



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Regulación transcripcional de los
genes parálogos *GDH1* y *GDH3* en
*Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
ALAN ANUART GONZÁLEZ RANGEL



**DIRECTOR DE TESIS:
Q.F.B. María Cristina Aranda Fraustro**

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos de jurado

1.- Datos del alumno

González
Rangel
Alan Anuart
52085299
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306251821

2.- Datos del tutor

Q.F.B.
María Cristina
Aranda
Fraustro

3.- Datos del sinodal 1

Dr.
Victor Manuel
Valdés
López

4.- Datos del sinodal 2

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

5.- Datos del sinodal 3

Dra.
María Teresa
Lara
Ortiz

6.- Datos del sinodal 4

M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

7.- Datos del trabajo escrito

Regulación transcripcional de los genes parálogos
GDH1 y *GDH3* en *Saccharomyces cerevisiae*
63
2014

A mis padres que supieron guiarme por el camino correcto.

A mis hermanos por estar conmigo en todo momento.

Reconocimientos

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Q.F.B María Cristina Aranda Fraustro en el laboratorio 301 Oriente del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural a cargo de la Dra. Alicia González Manjarrez del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se reconoce y agradece a la Dra. Alicia González Manjarrez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio para realizar los experimentos mostrados en este trabajo.

Se reconoce y agradece la colaboración de la Dra. Lourdes Valenzuela por su invaluable ayuda, su asesoría técnica y la discusión de los resultados obtenidos en este proyecto.

Se reconoce y agradece a la Dra. Maritrini Colón González por su apoyo, tiempo y sugerencias en esta tesis.

Se reconoce y agradece todo el apoyo de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera por la síntesis de oligonucleótidos.

El proyecto fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) a través del donativo CB-2010/152448 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) con el apoyo IN204412-3.

Durante un año fui beneficiado con una beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) con el apoyo IN204412-3.

El jurado de examen profesional de licenciatura estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Víctor Manuel Valdés López

Vocal: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Secretario: Q.F.B María Cristina Aranda Fraustro

Suplente: Dra. María Teresa Lara Ortiz

Suplente: M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera

Agradecimientos

Agradezco a mis padres todo su apoyo, sin ellos no sería quien ahora soy, por todos los cuidados que tuvieron, a mi mamá por aquellas pláticas sabias que me permitieron resistir en cada momento difícil de mi vida, a mi padre por compartir las noches de desvelo y las mañanas frías cuando salíamos a nuestras actividades cotidianas.

A mis hermanos David, Edmundo y Claudia por ser como son y apoyarme ante las adversidades, por aquellos momentos de convivencia, por estar a mi lado aun en momentos de su ausencia.

A mis sobrinos, por darme una fuerza más para continuar, a Víctor por enseñarme cada vez algo nuevo y recordarme que la curiosidad es lo más bello en el humano, a Evan por recordarme que la rebeldía junto con la curiosidad tienen un gran resultado.

A la Dra. Alicia González por permitirme adentrarme en la ciencia, guiarme de manera inequívoca y de una forma adecuada durante mi estancia en el laboratorio y lo más importante, por dotarme de un criterio objetivo para llevar a cabo la labor científica, mostrándome que sin controles y protocolos la ciencia se reduce a tan solo trabajo burdo y sin sentido.

A Cristi por formar parte de esta etapa de mi vida, compartir todo su conocimiento, tenerme paciencia en momentos difíciles, brindarme su amistad y estar siempre presente en el camino académico e incluso en lo personal.

A mis compañeros de la carrera que durante todo el proceso siempre estuvieron presentes en mi camino, gracias a todos por los grandes momentos que dentro y fuera del aula compartimos, más como una familia que como simples amigos, muchas gracias Juan Carlos, Ricardo, Saddam, Sergio, Víctor y Josué.

A mis compañeros de laboratorio, que sin duda me enseñaron miles de cosas, compartieron momentos muy agradables conmigo y que durante mi estancia en el laboratorio fueron como una segunda familia, gracias James, Geo, Mijail, Eren, Dariel, Charly, Aránzazu, Cit, Mari , Ximena y Rocío.

A todos mis amigos del Colegio Invisible por fomentar la creatividad y estimular el trabajo en equipo y multidisciplinario que enriquece la formación de cualquier ser humano.

Índice general

Reconocimientos	iii
Agradecimientos	vi
Índice de figuras	x
Índice de tablas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
1. Introducción	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio.	1
1.2. Duplicación del genoma en los organismos.	1
1.3. Destino de los genes duplicados.	2
1.4. El evento de duplicación en <i>S. cerevisiae</i> y sus ventajas adaptativas.	5
1.5. Metabolismo Central de Nitrógeno (MCN).	6
1.6 Las Glutamato Deshidrogenasas (Gdh's) en <i>S. cerevisiae</i>	7
1.7. Represión Catabólica Nitrogenada en <i>S. cerevisiae</i>	8
1.8. La vía TOR en la levadura y la regulación por <i>GLN3</i> , <i>RTG3</i> y <i>RTG1</i>	9
1.9. Complejo RTG1/3 y la ruta retrograda.	11
1.10. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).	11
1.11. El Complejo Hap2/3/4/5 y la regulación de genes del TCA.	12
1.12. Represión por glucosa en la levadura.	12
1.13. El factor transcripcional Nrg1.	13
2. Antecedentes	14
3. Planteamiento del problema	17
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo general.	18
4.2. Objetivos particulares.	18
5. Metodología	19
5.1. Análisis <i>in silico</i> y obtención de secuencias promotoras.	19
5.2. Diseño de oligonucleótidos.	19

5.3. Obtención de ADN total de levadura.	19
5.4. Transformación de la levadura.	20
5.5. Construcción de cepas.	22
5.6. Construcción de las dobles mutantes.	25
5.7. Northern Blot.	26
5.8. Comprobación de las dobles mutantes por análisis tipo Northern Blot.	28
5.9. Co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).	29
5.10. qRT-PCR (PCR en tiempo real) y sus aplicaciones.	31
5.11. Protocolo Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).	33
6. Resultados y discusión	39
6.1. La expresión de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> no es afectada por la etiqueta <i>myc</i> ¹³	39
6.2. Análisis <i>in silico</i> de los promotores de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i>	40
6.3. Diseño de oligonucleótidos para qChIP	41
6.4. Estandarización del protocolo de qChIP.	42
6.5. Rtg3 se une al promotor de <i>GDH3</i> de manera independiente del complejo HAP en etanol-glutamina.	43
6.6. Hap2 se une al promotor de los parálogos <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en un fondo <i>rtg3Δ</i>	45
6.7. El factor transcripcional Rtg3 se une a los promotores de los genes parálogos <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en medio glucosa-prolina.	46
6.8. El factor transcripcional Rtg3 se une a los promotores de los genes parálogos <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en medio YPD en fase estacionaria.	48
6.9. El factor transcripcional Nrg1 se une a los promotores de los parálogos <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en medio glucosa-prolina.	50
6.10 El factor transcripcional Nrg1 se une a los promotores de los parálogos <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en YPD.	53
7. Conclusiones.	56
8. Perspectivas.	57
Referencias.	58

Índice de figuras

Figura 1. Posibles destinos de un gen duplicado.	4
Figura 2. Cladograma del grupo Saccharomycetaceae.	5
Figura 3. Reacciones del metabolismo central del nitrógeno.	7
Figura 4. Regulación de <i>GLN3</i> y <i>RTG3</i> por medio de la vía TOR.	10
Figura 5. Perfil de expresión de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i>	14
Figura 6. Gln3 depende del complejo HAP para unirse al promotor de <i>GDH1</i> en medio mínimo etanol-glutamina.	15
Figura 7. La expresión de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> depende de Rtg3.	16
Figura 8. Esquema teórico de transformación por recombinación homóloga.	21
Figura 9. Gel de confirmación de la mutante <i>hap2Δ</i>	23
Figura 10. Gel de confirmación de mutantes NAT.	24
Figura 11. Gel de confirmación de las dobles mutantes.	25
Figura 12. Comprobación de las dobles mutantes por Northern Blot.	29
Figura 13. Esquema del fundamento de la técnica de Co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	30
Figura 14. Método de qRT-PCR por SYBR Green.	31
Figura 15. Esquema del Valor Ct.	32
Figura 16. Eficiencia de oligonucleótidos.	37
Figura 17. Curva de disociación de oligonucleótidos.	37
Figura 18. La expresión de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> no es afectada por la etiqueta <i>myc</i> ¹³	39
Figura 19. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>GDH1</i>	40
Figura 20. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>GDH3</i>	40
Figura 21. La unión de Gln3 al promotor de <i>GDH1</i> depende del complejo HAP.	42
Figura 22. La unión del factor transcripcional Rtg3 al promotor de <i>GDH3</i> no depende del complejo HAP.	44

Figura 23. La unión de Hap2 en <i>GDH3</i> no es afectada en una cepa mutante <i>rtg3Δ HAP2 myc¹³</i>	47
Figura 24. Rtg3 se une a los promotores de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en medio glucosa-prolina.	48
Figura 25. El factor transcripcional Rtg3 se une a <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en YPD en fase estacionaria.	49
Figura 26. El factor transcripcional Nrg1 se une a <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en medio glucosa-prolina.	52
Figura 27. El factor transcripcional Nrg1 se une a <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> en YPD.	54

Índice de tablas

Tabla I. Algunos de los genes regulados por el factor de transcripción <i>GLN3</i>9	
Tabla II. Cepas utilizadas en este trabajo. 21	
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de cepas mutantes. . .22	
Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en la confirmación de cepas. 22	
Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para confirmar las cepas con el casete de resistencia a <i>Neourseotricina</i> 24	
Tabla VI. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de dobles mutantes. . . 25	
Tabla VII. Oligonucleótidos para qChIP utilizados en este trabajo. 41	
Tabla VIII. Datos utilizados para la figura 22. Cepas RTG3 <i>myc</i> ¹³ y <i>hap2Δ</i> RTG3 <i>myc</i> ¹³ en medio glutamina + choque de etanol de 24 hrs. 44	
Tabla IX. Datos utilizados para la figura 23. Cepas HAP2 <i>myc</i> ¹³ y <i>rtg3Δ</i> HAP2 <i>myc</i> ¹³ en medio glutamina + choque de etanol de 24 hrs. 45	
Tabla X. Datos utilizados para la figura 24. Fase exponencial y estacionaria. Cepa RTG3 <i>myc</i> ¹³ en medio glucosa-prolina. 47	
Tabla XI. Datos utilizados para la figura 25. Fase exponencial y estacionaria. Cepa RTG3 <i>myc</i> ¹³ en medio YPD. 49	
Tabla XII. Datos utilizados para la figura 26. Fase exponencial y estacionaria. Cepa NRG1 <i>myc</i> ¹³ en medio glucosa-prolina. 51	
Tabla XIII. Datos utilizados para la figura 27. Fase exponencial y estacionaria. Cepa NRG1 <i>myc</i> ¹³ en medio YPD. 54	

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ARNm	ARN mensajero.
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (Chromatin Immunoprecipitation).
Ct	Ciclo de umbral (Cycle treshold) valor necesario para realizar la qChIP
DO	Densidad Óptica.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
FT	Factores de transcripción.
Kb	Kilobases.
KDa	KiloDaltones.
NCR	Represión Catabólica Nitrogenada (<i>Nitrogen Catabolite Repression</i>).
NAT	Nourseotricina.
MAE	Amortiguador MOPS+ Acetato de sodio + EDTA
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>).
pb	pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PEG	Polietilenglicol.
qChIP	Inmunoprecipitación de cromatina cuantitativa (<i>quantitative ChIP</i>).
rpm	revoluciones por minuto.
TES	Solución con Tris-HCl, EDTA y SDS.
UAS	Secuencias de activación río arriba (<i>Upstream Activation Sequences</i>).
WGD	Duplicación de todo el genoma (<i>Whole Genome Duplication</i>).
YPD	Medio rico para levadura compuesto por extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa (<i>Yeast extract-Peptone-Dextrose</i>).

Resumen

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo modelo, con su genoma descrito desde 1996. Además se sabe que experimentó una duplicación de genoma completo; ha sido ampliamente estudiado en aspectos bioquímicos, genéticos y moleculares; se emplea para estudiar genes parálogos.

En este trabajo se estudió la unión de los factores transcripcionales Rtg3, Hap2 y Nrg1 por medio de la técnica de qChIP en los promotores de los genes *GDH1* y *GDH3* los cuales fueron originados en el evento de duplicación de genoma completo.

Los genes *GDH*'s codifican para las proteínas glutamato deshidrogenasas, en cargadas de la síntesis de glutamato, compuesto indispensable para el metabolismo nitrogenado.

Nuestros resultados permiten concluir que la unión del factor Rtg3 es independiente al complejo HAP; y que el factor Nrg1 se encuentra unido a ambos promotores en cada fase del crecimiento probada (exponencial y estacionaria) en medio con glucosa-prolina y medio rico (YPD).

Sin embargo nuestros resultados muestran grandes desviaciones estándar por lo que se está buscando una solución a este problema y reducir el error experimental.

I. Introducción

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

La levadura del pan, *S. cerevisiae*, es considerada un organismo modelo debido a algunas características en su ciclo de vida. Es un organismo unicelular no patógeno, el tiempo generacional es muy corto (aproximadamente 90 minutos), facilidad de réplica en placas permitiendo aislamiento de mutantes, un sistema genético bien definido facilitando su cultivo y manipulación en el laboratorio, etc. (Sherman, 1998). Esta levadura, ha sido ampliamente utilizada en diversos campos del conocimiento tales como la biotecnología, genética, biología molecular, etc. (Mell y Burgess, 2002). Además de ser un organismo con el genoma totalmente secuenciado desde 1996. El proyecto de secuenciación fue encabezado por André Goffeau, donde participaron más de 600 científicos de 96 laboratorios. A partir de la resolución de la secuencia de este organismo se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio (Dujon, 1996).

Los estudios en esta levadura han facilitado el entendimiento de aspectos relacionados con el metabolismo de carbono (Broach, 2012) y metabolismo de nitrógeno (Magasanik, 2005). Este organismo eucarionte ha permitido conocer diversos fenómenos que parecen estar conservados en la línea evolutiva, por ejemplo, la duplicación génica (Wolfe, 1997).

1.2. Duplicación del genoma en los organismos

Los genomas son modificados por una serie de procesos que involucran sustituciones, inserciones, deleciones, retrotransposiciones, redistribución de exones, transferencia lateral de genes, duplicaciones sencillas y de genoma completo (Levasseur y Pontarotti, 2011). Las duplicaciones pueden ser de un segmento, es decir de unos pocos nucleótidos o de varias kilobases (kb) y aunque

este tipo de duplicaciones es el más común, además existe un proceso llamado poliploidización o duplicación de genoma completo (*Whole Genome Duplication* WGD, por sus siglas en inglés). Este evento ha ocurrido en muchos organismos eucariontes, desde el protozooario *Plasmodium* y la levadura *Saccharomyces* hasta la planta *Arabidopsis*, incluso la aparición de los vertebrados se cree que está ligada a este proceso; esto ha representado grandes ventajas adaptativas para los organismos que experimentan una WGD (Ohno,1970).

Desde el trabajo de Ohno (1970) se ha considerado la duplicación génica como la principal fuente de novedad evolutiva. La duplicación de genoma completo ofrece una ruta de innovación evolutiva mayor comparada con múltiples duplicaciones independientes, permitiendo adaptaciones a gran escala a nuevos ambientes (Bruce *et al*, 2004) favoreciendo que el nuevo material genético pueda obtener nuevas funciones, incrementando la complejidad en las redes de regulación génica así como en las interacciones proteicas (Kellis *et al.*, 2004).

1.3. Destino de los genes duplicados

La duplicación ocurre en un individuo y puede ser fijada o perderse en las poblaciones, de manera similar a las mutaciones puntuales. El destino de los genes duplicados a través de la historia evolutiva está determinado por sus funciones (**figura1**) (Force,1999).

El nacimiento y pérdida de genes es un tema común en la evolución de genomas y familias génicas. Un gen puede seguir diferentes destinos después de la duplicación, los cuales están determinados principalmente por la ventaja selectiva que le confieren al organismo (Zhang, 2003).

El evento más común luego de una WGD es la pérdida masiva de genes, seguida por arreglos genéticos. Estos genes duplicados pueden experimentar una pérdida de función ya que a menudo la redundancia generada por el evento de duplicación resulta no ventajosa e incluso algunas veces puede ser perjudicial. La **pseudogenización** es el proceso por el cual un gen acumula mutaciones en la región codificante o en la región promotora (o en ambas) y que guían a la pérdida

de la función o a la falta de expresión, lo que lo convierte en un pseudogen (Zhang, 2003). Con el tiempo, algunos pseudogenes son eliminados del genoma o bien divergen tanto del gen parental que no es posible identificarlos (Lynch y Force, 2000). Por lo general este proceso ocurre en los primeros millones de años después de la duplicación. Por otro lado, las copias adicionales de genes pueden conservarse si la dosis adicional representa una ventaja y se mantiene por conversión génica constante o por otros mecanismos de reparación de errores. Este mecanismo de conservación por **dosis génica** es común en proteínas que forman complejos macromoleculares y en donde es importante mantener la estequiometría de las subunidades del complejo, como los ARN ribosomales y las histonas. Es poco probable que dos genes con funciones idénticas se mantengan en el genoma a menos que la presencia de una cantidad mayor de producto de un gen sea ventajosa (Zhang, 2003).

La genética de poblaciones teóricamente predice que ambos duplicados pueden ser mantenidos de manera estable en el genoma si difieren en algunos aspectos de su función o expresión, es decir, experimentan un proceso de **subfuncionalización**. Una forma de subfuncionalización es la evolución divergente de la expresión de los genes parálogos (Force, 1999). Los cambios en la expresión después de la duplicación parecen ser una regla general más que una excepción y esos cambios a menudo ocurren rápidamente después de la duplicación (Lynch, 2000; Zhang, 2003).

Los procesos de subfuncionalización también pueden ocurrir a nivel de proteínas y conducen a una divergencia funcional cuando las actividades originales se distribuyen entre las dos copias originadas. Existen muchos estudios sobre la subfuncionalización en genes duplicados, tal es el caso de *GDH1* y *GDH3* (DeLuna *et al.*, 2001) o *BAT1* y *BAT2* (Colón *et al.*, 2005); sin embargo no es claro el porcentaje de genes que han evolucionado por este mecanismo (Zhang, 2003; Hurles, 2004).

El resultado más importante de la duplicación es el origen de nuevas funciones (**neofuncionalización**), en este caso uno de los genes resultante de la duplicación adquiere una función totalmente nueva, que no está relacionada con la

función del gen ancestral aunque parece improbable que una nueva función pueda surgir en un gen duplicado, existen ejemplos de este proceso, tal es caso del los genes *ADH1* y *ADH2* (Piskur *et al.*, 2006). Los estudios moleculares sugieren que nuevas funciones son probablemente conferidas por un gran número de cambios en la secuencia de aminoácidos durante un periodo corto de tiempo luego de la duplicación (Zhang, 2003; Hurles, 2004)

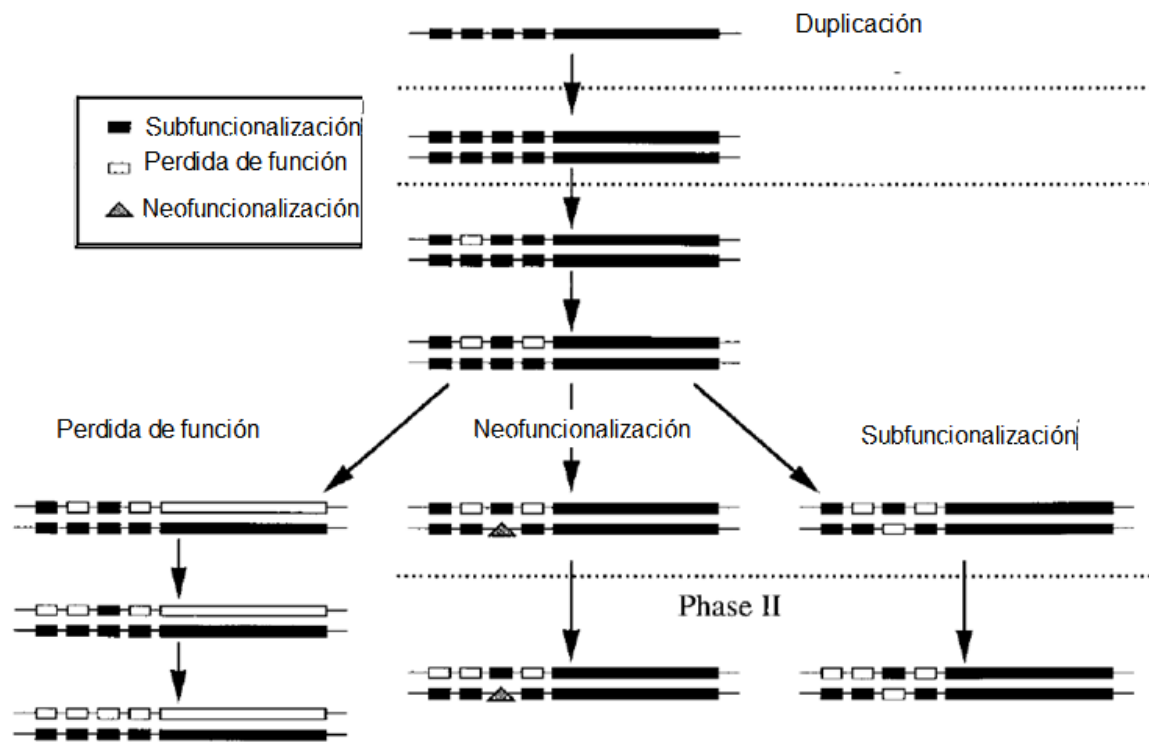


Figura 1. Posibles destinos de un gen duplicado. La duplicación de genes individuales generalmente resulta en que una de las copias del gen es perdida (pérdida de la función). En casos raros, la copia funcional del gen duplicado y el gen ancestral divergen en la función; neofuncionalización significa que uno de los dos genes adquiere una nueva función. La subfuncionalización implica que los genes duplicados cumplen funciones complementarias ya presentes en el gen ancestral (Imagen modificada de Force, 1999).

1.4. El evento de duplicación en *S. cerevisiae* y sus ventajas adaptativas

Es ampliamente aceptado que el clado Saccharomycetaceae experimentó un evento de WGD, éste es considerado un evento importante en la filogenia y ocurrió hace aproximadamente 100 millones de años (**figura 2**) (Gordon *et al* , 2011).

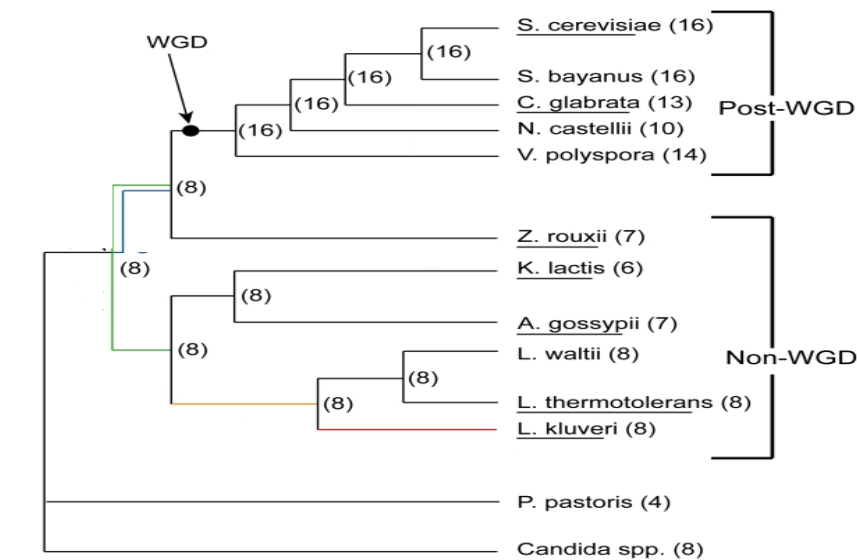


Figura 2. Cladograma del grupo Saccharomycetaceae. Entre paréntesis se indica el número de cromosomas de las especies y los números inferidos en los nodos en el árbol. La flecha indica el evento de la duplicación WGD. Las especies cuyos nombres están subrayados son aquellas cuyos genomas están secuenciados. (Imagen modificada de Gordon *et al.*, 2011).

Luego de este evento de duplicación, sólo una pequeña fracción de genes con copias adicionales fue retenida, alrededor del 13% de proteínas de *S. cerevisiae* fueron originadas por esta duplicación, entre ellas se encuentran proteínas cinasas, factores de transcripción, miosinas, ciclinas y enzimas del metabolismo central del carbono y nitrógeno. Se ha propuesto que la retención selectiva de algunos genes duplicados favoreció la adquisición del metabolismo fermentativo en *S. cerevisiae* (Piskur *et al.*, 2006).

Piskur y colaboradores (2006) propusieron que la retención de los parálogos *ADH1* y *ADH2* que codifican para las enzimas Alcohol Deshidrogenasas

1 y 2, respectivamente, permitieron que la levadura adquiriera un metabolismo fermentativo. Se conoce que estos parálogos se duplicaron hace aproximadamente 88 millones de años (Piskur *et al.*, 2006) correlacionándose con la fecha en que se data el evento de duplicación del genoma de *S. cerevisiae* calculado por Wolfe (1997). Este evento tiene relevancia al observar que la aparición de las plantas con flores y frutos (Angiospermas) está datada hace 130 millones de años aproximadamente (Willis, 2002), y es posible que las levaduras colonizaran los nuevos nichos ecológicos (frutos), favoreciendo así que los genes *ADH1* y *ADH2* se neofuncionalizaran.

1.5. Metabolismo Central de Nitrógeno (MCN)

La utilización de compuestos nitrogenados ha sido bien estudiada en *S. cerevisiae*. Large (1986) realizó un estudio detallado del metabolismo de estos compuestos, lo que permitió un mejor entendimiento del metabolismo del nitrógeno (Large, *et al* 1986). La degradación de compuestos nitrogenados para el crecimiento de la levadura conduce a la formación de 2 moléculas claves en la célula, que son la glutamina y el glutamato. Estos dos aminoácidos son muy importantes ya que sirven como donadores de nitrógeno para todos los compuestos nitrogenados en la célula, por esta razón se ha denominado a esta interconversión Metabolismo Central del Nitrógeno (CNM, por sus siglas en inglés) (Eelko, 2000). Estos metabolitos se encuentran vinculados por un sistema de 3 reacciones enzimáticas descritas a continuación:

Reacción 1.- La principal ruta de síntesis de glutamato ocurre a través de la condensación de amonio con α -cetoglutarato, reacción catalizada por las glutamato deshidrogenasas dependientes de NADPH Gdh1 y Gdh3 (NADPH-GDH). La degradación del glutamato se lleva a cabo por la Gdh dependiente de NAD (Gdh2).

Reacción 2.-La glutamina es sintetizada por la combinación de amonio con glutamato, esta reacción es catalizada por la GS (glutamina sintetasa).

Reacción 3.- Existe una ruta alternativa de formación de glutamato: la GOGAT emplea una molécula de α -cetoglutarato y una de glutamina (sintetizada por la

GS), biosintetizando 2 moléculas de glutamato y generando una ganancia neta de una molécula de glutamato. Las levaduras que no atravesaron la WGD tales como *S. pombe* y *K. lactis* muestran sólo un gen codificante para GDH-NADP. Cabe mencionar que Gdh1 y Gdh3 no son enzimas redundantes, como se explicará más adelante (**figura 3**) (Eelko, 2000).

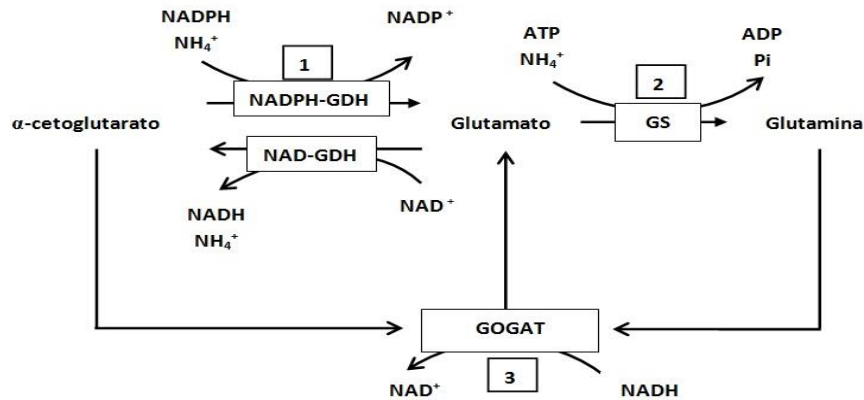


Figura 3. Reacciones del metabolismo central del nitrógeno. Los números indican las 3 reacciones enzimáticas que regulan el MCN en *S. cerevisiae* (ver texto) (Tomado de Eelko, 2000).

1.6. Las Glutamato Deshidrogenasas (Gdh's) en *S. cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es el primer microorganismo descrito en el que la actividad de NADP-GDH es codificada por los genes *GDH1* y *GDH3* (Avendaño, 1997). La proteína Gdh1 pesa 51kDa mientras que Gdh3 46kDa, lo que sugiere la existencia de una modificación post-traducciona. Todos los miembros de la familia de las glutamato deshidrogenasas, presentan una estructura hémérica α_6 50kD (DeLuna *et al.*, 2001).

GDH1 y *GDH3* han sido ampliamente estudiados por ser un ejemplo de divergencia tanto funcional (actividad de la proteína) como en la regulación transcripcional. Se sabe que cuando *S. cerevisiae* se cultiva en un medio con glucosa como fuente de carbono, Gdh1 representa la principal vía de síntesis de glutamato; sin embargo, en fuentes no fermentables de carbono como etanol, Gdh3 tiene un papel fundamental modulando la tasa de síntesis de glutamato, de

esta forma proporciona un mecanismo de balance de utilización de α -cetoglutarato, además Gdh3 es incapaz de complementar la falta de Gdh1 en ciertas condiciones (DeLuna *et al.*, 2001).

Con respecto a la expresión, se conoce que el gen *GDH1* está regulado por activadores transcripcionales tales como Gln3, Gcn4 y Leu3 involucrados en la regulación de genes del metabolismo del nitrógeno así como del carbono (complejo HAP), además presenta una regulación a través de complejos de remodelación de cromatina (Riego, 2002). Por otro lado, estudios de expresión han demostrado que *GDH3* está reprimido en glucosa, debido a que el complejo SAGA mantiene compacta la cromatina en esta condición, mientras que en presencia de etanol, su expresión aumenta y la cromatina está relajada (Avendaño, 2005).

1.7. Represión Catabólica Nitrogenada en *S. cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar una gran cantidad de compuestos como fuente de nitrógeno, que no tienen las mismas características y por lo tanto la levadura presenta diferentes tasas de crecimiento. Existen dos tipos de fuentes de nitrógeno: las que se consideran como fuentes primarias y permiten un crecimiento rápido tales como amonio, glutamina y asparagina, y las fuentes secundarias, que se caracterizan por producir tasas de crecimiento lento como la prolina, urea y GABA (Eelko, 2000).

La levadura está dotada de un sistema para reconocer en el medio la fuente de nitrógeno que le permita tener una mejor tasa de crecimiento, con la finalidad de poder sobrevivir y reproducirse. Este mecanismo se ha llamado ***Nitrogen Catabolite Repression*** (NCR, por sus siglas en inglés) en el que al cultivar a *S. cerevisiae* en un medio que contiene una fuente primaria de nitrógeno, se reprime la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno (Eelko, 2000). Se sabe que el mecanismo de represión de genes involucrados en el metabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno es regulado por factores de transcripción que reconocen UAS_{NTR} (Secuencias Activadoras Río Arriba, por sus siglas en inglés) (Rai *et al.*, 1987; Coffman *et al.*, 1994). Hasta ahora, se han identificado 5 proteínas clave en el sistema NCR a

nivel transcripcional, dos activadores (Gln3, Gat1/Nil1), 2 represores (Dal80/Uga43, Deh1/Gfz3) y la proteína reguladora Ure2.

GLN3 no es esencial para el crecimiento, sin embargo es necesario para la activación de diversos genes involucrados en el NCR (**Tabla I**). Este factor de transcripción es un dedo de Zinc y presenta regiones similares en secuencia con Nit2 (*Neurospora crassa*).

Tabla I. Algunos de los genes regulados por el factor de transcripción *GLN3*

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

1.8. La vía TOR en la levadura y la regulación de *GLN3*, *RTG3* y *RTG1*

La cinasa TOR (denominada así por ser blanco de rapamicina) regula un extenso conjunto de procesos celulares y es un sensor de los nutrientes, en especial fuentes de nitrógeno y posiblemente de carbono. Cuando TOR es inhibida por rapamicina los genes más afectados son aquellos involucrados en el metabolismo de fuentes secundarias de nitrógeno. Entre la gran variedad de fuentes de nitrógeno utilizadas por la levadura, la glutamina es un regulador clave en el metabolismo del nitrógeno ya que es requerida para la formación de purinas, pirimidinas así como NAD⁺ (Crespo *et al*, 2002). TOR inhibe la expresión de genes regulados por nitrógeno a través de la proteína Ure2, que secuestra al factor Gln3 formando un complejo en el citoplasma. En el modelo convencional, Gln3 se encuentra localizado en el citoplasma unido a Ure2 en presencia de fuentes de nitrógeno primarias y Ure2 es fosforilado de forma dependiente a TOR. El

complejo Gln3/Ure2 es incapaz de entrar al núcleo, por lo que Gln3 no puede activar sus genes blanco. Además otros factores de transcripción que responden a nutrientes como Msn2, Msn4, Rtg1 y Rtg3 son regulados por la cinasa TOR de una manera parecida (**figura 4**). Crespo y colaboradores (2002) proponen que la glutamina regula la vía retrograda por medio de la cinasa TOR (Crespo *et al.*, 2002).

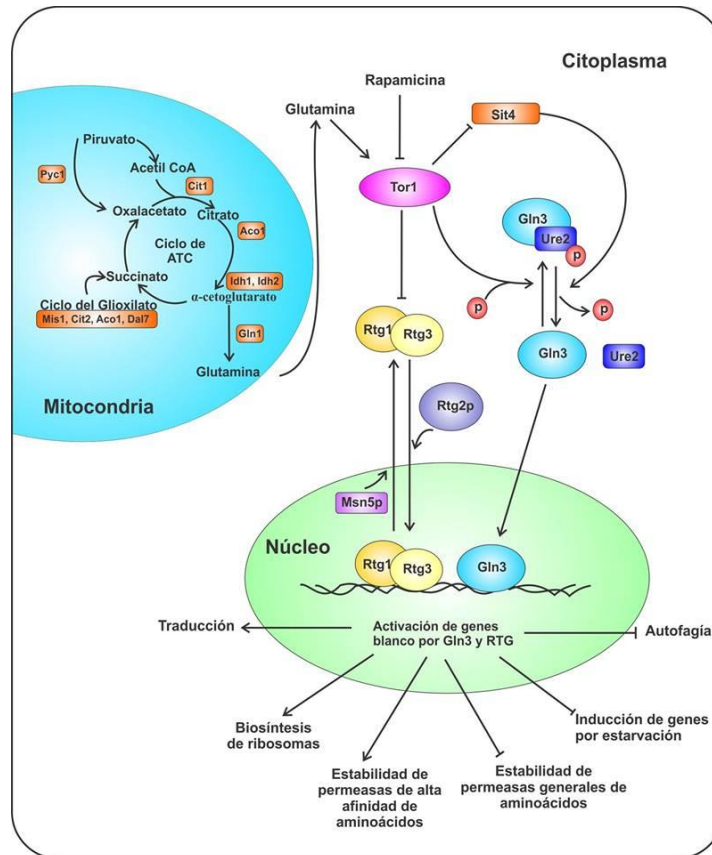


Figura 4. Regulación de *GLN3* y *RTG3* por medio de la vía TOR (Tomado y modificado de Biocarta)

1.9. Complejo Rtg1/3 y la ruta retrógrada

El complejo proteico Rtg1/3 regula la ruta retrógrada que involucra la expresión de los tres primeros pasos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Esta ruta funciona como ruta anaplerótica para el suministro necesario de α -cetoglutarato (Liu, 2006). El gen *RTG1* codifica para un factor de transcripción de 19kDa perteneciente a la familia de los factores básicos hélice-bucle-hélice, zipper de leucina (bHLH). Este factor de transcripción contiene un dominio de unión al ADN pero carece de dominio de activación el cual es proporcionado por Rtg3 (Jia *et al.*, 1997).

El gen *RTG3*, a diferencia de *RTG1*, contiene una secuencia de residuos de aminoácidos conservados entre la mayoría de los factores pertenecientes a esta familia y sirve para la unión con el ADN (E-Box). Sin embargo Jia y colaboradores (1997) demostraron que ambos factores son necesarios para la unión de una caja no consenso con la secuencia 5'GGTCAC 3', que se encuentra 76 pares de bases (pb) río arriba del codón de inicio en el gen *CIT2*. Por otro lado Rtg3 tiene 2 dominios de activación, uno presente en el extremo carboxilo terminal (375-486) y otro en la secuencia amino-terminal (1-175); ninguno de estos dominios de activación contiene el bHLH, además también se identificó un dominio de serina-treonina en los aminoácidos 176-282 que sirve como regulador de la transactivación (Jia *et al.*, 1997).

1.10. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)

En los organismos con metabolismo respiratorio, la mayor cantidad de ATP es proporcionado por el ciclo de Krebs también conocido como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). *S. cerevisiae* al presentar un metabolismo fermento-respiratorio utiliza la glucosa como fuente de carbono por medio de la glucólisis y apaga casi por completo el TCA; sin embargo, luego de la utilización de la glucosa y la formación de etanol, se lleva a cabo la respiración por el TCA (Liu, 1999). La expresión de las enzimas participantes en el TCA se regula por dos

diferentes complejos transcripcionales que actúan dependiendo de las condiciones metabólicas de la célula, produciendo la síntesis de α -cetoglutarato. Este compuesto sirve de conexión con el metabolismo del nitrógeno permitiendo la biosíntesis de proteínas.

1.11. El Complejo Hap2/3/4/5 y la regulación de genes del TCA

El complejo HAP fue originalmente encontrado como un regulador positivo de la expresión del citocromo C (Forsburg y Guarente, 1989), sin embargo, después se descubrió que es importante para la regulación de los genes del TCA y genes de la cadena respiratoria. HAP es un complejo heteromérico en *S. cerevisiae* compuesto por las proteínas Hap2, Hap3 y Hap5 formando el sitio de unión al ADN que reconoce la secuencia 5'CCAAT3' mientras que Hap4 contiene el dominio de activación. *HAP2*, *HAP3* y *HAP5* se mantienen expresados de manera constitutiva, mientras que la transcripción de *HAP4* es inducida durante la fase diaúxica, es decir cuando la glucosa se ha terminado y comienza la utilización de etanol (Buschlen *et al*, 2003).

1.12 Represión por glucosa en la levadura

Los organismos son capaces de adaptar su metabolismo con la finalidad de optimizar el uso de la fuente de carbono disponible en el ambiente. Para *S. cerevisiae* la glucosa (o fructosa) es la fuente de carbono preferida, pero las células son capaces de utilizar un amplio rango de otras fuentes de carbono. El mecanismo por el cual las células se adaptan a diferentes metabolismos es a través de la regulación de la expresión genética, que se logra principalmente aunque no de manera exclusiva por el control transcripcional (Carlson, 1999).

1.13 El factor transcripcional Nrg1

El gen *NRG1* codifica para un factor transcripcional de 231 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 25kDa perteneciente a la familia de dedos de Zn. Esta proteína tiene dos dominios de dedos de zinc cerca del carboxilo terminal, que son muy similares a los presentes en el represor Mig1, esta similitud de los motivos proteicos condujo al descubrimiento de que Nrg1 actúa como represor cuando la glucosa está en el medio, por la unión específica a la secuencia CCCCT presente en el gen *STA1* (Park *et al.*, 1999).

Nrg1 y Mig1 funcionan como represores en presencia de glucosa. Los análisis que permitieron conocer la secuencia consenso de unión para Nrg1 demostraron que no existe suficiente identidad para inferir homología con la secuencia consenso de Mig1 [(G/C)(C/T)GG(G/A)G]. Los sitios de unión para el represor Nrg1 son CCCCT y/o CCCTC, éstos son importantes para la unión del factor transcripcional al ADN en la secuencia promotora del gene *STA1* (Park *et al.*, 1999). Es importante destacar que a diferencia de Mig1, la localización del represor transcripcional Nrg1 no depende de la fuente de carbono (Broach, 2012).

2. Antecedentes

Análisis realizados por DeLuna y colaboradores (1999) demostraron que la enzima Gdh1 tiene diferentes capacidades catalíticas al compararla con Gdh3, debida a una divergencia funcional a nivel de la proteína (DeLuna *et al.*, 1999).

A nivel regulatorio se ha encontrado que los perfiles de expresión de *GDH1* y *GDH3* son opuestos en glucosa como única fuente de carbono. *GDH1* se expresa principalmente en la fase de crecimiento exponencial (cuando hay más glucosa) y su expresión disminuye conforme la glucosa es utilizada. Por otro lado, la expresión de *GDH3* está reprimida en la fase exponencial (cuando aún hay glucosa) y se expresa conforme la glucosa es utilizada y la célula comienza a sintetizar etanol (**figura 5**).

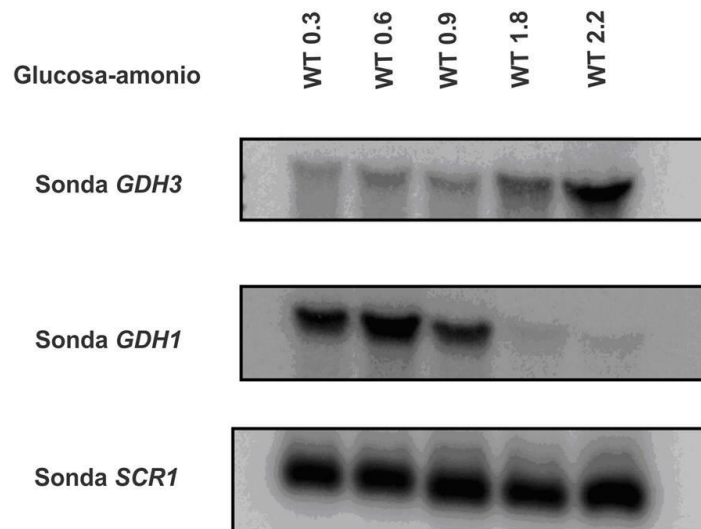


Figura 5. Perfil de expresión de *GDH1* y *GDH3*. Se analizó la expresión de *GDH1* y *GDH3* en una cepa silvestre a diferentes densidades ópticas (0.3, 0.6, 0.9, 1.8, y 2.2). en un medio con glucosa y amonio. *GDH1* se expresa en glucosa, mientras que *GDH3* se expresa en etanol. *SCR1* fue utilizado como control de carga.

Estudios por northern blot demostraron que *GDH1* y *GDH3* están regulados por el complejo HAP de una manera no canónica (Hernández² *et al.*, 2011). En un fondo *hap2Δ* la expresión de *GDH1* y *GDH3* disminuye, sin embargo en un fondo

*hap4*Δ la expresión no disminuye, lo que sugiere que existe otro activador transcripcional que depende de Hap2 (dominio de unión al ADN), pero no de Hap4 (dominio de activación).

Un ensayo de Coimmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostró que en etanol-glutamina la expresión de *GDH1* es regulada por un heterocomplejo formado por Gln3-Hap2/3/5 (**figura 6**) ya que en un fondo *hap2*Δ, el factor Gln3 no está unido al promotor de *GDH1*, en otras palabras, la unión de Gln3 a *GDH1* depende del complejo HAP. Por otra parte, la unión de Gln3 al promotor *GDH3* no depende del complejo HAP. Por lo tanto, el heterocomplejo Gln3-Hap2/3/5 no regula al gen *GDH3* (Hernández² *et al.* , 2011).

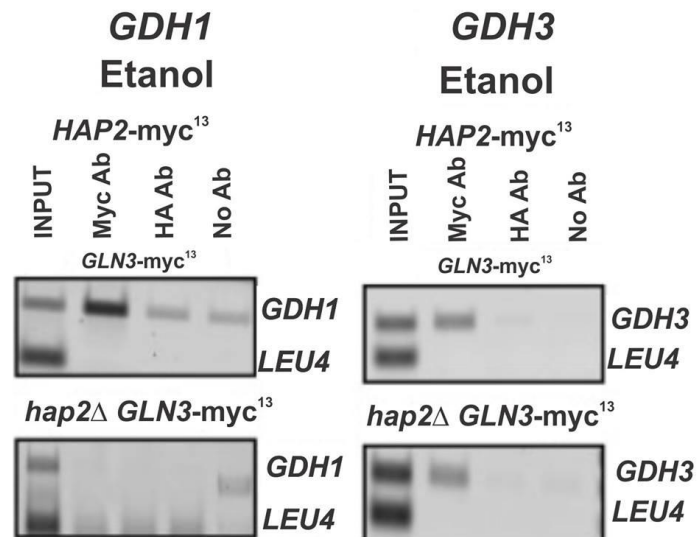


Figura 6. Gln3 depende del complejo HAP para unirse al promotor de *GDH1* en medio mínimo etanol-glutamina. En medio mínimo etanol-glutamina Gln3 depende del complejo HAP para unirse al promotor de *GDH1*, por otra parte la unión de Gln3 al promotor *GDH3* no depende del complejo HAP. *LEU4* fue utilizado como control negativo del experimento.

En un ensayo tipo northern blot encontramos que el factor transcripcional Rtg3 es importante para la expresión de *GDH3* y en menor grado para el gen

GDH1 (figura 7), debido a que en un fondo *rtg3Δ* la expresión de los genes *GDH1* y *GDH3* disminuye en comparación con la cepa silvestre.

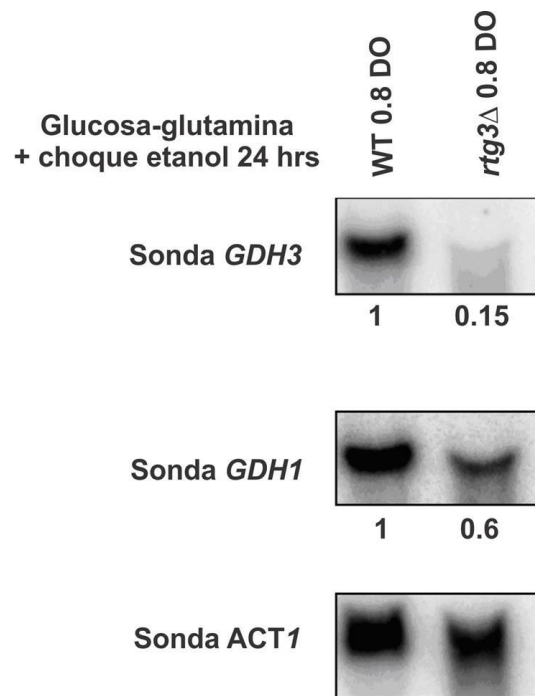


Figura 7. La expresión de *GDH1* y *GDH3* depende de *Rtg3*. Se analizó la expresión de *GDH1* y *GDH3* en un fondo *rtg3Δ* en glucosa-glutamina. *ACT1* se utilizó como control de carga.

3. Planteamiento del problema

El complejo HAP participa en la regulación de la expresión de genes en etanol como fuente de carbono y está involucrado en la regulación de la expresión de *GDH1* y *GDH3*. Para el gen *GDH1*, Hap2-3-5 forman el dominio de unión al ADN, y el dominio de activación Hap4, es sustituido por Gln3. En el caso de *GDH3*, Gln3 y Hap4 no son la subunidad de activación. Se conoce que Rtg3 regula la expresión de *GDH3* en etanol por lo que es un buen candidato para reemplazar a Hap4 y sea el que active a *GDH3*. Por lo tanto, se propone determinar si el factor transcripcional Rtg3 se une directamente al ADN y actúa en conjunto con Hap2.

Por otra parte, se conoce que uno de los mecanismos para regular la expresión génica es la unión de activadores y/o represores en la región regulatoria de los genes. Un análisis bioinformático identificó posibles sitios de unión para el represor Nrg1 en los promotores de los genes *GDH1* y *GDH3* por lo que se decidió analizar su participación en la regulación de este par de parálogos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General.

Determinar si el factor transcripcional Rtg3 se une directamente al ADN y si esta unión depende del complejo HAP en el promotor de *GDH3*. Analizar la unión de Nrg1 a los promotores de *GDH1* y *GDH3*.

4.2. Objetivos particulares

Realizar un análisis por PCR en tiempo real (qPCR) para el ensayo de Coinmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).

Construir las cepas

- 1) MAT α RTG3::*myc*¹³::*kanMX4 ura3*
- 2) MAT α *hap2* Δ ::*nat* RTG3-*myc*¹³::*kanMX4 ura3*
- 3) MAT α *rtg3* Δ ::*nat* HAP2-*myc*¹³::*kanMX4 ura3 leu2*

Determinar si hay unión de Rtg3 a los promotores de *GDH1* y *GDH3* por ChIP-qPCR.

Determinar si la unión de Rtg3 al promotor de *GDH3* en una condición de etanol-glutamina, es dependiente del complejo HAP.

Analizar si Nrg1 se une directamente a los promotores de *GDH1* y *GDH3* por ChIP- qPCR.

5. Metodología.

5.1. Análisis *in silico* y obtención de secuencias promotoras

Para este trabajo se utilizó como región promotora del gen de interés a los 1000pb río arriba del ATG. Estas secuencias se obtuvieron de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>). Para identificar los sitios de unión para los factores transcripcionales se utilizó la base de datos Yeastract (<http://www.yeastract.com/>).

5.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron con *primer3* (<http://primer3.ut.ee/>). Las temperaturas de alineamiento (T_m) y ausencia de *hairpin* de cada pareja de oligonucleótidos se obtuvieron mediante la página *Oligonucleotide properties calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

5.3. Obtención de DNA total de levadura

Para todo estudio de biología molecular es esencial contar con ADN del organismo que se pretende estudiar, por esta razón se lleva a cabo la extracción de ADN genómico. Numerosos métodos para la extracción de ADN total en levadura se han descrito (Osorio, 2009); éstos se diferencian básicamente en el procedimiento por el cual la pared es lisada y el ADN es purificado. En este trabajo se llevó a cabo una extracción de ADN total por el método de Hoffman (1987). Los cultivos fueron crecidos a 30° C a 250 revoluciones por minuto (rpm) por 16 horas, después las células fueron colectadas y lavadas con agua destilada. La lisis celular se realizó en buffer (Tritón X-100 al 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM) con perlas de vidrio y *vortex* durante 5 minutos, para su posterior extracción con Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1). Finalmente se precipitó con acetato de amonio (4M) y etanol 100%.

5.4. Transformación de la levadura

En este estudio se utilizaron mutantes isogénicas derivadas de la cepa CLA-1 (Avendaño, 1997).

Para la obtención de las construcciones necesarias en este trabajo se utilizó el método de transformación por reemplazo a través de recombinación homóloga. Se utilizó un fragmento de ADN que contiene el módulo de *KanMX4* que confiere resistencia al antibiótico *geneticina* (obtenido del plásmido pFA6a-*KanMX4*) e incluye colas de recombinación para el gen que se quiere mutar, reemplazando la región codificante del gen de interés (**figura 8**). En este método se permeabiliza la membrana con la ayuda de acetato de litio, posteriormente se agrega ADN acarreador (esperma de salmón) y el módulo con fragmentos homólogos de 60 pb al gen que se quiere deletar, se agrega polietilenglicol (PEG) y acetato de litio. Posteriormente se somete a un choque térmico. Finalmente las cepas son seleccionadas a través de 3 pases de purificación en el medio de selección (Wach, *et al.*, 1994).

Para las dobles mutantes el módulo *KANMX4* es reemplazado por el módulo de resistencia a Nourseotricina (NAT). El módulo de NAT se encuentra clonado en el plásmido p4339; cuando se digiere este plásmido con la endonucleasa de restricción *EcoRI* se libera un fragmento de 2kb que contiene al módulo NAT, con el que se transforman las cepas.

En las mutantes *myc13* el procedimiento fue el mismo, con la única diferencia que el módulo para transformación fue obtenido del plásmido pFA6a-13myc-kanMX6. El genotipo de las construcciones utilizadas en este trabajo se muestra en la **tabla II**. (Brachmann,1998; Goldstein, 1999).

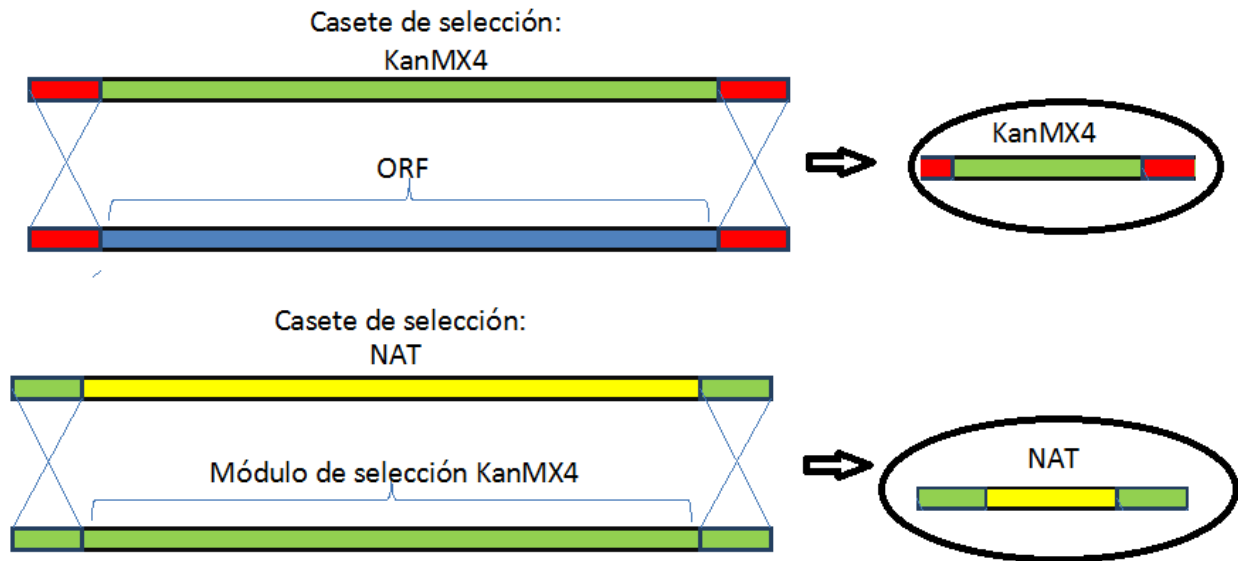


Figura 8. Esquema teórico de transformación por recombinación homóloga utilizado en este trabajo.

Tabla II. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	Genotipo	Referencia
CLA-1	MAT α <i>ura3 leu2</i>	Valenzuela <i>et al.</i> (1998)
CLA-600 RTG3- <i>myc</i> ¹³	MAT α RTG3- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3 leu2</i>	Este trabajo
CLA-506 HAP2- <i>myc</i> ¹³	MAT α HAP2- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3 leu2</i>	Hernández <i>et al.</i> (2011)
CLA-508 hap2 Δ GLN3- <i>myc</i> ¹³	MAT α <i>hap2</i> Δ :: <i>nat</i> GLN3- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3 leu2</i>	Hernández <i>et al.</i> (2011)
CLA-509 gln3 Δ HAP2- <i>myc</i> ¹³	MAT α <i>gln3</i> Δ :: <i>nat</i> HAP2- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3 leu2</i>	Hernández <i>et al.</i> (2011)
CLA-601 <i>rtg3</i> Δ HAP2- <i>myc</i> ¹³	MAT α <i>rtg3</i> Δ :: <i>nat</i> HAP2- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3 leu2</i>	Este trabajo
CLA-602 hap2 Δ , RTG3- <i>myc</i> ¹³	MAT α <i>hap2</i> Δ :: <i>nat</i> RTG3- <i>myc</i> ¹³ :: <i>kanMX4 ura3</i>	Este trabajo

5.5. Construcción de cepas

En la tabla III se muestran los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las cepas mutantes y en la tabla IV los Oligonucleótidos empleados en la confirmación de la cepa CLA *hap2Δ:KanMX4*.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de cepas mutantes.

Nombre del oligo	Secuencia del oligo	Referencia
Hap2Fw	5'TGAACTCTCCGTGTGGCACGGAAG3'	Hernandez, 2011
Hap2Rv	5'ATTACCATTTTGCCTCAATTGACCC3'	Hernandez, 2011
Hap2Confirmación	5'CTACGAGTGCATTCCCGATT3'	Este trabajo
KAN-5'REV	5'TCGCGAGCCCATTTATACCC3'	Hernandez, 2011
Hap2FwMYC	5'CAGCCGCATGCTACTTCCACCGCAGCTGCAGCA GCAAAAAAAAAACggaatccccgggt3'	Hernandez, 2011
Hap2RvMYC	5'ATTATTACAA'TAGTTCTTTTAGGAATGATATTAAC ATTGGAATAgattcgaggt 3'	Hernandez, 2011
Hap2FwConMYC	5'CGCTGAGATCAAAGCCCATGAAATC3'	Hernandez, 2011
Hap2RvConMYC	5'TTTTCCAGCGGAGTACATAGGTCTG3'	Hernandez, 2011
Rtg3FwMYC	5'GACAACTCTAATCCAGCTGACTATCTTTTAGAATT TGGTTCGGGcggatccccgggta3'	Este trabajo
Rtg3RvMYC	5'TGAACCTTTTTCAAATTTAATTTTTTCCCGCTAAT AAGACCATAAAgaattcgagtctgtta3'	Este trabajo
Rtg3FwConMYC	5'GTCGGCACTATGGGAGAGTC3'	Este trabajo
Rtg3Conrev	5'CCAATCATGAAGTGTGGCTCTAC3'	Este trabajo
NATConRV	5' TAAGCCGTGTCGTCAAGAGTGG 3'	Colon, 2005

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados en la confirmación de cepas.

Cepa	Oligos utilizados	Tamaño del PCR
A Wt	Hap2Fw y Hap2Rv	1457pb
B <i>hap2Δ::KANMX4</i>	Hap2Fw y Hap2Rv	2169pb
C Wt	Hap2Confirmación y KAN5'REV	No debe amplificar
D <i>hap2Δ::KANMX4</i>	Hap2Confirmación y KAN5'REV	800pb
E Wt	Hap2Confirmación y Hap2Rv	1737pb
F <i>hap2Δ::KANMX4</i>	Hap2Confirmación y Hap2Rv	2449pb

La **Figura 9** muestra el gel de confirmación de la mutante *hap2Δ::KanMX4*

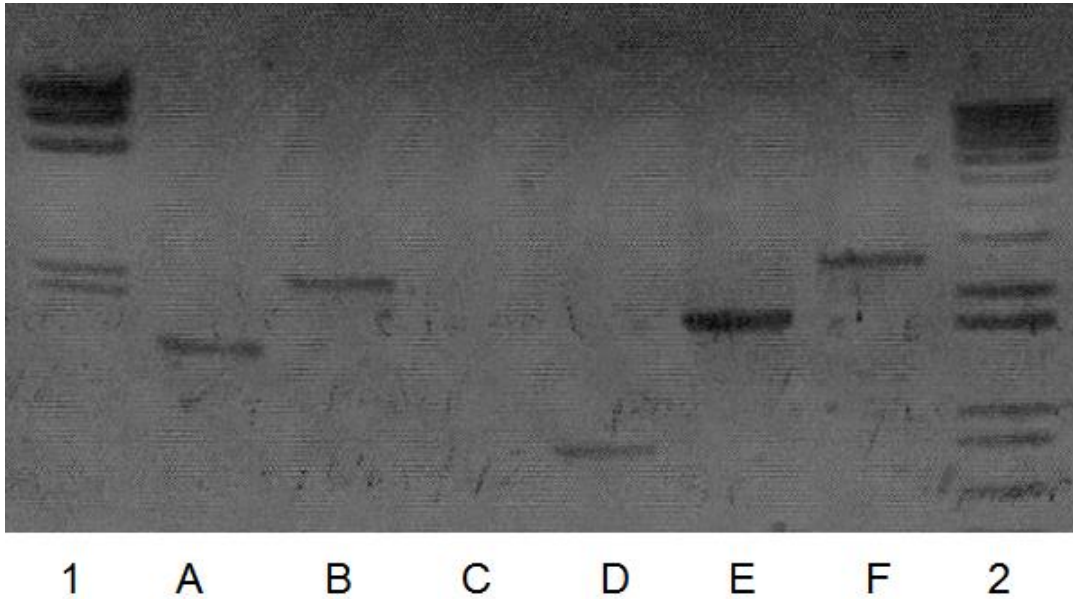


Figura 9. Gel de confirmación de la mutante *hap2Δ::KanMX4*. 1 marcador de peso molecular λ *HindIII*, De A a F productos de PCR según tabla IV. 2 Marcador de peso molecular 1 Kb Plus.

Se realizó una Segunda transformación, para sustituir el casete de *KANMX4*, por la resistencia a NAT, en las cepas *rtg3Δ::KanMX4* y *hap2Δ::KanMX4*; las cepas se comprobaron con un oligonucleótido dentro del casete de NAT (**tabla V**).

Tabla V. Oligonucleótidos empleados para confirmar las cepas con el casete de resistencia a *Neourseotricina*

Cepa	Oligos Utilizados	Tamaño del PCR
A Wt	Rtg3Fw y NATConRv	No debe amplificar
B rtg3 Δ ::NAT Col. 1	Rtg3Fw y NATConRv	1830pb
C rtg3 Δ ::NAT Col. 2	Rtg3Fw y NATConRv	Falsa positiva
D rtg3 Δ ::NAT Col. 3	Rtg3Fw y NATConRv	1830pb
E Wt	Hap2Confirmación y NATConRv	No debe amplificar
F hap2 Δ ::NAT Col. 1	Hap2Confirmación y NATConRv	1730pb
G hap2 Δ ::NAT Col. 2	Hap2Confirmación y NATConRv	1730pb
H hap2 Δ ::NAT Col. 3	Hap2Confirmación y NATConRv	1730pb

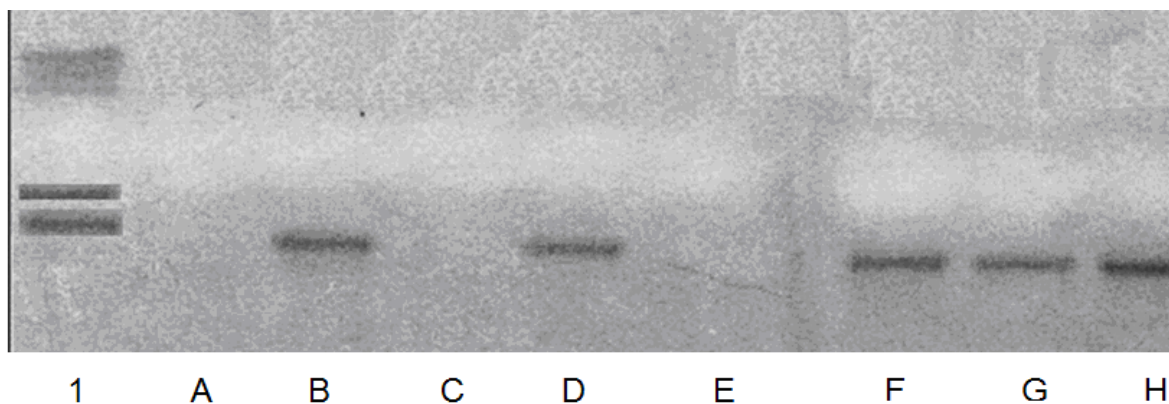


Figura 10. Gel de confirmación de mutantes NAT. 1 Marcador de peso molecular λ *HindIII*. De A a H productos de PCR según Tabla V.

5.6 Construcción de las dobles mutantes

Tabla VI. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de dobles mutantes.

Cepa	Oligos Utilizados	Tamaño del PCR
A Wt	HapFwConMYC y Hap2RvConMYC	323pb
B <i>rtg3Δ::NAT Hap2MYC::KAN</i>	HapFwConMYC y Hap2RvConMYC	2423pb
C Wt	Rtg3FwConMYC y Rtg3RvCon	774pb
D <i>hap2Δ::NAT RTG3MYC::KAN</i>	Rtg3FwConMYC y Rtg3RvCon	2874pb

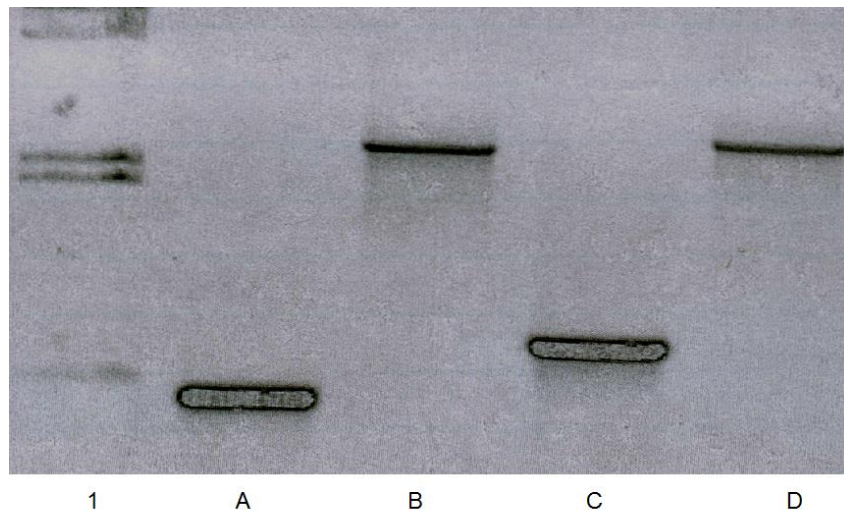


Figura 11. Gel de confirmación de las dobles mutantes. 1- Marcador de peso molecular λ *Hind*III. De A a D productos de PCR según tabla VI.

5.7 northern blot

Un northern blot es un método de laboratorio usado para detectar moléculas específicas de ARN en una mezcla de ARN total.

El primer paso en un Northern Blot es la obtención de ARN total. Posteriormente las moléculas de ARN se separan de acuerdo a sus tamaños utilizando una electroforesis en gel y el ARN se transfiere a una membrana de nitrocelulosa. Una vez que se completa la transferencia, y el ARN se fija en el Stratalinker (auto *crosslinker*). Además, se diseña un pequeño fragmento de ADN (sonda) que es complementario a un ARN específico. La sonda de ADN se marca radiactivamente con una citosina que tiene fósforo 32, y con esta se hibrida la membrana para que la molécula de ARN de interés sea detectada.

Extracción de ARN total

- Crecer un cultivo de células en 100mL del medio deseado.
- Colectar las células centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de agua DEPC fría
- Transferir a dos tubos de 1.5 mL, centrifugar 10 segundos a 4°C y remover el sobrenadante.
- Resuspender el *pellet* de células con el líquido remanente del tubo y adicionar 400 µl de solución TES. Añadir 400 µl de fenol ácido y agitar en *vortex* vigorosamente durante 10 segundos. Incubar de 30 a 60 minutos a 65°C con ocasional agitación en *vortex*.
- Colocar en una mezcla de hielo-agua durante 5 minutos y centrifugar durante 5 minutos a 14 000 rpm a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml y añadir 400 µl de fenol ácido y agitar vigorosamente. Repetir el paso 5.

- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml y añadir 400 µl de cloroformo. Agitar vigorosamente en *vortex* y centrifugar 5 minutos a velocidad máxima a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir 40 µl de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 1 mL de etanol absoluto para precipitar.
- Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima a 4°C. Lavar el pellet de ARN con etanol al 70% frío. Centrifugar y decantar.
- Resuspender el ARN en 50 µl de H₂O DEPC.

Electroforesis de ARN

- La cámara de electroforesis se lava con SDS 1% y H₂O con DEPC.
- Para preparar el gel se mezcla 1 g de agarosa con 84ml de H₂O y 10ml de MAE 10X. Hervir 30 segundos y dejar enfriar a 55°C para añadir 6mL de formaldehído. Vaciar al molde y dejar que solidifique.
- Para preparar un litro de amortiguador de corrida se mezcla 100ml de MAE 10X y 30ml de formaldehido, se afora con H₂O bidestilada.
- Para preparar las muestras se mezclan 30 µg de ARN con 20 µl de tampón para ARN y 0.5µl de bromuro de etidio. Posteriormente se calientan a 65°C y las muestras se cargan en el gel.
- Correr el gel a 60 volts hasta que el colorante esté por salir del gel.
- Revisar el gel en el transiluminador para documentar y transferir el ARN a la membrana de nylon (Amersham Hybond- N⁺ de GE Healthcare)
- Fijar la membrana con luz UV a 1200 µJ X100 (auto crosslinker).
- Hibridar la membrana con la sonda marcada a 65°C durante toda la noche.
- Realizar dos lavados de baja astringencia a 65°C (SSC al 2X y SDS 0.1%).
- Si es necesario realizar dos lavados de alta astringencia (SSC al 0.15% y SDS al 0.1%).

Obtención de sondas marcadas radiactivamente

- Utilizar 50 ng del producto de PCR específico que será empleado como sonda, previamente purificado.
- Para marcar las sondas se utilizó el Kit marcaje "*Prime-It Random Primer Labeling Kit*" de Stratagene.
- Anadir 10µL de "*random oligonucleotide primers*"
- Desnaturalizar el ADN en un baño de agua hirviendo por 5 minutos
- Agregar 10µL de " dCTP primer buffer" 5x, 3µL de [α - 32 P] dCTP y 1µL de enzima Exo(-) Klenow (5U/µL).
- Incubar a 37°C por 10-15 minutos.
- Agregar 2 µl de EDTA para detener la reacción.
- Pasar por una columna de Sephadex G-25 para eliminar la marca libre.
- Desnaturalizar la sonda en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.
- Finalmente agregar la sonda a la membrana previamente pre hibridada.
- Realizar 2 lavados

5.8. Comprobación de las dobles mutantes por medio de análisis tipo northern blot

Con la finalidad de comprobar las dobles mutantes anteriormente descritas, se empleó la técnica northern blot (**figura 12**).

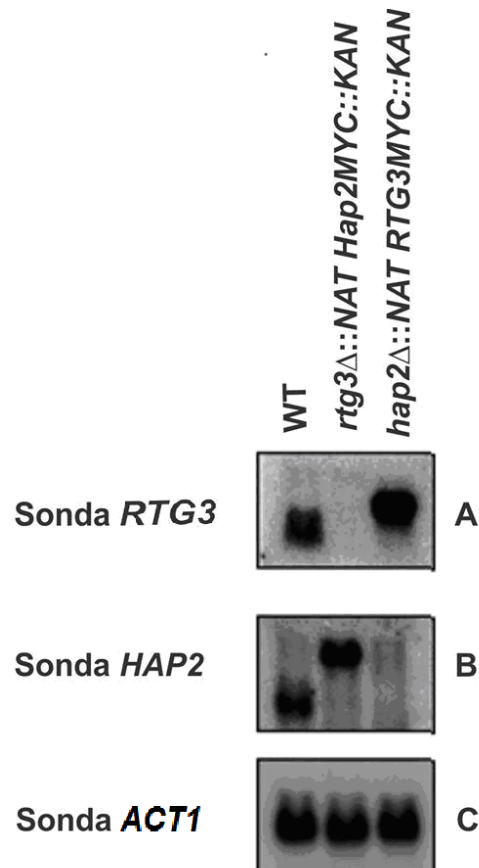


Figura 12. Comprobación de las dobles mutantes por Northern Blot Panel A: Carril 1.- Expresión de *RTG3* en la cepa silvestre. Carril 2.- Ausencia del transcrito de *RTG3* (cepa mutante *rtg3Δ::NAT*). Carril 3.- Transcrito para *RTG3* de mayor tamaño con respecto a la cepa silvestre (RNAm de *RTG3* con la etiqueta de *myc¹³*). Panel B: Carril 1.- Expresión de *HAP2* en una cepa silvestre; Carril 2.- Transcrito de *HAP2* de mayor tamaño con respecto a la cepa silvestre (ARNm de *HAP2* con la etiqueta de *myc¹³*). Carril 3. Ausencia del transcrito de *HAP2* (cepa mutante *hap2Δ::NAT*) Panel C: muestra la expresión de *ACT1* (control de carga).

Los resultados obtenidos de que las cepas están etiquetadas con *myc¹³*, concuerdan con los resultados de PCR.

5.9. Co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

La Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) es un método bioquímico usado principalmente para determinar la localización en el genoma de histonas modificadas y de otras proteínas *in vivo*. Esta técnica consiste en el uso de un anticuerpo que reconozca la proteína de interés no solamente en disolución sino también en la cromatina. La ChIP consta básicamente de dos pasos. El primero

consiste en el entrecruzamiento con formaldehído del ADN a las proteínas unidas a éste *in vivo* (Dedon, 1991) En las células con formaldehído se mantienen fijas las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-ADN. En un segundo paso se hace la inmunoprecipitación de los complejos proteína-ADN con anticuerpos específicos contra la etiqueta que lleva la proteína a estudiar. Esta inmunoprecipitación se lleva a cabo a partir de extractos sonicados donde la cromatina está fragmentada. Las secuencias específicas de ADN inmunoprecipitadas son amplificadas por PCR para determinar si han sido o no enriquecidas en las muestras correspondientes (Kuo y Allis, 1999) (**figura 13**). El PCR puede ser cualitativo (PCR en punto final) o cuantitativo (qPCR).

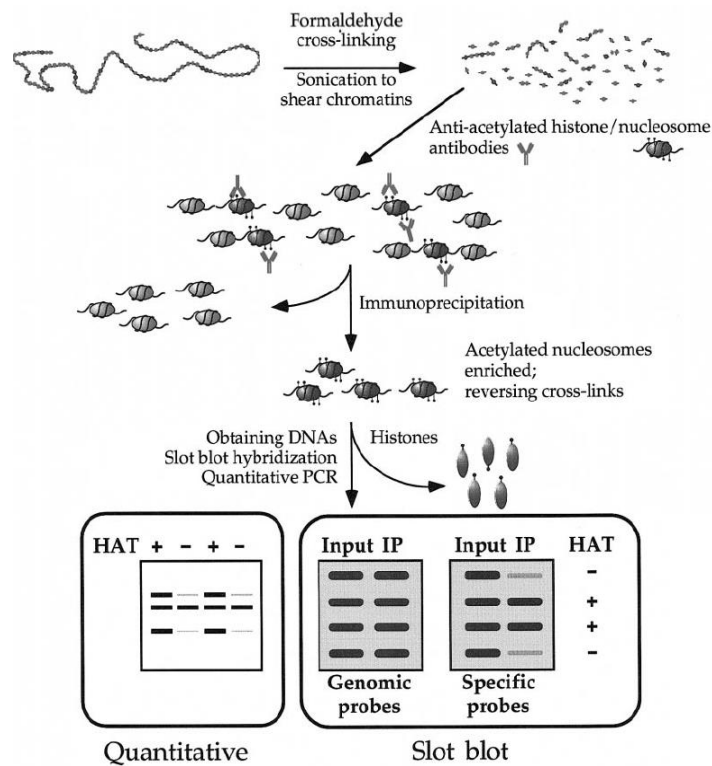


Figura 13. Esquema del fundamento de la técnica de Co-inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). (Tomado de Kuo y Allis, 1999).

Para este trabajo, el factor transcripcional a estudiar por el ensayo de ChiP se etiquetó con el epitopo *myc*¹³, luego se colectaron los fragmentos del ADN sonificado, por medio del anticuerpo antiMyc unido a perlas magnéticas y se

colectan todos los fragmentos de ADN que están unidos al factor transcripcional (Kuo y Allis, 1999).

5.10. qRT-PCR (PCR en tiempo real) y sus aplicaciones

El PCR en tiempo real, también conocido como, qPCR, QRT-PCR y RT-qPCR, es un método cuantitativo para la determinación del número de copias producidas de ADN o ADN complementario (ADNc) en una reacción de PCR.

Existen dos tipos de PCR en tiempo real, el primero está basado en la utilización de sondas fluorescentes, mientras que el segundo utiliza colorantes fluorescentes que se intercalan en la secuencia del ADN. En ambos métodos se requiere un termociclador especial equipado con una cámara sensible que monitorea la fluorescencia durante la reacción de PCR.

El SYBR *Green* es un colorante que se intercala a secuencias de doble cadena de ADN en la reacción de PCR, cuando el compuesto se une al ADN de doble cadena recién sintetizado da como resultado un aumento en la fluorescencia (**figura 14**). (Fraga, 2008).

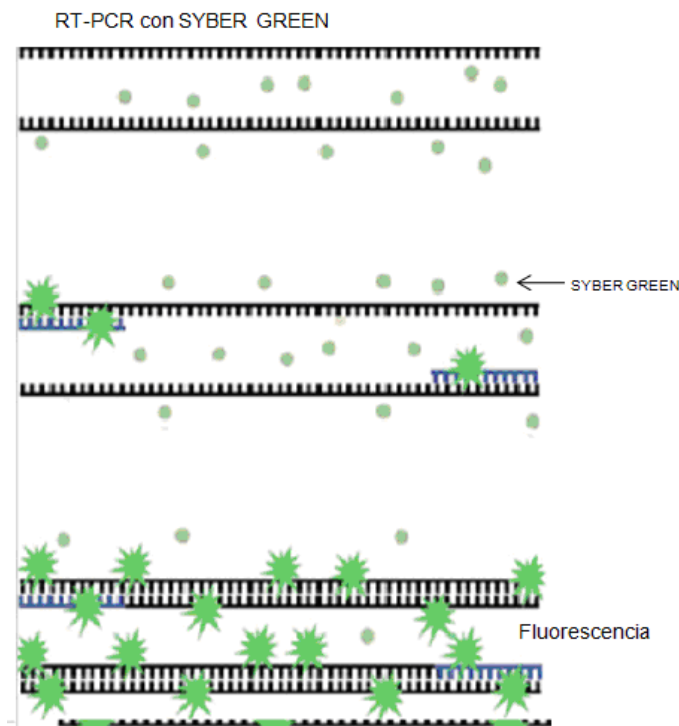


Figura 14. Método de qRT-PCR por medio de SYBR Green.

El acoplamiento de las técnicas ChIP y qRT-PCR han permitido la cuantificación del número de moléculas de ADN unido a un factor transcripcional, es decir determinar cuantitativamente el enriquecimiento del pegado de un factor de transcripción en un promotor en diferentes condiciones.

Para analizar por tiempo real (qPCR) si un factor transcripcional se une a un promotor es necesario hacer una sustracción entre el valor de *Ct* (figura 15) obtenido en el Input (ADN total) menos el valor de *Ct* del inmunoprecipitado con el anticuerpo *myc*¹³ (IP). La fórmula permite quitar el fondo que existe de manera natural. A este procedimiento se le llama quantitative ChIP, por sus siglas en ingles (qChIP).

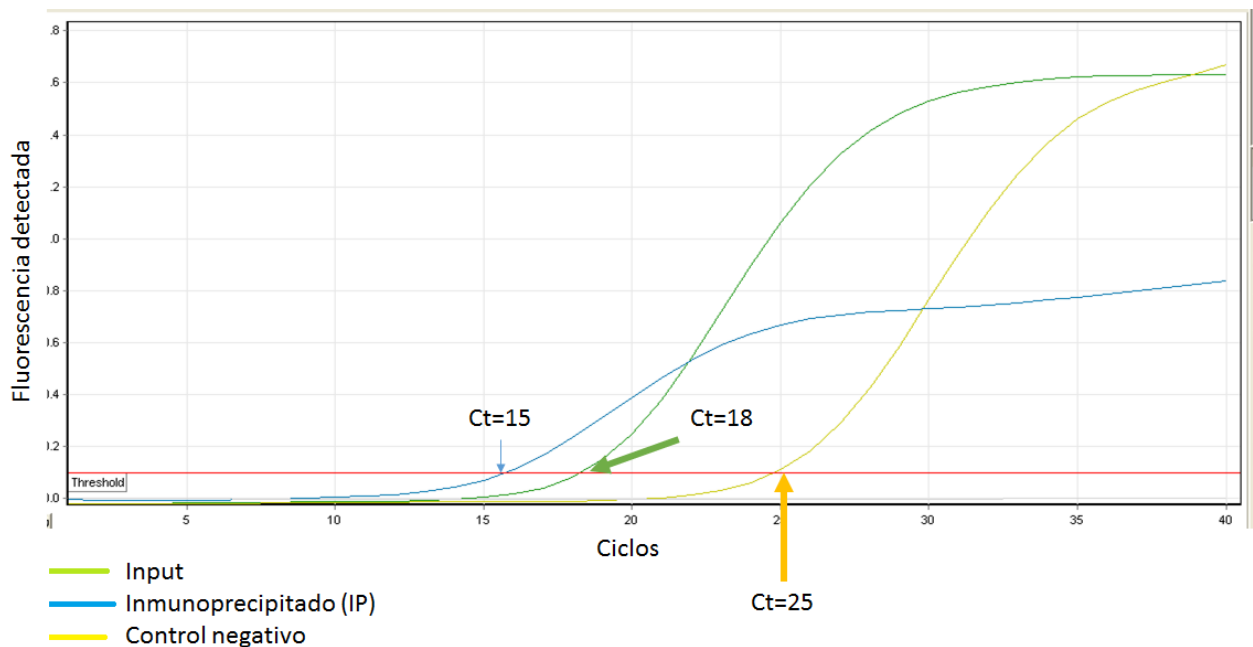


Figura 15. Esquema del Valor Ct. El Valor de Ct de una muestra es el valor del ciclo donde la muestra de ADN ha pasado un umbral de detección. Este valor lo genera el equipo con el cual se está analizando la muestra en qPCR.

5.11. Protocolo de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

Día uno

1. Inocular 100 ml del medio de selección a una densidad óptica de 0.05 OD. Incubar en agitación a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 OD. De preferencia, no utilizar OD. muy altas o mayores a 0.7 OD.
2. Realizar el *crosslinking* con formaldehído al 37% (final 1%). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente. (Para 100 ml de medio agregar 2.7 ml de formaldehído). Tiempos más largos de este paso pueden afectar el sonicado de la cromatina.
3. Al finalizar el tiempo de *crosslinking* adicionar 5.2 ml de glicina al 2.5 M (concentración final 125 mM). Se deja incubar en agitación durante 5 minutos.
4. Centrifugar los cultivos a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
5. Lavar dos veces las células con PBS1X (previamente esterilizado y mantenido en refrigeración). En este lavado se debe de asegurar que las células sean resuspendidas en su totalidad y evitar perder muestra.
6. Transferir las células a tubos *ependorf* con 1 ml de PBS1X, centrifugar por 1 minuto a 13,200 rpm y remover el sobrenadante.
7. Almacenar el *pellet* a -80°C (Este *pellet* puede ser almacenado hasta 3 meses para su posterior análisis).

Día dos. (Se trabaja a 4°C)

1. Preparar las *Dynabeads* (DynaL Proteína A) para los tubos con anticuerpo. Mezclar muy bien las perlas antes de transferir a los tubos.
 - a. Preparar 3 ml por cada IP inmunoprecipitado, de PBS1X/BSA 5 mg/mL frío. Para 4 muestras (12 IPs) se prepara 36 ml de PBS1X más 180mg de BSA.
 - b. Transferir a 3 tubos *ependorf* de 1.5 ml, 20 µl de *Dynabeads* (al finalizar este paso tendrás 3 tubos, 1 para clarificar el extracto y 2 llamados MYC1 y MYC2.) Utilizar puntas con filtro en este paso.
 - c. Centrifugar las perlas por 20 segundos a 12,000 rpm a 4°C.
 - d. Colocar las perlas en el magneto y tomar el sobrenadante con pipeta. Realizar dos lavados de 500 µl cada uno con PBS1X/BSA, resuspendiendo por inversión la totalidad de las perlas, después, centrifugar 20 segundos a 12,000 rpm a 4°C.

- e. Colocar los tubos en el magneto y remover el sobrenadante.
 - f. Después del segundo lavado, uno de los tubos con 20 μ l de perlas se deberán resuspender en 500 μ l de PBS1X/BSA y colocar en la rueda donde permanecerán en rotación durante los siguientes pasos.
 - g. Los tubos a los que llamamos MYC1 y MYC2, se deberán resuspender en 30 μ l de PBS1X/BSA, intentado no causar burbujas. Agregar 4 μ l del anticuerpo **Anti c-myc 9E11** a cada tubo. Para PCR en tiempo real estos tubos son suficientes. (Si el análisis se hiciera por PCR en punto final, se deberá incluir el anticuerpo HA en otro tubo y un tubo sin anticuerpo). Los tubos se deberán mantener en rotación por un mínimo de 2 horas a 4°C, verificando frecuentemente que las perlas no estén adheridas a las paredes del tubo. Si es necesario, resuspender cada 30 minutos durante la incubación.
2. Para preparar las células para sonicación se deberá:
 - a) Resuspender las células en 500 μ l de *Buffer* de Lisis + inhibidor de proteasa (10X) + PMSF (concentración final 1 mM). Para preparar el *stock* de inhibidor de proteasa, disolver una tableta en 2 ml de *Buffer* de Lisis (este *stock* queda 25X). Preparar el *stock* de PMSF 100mM en etanol y almacenar a -20°C. Para cuatro muestras se prepara 5,400 μ l de *Buffer* de lisis, + 600 μ l de IP + 60 μ l de PMSF.
 - b) Adicionar 300 μ l de perlas de vidrio.
 - c) Para romper las células se deberá dar *Vortex* 30 segundos y descansar 1 minuto en hielo, esto se deberá hacer 8 veces (4 minutos de *Vortex*).
 - d) Después de los 4 minutos de *Vortex*, mantener los tubos de cabeza y llevar el extracto hacia el fondo del tubo. Perforar el tubo usando una aguja caliente. Colocar el tubo con la perforación sobre otro tubo *ependorf* nuevo de 1.5 ml. Centrifugar en el cuarto frío a 5,000 rpm durante 2 minutos, (sin la tapa puesta).
 3. Resuspender el *pellet* con una punta azul y ponerlo en tubo *falcon* de plástico de 15 ml. Llevar a un mililitro final con *Buffer* Lisis + IP + PMSF y después romper la cromatina sonicando los extractos. Entre cada paso de sonicado mantener un minuto en hielo, evitar tener burbujas. Se debe de obtener fragmentos de 200 a 1,000 pb. Cada cepa tiene diferentes programas de sonicado, es recomendable estandarizar la sonicación antes. Las características son 60% *Duty Cycle* y 4 *out*, los ciclos pueden ser desde 2 hasta 6.

4. Centrifugar el extracto 5 minutos a 4°C a 12,000 rpm y adicionar el sobrenadante a las perlas de los tubos de 20 µl. **Esto es necesario para clarificar el extracto.** Dejar por un tiempo mínimo de 1 hora en rotación a 4°C.
5. Después de 45 minutos, comenzar a lavar las perlas con Anticuerpo (Ab). Lavar dos veces con 500 µl de PBS1XBSA y centrifugar 20 segundos a 12,000 rpm (Sólo retirar el sobrenadante final inmediatamente antes de adicionar el extracto).
6. Para preparar los IP's, centrifugar los extractos durante 1 minuto a 12,000 rpm a 4°C; retirar en un tubo nuevo marcado como INPUT 25 µl de extracto y medir el volumen restante con el magneto, transferir equitativamente a los tubos marcados como MYC. (Recordar que se tienen dos tubos de MYC por cada inmunoprecipitado).
7. Incubar los tubos con el anticuerpo y el extracto durante 3 horas por rotación.
8. Pasadas las 3 horas, preparar un termoblock a 65°C. Para hacer los lavados de los IP's en los magnetos, adicionar los siguientes *Buffers*, resuspendiendo cuidadosamente por inversión la totalidad de las *Dynabeads*, colocar en el magneto 2 minutos a 4°C y retirar el sobrenadante con pipeta.
 - a) 2X 1ml de *Buffer* de Lisis
 - b) 2X 1ml de *Buffer* de lisis +360mM NaCl
 - c) 2X 1ml de wash *Buffer*
 - d) 1X 1ml de TE pH 8, centrifugar a 3,000 rpm durante 3 minutos y retirar el sobrenadante sin el magneto, para quitar el sobrenadante restante, centrifugar a 13,200 rpm durante 1 minuto.
9. Cuando todos los *Buffers* fueron retirados, resuspender las perlas en 50 µl de amortiguador de elución, sin la pipeta y dando unos leves golpes con el dedo.
10. Incubar a 65°C durante 10 minutos con agitación, centrifugar a 12,000 rpm a temperatura ambiente y transferir 40 µl del SOBRENADANTE a nuevos tubos *ependorf*. Agregar 30 µl de amortiguador de elución a las perlas e incubar nuevamente a 65°C por 10 minutos transferir al mismo tubo 30 µl del SOBRENADANTE. **Las perlas a partir de este punto no sirven.**
11. Adicionar 70 µl de TE / 1% SDS a los tubos llamados *Input*, y adicionar 280 µl de TE / 1% SDS a los tubos llamados MYC. Dejar a 65°C durante toda la noche para revertir el *crosslinking*.

Día tres

1. Dar un pulso a los tubos en la centrífuga para recolectar el líquido.
2. Preparar Proteinasa K (20 mg/mL).
3. Adicionar a los tubos nombrados *Input* 500 µl de TE y a los MYCs 250 µl de TE. Después adicionar 15 µl a cada tubo de proteínas K. **No mezclar con vortex.**
4. Dejar actuar la proteinasa K a 56°C durante 2 horas. A todos los tubos adicionarles 4 µl de RNAsa y dejar actuar a 37°C durante 30 minutos.
5. Realizar extracciones fenol cloroformo: para los tubos marcados como *Input* se deberán dar 2 extracciones de 600 µl de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1), mientras que a los IP (MYCs) se deberá dar una extracción de Fenol:Cloroformo:Isoamilico. Al terminar estas extracciones se deberá realizar una extracción con cloroformo tanto a *Inputs* como MYCs. Nota: En la primera extracción de Fenol:Cloroformo:Isoamilico centrifugar por 20 minutos a 20°C.
6. Precipitar el DNA empleando NaCl 5M (20µl), etanol 100% (1ml) y Glicógeno (20µl) para hacer visible el *pellet*.
7. Dejar precipitando durante toda la noche a -20°C.

Día cuatro

1. Centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C, retirar el sobrenadante, dejar secar durante 5 minutos y adicionar 30 µl de H₂O miliQ.
2. Medir la concentración del *Input* en *Nanodrop* y realizar cálculos necesarios para hacer diluciones a 120 ng/ml, 40 ng/mL, 13 ng/mL y a 1ng/mL

Análisis por PCR en tiempo real

1. Eficiencia de los oligonucleótidos

Para realizar el análisis en tiempo real es necesario analizar si los oligonucleótidos que serán empleados funcionan eficientemente. Este valor de eficiencia es obtenido al realizar una recta con las diluciones de los *inputs*, con el fin de determinar la eficiencia de amplificación (**figura 16**).

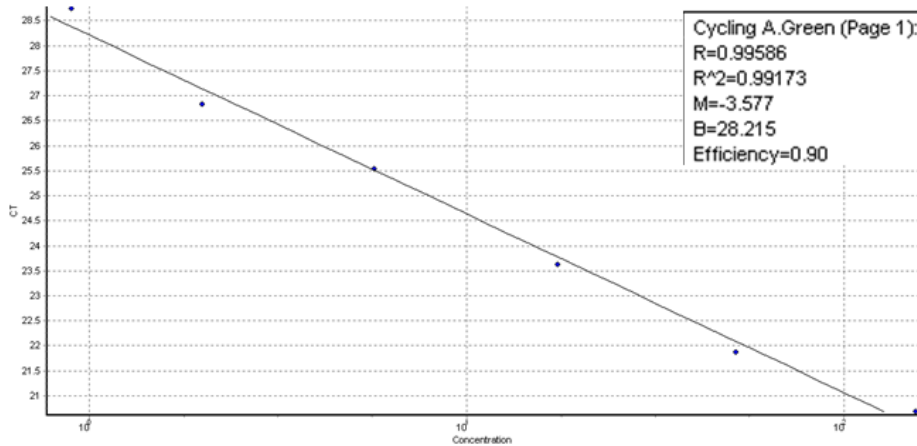


Figura 16. Eficiencia de oligonucleótidos. Se emplearon cinco muestras diferentes, que difieren en su concentración de ADN. Los oligonucleótidos deberán usarse a 10 mM cada uno. El valor de eficiencia de los oligonucleótidos deberá ser de 0.80 ó mayor.

La curva de disociación es importante debido a que nos permite determinar la especificidad de los oligonucleótidos que estamos empleando, que se ve reflejado en un solo pico de disociación (**figura 17**), TODO SE RECOMIENDA REALIZARLO ANTES DE UTILIZAR LAS MUESTRAS MYC's.

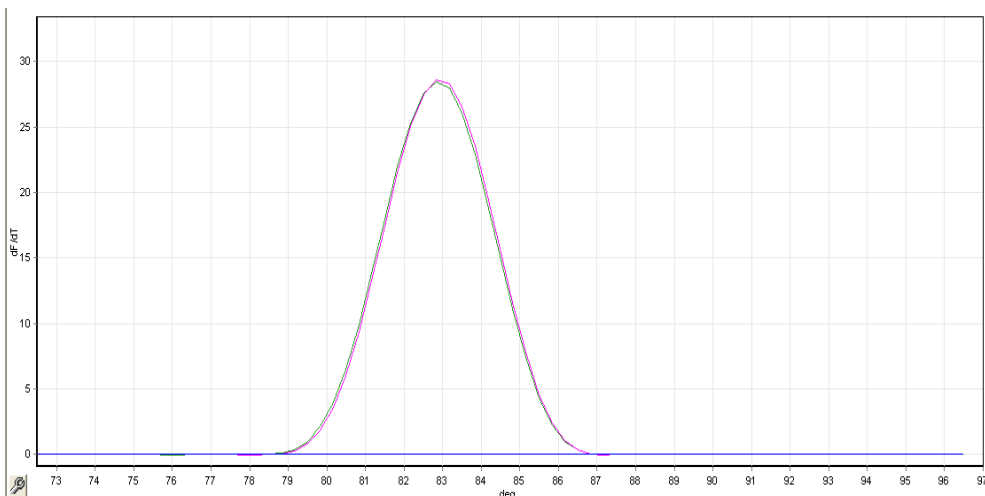


Figura 17. Curva de disociación de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos empleados muestran un solo producto de pico de disociación, indicando que son específicos para el fragmento de interés.

2. Reacción de PCR en tiempo real

Se realizará en tubos de 10 µl. Cada reacción se hará con 5 µl de *Buffer* con enzima y *SYBERGREEN*, 1 µl de templado (ya sea *Input* o *MYC* a una concentración 1 ng/µl), 3 µl de H₂O miliQ y 1 µl de mezcla de oligonucleótidos de interés.

Para analizar los resultados obtenidos de la reacción de qPCR los datos, son normalizados de acuerdo a la fórmula de *Background* sustracción. Esta fórmula elimina el ruido de fondo de las muestras que se genera al efectuar la qPCR, para esto es necesario restar el valor de Ct del Input con respecto al IP, estos valores son proporcionados por el equipo, en nuestro caso Rotor Gene. Después de restar los valores Ct se realiza un promedio de los datos de normalización y se divide con el promedio del valor Ct del control negativo. Para finalizar se obtiene la desviación estándar que sugiere diferencias significativas entre las muestras.

A continuación se describen los pasos empleados para esta normalización en un hoja de cálculo por el software Excel.

IP vs Input

=POTENCIA(Eficiencia de los oligos)(Ct input1 – Ctmyc1)

Ejemplo si la eficiencia de los oligos es de 1.95 la fórmula queda así:

=POTENCIA(1.95) (Ctinput1 – Ctmyc1) tubo 1

=POTENCIA(1.95) (Ctinput1 – Ctmyc2) tubo 2

=POTENCIA(1.95) (Ctinput2 – Ctmyc1) tubo 3

=POTENCIA(1.95) (Ctinput2 – Ctmyc 2) tubo 4

IP vs Input Promedio

=(SUMA (1:2:3:4)/ 4

IP vs Input

=(SUMA (IP vs Input Promedio1 + IP vs Input Promedio 2) / 2

IP – Input / control negativo

=Resultado anterior / Resultado control negativo.

Desviación Estándar

=DESVEST(X1, X2, X3, X4)

Error Estándar

=DESVEST / \sqrt{n}

Si n = 3 $\sqrt{3} = 1.7$

Si n = 4 $\sqrt{4} = 2$

6. Resultados y Discusión

6.1. La expresión de los parálogos *GDH1* y *GDH3* no es afectada por la etiqueta *myc*¹³

Para corroborar que los factores transcripcionales Rtg3 y Hap2 al ser etiquetados con *myc*¹³ no pierden su función regulatoria sobre los genes *GDH1* y *GDH3* se realizó un ensayo de northern blot demostrando que no existe diferencia en su expresión con respecto a una cepa silvestre (**figura 18**).

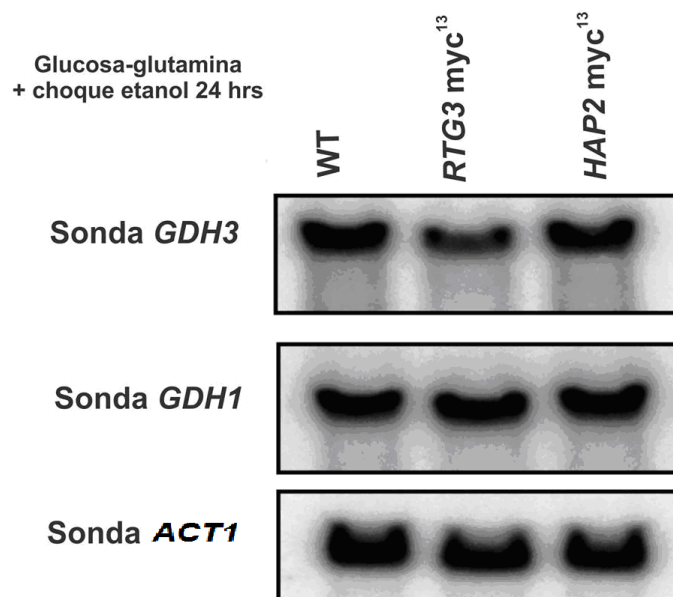


Figura 18. La expresión de *GDH1* y *GDH3* no es afectada por la etiqueta *myc*¹³. Se comprobó por northern blot que la etiqueta *myc*¹³ no afecta la expresión de *GDH1* y *GDH3*. *ACT1* se utilizó como control de carga.

6.2. Análisis *in silico* de los promotores de *GDH1* y *GDH3*

Con el fin de determinar los posibles sitios de unión de los factores transcripcionales Rtg3 y Nrg1 en los promotores de los genes *GDH1* (**figura 19**) y *GDH3* (**figura 20**) se realizó un análisis computacional tomando 1000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). Ambos promotores mostraron posibles sitios de unión para los factores transcripcionales Rtg3 y Nrg1. Los sitios

consenso de unión para los factores transcripcionales fueron obtenidos de la base Yeastrack.

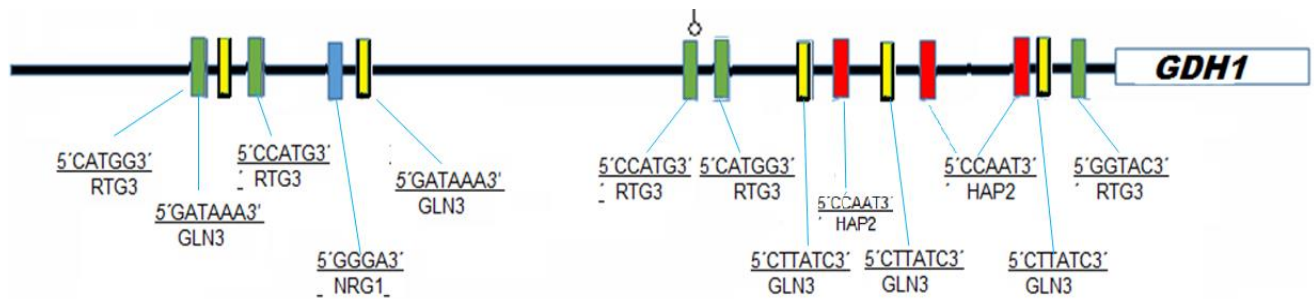


Figura 19. Análisis *in silico* del promotor de *GDH1*. El promotor de *GDH1* muestra posibles sitios de unión para los factores transcripcionales Rtg3 y Nrg1.

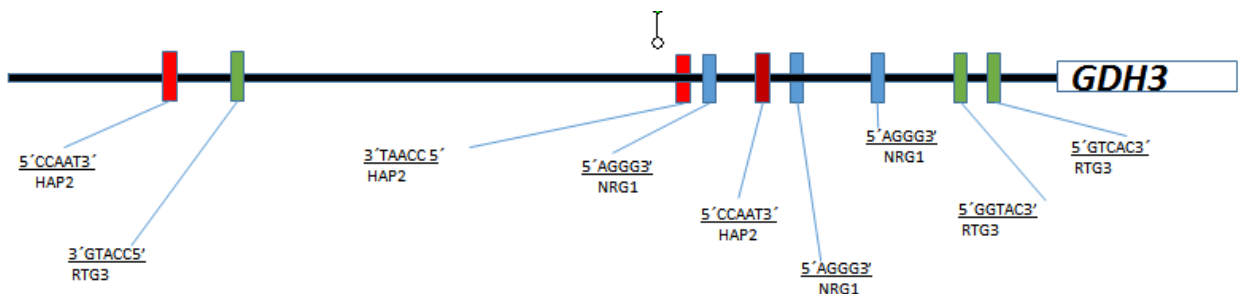


Figura 20. Análisis *in silico* del promotor de *GDH3*. El promotor de *GDH3* muestra posibles sitios de unión para los factores transcripcionales Rtg3 y Nrg1.

6.3. Diseño de oligonucleótidos para qChIP

Los oligonucleótidos utilizados en la cuantificación en tiempo real de los ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron diseñados con las características recomendadas, tales como: tamaño en un rango de 18 a 25pb, evitar que el producto de PCR sea mayor a 200pb, en caso de ser posible, el producto debe de ser de 150pb, que no formen estructuras secundarias (*hairpin*) y

que sean específicos.

Los oligonucleótidos que fueron generados en este trabajo se muestran a continuación en la **Tabla VII**.

Tabla VII. Oligonucleótidos para qChIP utilizados en este trabajo.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
FwGDH3qChIP	5' TTTCTTCCCGTTCAGTTTGC3'
RvGDH3qChIP	5' CGGCTCAAAGTCAGAAGTCA3'
FwGDH1qChIP	5' GGAAACGGGCCTGATCTTA3'
RvGDH1qChIP	5' CTCTCTGCTGATTGGACGTG3'
FwCIT2qChIP	5' TGGCGGTATCTCAAAGAGC3'
RvCIT2qChIP	5' TCTAGCTACGGAAAAGGTCACA3'
FwALT1qChIP	5' CACTTCCCATTAGACGTTTTCTGC3'
RvALT1qChIP	5' CGTCAACCACAGCAGGTCAGA3'
FwALT2qChIP	5' GCCTCACCCATACCTCAACTAAC3'
RvALT2qChIP	5' CGCAGCACATTAGTTAGAAACAATAG3'
FwGRS1qChIP	5' AAGCGTTCGGTTGGATGAC3'
RvGRS1qChIP	5' GGGGAGCAAACACTATTCATT3'
FwPHO5qChIP	5' GATGCCAATGATGACATTGTAAATG3'
RvPHO5qChIP	5' TGCACACCACGAGAATAAAGTACTA3'

6.4. Estandarización del protocolo de qChIP

Para montar en el laboratorio el análisis cuantitativo de ChIP (qChIP), se reprodujo el experimento publicado por Hernández y colaboradores (2011), utilizando las mismas cepas y condiciones del ChIP en punto final. En este trabajo se cuantificó por qPCR (**figura 21**).

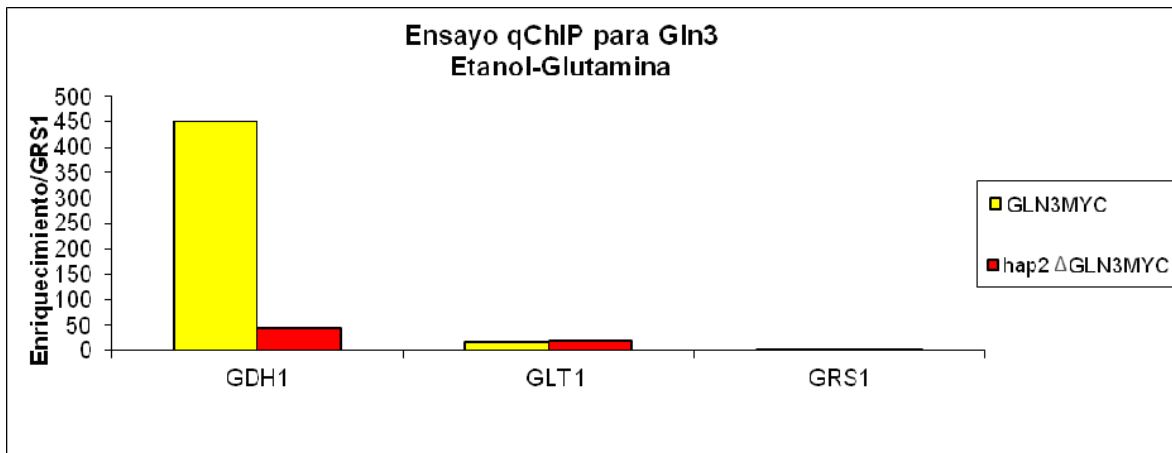


Figura 21. La unión de Gln3 a *GDH1* depende del complejo HAP. La unión de Gln3 al promotor de *GDH1* es dependiente del complejo Hap2-3-5, debido a que en un fondo *hap2Δ* la unión de Gln3 al promotor de *GDH1* se ve afectada significativamente. *GLT1* se utilizó como control positivo y *GRS1* fue utilizado como control negativo del experimento.

Como se observa en la **figura 21**, para la cepa *GLN3myc¹³* hay un enriquecimiento de la unión de Gln3 en el promotor de *GDH1* (450 veces con respecto al control negativo), sin embargo, en un fondo *hap2ΔGLN3myc¹³* el enriquecimiento disminuye considerablemente (inferior a 50 veces), indicando que la unión de Gln3 a dicho promotor es dependiente del complejo HAP. Como control positivo se utilizó el gen *GLT1* que ha sido reportado como un gen regulado por Gln3 (Ishida *et al.*, 2006) y como control negativo *GRS1*.

Este resultado permitió validar el protocolo de qChIP. A diferencia del ChIP en punto final (no cuantitativo) utilizado por Hernández y colaboradores (2011) que reportan que en un fondo *hap2ΔGLN3myc¹³* se muestra la ausencia total de la proteína Gln3 en el promotor de *GDH1*, nuestro resultado obtenido por qChIP muestra una pequeña cantidad de proteína Gln3 unida al promotor de *GDH1* en este mismo fondo. Este dato no afecta la conclusión de que Gln3 se une de manera dependiente del complejo Hap2-3-5 en el promotor del gen *GDH1*.

6.5. Rtg3 se une al promotor de *GDH3* de manera independiente del complejo HAP en etanol-glutamina

Como se mencionó anteriormente, Rtg3 es un factor transcripcional que regula diversos genes involucrados en la ruta retrógrada. Se ha demostrado que el heterodímero Rtg1-Rtg3 se une al promotor del gen *CIT2* y es necesario para su expresión (Jia *et al.*, 1997), por esta razón decidimos usar a *CIT2* como control positivo en nuestros experimentos.

Para analizar si el factor transcripcional Rtg3 se une directamente al promotor de *GDH3* y actúa en conjunto con el complejo HAP para regular a este gen se realizaron ensayos de qChIP. Como se observa en la **figura 22**, en la cepa *RTG3myc¹³* hay un enriquecimiento en la unión de la proteína Rtg3 al promotor de *GDH3* (4 veces comparado con el control negativo), en el caso de *CIT2* el enriquecimiento de esta proteína es mayor (56.5 veces comparado con el control negativo). El control negativo de este experimento es la secuencia codificante del gen *GRS1*, que no presenta secuencias de unión a Rtg3 ni a Hap2.

Es importante mencionar que en experimentos de qChIP los valores de enriquecimiento por arriba de 2.5 veces son considerados como unión del factor de interés al ADN. A pesar de las desviaciones estándar podemos concluir que la proteína Rtg3 se une directamente al promotor de *GDH3* y como era de esperarse, este factor se une al promotor de *CIT2*.

En un fondo *hap2Δ::Nat RTG3myc¹³* (**figura 22**) hay un enriquecimiento de 3.9 veces para el promotor de *GDH3* y 66.7 para *CIT2*, estos resultados son similares a los obtenidos para la cepa *RTG3myc¹³* lo que sugiere que la unión del factor transcripcional Rtg3 es independiente de la unión del factor transcripcional Hap2. Esto puede ser concluido debido a que en una cepa mutante *hap2Δ::Nat RTG3 myc¹³*, la unión del factor Rtg3 no se ve afectada.

La diferencia en las veces de enriquecimiento para Rtg3 entre los promotores de *GDH3* y *CIT2*, se puede explicar debido al diferente contexto genómico (secuencia promotora, estado de la cromatina etc.).

Tabla VIII. Datos utilizados para la figura 22. Cepas *RTG3myc¹³* y *hap2ΔRTG3myc¹³*

Promotor	<i>RTGmyc¹³</i>	Promedio	Error estándar	<i>hap2ΔRTG3myc¹³</i>	Promedio	Error estándar
GDH3	5.2 4.5 4.3 2	4	0.6	4.6 3.7 3.4	3.9	0.3
CIT2	108.5 33.1 34 44	56.5	19.4	97 55 40	66.7	18.6
GRS1	1 1 1 1	1	0	1 1 1	1	0

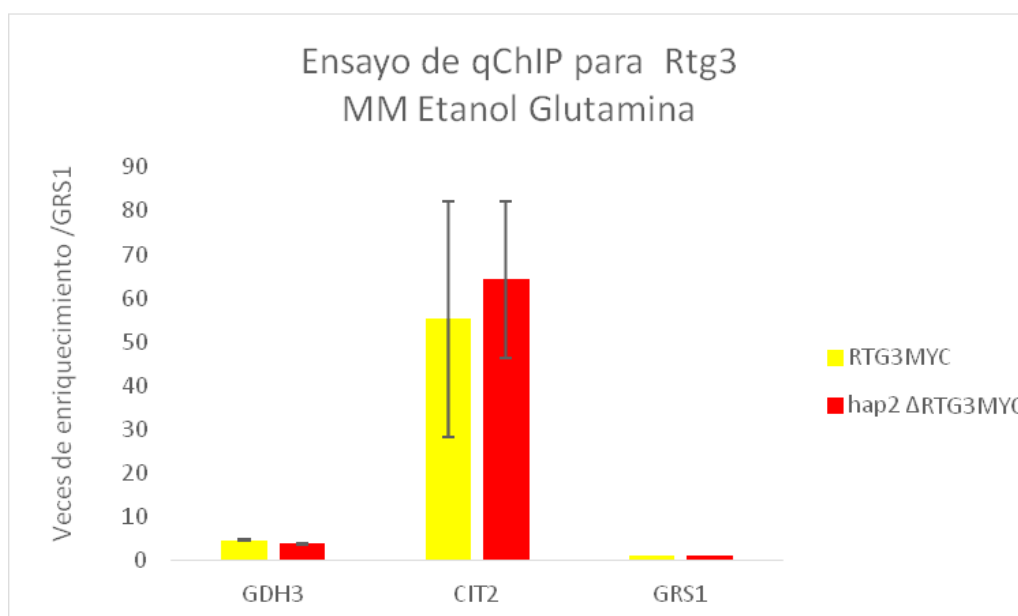


Figura 22. La unión de Rtg3 al promotor de *GDH3* no depende del complejo HAP. El ensayo de qChIP muestra que la unión de Rtg3 a *GDH3* no es dependiente de HAP, ya que no se encuentran diferencias entre la cepa silvestre y el fondo *hap2Δ::Nat RTG3myc¹³*. *CIT2* fue utilizado como control positivo y *GRS1* como control negativo. Resultados representativos de al menos tres réplicas biológicas.

6.6. Hap2 se une en el promotor de los parálogos *GDH1* y *GDH3* aun en una cepa mutante *rtg3Δ*

Como se reportó por ChIP en punto final en el trabajo de Hernández y colaboradores (2011), la proteína Hap2 se une a los promotores de los genes *GDH1* y *GDH3*. En el análisis de qChIP de una cepa *HAP2 myc¹³* (**figura 23**) encontramos un promedio de 6 veces de enriquecimiento de Hap2 en el promotor de *GDH3* y 33.5 veces para el promotor de *GDH1* (control positivo), ambos comparados con *GRS1*, concluyendo que Hap2 se une a ambos promotores en el ensayo de qChIP.

Para corroborar que en un fondo *rtg3Δ HAP2 myc¹³* la unión del complejo HAP no es afectada por la ausencia de Rtg3, se analizó por qChIP la unión del factor Hap2. Como se muestra en la **figura 23** las veces de enriquecimiento encontradas en este fondo para *GDH3* y *GDH1* son ligeramente menores que en la cepa *HAP2 myc¹³*, pero la diferencia no es significativa ya que las desviaciones estándar se traslapan en ambos casos. Es posible concluir que la unión de Hap2 al promotor de *GDH3* no depende de la proteína Rtg3, debido a que en una cepa mutante *rtg3Δ HAP2 myc¹³*, la unión de Hap2 no se ve afectada.

Tabla IX. Datos utilizados para la figura 23. Cepas *HAP2myc¹³* y *rtg3Δ HAP2myc¹³*

Promotor	<i>HAP2myc¹³</i>	Promedio	Error estándar	<i>rtg3Δ HAP2myc¹³</i>	Promedio	Error estándar
<i>GDH3</i>	6.2 5 7.2	6	0.5	2 3.5 1.7	2.5	2
<i>GDH1</i>	43.2 35 27	33.5	7.3	33 45 10	18.9	5.4
<i>GRS1</i>	1 1 1	1	0	1 1 1	1	0

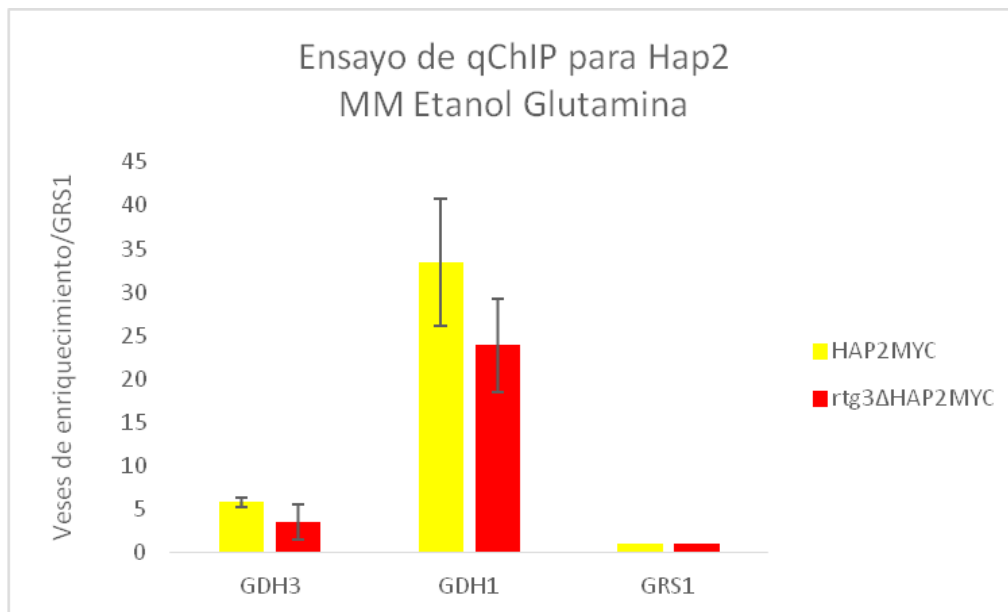


Figura 23. La unión de Hap2 a *GDH3* no es afectada en fondo *rtg3ΔHAP2 myc*¹³. El ensayo de qChIP muestra que la unión de Hap2 a *GDH3* no es afectada en ausencia de Rtg3, ya que no se encuentran diferencias entre la cepa silvestre y el fondo *rtg3ΔHAP2 myc*¹³. *GDH1* fue utilizado como control positivo y *GRS1* como control negativo. Resultados representativos de al menos tres réplicas biológicas.

6.7. El factor transcripcional Rtg3 se une en los promotores de *GDH1* y *GDH3* en medio glucosa-prolina

Como se mencionó anteriormente, la localización del factor transcripcional Rtg3 es regulada por la calidad de la fuente de nitrógeno, en un medio con fuente de nitrógeno secundaria (prolina) la mayor concentración de Rtg3 está localizada en el núcleo (Crespo, 2002).

Nuestros experimentos, realizados en prolina como fuente de nitrógeno, muestran la unión de Rtg3 a *GDH1* y *GDH3* en fase exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento (**figura 24**). La unión de Rtg3 al promotor de *GDH1* es de 16.5 fase exponencial y 9.6 veces de enriquecimiento durante la fase estacionario, mientras que para *GDH3* es 7.3 para la fase exponencial y 4.5 veces de enriquecimiento en fase estacionaria, comparados con el control negativo. Como se observa en la gráfica, no existe una diferencia significativa,

entra ambas fases de crecimiento para el gen *GDH1*, sin embargo se observa una pequeña diferencia en *GDH3*.

Como se esperaba el control *CIT2* muestra unión en ambas fases de crecimiento, pero muestra una diferencia que no se esperaba, probablemente se puede explicar porque durante la condición estacionaria el número de genes blanco regulados por Rtg3 aumenta, reflejándose como una disminución en la unión a *CIT2*; sin embargo la desviación estándar es muy grande y puede ser un error experimental. Para estos experimentos cambiamos el control negativo *GRS1* por *PHO5* con la finalidad de intentar reducir las variaciones entre experimentos, desafortunadamente el control negativo no influye en disminuir las desviaciones estándar.

Tabla X. Datos utilizados para la figura 24. Fase exponencial y estacionaria. Cepa RTG3*myc*¹³

Promotor	Fase Exponencia	Promedio	Error estándar	Fase estacionaria	Promedio	Error estándar
<i>GDH1</i>	19.7 12.7 17.7	16.53	3	10.4 3.5 15	9.6	3.5
<i>GDH3</i>	9.3 7 5.7	7.3	1.1	5.1 3.4 5	4.5	1.7
<i>CIT2</i>	39.5 16.2 48.4	34.7	9.7	10.7 3.3 20.2	11.4	4.9
<i>PHO5</i>	1 1 1	1	0	1 1 1	1	0

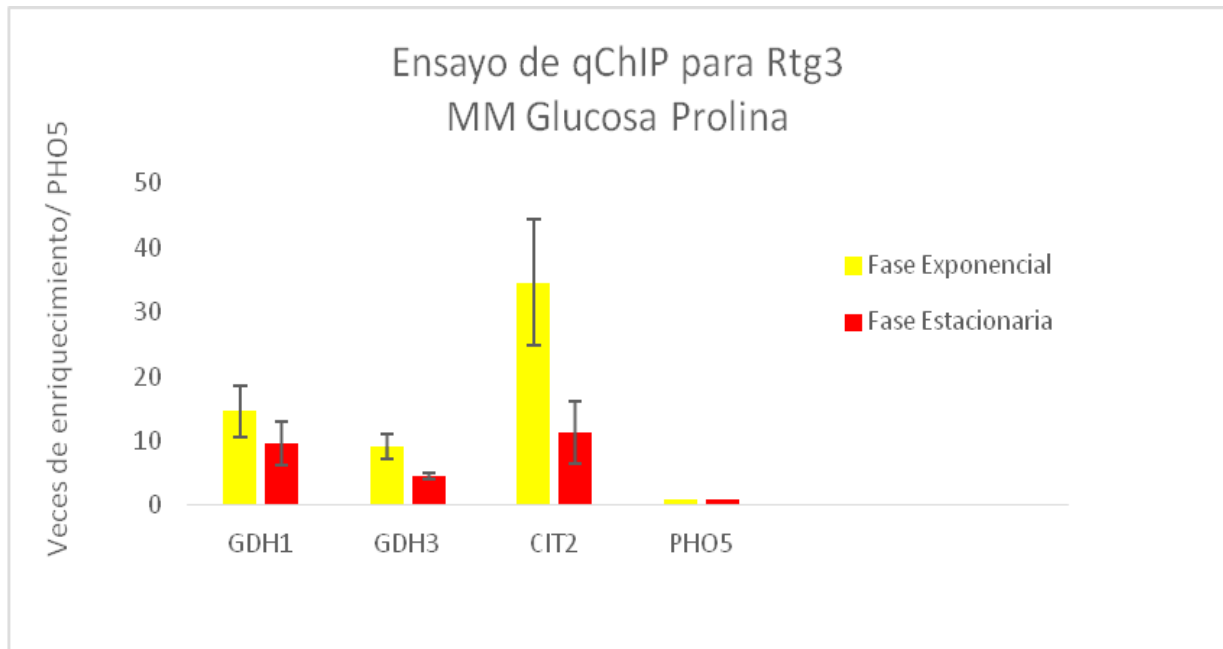


Figura 24. Rtg3 se une a los promotores de *GDH1* y *GDH3* en medio glucosa-prolina. Ensayo de qChIP muestra la unión de Rtg3 a *GDH1* y *GDH3* en fase exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento. Resultados representativos de al menos tres réplicas biológicas.

6.8. El factor transcripcional Rtg3 se une a los promotores de *GDH1* y *GDH3* en medio YPD en fase estacionaria

El medio rico (YPD) contiene diversos aminoácidos dentro los cuales se encuentra la glutamina (fuente primaria de nitrógeno). En la fase exponencial de crecimiento, la cantidad de glutamina presente en el medio mantiene en el citoplasma al factor transcripcional Rtg3, a diferencia de la fase estacionaria, donde los nutrientes se han consumido, provocando la internalización de Rtg3 al núcleo.

Para analizar la unión de Rtg3 en medio YPD a *GDH1* y *GDH3* se realizaron ensayos de qChIP. Nuestros resultados obtenidos por qChIP (**figura 25**) muestran que en la fase exponencial existe un pequeño enriquecimiento en la unión de Rtg3 a *GDH1*, *GDH3* y *CIT2* (control positivo), mientras que en la fase estacionaria, el enriquecimiento de Rtg3 aumenta en los promotores estudiados. *PHO5* fue utilizado como control negativo.

Tabla XI. Datos utilizados para la figura 25. Fase exponencial y estacionaria. Cepa RTG3myc¹³ YPD.

Promotor	Fase Exponencia	Promedio	Error estándar	Fase estacionaria	Promedio	Error estándar
<i>GDH1</i>	3.4 3 5.9	4.1	1	25 43 63.7	43.9	11.3
<i>GDH3</i>	6.2 6.1 8.2	6.8	0.6	12.6 16 20.8	16.4	2.4
<i>CIT2</i>	8.4 7.1 14.6	10	2.3	55 119 137.9	103.9	25.5
<i>PHO5</i>	1 1 1	1	0	1 1 1	1	0

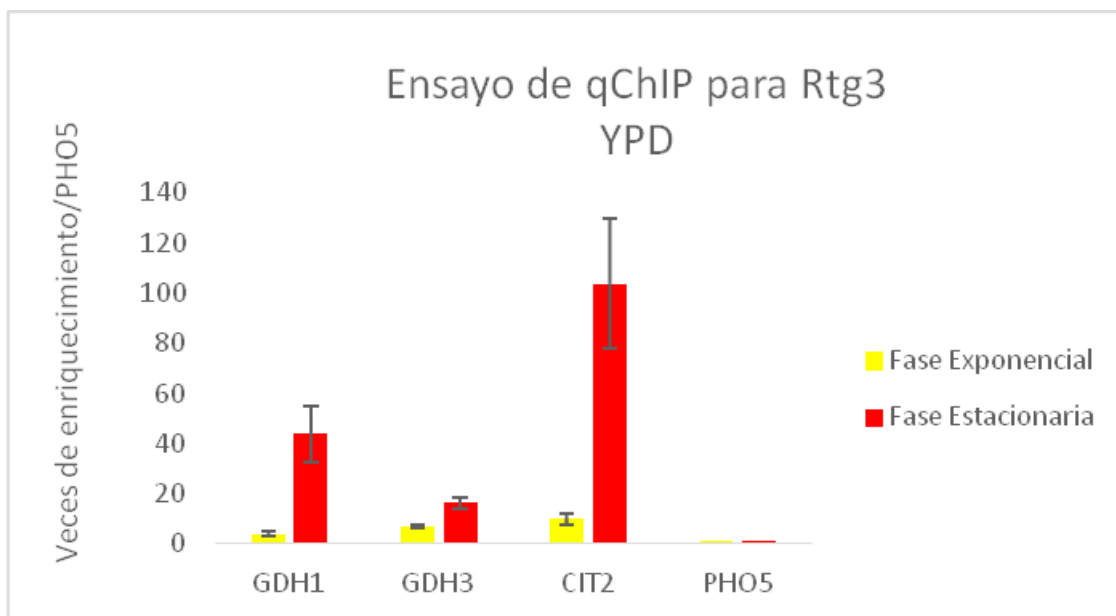


Figura 25. El factor transcripcional Rtg3 se une a *GDH1* y *GDH3* en YPD en la fase estacionaria. Ensayo de qChIP muestra la unión de Rtg3 a *GDH1* y *GDH3* en YPD durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Resultados representativos de al menos tres replicas biológicas.

Una posible explicación de lo observado en la fase exponencial es la presencia de una pequeña cantidad de Rtg3 en el núcleo, aún en medio rico y en presencia de fuentes primarias de nitrógeno. Esta pequeña cantidad de Rtg3 es necesaria para regular genes específicos en este contexto metabólico. Hernández y colaboradores (2011), sugieren que existe una pequeña cantidad de Gln3 en el núcleo que depende del complejo Hap2-3-5 para regular la expresión de *GDH1*. Por otro lado los resultados obtenidos en fase estacionaria, coinciden con que la mayor concentración de Rtg3 se encuentra en el núcleo, aunque es difícil determinar si esto es un artefacto de la técnica debido al tamaño de la desviación estándar.

6.9. El factor transcripcional Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3* en medio glucosa-prolina

El factor transcripcional Nrg1 actúa como represor, el cual media la represión por glucosa y regula de manera negativa diversos procesos celulares como el crecimiento filamentoso y la respuesta a pH (Vyas *et al.*, 2001).

Los promotores de los genes *GDH1* y *GDH3* presentan sitios potenciales para la unión a este factor transcripcional (**figura 19 y 20**). Para demostrar la unión de Nrg1 a estos promotores se hicieron experimentos de qChIP en medio glucosa-prolina. Los resultados obtenidos (**figura 26**) muestran que Nrg1 se une directamente a *GDH1* y *GDH3*. Peñalosa y colaboradores (2012) demostraron por ChIP en punto final la unión de Nrg1 a *ALT1* y *ALT2*, por esta razón estos promotores se utilizaron como controles positivos.

La unión de Nrg1 en fase exponencial y estacionaria concuerda con que la localización de Nrg1 no depende de la fuente de carbono (**figura 26**) (Broach, 2012).

Tabla XII. Datos utilizados para la figura 26. Fase exponencial y estacionaria. Cepa *NRG1myc*¹³

Promotor	Fase Exponencia	Promedio	Error estándar	Fase estacionaria	Promedio	Error estándar
<i>GDH1</i>	6.8 25.7 34.8 57.4	31.1	10.5	29.4 63 26.8 11.8	32.7	10.8
<i>GDH3</i>	2.4 11.4 17.2 20.9	12.9	4	15.3 34.1 11.4 7.2	17	5.9
<i>ALT1</i>	1.7 4.4 7.3 15.7	7	2.8	9.7 16 5.6 3.5	7.2	1.5
<i>ALT2</i>	2 5.6 5.9 15.4	7.2	2.8	12 22.6 10.6 3.3	11.9	3.8
<i>PHO5</i>	1 1 1 1	1	0	1 1 1 1	1	0

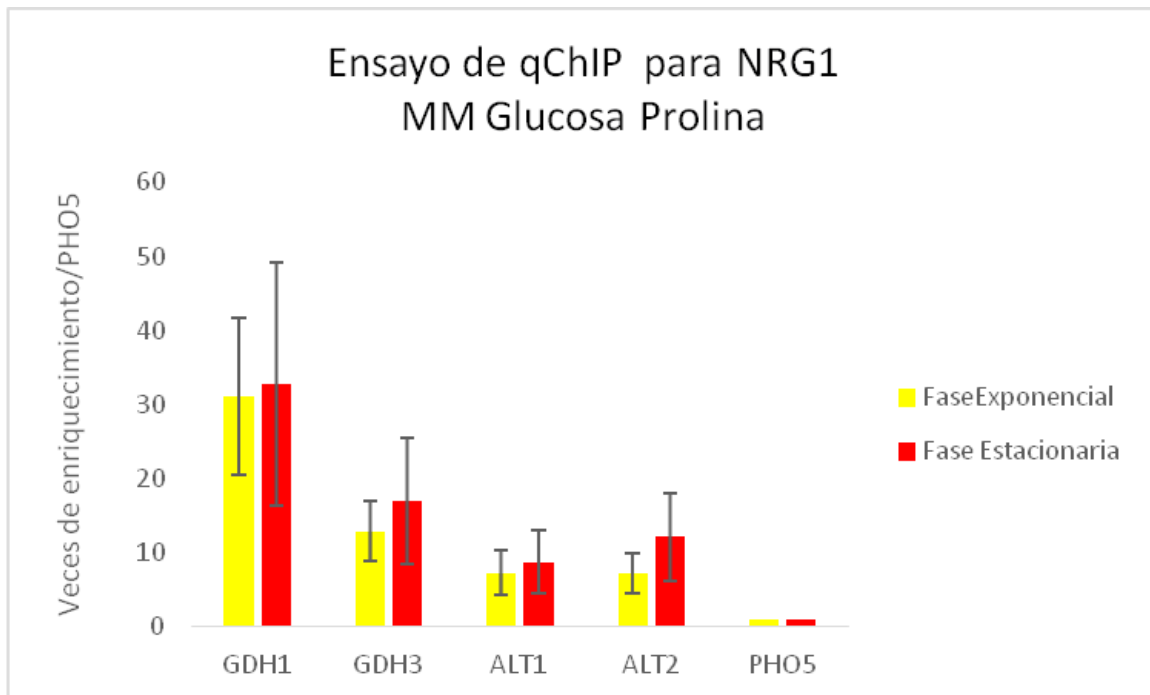


Figura 26. El factor transcripcional Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3* en medio glucosa-prolina. Ensayo de qChIP muestra la unión de Nrg1 a *GDH1* y *GDH3* en medio glucosa-prolina, durante las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento. Resultados representativos de al menos tres réplicas biológicas.

Encontramos una unión de 7 y 7.2 veces de enriquecimiento del factor Nrg1 para los genes *ALT1* y *ALT2* para la fase exponencial respectivamente con respecto a *PHO5*, no mostrando diferencia significativa para los promotores de *GDH1* y *GDH3* (31.1 y 12.9 veces de enriquecimiento). Estos resultados muestran que el factor Nrg1 está unido a ambos promotores, para la fase estacionaria obtuvimos que en *GDH1* hay un enriquecimiento de 32.7 veces y 17 veces para el gen *GDH3*, sin embargo existe una gran desviación estándar en los experimentos que no permite determinar si existen diferencias significativas en la unión de Nrg1 en ambas fases de crecimiento. Es importante encontrar la solución a las desviaciones estándar tan grandes en nuestros experimentos.

Para comprender el significado biológico de la interacción de Nrg1 a *GDH1* y *GDH3*, es necesario realizar ensayos complementarios como northern blot y coimmunoprecipitación de proteínas que junto con los datos obtenidos en este

trabajo, servirán para entender de manera detallada la regulación de este par de promotores.

6.10. El factor transcripcional Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3* en YPD

Para analizar si Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3* en YPD se realizaron ensayos de qChIP. Los resultados muestran la unión directa de Nrg1 a *GDH1* y *GDH3*, debido a que el número de veces de enriquecimiento en promedio para *GDH1* es de 6.4 veces en la fase exponencial y de 18.1 veces en la fase estacionaria, mientras que para *GDH3* encontramos valores de 12.8 veces de enriquecimiento en fase exponencial y de 9.6 veces en fase estacionaria, comparados con el control negativo *PHO5* (**figura 27**). Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3*, y se encontró una diferencia significativa para la unión a *GDH1* entre ambas fases de crecimiento, a pesar de que no tenemos una explicación para esto; una posibilidad es la formación de heterocomplejos proteicos que confieren la función de activador o represor en los factores transcripcionales, permitiendo a los organismos responder a las adversidades medioambientales de una manera adecuada, se conoce que Nrg1 actúa como represor y se mantiene unido al ADN de manera independiente a la fase de crecimiento (Berkey, 2004); sin embargo, para llevar a cabo su función represora es necesaria la presencia de correpresores como Tup1 (Vyas, 2001).

Tabla XIII. Datos utilizados para la figura 27. Fase exponencial y estacionaria. Cepa *NRG1myc*¹³

Promotor	Fase Exponencia	Promedio	Error estándar	Fase estacionaria	Promedio	Error estándar
<i>GDH1</i>	4.3 5.9 9	6.4	1.4	7.5 25 22	18.1	5.5
<i>GDH3</i>	8.6 15.9 14	12.8	2.2	4 16 8.9	9.6	3.5
<i>ALT1</i>	2.9 4 6.9	4.6	1.2	1.7 5.7 8.5	5	3.2
<i>ALT2</i>	3.1 4 6	4.3	0.9	2.4 5.6 7.6	5.2	1.5
<i>PHO5</i>	1 1 1	1	0	1 1 1	1	0

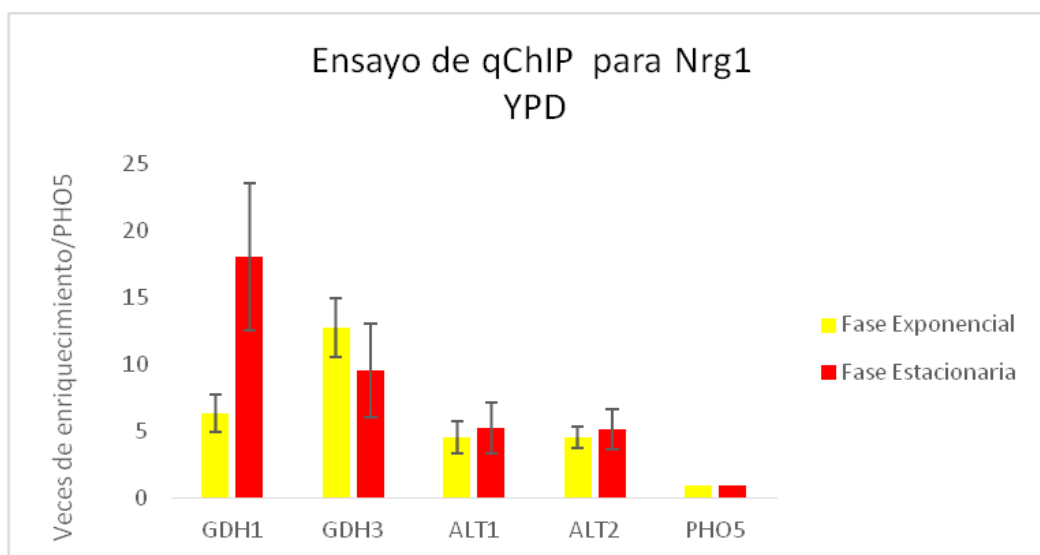


Figura 27. El factor transcripcional *Nrg1* se une a *GDH1* y *GDH3* en YPD. Ensayo de qChIP muestra la unión de *Nrg1* a *GDH1* y *GDH3* en YPD, durante las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento. Resultados representativos de al menos tres réplicas biológicas.

En estudios preliminares (aún no publicados) de nuestro laboratorio por ensayos tipo northern blot en un fondo *nrg1*Δ cultivada en etanol como fuente de carbono y prolina o glutamina como fuentes de nitrógeno, Nrg1 parece funcionar como activador, sin embargo, para entender la posible función de activador de este factor transcripcional son necesarios más experimentos como coinmunoprecipitación de proteínas que permitan determinar las proteínas que participan como co-activadores o co-represores para este promotor.

7. Conclusiones

- Se comprobó que la unión de Gln3 al promotor de *GDH1* es HAP-dependiente por qChIP.
- La regulación de *GDH1* y *GDH3* por el factor Rtg3 es de manera directa, debido a que este factor se une a ambos promotores.
- La unión de Rtg3 al promotor de *GDH3* es independiente al complejo Hap2-3-5.
- La unión de Hap2 al promotor de *GDH3* y *GDH1* es independiente de Rtg3.
- En medio glucosa-prolina y YPD, Rtg3 se une en la fase exponencial y estacionaria a *GDH1* y *GDH3*.
- Nrg1 se une a *GDH1* y *GDH3*, en la fase exponencial y estacionaria en medio glucosa-prolina y YPD.

8. Perspectivas

- 1.- A pesar de que el método de qChIP reproduce el resultado de Hernández y colaboradores (2011), de la unión del complejo híbrido Hap2-3-5-Gln3 en el promotor de *GDH1*, algunos resultados muestran desviaciones estándar grandes, evidenciando la necesidad de ajustar las condiciones técnicas de este protocolo en el laboratorio.
- 2.- Realizar un análisis bioinformático detallado que sugieran posibles sitios de unión para factores transcripcionales responsables de mediar la represión en glucosa del gen *GDH3*.
- 3.- Obtener cepas mutantes de los posibles reguladores y realizar análisis de expresión por northern blot.
- 4.- Buscar un factor transcripcional que actúe como dominio de activación en el complejo Hap2-3-5-X, ya que no es Rtg3.
- 5.- Realizar ensayos tipo northern blot en cepas mutantes sencillas *nrg1Δ* para dilucidar la función de Nrg1 en la regulación de *GDH1* y *GDH3*.

Referencias

- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L y González A. 1997. *GDH3* Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriology*. 17: 5594–5597.
- Avendaño A. Riego L., DeLuna A., Aranda C., Romero G., Ishida C., Vázquez Acevedo M., Rodarte B., Recillas-Targa F., Valenzuela L., Zonszein S., & A. González., 2005. Swi/ SNF GCN5- dependent chromatin remodeling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for the ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 57: 291-305.
- Berkey C.D., Vyas V.K. y Carlson M. 2004. Nrg1 and Nrg2 Transcriptional Repressors Are Differently Regulated in Response to Carbon Source. *EUKARYOTIC CELL*. 3: 311–317.
- Buschlen, S. Amillet J-M., Guiard B., Fournier A., Marcireau C y Bolotin-Fukuhara M. 2003. The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp Funct Genom*. 4:37-46.
- Brachmann, C. B. , Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P. y Boeke J. D. 1998. Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast*. 14: 115–132.
- Broach, J. R., 2012. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*. 192: 73–105.
- Carlson, M.1999. Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 2:202-207.

- Cliften P.F., .Fulton R.S, Wilson R.K. y Johnston M. 2005. After the Duplication: Gene Loss and Adaptation in *Saccharomyces* Genomes. *Genetics*. 172: 863-872
- Coffman J.A. Hassan M. Berry E. & Cooper. T. 1994. The URE2 Protein Regulates Nitrogen Catabolic Gene Expression through the GATAA-Containing UAS_{NTR} Element in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 176: 7476-7483.
- Colón M, Hernández F, López K, Quezada H, González J, López G, Aranda C. y González A. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases. Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. *Plos One*. 6:1-13
- Conant, G.C. 2010. Rapid reorganization of the transcriptional regulatory network after genome duplication in yeast. *Proc. R. Soc. B*. 277, 869–876.
- Crespo, J.L., Powers T., Fowler B. y Hall M.N. 2002. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *PNAS*. 10:6784-6789.
- Dang, V-D., Bohn C., Bolotin-Fukuhara M. y Daignan-Fornier B. 1996. The CCAAT Box-Binding Factor Stimulates Ammonium Assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, Defining a New Cross-Pathway Regulation between Nitrogen and Carbon Metabolism. *J. Bacteriology*. 7: 1842-1849.
- Dedon PC, Soultis JA, Allis CD, Gorovsky MA. (1991). A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal. Biochem*. 197: 83–90.
- DeLuna, A., A. Avedaño, L. Riego & A. González. 2001. NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces*. *JBC*. 47: 43775-43783.
- Dujon, B. 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends. Genet.*. 7: 263-270.
- Eelko S.G., Van Riel N.A. & C. Verrips., 2000. The role of the ammonia metabolism in the nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology*. 24: 67-83

- Fraga, D. T. Meulia, & S. Fenster., 2008. Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 10: 1-34.
- Force A., Lynch M., Pickett B., Amores A. Yan Y. y Postlethwait J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics Society of America.* **151**: 1531–1545.
- Forsburg S. y Guarente L. 1988. Mutational Analysis of Upstream Activation Sequence 2 of the CYCI Gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-Responsive Site. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY.* 8:647-654.
- Goldstein A.L. y Mccusker J.H. 1999. Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:1541–1553.
- Gordon J.L., Byrne K.P. y Wolfe K. H. 2011. Mechanisms of Chromosome Number Evolution in Yeast. *Plos Genetics.* 7: e1002190
- Guan, Y., M.J. Dunham & O.G Troyanskaya. 2007. Functional Analysis of Gene Duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 175: 933–943.
- Kellis B.M., Birren W. y Lander. E. S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *NATURE.* 428: 617-624.
- Hernández¹, H. C. Aranda, L. Riego & A. González. 2011. Gln3-Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BBRC.* 404:859-864.
- Hernández², H. C. Aranda, G. Lopez, L. Riego y 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
- Hoffman C.S. & Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently reales autonomus plasmid transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 5:267-27.
- Hurles M. 2004 Gene Duplication: The Genomic Trade in Spare Parts. *PLoS Biology* 2: 0900- 0904

- Ishida C. Aranda C. Valenzuela C. Riego L. DeLuna A. López-Revilla R. & González A. 2006 The UGA3-GLT1 intergenic region constitutes a promoter whose bidirectional nature is determined by chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* (2006)59: 1790–1806
- Jia Y, Rothermel B, Thornton J, & Butow RA. 1997 A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol.* 17:1110-7.
- Kuo, M.H. & C. D. Allis. 1999. *In Vivo* Cross-Linking and Immunoprecipitation for Studying Dynamic Protein: DNA Associations in a Chromatin Environment. *METHODS.* 19: 425-433.
- Large, Peter J. 1986. Degradation of Organic Nitrogen Compounds by Yeasts. *Yeast.* 2:1-34.
- Levasseur A. & P. Pontarotti. 2011. The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary based approaches in comparative genomics. *Biology Direct.* 6:11
- Liu Z. y Butow R. A. 2006. Mitochondrial Retrograde Signaling. In: *Annu. Rev. Genet.* 40:159–185
- Liu, Z. & R. A. Butow 1999. A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function. *M. C. B.* 10: 6720–6728.
- Lynch M. y Force A. 2000. The Probability of Duplicate Gene Preservation by Subfunctionalization. *Genetics* 154: 459–47.
- Magasanik B. 2005. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS.* 102: 16537–16538
- Mell Chang Joshua y M Burgess Sean. 2002. Yeast as a Model Genetic Organism. *Nature.* 1-8.
- Ohno. 1970. *S. Evolution by Gene Duplication.* Allen and Unwin. London.
- Osorio-Cadavid E., M. Ramírez, W. A. López, & L. A. Mambuscay., 2009. Standardising a simple protocol for extracting yeast from genomic DNA. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 11:125-13

- Park, S.H, Koh S., Chun J. H., Hwang H. J, y Kang H. S.1999. Nrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose Repression of *STA1* Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. 10: 2044–2050.
- Piskur, J. Rozpedowska E., Polakova S., Merico A. y Compagno C.. 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics*. 22: 183-186.
- Rai R. , Genbauffe F., Zoo H. L. & Cooper T. 1987. Transcriptional Regulation of the *DAL5* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 8:3521-3524
- Riego L., Avendaño A., DeLuna A., Rodríguez E., y A. González., 2002. *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *B.B.C.R.* 93:79–85
- Sherman F., 1998. An introduction to genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Genetics*. 6:302-325.
- Vyas, V. K., Kuchin S. y Carlson M., 2001. Interaction of the Repressors Nrg1 and Nrg2 With the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 158: 563–572.
- Wach A., Brachat A., Pöhlmann R., y Philippsen P. 1994 New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10:1793-808
- Willis y McElwain. 2002. "Flowering Plant Origins". In *The Evolution of Plants*, capítulo 6.
- Wolfe K. H. y Shields D. C. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *NATURE*. 12:708-713
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*. 18 292:298.