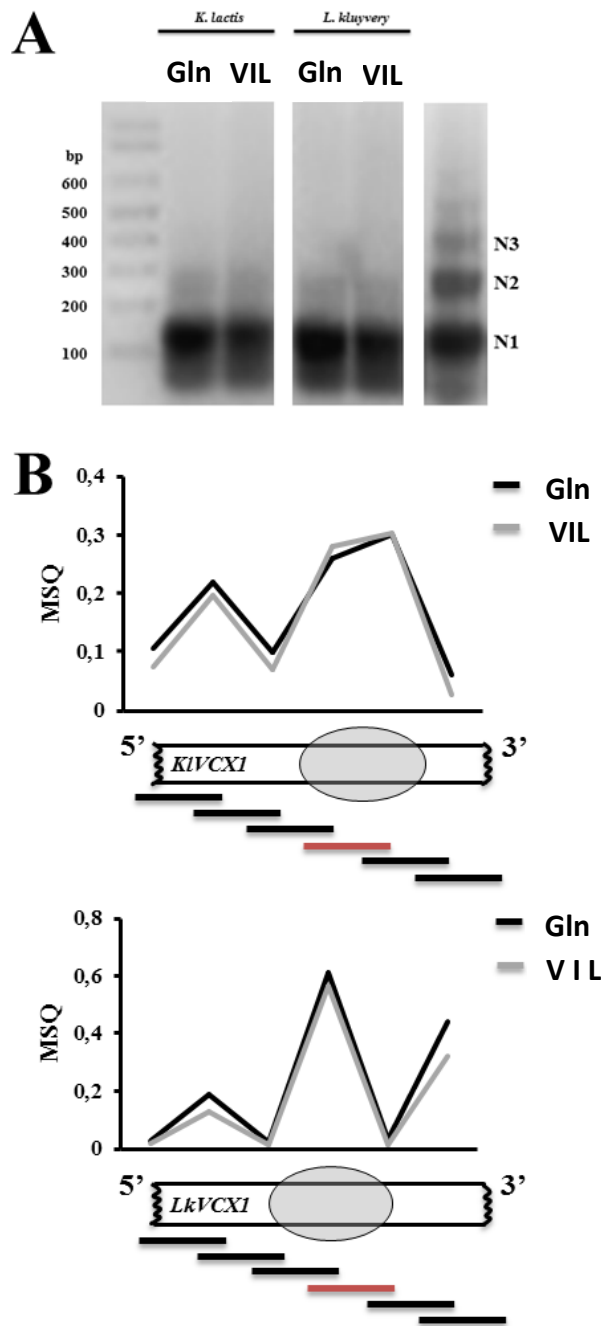


**Figura S1.** Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia 5'-UTR de *BAT1*. El alineamiento de secuencias múltiples se llevó a cabo con 600 pb río arriba del codón de inicio (+1 ATG) del gen *BAT1* de *S. cerevisiae* y sus genes ortólogos de las levaduras *Saccharomyces sensu stricto* (ver Materiales y Métodos). Los sitios de unión a factores de transcripción (TFs) consensos descritos para *S. cerevisiae* se destacan en color negro (*TATA<sub>BOX</sub>*, *LEU3*, *GCN4*, *HAP2*, *GLN3-GAT1* y *MOT3*). Un sitio de unión *PUT3* no consenso se indica en letras rojas. Los sitios de unión a TFs que se conservan en las secuencias de *Saccharomyces sensu stricto* también se indican en color negro (*TATA<sub>BOX</sub>*, *GCN4* y *LEU3*). La flecha negra indica el sitio +1 ATG y la orientación transcripcional. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.





**Figura S3.** Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción presentes en la secuencia 5'-UTR de *KIBAT1* y *LkBAT1*. Se muestran las secuencias de 600 pb río arriba del condón de inicio de la traducción (+1 ATG) de los genes *KIBAT1* ( $P_{KIBAT1}$ ) y *LkBAT1* ( $P_{LkBAT1}$ ). Los sitios de unión a factores de transcripción (TFs) se encontraron como se describe en Materiales y Métodos. *KIBAT1* contiene sitios de unión a TFs consensos para *HAP*, *GCN4*, *GATA* (*GLN3-GATI*), *NRG1* y *TATA<sub>BOX</sub>* (secuencia marcada en negro). Los sitios de unión a TFs consensos para *LEU3* (letras azules), *PUT3* (letras rojas) y *NRG1* (letras rojas y subrayadas en negro) se sobreponen. *LkBAT1* contiene sitios de unión a TFs consensos para *MOT3*, *LEU3*, *GCN4*, *HAP* y *TATA<sub>BOX</sub>* (secuencia marcada en negro). Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.



**Figura S4.** Identificación de regiones protegidas por nucleosomas en el ORF de los genes control *KIVCXI* y *LkVCXI*. (A) Electroforesis de los extractos digeridos con la enzima nucleasa micrococcal (MNasa). Las muestras digeridas se separaron en un gel de agarosa al 1.5 %. Se generaron y enriquecieron los fragmentos de ADN correspondientes a mononucleosomas (N1). (B) El análisis de escaneo de nucleosomas (NuSA) reveló una región resistente a la digestión de la MNasa (nucleosoma, ovalo gris). Los oligonucleótidos que amplifican las regiones de ADN protegidas por un nucleosoma se marcan con una línea roja. En el eje de la Y se muestra la cantidad inicial significativa (MSQ) que se detectó en cada región amplificada. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones probadas (glutamina línea negra, o VIL línea gris).

1) *gatacis* $\Delta$  (promotor de *BAT1*)

```
WT ccttgcgagcagtagataatntagataaagtgtatcttgccagggccttcccaggcattaactagataat
gatacis $\Delta$  ccttgcgagcagtagcaaatntagcaaaagtgtatcttgccagggccttcccaggcattaactagcaaat

WT gtgttcttttttagctgaactgtaaagcgtaaagttaacgctggataaagtaccgctgtacggttgatt
gatacis $\Delta$  gtgttcttttttagctgaactgtaaagcgtaaagttaacgctggcaaaagtaccgctgtacggttgatt
```

2) *gatacis* $\Delta$  (promotor de *BAT1*)

```
WT ccctctctgacacctcttggtatctaactctgtagatccgactcttttctttttgggtg
gatacis $\Delta$  ccctctctgacacctcttggttgctaactctgtagatccgactcttttctttttgggtg
```

3) *put3cis* $\Delta$  (promotor de *BAT1*)

```
WT tttagctgaactgtaaagcgtaaagtgttaaagctggataagtaaccgctgtacggttgatt
put3cis $\Delta$  tttagctgaactgtaaagcgtaaagtgttaaaaaatggataagtaaaaacgctgtacggttgatt
```

4) *leu3cis* $\Delta$  (promotor de *BAT2*)

```
WT tctattgtgtttgcccgtaccggcctttaagctttgaaaaaaaaaaaaagcatctgaaaaaa
leu3cis $\Delta$  tctattgtgtttaaaggtaccaaaactttaagctttgaaaaaaaaaaaaagcatctgaaaaaa
```

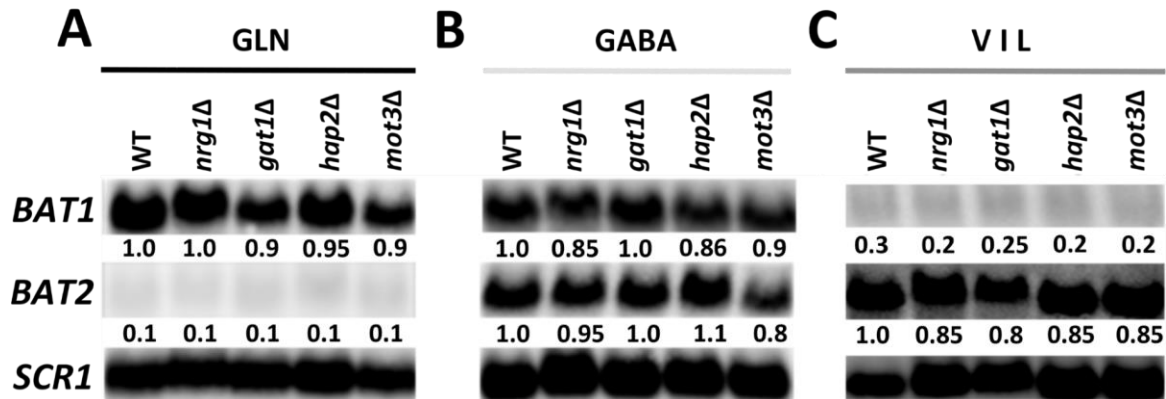
5) *put3cis* $\Delta$  (promotor de *BAT2*)

```
WT ccgcactacaccaaagtttaatgttccattggccccggaaccattcttgcaaaacggcgtt
put3cis $\Delta$  ccgcactacaccaaagtttaatgttccattggccccggaaccattcttgcaaaaaaacgtt
```

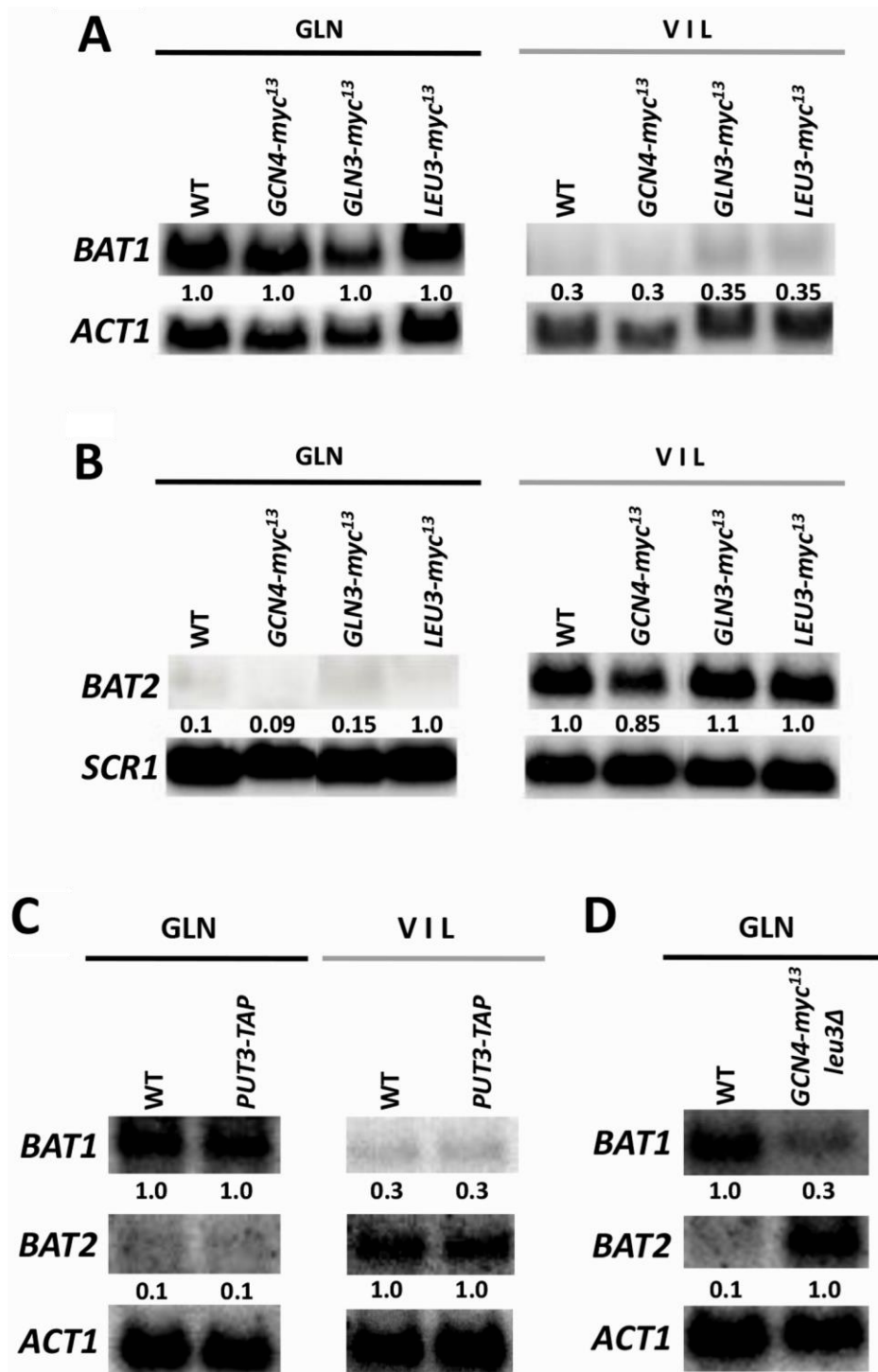
6) *leu3cis* $\Delta$  (promotor de *BAT2*)

```
WT ccattcttgcaaacggcgttctttttccgctttcgggtgacacttaatttagcttcttttcc
leu3cis $\Delta$  ccattcttgcaaacggcgttctttttccgctttaaaagtgacacttaatttagcttcttttcc
```

**Figura S5.** Alineamiento de las secuencias promotoras de *BAT1* o *BAT2* de una cepa tipo silvestre y las mutantes en *cis*. Se secuenció ADN de las cepas mutantes en *cis* (1-6, CLA11-726 a 731, ver Tabla 1) con el analizador Applied Biosystems 3100. Las secuencias se alinearon utilizando el programa Clone Manager Suite 7. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.



**Figura S6.** La expresión de *BAT1* y *BAT2* no se ve afectada en las mutantes *nrg1Δ*, *gat1Δ*, *hap2Δ* y *mot3Δ*. (A-C) El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las mutantes *nrg1Δ*, *gat1Δ*, *hap2Δ* y *mot3Δ* (Tabla 1). Los cultivos celulares se crecieron en Gln, GABA y VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR del gen *BAT1* y *BAT2* descritos en Materiales y Métodos. Se usó un fragmento de PCR del gen *SCR1* de 522 pb como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.



**Figura S7.** La expresión de *BAT1* y *BAT2* no se ve afectada en las cepas etiquetadas con el epítipo *myc<sup>13</sup>* o *TAP*. (A-D). El análisis mediante Northern se llevó a cabo con muestras de ARN total obtenidas de la cepa WT y las cepas *GCN4-myc<sup>13</sup>*, *GLN3-myc<sup>13</sup>* y *LEU3-myc<sup>13</sup>*, *GCN4-myc<sup>13</sup> leu3Δ* y *PUT3-TAP*. Los cultivos celulares se crecieron en Gln y VIL como se describe en Materiales y Métodos. Los filtros fueron sucesivamente sondeados con los productos de PCR del gen *BAT1* y *BAT2* descritos en Materiales y Métodos. Se usó un fragmento de PCR del gen *ACT1* (1500 pb) o *SCR1* (522 pb) como control de carga. El análisis y la normalización de datos se llevaron a cabo como se describe en la Figura 4A. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.

## P<sub>ScLEU1</sub>

```
1   ttgctccatttggaagtctcgcttacgtttatgogccatacagacactcaagatacac 60
61  acttacatgaacgtatacaaaatttactaacactacttgaaaatatgaaccacagtacatc 120
121 atattaagacgtagtattogatgattgaaggccgctcogcgaaatacctttactgattt 180
181 tgccggttaatcgcatcgaaatttcttcacacaagaaagcaaacaatcgccaggccat 240
241 tctacaagtttccttttcttatgaagatgtaaaagctactaaggcgctcattactctagat 300
301 gactcagtttagtctgaccttctatagtatactaccctggcgctatgatgatgagcggtt 360
      PUT3
361 cttttattgoggaaacgaaaattcogggaccgggogaaattgcccggttttgccgtaac 420
421 oggcttcatgagtcggcttcaatagtagttgaatacttatttaaacagcagaacttaact 480
481 cactcatcacgctgtttccgctgaattttctcaaaatatctaagcagtcacaacaatataa 540
541 agaatattgaaattgacagtttttgctgctatogatttttattatttgctgttttaaatc 600
```



**Figura S8.** El sitio de unión a *PUT3* está presente en la secuencia 5'-UTR de *LEU1*. Se muestra la secuencia (600 pb) río arriba del sitio +1 ATG de *LEU1*. El sitio de unión a *PUT3* (en negro) se identificó utilizando la base de datos YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>). La flecha indica el sitio +1 ATG y la orientación transcripcional. Tomada de González *et al* 2017. *GENETICS*.



## 12.2 TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla S1.** Oligonucleótidos utilizados para construir las mutantes nulas.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
J1	TTTTGTTTACCAATTTGTCTGCTCAAGAAAATAAATT AAATACAAATAAACGTACGCTGCAGGTCGACGGA	Secuencia de <i>GCN4</i> Fw que contiene 49 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>gcn4Δ</i> .
J2	TTATCTAAGTGAATGTATCTATTTTCGTTATACACGAG AATGAAAATAAAAAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>GCN4</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>gcn4Δ</i> .
J3	CCCATCCCACAATAACAGAGTGTGTAAGAAAGAGAG ACGACGTACGCTGCAGGTCGACGGA	Secuencia de <i>GLN3</i> Fw que contiene 39 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>gln3Δ</i> .
J4	TCAGTAATTATTAACATAATAAGAATAATGATAATG ATAAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>GLN3</i> Rv que contiene 40 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>gln3Δ</i> .
J5	CCTCAAGTAAAAATCGCTTCGTAACATTAATACAAAT TCTTTTTGCAATTACGTACGCTGCAGGTCGACGGA	Secuencia de <i>LEU3</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>leu3Δ</i> .
J6	AACATTTTTTCGAGGGTAAGTAAACATTACGCAAAA AAAGAAAAGGACTTATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>LEU3</i> Rv que contiene 49 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>leu3Δ</i> .
J7	GGTCCAATAACTCATTGATAGGATAATTGCAGTGAT CTAACGAGTTTACGTACGCTGCAGGTCGAC	Secuencia de <i>PUT3</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>put3Δ</i> .
J8	CATAAGAAAACAAAGAAATCAGTATTTTCTTCTTTGT CTTTGTAATGGTGATCGATGAATTCGAGCTCG	Secuencia de <i>PUT3</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>put3Δ</i> .
J9	TTTTGTTATTAGTCATATTGTTTTAAGCTGCAAATTA GTTGTACACCAACGTACGCTGCAGGTCGAC	Secuencia de <i>URE2</i> Fw que contiene 49 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>ure2Δ</i> .
J10	AACCTTCTTTTCTCTCTTCTTCTTTCTTTCTGTTTTA AAGCAGCCTATCGATGAATTCGAGCTCG	Secuencia de <i>URE2</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>ure2Δ</i> .
J11	GATTGTTCTCTCGACCAGCATATTACTAC CCTTCGAAACTTTCAGGCAACGTACGCTGCAGGTC GACGGA	Secuencia de <i>NRG1</i> Fw que contiene 49 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>nrg1Δ</i> .
J12	AGTGCGGAATAGTAGTACTGCTAATGAGAAAAACAC GGGTATACCGTCAAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>NRG1</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>nrg1Δ</i> .
J13	GCCCAGCCACATATATATAGGTGTGTGCCACTCCGG CCCCGGTATTAGCACGTACGCTGCAGGTCGACGGA	Secuencia de <i>GAT1</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>nrg1Δ</i> .
J14	TGAAGCGGACATGGAAGAAGCGAGTACTT TTTTTTTTTTGGGGGATATCGATGAATTCGAGCTCG T	Secuencia de <i>GAT1</i> Rv que contiene 47 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>nrg1Δ</i> .
J15	GCATCTGTATTTGGAAAAGCATTCTTTTTGGAAGAG GAACAAGAACGCCACGTACGCTGCAGGTCGACGG A	Secuencia de <i>HAP2</i> Fw que contiene 49 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>hap2Δ</i> .
J16	CTTGTATTATTTAGTAGTGATTTTTTATCCTCATGA CTATCGTCAGGAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>HAP2</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>hap2Δ</i> .
J17	CTAATAGGCAACAGTAGGCAAAATAGTAAAGGGACAT ATCATATTTGAGCAACGTACGCTGCAGGTCGACGG A	Secuencia de <i>MOT3</i> Fw que contiene 49 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .
J18	TTGTTAAATGAGTGGGAAGGGATTTTTGTGTGTCTA TAAAGTCTATATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>MOT3</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .
J19	AATTGACAGTTTTTGTGCTATCGATTTTTATTATTTG CTGTTTTAAATCcgcgccactctaataagc	Fw, oligo utilizado para generar la mutante <i>leu1Δ</i> , la secuencia recombinada 50 pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU1</i> (letras mayúsculas); oligo para amplificar <i>URA3</i> del plásmido pKT175 (letras minúsculas).

J20	CGCTGAGACACATGTTATTGACGCCAGGTTTGGACGT TGTTTTTCACTGTctcgttttcgacctggatgg	Rv, oligo utilizado para generar la mutante <i>leu1Δ</i> , la secuencia recombina 50 pb río abajo del codón de paron de <i>LEU1</i> (letras mayúsculas); oligo para amplificar <i>URA3</i> del plásmido pKT175 (letras minúsculas).
J20A	AAAATTTTAGAAAATTTAAGGGAAAGCATCTCCACGA GTTTTAAGAACGATAGATCTGTTTAGCTTGCCCTCGT CCCCGCCG	Secuencia de <i>BAT2</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido p4339 (negritas) para construir la mutante <i>bat2Δ</i> .
J20B	GTTTTATTCTTTTTAACTTTTTAATTACTTTACGTAGCA ATAGCGATACTTGAATTCGAGCTCGTTTTTCGACAC TGGATGG	Secuencia de <i>BAT2</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido p4339 (negritas) para construir la mutante <i>bat2Δ</i> .
J20C	ACTAGAAGTTTACTGTAGACTTTTTCTTACAAAAAG ACAAGGAACAATCAGATCTGTTTAGCTTGCCCTCGT CCCCGCCG	Secuencia de <i>LEU4</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .
J20D	GAACTTTTCTGTATTTTCAGGACTTATTCGCTTCTATTT ATTTCTATACTTGAATTCGAGCTCGTTTTTCGACACT GGATGG	Secuencia de <i>LEU4</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido pFA6-kanMX4 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .
J20E	CTTCTCCTTAGGATAATACTATCGGCACATTATCATT TAGCCGCGTAGCCACGTACGCTGCAGGTCGACGGA	Secuencia de <i>LEU9</i> Fw que contiene 50 pb río arriba del codón de inicio y la secuencia del plásmido p4339 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .
J20F	TAAAAATACATATATATATAACATGAGTAATCATAA GCTACTCCTTCTAATCGATGAATTCGAGCTCGT	Secuencia de <i>LEU9</i> Rv que contiene 50 pb río arriba del codón de paro y la secuencia del plásmido p4339 (negritas) para construir la mutante <i>mot3Δ</i> .

---

**Tabla S2.** Oligonucleótidos utilizados para construir las cepas marcadas con el epítipo *myc*<sup>13</sup>.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
J21	ATCACTTGGAAAATGAGGTTGCCAGATTAAAGAAAT TAGTTGGCGAACGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>GCN4-MYC</i> <sup>13</sup> Fw, contiene la secuencia que recombina 50 pb río arriba del codón de termino de <i>GCN4</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J22	CGTTATACACGAGAATGAAATAAAAAATATAAAATA AAAGGTAATGAGAATTCGAGCTCGTTAAAC	<i>GCN4-MYC</i> <sup>13</sup> Rv contiene la secuencia que recombina 50 pb río abajo del codón de termino de <i>GCN4</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J23	AAGAAAGTTCAGCAATTGCTGACGAATTGGATTGGT TAAAATTTGGTATACGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>GLN3-MYC</i> <sup>13</sup> Fw, contiene la secuencia que recombina 50 pb río arriba del codón de termino de <i>GLN3</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J24	AGTAATTATTAACATAATAAGAATAATGATAATGAT AATACGCGGGGACTGAATTCGAGCTCGTTAAAC	<i>GLN3-MYC</i> <sup>13</sup> Rv contiene la secuencia que recombina 50 pb río abajo del codón de termino de <i>GLN3</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J25	GGAGGGATGTTGATATTTAATGAATGAATTTGCGTT CAATCCAAGGTTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>LEU3-MYC</i> <sup>13</sup> Fw, contiene la secuencia que recombina 50 pb río arriba del codón de termino de <i>LEU3</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J26	TAACATTTTTTCGAGGGTAAGTAAACATTACGAAAA AAAGAAAAGGACTGAATTCGAGCTCGTTAAAC	<i>LEU3-MYC</i> <sup>13</sup> Rv contiene la secuencia que recombina 50 pb río abajo del codón de termino de <i>LEU3</i> , y la secuencia que amplifica el plásmido pFA6a-myc13-kanMX6 (negritas).
J26-A	GACTCGCTGCGTAAAACCTC	Fw, 240 pb río arriba del inicio de <i>LEU3::natMX4</i> (CLA11-717) para construir la cepa <i>GCN4-myc</i> <sup>13</sup> <i>leu3Δ</i> .
J26-B	CAAGGCTGGTTGGCGGTTTA	Rv, 259 pb río abajo del inicio de <i>LEU3::natMX4</i> (CLA11-717) para construir la cepa <i>GCN4-myc</i> <sup>13</sup> <i>leu3Δ</i> .

**Tabla S3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar las sondas para el análisis de Northern.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
J27	ATCAATAGTAAGGCTCGCAAACCGCCC	Fw, amplifica la sonda <i>BAT1</i> .
J28	CATGTAAAGTCCAGCGAGATACCTTGGC	Rv, amplifica la sonda <i>BAT1</i> .
J29	CAAACATCTTCGAACGTGAAAACCTGCCTCTGAGGG	Fw, amplifica la sonda <i>BAT2</i> .
J30	GTCCTTGATACCGATAGGCCAGC	Rv, amplifica la sonda <i>BAT2</i> .
J31	GTTTTGCCGGTGACGAC	Fw, amplifica la sonda <i>ACT1</i> .
J32	CTT TCG GCA ATA CCT GGG	Rv, amplifica la sonda <i>ACT1</i> .
J33	GGAGTTTTATCCAGGGTCAGCAAAGG	Fw, amplifica la sonda <i>SCR1</i> .
J34	TTTAATTTGGCGGTGCCATCAGGATTTA	Rv, amplifica la sonda <i>SCR1</i> .
J41	GTCAGCGGATGCTAGTACAA	Fw, amplifica la sonda <i>DAL5</i> .
J42	CAGCTATCTTATCACGTCTCT	Rv, amplifica la sonda <i>DAL5</i> .
J43	GGTTTTGCCGATTCTACCGTTA	Fw, amplifica la sonda <i>HIS4</i> .
J44	TTGGCTTAGCATCACCTTTCC	Rv, amplifica la sonda <i>HIS4</i> .
J47	ACTCTTTACGATAAGGTTTTTGATG	Fw, amplifica la sonda <i>LEU1</i> .
J48	GCGTGATCGTAAGCAGCACT	Rv, amplifica la sonda <i>LEU1</i> .
J49	ATGTCTGCCCTAAGAAGATC	Fw, amplifica la sonda <i>LEU2</i> .
J50	CTTAACTTCTCGGCGACAG	Rv, amplifica la sonda <i>LEU2</i> .

**Tabla S4.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes control *ScVCXI*, *KIVCXI* y *LkVCXI*.

Nombre	Secuencia (5' – 3')
<i>ScVCXI</i>	TGCGTGTGCATCCCTACTGA
<i>ScVCXI</i>	AAGTGGTCTTCCTTGCCATGA
<i>1KIVCXI</i>	GTCATGGTGTAGACTTTTATCAGTCCC
<i>1KIVCXI</i>	CAATCGACCTGGTATCAAAGCAACATC
<i>2KIVCXI</i>	GATGTTGCTTTGATACCAGGTCGATTG
<i>2KIVCXI</i>	GAGCCAACAATAAAACAAATTACAG CTGG
<i>3KIVCXI</i>	CCAGCTGTAATTTGTTTATTGTTGGCTC
<i>3KIVCXI</i>	AAACGGGTCCAAAATGCTCGCTCG
<i>4KIVCXI</i>	CGAGCGAGCATTTTGGACCCGTTT
<i>4KIVCXI</i>	TGGAGACAGTAGTACCTGAGATGATC
<i>5KIVCXI</i>	GATCATCTCAGGTACTACTGTCTCCA
<i>5KIVCXI</i>	CCGAAAAAGAAGCACGAACCAATCAC
<i>6KIVCXI</i>	GTGATTGGTTCGTGCTTCTTTTCGG
<i>6KIVCXI</i>	TTTGCTATGGCAGCTTTCGAGTGC
<i>1LkVCXI</i>	GCCTTTGCCACAGAAGAGTTGGC
<i>1LkVCXI</i>	CGATCAACTCAACGGCATTCCCT
<i>2LkVCXI</i>	AGGGAATGCCGTTGAGTTGATCG
<i>2LkVCXI</i>	CTACCTAACATGGAAGCCTGGACG
<i>3LkVCXI</i>	CGTCCAGGCTTCCATGTTAGGTAG
<i>3LkVCXI</i>	CTGTTGGATTCTGTTGTACCCACC
<i>4LkVCXI</i>	GGTGGGTACAACAGAATCCAACAG
<i>4LkVCXI</i>	GGCACAGGAAATGGCCAACAAGGA
<i>5LkVCXI</i>	TCCTTGTGGCCATTTCTGTGCC
<i>5LkVCXI</i>	TCATTGTCATCCGGCAAAGTGGCT
<i>6LkVCXI</i>	AGCCACTTTGCCGGATGACAATGA
<i>6LkVCXI</i>	GCAATATGGAAGTGCTTCTGGACAAG

**Tabla S5.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *BATI*.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Punto medio (Coordenada del promotor)	Inicio 5'/3'	Tamaño (pb)
1ScB1Fw	TTGACTATTCTAACGAGATTTA		-684	
1ScB1Rv	CGTCAAGTCCAGGGCGCCAATG	-642	-600	84
2ScB1Fw	AAACTCCTCGAGAAGCAAACCTG		-656	
2ScB1Rv	TGCGAGCCTTACTATTGATAGG	-605	-551	107
3ScB1Fw	AATTACCCACCCACAGCGCGAT		-628	
3ScB1Rv	TTTAATGGCTTGATATGGACGG	-576	-523	105
4ScB1Fw	CATTGGCGCCCTGGACTTGACG		-600	
4ScB1Rv	CATTTCACTTTTAAGGATAATA	-548	-495	105
5ScB1Fw	CCTATCAATAGTAAGGCTCGCA		-572	
5ScB1Rv	AAGGAAATGCCATCAAGCTTGT	-520	-467	105
6ScB1Fw	CCGTCCATATCAAGCCATTAAG		-544	
6ScB1Rv	GGCAATGCTATCAATTTGAGAA	-492	-439	105
7ScB1Fw	TATTATCCTTAATAGTGAAATG		-516	
7ScB1Rv	CTTTATCTAAATTATCTACTGC	-464	-411	105
8ScB1Fw	ACAAGCTTGATGGCATTTCCTT		-488	
8ScB1Rv	ATGCCTGGGAAGGCCCTGGCAA	-434	-383	105
9ScB1Fw	TTCTCAAATTGATAGCATTGCC		-460	
9ScB1Rv	AGCTAAATAAGAACACATTATC	-408	-355	105
10ScB1Fw	GCAGTAGATAATTTAGATAAAG		-432	
10ScB1Rv	CAGCGTTAACATTTACGCTTTA	-380	-327	105
11ScB1Fw	TTGCCAGGGCCTTCCCAGGCAT		-404	
11ScB1Rv	TCAATCAACCGTACACGCGGTA	-352	-299	105
12ScB1Fw	GATAATGTGTCTTTTTTAGCT		-376	
12ScB1Rv	ACCGCCTGGCCTCTATCAGTAA	-324	-271	105
13ScB1Fw	TAAAGCGTAAATGTTAACGCTG		-348	
13ScB1Rv	GCCGGTATGAAATCTGCACAAA	-296	-243	105
14ScB1Fw	TACCGCGTGTACGGTTGATTGA		-320	
14ScB1Rv	AGCCAATTCATCAGTAATAATA	-266	-215	105
15ScB1Fw	TTACTGATAGAGGCCAGGCGGT		-292	
15ScB1Rv	GATCGGATGGGCCATTAACAAA	-240	-187	105
16ScB1Fw	TTTGTGCAGATTTTCATACCGGC		-264	
16ScB1Rv	GAATTTTGAGTCATAAGAAGGC	-212	-159	105
17ScB1Fw	TATTATTACTGATGAATTGGCT		-236	
17ScB1Rv	TTAAAGGCCGGTACCGGCAAAC	-184	-131	105
18ScB1Fw	TTGTTTAAATGGCCCATCCGATC		-208	
18ScB1Rv	CTAGCTCTCTTTATAGTGCCAT	-144	-79	129
19ScB1Fw	GCCTTCTTATGACTCATAATTC		-180	
19ScB1Rv	TTCTAACGATAACATGTAGTTG	-116	-51	129
20ScB1Fw	GTTTGCCGGTACCGGCCTTTAA	-88	-152	129

20ScB1Rv	GCTGATTTTGCCTTTATAGGGT		-23	
21ScB1Fw	ATGGCACTATAAAGAGAGCTAG		-100	
21ScB1Rv	CAACATGTTTTAGTATGCTAAG	-47	+6	106
22ScB1Fw	CAACTACATGTTTTCGTTAGAA		-72	
22ScB1Rv	ATTTCCCCAACTTCAAGGAATG	-20	+32	104
23ScB1Fw	ACCCTATAAACGCATAATCAGC		-44	
23ScB1Rv	GCACCAGTAGCGAGTGTCTGA	+9	+62	106
24ScB1Fw	CTTAGCATACTATAACATGTTG		-16	
24ScB1Rv	AATTTTTAGTTGGATGCATCT	+37	+90	106
25ScB1Fw	CATTCCTGAAGTTGGGGAAAT		+13	
25ScB1Rv	TTGGCTTGGATGGATTTGGGTT	+65	+118	105
26ScB1Fw	TCAGAACACTCGCTACTGGTGC		+41	
26ScB1Rv	TCTGGCCGAACACTAATTCTTCAT	+94	+148	107
27ScB1Fw	AGATGCATCCAACTAATAATT		+69	
27ScB1Rv	GGAATGGTCAACATATGATCGG	+122	+176	107
28ScB1Fw	AACCCAAATCCATCCAAGCCAA		+97	
28ScB1Rv	AGTGCCCCACCCTTCTTTGGCT	+150	+204	107
29ScB1Fw	ATGAAGAATTAGTGTTCCGGCCAGA		+125	
29ScB1Rv	AAAGATTACCGTAAGGCTTGAT	+178	+232	107
30ScB1Fw	CCGATCATATGTTGACCATTCC		+155	
30ScB1Rv	AAGCAGATGGGTCAAGAGAAAG	+202	+250	95

---

**Tabla S6.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *BAT2*

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Punto medio (Coordenada del promotor)	Inicio 5'/3'	Tamaño (pb)
1ScB2Fw	CAGACCCGTCTCCCCTCAAGAT		-628	
1ScB2Rv	GGGGCTAACTAGGATGTCACTG	-581	-523	105
2ScB2Fw	ATTGCTCCCTCCAACACTCTC		-600	
2ScB2Rv	GGAGCGTTATAAGTTGTGTTGG	-548	-495	105
3ScB2Fw	ATTTCCACCATTTTTTGCAGTT		-572	
3ScB2Rv	GGTTTTACGTTCTGAAGATGTTTG	-520	-467	105
4ScB2Fw	CAGTGACATCCTAGTTAGCCCCTT		-544	
4ScB2Rv	GCTAGGTCGTGAATGACCCTCA	-492	-439	105
5ScB2Fw	CCAACACAACCTATAACGCTCC		-516	
5ScB2Rv	AATAAATCGTACACGTATATAG	-464	-411	105
6ScB2Fw	CAAACATCTTCGAACGTGATAACC		-488	
6ScB2Rv	AACTTTGGTGTAGTGCGGTCAC	-436	-383	105
7ScB2Fw	TGAGGGTCATTCACGACCTAGC		-460	
7ScB2Rv	GAATGGTTCCGGGGCCAATGGA	-408	-355	105
8ScB2Fw	CTATATACGTGTACGATTTTTT		-432	
8ScB2Rv	GAAAGCGGAATAAGAACGCCG	-380	-327	105
9ScB2Fw	GTGACCGCACTACACCAAAGTT		-404	
9ScB2Rv	GGAATAGAAGCTAAATTAAGTG	-352	-299	105
10ScB2Fw	TCCATTGGCCCCGGAACCATTC		-376	
10ScB2Rv	AGATTAGATAACAAGAGGTGTC	-323	-270	106
11ScB2Fw	ACGGCGTTCTTTTTCCGCTTTC		-348	
11ScB2Rv	CACCAATTAGAATAAGAGTCGG	-296	-243	105
12ScB2Fw	CACTTAATTTAGCTTCTTTTCC		-320	
12ScB2Rv	TGACAGAATAACGGACATAGAA	-268	-215	105
13ScB2Fw	GACACCTCTGTATCTAATCT		-292	
13ScB2Rv	AATTTCTACCTATTATTTCCGT	-240	-187	105
14ScB2Fw	CCGACTCTTTTTCTTTTGGTG		-264	
14ScB2Rv	GATCTCCTCTCACTCACGTACG	-212	-159	105
15ScB2Fw	TTCTATGTCCGTTTTTCTGTCA		-236	
15ScB2Rv	ATATTAGTTATACTGTCAGCTC	-184	-131	105
16ScB2Fw	ACGGAAATAATAGGTAGAAATT		-208	
16ScB2Rv	AGGAAATAGTCGAATATCTTGT	-156	-103	105
17ScB2Fw	CGTACGTGAGTGAGAGGAGATC		-180	
17ScB2Rv	GATTTCTCAAAGGAATGAATTT	-128	-75	105
18ScB2Fw	GAGCTGACAGTATAACTAATAT		-152	
18ScB2Rv	TTTTAGTAGTTAGTCTGTTTTT	-100	-47	105
19ScB2Fw	ACAAGATATTCGACTATTTCCCT		-124	
19ScB2Rv	GGAGATGCTTTCCTTAAATTT	-72	-19	105
20ScB2Fw	AAATTCATTCCTTTGAGAAATC	-43	-96	106



20ScB2Rv	CCAAGGTCATATCGTTCTTAAA		+10	
21ScB2Fw	AATAACAGACTAACTACTTAAA		-70	
21ScB2Rv	TTATCTTAACTTTGGAGGCGTCTA	-16	+38	108
22ScB2Fw	AAATTTAAGGAAAGCATCTCC		-40	
22ScB2Rv	TGGCTTAGATGCATGTTGTGTG	+13	+66	106
23ScB2Fw	TTTAAGAACGATATGACCTTGG		-12	
23ScB2Rv	TGCCAAACACTAACTCACTGTT	+41	+94	106
24ScB2Fw	TAGACGCCTCCAAAGTTAAGATAA		+17	
24ScB2Rv	GCAGTTAACATGTGGTCCGTGA	+69	+122	105
25ScB2Fw	CACACAACATGCATCTAAGCCA		+45	
25ScB2Rv	ACCCACCCCTTTTCAGCTGTC	+97	+150	105
26ScB2Fw	AACAGTGAGTTAGTGTGGCA		+73	
26ScB2Rv	GATTTTGATAAGGTTAATCTC	+125	+178	105
27ScB2Fw	TCACGGACCACATGTAACTGC		+101	
27ScB2Rv	AATACCACCGCGGAAGGGTCTA	+153	+206	105
28ScB2Fw	GACAGCTGAATAAGGGTGGGGT		+128	
28ScB2Rv	CCCTTCGAATAGCTCAATAGCA	+181	+234	106
29ScB2Fw	GAGATTAAACCTTATCATAATC		+157	
29ScB2Rv	TTCAATCTGGACGAAACATTG	+223	+290	133

**Tabla S7.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *KIBATI*

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Punto medio (Coordenada del promotor)	Inicio 5'/3'	Tamaño (pb)
1K/B1Fw	CCTGTACCTGAGCCAACGA		-720	
1K/B1Rv	CACTAGTGTATCGAAACAGGTTG	-672	-624	96
2K/B1Fw	AGATGTGGCCGTTTCAATGCA		-682	
2K/B1Rv	CTGTTCAAACAGGGGAAAACC	-631	-580	102
3K/B1Fw	CAACCTGTTTCGATACACTAGTG		-645	
3K/B1Rv	GAGATGAAGACCGAACCATTG	-598	-550	95
4K/B1Fw	GGTTTTCCCCTGTTTGAACAG		-600	
4K/B1Rv	CAAGGGTTTCACTCACATTGCA	-552	-503	97
5K/B1Fw	CAATGGTTCGGTCTTCATCTC		-570	
5K/B1Rv	TCCCGTCATGCATTGTCACTT	-522	-474	96
6K/B1Fw	TGCAATGTGAGTGAAACCCTTG		-524	
6K/B1Rv	AGGCCTTTCGCAGGCTGAA	-478	-431	93
7K/B1Fw	AAGTGACAATGCATGACGGGA		-494	
7K/B1Rv	ATTGAGAACGCAGGTGAAAGC	-448	-401	93
8K/B1Fw	TTCAGCCTGCGAAAGGCCT		-449	
8K/B1Rv	CACATGCATGACTACCAAGA	-401	-353	96
9K/B1Fw	GCTTTCACCTGCGTTCTCAAT		-421	
9K/B1Rv	GTAATCTTCGCTCAGGTTTCG	-375	-329	92
10K/B1Fw	TCTGGTGAGTCATGCATGTG		-373	
10K/B1Rv	AGTTTCAATTCCACTTGTACTTGG	-331	-288	85
11K/B1Fw	CGAACCTGAGCGAAGATTAC		-349	
11K/B1Rv	CTGTTGCTTAGTGTTTCCAGTG	-303	-256	93
12K/B1Fw	CCAAGTACAAGTGGAAATTGAAAC		-313	
12K/B1Rv	CAGATTGCCGGTTGCATTTTC	-267	-221	92
13K/B1Fw	CACTGAAACACTAAGCAACAG		-277	
13K/B1Rv	GAACCAGGCATCCCACCT	-234	-191	86
14K/B1Fw	GAAATGCAACCGGCAATCTG		-240	
14K/B1Rv	CTCAGTCTATGCGTATTATCGAA	-195	-149	91
15K/B1Fw	AGGTGGGATGCCTGGTTC		-209	
15K/B1Rv	ATGCCCTTCTTATCTGCCTCTT	-149	-88	121
16K/B1Fw	TTCGATAATACGCATAGACTGAG		-172	
16K/B1Rv	CCAAACAAGAACAGAAACAAGAC	-118	-63	109
17K/B1Fw	AAGAGGCAGATAAGAAGGGCAT		-109	
17K/B1Rv	CTTGCCAGGGATGAAATAGCT	-59	-9	100
18K/B1Fw	GTCTTGTTTCTGTTCTTGTTTGG		-85	
18K/B1Rv	CGTAGTCCAATGTAGTTCATGAA	-33	+20	105
19K/B1Fw	AGCTATTTTCATCCCTGGCAAG		-29	
19K/B1Rv	TACCTCTTGATGGAATGGAAACT	+21	+70	99
20K/B1Fw	TTCATGAACTACATTGGACTACG	+57	+3	107

20K/B1Rv	AAGGACATGGCTCTATAACTTGT		+110	
21K/B1Fw	AGTTTCCATTCCATCAAGAGGTA		+48	
21K/B1Rv	GACCTTGGTGATTTTAACCTTG	+95	+141	93
22K/B1Fw	ACAAGTTATAGAGCCATGTCCTT		+88	
22K/B1Rv	GACCGAAAACCAACTCATCGT	+138	+187	99
23K/B1Fw	CAAGGTAAAATCACCAAGGTC		+120	
23K/B1Rv	GTCCATTCGATGGTTAACATATG	+172	+224	104
24K/B1Fw	ACGATGAGTTGGTTTTCGGTC		+167	
24K/B1Rv	ATGGTTAATCTCTGGGACACC	+215	+262	95
25K/B1Fw	CATATGTTAACCATCGAATGGAC		+202	
25K/B1Rv	GAACACACACGAGGATGGAT	+251	+300	98

---

**Tabla S8.** Oligonucleótidos utilizados para NuSA en el gen *LkBAT1*

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Punto medio (Coordenada del promotor)	Inicio 5'/3'	Tamaño (pb)
1 <i>Lk</i> B1Fw	CTGGGCTGTAGCTGTTGCA		-689	
1 <i>Lk</i> B1Rv	TGGTGTGCGGGAAGGTGT	-646	-602	87
2 <i>Lk</i> B1Fw	ACTATCCGGTGAAAGGTCAGT		-656	
2 <i>Lk</i> B1Rv	TCTACTTGCCCTCGGTGTA	-608	-559	97
3 <i>Lk</i> B1Fw	ACACCTTCCCGCAACACCA		-620	
3 <i>Lk</i> B1Rv	CTTGGAACAGCTGTTTGATGCT	-574	-528	92
4 <i>Lk</i> B1Fw	AAGTACACCGAGGCAAGTAGA		-580	
4 <i>Lk</i> B1Rv	ACATGAGTATGGACTCTTGTGAA	-534	-488	92
5 <i>Lk</i> B1Fw	AGCATCAAACAGCTGTTCCAAG		-549	
5 <i>Lk</i> B1Rv	TCCGCTGTTGGCCGGCT	-497	-445	104
6 <i>Lk</i> B1Fw	TTCACAAGAGTCCATACTCATGT		-510	
6 <i>Lk</i> B1Rv	AGTCGAGCACGATCTGCGA	-468	-425	85
7 <i>Lk</i> B1Fw	AGCCGGCCAACAGCGGA		-469	
7 <i>Lk</i> B1Rv	AAACAAGGCTCTTCGTTGCT	-425	-381	88
8 <i>Lk</i> B1Fw	TCGCAGATCGTGCTCGACT		-443	
8 <i>Lk</i> B1Rv	ATGAGTAAGACTGCGTTGAGGT	-377	-352	91
9 <i>Lk</i> B1Fw	AGCGAACGAAGAGCCTTGTTT		-401	
9 <i>Lk</i> B1Rv	GTTGTAAGATTTGGTAAGTTGGGA	-359	-316	85
10 <i>Lk</i> B1Fw	ACCTCAACGCAGTCTTACTCAT		-373	
10 <i>Lk</i> B1Rv	AAGATGGAATACGAACGGACGA	-324	-274	99
11 <i>Lk</i> B1Fw	TCCCAACTTACCAAATCTTACAAC		-339	
11 <i>Lk</i> B1Rv	ACGTGACTCGAGGATAGGCT	-289	-238	101
12 <i>Lk</i> B1Fw	TCGTCCGTTTCGTATTCCATCTT		-295	
12 <i>Lk</i> B1Rv	TATGCGAGTAACATGCCTGTC	-253	-210	85
13 <i>Lk</i> B1Fw	AGCCTATCCTCGAGTCACGT		-257	
13 <i>Lk</i> B1Rv	TTTAGCCGCTACCGGCGTT	-207	-157	100
14 <i>Lk</i> B1Fw	GACAGGCATGTTACTCGCATA		-230	
14 <i>Lk</i> B1Rv	CAGGCGACGCGTTCGAT	-182	-133	97
15 <i>Lk</i> B1Fw	AACGCCGGTAGCGGCTAAA		-175	
15 <i>Lk</i> B1Rv	TATATCTTGTGACTCACTCGGTT	-133	-91	84
16 <i>Lk</i> B1Fw	ATCGACCGCTCGCCTG		-149	
16 <i>Lk</i> B1Rv	AGGAGCCAAGGATCATTGCTT	-102	-55	94
17 <i>Lk</i> B1Fw	AACCGAGTGAGTCACAAGATATA		-113	
17 <i>Lk</i> B1Rv	CAAATCTTTAATATTGGAGAAACGGA	-84	-25	88
18 <i>Lk</i> B1Fw	AAGCAATGATCCTTGGCTCCT		-75	
18 <i>Lk</i> B1Rv	TTCAGAGAACTTTTAGCATTTTCGT	-28	+20	95
19 <i>Lk</i> B1Fw	TCCGTTTCTCCAATATTAAGATTTG		-50	
19 <i>Lk</i> B1Rv	CTGGTACTAAATAGACGATTGAG	+1	+50	100
20 <i>Lk</i> B1Fw	ACGAAATGCTAAAAAGTTCTCTGAA	+38	+5	66

20 <i>Lk</i> B1Rv	GTCCAATGGAGCGGACATAG		+71	
21 <i>Lk</i> B1Fw	CTCAATCGTCTATTTAGTACCAG		+28	
21 <i>Lk</i> B1Rv	CTTGGATGGATTGGTGTTTTATG	+76	+123	95
22 <i>Lk</i> B1Fw	CTATGTCCGCTCCATTGGAC		+62	
22 <i>Lk</i> B1Rv	TTGACCAAAAACCAACTTGTCGT	+109	+156	94
23 <i>Lk</i> B1Fw	CTAAAAACACCAATCCATCCAAG		+100	
23 <i>Lk</i> B1Rv	TGGTCCATTCAATGGTCAACATA	+147	+193	93
24 <i>Lk</i> B1Fw	ACGACAAGTTGGTTTTTGGTCAA		+134	
24 <i>Lk</i> B1Rv	CATATGGCTTGATTTCTGGAACG	+183	+232	98
25 <i>Lk</i> B1Fw	TATGTTGACCATTGAATGGACCA		+171	
25 <i>Lk</i> B1Rv	TAGTGGAAGACGCATGCAGAT	+222	+272	99
26 <i>Lk</i> B1Fw	CGTTCCAGAAATCAAGCCATATG		+210	
26 <i>Lk</i> B1Rv	CTTCAAACCTTCAAACAACTCGA	+255	+300	90

**Tabla S9.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de qChIP.

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
J53	ATACCGCTGTCGCTATTATTA	Oligo P <sub>BAT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J54	TACCGCAAACACAATAGAATTTT	Oligo P <sub>BAT1</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J55	ATAGGTAGAAATTAAGAGCCGTAC	Oligo P <sub>BAT2</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J56	TCCCAGGAAATAGTCGAATATCTT	Oligo P <sub>BAT2</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J57	AACCAGCAGTTCTTCTAGGCA	Oligo P <sub>HIS4</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>HIS4</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J58	TTACCTTCTATATCGAATGACTGAT	Oligo P <sub>HIS4</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>HIS4</i> para determinar el pegado de Gcn4.
J59	ATTGCCTTGCGAGCAGTAGATA	Oligo P <sub>BAT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Gln3.
J60	TACTTATCCAGCGTAAACATTTAC	Oligo P <sub>BAT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Gln3.
J61	TCTTTTCCCTCTCTGACACCT	Oligo P <sub>BAT2</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Gln3.
J62	TACGGCTCTTAATTTCTACCTATT	Oligo P <sub>BAT2</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Gln3.
J63	TTTCATCAGTCACTTGACAAAT	Oligo P <sub>DAL5</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>DAL5</i> para determinar el pegado de Gln3.
J64	AATCCGCACTTCACTCAGA	Oligo P <sub>DAL5</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>DAL5</i> para determinar el pegado de Gln3.
J65	ATCCGATCCATATTGCCTTCTTAT	Oligo P <sub>BAT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Leu3.
J66	TATAGTGCCATTTTTTTCAGATGCTT	Oligo P <sub>BAT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT1</i> para determinar el pegado de Leu3.
J67	ACTACACCAAAGTTTAATGTTCCATT	Oligo P <sub>BAT2</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Leu3.
J68	TTAGATAACAAGAGGTGTCAGAGA	Oligo P <sub>BAT2</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>BAT2</i> para determinar el pegado de Leu3.
J69	TGAACCTTGCTTGCTGTCAAACCT	Oligo P <sub>ILV5</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>ILV5</i> para determinar el pegado de Leu3.
J70	TTCTGACTCCTACTGAGCTCT	Oligo P <sub>ILV5</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>ILV5</i> para determinar el pegado de Leu3.
J71	AAGCGTTCGGTTGGATGAC	Oligo P <sub>GRS1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>GRS1</i> .
J72	GGGGAGCAAACACTATTCACTT	Oligo P <sub>GRS1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>GRS1</i> .
J73	AATTCCTTTTCGCAATGGCTTT	Oligo P <sub>PUT1</sub> Fw, amplifica en la región promotora de <i>PUT1</i> para determinar el pegado de Put3.
J73	TAGCGCCACTCATCAATTGTTTAT	Oligo P <sub>PUT1</sub> Rv, amplifica en la región promotora de <i>PUT1</i> para determinar el pegado de Put3.

**Tabla S10.** Oligonucleótidos utilizados para construir las mutantes en *cis*

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Descripción
J74	GCATTTCTCTGCACTTCTCAAATTGATAGCATTGC CTTGCAGCAGTA GAGCTCGTTTTGACACTGG	Secuencia Fw usada para generar el CORE-BAT1-promotor en las cepas CLA11-726 y CLA11-728.
J75	CGCCTGGCCTCTATCAGTAAGATCATTCAATCAACCG TACACGCGGTACTTCCTTACCATTAAGTTGATC	Secuencia Rv usada para generar el CORE-BAT1-promotor en las cepas CLA11-726 y CLA11-728.
J76	CTGCACTTCTCAAATTGATAGCATTGCCTTGCAGCA GTAGcaAATTTAGcaAAAGTGTATCTTGCCAGGCCTT CCCAGGCATTAAGTcaAATGTGT	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-726.
J77	CTATCAGTAAGATCATTCAATCAACCGTACACGCGGT ACTTgCCAGCGTTAACATTTACGCTTTACAGTTCAGC TAAAAAAGAACACATTTGCTAGTTA	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-726.
J69	CTGCACTTCTCAAATTGATAGCATTGCCTTGCAGCA GTAGATAATTTAGATAAAAGTGTATCTTGCCAGGCCT TCCCAGGCATTAAGTcaAATGTGT	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-728.
J70	CTATCAGTAAGATCATTCAATCAACCGTACACGttTA CTTATCCAttCTTAACATTTACGCTTTACAGTTCAGCT AAAAAAGAACACATTTGCTAGTTA	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-728.
J71	TTGGCTCTCTTTTTGTTAATGGCCCATCCGATCCATA TTGCCCTTCTAT GAGCTCGTTTTGACACTGG	Secuencia Fw usada para generar el CORE-BAT1-promotor en la cepa CLA11-727.
J72	TGTTACCACTAGCTCTCTTTATAGTGCCATTTTTTTCA GATGCTTTTTTT TCCTTACCATTAAGTTGATC	Secuencia Rv usada para generar el CORE-BAT1-promotor en la cepa CLA11-727.
J73	TACTGATGAATTGGCTCTCTTTTTGTTAATGGCCCAT CCGATCCATATTGCCTTCTTATGACTCAAAATTCTATT GTGTTTaaGGTACCaaaCTTTAA	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-727.
J74	AACATGTAGTTGTTACCACTAGCTCTCTTTATAGTGC CATTTTTTTCAGATGCTTTTTTTTTTCAAAGCTTAAA GTTTGGTACCTTTAAACACAATAGA	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT1-promotor en la cepa CLA11-727.
J75	CCGCACTACACCAAAGTTAATGTTCCATTGGCCCCG GAACCATTCTTGCAGCTCGTTTTGACACTGG	Secuencia Fw usada para generar el CORE-BAT2-promotor en las cepas CLA11-729, CLA11-730 y CLA11-731.
J76	AAAAACGGACATAGAAGAACGACACCAAAAAAGAAA AAGAGTCGGATCTACTCCTTACCATTAAGTTGATC	Secuencia Rv usada para generar el CORE-BAT2-promotor en las cepas CLA11-729, CLA11-730 y CLA11-731.
J77	CCGCACTACACCAAAGTTAATGTTCCATTGGCCCCG GAACCATTCTTGCAAACGGCGTTCTTTTTCCGCTTTC GGTGACACTTAATTTAGCTTCTTTT	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT2-promotor en la cepa CLA11-729.
J78	AAAAACGGACATAGAAGAACGACACCAAAAAAGAAA AAGAGTCGGATCTACAGATTAGcaAACAAGAGGTGTC AGAGAGGAAAAGAAGCTAAATTAAGTG	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT2-promotor en la cepa CLA11-729.
J79	CCGCACTACACCAAAGTTAATGTTCCATTGGCCCCG GAACCATTCTTGCAAACGGCGTTCTTTTTCCGCTTAAA GTGACACTTAATTTAGCTTCTTTT	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT2-promotor en la cepa CLA11-730.

J80	AAAAACGGACATAGAAGAACGACACCAAAAAGAAA AAGAGTCGGATCTACAGATTAGATAACAAGAGGTGT CAGAGAGGGAAAAGAAGCTAAATTAAGTG	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT2- promotor en la cepa CLA11-730.
J81	CCGCACTACACCAAAGTTTAATGTTCCATTGGCCCG GAACCATTCTTGCAAAAaaCGTTCTTTTCCGCTTTCGG GTGACACTTAATTTAGCTTCTTT	Secuencia Fw usada para generar el IRO-BAT2- promotor en la cepa CLA11-731.
J82	AAAAACGGACATAGAAGAACGACACCAAAAAGAAA AAGAGTCGGATCTACAGATTAGATAACAAGAGGTGT CAGAGAGGGAAAAGAAGCTAAATTAAGTG	Secuencia Rv usada para generar el IRO-BAT2- promotor en la cepa CLA11-731.



### 13. PUBLICACIONES

**El trabajo realizado como tesis doctoral resultó en una publicación en la revista de *GENETICS* de la que soy primer autor.**

1. **James González**, Geovani López, Stefany Argueta, Ximena Escalera-Fanjul, Mohamed el Hafidi, Carlos Campero-Basaldua, Joseph Strauss, Lina Riego-Ruiz and Alicia González. 2017. Diversification of Transcriptional Regulation Determines Subfunctionalization of Paralogous Branched Chain Aminotransferases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. DOI: 10.1534/genetics.117.300290

**Estas publicaciones en las que aparezco como coautor son el resultado de colaboraciones con algunos miembros del laboratorio de la Dra. Alicia González y la Dra. Lina Riego Ruiz.**

2. Ximena Martínez de la Escalera-Fanjul, Jose Carlos Campero-Basaldua, Maritrini Colón, **James González**, Dariel Marquez and Alicia Gonzalez. 2017. Evolutionary Diversification of Alanine Metabolism in Yeast Catabolic Specialization and Biosynthetic Redundancy. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01150
3. Campero-Basaldua C, Quezada H, Riego-Ruiz L, Márquez D, Rojas E, **González J**, El-Hafidi M, González A. 2016. Diversification of the kinetic properties of yeast NADP-glutamate-dehydrogenase isozymes proceeds independently of their evolutionary origin. *Microbiology open*. DOI: 10.1002/mbo3.419
4. Montalvo-Arredondo J, Jiménez-Benítez Á, Colón-González M, **González-Flores J**, Flores-Villegas M, González A, Riego-Ruiz L. 2015. Functional roles of a predicted branched chain aminotransferase encoded by the *LkBAT1* gene of the yeast *Lachancea kluyveri*. *Fungal Genet Biol*. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.11.004
5. López G, Quezada H, Duhne M, **González J**, Lezama M, El-Hafidi M, Colón M, Martínez de la Escalera X, Flores-Villegas MC, Sczzocchio C, DeLuna A, González A. 2015. Diversification of Paralogous  $\alpha$ -Isopropylmalate Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-Oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. DOI: 10.1128/EC.00033-15
6. Colón M., Hernández F., López K., Quezada H., **González J.**, López G., Aranda C., González A. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. *PLoS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0016099 5.

**Durante el doctorado también realicé un ensayo de divulgación científica que resultó en una publicación en la revista de *CIENCIAS*, UNAM.**

7. **James González**, Geovani López y Alicia González. 2016. Duplicación génica: causas y repercusiones. Revista CIENCIAS, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.revistaciencias.unam.mx/es/>