



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Instituto de Fisiología Celular  
Biología Experimental

**Divergencia regulatoria en los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* en  
*Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Dariel Márquez Gutiérrez**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ma. Alicia González Manjarrez**  
**Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**  
**Dra. Guadalupe Espín Ocampo**  
**Instituto de Biotecnología, UNAM**  
**Dra. Soledad Funes Argüello**  
**Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**MÉXICO, D.F. Diciembre 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Instituto de Fisiología Celular  
Biología Experimental

**Divergencia regulatoria en los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* en  
*Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**Dariel Márquez Gutiérrez**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ma. Alicia González Manjarrez  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Guadalupe Espín Ocampo  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dra. Soledad Funes Argüello  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MÉXICO, D.F. Diciembre 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas en su sesión ordinaria del día 12 de octubre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno, **DARIEL MÁRQUEZ GUTIÉRREZ** con número de cuenta **304108365** con la tesis "**Divergencia regulatoria de los genes parálogos ALT1 y ALT2 en *Saccharomyces cerevisiae***", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ:**

Presidente: DR. VÍCTOR MANUEL VALDÉS LÓPEZ  
Vocal: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ  
Secretario: DRA. GUADALUPE ESPÍN OCAMPO  
Suplente: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY  
Suplente: DRA. LUISA ALVARINA ALBA LOIS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de noviembre de 2015

*María del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo a este proyecto con el Número **CB-2014-239492**.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el apoyo de este proyecto con el número **IN201015**.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención con número de becario **280449**.

Al Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico del programa **Ayudantes de Investigador Nacional Nivel III**.

A la Dra Alicia González Manjarrez por la dirección de este trabajo y por ser parte de mi formación académica.

A la Dra Guadalupe Espín Ocampo por sus valiosos comentarios que sirvieron para la conducción de este trabajo.

A la Dra Soledad Funes Argüello por sus críticos comentarios que ayudaron a discutir este proyecto.

## **Agradezco especialmente:**

A Alicia González por todo el apoyo y enseñanza durante el desarrollo de este proyecto. Por su firme convicción de hacernos amar los experimentos bien hechos. Por invitarme a analizar los datos e ir más allá. Pero sobre todo por dejarme claro que un experimento no es experimento si no tiene controles.

A todo el equipo de trabajo del 301 Oriente, todos mis compañeros: Charly, Lalo, James, Ximena, Hugo, Citlali, Maritrini, Mijaíl, Geovani, Juan Carlos, Alan, Eréndira, Stefany, Cristi, Guadalupe, Aranzazú, Alfredo y de reciente adquisición Bety. A todo este equipo con diferentes intereses pero que trabaja y funciona bien y que siempre quiere ir más allá.

A Ale por su trabajo que es esencial en el laboratorio y que sin duda sin ella no podríamos trabajar y estaríamos estancados.

A James por todo su apoyo con los NuSA, parte esencial de este trabajo y por estar siempre dispuesto a discutir y entender los experimentos.

A Charly especialmente por ayudarme a construir esas mutantes, ¡ah, cómo nos costaron esas construcciones! Porque a pesar de que a veces queríamos tirar la toalla, lo conseguiste y las construiste, ¡cuánto tiempo invertido! Las charlas tan graciosas y de profunda crítica que teníamos. ¡Qué tiempos aquellos cuando nos íbamos a platicar!

A Hugo (UGA3) particularmente por ayudarme a sacar las coinmunos, y sí, aunque no te creía al principio, te probaste (como tu me dijiste) y lo logramos. Pero estuvo divertido, ¿no? Nos la pásabamos riendo (por no decir la palabra que realmente es).

A toda la bola de amigos que nos reunimos para carcajear, discutir, improvisar, quejar y sí de vez en cuando mandarnos muy lejos para después volvernos a reunir y repetir el ciclo. Gracias a Octavio, Carlos Ugarte, Quique, JuanMa, Miguel, Martín y Fernando.

A Mariana y Tania mis súper amigas del Japanese, que siempre hacíamos cosas japonesas juntos y que a pesar de que no pudimos seguir frecuentándonos quedó una

muy sincera y bonita amistad. Especialmente a Mariana por ser tan buena amiga por escucharme cuando más lo necesité. Te quiero mucho Sope.

A esos amigos que nos reunimos cada mil años (porque hay que estarles rogando y pidiéndoles que hagan espacio en su agenda) pero que a pesar de eso el cariño sigue estando ahí. Gracias a todos ellos por su tiempo de escuchar, por sus consejos y por su experiencia compartida. Gracias Karen, Cindi, Ross, Armando, Ricardo, Robert Charles por sus pláticas tan enriquecedoras.

A todos los chicos del TESH (Biología) que me hicieron pasar tardes muy amenas y de gran aprendizaje. Pablo, Alejandra, Aurora, Julia, Gustavo, Freddy, Alejandro, Alejandra, Torrijos, Sebastián, Kalid, Erika, Ibeth, Armando, Lupita, Michelle, Samantha, Víctor y Mónica.

A aquel grupo de ATM que surgió en una época genial donde conocí lugares recónditos y fantásticos. A Jathzive, Daniel, Yol y el Kharma con los que pasé tardes y momentos llenos de aprendizaje... y de mucho etanol también.

A Rocío y Tere dos super-secretarias que me echaron (a mí y a varios) la mano en muchos momentos. Gracias por su trabajo tan bien hecho.

A mis sinodales por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo. A los doctores Víctor, Gloria, Luisa, Claudia y Guadalupe.



## **Dedicatorias:**

A mis padres, por el apoyo, el amor y el coraje que tienen. Por ser un ejemplo de compromiso, dedicación y bondad. Por ser uno de mis más grandes orgullos. Gracias por estar para mí y por ser parte de esto, lo cual jamás se habría realizado sin ustedes. E infinitamente gracias por seguir alentándome.

A mi hermana por su coraje y su pasión. Y sobre todo por inspirarme a estudiar ciencias, algo de lo que jamás me arrepentiré. Gracias también por tu apoyo y por sencillamente ser tú.

A Omar por su sencillez, humildad y compromiso. Gracias por apoyarme y ayudarme incluso en esos momentos difíciles. Por tu tiempo, tus palabras y tus sentimientos. Mis pensamientos, cariño y compromiso para ti.

*La selección natural es un relojero ciego; ciego porque no ve más allá,  
no planifica las consecuencias, no tiene finalidad en mente.  
Richard Dawkins*

# Índice

Lista de figuras y tablas	11
Resumen	12
Abstract	13
i. Introducción	
i.i EL metabolismo del nitrógeno de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
i.ii. El regulador Gln3 y la vía TOR	16
i.iii El control general de aminoácidos (GAAC)	18
i.iv La Ruta Retrógrada	20
i.v La represión mediada por Nrg1	22
- La participación de la cromatina	23
- Los co-represores Tup1 y Hda1	24
ii. Antecedentes	
ii.i La duplicación génica	27
ii.ii El destino de los genes duplicados	28
ii.iii El genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
ii.iv Los genes parálogos <i>ALT1</i> y <i>ALT2</i>	32
iii. Planteamiento del problema	36
iv. Objetivo	36
v. Desarrollo experimental	37
vi. Resultados	
vi.i Estudios de organización de cromatina	52
vi.ii Caracterización de fenotipo	55
vi.iii Divergencia regulatoria mediada por factores de transcripción	56
vi.iv Inmunoprecipitación de cromatina	62
vi.v Interacción entre los reguladores Rtg3 y Nrg1	65
vii. Discusión	66
viii. Conclusiones	73
ix. Perspectivas	74
x. Bibliografía	75

# Anexo de figuras y tablas

Figura/Tabla	Título	Página
Figura 1	Esquema general del metabolismo del nitrógeno	15
Figura 2	Regulación de Gln3	17
Figura 3	Procesos que regula Gcn4	29
Figura 4	La ruta retrógrada	20
Figura 5	La regulación de la activación de la ruta retrógrada	22
Figura 6	Represión por Nrg1 en el gen <i>STA1</i>	23
Figura 7	Represión causada por Tup1 y Hda1	25
Figura 8	El destino de los genes duplicados	28
Figura 9	Bloques duplicados en <i>S. Cerevisiae</i>	30
Figura 10	Filogenia del subfilo Saccharomycotina	31
Figura 11	Reacción de una alanina aminotransferasa	32
Figura 12	Velocidades de crecimiento y Cuantificación de las pozas de alanina	33
Figura 13	Análisis Northern Blot	34
Figura 14	Digestión con MNasa	41
Figura 15	Esquema del análisis de un promotor mediante NuSA	42
Figura 16	NuSA para la cepa de tipo ancestral <i>KIALT1</i>	52
Figura 17	NuSA para la cepa de tipo ancestral <i>LKALT1</i>	53
Figura 18	NuSA para la cepa de tipo ancestral <i>ALT1</i>	54
Figura 19	NuSA para la cepa de tipo ancestral <i>ALT2</i>	54
Figura 20	Velocidades específicas de crecimiento para las cepas	55
Figura 21	Northern Blot para una mutante <i>gcn4Δ</i>	56
Figura 22	Northern Blot para una mutante <i>rtg3Δ</i>	57
Figura 23	Northern Blot para una mutante <i>gln3Δ</i>	58
Figura 24	Northern Blot para una mutante <i>gln3Δ</i> con choque de alanina	59
Figura 25	Northern Blot para una mutante <i>nrg1Δ</i>	60
Figura 26	Northern Blot para una mutante <i>hda1Δ</i>	60
Figura 27	Northern Blot para una mutante <i>tup1Δ</i>	61
Figura 28	ChIP para Gcn4	62
Figura 29	ChIP para Rtg3	63
Figura 30	ChIP para Nrg1	64
Figura 31	ChIP para Gln3	64
Figura 32	Coinmunoprecipitación de Nrg1-myc/Rtg3-Tap	65
Figura 33	Modelo de regulación para <i>ALT1</i>	71
Figura 34	Modelo de regulación para <i>ALT2</i>	72
Tabla 1	Cepas empleadas en este estudio	37
Tabla 2	Oligonucleótidos para amplificar módulo de interrupción pFa6A-KanMX4	38
Tabla 3	Oligonucleótidos para amplificar el módulo del plásmido pFa6A-13myc-KanMX4	39
Tabla 4	Oligonucleótidos para “scanear” la región promotora en el gen <i>ALT1</i>	42
Tabla 5	Oligonucleótidos para “scanear” la región promotora en el gen <i>ALT2</i>	44
Tabla 6	Oligonucleótidos para “scanear” la región promotora en el gen <i>KIALT1</i>	46
Tabla 7	Oligonucleótidos para “scanear” la región promotora en el gen <i>LkALT1</i>	48
Tabla 8	Oligonucleótidos para el gen <i>VCX1</i>	50
Tabla 9	Resumen del efecto de cada uno de los reguladores analizados por Northern Blot	61

# Resumen

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* duplicó su genoma completo, un evento conocido como: *Whole Genome Duplication (WGD)*. *ALT1* y *ALT2* son dos genes parálogos que surgieron como consecuencia de la WGD. Resultados previos del laboratorio confirmaron que *ALT1* codifica para una alanino-aminotransferasa que remueve el grupo amino de la alanina para unirlo al 2-oxoglutarato para formar glutamato y piruvato. Curiosamente, ninguna función se ha determinado para Alt2 incluso cuando estas dos enzimas comparten 67% de identidad a nivel de secuencia. Se ha mostrado en trabajos previos que el perfil de expresión de *ALT1* y *ALT2* es opuesto: *ALT1* se expresa predominantemente en alanina como fuente de nitrógeno (condiciones catabólicas) y es poco expresado en amonio (condiciones biosintéticas); lo contrario con *ALT2*, el cual sólo se expresa en condiciones biosintéticas durante las primeras horas y cuya expresión disminuye con el crecimiento y está reprimido en alanina. Estos resultados sugieren que la alanina es co-inductor para *ALT1* y co-represor para *ALT2*. En este trabajo se analizaron los factores de transcripción (FT) que están implicados en la regulación de *ALT1* y *ALT2*. Se encontró que Gcn4 es activador directo de *ALT1* y regula a *ALT2* de manera indirecta. Inesperadamente, los reguladores positivos Gln3 y Rtg3 actúan como represores para *ALT2*, Gln3 sólo en amonio, pero no en alanina, mientras que Rtg3 funciona como represor en ambas condiciones. El regulador Nrg1 reprime a ambos genes. Mientras tanto Hda1 reprime a ambos genes y Tup1 sólo a *ALT2*; sin embargo, estos dos últimos reguladores son remodeladores de la cromatina y no factores transcripcionales. Por lo tanto, nuestros estudios revelan que hay cinco reguladores negativos para *ALT2* por lo que se propone la hipótesis de que *ALT2* es reprimido por un heteroligómero de regulación. Mientras que la expresión de *ALT1* está determinada por un activador y dos moduladores negativos, Nrg1 y Hda1. Por otro lado, se analizó la organización de la cromatina para estos genes en condiciones catabólicas y biosintéticas y se observó que la cromatina se organiza dependiendo de la condición, siendo un elemento contrastante en alanina y amonio; este estado dependiente de la condición no sucede con genes ortólogos en organismos tipo ancestral (*K. lactis* y *L. kluyveri*). Lo anterior demuestra que la cromatina, una estructura reguladora no sólo es fundamental en la expresión, sino también un elemento que muestra una divergencia evolutiva.

# Abstract

*Saccharomyces cerevisiae* genome went through an entire duplication known as: Whole Genome Duplication (WGD). *ALT1* and *ALT2* are two paralogous genes which arose due to WGD. Previous results from our laboratory confirmed that *ALT1* encodes an alanine aminotransferase which translocates amino group from alanine to 2-oxoglutarate to form glutamate and pyruvate. Surprisingly, no function has been determined for Alt2 even though these two enzymes share 67% of identity. Previous results in our laboratory showed that the expression profile of *ALT1* and *ALT2* is opposite: *ALT1* is poorly expressed in glucose-ammonium (biosynthetic conditions) and strongly induced in glucose-alanine (catabolic conditions), meanwhile *ALT2*, is only expressed on biosynthetic conditions during first hours, as culture grows the expression decreases, on alanine *ALT2* expression is completely repressed. These results suggest that alanine is co-inductor for *ALT1* and co-repressor for *ALT2*. In the present work we have analyzed the transcription factors which are involved in the regulation of *ALT1* and *ALT2* expression. We found that Gcn4 participates as an activator of the two genes but only directly for *ALT1* while *ALT2* is regulated in an indirect way. Unexpectedly, the positive regulators Gln3 and Rtg3 function as *ALT2* repressors. Gln3 represses *ALT2* only in ammonium, but not on alanine, whereas, Rtg3 functions as repressor under both conditions. Nrg1 negatively regulates both genes. Meanwhile Hda1 and Tup1 that are involved in chromatin reorganization act as negative modulators. Thus, our studies reveal that there are five negative regulators for *ALT2* and because of this we propose the hypothesis that *ALT2* is repressed by a heterooligomer. While *ALT1* expression is determined by one activator and two negative modulators, Nrg1 and Hda1. Although we have analyzed the chromatin organization for these two genes in catabolic and biosynthetic conditions and we observed chromatin organization is dependent of the biological condition. These changes in the chromatin between one condition and the other do not occurred in orthologous genes in ancestral-like organisms (*Kluyveromyces lactis* and *Lachancea kluyveri*). Our results show the chromatin has not just a pivotal role in the expression of the genes but a structure that has an evolutionary divergence.

# i. Introducción

## **i.i El metabolismo del nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae*.**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo que ha sido como modelo experimental desde 1930, ha permitido realizar distintas investigaciones en diferentes áreas del conocimiento. Entre una gran variedad de organismos eucariontes, *S. cerevisiae* posee varias ventajas experimentales comparada con otros, que por mencionar algunas, se encuentra su unicelularidad, su ciclo de vida, la existencia de medios de crecimiento definidos, la facilidad para transformación genética, entre otras; todo esto ha conducido a que *S. cerevisiae* sea el segundo eucarionte más estudiado, después del ser humano. Por ello es que distintos y diferentes mecanismos, procesos o vías se han estudiado y/o descubierto en esta levadura. Dentro de estos procesos, uno que resulta de interés para este trabajo es el metabolismo del nitrógeno, que ha sido considerablemente analizado.

Las levaduras pueden reaccionar de distintas formas al nitrógeno inorgánico u orgánico que hay en el medio extracelular, todo esto para que la célula pueda generar las moléculas nitrogenadas que necesita, tales como aminoácidos, vitaminas, cofactores y ácidos nucleicos. En el caso de que el nitrógeno externo sea una molécula orgánica, como lo son los aminoácidos, se activa una respuesta transcripcional que permite la internalización del aminoácido, esta respuesta es mediada por un complejo membranal, Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS), que aparentemente responde como un sensor ante la fuente de nitrógeno (Ljungdahl 2009). Una vez internalizada la molécula nitrogenada, ésta puede ser desaminada para generar amonio o bien funcionar como sustrato para generar glutamato o glutamina (Magasik & Kaiser 2009). Cuando las células crecen en un medio donde la fuente de nitrógeno es amonio y glucosa la fuente de carbono, los iones de amonio pueden fijarse ya sea al 2-oxoglutarato para formar glutamato por acción de la glutamato-deshidrogenasa, Gdh1 (Riego *et al.* 2002); o a la glutamina por acción de la glutamino-sintetasa, Gln1 (Minehart *et al.* 1992). En condiciones de etanol, la enzima paróloga de Gdh1, denominada Gdh3 es la que cataliza la reacción de incorporación del amonio al  $\alpha$ -cetoglutarato junto con Gdh1 (Avendaño *et al.* 1997; DeLuna *et al.* 2001). Cuando la fuente de nitrógeno es glutamina, participa otra

enzima, la glutamato-sintasa, Glt1, que es aquella que genera el glutamato. El glutamato también puede ser desaminado para formar de nuevo  $\alpha$ -cetoglutarato por otra enzima llamada Gdh2 (figura 1). El 2-oxoglutarato, resulta de gran importancia ya que éste es un intermediario del ciclo de Krebs, por ende, es quien conecta al metabolismo del carbono con el metabolismo del nitrógeno.

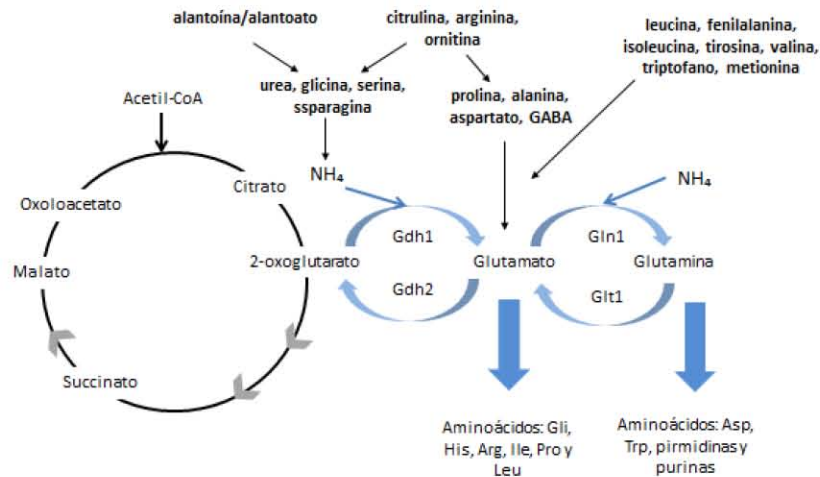


Figura 1. Esquema general del metabolismo del nitrógeno. El amonio inorgánico se fija al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato, por medio de Gdh1. O puede fijarse al glutamato por acción de Gln1, y formar glutamina. Glt1 puede regresar la glutamina a glutamato y éste también puede regenerar el 2-oxoglutarato que puede entrar al Ciclo de Krebs. Tanto del glutamato como de la glutamina es posible generar diferentes aminoácidos. *Tomado y modificado de Yeastbook -Gene expression and metabolism- 2012.*

Debido a lo anterior, la célula puede responder de manera distinta a diferentes fuentes de nitrógeno dependiendo de la facilidad con la que pueda internalizar y procesarla; las moléculas nitrogenadas que sean más complejas de degradar son fuentes secundarias, porque requieren un gasto de energía mayor que con aquellas fuentes de nitrógeno primarias en donde se requiere mucho menor cantidad de energía (Cooper 2004; Magasanik *et al.* 2003). La existencia en el medio de fuentes primarias de nitrógeno promueve una represión a aquellos mecanismos y respuestas enzimáticas que están involucrados en la degradación de las fuentes secundarias de nitrógeno, este mecanismo represor es una ruta de regulación que ha sido ampliamente estudiada, llamada “represión catabólica de nitrógeno” (NCR, por sus siglas en inglés).

NCR es una respuesta celular nitrógeno-sensitiva que le permite asegurar a la célula el uso selectivo de las fuentes de nitrógeno (Hofman-Bang, 1999; Rai *et al.* 2013). Fue identificada en la década de los 60's como un proceso fisiológico, aunque en la



actualidad hay una basta literatura sobre ello. Godard y colaboradores en 2007, realizaron un análisis extensivo en células crecidas en glucosa como fuente de carbono y distintas fuentes de nitrógeno, entre ellas 16 aminoácidos, este estudio concluye principalmente que la calidad de la fuente de nitrógeno afecta el crecimiento celular (Godard *et al.* 2007).

Los genes implicados en NCR son controlados por un *set* de reguladores transcripcionales denominados factores GATA, esto es porque poseen un dominio de dedo de zinc que interactúa directamente con una secuencia consenso y conservada en el promotor, la secuencia 5'-GATA-3' (Soussi-Boudekou *et al.* 1997). Estos factores GATA han sido bien estudiados y son: Gln3, Gat1, Dal80 y Gzf3 (Soussi-Boudekou *et al.* 1997; Minehart & Magasanik 1991; Cunningham & Cooper 1991; Stanbrough *et al.* 1995; Coffman *et al.* 1996; Coorneart *et al.* 1992).

## **i.ii El regulador Gln3 y la vía TOR**

Los reguladores Gln3 y Gat1 son los responsables de NCR, ya que responden a las fuentes secundarias de nitrógeno, como prolina o alantoína, por mencionar algunos (Cooper 2004). Tanto Gln3 como Gat1 han sido ampliamente reportados en la literatura como activadores transcripcionales, mientras que los otros dos, Dal80 y Gzf3 son represores (Cooper *et al.* 2002). Sin embargo, la característica excepcional de estos reguladores es que todos responden a Gln3, excepto el mismo Gln3, que es „inmune“ a los otros factores transcripcionales (FT) de NCR y es el iniciador de una red reguladora (Tate *et al.* 2010; Georis *et al.* 2009; Cooper 2004; Oliveira *et al.* 2002).

Cuando la célula está creciendo en una fuente primaria de nitrógeno, Gln3 es retenida en el citoplasma y la transcripción de los genes requeridos en condiciones limitantes de nitrógeno está completamente reprimida (Broach J., 2012; Rai *et al.* 2013). La proteína que realiza la retención de Gln3 en el citosol es Ure2, ésta forma un complejo con Gln3 en condiciones donde hay fuentes primarias de nitrógeno (Blinder *et al.* 1996; Bertram *et al.* 2000; Cunningham *et al.* 2000). En condiciones limitantes de nitrógeno, Ure2 se separa de Gln3 y por extensión, éste puede ir al núcleo donde activa a los genes necesarios para responder a la limitación de nitrógeno. Esto último es, *per se*, el mecanismo regulatorio de NCR (Rai *et al.* 2013; Cardenas *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 2003).

No obstante, las células tratadas con rapamicina generan una respuesta similar a la que ocurre en limitación de nitrógeno. La rapamicina inhibe selectivamente la actividad de cinasa de las proteínas Tor1 y Tor2, las cuales forman un complejo, llamado, TORC1 (por las siglas en inglés *Target Of Rapamycin Complex 1*) (Cooper *et al.* 2002). Los principales hallazgos con el tratamiento de rapamicina en condiciones de fuentes primarias de nitrógeno fueron: a) la desfosforilación de Gln3; b) Gln3 relocizaba al núcleo; c) los genes sensibles a NCR aumentaban su transcripción y d) la participación de una enzima con actividad de fosfatasa, llamada Sit4 (Beck & Hall, 1999; Hardwick *et al.* 1999).

El mecanismo regulatorio de NCR fue el siguiente, en condiciones no limitantes de nitrógeno o sin rapamicina, TORC1 fosforila a la proteína de llamada Tap42 (del inglés *Tor associated protein*) que se asocia con la proteína Sit4, formando un complejo que es secuestrado por TORC1, impidiendo que Sit4 lleve a cabo la función de fosfatasa (DiComo *et al.* 1996). Mientras que en privación de nitrógeno, así o con de rapamicina TORC1 fosforila a Tap42 y no mantiene secuestrado el complejo y por lo tanto éste último queda libre y permite desfosforilar a Gln3 que está formando el complejo con Ure2, Gln3 desfosforilada puede entrar al núcleo y activar a los genes que están reprimidos por NCR (figura 2) (Yang *et al.* 2006; Jiang & Broach 1999; Jacinto *et al.* 2001; Shamji *et al.* 2000; Puria *et al.* 2008; Puria & Cardenas 2008).

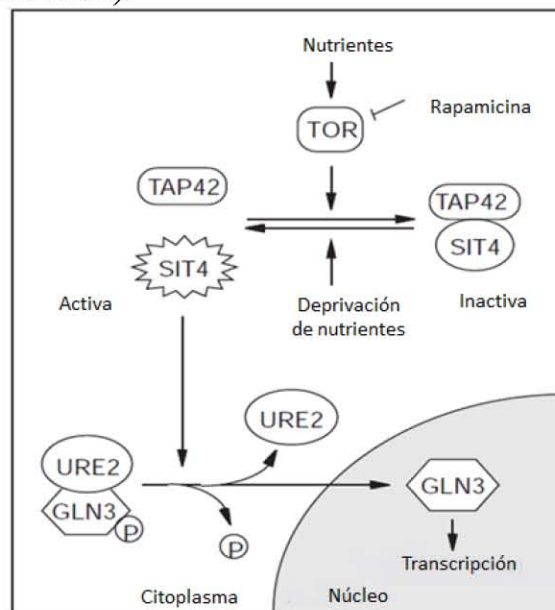


Figura 2. Regulación de Gln3. En condiciones de fuentes de nitrógeno primarias TOR fosforila a Tap42 la cual retiene a Sit4. Cuando hay privación de nutrientes TOR está inactiva y Sit4 puede ejercer su actividad de fosfatasa sobre Gln3. La desfosforilación de Gln3 le permite entrar al núcleo y activar los genes correspondientes. Tomado de Beck et al. 1999.

Cuando hay una limitación de nitrógeno también la hay de aminoácidos debido a que no hay nitrógeno para su biosíntesis. Por lo tanto, esto da como resultado tener dos rutas actuando en paralelo, una ruta catabólica y otra ruta biosintética, una que permite generar nitrógeno asimilable y la otra la fijación de nitrógeno para la biosíntesis. La ruta catabólica en su mayoría es Gln3-dependiente, pero la biosíntesis de aminoácidos está relacionada con otra proteína llamada Gcn4, otro factor transcripcional, vinculado a la biosíntesis de muchas biomoléculas además de aminoácidos. De hecho, ha sido reportado que Gln3 y Gcn4 pueden formar un complejo híbrido de activación. (Hernández *et al.* 2011).

### **i.iii El control general de aminoácidos (GAAC)**

En condiciones de privación de aminoácidos o con tratamiento con el análogo 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), se activa una respuesta enzimática en muchas rutas biosintéticas de aminoácidos, esta respuesta es llamada control general de aminoácidos (del inglés *General Amino Acid Control*, Hinnebusch & Natarajan 2002). Estudios de microarreglos en estas condiciones demostraron que el regulador Gcn4 (*General Control Non-derepressible*) induce una gran cantidad de genes por lo que se le conoce como un regulador maestro (Jia *et al.* 2000). Y como ya se mencionó anteriormente, Gcn4 no sólo responde a una privación de aminoácidos sino también a limitación de nitrógeno (Hernández *et al.* 2011). Este factor transcripcional se une a los promotores de genes que contengan la caja consenso UAS<sub>GCRE</sub> (UAS: *Upstream Activating Sequence*; GCRE: *Gcn4 Responding Elements*) cuya secuencia de unión es GAGTCA (Mueller & Hinnebusch 1986).

Dado que Gcn4 induce genes que codifican, en su mayoría, para la biosíntesis de aminoácidos. La delección en *GCN4* produce alteraciones en el crecimiento celular en medios que no contienen aminoácidos (Hinnebusch 1992), se observó que Gcn4 estimulaba su biosíntesis al mantener altos niveles de sintasas de aminoacil-tRNAs para proteínas involucradas en la biosíntesis, aunque ha sido descubierto que ciertos genes implicados en la ruta de biosíntesis de la adenina responden a Gcn4 (Mosch *et al.* 1991). Posterior a estos resultados y al descubrimiento de que Gcn4 regula no sólo genes implicados en biosíntesis de aminoácidos (figura 3), sino también en síntesis de bases nitrogenadas en condiciones de privación de purinas o de glucosa llevó a realizar estudios de análisis de genoma lo que permitió el descubrimiento de

como mínimo 539 genes de todo el genoma responden a Gcn4 (Hinnebusch *et al.* 2002). Por lo tanto es claro que Gcn4 no sólo está implicado en el control general de aminoácidos sino que está implicado en una respuesta integral biosintética (Godard *et al.* 2007).

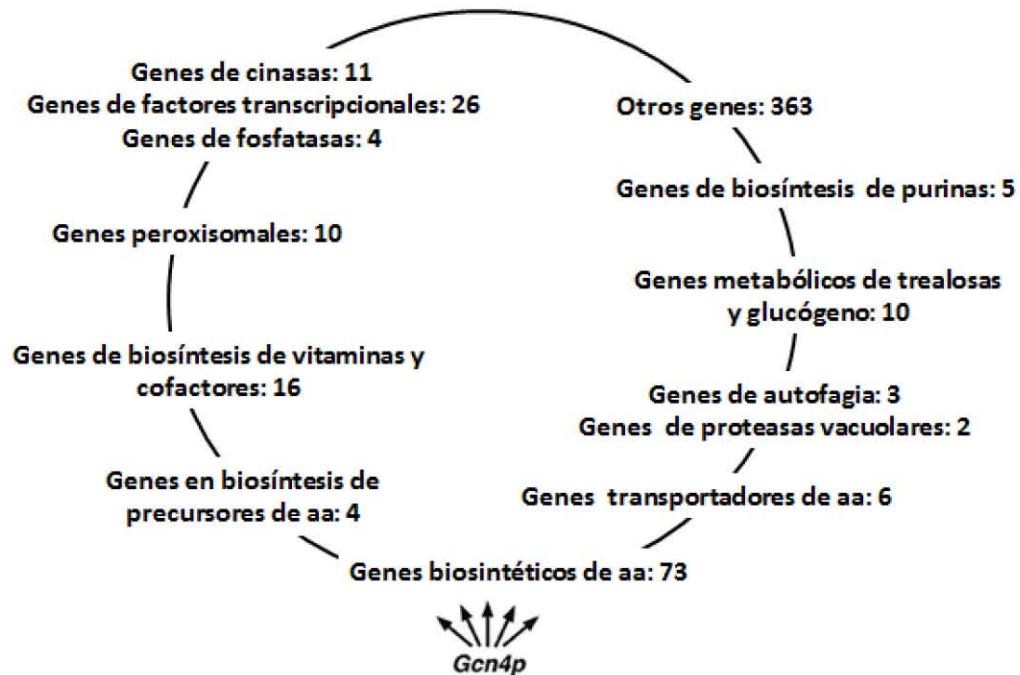


Figura 3. Procesos que regula Gcn4, acorde a análisis de microarreglos. Gcn4 participa en diferentes procesos de biosíntesis, no solamente en aminoácidos como se había descrito anteriormente, sino que también está implicado en la biosíntesis de purinas, vitaminas, cofactores, en metabolismo del carbono y otros procesos como lo muestra la imagen, Tomado y modificado de Hinnebusch & Natarajan 2002.

Hasta el momento se ha descrito cómo la célula, en condiciones limitantes de nutrimentos, genera respuestas para lidiar ante esa limitación, ya sea por Gln3, Gcn4 o los dos actuando paralelamente. La síntesis de aminoácidos se da inicialmente a partir de glutamato o glutamina (figura 1). Sin embargo, el glutamato y la glutamina, son principalmente producidos por el 2-oxoglutarato proveniente del ciclo de Krebs, empero, cuando la célula está creciendo en glucosa el ciclo de Krebs está abatido debido a que la glucosa se está fermentando, entonces, ¿cómo se produce ese 2-oxoglutarato? La producción de éste en estas condiciones se debe principalmente a una ruta metabólica, que ante una deficiencia mitocondrial genera una respuesta nuclear, conocida como ruta retrógrada.

## i.iv La ruta retrógrada

El funcionamiento de la mitocondria durante el crecimiento y desarrollo celular está dado por la labor en conjunto tanto del genoma nuclear, que codifica para la mayoría de las proteínas que realizan una función en la mitocondria como del genoma mitocondrial el cual codifica una cantidad mínima de proteínas las cuales en su mayoría están implicadas en la fosforilación oxidativa (Foury *et al.* 1998). Sin embargo, la mitocondria está implicada en una regulación retrógrada, lo que implica que cambios en el estado funcional del organelo generen cambios en la expresión de genes nucleares (Liu & Butow 2006).

El objetivo de la respuesta retrógrada es el mantenimiento parcial del ciclo de Krebs (figura 4) para la producción biosintética de intermediarios. La expresión de las primeras enzimas del Ciclo (la citrato sintasa, la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa) son aquellas que principalmente se generan por acción de la ruta retrógrada, lo cual permite generar 2-oxoglutarato que es la fuente principal para la producción del glutamato. Esta repuesta es sólo generada en condiciones donde no está ocurriendo la respiración (Jazwinski 2013).

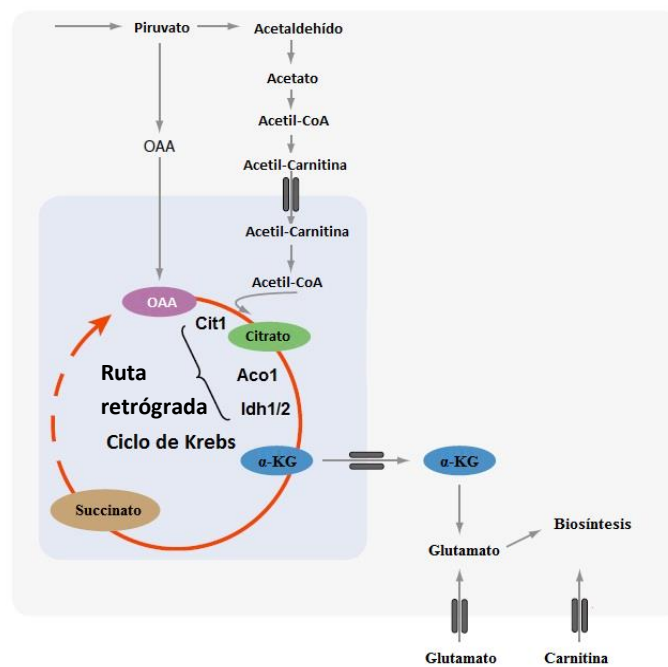


Figura 4. La ruta retrógrada. La síntesis de 2-oxoglutarato es la finalidad de esta respuesta mediada por la mitocondria, donde al activarse genera la producción de las enzimas Cit1, Aco1 e Idh1/2 para su producción. Tomado y modificado de Liu et al. 2006.

A través de un análisis genético se identificaron tres genes como los responsables de que la vía retrógrada se produzca: *RTG1*, *RTG2* y *RTG3* (Liao & Butow 1993; Liu & Butow 1999; Jia *et al.* 1997; Rothermel *et al.* 1997).

*RTG1* y *RTG3* codifican las subunidades de un factor de transcripción heterodimérico del tipo hélice-loop-hélice/zipper de leucina; el cual se une a una a la secuencia consenso GTCAC (caja R) en los promotores de los genes que responden a la ruta retrógrada (Liao & Butow 1993; Jia *et al.* 1997; Jia *et al.* 1997). Mientras que Rtg3 es una fosfoproteína, Rtg1 no lo es; y se ha observado que la activación de Rtg3 correlaciona con su desfosforilación y su translocación nuclear con Rtg1 (Sekito *et al.* 2000). Por otro lado, Rtg2 es una fosfatasa citoplásmica que tiene un dominio de unión a ATP (Koonin, 1994).

Rtg1-Rtg3 se localizan en el citoplasma. La activación de la ruta retrógrada resulta en la relocalización al núcleo de estas proteínas. Esta relocalización depende de la fosfatasa Rtg2, quien desfosforila a Rtg3. Por ello Rtg2 resulta ser un punto regulatorio en esta vía. Sin embargo, otra proteína llamada Mks1 resulta ser un regulador para Rtg2 (Dilova *et al.* 2002), ya que se une de forma reversible a ésta; lo cual promueve la hiperfosforilación de Rtg3 y bloquea su translocación al núcleo. Mks1 puede ser removido por acción de una proteína llamada Grr1 que recluta al proteasoma para la degradación de la proteína; otro tipo de proteínas llamadas Bmh1/2 previenen esa degradación. De ahí que Grr1 y Bmh1/2 son reguladores positivo y negativo de la ruta retrógrada, respectivamente (figura 5).

Curiosamente, estudios de microarreglos revelaron que los genes blanco de las proteínas Rtg1-Rtg3 aumentan su expresión en tratamiento con rapamicina, un inhibidor, que como ya se mencionó, es selectivo de la vía TOR (Komeili *et al.* 2000; Shamji *et al.* 2000). Ya hemos revisado que la vía TOR es sensible a la fuente de nitrógeno. Por ello se ha propuesto que la glutamina puede ser la señal para que TOR inhiba (a través del mecanismo ya discutido en i.ii) a Gln3 y, ahora también a Rtg1/3, puesto que la glutamina es una fuente primaria de nitrógeno.

Hasta el momento se ha revisado como se activan los genes en distintas condiciones y a través de diferentes FT, que resultan ser activadores. No obstante, para este trabajo es importante describir cómo se reprimen los genes en determinadas condiciones.

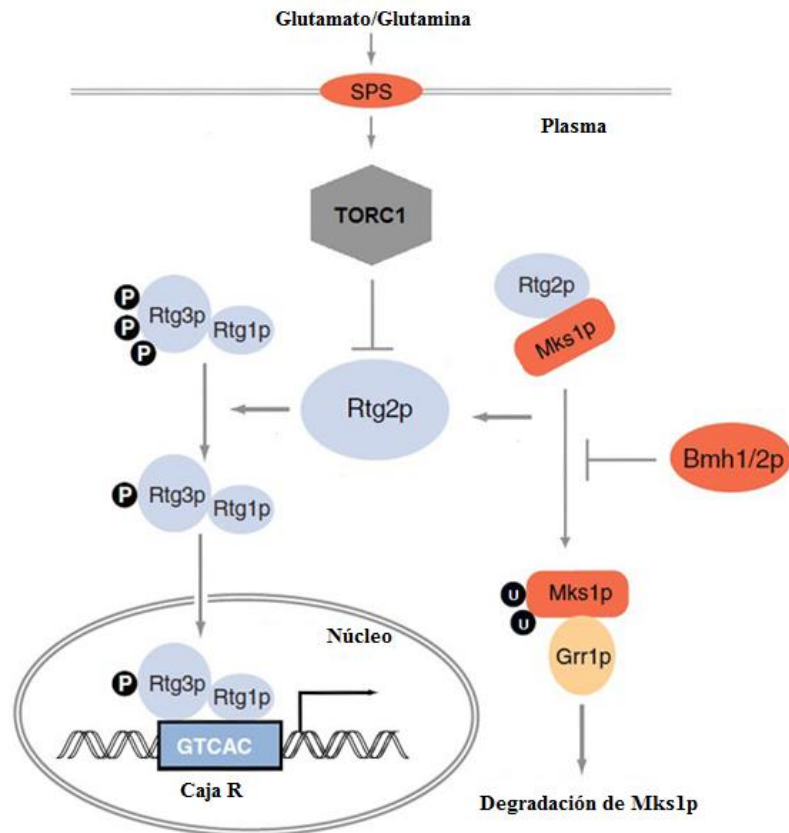


Figura 5. La regulación de la activación de la ruta retrógrada está dada por la proteína Mks1, TORC1 y Bmh1/2 de manera negativa, que impiden que Rtg2 lleve a cabo su función de fosfataza sobre Rtg3, mientras que la proteína Grr1, que es de tipo 14-3-3, regula de manera positiva la ruta, promoviendo la ubiquitinación de Mks1, y por extensión su degradación. Tomado y modificado de Liu et al. 2006.

## i.v La represión mediada por Nrg1

La expresión de una gran cantidad de genes se ve disminuida cuando las células de *S. cerevisiae* están creciendo en un medio que contiene glucosa (Gancedo 1992), este fenómeno se la ha denominado represión catabólica por glucosa (Ronne 1995) y es mediado por una serie de reguladores transcripcionales, entre los cuales se encuentra Nrg1 (del inglés *Negative regulator of glucose*). Éste fue identificado por primera vez como un inhibidor del gen *STA1* que codifica para una glucoamilasa extracelular y que se inhibe en presencia de glucosa (Ahn et al. 1995; Park et al. 1999). Nrg1 como factor de transcripción posee dos dedos de zinc, muy parecidos a los que posee su parálogo Nrg2, en la región C-terminal (Kuchin et al. 2002)

En la figura 6 se observa que Nrg1 se une particularmente a la secuencia en el promotor UAS1-1 (del inglés *Upstream Activating Sequence 1-1*), de esta forma puede reclutar a otros co-reguladores como es el caso de Tup1 (Park *et al.* 1999). También se ha reportado que en conjunto con otro regulador llamado Sfl1, el cual se une a la secuencia UAS2-2 en el promotor de *STA*, cooperan para el reclutamiento de un complejo llamado Srb8-11, el cual está relacionado con la represión de genes, puesto que inhibe la asociación entre el mediador de la transcripción y la RNA polimerasa, al fosforilar a esta última (Kim *et al.* 2004).

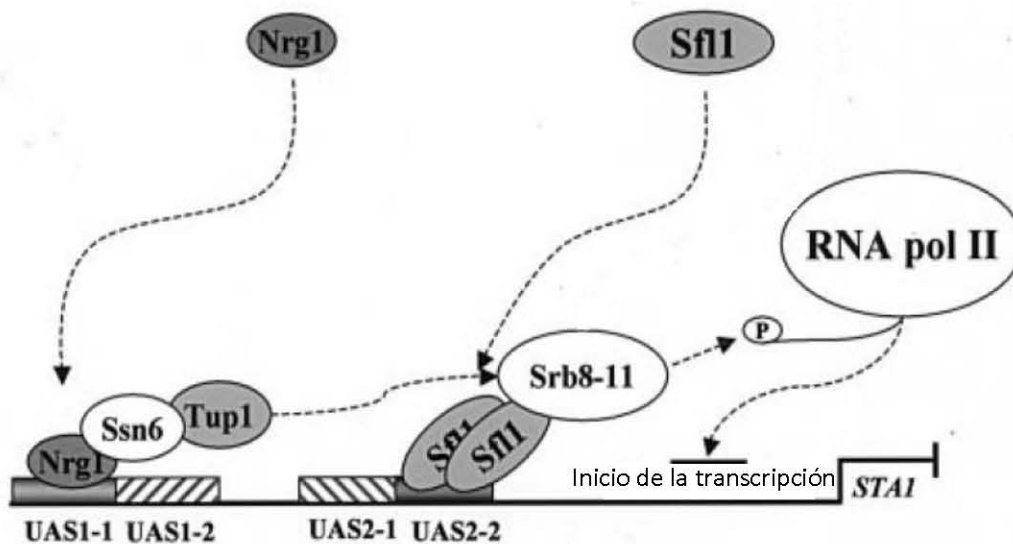


Figura 6. Represión por Nrg1 en el gen *STA1*. La inhibición de la activación mediada por Nrg1 implica que el reclutamiento de proteínas remodeladoras como lo es el complejo Ssn6-Tup1 y, el trabajo en a la par con otros represores como lo es Sfl1 que en conjunto pueden reclutar a complejos mucho más grandes que son desestabilizadores de la transcripción. Tomado de Kim *et al.* 2004.

## - La participación de la cromatina

El efecto represor que genera Nrg1 u otros reguladores negativos no es directo, es decir, éstos no impiden la transcripción; sino que la represión implica otros procesos que involucran co-represores y la participación de la cromatina.

La cromatina participa en la transcripción de forma directa, tanto en la activación como en la represión de los genes. El DNA eucarionte, como el de *S. cerevisiae*, es almacenado en el núcleo; y siendo éste un espacio muy pequeño, el DNA es enrollado en nucleosomas, cada nucleosoma contiene dímeros de 4 proteínas llamadas histonas, H2A, H2B, H3 y H4. Estos nucleosomas enredan al DNA con la



finalidad de que ocupe menos espacio en el núcleo, de protegerlo y también son un punto de regulación en la transcripción. Las histonas dan 1.65 vueltas al DNA, lo que equivale a 147 pares de bases (pb). La interacción entre el DNA y los nucleosomas es meramente electrostática, por lo tanto esto hace que los nucleosomas sean dinámicos, ya que por cambios post-traduccionales se puede alterar la carga neta de todo el nucleosoma y afectar la interacción con el DNA (Luger *et al.* 1997; Jiang *et al.* 2009)

Si la carga neta del nucleosoma es negativa la interacción con el DNA es más débil y esto hace que el DNA esté más relajado; por lo tanto, la transcripción se verá aumentada, ya que si hay relajación en la cromatina los FT y/o la maquinaria transcripcional pueden acceder. Lo contrario pasa cuando la interacción entre el DNA y el nucleosoma es fuerte; en este caso el DNA se compacta y se impide el acceso a los reguladores, co-reguladores y/o a la maquinaria de la transcripción (Gerhard *et al.* 2011).

Esto último es el mecanismo de como algunos represores como Nrg1 reprimen la expresión de genes, reclutando co-represores que a su vez reclutan a otras proteínas que alteran la organización de la cromatina e impiden la transcripción, como es el caso de Tup1 que es reclutado por Nrg1 y a su vez Tup1 recluta otros co-reguladores que afectan a organización de la cromatina.

### - **Los co-represores Tup1 y Hda1**

Tup1 es un co-represor transcripcional global que forma un complejo con otra proteína llamada Ssn6 (también conocido como Cyc8), la formación de este complejo requiere cuatro monómeros de Tup1 y uno de Ssn6, éste modula la represión de genes regulados por glucosa, disponibilidad de oxígeno, daño al DNA (Wahi *et al.* 1998). En *S. cerevisiae*, este complejo represor inhibe la expresión transcripcional de más de 300 genes en condiciones normales de crecimiento (no limitantes en nutrientes) (Green & Johnson 2004). Sin embargo Tup1-Ssn6 no se une directamente al DNA sino que es reclutado a los promotores de los genes a reprimir a través de la interacción con FT, que sí se unen al DNA, como lo es Nrg1 u otros (Zhang *et al.* 2002).

El complejo Tup1-Ssn6 reprime a los genes principalmente por dos mecanismos: a) la represión generada por alterar la dinámica en la cromatina, en donde este complejo se une a los FT *a posteriori* recluta a proteínas desacetiladoras, que reducen la cantidad de acetilos en las histonas y genera la compactación del DNA sobre el octámero de histonas e impidiendo, de esta forma, la transcripción de los genes blancos (figura 7); y b) la interacción con maquinaria transcripcional que desestabiliza al mediador de la transcripción y afecta a la RNA polimerasa (Green & Johnson 2004; Malavé & Dent 2006). El mecanismo mediado por Tup1-Ssn6 se ha encontrado en gusanos, moscas, plantas y mamíferos lo que indica que la represión transcripcional por este complejo está ampliamente conservada evolutivamente (Grbavec *et al.* 1999).

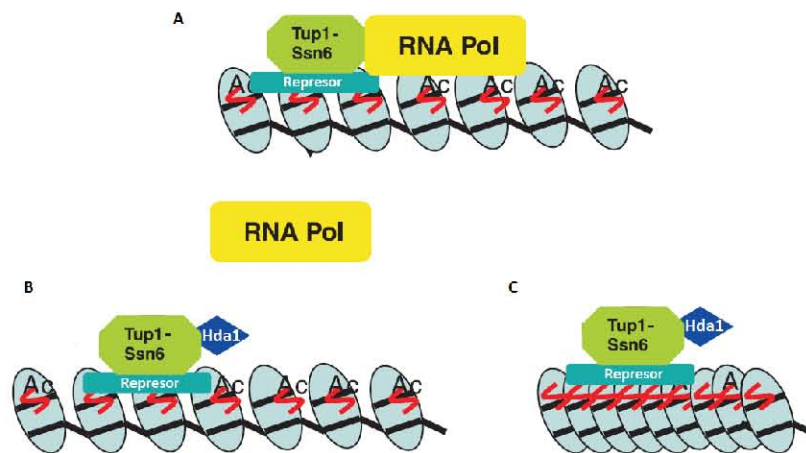


Figura 7. Represión causada por Tup1 y Hda1. A) Un represor con unión al DNA recluta a Tup1-Ssn6, B) La RNA polimerasa no puede acceder y se recluta a la desacetilasa de histonas Hda1, C) Finalmente la cromatina queda cerrada y la expresión del gen queda inhibida. Tomado y modificado de Malavé et al. 2006.

Por otro lado Tup1 interactúa con las histonas H3 y H4 a través de su dominio N-terminal (Edmonson *et al.* 1996). No obstante, la región amino terminal de la cola de las histonas H3 y H4 son susceptibles a acetilación en sus múltiples regiones conservadas de lisina, además se ha visto que las histonas cercanas a los sitios donde se recluta el complejo Tup1-Ssn6 están hipoacetiladas (Bone & Roth 2001; Davie *et al.* 2002). Aunado a lo anterior, se ha observado que Tup1 puede ser reclutado en la región codificante (Ducker & Simpson 2000) pero también puede reclutarse en la región del promotor (Li & Reese 2001), aunque aún no es muy claro el patrón de reclutamiento de Tup1, cualquiera que sea el caso disminuye el nivel de acetilación de las histonas, lo cual sugiere que Tup1 debe reclutar a desacetilasas de histonas,

HDACs (Malavé *et al.* 2006). De hecho, se ha reportado que Tup1 puede interactuar con Hda1, *in vitro* (Wu *et al.* 2001), pero estas interacciones no han sido confirmadas *in vivo* (Davie *et al.* 2003) aunque la delección de *HDA1* o *TUP1* resulta en la hiperacetilación de las histonas H2B/H3 que se encuentran cerca de la región donde se recluta a Tup1. Para el caso concreto de las desacetilasas de histonas la levadura tiene dos tipos de desacetilasas de histonas HDA y HDB (Carmen *et al.* 1996) el complejo HDA contiene tres subunidades Hda1, Hda2 y Hda3. Las desacetilasas de histonas son co-represores transcripcionales que reducen la acetilación de la cola de las histonas con el fin de crear una cromatina cerrada e impedir la transcripción (Dietvorst & Brandt 2010).

Hasta el momento hemos descrito cómo la células poseen distintos mecanismos regulatorios que le permiten adaptarse y desarrollarse en el medio en el que se encuentran. Estos mecanismos regulatorios actúan de formas tan complicadas que implican una serie de interacciones tanto proteína-proteína como proteína-DNA, entre otras interacciones. Estos procesos que se han revisado, sólo son una parte pequeña del reguloma que persiste en *S. cerevisiae*. Pero cabe mencionar, que no sólo esta compleja regulación le permite generar respuestas *ad hoc* al ambiente donde se desarrollan las células, sino también la constitución de su genoma le permite responder de manera tan específica y controlada.

## ii. Antecedentes

### ii.i La duplicación génica

El mecanismo por el cual surgen nuevas funciones en los organismos permanece aún sin aclararse por completo. Se ha propuesto que la duplicación genética es la fuente primaria para generar nuevos genes y funciones, y por lo tanto tiene una gran importancia evolutiva (Ohno 1970). Es importante mencionar que existen dos tipos de duplicaciones genéticas; aquellas que son aisladas, en donde se duplica una región única en el genoma; y las duplicaciones de genoma completo, que son poliploidías. El conocimiento hoy en día de la importancia de los genes duplicados continúa creciendo de manera sorprendente, sin embargo, la habilidad para generar modelos que describan el pasado o el destino de los genes duplicados es aún limitada (Fares *et al.* 2013). En una gran variedad de estudios se ha intentado establecer una relación entre la duplicación genética y las innovaciones adaptativas. Por mencionar un ejemplo, la mayoría de las angiospermas atravesaron por al menos una duplicación de genoma completo en la era del cretácico, que coincide a la explosión en la diversidad metabólica y fisiológica de las plantas (Taylor & Raes 2004).

Las fuerzas evolutivas que participan y actúan sobre los genes duplicados son diversas. Una cantidad de variables interdependientes determinan si un gen será retenido después de una duplicación. Estas variables pueden ser: su categoría funcional, el grado de conservación, la sensibilidad a los efectos de dosis génica, así como su complejidad regulatoria y estructural (Conrad *et al.* 2007). En general, se ha observado que los genes que codifican para proteínas que responden e interactúan con el medio ambiente tienden a ser más frecuentemente retenidos después de la duplicación que aquellos cuya función se encuentra en los compartimentos celulares (Li *et al.* 2003). Experimentos realizados en varias especies, desde unicelulares hasta mamíferos, indican que los genes divergen rápidamente después de una duplicación (Chung *et al.* 2006), y se ha observado tanto en humanos como en levaduras que la divergencia en la secuencia de la proteína y la divergencia a nivel de expresión correlaciona e incrementa con el tiempo evolutivo. También se ha desmotrado que la

región regulatoria es la que diverge primero y más rápido (Gu *et al* 2005). Una vez ocurrida la duplicación, el destino de las copias de genes pueden tener distintos escenarios.

## ii.ii El destino de los genes duplicados

El panorama convencional propuesto inicialmente por Susumu Ohno en 1970 sostiene que después de la duplicación genética, ésta produce dos copias génicas funcionalmente redundantes, parálogos y libres de las presiones de selección de cada uno. Una de las predicciones más comunes de este modelo convencional sobre el destino de los genes duplicados, es que éstos se pueden perder muy rápidamente debido a la acumulación de mutaciones deletéreas (Kondrashov *et al.* 2002). Empero, la pérdida de uno de los genes duplicados no es el único escenario donde pueden terminar éstos; hay otros posibles destinos (figura 8).

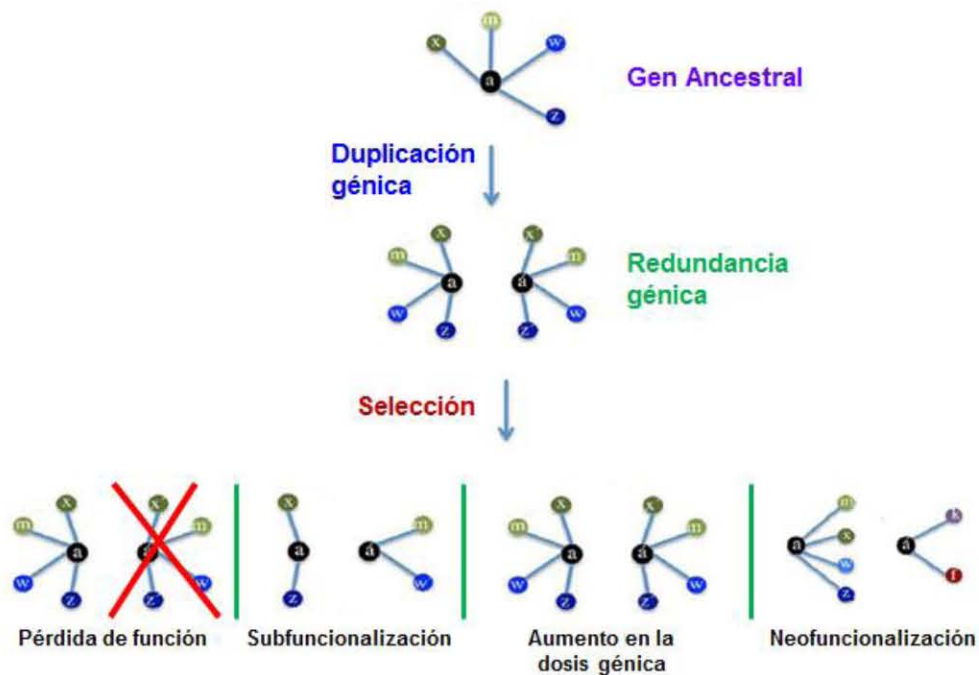


Figura 8. El destino de los genes duplicados. La duplicación de genes conduce en primera instancia a una redundancia génica y es a partir de ésta que se pueden generar distintos escenarios posibles; m, x, w, z son las funciones ancestrales. El más probable pero el más común es que una de las copias se pierda (pérdida de función); puede ocurrir una subfuncionalización, una retención de las dos copias o el desarrollo de nuevas funciones (k y f en el dibujo). *Tomado, modificado y adaptado de Fares et al. 2013.*

**La pérdida de función:** Después de la redundancia génica una de las dos copias se pierde, ésto puede ocurrir ya sea debido a que se acumulan mutaciones tanto en la región promotora como en la region codificante, que eventualmente genera pseudogenes. De hecho, la pseudogenización es un proceso común por el cual se pierde la función de una copia resultante de un evento de duplicación. No obstante, también pueden ocurrir deleciones parciales en los genes duplicados, lo que también puede conducir a la pérdida de función (Kimura & King 1979; Wagner 1998).

**Subfuncionalización:** El proceso de duplicación es un proceso neutral y la evolución de las copias se debe primordialmente a mutaciones azarosas en cada una las copias, que eventualmente generan que cada gen altere o pierda funciones distintas y por ello individualmente una sola copia no puede complementar la función del gen ancestral, la única forma es que se retengan las dos copias. *Grosso modo*, cuando ocurre una subfuncionalización, implica que se necesiten dos genes para realizar lo que antes de la duplicación se realizaba solamente con uno (Lynch *et al.* 2000).

**Dosis génica:** Cuando dos copias génicas provenientes de una duplicación son retenidas sin ningún tipo de divergencia funcional, se dice que aumentan la dosis génica; esto es que incrementa la robustez genética, lo cual le puede permitir al organismo tener un mayor amortiguamiento contra mutaciones deletéreas. Aunque el aumento en la dosis génica también puede generar un aumento en los productos de estos genes, como es el caso de los genes ribosomales, que son genes multicopia (Conrad *et al.* 2007).

**Neofuncionalización:** Un caso poco común que puede suceder después de la duplicación de genes en donde mutaciones estocásticas generen una función nueva y distinta a las función del gen original, la cual resulta en una novedad ventajosa de adaptación evolutiva (Force *et al.* 1999).

Se ha revisado hasta ahora que la duplicación de genes es una fuente de variación sumamente importante, y allende a la actuación conjunta de las fuerzas evolutivas como la selección natural, la deriva genética y la mutación, resulta ser un proceso de alto impacto evolutivo. Tal vez sea por esto último que la duplicación génica está presente en la mayoría de los organismos y *S. cerevisiae* no es la excepción.

### ii.iii El genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *S. cerevisiae* se han realizado análisis genómicos que han revelado la existencia de bloques de genes parálogos que tuvieron que provenir de un evento de duplicación, no obstante, por mucho tiempo el origen de estas regiones parálogas permaneció sin elucidar (Wolfe *et al.* 1997). Recientes estudios han demostrado que la duplicación de genoma completo fue en realidad una fusión celular entre dos especies diploides diferentes (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). La evidencia principal para llegar a esta conclusión de que ocurrió una poliploidia son dos características en las regiones parálogas, la primera y más clara es que son regiones homólogas, puesto que son parálogas, y la segunda y tal vez más importante es que entre dos regiones parálogas se mantiene el mismo orden con respecto al centrómero; es decir, una sintenia. Se identificaron 145 regiones parálogas que representaban el 88% del genoma y que contenían 457 pares de genes duplicados (Kellis *et al.* 2004).



Figura 9. Bloques duplicados en *S. cerevisiae*. La existencia de bloques homólogos y sinténicos apoyan la hipótesis sobre la duplicación de genoma completo puesto que es poco probable que cada una de estas regiones haya surgido por duplicaciones aisladas. Se muestran los cromosomas de *S. cerevisiae* (líneas horizontales negras), la línea delgada negra vertical que atraviesa los 16 cromosomas representa la ubicación del centrómero y cada banda de color que conecta a diferentes cromosomas representan las regiones duplicadas en el genoma. Tomado de Kellis *et al.* 2004.

Esta duplicación de genoma completo es un evento que ocurrió en el género *Saccharomyces* puesto que distintas especies muy cercanas a *S. cerevisiae*, denominadas *sensu stricto* y otras (*Kazachstania* y *Naumovozyma*), mantienen estas relaciones de paralogía y sintenia en sus regiones duplicadas. Otras especies más alejadas filogenéticamente como lo es el género de *Kluyveromyces* no presentan estas características en su genoma; por ende, lo propuesto es que el evento WGD ocurrió justo antes del surgimiento de las especies de *Saccharomyces* y después de la divergencia de especies entre el género *Saccharomyces* y otros géneros como lo es el de *Kluyveromyces* (figura 10).

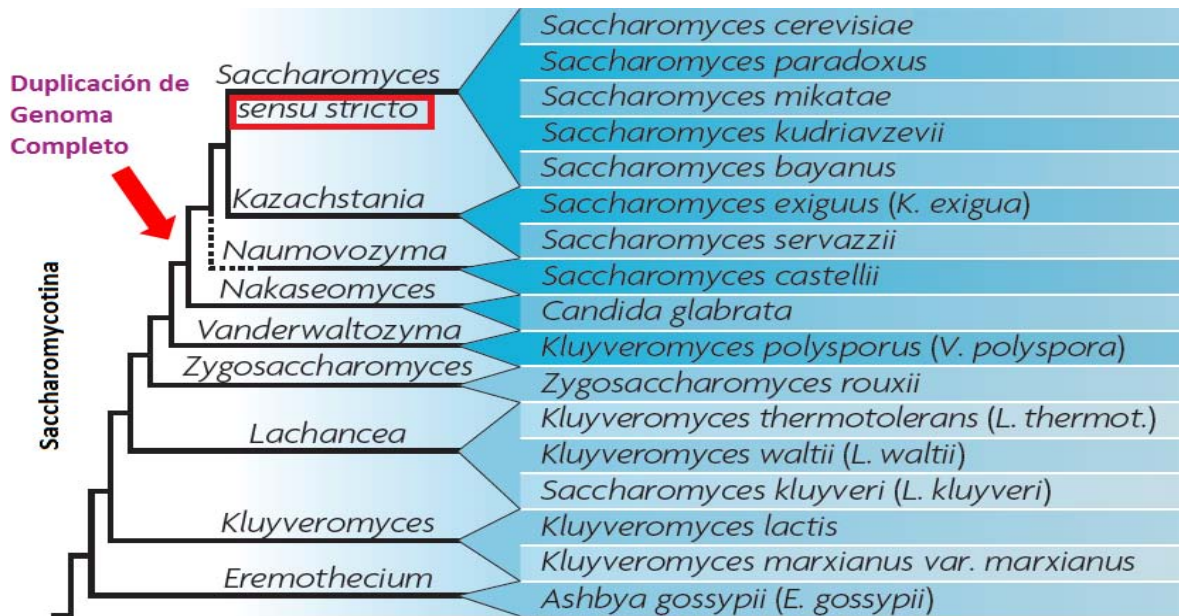


Figura 10. Filogenia del subfilo Saccharomycotina que señala el evento de duplicación, el cual ocurrió antes del surgimiento de los linajes *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovozyma* y *Nakaseomyces* pero después de que los linajes de *Vanderwaltozyma*, *Zygosaccharomyces*, *Lachancea* y *Kluyveromyces* hayan surgido. Tomado de Dujon et al. 2010

Se ha propuesto que la duplicación de genoma completo le trajo a *Saccharomyces* una gran ventaja adaptativa. Se propone que esto le permitió desarrollar un metabolismo facultativo que a diferencia de las otras especies que no duplicaron su genoma son aerobios estrictos (Piskur 2001). Además de que el evento de duplicación coincide con el surgimiento de las angiospermas, el cual ocurrió hace aproximadamente 150 millones de años justamente cuando los linajes de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* divergieron (Wolfe et al. 1997). Esto supone que con el surgimiento de las plantas con fruto aparecieron nuevos nichos ecológicos para conquistar y esta robustez en el genoma le permitió a *S. cerevisiae* poder conquistarlos.



Particularmente, las especies *Kluyveromyces lactis* y *Lachancea kluyveri* son organismos que, como se observa en la figura 10, divergen mucho antes de la WGD, por lo tanto, estos organismos son especies tipo ancestral, puesto que su genoma es más parecido al ancestro común de estos hemiascomicetos que el de *S. cerevisiae*. Esto implica que los genes duplicados en *S. cerevisiae* (parálogos) están en una sóla copia en *K. lactis* y *L. kluyveri* (ortólogos).

Finalmente, dentro de estos bloques parálogos provenientes de la duplicación de genoma completo se encuentran los genes *ALT1* y *ALT2*.

#### ii.iv Los genes parálogos *ALT1* y *ALT2*

Los genes *ALT1* y *ALT2* (del inglés *ALanine TRANSaminase*) encontrados en *S. cerevisiae* están implicados en el metabolismo de la alanina. En ambos procesos bioquímicos: catabolismo y anabolismo participan transaminasas de alanina, que son enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que llevan a cabo la traslocación del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato para formar piruvato y glutamato (figura 11), las transaminasas pueden actuar en ambos sentidos de la reacción. En la mayoría de los seres vivos hay la presencia de al menos dos isoenzimas de transaminasas de alanina. Las isoenzimas Alt se han considerado como la vía principal para la biosíntesis y catabolismo de alanina. El metabolismo en general de la alanina (biosíntesis y catabolismo) es central tanto en las rutas metabólicas de nitrógeno como en las de carbono (Peñalosa et al., 2012).

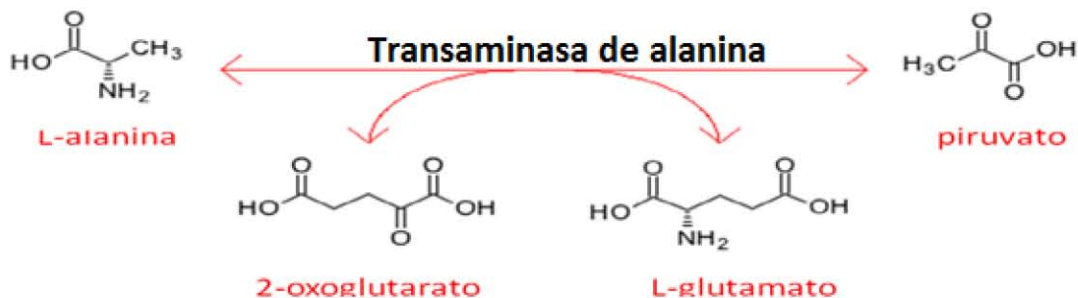


Figura 11. Reacción de una alanina aminotransferasa. Las transaminasas son enzimas reversibles, pueden generar piruvato a partir de alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato (oxoglutarato), o bien formar a partir de piruvato y glutamato.

Se ha demostrado experimentalmente que la proteína codificada por el gen *ALT1*, Alt1, realiza precisamente esta función. En cambio, la proteína Alt2 no tiene actividad catalítica a pesar de compartir un 67% de identidad en secuencia de aminoácidos con Alt1 y conservar los 11 residuos invariables propios de las trasaminasas (Peñalosa *et al.* 2012; Mehta *et al.* 1993).

En resultados previos de nuestro grupo, de trabajo se demostró que la ausencia de *ALT1* y *ALT2* no provoca auxotrofia de alanina, lo que sugiere por extensión la existencia de una ruta alterna para la biosíntesis de este aminoácido (García-Campusano *et al.* 2009).

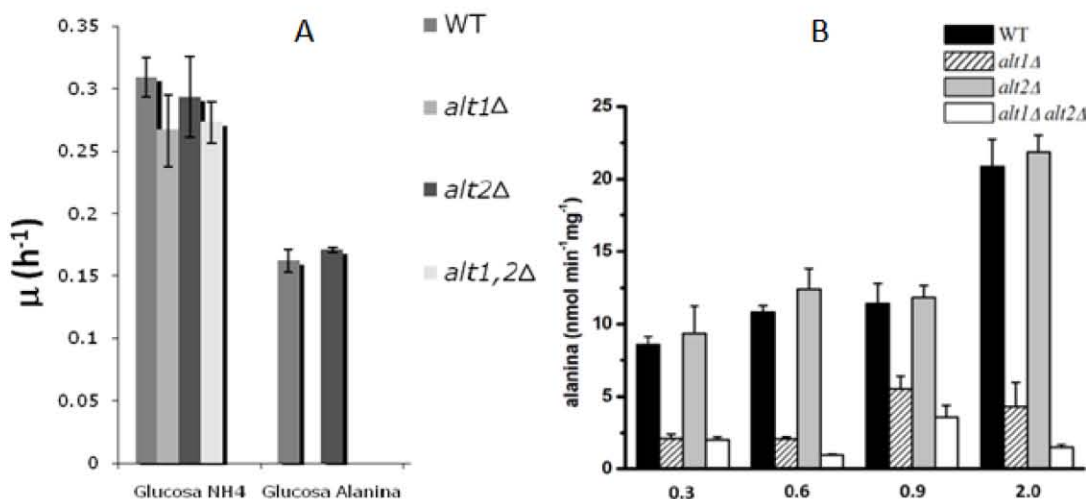


Figura 12. Características fenotípicas de mutantes *alt1Δ*, *alt2Δ* y *alt1Δalt2Δ*. **A.** Velocidades de crecimiento en medio con glucosa-amonio y glucosa-alanina, para las cepa silvestre, *alt1Δ*, *alt2Δ* y *alt1Δalt2Δ*. Se observa que en un medio con glucosa-amonio, las mutantes tienen un fenotipo igual a la cepa silvestre, pero en un medio con glucosa-alanina las mutantes *alt1Δ* y *alt1Δalt2Δ* no crecen. Particularmente, la mutante *alt2Δ* en ambas condiciones presenta un fenotipo igual al de la cepa silvestre. Tomado y modificado de García-Campusano *et al.* 2009. **B.** Cuantificación de las pozas de alanina para las cepas WT, *alt1Δ*, *alt2Δ* y *alt1Δalt2Δ* en un medio glucosa-amonio en diferentes puntos del crecimiento. Se observa que Alt1 contribuye primordialmente a la síntesis de alanina en todo el crecimiento. Tomado de Peñalosa *et al.* 2012.

Por otra parte, también se observó que mutantes *alt1Δ* y *alt1Δalt2Δ* son incapaces de crecer en un medio con glucosa y alanina, como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, lo cual denota que Alt1 es la única vía para degradar la alanina. Mutantes *alt2Δ* tienen un crecimiento igual a la cepa silvestre (figura 12). A partir de estos datos se estudió la contribución de estas enzimas a las pozas

intracelulares de alanina a lo largo de la curva de crecimiento (figura 12B) en donde se concluyó que Alt1 es la enzima que contribuye primordialmente a la poza de alanina en todo el crecimiento celular, puesto que en la mutante *alt1Δ* (barras con rayas) la concentración intracelular de alanina disminuye significativamente con respecto a la cepa silvestre (barras negras); aparentemente, Alt2 (barras grises) no contribuye a las pozas de alanina, puesto que éstas son iguales que en la cepa silvestre en todos los puntos del crecimiento; sin embargo, la contribución exclusiva de Alt2 a las pozas de alanina se observa al comparar las mutantes *alt1Δ* y *alt1Δalt2Δ*, y esto indica que Alt2 contribuye con alanina en las fases tardías del crecimiento celular: la fase diáuxica y la estacionaria; eso se concluye al observar que la poza de alanina de la doble mutante (barras blancas) es ligeramente menor que la poza de alanina de la mutante *alt1Δ* (Peñalosa *et al.* 2012).

Posteriormente, se llevaron a cabo análisis de expresión tipo *Northern blot* para observar el perfil de expresión de *ALT1* y *ALT2* en diferentes condiciones (figura 13): glucosa-amonio y glucosa-alanina. Se observa que la expresión de *ALT1* en un medio con glucosa-amonio va aumentando gradualmente (figura 13) lo cual es consistente con el incremento de la poza de alanina en la curva de crecimiento (figura 12B). Sucede lo contrario con *ALT2*, su expresión es mayor en la fase temprana del crecimiento, cuando hay menos alanina en la células (figura 13). Aunado a estos datos, análisis de la expresión de ambos genes parálogos fueron llevados a cabo en un medio con glucosa-alanina, figura 13B, donde se observa que la expresión de *ALT1* es mayor desde el inicio del crecimiento y que su expresión va disminuyendo; mientras que no se observa expresión de *ALT2* a lo largo de las diferentes fases del crecimiento (Peñalosa *et al.* 2012).

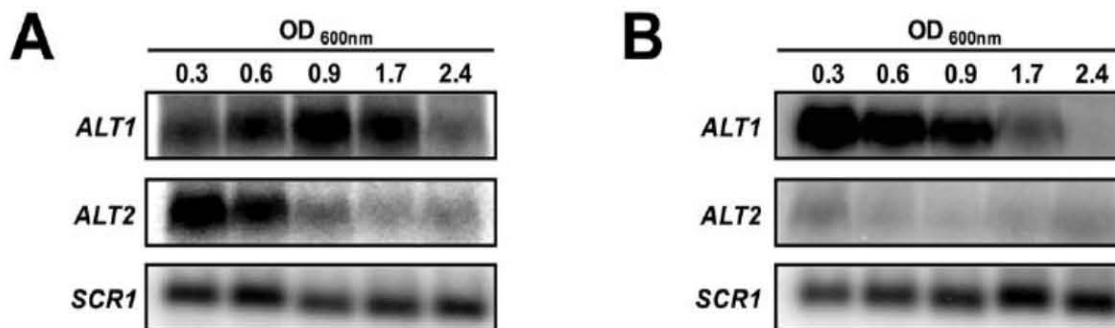


Figura 13. Análisis de expresión tipo *Northern blot* para observar la expresión de *ALT1* y *ALT2* en diferentes puntos del crecimiento en medio glucosa-amonio (A) y en medio glucosa-alanina (B) Tomado de Peñalosa *et al.*, 2012.

El perfil de expresión de *ALT1* es característico de un gen catabólico, mientras que el perfil de expresión de *ALT2* es particular de un gen biosintético. Ambos genes divergieron en su regulación después de la duplicación de genoma completo.

### iii. Planteamiento del problema

Es claro que los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* han divergido en su perfil de expresión, *ALT1* tiene un perfil de expresión de acuerdo a un gen catabólico y *ALT2*, a uno biosintético. ¿Cómo ocurrió la divergencia regulatoria de los genes parálogos *ALT1/ALT2*? ¿Qué elementos *cis* y *trans* participan en la regulación de la expresión? ¿Cómo actúan estos elementos en la expresión de estos genes?

### iv. Objetivo

Caracterizar los elementos *cis* y *trans* que determinan la expresión de *ALT1* y *ALT2*, con el propósito de analizar qué generó la divergencia de estos genes parálogos de *S. cerevisiae* y de esta forma proponer un modelo mecanístico de regulación sobre la expresión.

#### iv.i Objetivos particulares

- i. Análisis de la cromatina para los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* y los ortólogos de *K. lactis* y *L. kluyveri*.
- ii. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de las cepas silvestre, *gcn4Δ*, *gln3Δ*, *rtg3Δ*, *nrg1Δ*, *hda1Δ* y *tup1Δ*.
- iii. Análisis de la participación de reguladores de la transcripción (Gcn4, Rtg3, Nrg1, Gln3, Tup y Hda1) en la expresión de *ALT1* y *ALT2*.
- iv. Determinar por ChIP si el efecto de los reguladores sobre la expresión de los parálogos es directo o indirecto.
- v. Comprobar la interacción de las proteínas Rtg3, Nrg1 y Gln3.

## v. Desarrollo experimental

El desarrollo experimental se divide en análisis fisiológico, con el fin de conocer el fenotipo de las cepas que se trabajaron, el análisis de expresión y cromatina con el fin de conocer como éstos afectan la expresión de los genes parálogos *ALT1* y *ALT2*; y finalmente el análisis de proteínas con el objetivo de determinar si los reguladores participan directa o indirectamente en la regulación de estos genes así como también determinar posibles nuevas interacciones entre reguladores transcripcionales.

Las cepas empleadas en este trabajo se enlistan a continuación:

Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio.

Nombre de la cepa	Genotipo	Fuente
Cla-1 wt	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2::LEU2</i>	Campusano et al., 2009
Cla-1-1 <i>gcn4Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2::LEU2 gcn4Δ::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-2 <i>gln3Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2::LEU2 gln3Δ::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-3 <i>rtg3Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2::LEU2 rtg3Δ::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-4 <i>nrg1Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 nrg1Δ::KanMX4</i>	Peñalosa et al., 2012
Cla-1-5 <i>tup1Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 tup1Δ::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-6 <i>hda1Δ</i>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 hda1Δ::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-7 Gcn4-myc <sup>13</sup>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 GCN4-MYC<sup>13</sup>::KanMX4</i>	Hernández et al., 2011
Cla-1-8 Gln3-myc <sup>13</sup>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 GLN3-MYC<sup>13</sup>::KanMX4</i>	Hernández et al., 2011
Cla-1-9 Rtg3-myc <sup>13</sup>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 RTG3-MYC<sup>13</sup>::KanMX4</i>	Este estudio
Cla-1-10 Nrg1-myc <sup>13</sup>	<i>Mata. ALT1 ALT2 ura3leu2 NRG1-MYC<sup>13</sup>::KanMX4</i>	Peñalosa et a., 2012
BY-1	<i>BY4741 ura3leu2his3met5 GLN3-MYC<sup>13</sup>::KanMX4 RTG3-TAP::HIS3</i>	Este estudio
BY-2	<i>BY4741 ura3leu2his3met5 NRG1-MYC<sup>13</sup>::KanMX4 RTG3-TAP::HIS3</i>	Este estudio
K1-155	<i>Mata. ade2his3ura3</i>	Navarro-Olmos et al., 2010
LK-1	<i>Mata. ura3</i>	Este estudio

## Construcción de mutantes nulas

La construcción de las mutantes con el gen eliminado se realizó, en cualquiera de los casos, por una inserción por recombinación homóloga de un módulo amplificado a partir del plásmido pFA6a-KanMx4 el cual confirió resistencia a geneticina (marcador de selección). Los oligonucleótidos que amplificaron el módulo poseen una secuencia homóloga con la región donde se intercambié el fragmento de DNA.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar el módulo del plásmido pFA6A-KanMX4 y para recombinar con su respectivo gen a eliminar. La región resaltada es la secuencia que se une al plásmido y el resto de la secuencia

Cepa interrumpida	Oligonucleótidos 5" a 3"	
<b>Cla-1-1 <i>gcn4Δ</i></b>	Fw	TTTTGTTTACCAATTTGTCTGCTCAAGAAAATAAAATTAATACAAATAA <b>ACGTACGCTGCAGGTCGACGGA</b>
	Rv	TTATCTAAGTGAATGTATCTATTTTCGTTATACACGAGAATGAAATAAA <b>AAATCGATGAATTCGAGCTCGT</b>
<b>Cla-1-2 <i>gln3Δ</i></b>	Fw	CCCATCCCACAATAACAGAGTGTGTAAGAAAGAGAGACGACGTACGC <b>TGCAGGTCGACGGA</b>
	Rv	TCAGTAATTATTAACATAATAAGAATAATGATAATGATAAATCGATG <b>AATTCGAGCTCGT</b>
<b>Cla-1-3 <i>rtg3Δ</i></b>	Fw	ATTTTTTGTGAGGCGAACCTACTTCTTAAATAAGTGAAGACGTACGCT <b>GCAGGTCGACGGA</b>
	Rv	TACCTGACCTTTTTCAAATTTAATTTTTTCCCGCTAATAAATCGATGAA <b>TTCGAGCTCGT</b>
<b>Cla-1-5 <i>tup1Δ</i></b>	Fw	GCCAAGTTACCTTTCGCACACCACTACTCTTTTTCTATTGTTTTTTGTC <b>CGTACGCTGCAGGTCGACGGA</b>
	Rv	GGTGAGGAAAGTAACTGTTTGTTTTAAAGCGTACCTGGATCATAACAT <b>CGATGAATTCGAGCTCGT</b>
<b>Cla-1-6 <i>hda1Δ</i></b>	Fw	AATTTTTAGTGACCTAATTCACATAACAAAATATTGAGAACGTACGCT <b>GCAGGTCGACGGA</b>
	Rv	TTCAACTTTTATAAGGCATGAAGGTTGCCGAAAAAAAATTCGTACGC <b>TGCAGGTCGACGGA</b>

## Construcción de mutantes etiquetadas.

Las cepas etiquetadas son aquellas donde a una proteínas, factores de transcripción en este caso, se les pone en el C-terminal una secuencia de aminoácidos (un epítipo) que es reconocido por anticuerpo. EL etiquetamiento de FT sirvió para realizar inmunoprecipitaciones.

En el caso de las mutantes etiquetadas con un sólo epítipo se hizo la amplificación de un módulo que de igual forma confirió resistencia a geneticina; el plásmido pFA6a-13myc-KanMX4. Para generar las cepas doblemente etiquetadas se parte de una cepa que ya posee una etiqueta, el epítipo de TAP. La cepa BY4741 fue la cepa empleada para generar aquellas dobles etiquetamientos.

Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificar el módulo del plásmido pFa6A-13myc-KanMX4 y para recombinar con su respectivo gen a etiquetar.

Cepa etiquetada	Oligonucleótidos 5''a 3''	
Rtg3-myc	Fw	CTCTAATCCAGCTGACTATCTTTTAGAATTTGGTTCGGGGACGGATCC CCGGGTTAATTAA
	Rv	CCCCGAACCAAATTCTAAAAGATAGTCAGCTGGATTAGAGGAATTCC AGCTCGTTTAAAC
Rtg3-tap con Nrg1-myc	Fw	GACATGATAATTGCTTGCAACACTATAGAACACATTTGAAAAAGGGAC AACGGATCCCCGGGTTAATTAA
	Rv	GTAAAGTGC GGAATAGTAGTACTGCTAATGAGAAAAACACGGGTATA CCGTCAAGAATTTCGAGCTCGTTTAAAC
Rtg3-tap con Gln3-myc	Fw	AGCAATTGCTGACGAATTGGATTGGTTAAAATTTGGTATACGGATCCC CGGGTTAATTAA
	Rv	TTAACATAATAAGAATAATGATAATGATAATACGGGTCAGAATTCC AGCTCGTTTAAAC

## Cultivos y obtención del fenotipo

Previo a la inoculación en medios de cultivo empleados para este estudio se usó un preinóculo en medio rico con extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa. (YPD). Los medios de cultivo en los que se trabajó fue medio mínimo (MM) los cuales contienen como fuente de carbono glucosa al 2% m/v y como fuente de nitrógeno 40 mM de Sulfato de Amonio o 7 mM de Alanina. En los casos de auxotrofias de uracilo se utilizó 20 mg/L y/o 100 mg/L de leucina.

Para la obtención de la velocidad de crecimiento se inocularon tres matraces (réplicas biológicas) de MM con un inóculo proveniente de YPD, la densidad óptica (DO) inoculada fue de 0.05 en todos los casos para su monitoreo de crecimiento cada 2 h a una longitud de 600 nm. Las lecturas se llevaron a cabo hasta que se llegaba a fase estacionaria. Con estos datos, los cuales son réplicas de tres, como ya se mencionó, se obtuvieron valores como la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación. La obtención de estos datos para cada cepa permitió realizar



las extracciones de RNA, ya que gracias a esa información se planificó a diferentes tiempos dichas extracciones.

### **Extracción de RNA e hibridación tipo *Northern blot***

La extracción de RNA se realizó a partir de células crecidas en MM con amonio y con alanina en tres diferentes DO (0.3, 0.6 y 0.9). Una vez que las células estaban en la DO indicada, éstas fueron concentradas por centrifugación a 200 xg y lavadas con agua estéril y dietilpírocarbonato (DEPC) al 0.1 % v/v y transferidas a un tubo de microcentrífuga para centrifugarse a 200 xg y posteriormente fueron resuspendidas en 500 µL de una solución TES (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM pH 8 y SDS al 0.5% m/v) a los cuales se le adicionaron 400 µL de fenol y se incubaron a 65°C durante 1 h.

Transcurrido el tiempo se centrifugaron los tubos a 2085 xg a 4°C por 5 minutos. Se retiró la fase acuosa y se volvió a realizar una extracción con fenol la cual se centrifugó en las mismas condiciones que la primera extracción. Posteriormente se realizó una extracción con cloroformo para eliminar el exceso de fenol. Se precipitó el RNA concentrado en la fase acuosa con Etanol al 100% y acetato de sodio 3 M pH 5.3 por toda la noche. Se centrifugó el RNA a 2085 xg a 4°C y se resuspendió en agua tratada con DEPC.

Los RNA se cargaron en un gel de agarosa al 1% y formaldehído al 6% para después transferirse a una membrana de Nylon cargada positivamente (GE Healthcare). La membrana se hibridó tanto con una sonda *ALT1* obtenida del trabajo de García-Campusano et al., 2009 como con una sonda *ALT2* obtenida del trabajo de Peñalosa et al., 2012. Como control de carga se usó el gen constitutivo *ACT1*.

### **Análisis de posicionamiento de nucleosomas (NuSA)**

El análisis de posicionamiento de nucleosomas se realizó para observar la organización de la cromatina en los promotores de los parálogos *ALT1* y *ALT2* y con un fin comparativo se realizó también sobre los ortólogos en las especies tipo ancestral *K. lactis* y *L. kluyveri* a los que a partir de ahora se denominarán *KLALT1* y

*LKALT1*. El procedimiento para realizar el estudio del posicionamiento de nucleosomas sobre los promotores de *ALT1*, *ALT2*, *KIALT1* y *LKALT1* se realizó como describe Infante *et al.* 2012.

Se creció un cultivo a la DO requerida y se le agregó formaldehído al 37% por 15 minutos, el formaldehído genera enlaces covalentes entre las proteínas y el DNA lo que hace la interacción fija; a esto se le llama enrecruzamiento (*crosslinking*, en inglés), después se incubó con glicina 2.5 M por 5 minutos más. Las células centrifugadas a 200 xg por 5 minutos y resuspendidas en amortiguador Z2 (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.4,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y zimoliasa 10 mg/mL); se dejaron incubando 20 minutos a 30°C. Se centrifugaron los esferoplastos a 300 xg, 10 minutos por 4°C, posteriormente se resuspendieron en amortiguador NPS (espermina 0.05 mM, NP-40 0.075% v/v, NaCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM) y se transfirieron a tres tubos de 1.5 mL en donde se agregó 3  $\mu$ L MNasa (15 U/ $\mu$ L). Se realizaron 3 digestiones a 50 min, 60 min y 70 min a 37°C .

Transcurrido el tiempo se adicionaron 60  $\mu$ L de SDS al 10% y 10  $\mu$ L de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL y se incubaron a 65°C toda la noche. Finalizado este punto se extrajo el DNA con Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, respectivamente. Posteriormente se precipitó por 30 minutos el DNA con alcohol etílico al 100% y 20  $\mu$ L de NaCl 5 M a -20°C. Se centrifugaron las muestras a 2089 xg por 20 minutos y se dejó secar para después resuspender el sedimento en TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA pH 8 1 mM) finalmente se cargó en un gel de agarosa al 1%. Con la digestión se observó un bandeo en el gel (figura 14).

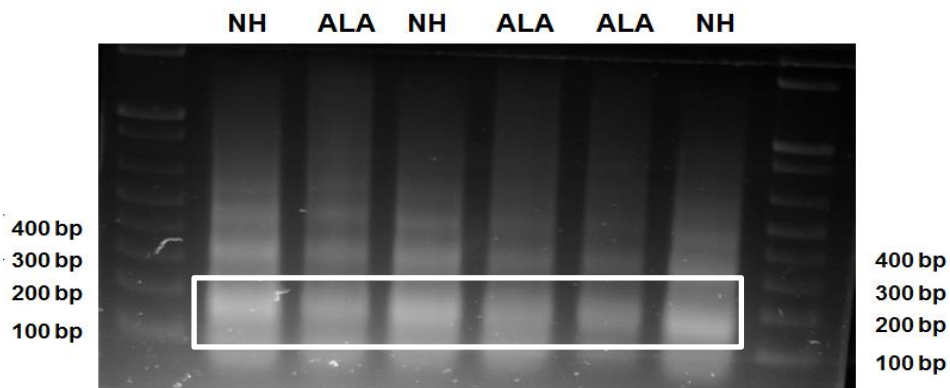


Figura 14. Digestión con MNasa tanto en amonio como en alanina, la banda que de interés es la banda monosomal que es de 147 pb (recuadro blanco), puesto que es la longitud del DNA protegido por un nucleosoma.

Posteriormente se cortó la banda monosomal y se purificó por el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de *Promega* y se procedió a realizar un análisis Q-PCR. Los oligonucleótidos empleados para los promotores fueron diseñados aproximadamente cada 100 pb. Los oligonucleótidos permiten ir amplificando la región determinada en forma consecutiva. Al hacer el entrecruzamiento con el formaldehído, los nucleosomas quedan fijos y por lo tanto, protegen al DNA, al tratar con la MNasa, ésta no puede acceder y por ende no degrada al DNA, en las regiones donde no hay nucleosomas, el DNA está libre y puede ser degradado por la MNasa. Cuando hacemos el Q-PCR las regiones donde hay mayor amplificación es porque hay DNA que quedó protegido (figura 15). Una vez que se obtuvieron los datos de Q-PCR; es decir la cantidad de amplificación; éstos se grafican con respecto a la posición que amplificaron en el promotor.

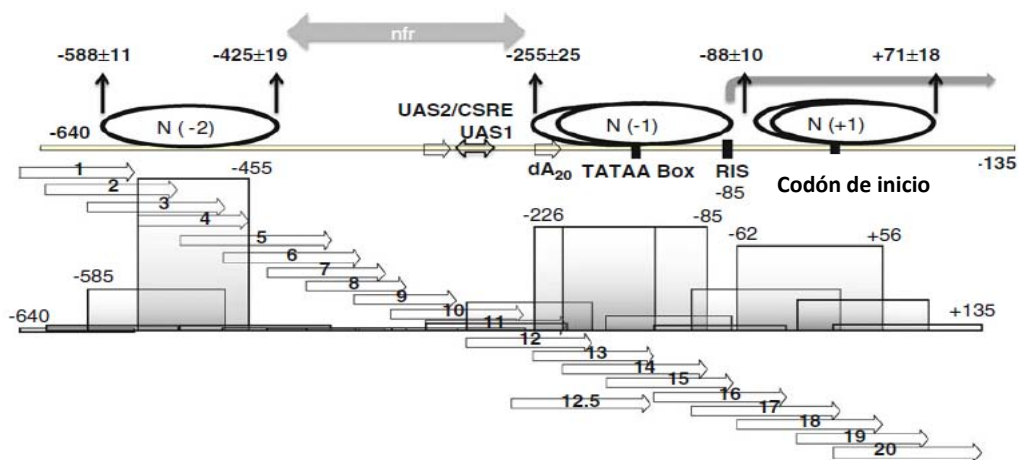


Figura 15. Representación gráfica para determinar el posicionamiento de nucleosomas. Las flechas enumeradas representan los oligonucleótidos, los cuales van amplificando una región determinada, los óvalos sobre la línea que representa el promotor, son los nucleosomas. Cuando hay un nucleosoma, se protege al DNA y hay mayor amplificación (rectángulos).

Los oligonucleótidos empleados fueron:

Tabla 4. Oligonucleótidos para analizar la región promotora en el gen *ALTI*.

Promotor de <i>ALTI</i>		
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Región amplificada
<b>A0.5</b>	Fw ATG ATG TTT CAG GGC AAG CTT T Rv AGA GGA GAC CGG TTA TAC GA	-796 a -700

<b>A0.6</b>	Fw AAT CTC TTG CAC GGT CGC AT Rv AAA GTA AGT ACG CAG GTG TAG TT	-760 a -658
<b>A0.7</b>	Fw TCG TAT AAC CGG TCT CCT CT Rv ATC TTA AGA GAT ATG CCG CTT G	-720 a -619
<b>A0.8</b>	Fw AAC TAC ACC TGC GTA CTT ACT TT Rv TTT GCC TCT CTG CCT TTC TTT	-681 a -578
<b>A0.9</b>	Fw CAA GCG GCA TAT CTC TTA AGA T Rv ACG AGC CAT CCT CTG CAG A	-641 a -551
<b>A1</b>	Fw TTT GCC TCT CTG CCT TTC TTT Rv TGC TGT GCA ATC CTT GTT TCT	-599 a -501
<b>A2</b>	Fw TCT GCA GAG GAT GGC TCG T Rv TAT GTG TGT GGG GCA GCG	-568 a -478
<b>A3</b>	Fw AGA AAC AAG GAT TGC ACA GC Rv TAT ATG GAT TAT ATA GCC ACG AAT	-520 a -431
<b>A4</b>	Fw CGC TGC CCC ACA CAC ATA Rv ACG TCT AAT GGG AAG TGC TA	-496 a -375
<b>A5</b>	Fw ATT CGT GGC TAT ATA ATC CAT ATA Rv AGT GAA AAA AAA ACC AGT ACT GTA A	-454 a -341
<b>A6</b>	Fw TAG CAC TTC CCA TTA GAC GT Rv CTT GGA CCC CTT CAG AAT GA	-394 a -302
<b>A7</b>	Fw TTA CAG TAC TGG TTT TTT TTT CAC T Rv TTG TCT CAA CGA AAG GTC GAA	-374 a -271
<b>A8</b>	Fw TCA TTC TGA AGG GGT CCA AG Rv AAC CAC AGC AGG TCA GAA GA	-321 a -241
<b>A9</b>	Fw TTC GAC CTT TCG TTG AGA CAA Rv ATC GTT TAC AAA GGG CGC AG	-291 a -204
<b>A10</b>	Fw TCT TCT GAC CTG CTG TGG TT Rv GTA GTA ACG GAA GAG CTT TTC	-260 a -161
<b>A11</b>	Fw CTG CGC CCT TTG TAA ACG AT Rv ACA ACT AGA GTA AAA TAG CGA GAA	-223 a -129

<b>A12</b>	Fw GAA AAG CTC TTC CGT TAC TAC Rv AAG CTG GTC CTG TTC TCG A	-181 a -91
<b>A13</b>	Fw TTC TCG CTA TTT TAC TCT AGT TGT Rv TGC GTT CAA TTG AGA AGC AGA	-153 a -62
<b>A14</b>	Fw TCG AGA ACA GGA CCA GCT T Rv C AAA ATA AAG ACT GGG GAA AT	-109 a -9
<b>A15</b>	Fw TCT GCT TCT CAA TTG AAC GCA Rv TGA AGT GAT TTT TGG CAG ACA GT	-62 a +71
<b>A16</b>	Fw ATT TCC CCA GTC TTT ATT TTG CT Rv GAG TTA TAG AAT TAC TCA CTG TG	-32 a +52
<b>A17</b>	Fw ACT GTC TGC CAA AAA TCA CTT CA Rv TTT CTG CGC TTG AAG TGA GA	+8 a +100
<b>A18</b>	Fw CAC AGT GAG TAA TTC TAT AAC TC Rv AAA GGA GTA GTG ATA TGT GGC A	+29 a +125
<b>A19</b>	Fw TCT CAC TTC AAG CGC AGA AA Rv AAT CCA GGA AGA GCT ATG TCT	+80 a +179
<b>A20</b>	Fw TGC CAC ATA TCA CTA CTC CTT T Rv AAT CCA GGA AGA GCT ATG TCT	+104 a + 204

Tabla 5. Oligonucleótidos para analizar la región promotora en el gen *ALT2*.

Promotor de <i>ALT2</i>		
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Región amplificada
<b>B0.6</b>	Fw TTC AAA GAA GTT GCC GCC GT Rv TGT ATG TGA ATG AGC AGT GGA T	-821 a -710
<b>B0.7</b>	Fw CTG AAG AAC TAG AGG ACT TAG T Rv CAG GAG CAA CCG CTT TTA AC	-760 a -641
<b>B0.8</b>	Fw ATC CAC TGC TCA TTC ACA TAC A Rv TGG GTG AGG CCG CAG ATT	-731 a -611
<b>B0.9</b>	Fw GTT AAA AGC GGT TGC TCC TG Rv TTG CCA ATC AAG GGT GAA GC	-660 a -548

<b>B1</b>	Fw ACC GCC ATT GTT CGT ACG T Rv GAA ACA ATA GTA TCG TGA TGT GA	-600 a -510
<b>B2</b>	Fw GCT TCA CCC TTG ATT GGC AA Rv AAG ACG TGT GGA GGA CAT CA	-568 a -472
<b>B3</b>	Fw TCA CAT CAC GAT ACT ATT GTT TC Rv ATA ATG AAG TAA TTA TGA CGA AGT A	-533 a -418
<b>B4</b>	Fw TGA TGT CCT CCA CAC GTC TT Rv TTC TTA GGT ATA ATG AAG TAA TT	-492 a -409
<b>B5</b>	Fw TAC TTC GTC ATA ATT ACT TCA TTA T Rv TTG CGA ATG AGG CCA AAC TT	-443 a -340
<b>B6</b>	Fw AAT TAC TTC ATT ATA CCT AAG AA Rv ACA AGC CGT TTC CAT GGA GA	-432 a -315
<b>B7</b>	Fw AAG TTT GGC CTC ATT CGC AA Rv AAT AAA ATC GCC AAA CAA GTA GGA	-360 a -278
<b>B8</b>	Fw TCT CCA TGG AAA CGG CTT GT Rv TAT GGG ACC ATA AGA GTA GGA	-335 a -250
<b>B9</b>	Fw TCC TAC TTG TTT GGC GAT TTT ATT Rv AAG TGT ATT GGT AAT TTG AAG AGA T	-302 a -212
<b>B10</b>	Fw TCC TAC TCT TAT GGT CCC ATA Rv TTC CCA CAC GAA GTA GTA AAT TT	-271 a -178
<b>B11</b>	Fw ATC TCT TCA AAT TAC CAA TAC ACT T Rv AAA GGA TCA AAA AGA AAA GTG AAC A	-247 a -145
<b>B12</b>	Fw AAA TTT ACT ACT TCG TGT GGG AA Rv TAT TTA CTG AAT GAG AAA AGG ATG A	-201 a -109
<b>B13</b>	Fw TGT TCA CTT TTC TTT TTG ATC CTT T Rv TCT TAT CTT TTA TGC CTC TAG AGA	-170 a -67
<b>B14</b>	Fw TCA TCC TTT TCT CAT TCA GTA AAT A Rv ACT TAC AAA AAC AAC ACT ACT GTG	-134 a -26
<b>B15</b>	Fw TCT CTA GAG GCA TAA AAG ATA AGA Rv TGT CAT TGT CAT GTG TTC TTA CTT	-91 a +12

<b>B16</b>	Fw CAC AGT AGT GTT GTT TTT GTA AGT Rv TCC TTT GCG GTG AAC ACA C	-50 a +50
<b>B17</b>	Fw AAG TAA GAA CAC ATG ACA ATG ACA Rv TAA TCT TGC CAG CGG GCT TA	-12 a +79
<b>B18</b>	Fw GTG TGT TCA CCG CAA AGG A Rv AGC ATA TTC TGC CTT AGT GAC A	+31 a +113
<b>B19</b>	Fw TAA GCC CGC TGG CAA GAT TA Rv TTA GCT CGT CAG CTC TGG TT	+59 a +160

Tabla 6. Oligonucleótidos para analizar la región promotora en el gen *ALTI* en el promotor del ortólogo en la especie *Kluyveromyces lactis*.

Promotor de <i>KIALTI</i>		
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Región amplificada
<b>F1</b>	Fw TTC ACG ACA CTG TAT TAA GCG TA Rv ATT TTG CGG GTA TCT TGT TGC AA	-903 a -802
<b>F2</b>	Fw CTT AAG GTG GAA AGT CGG AAG Rv CTC GGT GTA GAT ACT ATT TAA CC	-860 a -769
<b>F3</b>	Fw TTG CAA CAA GAT ACC CGC AAA AT Rv AGG ACT GAT AGA AAA GTG GAC A	-824 a -731
<b>F4</b>	Fw GGT TAA ATA GTA TCT ACA CCG AG Rv AAA GTA AGC ATC AAC CGC CCA	-791 a -693
<b>F5</b>	Fw TGT CCA CTT TTC TAT CAG TCC T Rv GGC ATT GCA CAT CAA GGG TT	-752 a -655
<b>F6</b>	Fw TGG GCG GTT GAT GCT TAC TTT T Rv GCA AAA TAG TGC TGT AAG GAA AA	-713 a -620
<b>F7</b>	Fw AAC CCT TGA TGT GCA ATG CC Rv GCT CAT CAT TTT GAA TAT AAC AAT TG	-674 a -584
<b>F8</b>	Fw TTT TCC TTA CAG CAC TAT TTT GC Rv TGG GAC TGT GTT GAT CTG AAA T	-642 a -542
<b>F9</b>	Fw CAA TTG TTA TAT TCA AAA TGA TGA GC Rv AGC CTT AAA CCC AAA AGA AAA ACT A	-612 a -504

<b>F10</b>	Fw ATT TCA GAT CAA CAC AGT CCC A Rv GTA ACC CTT TAT CTT TTT TTT TCC T	-563 a -461
<b>F11</b>	Fw TAG TTT TTC TTT TGG GTT TAA GGC T Rv ATG GAG GCA AGG ATT CAA AGT AT	-528 a -428
<b>F12</b>	Fw AGG AAA AAA AAA GAT AAA GGG TTA C Rv TAA TAG CGT AGT CCC GTC TTG A	-485 a -381
<b>F13</b>	Fw ATA CTT TGA ATC CTT GCC TCC AT Rv ACA ACT GTA CGT AAC AAA TGA ACA	-450 a -347
<b>F14</b>	Fw TCA AGA CGG GAC TAC GCT ATT A Rv CTG ATA ACG AAA AAC TAA AAA GTG	-402 a -293
<b>F15</b>	Fw TGT TCA TTT GTT ACG TAC AGT TGT Rv AAA AGA TGG AAT GGC TGA CCA	-370 a -270
<b>F16</b>	Fw CAC TTT TTA GTT TTT CGT TAT CAG Rv TCT TCT TTT TCT TTC AGT GTC AGA	-316 a -209
<b>F17</b>	Fw TGG TCA GCC ATT CCA TCT TTT Rv AAT GTA TTC TCG ACC TAT AGG A	-290 a -179
<b>F18</b>	Fw TCT GAC ACT GAA AGA AAA AGA AGA Rv AAA ATT CGC CCA ACT AAA TCT CGA	-232 a -126
<b>F19</b>	Fw TCC TAT AGG TCG AGA ATA CAT T Rv ACT AAA CGA GTA ACA GGA AAA C	-200 a -101
<b>F20</b>	Fw TCG AGA TTT AGT TGG GCG AAT TTT Rv AGC CAA ATT CCT CTC GAA GCT	-149 a -64
<b>F21</b>	Fw GTT TTC CTG TTA CTC GTT TAG T Rv AGT GTT TGA TGG AAA GCT CTT AAC	-122 a -7
<b>F22</b>	Fw AGC TTC GAG AGG AAT TTG GCT Rv AGT TAA CTC TGA CAG ACA ACA TCT	-84 a +22
<b>F23</b>	Fw GTT AAG AGC TTT CCA TCA AAC ACT Rv AAA GCT GGA GCA TTG ACT CTA	-30 a +71
<b>F24</b>	Fw AGA TGT TGT CTG TCA GAG TTA ACT Rv TAA ACT TGT TAC AGA AGG CAT TGT	-2 a +102



<b>F25</b>	Fw TAG AGT CAA TGC TCC AGC TTT Rv TAA CAT CAT CTA GCG AAA GCT TTG	+50 a +163
------------	--	------------

Tabla 7. Oligonucleótidos para analizar la región promotora en el gen *ALTI* en el promotor del ortólogo en la especie *Lachancea kluyveri*.

Promotor de <i>LkALTI</i>		
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Región amplificada
<b>E1</b>	Fw AAT CAT GAC CCG AGG TCT TAC Rv AAA GTA CAC GCC ATT CAA GCA	-940 a -834
<b>E2</b>	Fw ACC ACA CTC ACT GAG CAA G Rv TAG TGA TAA ACG TCT GGT ACA G	-890 a -789
<b>E3</b>	Fw TGC TTG AAT GGC GTG TAC TTT Rv CAA GAA AGA AGC TGT TAG TGT CA	-854 a -755
<b>E4</b>	Fw CTG TAC CAG ACG TTT ATC ACT A Rv TCT TGA GAA CAC TGG TTG CAC	-810 a -711
<b>E5</b>	Fw TGA CAC TAA CAG CTT CTT TCT TG Rv CTG TCG GTA AGA ACG TTG TAT	-777 a -664
<b>E6</b>	Fw GTG CAA CCA GTG TTC TCA AGA Rv TGG GTT TTC GTA GTT TTT AGT GC	-731 a -630
<b>E7</b>	Fw ATA CAA CGT TCT TAC CGA CAG Rv GTT GTT GTT TTT TCA TTT TTC CAC G	-684 a -593
<b>E8</b>	Fw GCA CTA AAA ACT ACG AAA ACC CA Rv ATG TAT CGC TCG AGC CAG T	-652 a -554
<b>E9</b>	Fw CGT GGA AAA ATG AAA AAA CAA CAA C Rv ACC TCT TTT CTC GGC TGT GT	-617 a -521
<b>E10</b>	Fw ACT GGC TCG AGC GAT ACA T Rv GTA TAT GGG AGA AAG AGA AGC	-572 a -471
<b>E11</b>	Fw ACA CAG CCG AGA AAA GAG GT Rv CTG TAT GAA AGT AGT AGA AGC G	-540 a -438
<b>E12</b>	Fw GCT TCT CTT TCT CCC ATA TAC Rv CTC TAT ACG GCT CGT TCT GTA	-492 a -395

<b>E13</b>	Fw CGC TTC TAC TAC TTT CAT ACA G Rv ACT GCC TTG CCG TTT TTC C	-459 a -361
<b>E14</b>	Fw TAC AGA ACG AGC CGT ATA GAG Rv TGT TCA ATC AGC GAC GGC T	-415 a -312
<b>E15</b>	Fw GGA AAA ACG GCA AGG CAG T Rv CTT CAA AGG GCG CCT ATT GTA	-379 a -280
<b>E16</b>	Fw AGC CGT CGC TGA TTG AAC A Rv TGC CAA GAT TGT ACC AGT AGA A	-330 a -239
<b>E17</b>	Fw TAC AAT AGG CGC CCT TTG AAG Rv GTA CTT GCC GGA CAA AAC CA	-300 a -201
<b>E18</b>	Fw TTC TAC TGG TAC AAT CTT GGC A Rv AAT TGA AAC GAT TTT TGT CGA TGT T	-260 a -173
<b>E19</b>	Fw TGG TTT TGT CCG GCA AGT AC Rv TAA CGG AAA GGA GGA GAA ATC T	-220 a -122
<b>E20</b>	Fw AAC ATC GAC AAA AAT CGT TTC AAT T Rv CCG TGA AAA GGC GTG AAA AAT TT	-197 a -85
<b>E21</b>	Fw AGA TTT CTC CTC CTT TCC GTT A Rv AAC GAA GGG GTG GGA CGT	-143 a -51
<b>E22</b>	Fw AAA TTT TTC ACG CCT TTT CAC GG Rv TGA CGA GAG TTG TTT GCG TGA	-107 a -11
<b>E23</b>	Fw ACG TCC CAC CCC TTC GTT Rv GCA TTC TTA AGC TAG GAG TTC T	-68 a +40
<b>E24</b>	Fw TCA CGC AAA CAA CTC TCG TCA Rv TAG CGA TAT TAC CAG CAG TAG	-31 a +70
<b>E25</b>	Fw AGA ACT CCT AGC TTA AGA ATG C Rv TAT AGG GCA CAA AGT TCG ACG	+19 a +130

En estos casos se hizo una normalización contra un gen que posee un nucleosoma que nunca se reposiciona independientemente de la condición fisiológica, *VCXI*, un gen que codifica para un transportador vacuolar de calcio. Se buscó el ortólogo en *K*.

*lactis* y *L. kluyveri* con el objetivo de localizar la misma región para poder emplear como normalizador. Los oligonucleótidos empleados fueron:

Tabla 8. Oligonucleótidos para el gen *VCX1* normalizador para NuSA.

Gen <i>VCX1</i>	Secuencia 5' a 3'
<i>S. cerevisiae</i>	Fw TGCGTGTGCATCCCTACTGA Rv AAGTGGTCTTCCTTGCCATGA
<i>K. lactis</i>	Fw CGAGCGAGCATTTTGGACCCGTTT Rv TGGAGACAGTAGTACCTGAGATGATC
<i>L. kluyveri</i>	Fw GGTGGGTACAACAGAATCCAACAG Rv GGCACAGGAAATGGCCAACAAGGA

### Inmunoprecipitación de cromatina (ChiP)

El procedimiento para determinar si los factores de transcripción Gcn4, Rtg3, Nrg1 y Gln3 se unen al DNA fue realizado justo como se describe en Hernández y colaboradores en 2011.

Se realizó un entrecruzamiento proteína-DNA en un cultivo celular (MM glucosa-amonio y MM glucosa-alanina) a la DO requerida y después se trataron con glicina al 2.5 M, de este cultivo se realizó un extracto empleando una solución de lisis (0.1% de desoxicolato de sodio, 1% de tritón X-100, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA 50 mM de HEPES/KOH) con un coctel inhibidor de proteasas (*Complete Mini, Roche*). Las células fueron lisadas con perlas de vidrio y centrifugadas para retirar el extracto celular.

Los extractos celulares fueron sonicados a una amplitud de 60% (potencia del sonicador) con tres ciclos de 20 segundos, cada pulso fue de 1 segundo de sonicación por 1 segundo de descanso, esto por 20 segundos. La sonicación se realizó para obtener fragmentos de DNA aproximadamente de entre 200 a 500 pb. Después de esto se inmunoprecipitó toda la noche con un anticuerpo anti-c-Myc (9E11, *Santa Cruz Biotechnology*), pasado el tiempo se lavaron y se resuspendieron en TE/1% SDS y se dejó a 65°C toda la noche para revertir el entrecruzamiento.

Consiguiente a esto, se incubaron las muestras con proteinasa K 2 h y se realizó una extracción fenol/cloroformo/isoamílico 25:24:1, y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Estos DNA fueron amplificados en una Q-PCR con el kit *KAPA SYBR*, *Applied Biosystems*.

Si un FT se une al DNA para modular la expresión de un gen, al realizar el entrecruzamiento con formaldehído se generan uniones covalentes; es decir, el FT queda unido al DNA. Este FT puede ser inmunoprecipitado con un anticuerpo específico dirigido a él o a una etiqueta particular (en este caso c-Myc) y después revirtiendo el entrecruzamiento el DNA inmunoprecipitado se puede amplificar. Si el FT no se une al DNA, éste simplemente no inmunoprecipitaría y no habría amplificación.

### **Coinmunoprecipitación**

La coinmunoprecipitación de Nrg1-Myc con Rtg3-Tap se realizó a partir de una extracción celular en una DO de 0.6 a 600 nm en MM glucosa-amonio. La extracción fue llevada a cabo con amortiguador TEA (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 7.4, 1 mM PMSF, 20 mM de NaN<sub>3</sub> y una tableta de coctel de inhibidor de proteasa “*Complete Mini, Roche*”). Estos extractos fueron incubados toda la noche en amortiguador TNET (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 5 mM EDTA y 1% Tritón X-100) con perlas de proteína A, anticuerpo anti-Myc (diluido 1:2000).

Después del tiempo transcurrido, las perlas fueron lavadas cinco veces con amortiguador TNET y calentadas a 65°C 10 minutos en amortiguador Laemmli. Los sobrenadantes fueron cargados en un gel SDS PAGE (10%) y revelado como ensayo tipo *Western blot* usando un anticuerpo anti-Tap.

# vi. Resultados

## vi.i. Divergencia estructural en la organización cromatínica

Los análisis de cromatina que se realizaron nos muestran la reorganización de los nucleosomas en diferentes regiones del promotor así como las condiciones biológicas en las que se estudiaron las células.

Estos análisis se realizaron para cepas tipo ancestral, es decir; para organismos que no atravesaron por la duplicación de genoma completo, como lo son *K. lactis* y *L. kluyveri*; en condiciones de glucosa-amonio y glucosa-alanina (figura 15 y 16), esto para poder comparar con *S. cerevisiae*. Las gráficas muestran protección por un nucleosoma (pico alto) o una región libre (pico bajo); sobre las gráficas aparece a escala el promotor con las cajas de factores transcripcionales identificados, debajo de las gráficas se esquematiza el promotor con los nucleosomas posicionados.

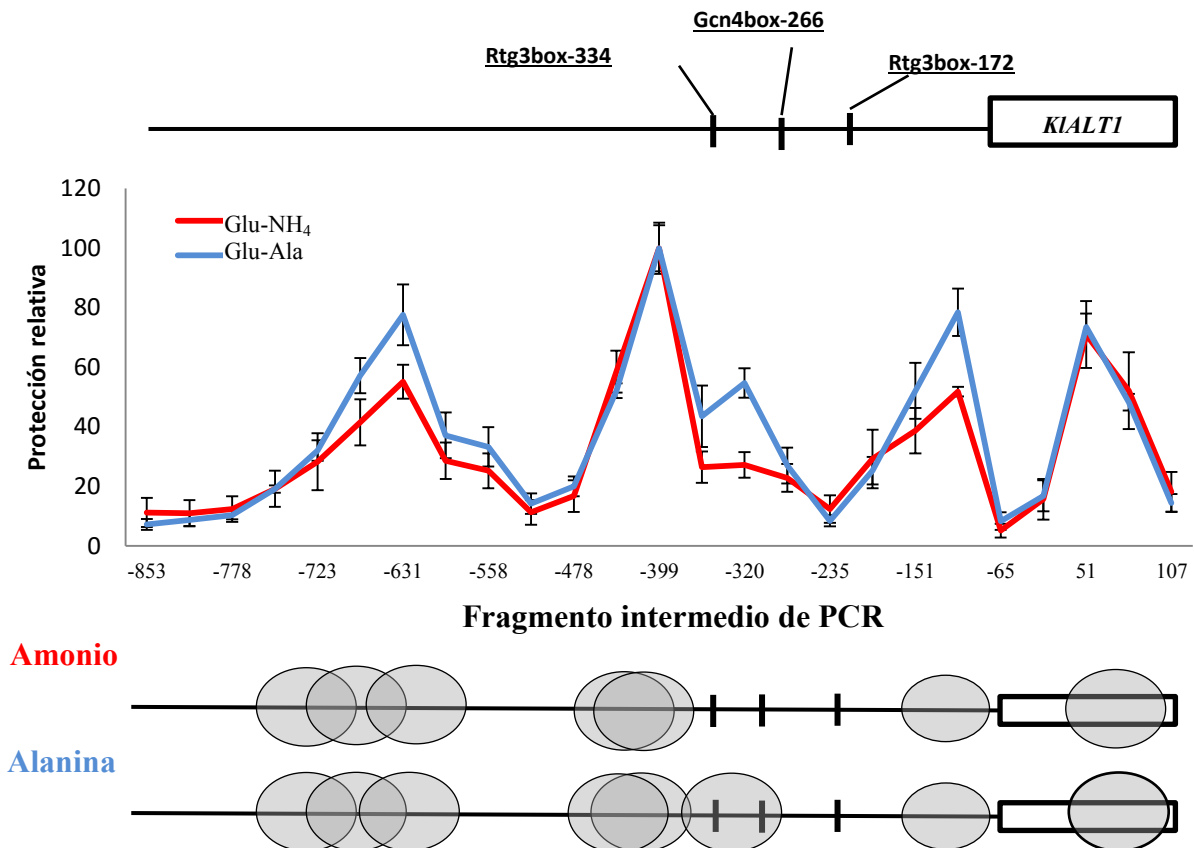


Figura 16. NuSA para la cepa de tipo ancestral *K. lactis* en el gen ortólogo de *ALT1* y *ALT2* en ambas condiciones glucosa alanina y glucosa amonio.

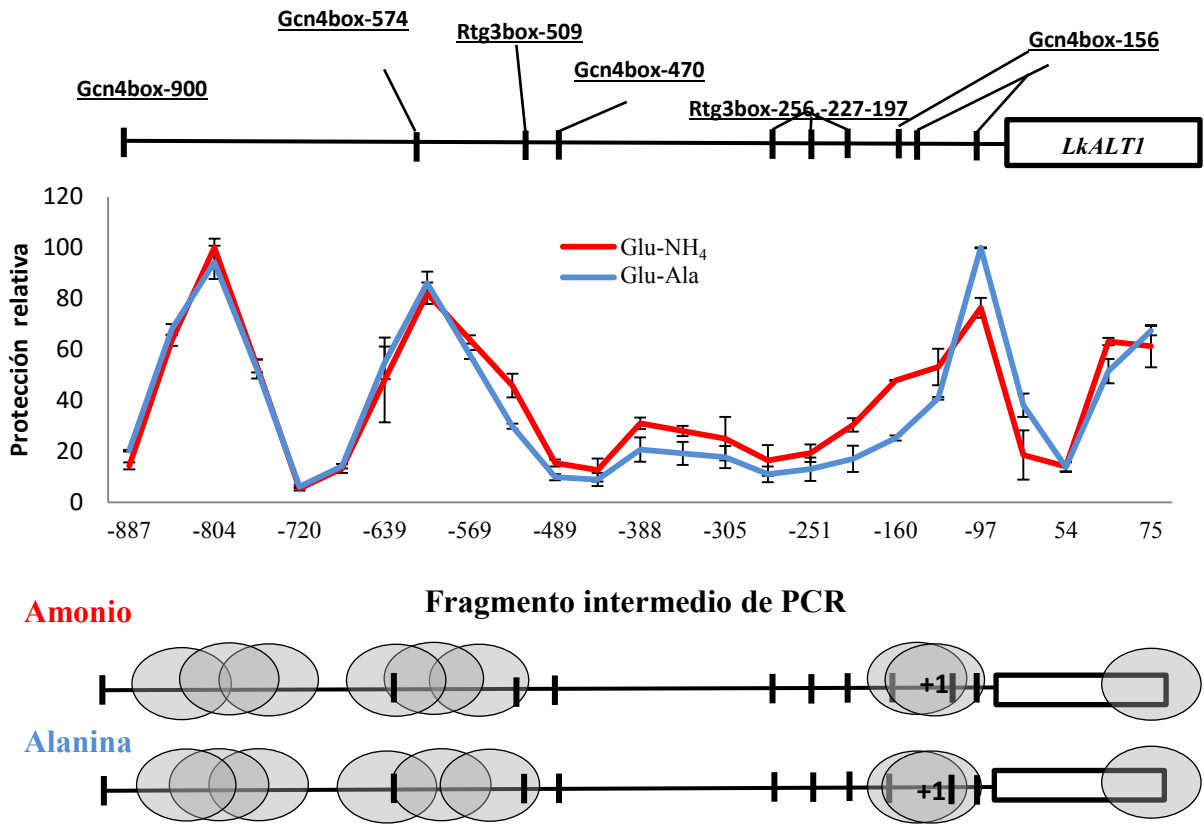


Figura 17. NuSA para la cepa de tipo ancestral *Lachancea kluyveri* en el gen ortólogo de *ALT1* y *ALT2* en ambas condiciones glucosa alanina y glucosa amonio.

Cabe resaltar que en algunas gráficas los picos de protección abarcan más 147 pb, esto es por que los nucleosomas son dinámicos y se están moviendo constantemente; como en esta técnica se usa una cantidad  $n$  de células, en algunas un nucleosoma se encuentra ligeramente desplazado hacia un lado y en algunas otras células hacia el otro lado, pero siempre sobre la misma región, debido a esto es que en los esquemas (debajo de las gráficas) se colocan varios nucleosomas por este movimiento constante que tienen los nucleosomas.

Con el objetivo de analizar posibles cambios en la cromatina del promotor entre diferentes condiciones fisiológicas, determinar si ocurre algún tipo de divergencia estructural en la cromatina y si ocurre la exposición o encubrimiento de cajas que regulen la expresión de los genes de *S. cerevisiae* se realizaron los NuSA para los genes parálogos que se estudian en el presente trabajo, *ALT1* y *ALT2*, en ambas condiciones; glucosa amonio y glucosa alanina (figuras 17 y 18)

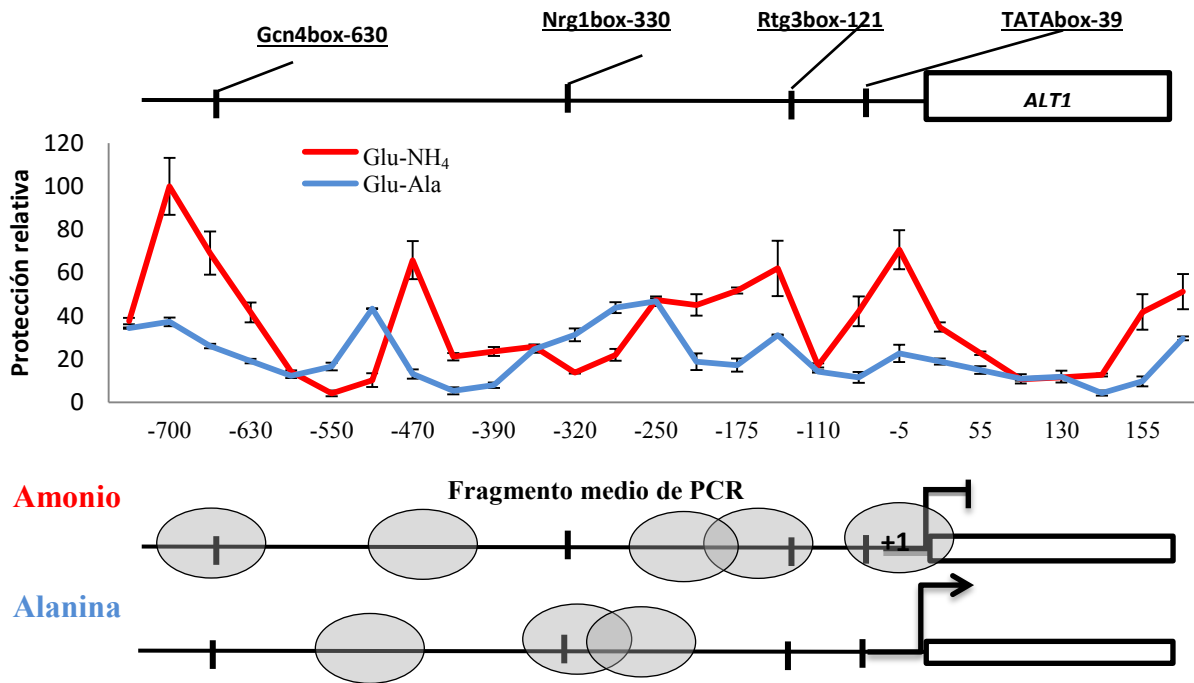


Figura 18. NuSA para el gen *ALT1* en ambas condiciones glucosa alanina y glucosa amonio.

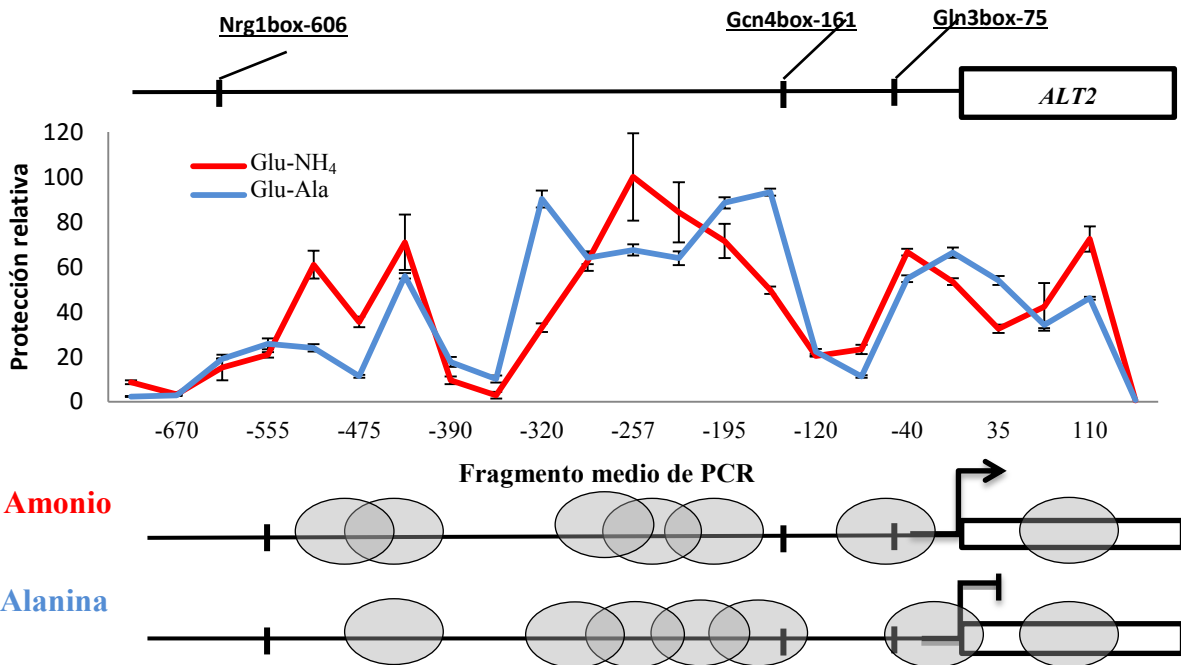


Figura 19. NuSA para el gen *ALT2* en ambas condiciones glucosa alanina y glucosa amonio.

Los estudios de cromatina mostraron que hay cajas de reguladores transcripcionales que se cubren y se protegen dependiendo de la organización de la cromatina en la

condición biológica que se estudie al gen, por ello se decidió realizar análisis de expresión para determinar si esos reguladores transcripcionales realmente regulan a los genes que se estudian en este trabajo.

Para hacer los *Northern blot*, se decidió realizar cinéticas de expresión, es decir, observar la expresión de los genes *ALT1* y *ALT2* en amonio y alanina a lo largo del crecimiento en la ausencia de diferentes factores transcripcionales, por ello es imperante conocer la forma de crecimiento (fenotipo) de las cepas a las que se les realizarán estas cinéticas de expresión.

### vi.ii. Velocidades de crecimiento

La caracterización fenotípica se realizó para la cepa silvestres y para mutantes en reguladores de la transcripción que están implicados en el metabolismo de fuentes de nitrógeno (figura 19).

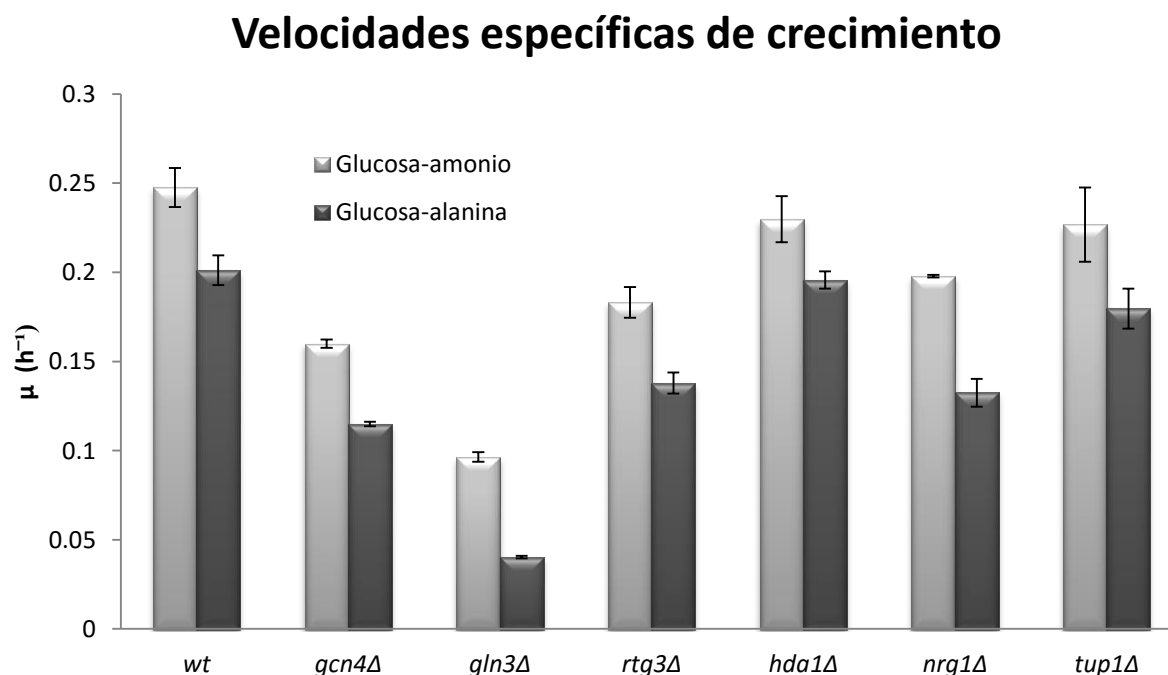


Figura 20. Velocidades específicas de crecimiento. Gráfica de las cepas empleadas y su fenotipo en glucosa-amonio y glucosa-alanina.  $\mu$  es la constante de la velocidad de crecimiento y es un parámetro de la afinidad de las células por determinado sustrato.



Se observa de acuerdo a la velocidad específica de crecimiento que la alanina es una fuente secundaria de nitrógeno comparada con el amonio. La obtención de las velocidades de crecimiento permitieron conocer el tiempo necesario para que los cultivos alcanzaran determinados puntos de la curva de crecimiento equivalentes a las densidades ópticas de 0.3, 0.6 y 0.9, puntos donde se realizaron los análisis de expresión tipo *Northern blot*, éstos llevados a cabo en dos condiciones: glucosa-amonio y glucosa-alanina. Estos análisis de expresión permitieron analizar como la falta de estos reguladores transcripcionales afectaba la expresión tanto de *ALT1* como de *ALT2*.

### vi.iii Divergencia regulatoria mediada por factores de transcripción

Se determinó la expresión de la mutante *gcn4Δ* comparando con una cepa silvestre durante la fase exponencial, es decir, se realizaron cinéticas de expresión tomando tres puntos de la curva de crecimiento equivalentes a las densidades ópticas de 0.3, 0.6 y 0.9 para observar si este regulador transcripcional afectaba de alguna manera la expresión de los genes parálogos.

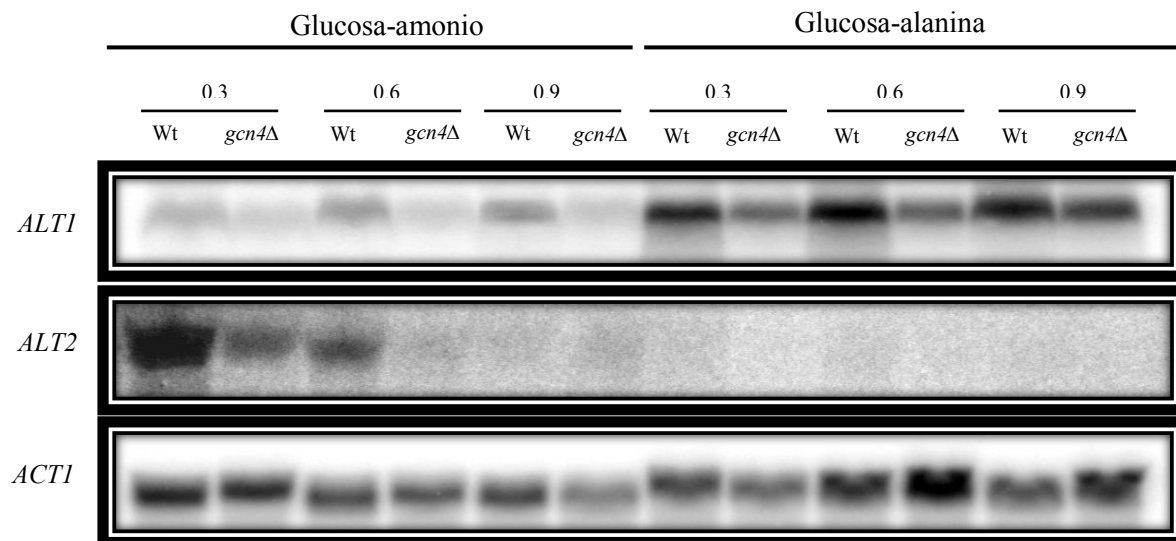


Figura 21. *Northern blot* para una mutante *gcn4Δ* y una cepa silvestre, en dos condiciones glucosa-amonio y glucosa-alanina para tres puntos de la fase exponencial.

El análisis de expresión para la mutante *gcn4Δ* (figura 20) muestra que *ALT1* es regulado de manera basal en su expresión: en glucosa-amonio la expresión de *ALT1* disminuye al faltar Gcn4 pero para el caso de glucosa-alanina se puede observar que la expresión en una *gcn4Δ* disminuye pero sigue habiendo una ligera expresión de *ALT1*, lo que parece indicar que en presencia de alanina Gcn4 no participa en la inducción de la expresión de *ALT1*. Para el caso particular de *ALT2* se puede observar en la cepa silvestre que éste sólo se expresa únicamente en glucosa-amonio y al principio del crecimiento; que corresponde a la densidad óptica de 0.3; sin embargo, en ese mismo punto en ausencia de Gcn4 se observa una disminución en la expresión de *ALT2*. En el siguiente punto del crecimiento, que equivale a 0.6 de densidad óptica, en la cepa silvestre se observa menor expresión pero en la mutante *gcn4Δ* no hay expresión. Y en condiciones de glucosa-alanina la expresión de *ALT2* está completamente abatida.

El siguiente análisis de expresión realizado fue para una mutante *rtg3Δ* (figura 21). Para el gen *ALT1*, aparentemente, Rtg3 no funciona como un regulador en glucosa-amonio ni en glucosa-alanina, salvo en el punto que corresponde a la densidad óptica de 0.9 que parece que a la falta de este regulador, la expresión de *ALT1* incrementa tanto en glucosa-amonio como en glucosa alanina. En el caso de *ALT2* el efecto resultante de la falta de Rtg3 es muy claro: en ambas condiciones genera desrepresión.

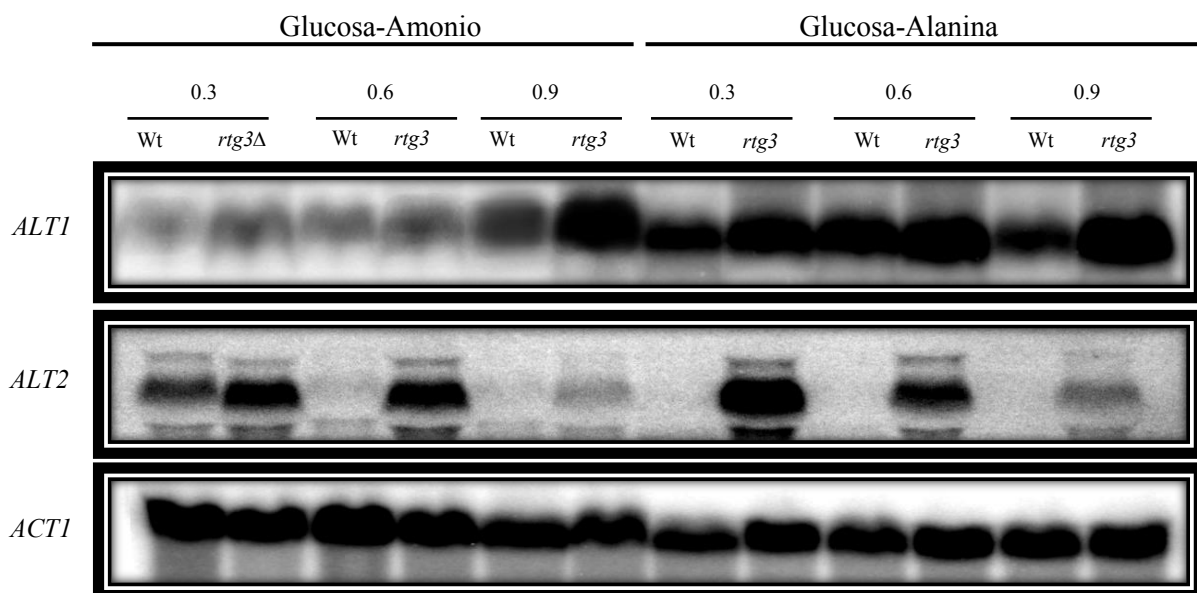


Figura 22. Northern blot para una mutante *rtg3Δ*.

El análisis de expresión para una mutante *gln3Δ* (figura 22) muestra cómo afecta la falta de Gln3 a la expresión de *ALT1*. En este caso particular la figura está ordenada de forma distinta: primero se muestran todos los puntos en glucosa-amonio para la cepa silvestre y para la mutante, después en glucosa-alanina para la cepa silvestre y para la mutante (sólo dos puntos de crecimiento), se presenta de esta manera porque la mutante *gln3Δ* no alcanza los mismos puntos de crecimiento en glucosa-alanina que la cepa silvestre. En esta figura se observa que en glucosa-amonio la ausencia del regulador no afecta la expresión del gen, en cambio en glucosa-alanina pareciera que la delección de *GLN3* disminuye la expresión de *ALT1*. Es importante mencionar que el control de carga (*ACT1*) muestra que no se cargó la misma cantidad, por ende no se puede concluir una disminución real en la expresión de *ALT1*. *ALT2*, por otro lado, en condiciones de amonio se desreprime pero no sucede lo mismo en condiciones de alanina. Para tener claro el efecto de Gln3 sobre la expresión de los genes que estudiamos se decidió realizar un segundo experimento.

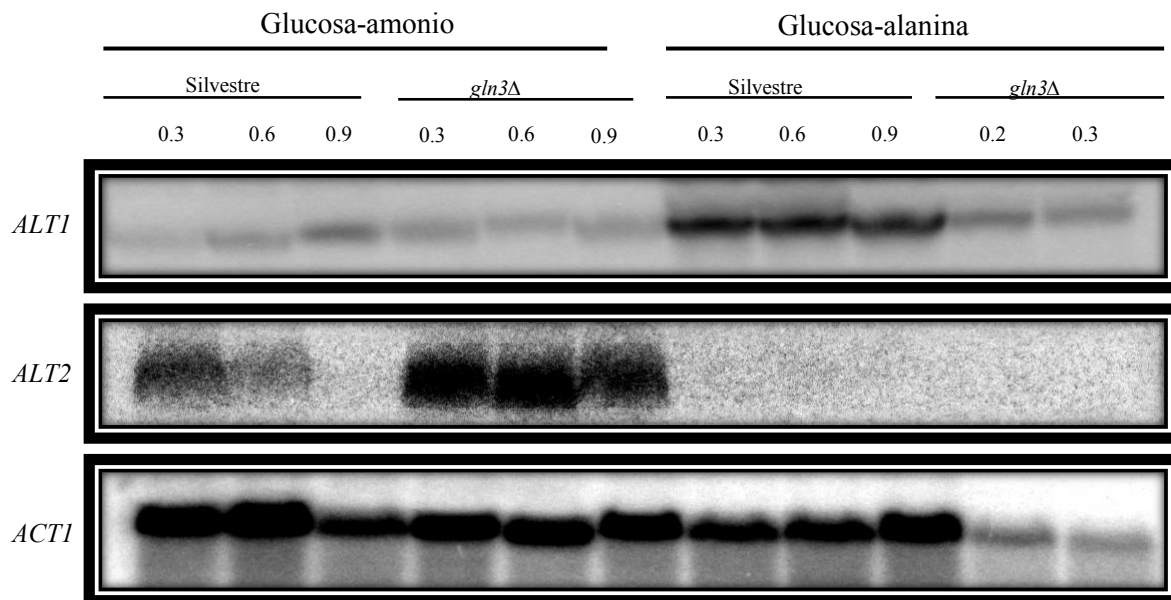


Figura 23. Northern blot para una mutante *gln3Δ*.

Para comprobar si realmente Gln3 es un activador y un represor para *ALT1* y *ALT2*, respectivamente, algo que se sugiere del experimento anterior, pero dado que la actina no hay homogeneidad en el cargado y que la cepa tiene un crecimiento lento (figura 19), lo cual aumenta la degradación del RNA se decidió llevar a cabo un experimento en amonio con choque de alanina.

El experimento fue de la manera siguiente: un cultivo con células cultivadas en glucosa-amonio se dejó crecer hasta la densidad óptica de 0.3; en ese momento se extrajo RNA de una porción del medio y el resto se dividió en dos partes, una de ellas se dejó crecer sin agregar nada pero la otra parte del medio se le agregó alanina (choque de alanina) y después de esto se extrajo RNA de ambas partes en los puntos de crecimiento que corresponden a las densidades ópticas de 0.6 y 0.9. Este experimento se realizó tanto para la mutante *gln3Δ* como para la cepa silvestre, la cual es el control. En la figura 23 se puede observar el resultado de este experimento, y se observa que para el caso de *ALT1* no hay efecto en la expresión a pesar de la falta de Gln3, sin embargo, para el caso de *ALT2* cuando crece en amonio y no hay Gln3, hay inducción en la expresión de *ALT2*, pero en el momento de que se agrega la alanina se reprime.

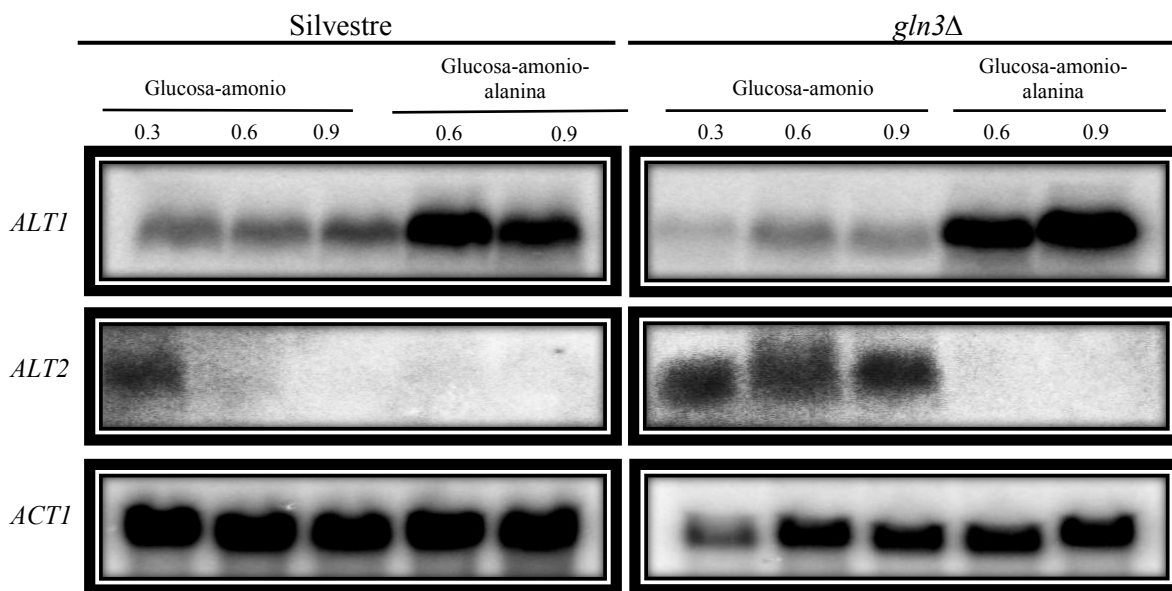


Figura 24. Northern blot para cepa silvestre y para la mutante *gln3Δ* con choque de alanina.

El siguiente Northern blot que se analizó fue el de una mutante *nrg1Δ* (figura 24). Se puede observar que en el caso de *ALT1* la ausencia de este regulador genera una inducción en la expresión en glucosa-amonio cuando *ALT1* no se expresa prioritariamente en esta condición; pero en glucosa-alanina, la cual es la condición principal donde se expresa *ALT1*, éste se expresa ligeramente más cuando no está Nrg1. En el caso de *ALT2* observamos que tanto en glucosa-amonio como en glucosa-alanina se desreprime en ausencia de Nrg1.

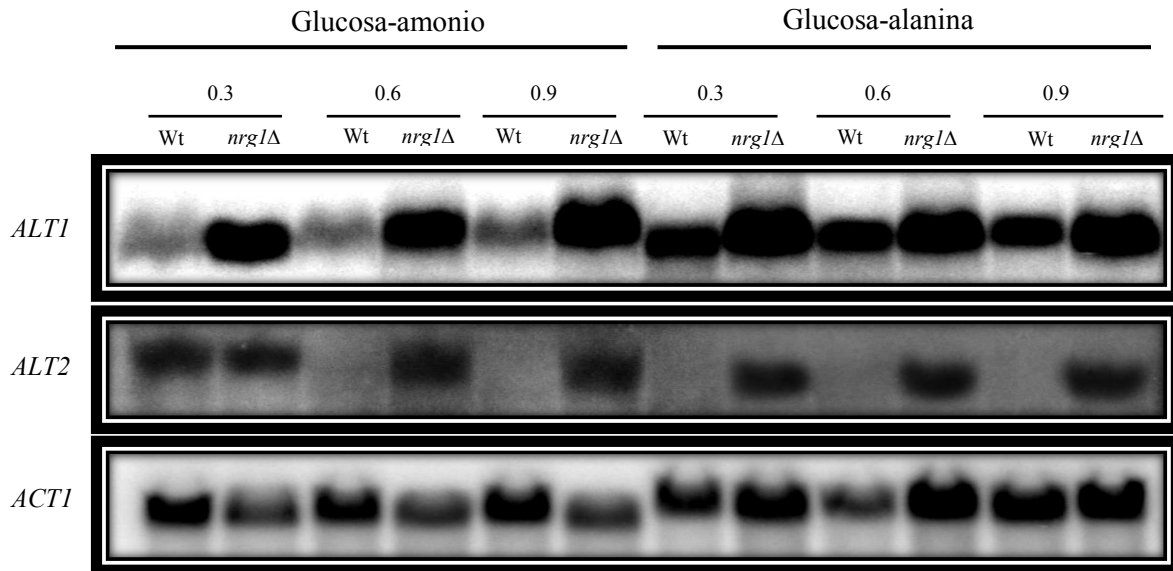


Figura 25. Northern blot para una mutante *nrg1Δ*.

En la figura 25 se puede observar el análisis de expresión realizado para una mutante *hda1Δ*. En este experimento se observa que para el caso de *ALT1* la delección de *HDA1* genera una inducción en la expresión y esta desrepresión es más evidente en glucosa-amonio, donde *ALT1* no se expresa principalmente, aunque, en las condiciones de glucosa-alanina se puede observar que aumenta la expresión en ausencia de Hda1. En el caso de *ALT2* se muestra que ocurre algo muy parecido a lo observado en una mutante *nrg1Δ*; que en ausencia de Hda1 se genera desrepresión del gen independientemente de la condición.

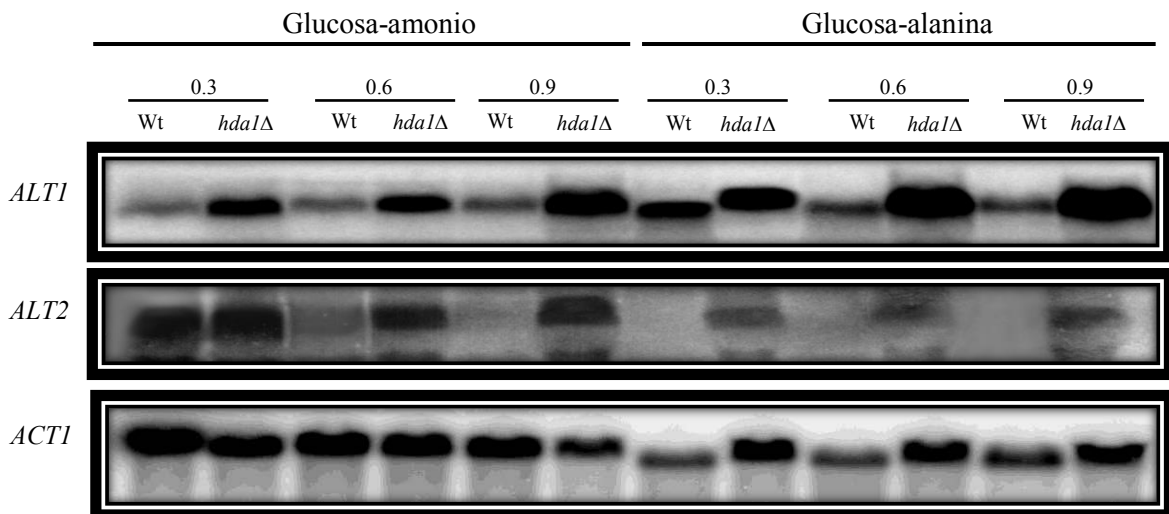


Figura 26. Northern blot para una mutante *hda1Δ*.

Posteriormente, se lleva a cabo el análisis de expresión en la mutante *tup1Δ* (figura 26). En ausencia de Tup1 la expresión de *ALT1* no se ve afectada en ninguna de las dos condiciones, ya sea glucosa-amonio o glucosa-alanina. Sin embargo, para *ALT2* es diferente, ya que se puede observar que sucede lo mismo que con las mutantes *rtg3Δ*, *nrg1Δ* y *hda1Δ*: la ausencia de la proteína Tup1 ocasiona que *ALT2* se exprese independiente de la condición.

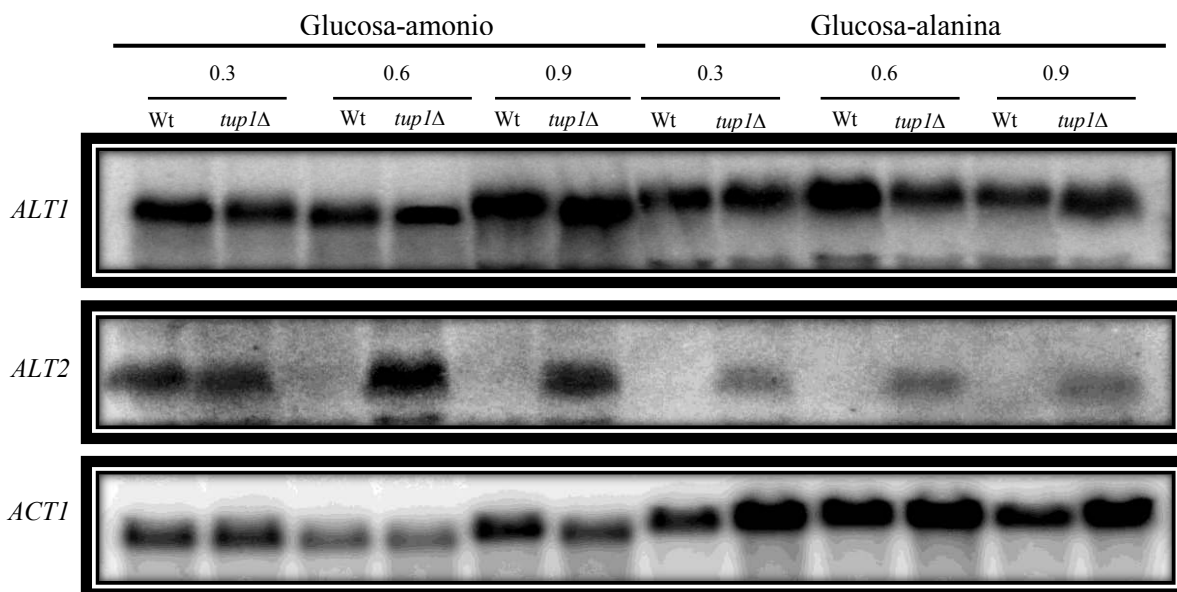


Figura 27. Northern blot para una mutante *tup1Δ*.

Todos estos resultados han permitido identificar tanto reguladores negativos como positivos para cada uno de los genes. A manera de resumen los datos anteriores se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Efecto de los reguladores analizados y su efecto sobre los genes parálogos *ALT1* y *ALT2*.

Regulador	Efecto	
	<i>ALT1</i>	<i>ALT2</i>
<b>Gcn4</b>	Positivo	Positivo
<b>Rtg3</b>	Negativo	Negativo
<b>Gln3</b>	Sin efecto	Negativo
<b>Nrg1</b>	Negativo	Negativo
<b>Hda1</b>	Negativo	Negativo
<b>Tup1</b>	Sin efecto	Negativo

Para el caso particular de *ALT2* la mayoría de los factores que se estudiaron son reguladores negativos, ya que la ausencia de uno de ellos es suficiente para inducir transcripcionalmente al gen *ALT2*; es decir, si se elimina el regulador Rtg3 *ALT2* se expresa, si Nrg1 no está también *ALT2* se induce y ocurre lo mismo si se elimina a Gln3. Si los tres reguladores actuaran de forma independiente, jamás se vería este fenómeno porque si uno se elimina estarían los otros 2 reprimiendo; esto sería si actuaran independientemente, pero se observa que el remover a uno de ellos genera desrepresión, por ello se propone que éstos forman un complejo.

#### vi.iv Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

En la Tabla 9 se observa a manera de resumen el efecto de los distintos reguladores sobre la expresión de los genes de *ALT1* y *ALT2*. Pero este efecto que se observa puede ser provocado de formas distintas: ya sea por un efecto directo, es decir, que el factor de transcripción se una realmente a una secuencia *cis* en el promotor, o que el efecto sea indirecto, esto es que el regulador module la expresión de otro factor de transcripción y que éste sea el que tenga el efecto sobre la expresión. Por lo anterior se decidió realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, con el fin de determinar si estos factores de transcripción se unen o no al promotor.

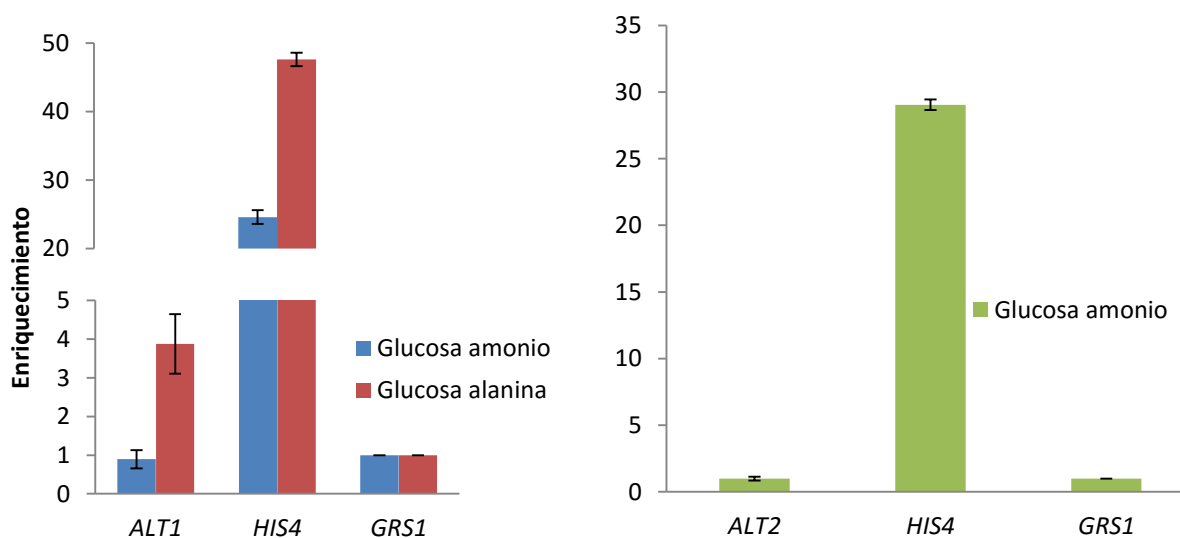


Figura 28. ChIP para observar la unión de Gen4. ChIP para *ALT1* en condiciones de amonio y alanina, panel de la izquierda, para *ALT2* panel de la derecha. *HIS4* como control positivo y *GRS1* como negativo.

En la figura 27 observamos el ChIP para Gcn4 tanto para *ALT1* y *ALT2*, para el caso de *ALT1* el ChIP se realizó en ambas condiciones tanto amonio como alanina porque Gcn4 regula a *ALT1* tanto en glucosa-amonio como en glucosa-alanina, para *ALT2* sólo se realizó el ChIP para la condición de glucosa-amonio puesto que de acuerdo al análisis de expresión tipo *Northern blot* no observamos efecto alguno para una mutante en *GCN4*.

En la siguiente figura se observa la unión de Rtg3 sobre el promotor tanto de *ALT1* como de *ALT2*. En este experimento Rtg3 se une principalmente a *ALT1* independientemente de la condición, tal vez esta unión es la que produce el efecto en *ALT1* observado en el análisis de expresión (figura 28). Para el caso de *ALT2* vemos que también Rtg3 se une no tanto como la unión que vemos en *ALT1* pero hay unión.

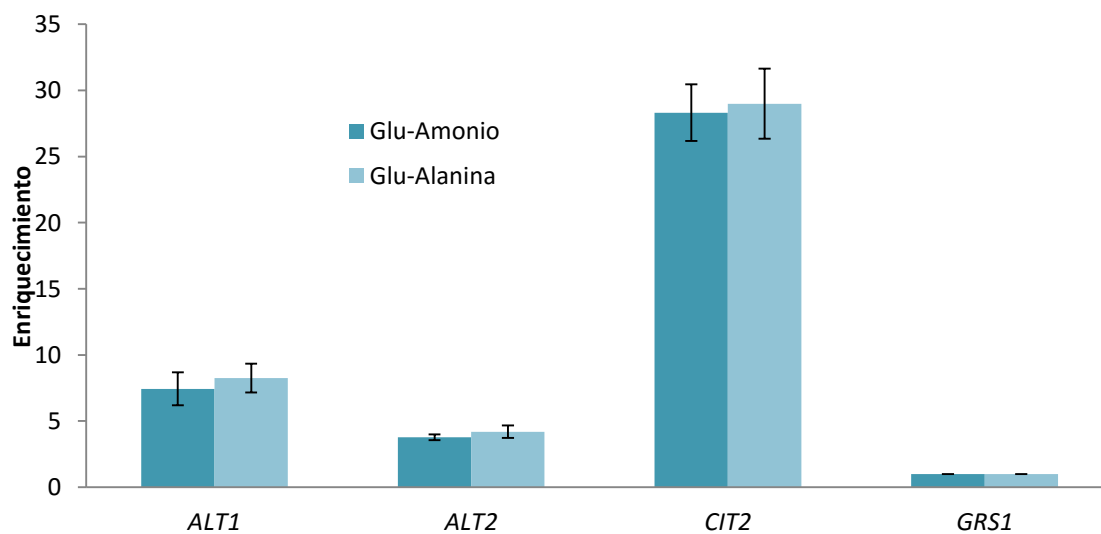


Figura 29. ChIP para observar la unión de Rtg3 a los promotores de *ALT1* y *ALT2* tanto en glucosa-amonio como en glucosa-alanina.

El siguiente experimento (figura 30) demuestra la unión de Nrg1 sobre los promotores de estos genes parálogos, de igual forma en ambas condiciones: glucosa-amonio y glucosa-alanina. Aquí se puede observar que tanto para *ALT1* como para *ALT2* la unión sobre el promotor de este regulador es mayor en alanina, pero también hay unión en amonio, esto concuerda con la expresión que se observa en la figura 17: Nrg1 regula negativamente a los dos genes y lo hace de manera directa.



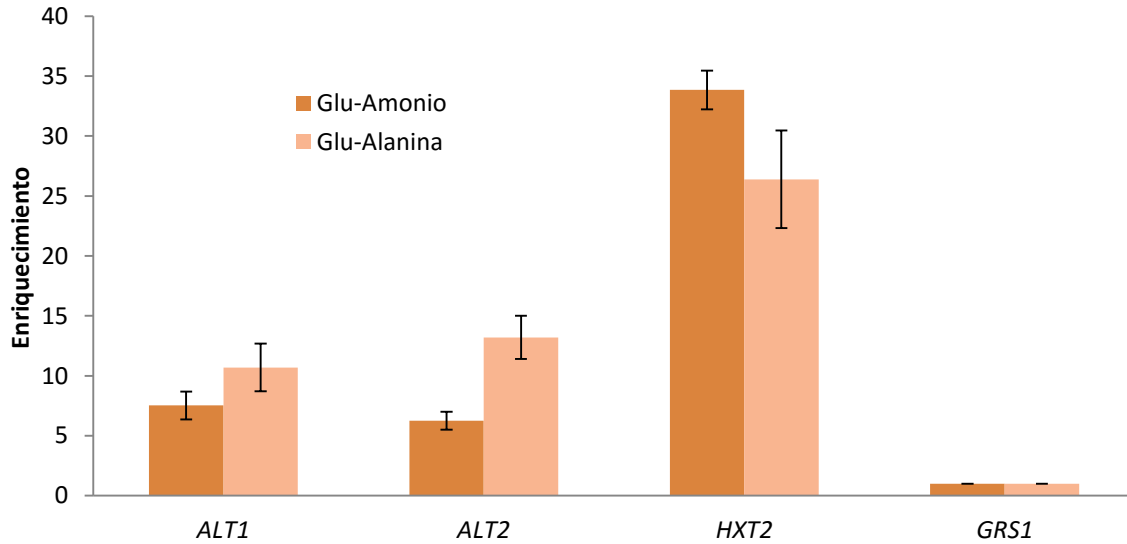


Figura 30. ChIP para observar la unión de Nrg1 en los promotores de *ALT1* y *ALT2* tanto en glucosa amonio como en glucosa alanina.

Finalmente se realizó el experimento de ChIP para determinar si Gln3 en realidad se une a los promotores de *ALT1* y *ALT2* (figura 31) en las condiciones de glucosa-amonio y glucosa-alanina. El resultado demuestra que Gln3 no se une al promotor de ninguno de los dos genes en ninguna condición. Sin embargo, al menos para el caso de *ALT2*, Gln3 regula de manera negativa a este gen, por lo tanto, de acuerdo con este resultado lo debe de hacer de forma indirecta.

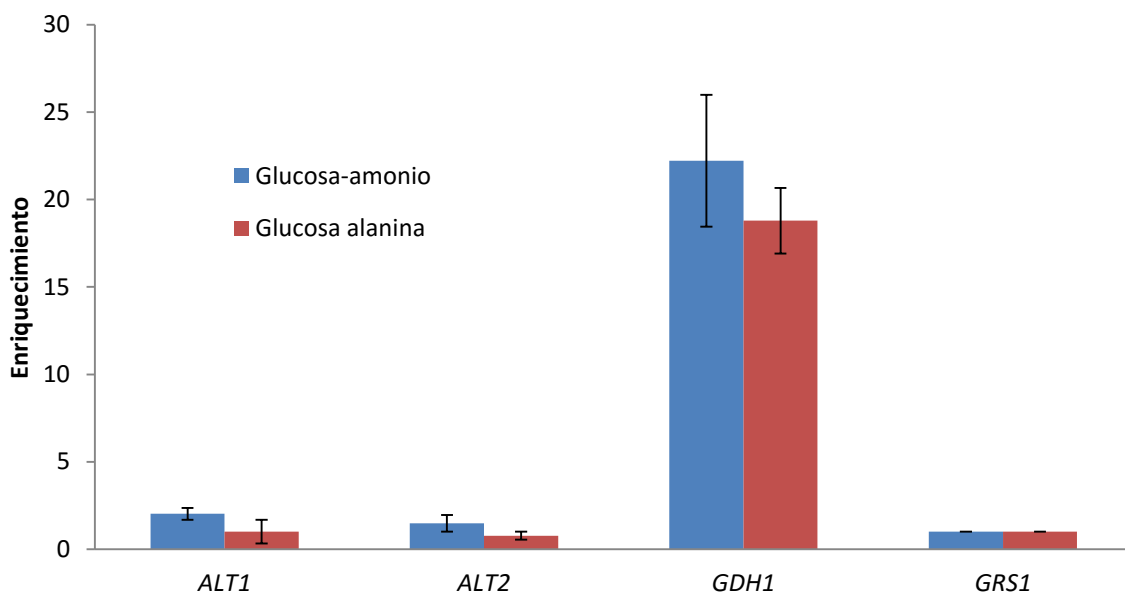


Figura 31. ChIP para observar la unión de Gln3 en los promotores de *ALT1* y *ALT2* tanto en glucosa amonio como en glucosa alanina.

## vi.v Interacción entre los reguladores Rtg3 y Nrg1

Como ya se mencionó anteriormente, de acuerdo a los datos se sugiere una interacción entre proteínas (Nrg1-Gln3-Rtg3) que reprimirían a *ALT2*. Para comprobar esta hipótesis se realizó una coimmunoprecipitación para analizar si Rtg3 y Nrg1 interactúan (Figura 31).

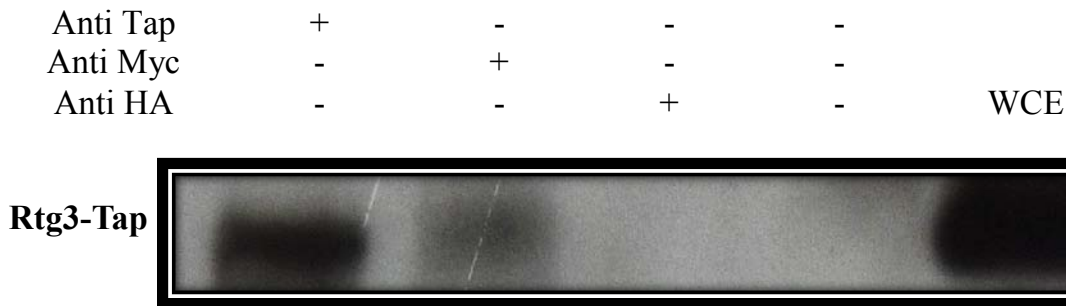


Figura 32. Coimmunoprecipitación para una cepa doblemente etiquetada Rtg3-Tap y Nrg1-Myc. Toda la membrana es revelada contra Tap. En el primer carril se inmunoprecipita con anti-Tap (control positivo), en el segundo carril se inmunoprecipita con anti-Myc (muestra experimental), en el tercer carril se inmunoprecipita con un anticuerpo no relacionado, en este caso anti-HA, el cuarto carril se inmunoprecipita anticuerpo y en el último carril es un extracto total celular, una muestra que no fue coimmunoprecipitada, que sirve como control estándar.

La coimmunoprecipitación demuestra que hay una interacción entre dos proteínas Rtg3-tap y Nrg1, que de acuerdo a los análisis de expresión regulan al promotor de *ALT2*. En los carriles de izquierda a derecha, en el primero se inmunoprecipitó a Rtg3 que está etiquetada con Tap, por lo tanto ese es el control positivo; en el segundo se inmunoprecipitó a Nrg1 con anti-Myc, éste es la muestra experimental. En todo momento se está observando a Rtg3 porque se reveló con anti-Tap; sólo que en el carril dos se “atrapa” a Rtg3 a través de Nrg1 que es la que está etiquetada con Myc. En el carril tres se empleó un anticuerpo no relacionado, lo cual indica que lo que se observa en la inmunoprecipitación es específico de los anticuerpos Tap y Myc. En el carril cuatro no hay anticuerpo, por lo tanto demuestra que lo que se observa en la muestra control y la muestra experimental no se debe a la inmunoprecipitación por la proteína A presente en las perlas. Y finalmente en el carril cinco se observa un extracto celular que no recibió tratamiento experimental y sirve como estándar.

## vii. Discusión

La regulación, tema principal de este trabajo, ha demostrado ser bastante compleja. La regulación genética cuenta con elementos que aditivamente terminan siendo un complicado sistema para responder al medio ambiente, este complejo sistema de regulación que no sólo le permite responder a lo que hay en el exterior de la célula, sino que también evoluciona y se “reconfigura”.

Como se observa en las primeras imágenes de los resultados (figuras 15 y 16) los organismos tipo-ancestral *K. lactis* y *L. kluyveri* presentan una organización estructural en la cromatina muy similar en condiciones de amonio y alanina. Los resultados del reposicionamiento de nucleosomas realizados para los genes ortólogos en dichas especies apuntan a que la organización de la cromatina no jugaría un papel importante en la expresión de estos genes en estos organismos, puesto que es muy similar entre las condiciones estudiadas, y los cambios observados son realmente mínimos. Se ha discutido anteriormente que a pesar de que hay cambios mínimos en la cromatina, como se observa en este caso entre una condición y otra, no necesariamente tiene una repercusión en la expresión de los genes; muchas veces estos ligeros cambios observados se deben a las condiciones inherentes de la cromatina al ser una estructura dinámica; esos ligeros cambios en la cromatina se les ha denominado “*chromatin breathing*” (Hinde *et al.* 2012).

Sin embargo, después de que ocurre la duplicación de genoma completo y surgen los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* en *S. cerevisiae*, se reorganiza la cromatina en condiciones fisiológicas diferentes; algo que no ocurre en los ortólogos. Estos rearrreglos en la cromatina que pueden ocurrir después de una divergencia evolutiva pueden traer consigo cambios no sólo estructurales sino también en la dinámica de la misma cromatina, y por extensión, una divergencia en la regulación a nivel de la expresión de los genes ya sea por ganancia y/o pérdida de nuevas cajas de unión a factores de transcripción, como se ha reportado anteriormente (Tirosh *et al.* 2009; Degner *et al.* 2012).

Las figuras de los reposicionamientos de los nucleosomas para los genes parálogos en *S. cerevisiae* (figuras 18 y 19) muestran una clara divergencia a nivel estructural en la cromatina y además en la dinámica que ocurre sobre los promotores de estos genes cuando hay un cambio en la condición biológica en la que se encuentra la célula, esto lleva consecuentemente a la regulación opuesta que se ha observado en

los genes *ALT1* y *ALT2*, como se revisó al principio de este trabajo; mientras un gen está expresándose el otro se encuentra reprimido y viceversa (Peñalosa *et al.* 2012).

Mucho se ha revisado sobre la importancia de lo cromatina sobre la expresión de los genes, ya que ésta es una arquitectura para impedir o facilitar el acceso a las maquinarias transcripcionales o a los represores para impedir su transcripción (Jiang & Pugh 2009, Tsankov *et al.* 2010). Y es precisamente lo que se observa en los análisis de reposicionamiento de nucleosomas para estos genes, *ALT1* es un gen que se induce en alanina, pero se reprime en condiciones de amonio o de baja concentración de alanina (figura 18); se observa que en amonio hay dos nucleosomas posicionados sobre la caja de Gcn4 de esta forma se impide la unión al DNA y no se induciría su expresión; pero en alanina, dónde este gen se ha visto que tiene su mayor expresión, la caja de Gcn4 se descubre y no hay nucleosomas que impidan que éste se pegue sobre su caja para inducir la expresión de *ALT1*, también es muy claro que en alanina no hay un nucleosoma +1 sobre la caja TATA; este nucleosoma se sabe con exactitud que se escinde de la cromatina para permitir el posicionamiento de la RNA polimerasa II y toda la demás maquinaria de la transcripción (Weiner *et al.* 2009). Este nucleosoma sí se observa presente en amonio donde *ALT1* no se expresa, por ende; cuando se remueve este nucleosoma se permite la transcripción de *ALT1*.

Para el caso de *ALT2* no se puede definir con exactitud un nucleosoma +1, pero hay importantes regiones que juegan un rol principal en su regulación, como es la caja de Nrg1 que permanece descubierta en ambas condiciones. Como se ha descrito ya, Nrg1 es un represor, por lo tanto que el sitio de unión de Nrg1 esté descubierta en *ALT2* parece indicar que este factor lo reprime en ambas condiciones (que es lo que sucede). Otro punto importante sobre la organización de la cromatina en el promotor de este parólogo es que la caja de Gcn4 se cubre en alanina, condición donde este gen se reprime, y se descubre en amonio condición en la que se induce su expresión. De acuerdo a estos datos, Gcn4 pudiese ser el responsable de la inducción de *ALT2* que se observa en amonio. Con estos datos del encubrimiento y descubrimiento de las cajas de los genes se observa una divergencia a nivel de la expresión y de la unión de los reguladores que participan en esta misma. Los estudios de expresión que se realizaron permitieron corroborar si en efecto los reguladores que se predicen regulan verdaderamente la expresión de *ALT1* y *ALT2*.

La regulación de estos genes parólogos que es completamente opuesta, es el resultado de la participación de factores de trascrición que tienen el efecto de inducir o reprimir la expresión.

En la figura 20 donde se realizó un análisis de expresión para una mutante *gcn4Δ*, donde se observa que Gcn4 es un inductor basal de *ALT1* puesto que aun en su ausencia sigue existiendo una expresión mínima de este gen, incluso en ambas condiciones. En alanina que es la condición biológica donde se induce la expresión decrece en ausencia de Gcn4 pero no en su totalidad, por lo tanto se concluye que debe haber un inductor principal en esta condición. Para el caso particular de *ALT2* se puede observar en la cepa silvestre que éste solo se expresa principalmente en glucosa-amonio y al principio del crecimiento, que es en la densidad óptica equivalente a 0.3; sin embargo, se observa que en ausencia de Gcn4 en esa misma densidad óptica, es claro, la disminución en la expresión de *ALT2*. En el punto de crecimiento que corresponde a 0.6 de densidad óptica en la cepa silvestre se observa menor expresión pero en la mutante *gcn4Δ* no hay expresión. Y en condiciones de glucosa-alanina la expresión de *ALT2* está completamente abatida.

Por lo tanto con estos datos, aunado a la organización de la cromatina, donde, como ya se describió, es en amonio donde la caja de Gcn4 se descubre pero se cubre en alanina para impedir la unión de este factor de transcripción lo cual pareciera indicar que es Gcn4 aquel que induce la expresión de *ALT2* en amonio, empero; la figura 27 que es la inmunoprecipitación de la cromatina con este factor de transcripción se denota que Gcn4 no se une al promotor de *ALT2* por lo tanto la regulación de Gcn4 debe ser indirecta, modulando al regulador que induzca la expresión en glucosa amonio, lo cual no es algo novedoso puesto que ya se ha reportado que Gcn4 puede controlar la expresión de otros reguladores (Hinnebusch & Natarajan 2002). Analizando el mismo ChIP para el promotor de *ALT1* donde se evidencia que sí hay una unión sólo en alanina, más no en amonio, recordando que sólo en alanina este gen tiene su máxima inducción, esto concuerda con el dato de NuSA que como ya se revisó, es en alanina donde se descubre la caja de Gcn4, mientras que en amonio permanece protegida por los nucleosomas.

Por otra parte, la regulación mediada por Rtg3 (figura 21) muestra que no hay un efecto sobre la expresión de *ALT1* cuando se deleta a *RTG3*, excepto en la fase diáxica que es al final de la fase exponencial, donde observamos una desrepresión de *ALT1* incluso en alanina, pesar de que es esta condición en la que se induce este gen. La inmunoprecipitación de cromatina para Rtg3 (figura 28) muestra que hay una unión de este regulador sobre *ALT1*, sin embargo, la razón del por qué pueda ocurrir esto necesitaría ser investigada, puesto que Rtg3 está funcionando como un represor para *ALT1* sólo en la fase terminal del crecimiento exponencial, nada ha sido reportado sobre esto. Lo que sí se ha reportado es que Rtg3 puede tener un efecto

negativo en *ALT2* (Reimand *et al.* 2010) y es de hecho lo que se observa en el análisis de expresión para una mutante en *RTG3*. Cuando no hay Rtg3 ocurre una desrepresión, lo interesante es que ocurre en ambas condiciones, tanto en amonio como alanina. Al realizar la inmunoprecipitación sobre el promotor de *ALT2* la unión sobre el promotor es muy poca, incluso es menor que la que se observa sobre el promotor de *ALT1*. Particularmente, Rtg3 siempre ha sido reportado como un activador como se revisó en la introducción de este trabajo.

Un dato importante a señalar es que sobre el promotor de *ALT2* no se predice ninguna región de unión donde se pueda unir Rtg3, a pesar de que se observa una ligera unión en el promotor. Cabe mencionar que tal vez no se predice a través de las herramientas bioinformáticas una caja de unión canónica porque ésta puede ser una caja no conservada ni consenso donde se esté uniendo Rtg3. Otro punto interesante que cabe mencionar sobre la regulación de Rtg3 es que puede ser que él no sea el factor de unión, tal vez puede ser reclutado por otro y en conjunto generar la represión sobre *ALT2*.

Por otro lado, la regulación que se puede observar en una mutante *gln3Δ* es bastante peculiar, puesto que es la primera vez que se observa que Gln3 tiene un efecto negativo sobre la expresión de un gen, y más en amonio, una condición que ha sido reportada ampliamente como la condición donde Gln3 es retenido en el citoplasma. En los resultados (figuras 22 y 23) se evidencia que Gln3 actúa como represor para *ALT2* pero sólo en una única condición: glucosa-amonio; si bien es cierto que no es la primera vez que Gln3 se reporta con actividad en una fuente primaria de nitrógeno; es decir en condiciones represoras, refiriéndonos a la NCR (Hernández *et al.* 2011); siempre ha sido reportado como regulador positivo (Cooper 2004). Sin embargo, analizando la inmunoprecipitación de cromatina para Gln3 sobre el promotor de *ALT2* (figura 30) observamos que no hay una unión sobre éste, por lo tanto, es probable que la regulación observada en una mutante carente de Gln3 sea indirecta. Puede ocurrir también que exista una interacción con otro regulador el cual se una realmente al promotor de *ALT2* y Gln3 sólo actúe reprimiendo a éste sin unirse al DNA porque sería el otro regulador el que estaría uniendo. En otras palabras, es probable la existencia de un regulador “híbrido” entre Gln3 y otros.

Finalmente el análisis de expresión para una mutante *nrg1Δ* demuestra claramente que Nrg1 es otro represor tanto para *ALT1* como para *ALT2*, esto ya había sido reportado anteriormente por Peñalosa y colaboradores en 2012. Para el caso de *ALT1* es sólo Nrg1 quien está reprimiendo incluso en alanina, condición de máxima

inducción para este gen; pero Nrg1, aparentemente recluta a Hda1, una desacetilasa de histonas para reprimirlo, esto se concluye observando la figura 25 en una mutante *hda1Δ*, donde ocurre una despresión en ambas condiciones. Para el caso de *ALT2*, sabiendo que hay otros dos reguladores negativos para *ALT2*: Rtg3 y Gln3. Si los reguladores actuaran de forma independiente uno de otro, jamás se hubiese conseguido el efecto que se observa en los experimentos de expresión: al quitar a cualquiera de esos tres se desreprime *ALT2*. Si actuaran de forma independiente, al deletar un regulador estarían los otros dos reprimiendo, pero lo que muestran los datos es que con quitar tan sólo uno, cualquiera de ellos, se logra inducir *ALT2*. Esta interacción entre las proteínas se comprobó para Nrg1 y Rtg3 con la coimmunoprecipitación. En este experimento al “bajar” a Nrg1 etiquetada con Myc se inmunoprecipita a Rtg3 la cual está etiquetada con Tap que puede revelarse con un anti-Tap. Esto demuestra entonces que la represión observada para *ALT2* es al menos llevada a cabo por 2 reguladores distintos, algo no reportado anteriormente. Faltaría realizar el mismo experimento para Gln3 y Rtg3.

Anteriormente se ha reportado que se pueden generar estos complejos heteroligoméricos (Hernández *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2011). Lo interesante de todo esto es que en *S. cerevisiae* al día de hoy se reportan aproximadamente 184 factores de transcripción con unión a DNA ([www.yeasttract.com](http://www.yeasttract.com)), pero si la levadura puede generar complejos de regulación heteroligoméricos no tiene 184 factores, tiene  $n$ , lo que permite generar una respuesta más compleja y precisa para contender con el medio ambiente, tal vez esta sea una forma de diversificación también; la generación de nuevas interacciones regulatorias para responder de mejor forma.

A manera de resumen todo lo discutido anteriormente, para facilitar la comprensión de la regulación estudiada, se presentan a continuación los modelos que se proponen para la regulación de *ALT1* y *ALT2*, juntando todos los resultados antes descritos. La regulación de *ALT1* está reprimida por Nrg1 en amonio (figura 31A) donde éste, al no haber nucleosomas protegiendo, puede acceder y unirse al DNA; mientras que en alanina *ALT1* (figura 31B) necesita la máxima inducción la cual es debida en parte (no total) a que Gcn4 puede acceder su sitio de unión e inducir la expresión.

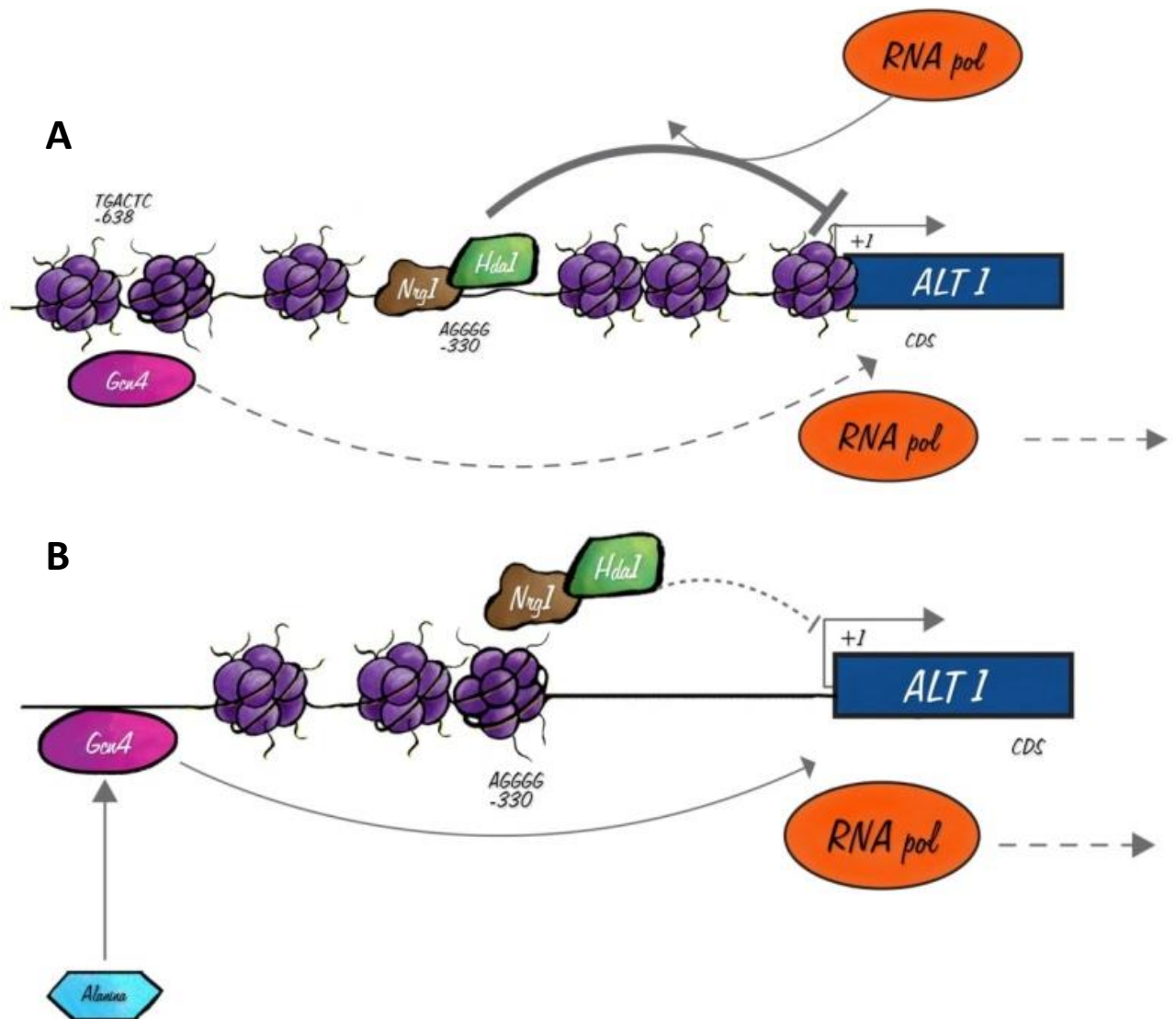


Figura 33. Modelo de regulación para *ALT1* en las dos condiciones estudiadas, glucosa amonio (A) y glucosa alanina (B).

La regulación de *ALT2* muestra que en amonio (figura 32A) Gcn4 tiene acceso a su sitio de unión e impone un efecto (epistático) inductor sobre la expresión de *ALT2*; mientras que en alanina (figura 32B) los nucleosomas se reposicionan y se cubre la caja de Gcn4, y entonces el complejo represor ejerce su efecto y reprime la expresión de *ALT2*.



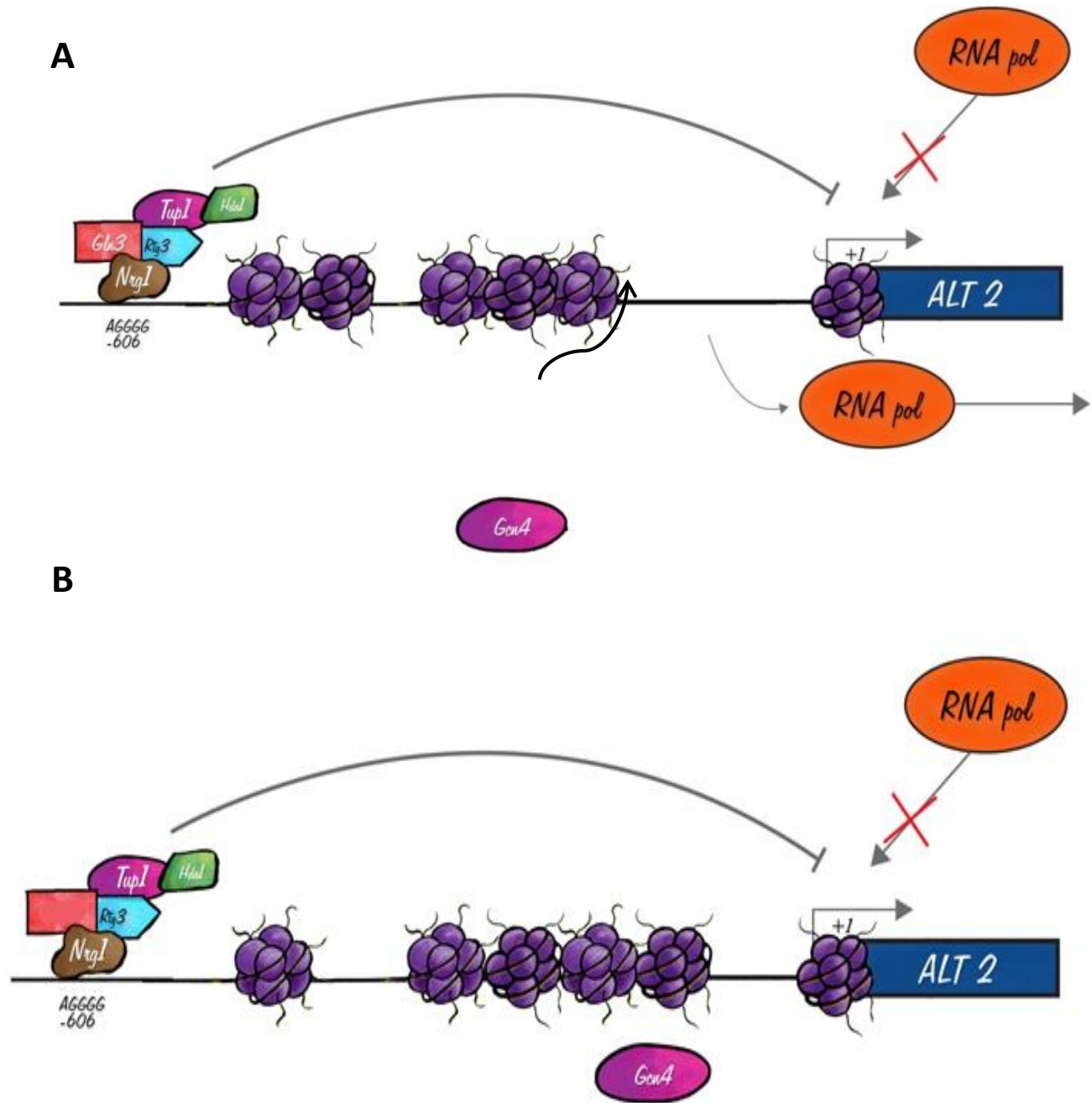


Figura 34. Modelo de regulación para *ALT2* en las dos condiciones estudiadas, glucosa amonio (A) y glucosa alanina (B).

## viii. Conclusiones

- ❖ La estructura de la cromatina juega un papel importante en la divergencia regulatoria de los genes *ALT1* y *ALT2*; el reposicionamiento de nucleosomas permite o no la accesibilidad de los diferentes factores de transcripción que pueden inducir o reprimir la expresión de *ALT1* y *ALT2*.
- ❖ En comparación con la estructura cromatínica de los genes ortólogos ancestrales de *K. lactis* y *L. kluyveri*, la de *S. cerevisiae* muestra una divergencia a nivel estructural.
- ❖ Gcn4 es el único regulador positivo que se encontró en este estudio, sin embargo, sobre el promotor de *ALT1* sí ocurre una unión, pero sobre el promotor de *ALT2* no. Por ende, es probable que el efecto observado sobre éste último sea indirecto: modulando al regulador positivo sobre *ALT2*.
- ❖ Rtg3, Gln3 y Nrg1 son reguladores negativos para *ALT2*, los resultados señalan que Nrg1 es el que tiene mayor unión sobre el promotor de este gen mientras que los otros dos reguladores muestran una unión menor o nula.
- ❖ *ALT2* es reprimido por un regulador heteroligomérico que hasta ahora incluye a Rtg3 y a Nrg1.

## ix. Perspectivas

1. Comprobar que las proteínas Nrg1 y Gln3 interactúan participando en la represión de *ALT2*.
2. Comprobar que el anclaje del complejo heterooligomérico sobre el promotor de *ALT2* ocurre a través de Nrg1 mediante mutagénesis sitio-dirigida en la caja de unión de este factor transcripcional.

## x. Bibliografía

Ahn JH, Park SH and Kang HS, (1995) Inactivation of the UAS1 of STA1 by glucose and STA10 and identification of two loci, SNS1 and MSS1, involved in STA10-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 246(5):529-37.

Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L and González A (1997) GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179 5594–5597.

Beck T and Hall MN, (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402: 689-902

Bertram, P. G., Choi, J. H., Carvalho, J., Ai, W., Zeng, C., Chan, T. F, and Zheng, X. F. (2000) Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J. Biol. Chem.* 275, 35727–35733.

Blinder, D., Coschigano, P. W and Magasanik, B. (1996) Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 4734–4736.

Bone, J.R., and Roth, S.Y. (2001) Recruitment of the yeast Tup1p- Ssn6p repressor is associated with localized decreases in histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 276: 1808 – 1813.

Broach JR, (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics.* 192(1):73-105.

Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J and Heitman, J. (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13, 3271–3279.

Carmen A, Rundlett SE and Grunstein M. (1996) HDA1 and HDA3 Are Components of a Yeast Histone Deacetylase (HDA) Complex. Vol. 271, No. 26 pp. 15837–15844,

Carvalho, J and Zheng, X. F. (2003) Domains of Gln3p interacting with karyopherins, Ure2p, and the target of rapamycin protein. *J. Biol. Chem.* 278, 16878–16886.

Chen LJ, Sawywer EB and Perret S (2011) The yeast prion protein Ure2: insights into the mechanism of amyloid formation. *Biochem Soc Trans* 39(5):1359-64

Chung WY, Albert R, Albert I, Nekrutenko A and Makova KD. (2006) Rapid and asymmetric divergence of duplicate genes in the human gene coexpression network. *BMC Bioinformatics* 7:46.

Coffman, J.A., Rai, R., Cunningham, T.S., Svetlov, V and Cooper, T.G. (1996) Gatlp, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 847-858.

Connelly CF, Wakefield J and Akey JM. (2014) Evolution and genetic architecture of chromatin accessibility and function in yeast. *PLoS Genet.* 10(7):e1004427

Conrad B and Stylianou EA, (2007) Gene Duplication: A Drive for Phenotypic Diversity and Cause of Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8:17–35

Cooper TG (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. FEMS Microbiology Reviews 26 223-38

Cooper, TG. (2004). Nutrient-induced responses in eukaryotic cells. Vol. 7, pp. 225–257, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.

Coornaert, D., Vissers, S., Andre, B. and Grenson, M. (1992) The UGA43 negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. Curr Genet 21: 301 -307.

Cunningham, T. S., Andhare, R. and Cooper, T. G. (2000) Nitrogen catabolite repression of DAL80 expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 275, 14408–14414.

Cunningham, T. S., R. Rai and T. G. Cooper. (2000) The level of DAL80 expression down-regulates GATA factor-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 182:6584–6591.

Cunningham, T.S. and Cooper, T.G. (1991) Expression of DAL80, whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. Mol Cell Biol 11 : 6205-6215.

Davie, J.K., Edmondson, D.G., Coco, C.B. and Dent, S.Y. (2003) Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. J. Biol. Chem. 278: 50 158 – 50 162. doi:10.1074/jbc. M309753200.

Degner JF, Pai AA, Pique-Regi R, Veyrieras J, Gaffney DJ, et al. (2012) DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. Nature 482:390–4

DeLuna A, Avendaño A, Riego L and Gonzalez A (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. J Biol Chem 276: 43775–43783.

Di Como, C. J. and Arndt, K. T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. Genes Dev. 10, 1904–1916.

Dietvorst J and Brandt A, (2010) Histone modifying proteins Gcn5 and Hda1 affect flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* during high-gravity fermentation. Curr Genet 56:75–85

Dilova I, Chen CY and Powers T, (2002) Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. Current Biology, Vol. 12, 389–395.

Ducker, C.E. and Simpson, R.T. (2000) The organized chromatin domain of the repressed yeast a cell-specific gene STE6 contains two molecules of the corepressor Tup1p per nucleosome. EMBO J. 19: 400–409.

Edmondson, D.G., Smith, M.M. and Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. Genes Dev. 10: 1247–1259. PMID: 8675011.

Fares M, Keane O, Toft C, Carretero-Paulet L and Jones GW, (2010) The Roles of Whole-Genome and Small-Scale Duplications in the Functional Specialization of *Saccharomyces cerevisiae* Genes. PLOS Gen. 9(1) e1003176

Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, et al. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531–1545.

Foury F, Roganti T, Lecrenier N and Purnelle B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440:325–31.

Gancedo JM (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* 206(2); 297313

García-Campusano F, Anaya VH, Robledo-Arratia L, Quezada H, Hernández H, Riego L and González A. (2009) ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 2009 Apr;55(4):368-74.

Georis, I., Feller, A., Tate, J. J., Cooper, T. G. and Dubois, E. (2009) The yeast GATA factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Genetics* 181, 861–874; Correction (2009) *Genetics* 182, 927.

Godard, P., A. Urrestarazu, S. Vissers, K. Kontos and G. Bontempi. (2007) Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27: 3065–3086.

Grbavec D, Lo R, Liu Y, Greenfield A and Stifani S. (1999) Groucho/transducinlike enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor SSN6 and mammalian SSN6-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms. *Biochem J* 337 (Part 1):13–17.

Green SR and Johnson AD (2004) Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15:4191–4202.

Gu X, Zhang Z and Huang W. (2005) Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:707–12.

Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F. and Schreiber, S. L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14866–14870.

Hernández H, Aranda C, López G, Riego L and González A, (2011) Gln3–Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404 859–864

Hernández H, Aranda C, López G, Riego L and González A, (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

Hinde E, Cardarelli F, Chen A, Khine M and Gratton E. (2012) Tracking the mechanical dynamics of human embryonic stem cell chromatin. *Epigenetics Chromatin.* 5(1):20.

Hinnebusch AG and Natarajan (2002) Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell.* 1(1):22-32.

Hinnebusch, A. G. (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. p. 319–414. In J. R. Broach, E. W.

Jones, and J. R. Pringle (ed.), The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hofman-Bang, J. (1999) Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biotechnol. 12, 35-73

Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K. T., Schmelzle, T and Hall, M. N. (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. Mol. Cell 8, 1017–1026.

Jazwinski SM (2013) The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. Biochimica et Biophysica Acta 1833 400–409

Jia Y, Rothermel B, Thornton J and 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 1110–1117.

Jia YK, Bécam AM, Herbert CJ, (1997) The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase. Mol Microbiol 24(1):53-9.

Jia, M. H., R. A. Larossa, J. M. Lee, A. Rafalski, E. Derose, G. Gonye and Z. Xue. (2000) Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. Physiol. Genomics 3:83–92.

Jiang C and Pugh BF (2009) Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. Nat Rev Genet 10: 161–172.

Jiang, Y. and Broach, J. R. (1999) Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. EMBO J. 18, 2782–2792.

Kellis M, Birren B and Lander ES, (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 428 617-624.

Kim TS, Lee Sb and Kang HS, (2004) Glucose repression of STA1 expression is mediated by the Nrg1 and Sfl1 repressors and the Srb8-11 complex, Mol. Cell. Biol. 24 (17) 7695–7706.

Kimura M and King JL (1979) Fixation of a deleterious allele at one of two “duplicate” loci by mutation pressure and random drift. Proc Natl Acad Sci USA , 76:2858-2861.

Komeili A, Wedaman KP, O'Shea EK and Powers T.(2000) Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. J Cell Biol. 151(4):863-78.

Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI and Koonin EV (2002) Selection in the evolution of gene duplications. Genome Biol. 3(2).

Koonin EV. (1994) Yeast protein controlling interorganelle communication is related to bacterial phosphatases containing the Hsp 70-type ATP-binding domain. Trends Biochem. Sci. 19:156–57

Kuchin S, Vyas VK and Carlson M (2002) Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol.* 22(12):3994-4000.

Li B and Reese, JC (2001) Ssn6-Tup1 regulates RNR3 by positioning nucleosomes and affecting the chromatin structure at the upstream repression sequence. *J. Biol. Chem.* 276: 33 788 – 33 797

Li WH, Gu Z, Cavalcanti AR and Nekrutenko A. (2003) Detection of gene duplications and block duplications in eukaryotic genomes. *J. Struct. Funct. Genom.* 3:27–34.

Lian HY, Jiang Y, Zhang, Jones GW and Perrett S. (2006) The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding. *Biochim Biophys Acta.* 1764(3):535-45

Liao X and Butow RA (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus, *Cell* 72 61–71.

Liu Z and Butow R, (2006) Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40:159–85

Liu Z and Butow R. (1999) A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function. *Molecular and cellular biology* 19 (10); 6720–6728

Ljungdahl, P. O., (2009) Amino-acid-induced signalling via the SPS sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 242–247.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TH. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.

Jiang C & Pugh BF. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* 10:161-172.

Lynch M and Force A. (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459-473.

Magasanik, B and C. A. Kaiser (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1–18

Malavé TM and Dent SYR, (2006) Transcriptional repression by Tup1–Ssn6. *Biochem. Cell Biol.* 84: 437–443

Marcet-Houben M & Gabaldón T. (2015). Beyond the whole genome duplication: phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *Plos Biology* 13(8): e1002220

Mehta PK, Hale TI and Christen P. (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem.* 1;214(2):549-61.

Minehart, P.L and Magasanik, B. (1991) Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 11 : 621 6-6228.



Mosch, H. U., B. Scheier, R. Lahti, P. Mantsala, and G. H. Braus. (1991) Transcriptional activation of yeast nucleotide biosynthetic gene ADE4 by GCN4. *J. Biol. Chem.* 266:20453–20456.

Mueller PP and Hinnebusch AG (1986) Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell.* 45(2):201-7.

Navarro-Olmos R, Kawasaki L, Domínguez-Ramírez L, Ongay-Larios L, Pérez-Molina R and Coria R. The beta subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the gamma subunit. *Mol Biol Cell.* 21(3):489-98

Niederacher G, Klopff E & Schüller C. (2011). Interplay of dynamic transcription and chromatin remodeling lessons from yeast. *Int. J. of Mol. Sci.* 12:4758-4769.

Ohno S (1970) *Evolution by Gene duplication*; Olson KA, editor. Berlin: Springer-Verlag.

Oliveira E, Martins A, Carvajal and Bon E (2003) The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20: 31–37.

Park SH1, Koh SS, Chun JH, Hwang HJ and Kang HS. (1999) Nrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose Repression of STA1 Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol.* 19(3):2044-50.

Peñalosa-Ruiz G, Aranda C, Ongay-Larios L, Colon M, Quezada H and González A (2012) Paralogous ALT1 and ALT2 Retention and Diversification Have Generated Catalytically Active and Inactive Aminotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* 7(9);e45702

Piskur J, (2001) Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* 17(6):302-3

Puria R and Cardenas ME, (2008) Rapamycin bypasses vesicle-mediated signaling events to activate Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Communicative & Integrative Biology* 1:1, 23-25

Puria R, Zurita-Martínez S and Cardenas ME, (2008) Nuclear translocation of Gln3 in response to nutrient signals requires Golgi-to-endosome trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 105 (20);7194-7199

Rai R, Tate JJ, Nelson DR and Cooper TG (2013) gln3 mutations dissociate responses to nitrogen limitation (nitrogen catabolite repression) and rapamycin inhibition of TorC1. *J Biol Chem* 288(4):2789-804.

Riego L, Avendaño A, DeLuna A, Rodríguez E and González A. (2002) GDH1 expression is regulated by GLN3, GCN4, and HAP4 under respiratory growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 79–85

Ronne H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11(1):12-7.

Rothermel BA, Thornton JL and Butow RA, (1997) Rtg3p, a basic helix–loop–helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J. Biol. Chem.* 272 19801–19807.

Sekito T, Liu Z, Thornton J and Butow RA. (2002) RTG-dependent mitochondria-to-nucleus signaling is regulated by MKS1 and is linked to formation of yeast prion [URE3]. *Mol. Biol. Cell* 13:795–804.

Shamji, A. F., Kuruvilla, F. G and Schreiber, S. L. (2000) Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.* 10, 1574–1581.

Soussi-Boudekou S and Bruno A, (1999) A co-activator of nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae* *Molecular Microbiology* 31(3), 753–762

Stanbrough, M., Rowen, D.W and Magasanik, B. (1995) Role of the GATA factors Gln3p and Nllp of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9450-9454.

Tate JJ, Georis I, Rai R, Vierendeels F, Dubois E and Cooper TG. (2010) GATA Factor Regulation in Excess Nitrogen Occurs Independently of Gtr-Ego Complex-Dependent TorC1 Activation. *G3 (Bethesda)*. 2015 May 29;5(8):1625-38

Taylor JS and Raes J (2004) Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet* 38: 615–643.

Tirosh I, Reikhav S, Levy A and Barkai N (2009) A Yeast Hybrid Provides Insight into the Evolution of Gene Expression Regulation. *Science* 324:659–662

Tsankov AM, Thompson DA, Socha A, Regev A and Rando OJ. (2010) The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol.* 8(7):e1000414.

Wagner A. (1998) The fate of duplicated genes: loss or new function? *BioEssays* 20:785-788.

Wahi M, Komachi K and Johnson AD (1998) Gene regulation by the yeast Ssn6–Tup1 corepressor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:447–457.

Weiner A, Hughes A, Yassour M, Rando OJ and Friedman N (2009) Highresolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res.*

Wolfe K and Shields D, (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387; 708-713.

Wu J, Noriyuki S, Carlson M and Grunstein M, (2001) TUP1 Utilizes Histone H3/H2B–Specific HDA1 Deacetylase to Repress Gene Activity in Yeast. *Molecular Cell*, Vol. 7, 117–126

Yan, G., Shen, X and Jiang, Y. (2006) Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J.* 25, 3546–3555.

Zhang Z, Varanasi U, Carrico P and Trumbly RJ (2002) Mutations of the WD repeats that compromise Tup1 repression function maintain structural integrity of the WD domain trypsin-resistant core. *Arch Biochem Biophys* 406:47–54.