



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Instituto de Fisiología Celular
Facultad de Medicina

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

Análisis de la regulación de los genes parálogos
EGD1 y *BTT1* por cambios en el metabolismo de
carbono en *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

Que para obtener el grado de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA

José Ernesto Bravo Arévalo

Facultad de Medicina



Directora de tesis:
Dra. María Soledad Funes Argüello

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., diciembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*La belleza en el universo no es sólo la unidad en la variedad, sino también la
diversidad de la unidad.*

El nombre de la rosa, Umberto Eco

El ver mucho y leer mucho aviva los ingenios de los hombres.

Don Quijote de la Mancha, Miguel de Cervantes y Saavedra

*Of course it is happening inside your head, Harry, but why on Earth should that
mean that it is not real?*

Harry Potter and the Deathly Hallows, J. K. Rowling

RECONOCIMIENTOS

El presente estudio se realizó bajo la dirección de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el laboratorio 204 Sur del Departamento de Genética Molecular de la División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo 237244 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como el donativo IN207518 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Al Dr. Diego González Halphen por el equipo y apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A la Dra. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez por las sugerencias y toda la ayuda técnica brindada.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biól. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera, miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC (UNAM), por la síntesis de desoxiligonucleótidos y la secuenciación de DNA requerida en este proyecto.

A Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega, miembros de la Unidad de Cómputo del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

Al Ing. Aurey Gaván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides del Taller de Mantenimiento del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

A Javier Gallegos Infante y Sandra Moncada Hernández, personal de la Biblioteca "Armando Gómez Puyou" del IFC (UNAM), por su atención y ayuda técnica.

A la Lic. Cynthia Lima Cruz y Mayra Ocegüera Jiménez por la gran ayuda administrativa brindada durante toda la Licenciatura.

Al Dr. Luis Servín González, a la Dra. Soledad Funes, al Dr. Alexander de Luna, al Dr. José Francisco Torres Quiroz y al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, miembros del jurado, por el tiempo invertido en la revisión del presente trabajo y sus valiosos comentarios y sugerencias.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Ernesto Bravo Benítez, que en los ires y venires de la vida, incansablemente siempre encontró el tiempo y la vida para llegar cada tarde y estar cuando más lo necesité. Que sin sus palabras y su guía, sin su apoyo y sosiego, el mar del destino quién sabe dónde me tendría en este momento. Siempre a la vera de mí, cercano o lejano entre las cosas humanas, es padre, ejemplo, pero también amigo.

A mi madre Verónica Arévalo Herrera, siempre un bastión de seguridad y cariño, pero también de franqueza y rectitud, estuvo ahí cuando veíame errar el camino. Mas cuando la vida me abatía o me presentaba barreras a la vista infranqueables, lo imposible e inamovible se volvía algo dispensable en pos de mí. Y que, al volver del andar, estuviese donde estuviese, siempre otra forma de decir hogar.

A mis hace tiempo fallecidas abuelas, Ofelia y María, cuyo candor y hogar andante siempre me fue refugio del alma, aquí o allá, por doquier o rondando los matorrales del jardín, siempre paz.

A Fernanda, mi destello lunar, que fortuito encuentro de la vida, apareció como si del insomnio más ilusionado hubieran sacado al sueño añorado, a esa persona especial. Que entre paños y derivas, bogueé a su encuentro, sólo para encontrar poesía y lírica, eternos alimentos del alma. Que con su cálido estar, ser a su lado es la vida misma.

A mis amigos biomédicos, Lalo, Rafal, Marintia y Fátima, de quienes conocí lo peor y lo mejor, pero que jamás cambiaría pues no hay mejores compañeros de batalla.

A Carlos Ochoa y Lorena Caballero por enseñarme y guiarme por los senderos siempre cambiantes de la Evolución y por abrirme la mente fuera de la ortodoxia.

A Priscila, Ana, Frank, Cristian, Paco, Gaby y Jahaziel y los demás chicos del laboratorio de Inmunobiología, eternos amigos, donde estar en casa solamente es cruzar una puerta.

A todo el 204 sur, la segunda casa que toda persona necesita, por abrirme sus puertas, retarme, incentivar me, enseñarme y siempre ser sinónimo de amistad y familia.

A la LIBB, por sacar, a golpes y ovas, todo lo mejor y peor que pude dar de mí, pero que me hizo encontrar quién soy y adónde voy.

A todos esos amigos, familiares y apenas conocidos que, en el andar de la vida, encontré en el camino y quienes compartí una risa, una aventura, una locura.

A la UNAM, que desde que tomó a un simple bachiller ansioso de saber de la ciencia y de la vida, me tiene aquí aún sin saber nada de la ciencia y de la vida, pero ignorando menos de cuanto es vivir.

ABREVIATURAS

- *UTR*: Región no traducida (*Untranslated Region*, en inglés).
- *GAL*: Genes involucrados en el metabolismo de galactosa.
- *HAP*: Del inglés *Heme Activator Protein*, genes involucrados en la biogénesis mitocondrial.
- *DNA*: Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic Acid*, en inglés).
- *RNA*: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*, en inglés).
- *RNA_m*: RNA mensajero.
- *WGD*: Duplicación completa de genoma (*Whole Genome Duplication*, en inglés).

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Generalidades sobre la duplicación genética	2
2.2 Tipos de duplicación genética.....	3
2.2.1 Duplicación segmental	3
2.2.1 Duplicación de genoma completo (WGD)	7
2.3 Destino de los genes duplicados	8
2.3.1 Conservación de los duplicados.....	9
2.3.2 Pseudogenización	9
2.3.3 Subfuncionalización	10
2.3.4 Neofuncionalización	11
2.4 Recableado transcripcional.....	13
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : una levadura descendiente de una duplicación completa de genoma.	14
2.5.1 Alotetraploide ancestral.....	14
2.5.2 Regulación por fuente de carbono	17
2.6 El Complejo Asociado a polipéptidos Nacientes (<i>Nascent-polypeptide Associated Complex</i>).....	21
3. Planteamiento del problema.....	26
4. Pregunta de investigación	28
5. Hipótesis.....	28
6. Objetivo general	28
7. Objetivos particulares	28
8. Materiales y Métodos	29
8.1 Cepas	29
8.2 Plásmidos	30
8.3 Desoxioligonucleótidos	30
8.4 Purificación de plásmidos	31
8.5 Amplificación por PCR de módulos para etiquetar los genes <i>EGD1</i> y <i>BTT132</i>	
8.6 Generación de cepas etiquetadas con 3HA en los genes <i>EGD1</i> y <i>BTT1</i>	33
8.7 Purificación de DNA genómico de levadura.....	34
8.8 Generación de cepas con <i>EGD1</i> y <i>BTT1</i> relocalizados y etiquetados con 3HA.....	35

8.9 Validación de cepas de levadura mutantes	37
8.10 Electroforesis en gel de agarosa	38
8.11 Ensayo de sensibilidad a estrés oxidante	38
8.12 Análisis de los niveles proteicos de las proteínas β 1-NAC y β 2-NAC.....	40
8.12.1 Análisis del efecto de la fuente de carbono sobre los niveles proteicos de las proteínas β 1-NAC y β 2-NAC	40
8.12.2 Extracción de proteínas totales	40
8.12.3 Electroforesis desnaturalizante de proteínas	41
8.12.4 Inmunodetección	41
8.13 Construcción de un reportero transcripcional para evaluar la actividad de las regiones 5' y 3' UTR del gen <i>BTT1</i>	42
8.14 Ensayo de actividad de β -galactosidasa.....	45
8.15 Análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes <i>EGD1</i> y <i>BTT1</i>	47
9. Resultados	48
9.1 Construcción de cepas mutantes por recombinación homóloga.....	48
9.2 La relocalización de los parálogos β -NAC no afecta el fenotipo crecimiento en condiciones estándar ni en estrés oxidante	51
9.3 Los niveles proteicos de las proteínas β 1-3HA y β 2-3HA dependen del contexto genómico, de la fuente de carbono y de α -NAC.....	53
9.4 El gen <i>BTT1</i> se regula por la fuente de carbono a nivel transcripcional	56
9.5 Análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes <i>EGD1</i> y <i>BTT1</i>	58
10. Discusión de los resultados.....	63
11. Conclusiones.....	77
12. Perspectivas.....	78
13. Apéndice	79
13.1 Medios de cultivo	79
13.2 Soluciones y amortiguadores.....	80
13.3 Tiempos de duplicación estimados en los diferentes medios de cultivo	80
14. Bibliografía	82

1. RESUMEN

El Complejo Asociado a Polipéptidos Nacientes (NAC, por sus siglas en inglés) es una chaperona heterodimérica conformada por una subunidad α -NAC y una subunidad β -NAC que se asocia a la vecindad del túnel de salida del ribosoma y participa en el plegamiento temprano de las proteínas.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, NAC posee dos subunidades β -NAC codificadas por los genes parálogos *EGD1* y *BTT1* (β 1-NAC y β 2-NAC) que tienen su origen en un evento de duplicación completa de genoma. Los genes duplicados o parálogos son fuentes de novedad evolutiva debido a que aligeran las presiones selectivas que actúan sobre la secuencia codificante de los genes permitiendo así la acumulación de mutaciones sin comprometer las funciones asociadas y la posibilidad del surgimiento de nuevas funciones. Tal es el caso de NAC de *S. cerevisiae*. En los últimos años se ha reportado que los heterodímeros $\alpha\beta$ 2-NAC colaboran en la importación cotraduccional de proteínas a las mitocondrias, mientras que el heterodímero $\alpha\beta$ 1-NAC se asocia a proteínas citosólicas y de la vía de secreción. No obstante, poco se sabe acerca de la regulación de las subunidades β -NAC

En el presente estudio se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre la regulación de las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae* a través de ensayos de actividad de gen reportero y de inmunodetección de las proteínas β 1-NAC y β 2-NAC. Asimismo, se evaluó el efecto de la relocalización de los parálogos al contexto genómico de su duplicado en la expresión de éstos.

En general, se encontró que la subunidad β 2-NAC se ve modulada por la fuente de carbono tanto a nivel transcripcional como en niveles proteicos, mientras que la subunidad β 1-NAC parece tener una expresión constitutiva en las condiciones evaluadas. Igualmente, se determinó que los niveles proteicos de ambas subunidades a su vez dependen de la presencia de la subunidad α -NAC, así como de β 1-NAC para el caso de β 2-NAC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 GENERALIDADES SOBRE LA DUPLICACIÓN GENÉTICA

Los genomas son los repositorios de la información necesaria para que un organismo lleve a cabo sus funciones biológicas. Contrario a lo que se pensaría a primera vista, los genomas se han moldeado y modificado a lo largo del curso de la evolución por una serie de eventos que involucran mutaciones puntuales, cambios en el número de genes y rearrreglos entre cromosomas completos.

De entre los diversos elementos que están involucrados en la evolución de los genomas, las duplicaciones genéticas han sido consideradas como uno de los factores más importantes puesto que son fuente de novedad biológica (Ohno, 1970). En este aspecto, la existencia de un gen o de todo un genoma duplicado abre la puerta a cambios evolutivos que van desde la coaptación de uno de los duplicados a una nueva función (un caso de exaptación) hasta la formación no sólo de especies, sino de familias o géneros completos (Bateman & DiMichele, 2002; Conant & Wolfe, 2008; Marcet-Houben & Gabaldón, 2015; Ohno, 1970).

Se pueden encontrar evidencias de las duplicaciones genéticas en todos los dominios de la vida. Estas van desde las familias multigénicas como las de globulinas, la de receptores olfatorios o la de genes ribosomales con un alto número de copias; hasta duplicaciones de genomas completos como las encontradas en plantas como *Arabidopsis*, en vertebrados y en la familia de hongos *Saccharomycetaceae* (Levasseur & Pontarotti, 2011; Marcet-Houben & Gabaldón, 2015; Ohno, 1970; Zhang, 2003).

Durante la evolución de los genomas, las duplicaciones genéticas han tenido un papel central en la generación de diversidad biológica debido al efecto de amplificación que tienen en el tamaño del genoma. Sin embargo, el destino de los genes duplicados depende tanto del mecanismo de duplicación, como de su integración en las redes de regulación genética. Ultimadamente, el destino de las duplicaciones dependerá de la adecuación al ambiente que presenten los organismos en que residan las duplicaciones (Chandan & Indra, 2014; Emery et al., 2018; Wendel, Lisch, Hu, & Mason, 2018).

2.2 TIPOS DE DUPLICACIÓN GENÉTICA

2.2.1 Duplicación segmental

La duplicación segmental es la consecuencia de que regiones genómicas que van desde genes únicos hasta segmentos de cromosomas se vean duplicadas y es la responsable de la existencia de grandes familias de genes organizadas en tándem. Entre las familias génicas generadas de este modo se encuentran la familia de los genes homeóticos Hox (involucrados en la especificación de los planes corporales de animales), los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) o los genes de la familia de las globulinas, por mencionar algunos ejemplos.

No obstante, debido a que la duplicación segmental también resulta de algunos mecanismos de recombinación entre regiones de homología presentes en diferentes partes del genoma, no todos los genes duplicados (parálogos) generados de este modo se encuentran organizados de manera contigua. A continuación se discuten los mecanismos principales de la duplicación segmental (Chandan & Indra, 2014).

1) *Entrecruzamiento desigual*

El mecanismo de entrecruzamiento desigual (*Unequal crossing-over*, en inglés) recibe dicho nombre por la generación de duplicados en uno de los cromosomas y la pérdida de un segmento cromosomal en el otro. En dicho fenómeno, la recombinación ocurre entre segmentos homólogos presentes en diferentes regiones del genoma en lugar de entre genes homólogos.

Una de las consecuencias de este mecanismo es la formación de duplicaciones en tándem. Este tipo de duplicaciones surgen del apareamiento y recombinación entre regiones de homología presentes en genes vecinos (Figura 1). Una vez que termina el evento de recombinación y la disyunción de cromosomas, en uno de ellos habrá al menos una copia adicional de los genes mientras que el otro perderá la

región genómica involucrada en la recombinación (Chandan & Indra, 2014; Zhang, 2003).

Los genes parálogos generados de este modo se distinguen de otros generados por los mecanismos descritos más adelante en cuanto a que varias copias del mismo gen se encuentran ligadas genéticamente y poseen intrones entre su secuencia codificante.

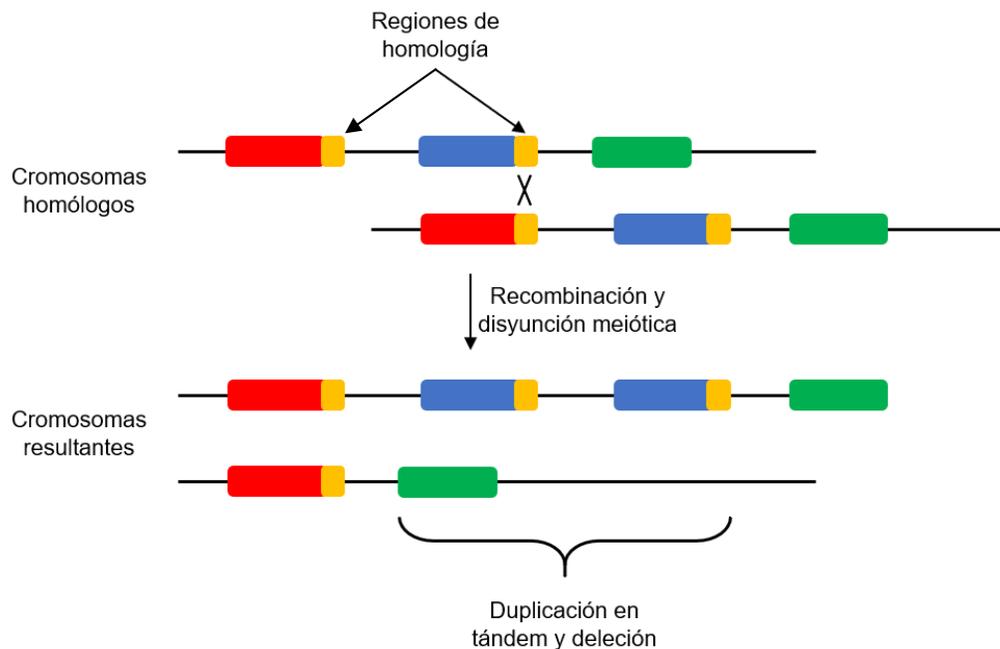


Figura 1. Duplicación genética por entrecruzamiento desigual. Durante la meiosis, aquellos genes con secuencias homólogas presentes también en otras regiones del genoma (cajas amarillas en los bloques de colores) tienen el potencial de aparearse entre sí y ser blancos de la recombinación por homología. Si las regiones de homología se encuentran en genes adyacentes, el resultado es una duplicación en tándem en uno de los cromosomas y una deleción en el otro. Basado en Zhang, 2003.

2) Retrotransposición

La retrotransposición es el evento por el cual un RNAm codificado por un retrotransposón es editado por la maquinaria de corte y empalme, y funge como sustrato para la síntesis un DNA complementario (DNAc) el cual puede integrarse nuevamente en el genoma (Figura 2). Dicho evento genera un gen parálogo que no

se encuentra ligado genéticamente al gen progenitor dado el carácter estocástico de la integración de los retrotransposones (Hancks & Kazazian, 2016; Long, 2001).

Entre las características que poseen los genes parálogos generados por este proceso están la presencia de tractos de poliadeninas debido a la retrotranscripción del RNAm, así como la presencia de algunas secuencias cortas repetidas en los extremos del retrotransposón insertado (Viets, et al., 2016).

A diferencia de las duplicaciones por entrecruzamiento desigual, que pueden o no incluir genes completos, la retrotransposición genera duplicaciones cuya secuencia codificante da pie a un gen funcional. No obstante, debido a que el retrotransposón se puede insertar en diversas regiones del genoma, no siempre la integración se da en la vecindad de regiones promotoras que permitan su transcripción (Vinckenbosch, et al., 2006). Asimismo, se ha reportado que dichos elementos genéticos móviles son blancos de modificaciones epigenéticas que silencian su expresión en caso de que se inserten en regiones transcripcionalmente activas (García-Pérez et al., 2010).

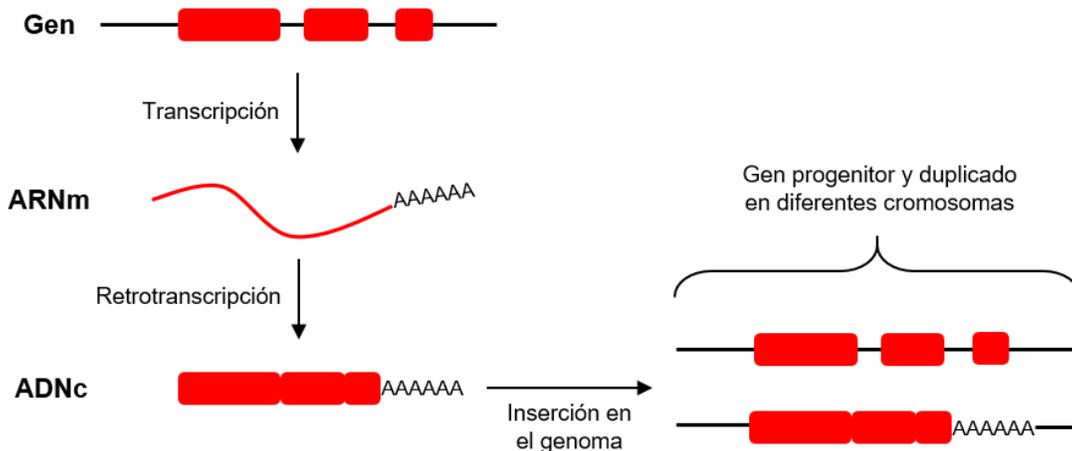


Figura 2. Duplicación genética por retrotransposición. Los retrotransposones en el genoma (las cajas rojas intercaladas representan a los exones intercalados por intrones) son transcritos y procesados por la maquinaria de corte y empalme para producir un RNAm maduro. Posteriormente, los RNAm son retrotranscritos a un DNAc con un tracto de poliadeninas en su extremo 3' y sin intrones el cual se inserta en el genoma. El resultado es la generación de un gen parálogo del retrotransposón presente en alguna región del genoma. Basado en Zhang, 2003.

3) Transposición duplicativa

La generación de duplicados por transposición duplicativa es consecuencia de los mecanismos de reparación del DNA ante un quiebre de doble hebra. En particular, el mecanismo por el cual procede la reparación por recombinación homóloga no alélica (en inglés *nonallelic homologous recombination*) involucra el uso de secuencias homólogas al sitio de ruptura del DNA como templado para llevar a cabo la reparación del DNA (Bailey, et al., 2003; Chandan & Indra, 2014).

De manera similar al entrecruzamiento desigual, la recombinación ocurrida en las regiones de homología da pie a la duplicación de los genes en la vecindad del sitio de entrecruzamiento y la ligación de éstos a los genes adyacentes al sitio de ruptura (Figura 3).

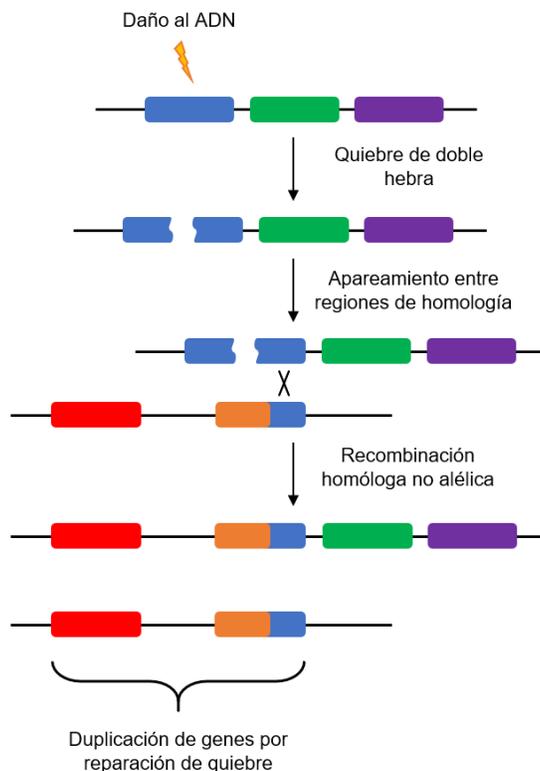


Figura 3. Duplicación genética por reparación de doble quiebre. Ante un daño en el DNA que genera un quiebre de doble hebra, el mecanismo de reparación por recombinación homóloga no alélica usa como templado regiones homólogas al sitio de la ruptura presentes en diferentes regiones del genoma (secciones azules en los bloques que representan genes). En consecuencia, se da una duplicación de los genes adyacentes al sitio homólogo usado como templado y una conversión génica si el daño ocurre en un gen. Basado en Chandan & Indra, 2014.

2.2.1 Duplicación de genoma completo (WGD)

A diferencia de la duplicación segmental en la que cada gen parálogo posee un gen progenitor en el mismo genoma, en la WGD los genes duplicados surgen por la unión de dos o más genomas completos dentro de la misma célula (poliploidización). Dependiendo de si la unión de genomas se da entre la misma especie (autopoliploidización) o entre especies cercanas (alopoliploidización), los genes parálogos serán ohnólogos u homeólogos, respectivamente. Por este proceso, virtualmente cada gen del genoma en cuestión poseería un gen duplicado (Hufton & Panopoulou, 2009).

Existen diferentes formas por las cuales la poliploidía puede ocurrir. Los procesos más comunes son la no reducción gamética y la no disyunción mitótica, en las cuales la duplicación se debe a un fallo en la segregación de los cromosomas durante la meiosis y la mitosis, respectivamente. En el caso de la aloploidía, este tipo de WGD involucra la unión de gametos de diferentes especies lo suficientemente cercanas evolutivamente para que exista interfertilidad (Levasseur & Pontarotti, 2011).

En ambos casos de WGD, se da el fenómeno de diploidización en el que los organismos tetraploides recién formados pierden algunos de los genes duplicados. Este fenómeno se debe tanto a defectos en la mitosis y meiosis por la presencia de varios complementos de cromosomas apareables entre sí, como a rearrreglos genómicos que involucran inserciones, deleciones, translocaciones y duplicaciones segmentales entre los dos genomas del poliploide (Hufton & Panopoulou, 2009).

2.3 DESTINO DE LOS GENES DUPLICADOS

Los genes están sometidos a presiones de selección que determinan el mantenimiento de su secuencia, su regulación y las funciones de sus productos codificados. Estas presiones de selección están causadas por dos fenómenos que ocurren simultáneamente. En primer lugar, debido a que los productos génicos (proteínas o RNAs) interactúan con otros componentes moleculares de las células física o funcionalmente (e.g. en complejos multiproteicos, cascadas de señalización, etc.), existe una presión de selección que restringe cambios mutacionales que alteren el perfil de expresión o las funciones que los genes puedan tener. En segundo, a causa de la contribución diferencial de los alelos de un gen a la adecuación (*fitness* en inglés) de un organismo, existe una presión de selección que favorece la propagación de aquellos alelos benéficos a nivel poblacional (Hurst, 2009; Levasseur & Pontarotti, 2011).

Ahora bien, las duplicaciones segmentales o la WGD traen como consecuencia un relajamiento de las presiones de selección que aseguraban la integridad de secuencia de las regiones regulatorias y codificantes del gen debido a la presencia de un duplicado. No obstante, para que los genes duplicados sean sujetos del cambio mutacional, primero deben fijarse a nivel poblacional y esto supone una restricción de inicio para la supervivencia de los duplicones. En la mayoría de los casos, hay una pérdida temprana de los genes duplicados en el genoma que se ve acentuada en los casos de WGD debido a efectos deletéreos producidos por el desbalance génico, la recombinación no alélica y errores en la segregación de cromosomas (Hufton & Panopoulou, 2009; Jackson & Chen, 2010; Levasseur & Pontarotti, 2011).

En dado caso que un duplicón sea fijado a nivel poblacional, ya sea por selección natural o deriva génica, se da un aumento en la acumulación de mutaciones y se abre la posibilidad de la diversificación de las funciones de los duplicados, o bien, a la pérdida de uno de estos de acuerdo con los siguientes casos (Figura 4) (Chandan & Indra, 2014; Espinosa-Cantú et al., 2015; Innan & Kondrashov, 2010; Yue et al., 2017).

2.3.1 Conservación de los duplicados

La conservación de una o más copias de un gen en el genoma ocurre en casos donde el aumento de la dosis génica de los productos codificados por los parálogos resulta benéfica o neutral para las funciones moleculares del organismo (Figura 4, panel 1) (Chandan & Indra, 2014; Innan & Kondrashov, 2010). Ejemplo de ello son las múltiples duplicaciones encontradas en los genes codificantes de los RNAs ribosomales o en las proteínas histonas en los eucariontes (Chandan & Indra, 2014).

La retención de la función y la regulación del gen ancestral en los genes duplicados es posible que se deba a dos mecanismos. El primero de ellos es la evolución concertada: a nivel molecular, es un modo de evolución que ocurre en familias génicas donde los genes miembros se mantienen similares en secuencia debido a frecuentes eventos de conversión génica o entrecruzamiento desigual que homogenizan la secuencia de nucleótidos (Liao, 1999). El segundo es debido a selección purificadora: dado que la presencia de los duplicados resultó benéfica para el organismo, existe una presión de selección positiva para el número de copias del gen, pero negativa para mutaciones que alteren su función; la confluencia de ambas presiones de selección se ve reflejada en el número de mutaciones sinónimas o silenciosas encontradas en algunos duplicados que no repercuten en la función del producto codificado (Innan & Kondrashov, 2010).

2.3.2 Pseudogenización

La redundancia funcional que algunos duplicados generan usualmente no resulta ventajosa para un organismo, pero tampoco resulta en un efecto deletéreo. Debido a esto, la presión selectiva que mantuvo la integridad de la secuencia del gen ancestral se mantiene en uno de los duplicados. Paralelamente, en el otro duplicado, el alivio de la restricción mutacional aumenta la probabilidad de mutaciones en regiones de regulación que abaten el perfil de regulación del gen ancestral; o bien, aumentan la probabilidad de mutaciones sin sentido o no

sinónimas, así como de deleciones o inserciones que alteran la función del producto codificado (Figura 4, panel 2).

Evidencias de que el proceso de pseudogenización responde a presiones de selección involucradas con el ambiente y el estilo de vida de un organismo se pueden encontrar, por ejemplo, en los genes de la familia de genes de receptores olfatorios. En humanos y ratones, el número de miembros de esta familia es cercano a los 1000, pero varía en cuanto a la presencia de pseudogenes: mientras que en el humano hay una presencia del más del 60 % de pseudogenes, en los ratones es del 20 %, lo cual se ha correlacionado con la dependencia de los ratones en el sentido del olfato y con que el humano basa su interacción con el entorno con apoyo en otros sistemas sensoriales (Rouquier, et al., 2000; Zhang, 2003)

2.3.3 Subfuncionalización

A diferencia de la conservación de la función en los duplicados modernos por la ventaja que supone el aumento en la dosis génica en algunos casos, en el modelo de subfuncionalización las funciones de un gen ancestral se ven repartidas entre los genes duplicados modernos. Dicho reparto de funciones ocurre cuando el gen ancestral posee más de una actividad asociada, sea esta de regulación o de catálisis (Espinosa-Cantú et al., 2015; Zhang, 2003).

Luego de la fijación de los genes parálogos, el relajamiento de la restricción mutacional en las regiones de regulación y codificantes del gen permiten la acumulación de cambios en su secuencia; sin embargo, la red de regulación genética de las células impone una presión de selección sobre las funciones que poseía el gen ancestral. Debido a ello, la interacción entre ambos elementos deriva en cambios mutacionales restringidos en los genes duplicados que aseguran que las funciones bioquímicas o de regulación permanezcan sin perturbaciones (Conant & Wolfe, 2008; Hurst, 2009; Innan & Kondrashov, 2010). Es decir, las mutaciones ocurridas durante el proceso de subfuncionalización se compensan entre sí para conservar, en los dos genes modernos, las funciones del gen ancestral.

En línea con lo anterior, si se da la eliminación de una de las regiones de regulación en uno de los parálogos, aumenta la presión de selección por la conservación de ese mismo sitio de regulación en el otro parálogo. Lo mismo sucede con las funciones de los productos génicos: existen presiones de selección que restringen los posibles cambios en la función de uno de los parálogos cuando ese cambio ya ocurrió en el otro duplicado (Chandan & Indra, 2014; Conant & Wolfe, 2008). Por tanto, dicha interacción entre mutaciones y presiones de selección llevan a la partición de las funciones de los genes ancestrales (Figura 4, panel 3).

Finalmente, debido a que los perfiles de regulación de la expresión génica están correlacionados con la función del producto génico, es común que durante la subfuncionalización se repartan tanto la función del producto génico como su perfil de regulación a uno de los parálogos (Allan Force et al., 2005; Marsit et al., 2017; Thompson et al., 2013)

2.3.4 Neofuncionalización

La neofuncionalización resulta de una circunstancia similar a la pseudogenización: dado que las presiones que aseguraban la integridad de la secuencia y regulación del gen ancestral persisten en uno de los duplicados, el parálogo puede acumular mutaciones (Figura 4, panel 4). A diferencia de la pseudogenización, las mutaciones acaecidas en las regiones regulatorias o codificantes del gen pueden ser fijadas por selección natural si es que proveen alguna la función novedosa que le den una mayor adecuación al ambiente al organismo en cuestión (Levasseur & Pontarotti, 2011), o bien, por deriva génica durante el período de adquisición de función (Conant & Wolfe, 2008; Innan & Kondrashov, 2010). Evolutivamente, una neofuncionalización es un ejemplo de exaptación puesto que el gen duplicado es coaptado por el organismo a una función distinta a aquella por la cual fue fijado por selección originalmente (Conant & Wolfe, 2008; Gould, 2002).

Se distinguen dos tipos de neofuncionalización: la neofuncionalización *stricto sensu* y la microneofuncionalización. En la primera hay un cambio radical de la función bioquímica o en el perfil de regulación; mientras que la segunda involucra

cambios en la especificidad por alguna actividad metabólica, la afinidad por algún ligando o la especificidad por algún sustrato (Conant & Wolfe, 2008; Levasseur & Pontarotti, 2011).

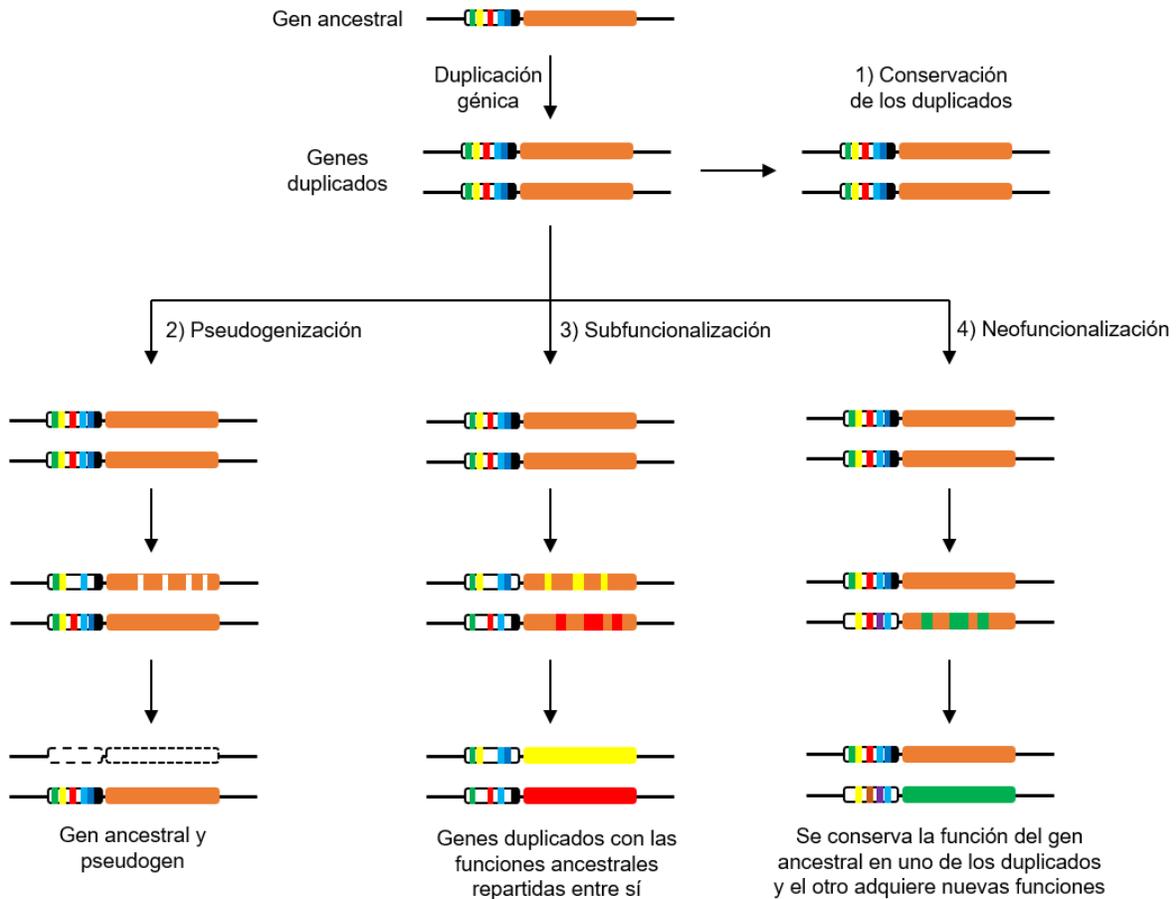


Figura 4. Destino de los genes duplicados. Luego de la duplicación génica, los duplicados tienen cuatro posibles destinos que se indican con números. Véase el texto para la descripción de cada uno de ellos. Las cajas multicolor a la izquierda de cada gen indican las regiones promotoras del gen y, en colores, los motivos de unión de reguladores de la transcripción; los colores en las cajas anaranjadas de los genes indican mutaciones que cambian la función. Modelo basado en (Chandan & Indra, 2014; A Force et al., 1999; Zhang, 2003).

2.4 REORGANIZACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES

Uno de los factores más importantes en la expresión de un gen es la tasa de transcripción la cual está guiada por la asociación de reguladores transcripcionales a sitios de unión presentes en las secuencias promotoras de la transcripción. En general, los sitios de unión son secuencias degeneradas cortas en los trechos de DNA que anteceden a la región codificante de un gen (Dalal & Johnson, 2017).

Debido al tamaño y al carácter degenerado de sus secuencias, los sitios de unión son relativamente fáciles de ganar o perder por acumulación de mutaciones, lo cual da pie a la reestructuración de las redes de regulación génica transcripcionales entre las especies durante el curso de la evolución. A este proceso se le denomina reorganización de redes transcripcionales (*transcriptional rewiring* en inglés) (Dalal & Johnson, 2017; Payne & Wagner, 2014).

El recableado transcripcional ocurre también entre los duplicados génicos. Como se mencionó antes para la sub- y la neofuncionalización, la relajación de la presión de selección que restringe los posibles cambios en los patrones de expresión de los genes en una especie, permite un aumento en la variabilidad tanto en las regiones de regulación como en las codificantes de un gen por acumulación de mutaciones (Chandan & Indra, 2014; Levasseur & Pontarotti, 2011). En consecuencia, tanto para la duplicación segmental, como para la WGD, la reorganización de redes transcripcionales explica los cambios de expresión, así como la integración de los duplicados a nuevas redes de regulación (Dalal & Johnson, 2017; Levasseur & Pontarotti, 2011).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*: UNA LEVADURA DESCENDIENTE DE UNA DUPLICACIÓN COMPLETA DE GENOMA.

Saccharomyces cerevisiae actualmente forma parte de un género en el que se agrupa junto con otras siete especies de levaduras, así como con varios híbridos interespecíficos (Dujon & Louis, 2017). Ésta ha sido uno de los modelos de estudio más utilizado en biología celular y molecular a causa de ser el primer eucarionte cuyo genoma fue secuenciado y por la facilidad de generar mutantes para cada gen dentro de su genoma (Goffeau et al., 1996; Winzeler et al., 1999).

Asimismo, juega un papel muy importante en la industria biotecnológica y en la producción de alimentos fermentados debido al efecto *Crabtree*, en el cual las levaduras poseen un estilo de vida fermentativo que, aun en presencia de oxígeno, fermentan azúcares y generan etanol como producto secundario. Dicho efecto se ha asociado a una estrategia denominada generar-acumular-consumir en la que el alcohol etílico generado le da una ventaja a la levadura para competir con otros microorganismos en su nicho ecológico debido a su mayor tolerancia al etanol y a que puede utilizar a esta molécula como fuente de carbono secundaria (Broach, 2012; Escalera-Fanjul, et al., 2019).

S. cerevisiae resulta interesante más allá de las virtudes que posee como modelo experimental debido a la presencia de bloques de genes duplicados (Wolfe, 2015), así como una serie de programas de regulación genética que dependen de la fuente de carbono y que le permiten a esta levadura adaptarse a diferentes condiciones ambientales como el pH, la osmolaridad, la disponibilidad de nutrientes, entre otras variables (Broach, 2012; Cullen & Sprague, 2012; Duan et al., 2018)

2.5.1 Alotetraploide ancestral

Desde que se obtuvo la secuencia de su genoma completo en 1996, se planteó la hipótesis de que *S. cerevisiae* derivase de un evento de WGD ancestral seguido de un extenso rearrreglo cromosómico (pérdida de genes y translocaciones) debido a la presencia de 551 pares de genes duplicados en 55 bloques dispersos entre sus

16 cromosomas, pero que conservaban la sintenia entre sí (Goffeau et al., 1996; Wolfe, 2015). Es decir, el arreglo de genes en uno de los bloques era el mismo que en alguno de los bloques presentes en otros cromosomas (Figura 5).

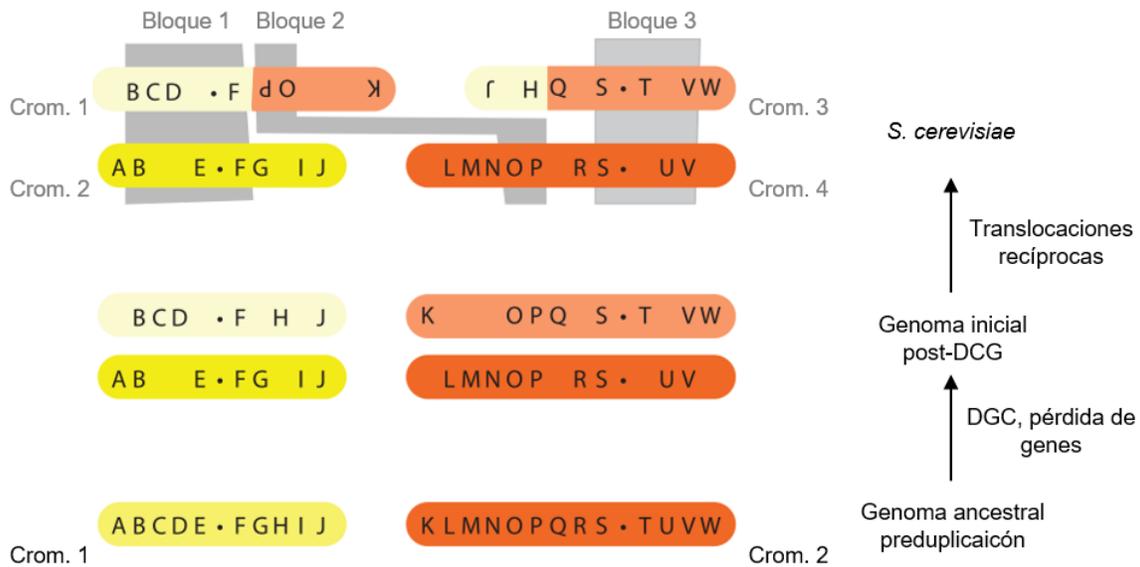


Figura 5. Rearreglo cromosómico luego de la WGD en *S. cerevisiae*. Los cromosomas de la especie pre-WGD se muestran con letras que representan genes y con puntos representando los centrómeros. Luego de la WGD, los rearrreglos cromosómicos dieron pie a la dispersión de bloques sinténicos que dan evidencia de la duplicación ancestral. En algunos casos, se dio la pérdida de algunos genes entre los bloques. Imagen modificada de Wolfe, 2015.

Fue hasta 2004 cuando se obtuvo la secuencia de los genomas de levaduras descendientes de aquellas que se separaron del linaje en que ocurrió la WGD, y por lo tanto pudo verificarse la hipótesis de la duplicación ancestral (Kellis, et al., 2004; Wolfe, 2015). Los genomas de las especies sin duplicación poseían una relación de doble sintenia con respecto al genoma de *S. cerevisiae*. Es decir, que ambos bloques sinténicos de genes duplicados en *S. cerevisiae* correspondían a una región del genoma de las levaduras pre-WGD. (Figura 6).

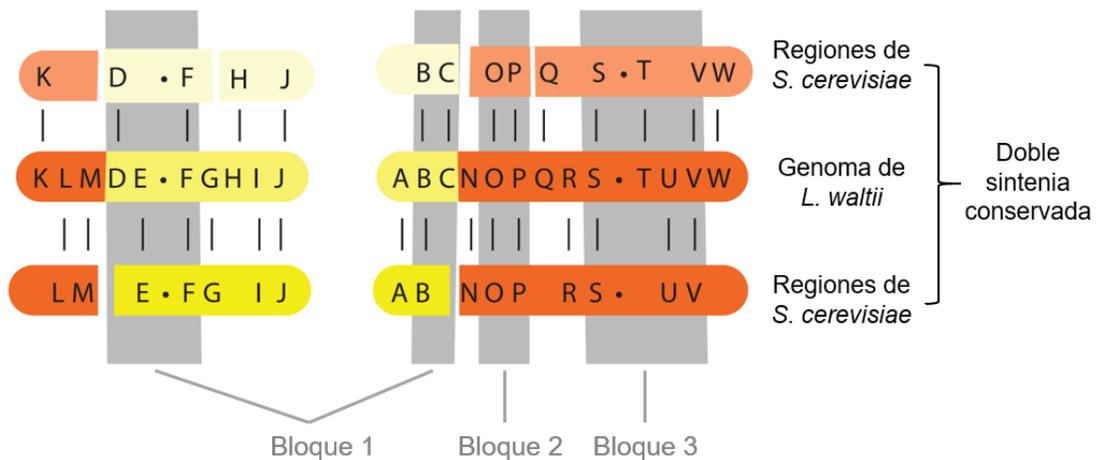


Figura 6. Relación de doble sintenia entre los bloques duplicados de *S. cerevisiae* con regiones del genoma de la levadura pre-WGD *Lachancea waltii*. Imagen tomada y modificada de Wolfe, 2015.

No obstante, como se mencionó antes, las WGD se deben a eventos autoploidización o de aloploidización y el caso de *S. cerevisiae* existía la hipótesis de que podría deberse a cualquiera de ambos eventos. En 2015, a través de análisis filogenéticos, se determinó que el evento de WGD realmente correspondió a una hibridación interespecífica (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). Al respecto, los autores determinaron que los genes pertenecientes a un par duplicado guardaban una similitud diferencial con los clados de levaduras pre-WGD que ellos denominaron KLE (por los géneros *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium*) y ZT (por los géneros *Zygosaccharomyces* y *Torulaspota*). De dichos análisis filogenéticos concluyeron que los genomas involucrados en la WGD que dio origen a *Saccharomyces* y a otros seis géneros provenían de linajes diferenciados dentro de la familia *Saccharomycetaceae* (Dujon & Louis, 2017). Asimismo, una consecuencia de este estudio es que los genes parálogos presentes en los géneros post-WGD son a su vez genes homeólogos por derivar de dos genomas distintos.

Adicionalmente, en ese mismo estudio se indicó que la mayoría de los genes presentes de duplicados se agrupaban en el clado ZT y solo una minoría del 30 % con el clado KLE. Los autores sostienen que este fenómeno es consecuencia de

una conversión génica sesgada que homogenizó las secuencias de los genes duplicados hacia aquellas presentes en el clado ZT, lo cual concuerda con el fenómeno de dominancia genómica observada en otros eventos de hibridación (Emery et al., 2018; Liang & Schnable, 2018)

Finalmente, debido a que los eventos de hibridación en general llevan a infertilidad, en el estudio mencionado se propusieron dos alternativas: 1) la fusión de células haploides y una posterior duplicación del contenido cromosómico; o 2) la fusión de células diploides. En ambos escenarios, el híbrido resultante posee pares de cromosomas homólogos que le permiten una recombinación y segregación exitosa durante la meiosis y, por tanto, la posibilidad de dejar descendencia fértil.

2.5.2 Regulación por fuente de carbono

A diferencia de las células de mamífero siempre presentes en un medio extracelular con un flujo constante de nutrientes, así como de factores de crecimiento y hormonas que regulan su desarrollo, *S. cerevisiae* es un hongo unicelular de vida libre en el que los nutrientes disponibles no sólo sirven como fuente de energía o de componentes estructurales, sino que funcionan como señales moleculares que guían programas de regulación genética particulares. Dichos programas le permiten a la levadura modular la duración de su ciclo celular, cambiar de un estado de rápida división mitótica a un crecimiento filamentoso, o bien, frenar su ciclo celular en diferentes estados de quiescencia cuando la disponibilidad de nutrientes es escasa (Broach, 2012).

S. cerevisiae utiliza las fuentes de carbono siguiendo un patrón jerárquico en el que se da preferencia a la glucosa o fructosa sobre cualquier otro azúcar, así como a fuentes de carbono fermentables sobre aquellas que requieran del metabolismo mitocondrial como el etanol, el glicerol, el lactato o los acetatos (Bhat, 2008; Broach, 2012). El patrón jerárquico mencionado se debe a la modificación alostérica de enzimas en las vías glucolítica y gluconeogénica, por el recambio de transportadores presentes en la membrana con diferentes afinidades por las fuentes

de carbono, así como por una extensa red de regulación genética (Broach, 2012; Schuller, 2003).

En línea con lo anterior, la preferencia por la fermentación de glucosa se debe al efecto de este azúcar de inducir el fenómeno de represión catabólica. Este se da por la represión de genes involucrados en el transporte y catabolismo inicial de otros azúcares, así como una represión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa y en la biogénesis mitocondrial cuando las levaduras están en presencia de glucosa o fructosa (Broach, 2012; Piškur & Compagno, 2014). Asimismo, la represión catabólica es la responsable del efecto *Crabtree* antes mencionado. Puesto que las dos moléculas de piruvato generadas por la glucólisis no pueden ser metabolizadas en la mitocondria por el ciclo de ácidos tricarboxílicos y la posterior fosforilación oxidativa dada la supresión de varios genes involucrados en estas dos vías bioquímicas, se canaliza el flujo metabólico hasta la formación de etanol a través de la fermentación (Kayikci & Nielsen, 2015; Piškur & Compagno, 2014).

Ahora bien, la reprogramación metabólica y transcripcional causada por las fuentes de carbono se deben a cambios en los perfiles de fosforilación de varias proteínas involucradas en el ciclo celular, en la biogénesis ribosomal, en transducción de señales y de respuesta a diferentes tipos de estrés, así como en factores de transcripción y modificadores de cromatina. Por ejemplo, cerca de 40 % de los genes de *S. cerevisiae* cambian sus niveles de transcripción como respuesta a la adición de glucosa a células crecidas en una fuente de carbono no fermentable, lo cual refleja el margen del genoma que se ve regulado en respuesta a dicho azúcar (Broach, 2012; Kresnowati et al., 2006).

Con respecto a esto, los cambios en la fisiología de la levadura causados por la glucosa son llevados a cabo por las vías de regulación general mostradas a continuación junto con los procesos celulares y metabólicos en los que intervienen (Figura 7) (Broach, 2012; Schuller, 2003):

- PKA (del inglés *Protein Kinase A*) y Ras: acumulación de masa y respuesta estrés.

- SNF (de las siglas en inglés *Sucrose Non-Fermenting*): uso de fuentes alternas de carbono, gluconeogénesis y supresión de la biosíntesis de aminoácidos.
- Complejo Hap: biogénesis mitocondrial y fosforilación oxidativa.
- RGT (de las siglas en inglés *Restore Glucose Transport*): regulación de transportadores de glucosa.
- Sch9: acumulación de masa; activada por la vía de TOR.

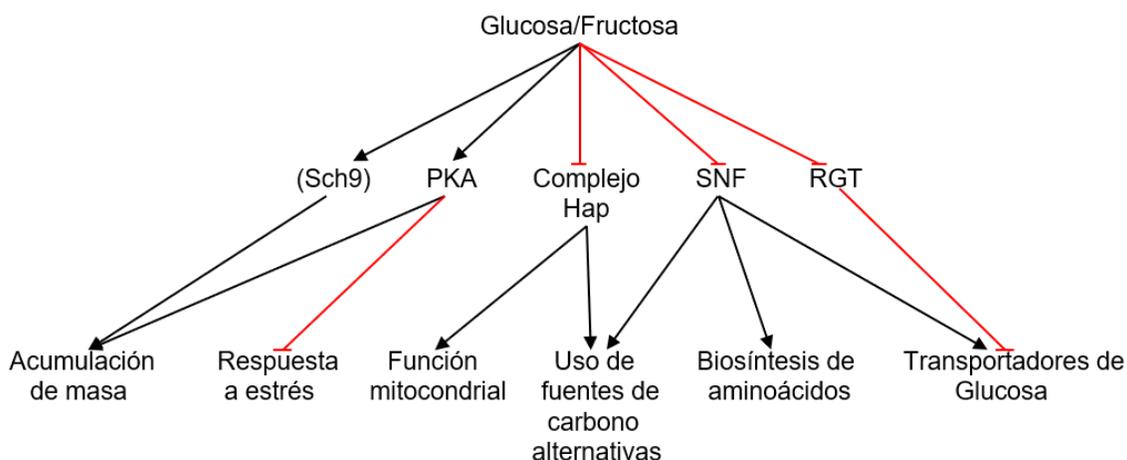


Figura 7. Vías de transducción de señales involucradas en la respuesta a glucosa. Muchas de las vías mostradas tienen blancos de regulación compartidos, por lo que hay respuestas redundantes ante la presencia de glucosa. En negro se indica una relación positiva y en rojo una relación negativa entre los elementos del esquema. Imagen modificada de Broach, 2012.

Como se mencionó antes, *S. cerevisiae* puede utilizar otros compuestos como fuente de carbono cuando la glucosa no se encuentra presente en su medio (Barnett, 1976). En este aspecto, existen programas transcripcionales que le permiten a la levadura el aprovechamiento óptimo de otros esqueletos de carbono (Gancedo, 1998; Schuller, 2003). Un caso particular es la utilización del azúcar galactosa, en donde el grupo de genes *GAL* regulan la expresión de los transportadores y las enzimas involucradas en su catabolismo inicial (Bhat, 2008; Kayikci & Nielsen, 2015).

Dado a que es una hexosa, los carbonos de la galactosa son conducidos por la vía glucolítica hasta la generación de piruvato. No obstante, a diferencia de la

glucosa, la galactosa no abate la actividad del complejo Hap y de la vía SNF, por lo que el metabolismo y la biogénesis mitocondrial no ven disminuida su actividad (Broach, 2012; Piškur & Compagno, 2014). En consecuencia, la levadura adquiere un fenotipo respiro-fermentativo (en contraste al fenotipo fermentativo cuando hay glucosa presente) en donde el flujo metabólico es dirigido tanto a la producción de etanol como a el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa.

En lo que respecta a la adquisición de fuentes de carbono no fermentables, ésta no se ve subordinada a un programa transcripcional particular para cada esqueleto de carbono. En cambio, su asimilación es consecuencia del alivio de la represión catabólica inducida por glucosa, así como de la desactivación de los genes involucrados en el catabolismo de otros azúcares (Broach, 2012; Klein, et al., 2017; Piškur & Compagno, 2014).

A nivel metabólico, las fuentes de carbono no fermentables entran en la vía glucolítica a nivel de la producción de dihidroxiacetona fosfato (DHAF) para el glicerol y de piruvato para los isómeros D- y L-lactato (Klein et al., 2017; Schuller, 2003). En el caso de los acetatos y el etanol, estos son conducidos a la producción directa de acetil-CoA (Schuller, 2003). Aunque la entrada diferencial de las fuentes de carbono no fermentables en la vía glucolítica trae como consecuencia variaciones en el flujo metabólico¹, los carbonos de estas moléculas son destinados al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y sus electrones se canalizan a la cadena de transporte de electrones para la generación de ATP (Piškur & Compagno, 2014; Schuller, 2003).

¹ e.g. La DHAF generada por el metabolismo del glicerol es también sustrato de la gluconeogénesis. Para que lo mismo ocurra con las otras moléculas mencionadas en el texto, primero deben ser metabolizadas por el ciclo del glioxilato para generar sustratos de la vía gluconeogénica (Klein et al., 2017).

2.6 EL COMPLEJO ASOCIADO A POLIPÉPTIDOS NACIENTES (*NASCENT-POLYPEPTIDE ASSOCIATED COMPLEX*)

El Complejo Asociado a polipéptidos Nacientes (NAC, por sus siglas en inglés) es una chaperona que, junto con RAC (siglas en inglés para el Complejo Asociado a Ribosomas, un sistema basado en chaperonas de las familias Hsp40 y Hsp70), se asocia al túnel de salida ribosomal y participa en el plegamiento temprano de las proteínas conforme emergen del ribosoma (Figura 8) (Gamerdinger et al., 2019; Wegrzyn, et al., 2006; Wiedmann, et al., 1994). Dicha chaperona es un heterodímero compuesto por una subunidad α y una subunidad β (α - y β -NAC, respectivamente) que se asocian entre sí a través de un dominio NAC homólogo presente en ambas subunidades y que adopta una conformación de barril β aplanado (Liu, et al., 2010; Spreter, et al., 2005). Asimismo, debido a la homología en los dominios NAC, se han reportado en estudios *in vitro* la formación de homodímeros de las subunidades de NAC (Nyathi & Pool, 2015; Spreter et al., 2005).

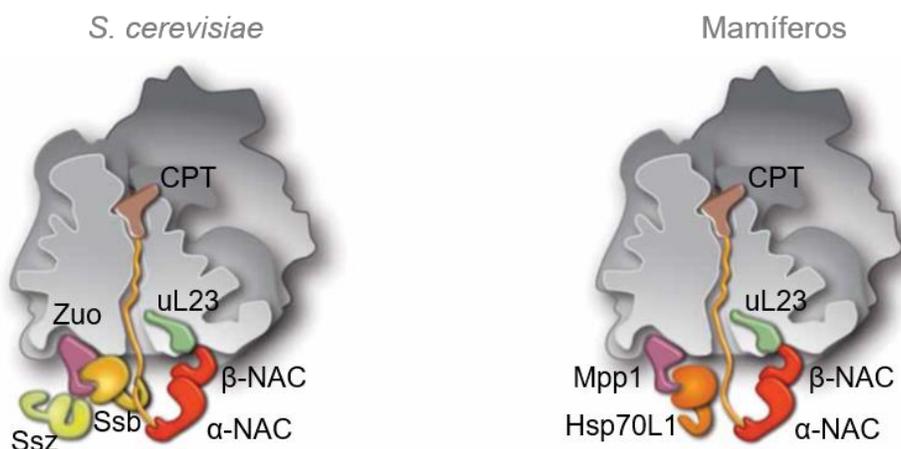


Figura 8. Chaperonas asociadas al túnel de salida del ribosoma en eucariontes. Representación de los complejos proteicos asociados a ribosomas que asisten el plegamiento temprano de proteínas. En ambos casos, NAC se muestra en rojo con sus diferentes subunidades y se indica la asociación de β -NAC con la proteína ribosomal uL23. Igualmente, se muestran los componentes de RAC en levaduras y mamíferos: Zuotin y Mpp1 forman parte de las cochaperonas de la familia Hsp40, aunque en levaduras la actividad de cochaperona recae en el heterodímero formado por Zuotin y Ssz. Ssb y Hsp70L1 son las chaperonas de la familia Hsp70 que completan el sistema. CPT: centro peptidil-transferasa. Tomada y modificada de Kramer, et al., 2009.

En eucariontes, NAC se asocia a las proteínas ribosomales eL31 y uL23 por medio de un motivo de unión a ribosomas conformado por un tramo de lisinas y argininas presente en el extremo N-terminal de la subunidad β -NAC (Wegrzyn et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que la subunidad α -NAC también interactúa con la superficie ribosomal a través de un tracto de aminoácidos básicos presente en su extremo N-terminal (Gamerding et al., 2019).

A diferencia de otros elementos asociados a los ribosomas como las enzimas de procesamiento postraduccionales de proteínas (aminopeptidasas de metionina o N-acetil transferasas) o el complejo RAC, NAC se expresa y une equimolarmente a los ribosomas, lo cual indica que este complejo posee un papel importante en la traducción de proteínas (del Alamo et al., 2011; Kramer, et al., 2009). Esto último se ve reforzado por el hecho de que mutaciones en los genes que codifican para las proteínas de este complejo resultan en letalidad embrionaria en gusanos, moscas y ratones (Bloss, et al., 2003; Bull, 1966; Deng & Behringer, 1995).

La asistencia en el plegamiento temprano de proteínas por parte de NAC se ha estudiado a través de diferentes enfoques desde su caracterización en 1994. Inicialmente, NAC fue caracterizado como un factor que aseguraba la especificidad de la Partícula de Reconocimiento de Señal (SRP por sus siglas en inglés) en el reconocimiento de los sustratos destinados al retículo endoplásmico (Wiedmann, et al., 1994) y, posteriormente, se determinó que NAC también era capaz de proteger de la acción de proteasas a péptidos nacientes del ribosoma (Wang, et al., 1995).

Por lo anterior, se infirió que dicho complejo actúa como una chaperona que permite que las señales halladas en los extremos N-terminal de las proteínas sean reconocidas con fidelidad por los sistemas de importación a compartimentos membranosos como el sistema SRP-Sec61 (del Alamo et al., 2011; Möller et al., 1998; Wang et al., 1995) e inclusive por la maquinaria de importación mitocondrial (George, et al., 2002).

Más tarde, estudios realizados en *Caenorhabditis elegans* reforzaron tal afirmación al determinar que, en ausencia de NAC, algunas proteínas mitocondriales son importadas erróneamente al Retículo Endoplásmico (RE)

(Gamerding, et al., 2015), y que defectos en la asociación de NAC a los ribosomas por sustituciones realizadas en los motivos de unión de α - y β -NAC inducían estrés del RE (Gamerding et al., 2019).

En *S. cerevisiae*, a diferencia de otros eucariontes en los que se ha estudiado a NAC, las mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de este complejo no resultan en fenotipos letales ni en defectos en el crecimiento en condiciones estándar de laboratorio. Además, debido a la WGD acaecida en este organismo, existen tres genes que codifican para los componentes de NAC: los genes parálogos *EGD1* y *BTT1* codificantes de las subunidades β 1- y β 2-NAC (Figura 9) y el gen *EGD2* que codifica para la subunidad α -NAC (del Alamo et al., 2011; Hu & Ronne, 1994).

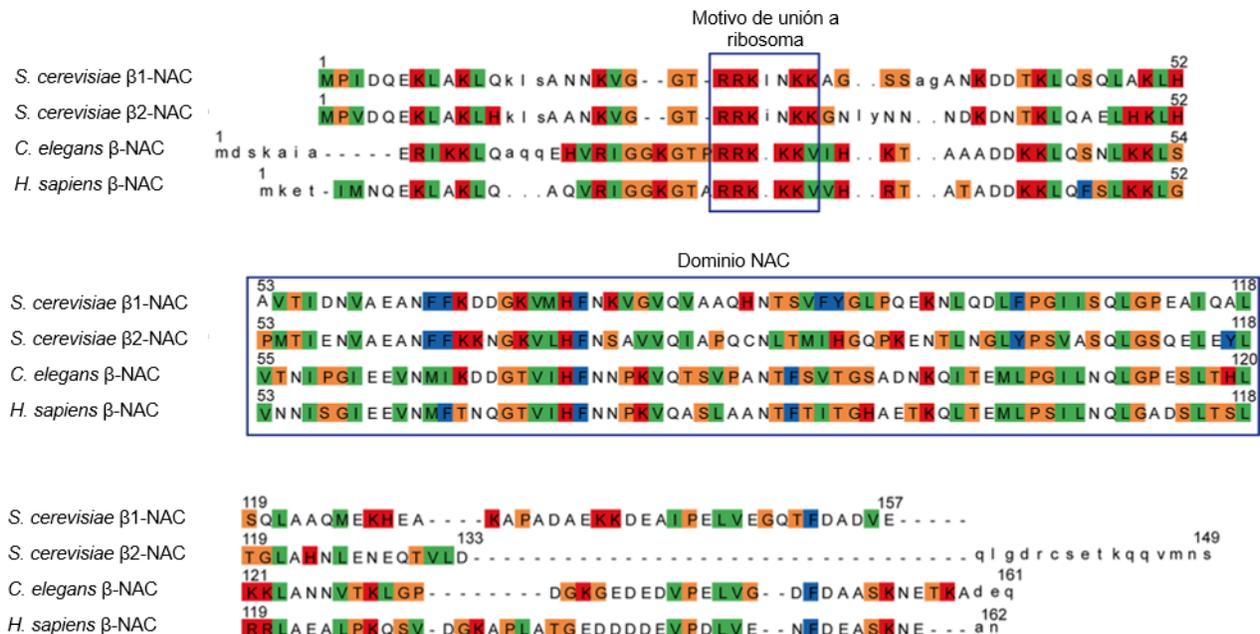


Figura 9. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las subunidades β -NAC de diferentes organismos. Alineamiento generado y reportado en Ott, et al., 2015 en el que se destaca el motivo de unión a ribosoma y el dominio NAC de las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *H. sapiens*. Se indican en letras minúsculas los aminoácidos presentes en sólo una especie y, por medio de puntos, los espacios insertados para alinear el resto de las secuencias. El extremo C-terminal de β 2-NAC de *S. cerevisiae* no pudo ser alineado con el resto de secuencias y se añadió como un inserto al final de la secuencia. Código de colores de los aminoácidos: naranja = hidrofílicos pequeños, verde = hidrofóbicos pequeños, rojo = alcalinos, azul = aromáticos y sin color: ácidos, amidas y sulfhidrilos. Tomado y modificado de Ott, et al., 2015.

EGD1 y *BTT1* son genes parálogos que codifican a las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae* (Hu & Ronne, 1994). Estos tuvieron su origen en la aloploidización que ocurrió en la familia *Saccharomycetaceae*, por lo que constituyen un par de genes homeólogos. Tal hecho se pone en evidencia cuando se examinan las regiones genómicas de *EGD1* y *BTT1* y se encuentra que ambos poseen, río abajo de sus marcos de lectura, a los genes que codifican a los reguladores del metabolismo de metionina *MET31* y *MET 32*, respectivamente (Goffeau et al., 1996). Aunque no se ha evaluado si hay una relación funcional entre ambos pares de genes, así como la presencia subunidades β -NAC duplicadas en otras levaduras post-WGD, esto indicaría que forman parte de un bloque sinténico de genes originado en la WGD (Figura 5). Sin embargo, dado que los genes que codifican a las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae* forman parte de un bloque sinténico, es de esperar que al menos otras especies del género *Saccharomyces* también posean a dicho par de genes homeólogos.

Con respecto a las funciones de NAC de *S. cerevisiae*, diversos estudios se han realizado para dilucidar sus características moleculares, así como el papel de las subunidades β -NAC duplicadas en la fisiología de la levadura. Se resumen a continuación las conclusiones más relevantes de estos trabajos:

1. Existe una diferencia de 100 veces en la expresión entre los genes parálogos *EGD1* y *BTT1*. Este último parece actuar como factor de transcripción dado que, en su ausencia, algunos genes involucrados con el metabolismo de galactosa ven alterado su patrón de regulación (Hu & Ronne, 1994).
2. En levadura, $\alpha\beta$ -NAC es importante para asegurar el reconocimiento de proteínas por parte de SRP para la correcta importación al RE (Wiedmann & Prehn, 1999).
3. $\alpha\beta$ -NAC es importante para la asociación de ribosomas a la superficie de la mitocondria. En ausencia de NAC, algunas proteínas mitocondriales se ven disminuidas (George, et al., 2002).
4. NAC y RAC colaboran en el plegamiento temprano de proteínas y en la biogénesis ribosomal (Koplin, et al., 2010).

5. β 1- y β 2-NAC se asocian diferencialmente a ribosomas: A la vez que β 1-NAC se asocia a ribosomas unidos a RNAm codificantes para proteínas de la vía de secreción y citosólicas, β 2-NAC hace lo propio con ribosomas unidos a RNAm de proteínas mitocondriales (del Alamo, et al., 2011).
6. OM14 es determinado como un receptor de la membrana externa mitocondrial para ribosomas asociados al heterodímero $\alpha\beta$ 1-NAC. (Lesnik, et al., 2014)
7. Los heterodímeros $\alpha\beta$ 1-NAC y $\alpha\beta$ 2-NAC son funcionalmente distintos. La función de chaperona del plegamiento temprano de proteínas recae en el primer heterodímero. El dominio asociado a ubiquitina presente en α -NAC regula la actividad de chaperona de NAC (Ott, et al., 2015).
8. Las subunidades β 1- y β 2-NAC poseen una similitud del 64.3 % y una identidad del 46.5 %, y difieren en su mayoría en su extremo carboxilo terminal (Figura 9) (Ott, et al., 2015).
9. Sam37, una proteína parte del complejo SAM de ensamblaje de barriles β en la membrana externa mitocondria y el heterodímero $\alpha\beta$ 2-NAC están relacionados funcionalmente en la importación cotraduccional de algunas proteínas (Ponce-Rojas et al., 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

NAC es una chaperona cuya función se ha relacionado con la asistencia del plegamiento temprano de proteínas. De igual modo, se le ha implicado con la fidelidad en el reconocimiento de señales de destino subcelular por parte de las maquinarias de importación del RE debido a su anclaje a los ribosomas y a los efectos deletéreos que algunos organismos modelo presentan por la ausencia de este complejo proteico. Asimismo, se ha determinado que NAC también está relacionado de algún modo con la importación de proteínas a la mitocondria, hecho particularmente estudiado en *S. cerevisiae* por la ausencia de fenotipos letales causados por la ausencia de NAC.

S. cerevisiae desciende de un evento de aloploidización el cual dio pie a una WGD. Por tal suceso, NAC posee genes parálogos que codifican dos subunidades β -NAC a diferencia de otros eucariontes. Un fenómeno común en las duplicaciones génicas es la divergencia de función y de regulación (neofuncionalización), o bien, un reparto de las funciones y de la regulación del gen ancestral a los dos genes modernos (subfuncionalización). En línea con esto, se ha demostrado que las subunidades $\beta 1$ - y $\beta 2$ -NAC de *S. cerevisiae* poseen funciones divergentes por su asociación a diferentes subgrupos de ribosomas, por las diferencias en la asistencia en el plegamiento temprano de proteínas y por su relación funcional con elementos de la membrana externa mitocondrial.

A pesar de ello, poco se sabe de la regulación de la expresión de los genes parálogos a pesar de que, desde la caracterización inicial de NAC de levadura, es sabido que los parálogos poseen una diferencia en expresión de casi 100 veces.

Debido a que *S. cerevisiae* regula un gran grupo de genes en función de la fuente de carbono disponible a través de fenómenos como la represión catabólica, y dado que la subunidad $\beta 2$ -NAC está relacionada funcionalmente con la importación mitocondrial, es posible que exista un efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los genes parálogos *EGD1* y *BTT1*. Además, dado que $\beta 1$ -NAC tiene una mayor participación en procesos centrales como el plegamiento proteico temprano es factible que su regulación sea constitutiva y que a su vez sea

modulada por fenómenos que comprometan la estabilidad y la síntesis proteica tales como el estrés oxidante y térmico. En contraste, β 2- NAC está relacionado con el fenómeno de la importación mitocondrial, tanto a nivel de la asociación con ribosomas cargados con RNAm de proteínas mitocondriales como a nivel de la interacción con componentes de la membrana externa mitocondrial. Probablemente, fuentes de carbono que induzcan el metabolismo mitocondrial tengan algún efecto sobre la regulación de β 2- NAC.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se regula la expresión de las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae*?

5. HIPÓTESIS

La expresión de los genes codificantes para las subunidades β -NAC está regulada diferencialmente: mientras que la expresión de *EGD1* es constitutiva, *BTT1* se regula al alza en fuentes de carbono no fermentables.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la fuente de carbono y el estrés oxidante sobre la expresión de los genes codificantes para las subunidades β -NAC

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Etiquetar los genes *EGD1* y *BTT1* con epítomos de hemaglutinina en cepa silvestres y mutantes sencillas para los componentes de NAC en *S. cerevisiae*.
- Relocalizar los ORF de los genes *EGD1* y *BTT1* etiquetados para reemplazar los parálogos en su contexto silvestre en cepas mutantes para los genes relocalizados.
- Analizar el fenotipo de crecimiento y la sensibilidad a estrés oxidante de las cepas mutantes para los genes de NAC y las cepas con los parálogos relocalizados en fuentes de carbono fermentables y no fermentables.
- Evaluar los niveles proteicos de las proteínas Egd1-3HA y Btt1-3HA en las diferentes cepas generadas crecidas en fuentes de carbono fermentables y no fermentables.
- Evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la transcripción del gen *BTT1* utilizando un reportero transcripcional en donde el gen *lacZ* se regule bajo el promotor del gen mencionado.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 CEPAS

a) Cepas de levadura (*S. cerevisiae*).

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae*

Nombre	Fondo silvestre	Genotipo	Referencia
WT	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al., 1998
$\Delta\alpha$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd2Δ0::KanMX4</i>	Ponce-Rojas et al., 2017
$\Delta\beta_1$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd1Δ0::KanMX4</i>	Ponce-Rojas et al., 2017
$\Delta\beta_2$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 btt1Δ0::KanMX4</i>	Ponce-Rojas et al., 2017
Δnac	Y8205	<i>MATa can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 egd1Δ0::hph btt1Δ0::caURA3 egd2Δ0::nat1</i>	Ponce-Rojas et al., 2017
β_1	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 EGD1-3HA::hph</i>	Este trabajo
β_2	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BTT1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$P^{\beta_2}\beta_1$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd1Δ0::KanMX4 btt1Δ0::EGD1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$P^{\beta_1}\beta_2$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 btt1Δ0::KanMX4 egd1Δ0::BTT1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$\beta_2^{\Delta\beta_1}$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd1Δ0::KanMX4 BTT1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$\beta_1^{\Delta\beta_2}$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 btt1Δ0::KanMX4 EGD1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$\beta_1^{\Delta\alpha}$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd2Δ0::KanMX4 EGD1-3HA::hph</i>	Este trabajo
$\beta_2^{\Delta\alpha}$	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd2Δ0::KanMX4 BTT1-3HA::hph</i>	Este trabajo
WT [p β_2 Z]	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 [pRS316-P_{BTT1} - LacZ-Ter_{BTT1}]</i>	Este trabajo
$\Delta\beta_1$ [p β_2 Z]	BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 egd1Δ0::KanMX4 [pRS316-P_{BTT1}-LacZ-Ter_{BTT1}]</i>	Este trabajo

b) Cepas de bacterias

- *E.coli DH5α* (Promega)

Genotipo: F- Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supEAA* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

8.2 PLÁSMIDOS

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el estudio

Nombre	Modulo amplificado	Marcador de selección en <i>S. cerevisiae</i>	Marcador de selección en <i>E. coli</i>	Referencia
pYM24	<i>3HA-hph</i>	<i>hph</i>	<i>Amp</i>	Janke et al., 2004
pRS316	Utilizado como vector de clonación	<i>URA3</i>	<i>Amp</i>	Sikorski & Hieter, 1989
pSH18-34	<i>lacZ</i>	<i>URA3</i>	<i>Amp</i>	Golemis, Serebriiskii, Finley, Gyuris, & Brent, 2001

8.3 DESOXIOLIGONUCLEÓTIDOS

En la Tabla siguiente se muestran los desoxioligonucleótidos diseñados y utilizados en este trabajo. En cada caso se especifica si cada par de desoxioligonucleótidos se utilizó para generar cepas mutantes por recombinación homóloga o si se utilizó para el proceso de clonación. Igualmente, se especifica el sitio de inserción o si se genera un sitio de restricción. Además, también se especifica si el oligonucleótido es sentido (F) o antisentido (R) si es que el nombre de este no lo indica.

Tabla 3. Desoxioligonucleótidos diseñados en este estudio

Nombre	Función	Secuencia (5' – 3')
JAB01 (F)	Reemplazo del codón de paro de <i>EGD1</i> por <i>3HA::hph</i>	AGAGTTAGTTGAAGGTCAAACCTTTTGATGCTGAC
JAB02 (R)		GTCGAATACCCATACGATGTTCCCTGACTATG
JAB03 (F)	Reemplazo del ORF de <i>BTT1</i> por el gen <i>EGD1-3HA::hph</i>	GCTAAATTAATAAACTACTACATAATCCTACAAC
JAB04 (R)		ATCAAATGCCAATTGACCAAGAAAAATTAG
JAB05 (F)	Reemplazo del codón de paro de <i>BTT1</i> por <i>3HA::hph</i>	CGACAGATGCAGCGAGACAAAACAACAAGTGATG
JAB06 (R)		AATAGCTACCCATACGATGTTCCCTGACTATG
JAB07 (F)	Reemplazo del ORF de <i>EGD1</i> por el gen <i>BTT1-3HA::hph</i>	CACTAGCTATAACGTTTACTGGCAATTATTATGAA
		CTATGTTAAAGCCTTCGAGCGTCCCAAAAC
		GAATAGAACATCTCACACCAGACGCGACTCATAA
		TTCATAATGCCTGTAGATCAAGAAAAATTAG

JAB08 (R)		GTGTTTTTTTTATTTAACGTTAAAATTAAGATTAA GTTATTTAAAGCCTTCGAGCGTCCCAAAC
JAB25 (F)	Adición del sitio Sall en el extremo 5' del P_{BTT1}	ATCGT CGAC GCATGGAGGTA CTCTTTCG
JAB26 (R)	Adición del sitio XmaI en el extremo 3' del P_{BTT1}	TG CCCCGG TATGAATTATGAGTCGCGTC
JAB27 (F)	Adición del sitio SpeI en el extremo 5' del Ter_{BTT1}	AT CACTAG TATAACTTAATCTTTAATTTAAC
JAB28 (R)	Adición del sitio XbaI en el extremo 3' del Ter_{BTT1}	CG CTTAGA TTTGCCAGGAAGGATGCTC
LacZ F	Adición del sitio XmaI en el extremo 5' de <i>lacZ</i>	GCG CCCCGG GATGACTAAATCTCATT CAGA
LacZ R	Adición del sitio SpeI en el extremo 3' de <i>lacZ</i>	GCG ACTAG TTTATTTTTGACACCAGACCA
Butb1 (F)	Validación de gen <i>EGD1</i>	GGGGCGGCCCGCGTTATGAATTAATCTCTTGG
Terb1 (R)		TTGACCTTCAACTAACTCTGG
Flyb2 (F)	Validación del gen <i>BTT1</i>	GCGGGCGGCCGCTTTCCAATCCAATAATCCG
Effb2 (R)		ATACTCAAGTTCTTGGCTAC
EctaF	Validación del gen <i>EGD2</i>	GCGGGCGGCCGCTAAAAGGGAAAGTTGCAGTG
HygRev	Validación del <i>cassette hph</i>	GCAATCGCGCATATGAAATC
KanRev	Validación del <i>cassette KanMX4</i>	GGCAGTTCCATAGGCTGGCA

8.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos mencionados en el apartado 8.2 fueron extraídos de células de *E. coli* DH5 α previamente transformadas y almacenadas en nuestro laboratorio. Brevemente, se generaron cultivos por estría cruzada de cada una de las cepas transformadas con los plásmidos mencionados en agar LB + ampicilina 100 μ g/mL y se dejaron crecer durante 16 horas a 37 °C (la composición de los medios de cultivo se encuentra en el anexo). Al siguiente día, se tomó una colonia aislada de cada caja de cultivo, se inoculó en 100 mL de medio LB + ampicilina y se incubó a 37 °C y agitación a 200 rpm durante 16 horas.

Más tarde, se recolectaron las células en tubos graduados de 50 mL por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos y se recuperaron los plásmidos con el

kit Wizard Plus SV Midiprep DNA Purification (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

8.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE MÓDULOS PARA ETIQUETAR LOS GENES *EGD1* Y *BTT1*

A partir del plásmido pYM24 que posee codificadas tres etiquetas del epítipo de hemaglutinina río arriba del módulo de resistencia *hph* (*3HA::hph*), se realizó una reacción de PCR para etiquetar cada gen parálogo utilizando a los oligonucleótidos JAB01,02 para *EGD1* y JAB05,06 para *BTT1*. En ambos casos, cada par de oligonucleótidos consta de 60 pares de bases en los que los primeros 40 nucleótidos en sentido 5' - 3' son idénticos a los 40 nucleótidos río arriba (oligonucleótidos F) y río abajo (oligonucleótidos R) del codón de paro de cada gen en cuestión. Los 20 nucleótidos restantes son complementarios con el módulo *3HA::hph* y permiten su amplificación (paso 1 de la Figura 10)

Para cada reacción de amplificación se utilizaron los siguientes componentes: 0.5 μ mol de cada oligonucleótido, 10 ng de DNA plasmídico, 25 μ L de 2X Phusion Master Mix (Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer, New England BioLabs) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones utilizadas para las reacciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor:

Fase inicial:

- Desnaturalización inicial: 98 °C, 30 s

30 ciclos de repetición:

- Desnaturalización: 98 °C, 10 s
- Alineamiento: 55 °C, 30 s
- Extensión: 72 °C, 1 min (1778 pb amplicón; 30s/1kb)

Fase final:

- Extensión final: 72 °C, 5 min

Se tomaron en cada caso 5 μ L de cada reacción y se verificó la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x.

8.6 GENERACIÓN DE CEPAS ETIQUETADAS CON 3HA EN LOS GENES *EGD1* Y *BTT1*

Se generaron cepas mutantes de levaduras en las que se etiquetaron a los genes *EGD1* y *BTT1* con el módulo *3HA::hph* (paso 2 de la Figura 10) siguiendo el protocolo de transformación acetato de litio/DNA acarreador (Gietz, 2014).

Brevemente, se tomó una colonia aislada de las cepas *WT*, $\Delta\alpha$, $\Delta\beta1$ y $\Delta\beta2$, se inocularon en 5 mL de medio YPD y se incubaron por 16 horas a 30 °C a 200 rpm de agitación. A la mañana siguiente se midieron las densidades ópticas de los cultivos y se realizaron diluciones a una $DO_{600}=0.3$ en 5 mL de medio YPD. Se dejaron crecer durante tres horas hasta una DO_{600} entre 0.7 y 1.0. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se centrifugaron las células a 8609 g durante dos minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavaron los botones celulares con 500 μ L de agua desionizada estéril. Se centrifugaron de nuevo a 8609 g durante dos minutos, se desechó el sobrenadante y se incubaron por 10 minutos con 1 mL de acetato de litio 0.1 M. Se centrifugó a la velocidad y tiempo ya mencionados, y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron a los botones celulares las siguientes soluciones en el orden mencionado:

- 240 μ L de polietilenglicol 3350 50% w/v,
- 36 μ L de acetato de litio 1 M,
- 10 μ L de DNA de esperma de salmón (10 mg/mL)
- 45 μ L de los productos de amplificación del apartado anterior
- 24 μ L de agua desionizada estéril

Luego, se resuspendieron las células vigorosamente y se incubaron a 42 °C durante 45 minutos. Se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μ L de agua desionizada estéril. Las células se sembraron en medio no selectivo durante 48 horas a 30 °C. Una vez obtenido un césped de células de cada cepa transformante, se replicaron en medio selectivo y se incubaron por 48 horas a 30 °C para el aislamiento de colonias resistentes.

En la tabla de abajo se especifican las cepas mutantes generadas con este método, las cepas a partir de las cuales se generaron y los medios selectivos y no selectivos utilizados.

Tabla 4. Cepas mutantes generadas y marcadores de selección utilizados

Cepa original (mutaciones)	Gen etiquetado	Medio no selectivo	Medio selectivo	Cepa generada (mutación generada)
<i>WT</i>	<i>EGD1</i>	YPD	YPD + higromicina	$\beta 1$ (<i>EGD1-3HA::hph</i>)
<i>WT</i>	<i>BTT1</i>	YPD	YPD + higromicina	$\beta 2$ (<i>BTT1-3HA::hph</i>)
$\Delta\beta 2$ (<i>btt1\Delta 0::KanMX4</i>)	<i>EGD1</i>	YPD + G418	YPD + G418 + higromicina	$\beta 1^{\Delta\beta 2}$ (<i>EGD1-3HA::hph</i>)
$\Delta\beta 1$ (<i>egd1\Delta 0::KanMX4</i>)	<i>BTT1</i>	YPD + G418	YPD + G418 + higromicina	$\beta 2^{\Delta\beta 1}$ (<i>BTT1-3HA::hph</i>)
$\Delta\alpha$ (<i>egd2\Delta 0::KanMX4</i>)	<i>EGD1</i>	YPD + G418	YPD + G418 + higromicina	$\beta 1^{\Delta\alpha}$ (<i>EGD1-3HA::hph</i>)
$\Delta\alpha$ (<i>egd2\Delta 0::KanMX4</i>)	<i>BTT1</i>	YPD + G418	YPD + G418 + higromicina	$\beta 2^{\Delta\alpha}$ (<i>BTT1-3HA::hph</i>)

8.7 PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO DE LEVADURA

Para analizar y validar las cepas mencionadas en el apartado anterior, se extrajo el DNA genómico de estas con un protocolo modificado a partir del reportado en Johnson, Smith, & Schneider, 2014.

Con este fin, se tomó una colonia aislada de cada cepa, se inoculó en 5 mL de medio YPD y se incubó durante 16 horas a 30 °C y 200 rpm de agitación. Al día siguiente, se tomó un 1 mL de cada cultivo y se centrifugó por un minuto a 13200 g, se descartó el sobrenadante y se lavaron los botones celulares con 500 μ L de agua desionizada. Se centrifugó al igual que en el paso anterior y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron los botones celulares en 200 μ L de amortiguador de lisis (véase Anexo), se les agregó 200 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (en una relación 25:24:1) y se agitaron en vórtex durante tres minutos. Luego, se centrifugó a 13200 g durante 5 minutos a 4 °C, se

recuperaron 200 μL de la fase acuosa y se precipitó agregando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol al 98 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se incubó durante 20 minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Más tarde, se centrifugó a 13200 g durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron los botones de DNA en con 1 mL de etanol al 70 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó por un minuto a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó el sobrenadante y el botón resultante se resuspendió en 50 μL de agua libre de nucleasas después de dejar evaporar el etanol sobrante.

8.8 GENERACIÓN DE CEPAS CON *EGD1* Y *BTT1* RELOCALIZADOS Y ETIQUETADOS CON 3HA

Para evaluar si la regulación de los genes parálogos codificantes para las subunidades β -NAC depende del contexto genómico en que se encuentran, se relocalizaron los ORF de *EGD1* y *BTT1* cambiándolos al locus genómico de su parálogo. Para esto, se partió del DNA genómico de las cepas $\beta 1$ y $\beta 2$ y de los pares de oligonucleótidos JAB03,04 y JAB07,08 para amplificar a los genes etiquetados *EGD1-3HA::hph* y *BTT1-3HA::hph*, respectivamente. De manera similar a los oligonucleótidos mencionados en el apartado 3.5, los oligonucleótidos JAB03,04 y JAB07,08 constan de 60 nucleótidos de los cuales los primeros 40 en sentido 5'-3' son idénticos a la región río arriba del codón de inicio de la traducción del parálogo a reemplazar (oligonucleótidos F), o idénticos a la región río abajo del codón de paro del parálogo blanco (oligonucleótidos R). Los 20 nucleótidos restantes permiten amplificar *EGD1-3HA::hph* a partir del par JAB03,04, o amplificar *BTT1-3HA::hph* usando el par JAB07,08 (paso 3 de la Figura 10)

Para amplificar los genes deseados a partir de las cepas $\beta 1$ y $\beta 2$, se realizaron reacciones de amplificación por PCR con los siguientes componentes: 0.5 μmol de cada oligonucleótido, 100 ng de DNA genómico de las cepas mencionadas, 25 μL de 2X Phusion Master Mix (*Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer*, New England BioLabs) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 μL .

Las condiciones para las reacciones de amplificación fueron las siguientes:

Fase inicial:

- Desnaturalización inicial: 98 °C, 30 s

30 ciclos de repetición:

- Desnaturalización: 98 °C, 10 s
- Alineamiento: 55 °C, 30 s
- Extensión: 72 °C, 1:15 min (2250-2300 pb amplicones; 30s/1kb)

Fase final:

- Extensión final: 72 °C, 5 min

Se tomaron 5 μ L de cada reacción y se verificó la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x.

Una vez obtenidos los amplicones *EGD1-3HA::hph* y *BTT1-3HA::hph*, se transformaron con estos a las cepas $\Delta\beta 2$ y $\Delta\beta 1$, respectivamente, siguiendo el protocolo de transformación detallado en el apartado 3.6. En la tabla siguiente se muestran las cepas generadas y los medios utilizados para su selección. Se escogieron a las cepas $\Delta\beta 2$ y $\Delta\beta 1$ para ser transformadas con los amplicones indicados debido a que solo se encontraría una copia del gen de interés etiquetado sin la intervención del mismo gen en su entorno genómico silvestre (paso 4 de la Figura 10).

Tabla 5. Medios de selección y ORFs reemplazados

Cepa original (mutaciones)	ORF reemplazado	Medio no selectivo	Medio selectivo	Cepa generada (mutación generada)
$\Delta\beta 1$ (<i>egd1Δ0::Kan</i> MX4)	<i>BTT1 -> EGD1-3HA::hph</i> <i>NTI</i>	YPD +G418	YPD + higromicina + G418	$P^{\beta 2}\beta 1$ (<i>btt1Δ0::EGD1-3HA::hph</i>)
$\Delta\beta 2$ (<i>btt1Δ0::Kan</i> MX4)	<i>EGD1 -> BTT1-3HA::hph</i>	YPD + G418	YPD + higromicina +G41	$P^{\beta 1}\beta 2$ (<i>egd1Δ0::BTT1-3HA::hph</i>)

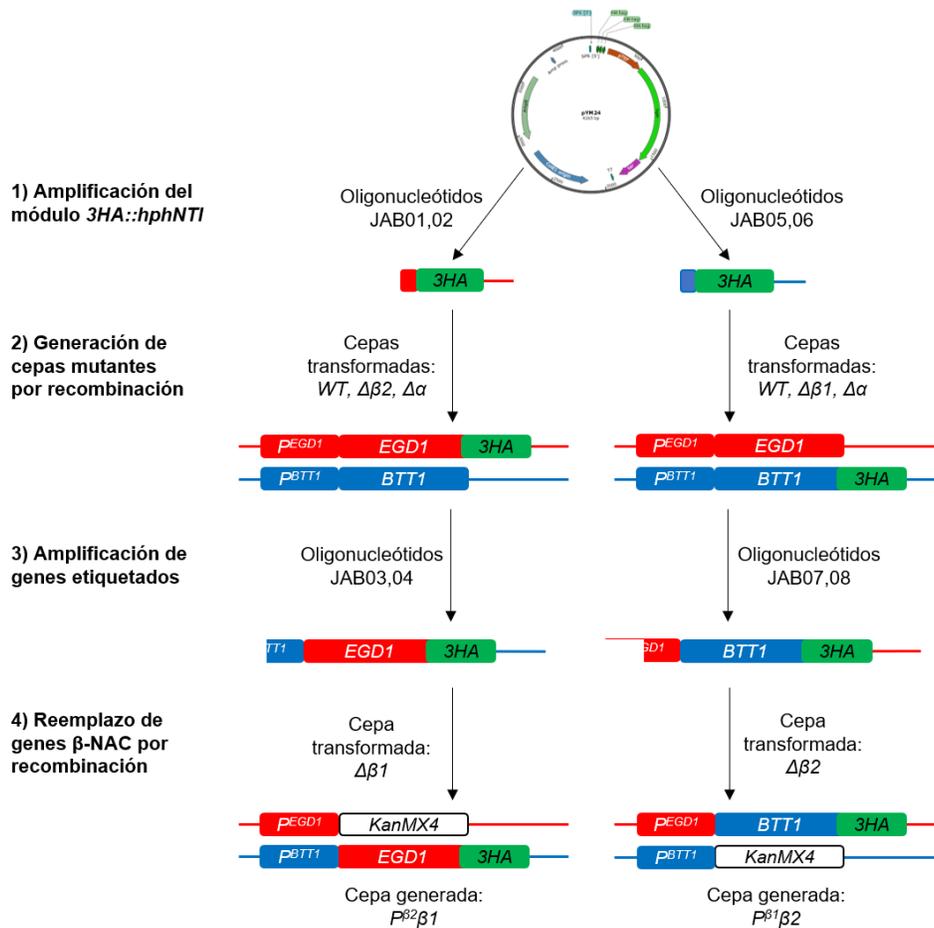


Figura 10. Representación esquemática del proceso de generación de las cepas mutantes usadas en este estudio. Se amplificaron por PCR tres etiquetas de hemaglutinina junto con el módulo de resistencia *hph* (indicado en la figura como 3HA) para recombinarse por homología en los genes *EGD1* y *BTT1*. Los genes *EGD1* y *BTT1* etiquetados fueron amplificados por PCR y se les añadieron regiones de homología a los extremos 5' y 3' UTR de los genes *BTT1* y *EGD1*, respectivamente. Posteriormente, los amplicones se utilizaron para transformar a las cepas $\Delta\beta 1$ y $\Delta\beta 2$, y generar las cepas indicadas en la figura.

8.9 VALIDACIÓN DE CEPAS DE LEVADURA MUTANTES

La validación de las cepas generadas se realizó a través de reacciones de amplificación por PCR. Cada reacción tuvo los siguientes componentes: 0.5 U *Taq* polimerasa (KAPA Biosystems), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 0.5 μ mol de cada oligonucleótido, 100 ng de DNA genómico y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 μ L. Se siguieron las recomendaciones

de proveedor para las condiciones de amplificación, las cuales se indican a continuación:

Fase inicial:

- Desnaturalización inicial: 95 °C, 3 min

30 ciclos de repetición:

- Desnaturalización: 95 °C, 30 s
- Alineamiento: 55 °C, 30 s
- Extensión: 72 °C, tiempo ajustado para cada amplicón con base en la velocidad de síntesis de la enzima utilizada (1 kb/min)

Fase final:

- Extensión final: 72 °C, 5 min

Los productos de amplificación se validaron por electroforesis en gel de agarosa y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

8.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Todas las reacciones de amplificación por PCR y las reacciones de restricción, fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% w/v en amortiguador TAE 1x. En cada ocasión, se agregó Gel Red 3X y amortiguador de corrida 6X ajustados de tal manera que, en el volumen final, ambos quedasen en una concentración 1X. Las electroforesis fueron llevadas a cabo a 100 V y fueron observadas en un transiluminador.

8.11 ENSAYO DE SENSIBILIDAD A ESTRÉS OXIDANTE

Para evaluar si las mutantes $P_{\beta_1\beta_2}$ y $P_{\beta_1\beta_2}$ presentaban anomalías en su fenotipo de crecimiento en diferentes fuentes de carbono o un cambio en la resistencia al estrés oxidante comparadas con la cepa silvestre *WT*, las mutantes sencillas $\Delta\beta_1$, $\Delta\beta_2$ y $\Delta\alpha$ o la cepa tripe mutante Δnac , se realizaron ensayos de crecimiento por

diluciones seriadas. En este ensayo se evaluaron tanto la sensibilidad a un pulso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como el fenotipo de crecimiento en medios de cultivo con una fuente de carbono fermentable (agar YPD) o con una no fermentable (agar YPEG).

El ensayo se realizó del siguiente modo. Se inoculó una colonia aislada de cada cepa en cuestión en 5 mL de medio YPD y se dejó crecer durante 16 horas a 30 °C y 200 rpm de agitación. Una vez pasado ese tiempo, se midió la densidad óptica de los cultivos y se realizaron dos diluciones en 5 mL de medio fresco YPD hasta una $DO_{600}=0.3$. Una vez realizadas las diluciones, se dejaron crecer los cultivos durante 3 horas a 30 °C y 200 rpm de agitación hasta un DO_{600} entre 0.7 y 1.0. Más tarde, a uno de los grupos de cultivos se les agregó H_2O_2 hasta una concentración final de 7.5 mM y se incubó junto con el grupo sin tratar durante tres horas más en las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se midió la densidad óptica y se recuperó la cantidad necesaria de cada cultivo para tener una unidad de DO_{600} en 1 mL de volumen. Después, se centrifugó durante 5 minutos a 8609 g y se desechó el sobrenadante. Los botones celulares se lavaron con 500 μ L de agua desionizada estéril y se centrifugaron por 5 minutos más a la velocidad mencionada y se descartó el sobrenadante. Cada botón celular resultante se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril y a partir de aquí se realizaron las diluciones seriadas en 100 μ L de volumen final en el siguiente orden:

- Primera dilución (1:2): 50 μ L de agua desionizada + 50 μ L de células
- Segunda dilución (1:10): 90 μ L de agua desionizada + 10 μ L de la dilución anterior
- Tercera dilución (1:10): 90 μ L de agua desionizada + 10 μ L de la dilución anterior
- Cuarta dilución (1:10): 90 μ L de agua desionizada + 10 μ L de la dilución anterior
- Quinta dilución (1:10): 90 μ L de agua desionizada + 10 μ L de la dilución anterior

Una vez realizadas todas las diluciones, se tomaron 3 μL de cada una, se inocularon en hileras en agar YPD y YPEG y se incubaron respectivamente por 48 y 72 horas a 30 °C.

8.12 ANÁLISIS DE LOS NIVELES PROTEICOS DE LAS PROTEÍNAS β 1-NAC y β 2-NAC

8.12.1 Análisis del efecto de la fuente de carbono sobre los niveles proteicos de las proteínas β 1-NAC y β 2-NAC

De cada cepa mencionada se tomó una colonia aislada, se inoculó en 5 mL de YPD y se incubó durante 8 horas a 30 °C y agitación a 200 rpm. Pasado ese tiempo, se midió la densidad óptica y se realizaron las siguientes diluciones en 15 mL de medio rico (YP): para fuentes de carbono fermentables (glucosa y galactosa) se tomó suficiente volumen de células para tener una DO_{600} final de 0.132; para fuentes de carbono no fermentables (glicerol y lactato) se hizo lo mismo salvo que la DO_{600} final fue de 0.37. Posteriormente, se dejaron crecer durante 16 horas a 30 °C con 200 rpm de agitación. Más tarde, se midió la densidad óptica y de nueva cuenta se realizaron diluciones en 15 mL de medio YP con las diferentes fuentes de carbono a dos DO_{600} finales: 0.14 para fuentes de carbono fermentables y 0.35 para no fermentables. Los cultivos se incubaron por 5 horas en las mismas condiciones ya mencionadas para que las células llegasen al intervalo de 0.7 – 1.0 de DO_{600} . Una vez en el intervalo mencionado, se recuperó el equivalente a dos unidades de DO_{600} y se realizaron extracciones de proteínas totales.

8.12.2 Extracción de proteínas totales

En cada caso, la extracción de proteínas totales se realizó a partir de dos unidades de DO_{600} . Dicha cantidad de células se centrifugó durante 2 minutos a 8609 g , se descartó el sobrenadante y se lavaron con 1 mL de agua desionizada. Se centrifugaron de nueva cuenta. Los botones celulares resultantes se resuspendieron en 250 μL de Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Después, se les agregó 50

μ L de solución de extracción (0.3 N NaOH, 176 mM, β -mercaptoetanol y 3.5 mM de PMSF) y se incubó por 10 minutos en hielo. Más tarde, se añadió ácido tricloroacético a una concentración final de 12 % v/v para precipitar las proteínas y se incubó a -20 °C por 30 minutos. Luego, se centrifugó por 30 minutos a 18000 g y se descartó el sobrenadante. Se lavaron los botones resultantes con 1 mL de acetona a -20 °C y se repitió la centrifugación en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ L de amortiguador Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.02 %) (Laemmli, 1970).

8.12.3 Electroforesis desnaturalizante de proteínas

Para detectar por peso molecular a las proteínas β -NAC etiquetadas, se realizaron geles de poliacrilamida desnaturalizante a una concentración de 16 % de acrilamida y 0.2 de bis-acrilamida. Se cargaron 0.4 DO₆₀₀ de extracto proteico y se corrieron los geles a 35 mA por gel durante dos horas en amortiguador de corrida.

8.12.4 Inmunodetección

Las proteínas separadas por peso molecular fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Amershan Protran 0.2 μ m NC, GE Healthcare Life Sciences*) a través de una electrotransferencia en cámara húmeda con amortiguador de transferencia. Una vez en las membranas de nitrocelulosa, se realizó una tinción con el colorante Rojo de Ponceau para verificar la presencia de las proteínas y su patrón de corrimiento.

Para revelar tanto la proteína Hog1 que fungió como control de carga (dado que en las condiciones evaluadas no cambia su estado basal), así como las proteínas a evaluar, las membranas se segmentaron en dos partes cortando entre los pesos moleculares 25 y 37 kDa.

Posteriormente, se realizaron lavados con agua desionizada para retirar el colorante, y se incubaron con solución de bloqueo (TBS 1x + leche 5 % w/v) durante una hora a temperatura ambiente y agitación.

Las membranas destinadas a revelar Hog1 se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución 1:5000 en TBS 1x leche al 5 % w/v, mientras que aquellas destinadas a revelar las etiquetas 3HA se incubaron en la solución de bloqueo. Ambas incubaciones se realizaron toda la noche con agitación y a 4 °C.

A la mañana siguiente, se lavaron las membranas incubadas con anticuerpo contra Hog1 de la forma siguiente:

- TBS 1x Tween-20 0.1 % por 10 minutos
- TBS 1X por 10 minutos
- TBS1X por 10 minutos

Más tarde, las membranas para revelar Hog1 y las etiquetas HA fueron incubadas con anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (anticuerpo secundario para Hog1 y primario para HA) durante 3 horas a 4 °C y agitación. Pasado este tiempo, se realizó un ciclo de lavado como el especificado previamente. Una vez lavadas las membranas, se revelaron con el sustrato Inmobilon (Millipore) para detección por quimioluminiscencia.

8.13 CONSTRUCCIÓN DE UN REPORTERO TRANSCRIPCIONAL PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD DE LAS REGIONES 5' Y 3' UTR DEL GEN *BTT1*

Con el objetivo de analizar la contribución de los elementos de regulación de la transcripción del gen *BTT1* en los niveles proteicos de β 2-NAC, se realizaron dos reacciones de amplificación por PCR. En la primera, se amplificaron 1000 pb río arriba del ORF del gen *BTT1* (amplicón denominado a partir de aquí como P_{BTT1}); en la segunda, se amplificaron 500 pb río abajo del codón de paro del ORF mencionado (amplicón ahora indicado como Ter_{BTT1}). Ambos amplicones corresponden a las regiones 5' y 3' UTR de *BTT1*.

Para amplificar P_{BTT1} se realizaron reacciones de PCR a partir del DNA genómico de la cepa *WT* con el par de oligonucleótidos JAB25,26 los cuales

introducen en los extremos del amplicón los sitios de restricción Sall y XmaI, respectivamente. Para amplificar *Ter_{BTT1}* se usó el mismo DNA genómico y el par de oligonucleótidos JAB27,28 que introducen los sitios de corte para las enzimas SpeI y XbaI, respectivamente (véase la descripción de cada oligonucleótido en la tabla del apartado 7.3). Por otro lado, se amplificó al gen *lacZ* presente en el plásmido pSH18-34 con los oligonucleótidos Lac Z F y Lac Z R los cuales introducen los sitios de restricción XmaI y SpeI.

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el sistema de amplificación *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer*, New England BioLabs. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Fase inicial:

- Desnaturalización inicial: 98 °C, 30 s

30 ciclos de repetición:

- Desnaturalización: 98 °C, 10 s
- Alineamiento: 55 °C, 30 s
- Extensión: 72 °C, 30 y 15 s (1000 y 500 pb amplicones; 30s/1kb)

Fase final:

- Extensión final: 72 °C, 5 min

Todas las reacciones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa. Las reacciones generadas se purificaron a través del kit comercial Expin Combo GP (GeneAll).

Los sitios de restricción utilizados se encuentran presentes en el sitio de multiclonación del plásmido pRS316, lo cual permitió integrar uno a uno los amplicones generados. En cada caso de integración de los componentes al vector de clonación, se realizaron digestiones de los insertos y los vectores con las enzimas y condiciones mencionadas en la tabla de abajo. Una vez culminadas dichas reacciones, se purificaron los productos resultantes por electroforesis en gel de agarosa y a través del kit Expin Combo GP. Posteriormente, se realizaron reacciones de ligación con la ligasa T4 (*New England Biolabs*) entre el vector correspondiente y su inserto en una relación molar 1:5. Estas últimas se incubaron por 16 horas a 16 °C, se transformaron en células de *E. coli* DH5α competentes

(Inoue, Nojima, & Okayama, 1990) por choque térmico, se seleccionaron colonias resistentes y se verificaron para la presencia del constructo. El proceso se repitió hasta que se formó la construcción pRS316- P_{BTT1} -*lacZ*- Ter_{BTT1} cuya secuencia se verificó por secuenciación en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Dicho constructo se nombró p β 2Z (Figura 11).

Tabla 6. Enzimas de restricción y condiciones de reacción utilizadas

Inserto/ vector	Enzimas de restricción	Amortiguador
P_{BTT1} /pRS316	Sall + XmaI	CutSmart
<i>lacZ</i> /pRS316- P_{BTT1}	XmaI + SpeI	CutSmart
Ter_{BTT1} /pRS316- P_{BTT1} - <i>lacZ</i>	SpeI + XbaI	CutSmart

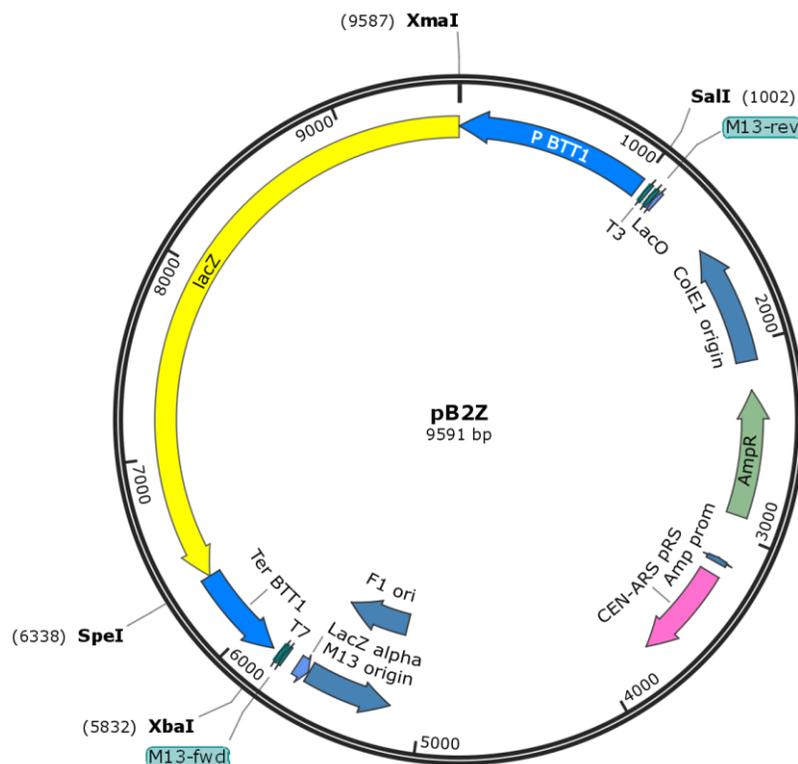


Figura 11. Mapa de la construcción p β 2Z generada en este estudio. Se indican los sitios de restricción utilizados para la clonación de los elementos P_{BTT1} , *lacZ* y Ter_{BTT1} presentes en el constructo p β 2Z. Mapa generado con el programa SnapGene.

8.14 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

Las cepas *WT* y $\Delta\beta 1$ se transformaron con la construcción p β 2Z con el protocolo de transformación con acetato de litio, polietilenglicol y DNA de espermatozoos de salmón mencionado en la sección 8.6. En este caso, el medio de selección constó de medio SGlucosa (véase anexo) sin uracilo debido a que la construcción p β 2Z posee en el gen *URA3* que alivia la auxotrofia de las cepas con fondo genético BY4741 por esta base nitrogenada.

Una vez pasadas 72 horas de incubación de las células transformantes a 30 °C, se aisló una colonia de cada cepa, se inocularon en 15 mL de medio SGlucosa sin uracilo y se incubaron por 24 horas a 30 °C con 200 rpm de agitación. Al día siguiente, se midió la densidad óptica y se realizaron diluciones en 30 mL de volumen final de los siguientes medios de cultivo:

- SGlucosa: 0.01 de DO₆₀₀
- SGalactosa: 0.15 de DO₆₀₀
- SGlicerol: 0.36 de DO₆₀₀
- SLactato: 0.36 de DO₆₀₀

Posteriormente, se incubaron las diferentes diluciones durante 16 horas a 30 °C y se realizó una extracción de proteínas nativas como sigue. Una vez que las células llegaron a una densidad óptica entre 0.7 y 1.0 de DO₆₀₀, se recolectaron los equivalentes a 20 unidades de DO₆₀₀ por mL en tubos graduados de 50 mL por centrifugación a 3900 g durante 5 minutos. Luego, se lavaron los botones celulares obtenidos con 1 mL de agua desionizada, se transfirieron a tubos de 1.5 mL, se centrifugaron a 10000 g por dos minutos y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendieron los botones en 500 μ L de amortiguador Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl y 1 mM MgSO₄), se agregó el equivalente a 500 μ L de volumen de perlas de vidrio y se resuspendió en vórtex a máxima potencia en pulsos de 30 segundos durante 2 minutos. Se recuperaron los lisados celulares en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 10000 g por dos minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes de nueva cuenta en los tubos ya mencionados. Se midió la concentración de proteínas a través del método de

Bradford siguiendo las recomendaciones del proveedor (*Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, Bio-Rad*)

Para el ensayo colorimétrico de actividad de la enzima β -galactosidasa, se tomaron 100 μ L de los extractos proteicos generados, se les añadieron 400 μ L de amortiguador Z + β -mercaptoetanol (0.27 % v/v) y 100 μ L de o-nitrofenil- β -galactósido (oNPG). Más tarde, se realizó una incubación de una hora a 30 °C, se frenó la reacción con 250 μ L de NaCO₃ 1M y se leyó la absorbancia a 420 nm de cada muestra. Asimismo, se leyó la absorbancia a 550 nm para descartar la contribución de los restos celulares en la primera lectura de absorbancia generada.

Con estos datos, se realizó una corrección de la lectura de absorbancia a 420 nm con la siguiente ecuación:

$$\text{Abs } 420' = \text{Abs } 420 - 1.75 * \text{Abs } 550$$

- Abs 420': Absorbancia corregida de la muestra
- Abs 420: Absorbancia de la muestra a 420 nm
- Abs 550: Absorbancia de la muestra a 550 nm

Los valores de absorbancia corregidos se tradujeron a unidades por miligramo de proteína (U/mg) con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (U/mg)} = 1000 * \frac{\text{Abs } 420' * \text{Vol.t}}{\epsilon_{\text{oNPG}} * \text{Vol.v} * t * [\text{proteína}]}$$

- Vol.t: Volumen total de la muestra (850 mL)
- Vol.v: Volumen valorado (100 mL)
- ϵ_{oNPG} : Coeficiente de extinción molar del oNPG a 420 nm (4.5 cm²/ μ mol)
- t: Tiempo de reacción (60 minutos)
- [proteína]: Concentración de proteína en mg/mL

8.15 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES *EGD1* Y *BTT1*

Con el objetivo de obtener más información acerca de la regulación de los genes codificantes para las subunidades β -NAC, se realizó un análisis de los sitios de unión de diferentes factores de transcripción presentes en los 1000 pb río arriba de los codones de inicio de los genes *EGD1* y *BTT1* a través del programa en línea *Yeasttract* (www.yeasttract.com). Este análisis se realizó con base en el genoma de la cepa S288C (cepa parental de la cepa BY4741 utilizada en este estudio).

Posteriormente, se analizaron los sitios de unión a factores de transcripción predichos para cada gen en la base de datos *Eukaryotic Promoter Database* (<https://epd.epfl.ch/index.php>) y se conservaron aquellos cuyo p-valor fue igual o menor a 0.001 de ser fidedignos de acuerdo con los parámetros del programa. Asimismo, se eliminaron aquellos sitios predichos por *Yeasttract* que no aparecieron en *Eukaryotic Promoter Database*.

9. RESULTADOS

9.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Las cepas diseñadas en este estudio especificadas en el apartado de Materiales y Métodos se analizaron a través de reacciones de amplificación por PCR a partir de DNA genómico.

A continuación, se muestran las reacciones de confirmación de cada mutante junto con esquemas de las regiones genómicas blanco y los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados (Figuras 12, 13, 14 y 15). Los productos de amplificación de las cepas $P_{\beta 1}\beta 2$ y $P_{\beta 2}\beta 1$ fueron secuenciados para verificar la integración de los ORFs relocalizados y descartar alteraciones en las regiones codificantes.

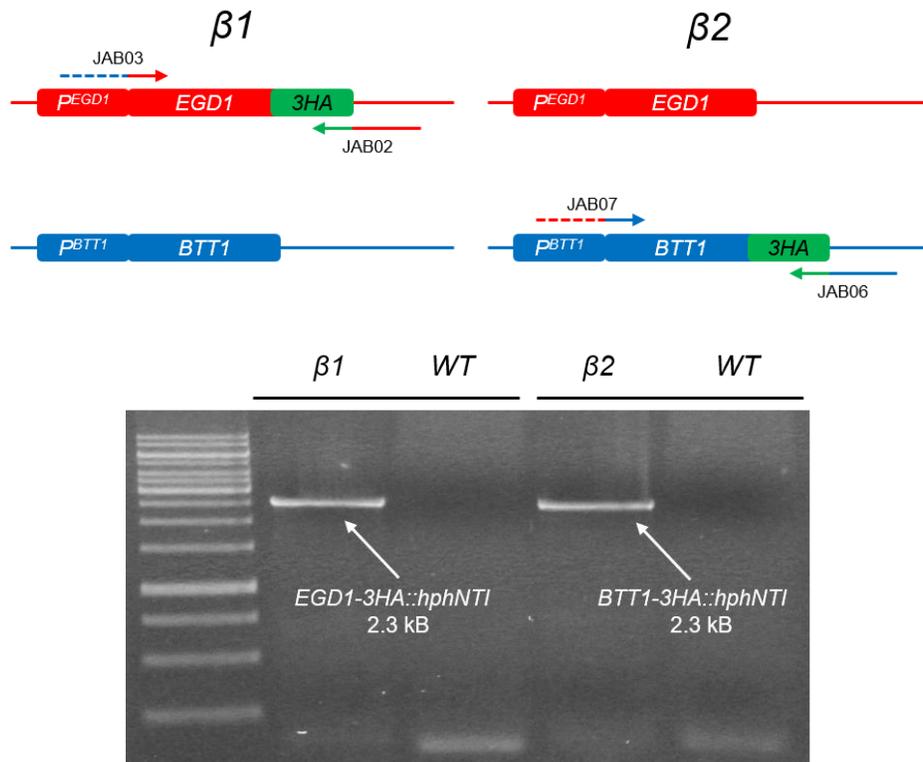


Figura 12. Validación por PCR de las cepas $\beta 1$ y $\beta 2$. En la parte superior de la imagen se muestran los esquemas de las regiones genómicas analizadas con los nombres de la cepa a la que pertenecen y los desoxi oligonucleótidos utilizados. Los productos de amplificación obtenidos se validaron a través de electroforesis en gel de agarosa y observación en transiluminador. La cepa WT se usó como control negativo para la amplificación de las etiquetas.

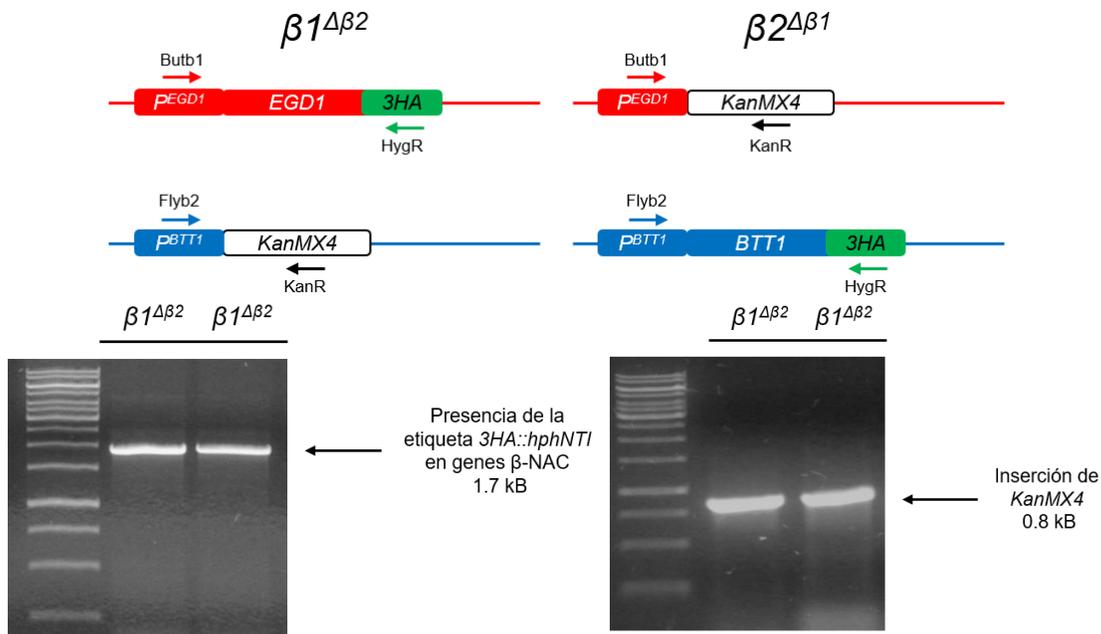


Figura 13. Validación de las cepas $\beta 1^{\Delta\beta 2}$ y $\beta 2^{\Delta\beta 1}$. En la parte superior de la imagen se muestran los esquemas de las regiones genómicas analizadas con los nombres de la cepa a la que pertenecen y los desoxioligonucleótidos utilizados. Los productos de amplificación obtenidos se validaron a través de electroforesis en gel de agarosa y observación en transiluminador.

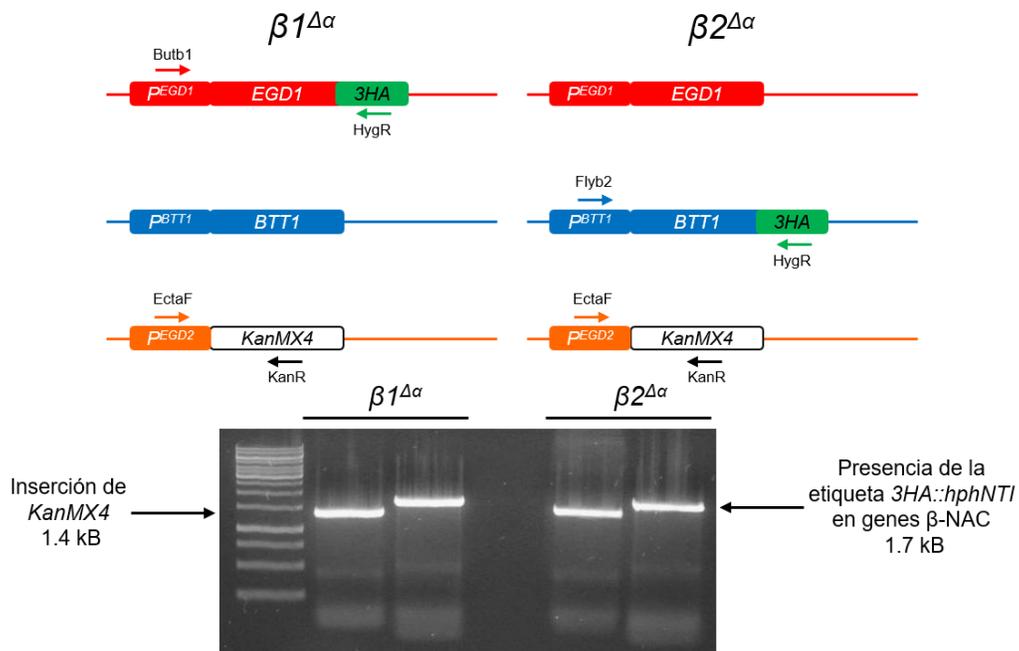


Figura 14. Validación de las cepas $\beta 1^{\Delta\alpha}$ y $\beta 2^{\Delta\alpha}$. En la parte superior de la imagen se muestran los esquemas de las regiones genómicas analizadas con los nombres de la cepa a la que pertenecen y los desoxioligonucleótidos utilizados. Los productos de amplificación obtenidos se validaron a través de electroforesis en gel de agarosa y observación en transiluminador.

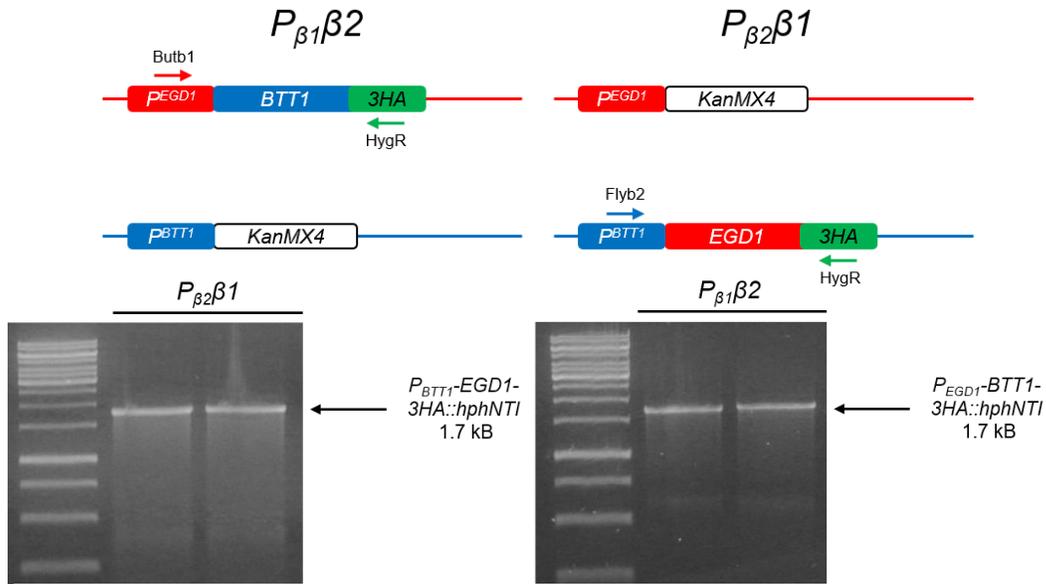


Figura 15. Validación de las cepas $P_{\beta_1\beta_2}$ y $P_{\beta_2\beta_1}$. En la parte superior de la imagen se muestran los esquemas de las regiones genómicas analizadas con los nombres de la cepa a la que pertenecen y los desoxioligonucleótidos utilizados. Los productos de amplificación obtenidos se validaron a través de electroforesis en gel de agarosa y observación en transiluminador.

Las cepas generadas se muestran en seguida a manera de esquemas donde se indican las modificaciones generadas a los genes codificantes de las subunidades de NAC (Figura 16).

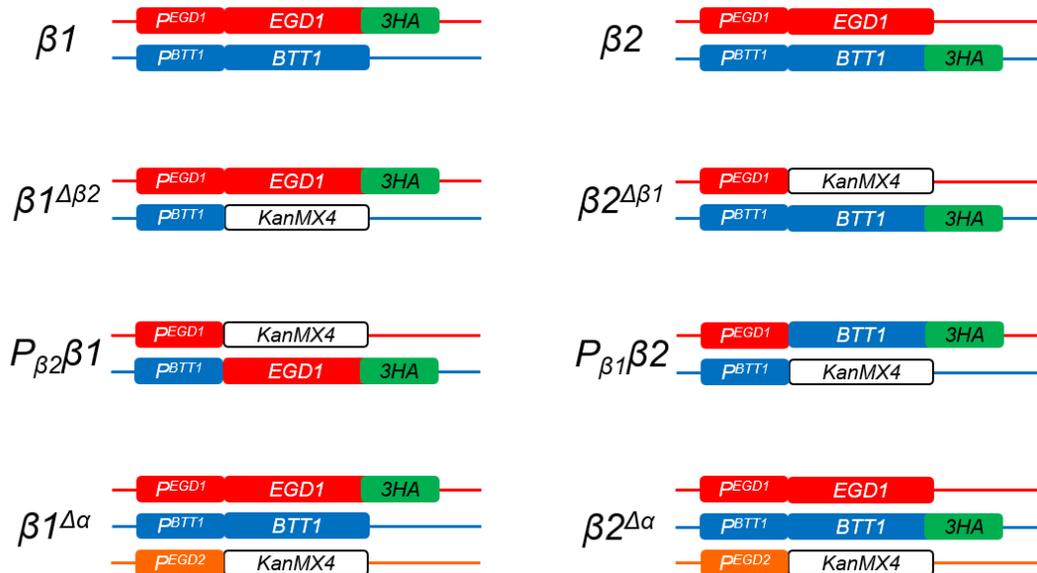


Figura 16. Resumen de las cepas generadas en este trabajo. Se muestran las particularidades que cada cepa presenta en el locus de los genes de NAC. Asimismo, se muestran sus nombres a la izquierda de cada bloque. La etiqueta indicada como $3HA$ incluye el módulo de resistencia hph .

9.2 LA RELOCALIZACIÓN DE LOS PARÁLOGOS β -NAC NO AFECTA EL FENOTIPO CRECIMIENTO EN CONDICIONES ESTÁNDAR NI EN ESTRÉS OXIDANTE

S. cerevisiae cambia sus perfiles de expresión, así como su sensibilidad a diferentes tipos de estrés dependiendo de la fuente de carbono en la que crece (Broach, 2012). Diversos estudios sobre NAC de *S. cerevisiae* indican que la eliminación de los genes codificantes para las subunidades del complejo no afectan el fenotipo de crecimiento en condiciones estándar de laboratorio (del Alamo et al., 2011; Ott et al., 2015; Ponce-Rojas et al., 2017).

Para determinar si en las condiciones experimentales de este trabajo los datos reportados eran reproducibles, se comparó el fenotipo de crecimiento de las mutantes sencillas $\Delta\beta1$, $\Delta\beta2$ y $\Delta\alpha$, y de la cepa Δnac (carente de todos los componentes de NAC) con la cepa silvestre WT. Debido a que usualmente la expresión de los genes parálogos está correlacionada con la función que llevan a cabo sus productos codificados, en este análisis se incluyeron a las cepas $P_{\beta1}\beta2$ y $P_{\beta2}\beta1$ para evaluar si la relocalización de los parálogos β -NAC repercute en el fenotipo de crecimiento por cambios en la expresión de las subunidades codificadas. Adicionalmente, se retó a las cepas a un pulso de estrés oxidante para evaluar si las mutaciones en los genes de NAC repercuten en la resistencia temprana y posterior supervivencia de las levaduras a un evento que afecta de manera sustancial el plegamiento proteico (Figura 17).

En el análisis realizado no se encontraron diferencias marcadas en las condiciones evaluadas. Sin embargo, se encontró que las colonias de la cepa $\Delta\alpha$ presentan un mayor crecimiento comparadas con la cepa silvestre, así como una mayor resistencia al estrés oxidante, especialmente si se crecen en fuentes de carbono no fermentables (YPEG). En consecuencia, las cepas evaluadas no poseen afectaciones en la cadena de transporte de electrones puesto que el fenotipo de crecimiento de las mutantes no difirió con de la cepa WT en medio YPEG.

Estos ensayos permiten afirmar que las mutaciones en los genes de NAC no repercuten de manera significativa en el fenotipo de crecimiento ni en la resistencia al estrés oxidante.

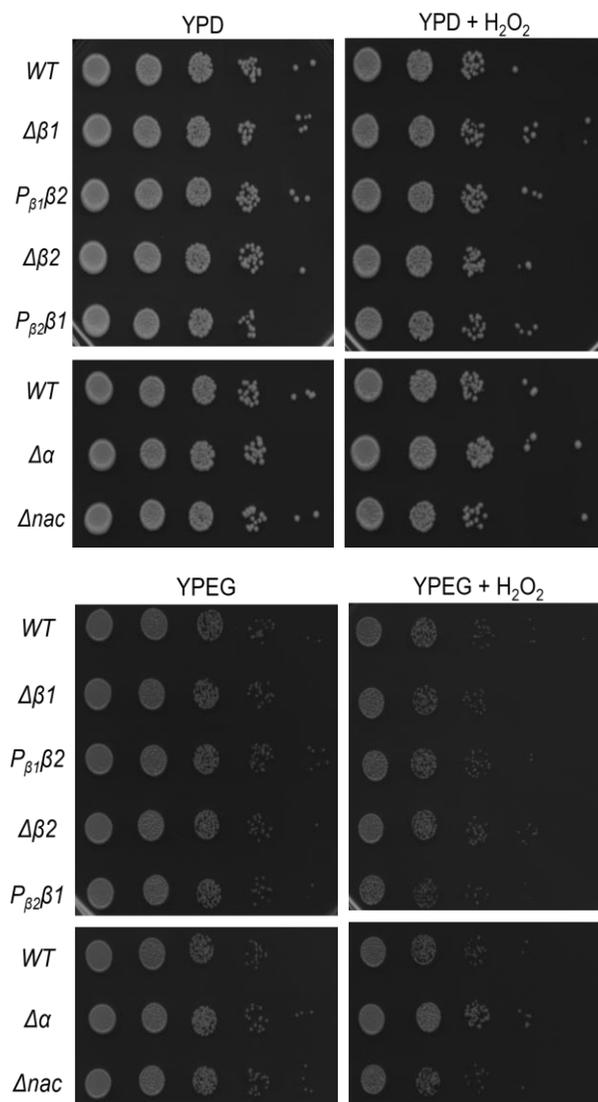


Figura 17. Análisis de crecimiento por diluciones seriadas en condiciones de fermentación o respiración después de un pulso de H₂O₂. El ensayo de crecimiento fue realizado con o sin un tratamiento de 7.5 mM de H₂O₂ en YPD durante 3 horas antes de realizar diluciones seriadas y analizar el crecimiento en medio rico sólido en condiciones de fermentación (YPD) o de respiración (YPEG). Las cajas se incubaron a 30 °C durante 48 o 72 horas, respectivamente.

9.3 LOS NIVELES PROTEICOS DE LAS PROTEÍNAS β 1-3HA Y β 2-3HA DEPENDEN DEL CONTEXTO GENÓMICO, DE LA FUENTE DE CARBONO Y DE α -NAC

La fuente de carbono regula una amplia gama de genes en *S. cerevisiae* y es una de las respuestas más generales que esta levadura tiene al ambiente. Aunado a ello, los genes duplicados en este organismo han sido objeto de una diversificación en su función y regulación. Tomando en cuenta los puntos anteriores junto con la evidencia reportada de la participación de β 2-NAC en la importación de algunas proteínas mitocondriales, resultó plausible evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la regulación de las subunidades β -NAC, así como la contribución del contexto genómico en el que se encuentran los genes *EGD1* y *BTT1*, con particular énfasis en aquellas fuentes de carbono que inducen la biogénesis mitocondrial.

Con lo dicho, se evaluó el efecto de la fuente de carbono sobre los niveles proteicos de las subunidades β -NAC etiquetadas en las cepas β 1, β 2, β 1 $\Delta\beta$ 2, β 2 $\Delta\beta$ 1, β 1 $\Delta\alpha$, β 2 $\Delta\alpha$, *P* β 1 β 2 y *P* β 1 β 2. Esto se realizó con el objetivo de evaluar la contribución de los otros componentes de NAC (*i.e.* la subunidad α -NAC y la subunidad β -NAC paróloga de la subunidad en evaluación) y del contexto genómico en que se encuentren los genes parálogos codificantes para las subunidades β -NAC.

Para tal fin, se obtuvieron extractos proteicos totales de las cepas generadas en este estudio incubadas hasta la fase de crecimiento logarítmica en medio rico con fuentes de carbono fermentables (glucosa y galactosa) o con fuentes de carbono no fermentables (glicerol y lactato) y se evaluaron a través de inmunodetección los niveles proteicos de las proteínas β 1- y β 2-NAC.

En primer lugar, se evaluaron a las cepas β 1, β 2 en donde únicamente se encuentran etiquetados los genes *EGD1* y *BTT1* (Figura 18). De este análisis se concluyó que la proteína β 1-NAC se expresa constitutivamente en todas las condiciones evaluadas, mientras que la proteína β 2-NAC se detecta exclusivamente en las fuentes de carbono fermentables con menor intensidad en galactosa.

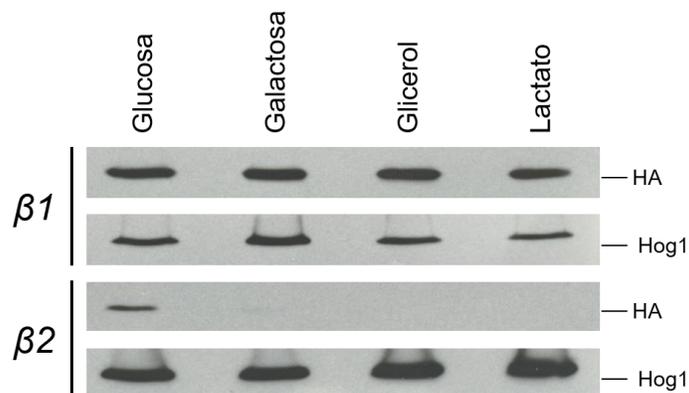


Figura 18. Análisis de los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en las cepas $\beta 1$ y $\beta 2$. Cultivos de las cepas mencionadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en las fuentes de carbono indicadas y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas β -NAC se detectaron a través de anticuerpos contra los epítomos de HA. La proteína Hog1 fue utilizada como control de carga.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la eliminación de la subunidad β -NAC paráloga sobre los niveles proteicos de la subunidad analizada (Figura 19). Se observó que la eliminación de $\beta 1$ -NAC causa que no se pueda detectar a la subunidad $\beta 2$ -NAC, mientras que $\beta 1$ -NAC se muestra sin cambios aparentes ante la ausencia de $\beta 2$ -NAC.

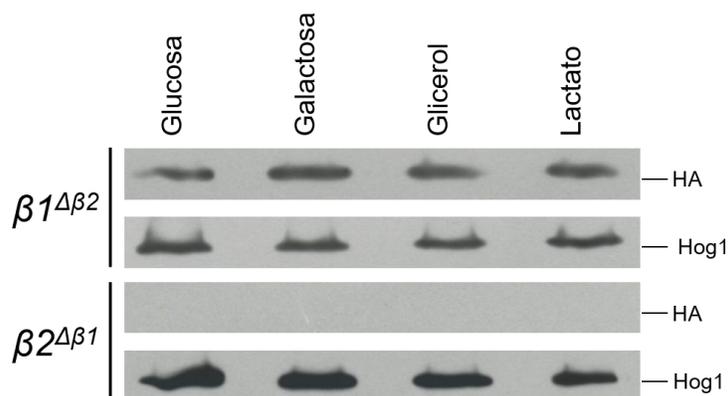


Figura 19. Análisis de los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en las cepas $\beta 1^{\Delta\beta 2}$ y $\beta 2^{\Delta\beta 1}$. Cultivos de las cepas mencionadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en las fuentes de carbono indicadas y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas β -NAC se detectaron a través de anticuerpos contra los epítomos de HA. La proteína Hog1 fue utilizada como control de carga.

Asimismo, se evaluó la contribución de la subunidad α -NAC sobre los niveles proteicos de ambas subunidades β -NAC (Figura 120). En ausencia de α -NAC, hay

una disminución de los niveles de $\beta 1$ -NAC en fuentes de carbono no fermentables. De igual modo, en ausencia de dicha subunidad, $\beta 2$ -NAC no pudo ser detectada.

Finalmente, se analizaron los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en las cepas $P_{\beta 1}\beta 2$ y $P_{\beta 2}\beta 1$ en las que los parálogos fueron intercambiados de contexto genómico (Figura 21). En la cepa $P_{\beta 2}\beta 1$ hay una disminución general de los niveles proteicos de $\beta 1$ -NAC y no se observa el patrón que $\beta 2$ -NAC presenta en la Figura 18. De manera similar, en la cepa $P_{\beta 1}\beta 2$, $\beta 2$ -NAC parece regularse de manera constitutiva similar a $\beta 1$ -NAC, aunque con una disminución en fuentes de carbono no fermentables.

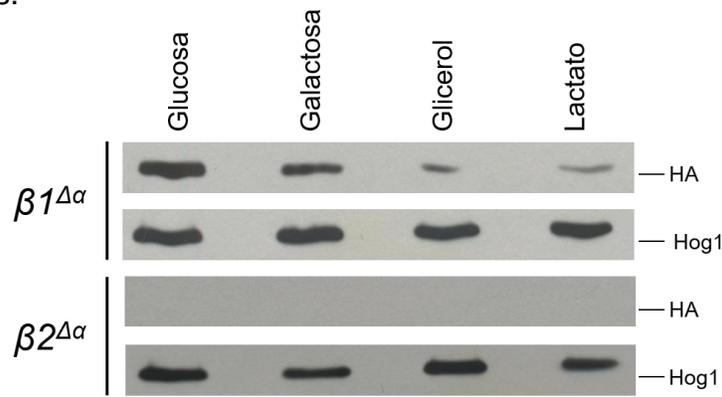


Figura 20. Análisis de los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en las cepas $\beta 1^{\Delta\alpha}$ y $\beta 2^{\Delta\alpha}$. Cultivos de las cepas mencionadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en las fuentes de carbono indicadas y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas β -NAC se detectaron a través de anticuerpos contra los epítomos de HA. La proteína Hog1 fue utilizada como control de carga.

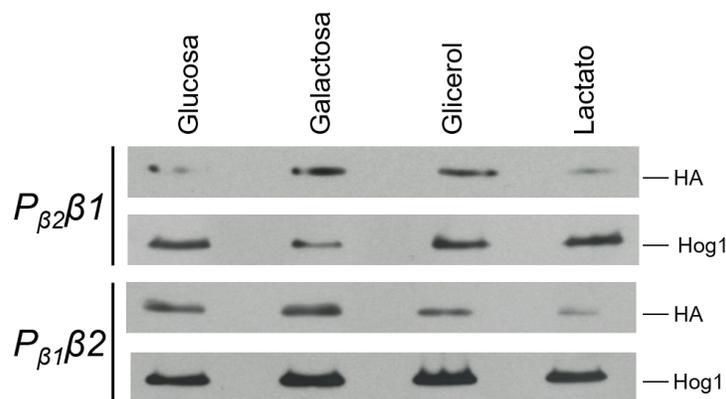


Figura 21. Análisis de los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en las cepas $P_{\beta 2}\beta 1$ y $P_{\beta 1}\beta 2$. Cultivos de las cepas mencionadas se crecieron hasta la fase de crecimiento exponencial en las fuentes de carbono indicadas y 0.4 unidades de DO_{600} de extractos proteicos totales fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas β -NAC se detectaron a través de anticuerpos contra los epítomos de HA. La proteína Hog1 fue utilizada como control de carga.

9.4 EL GEN *BTT1* SE REGULA POR LA FUENTE DE CARBONO A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

La evaluación de los niveles proteicos de las proteínas β -NAC mostró que la regulación de proteína β 2-NAC depende de la fuente de carbono. Asimismo, indicó que esta observación dependía de la presencia de las otras subunidades de NAC.

Para discernir si el fenómeno observado dependía de una regulación a nivel del promotor del gen *BTT1* o si resultaba de una regulación postranscripcional o inclusive postraducciona, se clonaron las regiones 5' y 3' UTR de este gen nombradas como P_{BTT1} y Ter_{BTT1} (1000 pb río arriba y 500 pb río abajo del ORF de *BTT1* respectivamente) en el vector de expresión pRS316 y se colocó al gen *lacZ* bajo su control (plásmido p β 2Z).

Con esta construcción se transformaron las cepas *WT* y $\Delta\beta 1$ y se evaluó la actividad de la enzima β -galactosidasa de las cepas crecidas hasta fase de crecimiento logarítmico en medio sintético con las cuatro fuentes de carbono antes mencionadas (Figura 22).

La cepa *WT* p β 2Z muestra una regulación diferencial del P_{BTT1} en las cuatro fuentes de carbono indicadas. Notablemente, no se encontraron diferencias en la actividad del gen reportero en galactosa y lactato como fuentes de carbono. Estos resultados se asemejan al patrón que presenta β 2-NAC en la Figura 17. Sin embargo, en dicha figura se muestra que β 2-NAC, en su contexto silvestre, aún alcanza a ser detectada a través de la inmunodetección cuando crece la cepa en medio rico con galactosa.

En la cepa $\Delta\beta 1$, dada la eliminación del gen *EGD1*, el patrón de regulación por la fuente de carbono del gen *BTT1* desaparece. Sin embargo, se nota al menos en el promedio de actividad enzimática que en glucosa hay una regulación al alza en actuando sobre el promotor putativo.

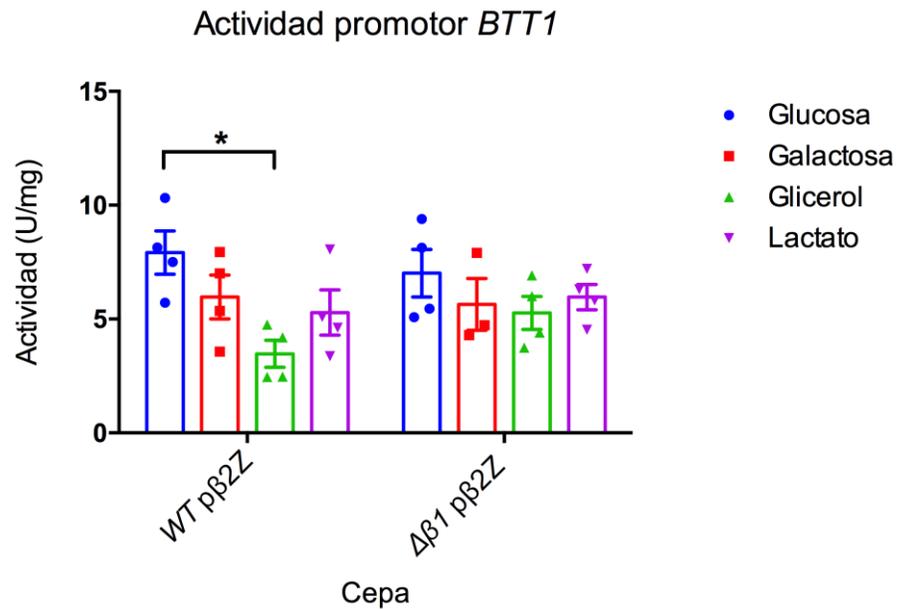


Figura 22. Actividad del promotor del gen *BTT1* en diferentes fuentes de carbono. Se obtuvieron extractos proteicos crudos de las cepas mencionadas crecidas en glucosa, galactosa, glicerol o lactato como fuente de carbono. Posteriormente se realizó el ensayo colorimétrico de β -galactosidasa para estimar la actividad de los promotores. Los datos se analizaron a través de una ANOVA de dos vías en la que los factores fueron cepa y fuente de carbono. Las barras de error indican el error estándar y se resalta la diferencia significativa con un asterisco ($p < 0.05$). Se realizaron cuatro réplicas biológicas por cada condición a excepción de la condición galactosa en la cepa $\Delta\beta1$ pβ2Z en que se realizaron 3 réplicas.

9.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES *EGD1* Y *BTT1*

Las diferencias observadas en los niveles de las proteínas β -NAC (Figura 18), así como el patrón de actividad del promotor del gen *BTT1* encontrado en la cepa *WT*, indican una regulación diferencial de los genes codificantes para las subunidades β -NAC.

Para tratar de explicar las diferencias observadas en la expresión de los genes parálogos, se realizó un análisis de las regiones promotoras putativas de ambos genes (1000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción) con el programa *Yeasttract* disponible en línea (www.yeasttract.com). Dicho programa, entre otras funciones, permite encontrar motivos consenso de unión a factores de transcripción en una secuencia de nucleótidos dada. Los sitios de unión predichos de factores de transcripción predichos por *Yeasttract* se depuraron posteriormente en la base datos *Eukaryotic Promoter Database* (<https://epd.epfl.ch//index.php>), la cual permite asignar un valor estadístico a un motivo consenso hallado en un promotor de ser verdadero. De dichos sitios de unión a factores de transcripción predichos se conservaron aquellos cuyo p-valor fuera menor o igual a 0.001 de ser fidedignos de acuerdo con los parámetros del programa.

A continuación, se muestran los sitios putativos de unión a factores de transcripción en las 1000 pb seleccionadas como promotores de ambos genes, así como sus funciones de regulación asociadas obtenidas en la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org). Se resaltan en amarillo los factores de transcripción asociados a la respuesta a fuente de carbono, en anaranjado aquellos asociados a la respuesta a estrés y en verde el regulador de la biosíntesis de aminoácidos Gcn4.

- Elementos que se encuentran en la región 5'UTR de *EGD1* y que podrían ser reconocidos por factores de transcripción (en orden alfabético)

Factor de transcripción	Función de regulación asociada
Abf1	Reorganización de la cromatina

Adr1	Transcripción de <i>ADH2</i> , de genes peroxisomales y genes necesarios para la utilización de alcohol, glicerol y ácidos grasos
Azf1	Involucrado en el cambio diáxico; cambia su actividad dependiendo la fuente de carbono
Cup2	Activación de genes de respuesta a elevadas concentraciones de cobre
Gal4	Activación de genes para la utilización de galactosa
Gcr1	Activación de genes involucrados en la glucólisis
Gis1	Regulación de genes durante la privación de nutrientes
Hac1	Regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas
Hap1	Regulación global de genes involucrados en el metabolismo respiratorio
Hsf1	Activación de genes como respuesta a múltiples estímulos de estrés
Mig1	Represión inducida por glucosa
Msn2/4	Activación de la transcripción de genes involucrados en la respuesta a estrés
Nrg1	Represión inducida por glucosa y regulación a la baja del crecimiento filamentoso y la respuesta al pH alcalino
Pho2	Regulación de genes del metabolismo de fosfatos
Pho4	Regulación de genes del metabolismo de fosfatos
Rim101	Represión de genes en pH alcalino
Rox1	Represión de genes involucrados en la respuesta a hipoxia
Rtg1/3	Comunicación interorganelar entre la mitocondria, los peroxisomas y el núcleo
Stb5	Resistencia a multidroga y estrés oxidante
Stp2	Activación de genes de permeasas de aminoácidos
Tec1	Regulación de la transcripción de genes para el crecimiento filamentoso y la expresión del elemento móvil Ty1
Upc2	Activación de genes para la biosíntesis de esterol

Xbp1	Unión a promotores de genes de ciclinas en estrés o privación de nutrientes
Yap1	Tolerancia a estrés oxidante

- Elementos que se encuentran en la región 5'UTR de *BTT1* y que podrían ser reconocidos por factores de transcripción (en orden alfabético)

Factor de transcripción	Función de regulación asociada
Adr1	Transcripción de <i>ADH2</i> , de genes peroxisomales y genes necesarios para la utilización de alcohol, glicerol y ácidos grasos
Azf1	Involucrado en el cambio diáuxico; cambia su actividad dependiendo la fuente de carbono
Bas1	Involucrado en la regulación de genes para la biosíntesis de purinas e histidina
Cha4	Involucrado en la activación de la desaminasa de L-serina y L-treonina
Crz1	Activación de genes de respuesta a estrés
Cup2	Activación de genes de respuesta a elevadas concentraciones de cobre
Fkh1/2	Factor de unión a múltiples elementos cromosomales
Gcn4	Respuesta a la privación de aminoácidos; activación de genes de la biosíntesis de aminoácidos
Gcr1	Activación de genes involucrados en la glucólisis
Hap1	Regulación global de genes involucrados en el metabolismo respiratorio
Hap2/3/4/5	Regulación global de genes involucrados en el metabolismo respiratorio
Mcm1	Formación de complejos activadores y represores de la transcripción
Mig1	Represión inducida por glucosa
Nrg1/2	Represión inducida por glucosa y regulación a la baja del crecimiento filamentoso y la respuesta al pH alcalino
Pho2	Regulación de genes del metabolismo de fosfatos

Rgt1	Respuesta a glucosa; regulación de la expresión de los transportadores de glucosa
Rox1	Represión de genes involucrados en la respuesta a hipoxia
Rtg1/3	Comunicación interorganelar entre la mitocondria, los peroxisomas y el núcleo
Yap1	Tolerancia a estrés oxidante
Yrr1	Activación de genes de resistencia a multidroga

El análisis realizado indicó, al menos a nivel de predicción *in silico*, que los promotores putativos de los genes parálogos son en efecto distintos, aunque comparten un número importante de motivos de unión predichos (Figura 23), lo cual concuerda con lo previamente descrito sobre la evolución de la regulación de los

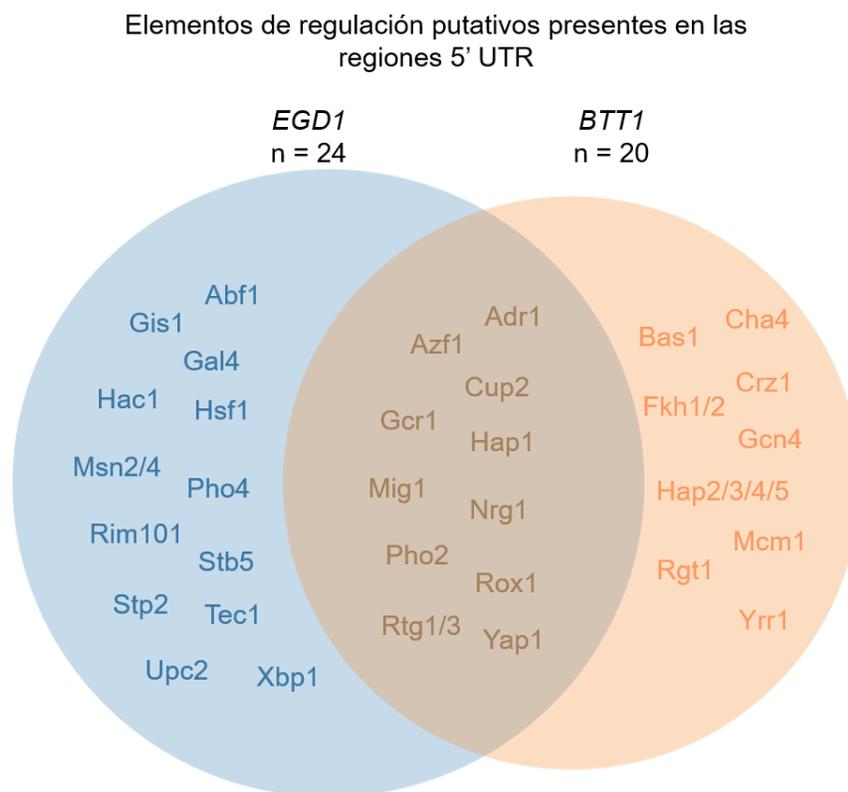


Figura 23. Elementos de regulación predichos en las regiones 5' UTR de los genes *EGD1* y *BTT1*. Diagrama de Venn en el que se indican los elementos de regulación predichos en los 1000 pb escogidos como región 5' UTR de los genes mencionados, así como los elementos compartidos entre ambas UTRs.

genes duplicados (Baker, Hanson-Smith, & Johnson, 2013; Dalal & Johnson, 2017; Diss, Ascencio, Deluna, & Landry, 2014)

Es importante resaltar la presencia de una mayor cantidad de motivos predichos de unión de factores de transcripción de la respuesta a estrés en el promotor del gen *EGD1* y una mayor predominancia de los sitios de unión de factores de transcripción de la regulación del metabolismo de carbono en el promotor del gen *BTT1*, lo cual es consistente con los resultados mostrados en los apartados 9.3 y 9.4.

Cabe mencionar que parte de los 1000 pb escogidos como 5' UTR de los genes estudiados incluyen parte de la región promotora del gen *PMA2* en el caso de *EGD1* y de la región 3' del marco de lectura del gen *PAM1* en el caso del *BTT1*. Por este motivo, es posible que parte de los elementos de regulación predichos no sean parte de la región promotora de los genes de interés. A pesar de esto, es notable la correlación entre los factores de transcripción putativos y la regulación observada de los genes parálogos codificantes de las subunidades β -NAC.

10. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El destino evolutivo de los genes duplicados está determinado tanto por las constricciones de las redes de regulación genética en las que se integran, como por los efectos que tienen sobre la adecuación de los organismos a su ambiente. Entre los diversos destinos de los genes duplicados saltan a la vista la neofuncionalización y la subfuncionalización puesto que dependen de un matiz entre los dos elementos arriba mencionados dando origen a nuevas funciones biológicas, o bien, a una partición de las funciones del gen ancestral entre los genes parálogos.

NAC es una chaperona que compite con SRP por las cadenas nascentes de proteínas asegurando así la fidelidad en el reconocimiento de los sustratos para la vía de secreción. Asimismo, se ha reportado que asiste el plegamiento temprano de proteínas junto con RAC y que su ausencia resulta en letalidad embrionaria en animales modelo. En *S. cerevisiae*, la falta de fenotipos letales por mutaciones en NAC ha dado pie a análisis integrales en cuanto a su función en los que se ha determinado que participa en la importación de algunas proteínas a la mitocondria.

A diferencia de otros eucariontes, *S. cerevisiae* posee dos subunidades β -NAC codificadas por genes parálogos originados por WGD. En los análisis reportados sobre NAC de esta levadura, se estableció una clara divergencia de funciones entre los heterodímeros $\alpha\beta$ 1-NAC y $\alpha\beta$ 2-NAC que van desde una diferencia en la expresión de las genes codificantes para las subunidades β 1-NAC y β 2-NAC (Hu & Ronne, 1994) , la asociación a ribosomas cargados con RNAm pertenecientes a diferentes categorías (del Alamo et al., 2011), la asistencia diferencial en el plegamiento de proteínas nascentes (Ott et al., 2015), hasta la asociación con distintos elementos involucrados en importación de proteínas a la mitocondria (Lesnik et al., 2014; Ponce-Rojas et al., 2017).

El presente estudio tuvo como objetivo abordar la expresión de los genes parálogos *EGD1* y *BTT1* con el motivo de identificar los factores involucrados en su regulación y su interacción con el fenómeno de importación mitocondrial. Este trabajo se sustentó sobre el reporte de una diferencia en la expresión de los genes codificantes para las subunidades β -NAC de *S. cerevisiae* (Hu & Ronne, 1994) y

sobre la evidencia de la interacción funcional del heterodímero $\alpha\beta 2$ -NAC con elementos de la membrana externa mitocondrial y con ribosomas asociados a RNAm codificante para proteínas mitocondriales (del Alamo et al., 2011; Ponce-Rojas et al., 2017). Adicionalmente, el estudio también se basó en una serie de premisas derivadas de los modelos de duplicación genética y la regulación de la expresión génica en levadura:

- Los genes duplicados cambian de función y regulación por la acumulación de mutaciones (Conant & Wolfe, 2008; Innan & Kondrashov, 2010; Ohno, 1970; Wendel et al., 2018).
- Existen mecanismos de compensación que regulan la expresión de uno de los duplicados cuando la expresión de su parólogo se ve comprometida (Diss et al., 2014).
- El fenómeno de recableado transcripcional es consecuencia de la acumulación de mutaciones en las regiones de regulación de la expresión génica (Dalal & Johnson, 2017).
- Un gran conjunto de genes en *S. cerevisiae* son regulados como respuesta a cambios en la fuente de carbono (Broach, 2012; Gancedo, 1998; Kresnowati et al., 2006; Schuller, 2003).
- Existe una estrecha relación entre el metabolismo y la regulación de la expresión génica que le permiten a la levadura adaptarse a su medio (Broach, 2012; Kresnowati et al., 2006).
- El metabolismo y la biogénesis mitocondrial están altamente regulados por la fuente de carbono (Gerbeth et al., 2013; Kayikci & Nielsen, 2015; Schmidt et al., 2011).

Con base en lo anterior, es posible que la participación del heterodímero $\alpha\beta 2$ -NAC en la importación mitocondrial sea consecuencia de una neofuncionalización de la subunidad $\beta 2$ -NAC y que, a su vez, exista una correulación de la expresión de esta subunidad con la regulación al alza del metabolismo mitocondrial por fuentes de carbono distintas a la glucosa.

En el caso de que exista la correulación antes mencionada, en principio, debería estar causada por elementos de regulación presentes en la región

promotora de la transcripción del gen *BTT1*. En consecuencia, dichos elementos de regulación deberían ser distintos a los hallados en el gen *EGD1* como posible consecuencia del recableado transcripcional.

Por otra parte, con el fin de discernir qué elementos participan en la regulación de los genes *EGD1* y *BTT1* y de sus productos proteicos, en el presente proyecto se etiquetaron a éstos con epítomos de HA en cepas tanto silvestres como mutantes simples de cada uno de los genes codificantes de NAC. También, se diseñaron cepas en las que los genes *EGD1* y *BTT1* etiquetados fueron transferidos al locus cromosómico de su gen parálogo sobre un fondo genético previamente carente del parálogo relocalizado. De este modo, las cepas generadas permitieron contrastar los niveles proteicos de las proteínas $\beta 1$ - y $\beta 2$ -NAC en diferentes contextos. El diseño de las cepas mutantes estuvo basado en el razonamiento de que los genes codificantes para las subunidades β -NAC podrían estar regulados de manera diferencial por una divergencia de sus contextos genómicos (*i.e.* las regiones regulatorias aledañas a los marcos de lectura del gen en cuestión) en el curso de la evolución (cepas $P_{\beta 1\beta 2}$ y $P_{\beta 2\beta 1}$). Asimismo, la posibilidad de que las subunidades β -NAC posean un mecanismo de compensación en su regulación por la ausencia de uno de los parálogos o de la subunidad α -NAC, llevó a la generación de cepas en las que se eliminó uno de los componentes de NAC para evaluar su repercusión en los niveles proteicos de las proteínas duplicadas (cepas $\beta 1^{\Delta\beta 2}$, $\beta 2^{\Delta\beta 1}$, $\beta 1^{\Delta\alpha}$ y $\beta 2^{\Delta\alpha}$).

Ahora bien, las cepas $P_{\beta 1\beta 2}$ y $P_{\beta 2\beta 1}$ se evaluaron junto con las cepas mutantes $\Delta\beta 1$, $\Delta\beta 2$, $\Delta\alpha$, Δnac y *WT* en ensayos de crecimiento por diluciones seriadas en los medios YPD y YPEG para determinar si la relocalización de los genes *EGD1* y *BTT1* afectaba el fenotipo de crecimiento de las cepas mutantes. Como se había reportado previamente para las cepas mutantes $\Delta\beta 1$, $\Delta\beta 2$, $\Delta\alpha$, Δnac en fondos genéticos derivados de la cepa BY4741 (Ott et al., 2015; Ponce-Rojas et al., 2017), el fenotipo de crecimiento no tuvo diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre. En cuanto a las cepas $P_{\beta 1\beta 2}$ y $P_{\beta 2\beta 1}$, la primera no presentó diferencias de crecimiento comparada con la cepa silvestre, mientras que la segunda crecía ligeramente menos que la cepa silvestre en todos los experimentos realizados en

medio YPD. Sin embargo, esto último no se presentaba en el medio YPEG. El menor crecimiento de la cepa $P_{\beta 2}\beta 1$ se asemeja a algunos fenotipos observados por Ott et al., 2015 en cepas donde el gen *EGD1* fue colocado bajo el control de las regiones regulatorias del gen *BTT1* sobre un fondo genético en el que se eliminaron a las proteínas de los complejos NAC y RAC. A diferencia del estudio mencionado, las construcciones generadas en este trabajo se realizaron directamente en el locus cromosómico de los genes parálogos. Además, la disminución en los niveles proteicos de $\beta 1$ -NAC por el control de las regiones regulatorias del gen *BTT1*, aunado a la adición de las tres etiquetas de HA podría repercutir en su asistencia al plegamiento de proteínas y repercutir en el fenotipo de la célula.

Por otro lado, el ensayo de tolerancia al estrés oxidativo se realizó con el fin de evaluar si la relocalización de los genes parálogos alteraba la capacidad de las cepas generadas para contender con tal estímulo. No se encontraron diferencias en el fenotipo de crecimiento salvo en la cepa $\Delta\alpha$ que presentaba una resistencia superior a la cepa silvestre en los dos medios de cultivo evaluados. Este fenotipo puede deberse a que la subunidad α -NAC actúa como regulador negativo, a través de su dominio asociado a ubiquitina, de la asistencia de NAC en el plegamiento de proteínas (Ott et al., 2015). No obstante, en el estudio citado solamente se elimina el dominio asociado a ubiquitina mas no toda la subunidad α -NAC, por lo que hacen falta más estudios para evaluar la resistencia de la cepa $\Delta\alpha$ al estrés oxidante.

En resumen, los ensayos de crecimiento realizados permitieron determinar que no hay afectaciones significativas en el crecimiento de las cepas.

Debido a que se desconocen los factores que regulan y causan la diferencia en la expresión de los genes *EGD1* y *BTT1*, se evaluó si la fuente de carbono afectaba la regulación y por ende los niveles proteicos de las proteínas $\beta 1$ - y $\beta 2$ -NAC. La elección de esta condición a evaluar estuvo basada en el amplio margen de genes regulados como respuesta a la fuente de carbono, pero también por el nexo entre el heterodímero $\alpha\beta 2$ -NAC y la biogénesis mitocondrial, proceso también modulado por la fuente de carbono (Broach, 2012; del Alamo et al., 2011; Gerbeth et al., 2013; Ponce-Rojas et al., 2017).

Los niveles proteicos de las proteínas β 1- y β 2-NAC fueron determinados a partir de la inmunodetección con anticuerpos contra los epítomos de HA de extractos proteicos totales de las cepas generadas en este estudio. Éstos fueron obtenidos de cultivos en fase de crecimiento logarítmica en medio rico con glucosa, galactosa, glicerol o lactato como fuentes de carbono. Las fuentes de carbono fueron escogidas en virtud del efecto que tienen en la modulación de los programas de regulación en levadura.

El primer resultado que salta a la vista es la diferencia en los niveles proteicos de las proteínas β -NAC en su contexto silvestre (Figura 18). Mientras que β 1-NAC parece no presentar cambios en las cuatro fuentes de carbono evaluadas, β 2-NAC es regulado de manera diferencial dependiendo el tipo de fuente utilizada. Consistentemente, la señal de β 2-NAC fue detectada en todos los casos en las fuentes de carbono fermentables, en donde la señal era detectada con mayor intensidad en glucosa y en menor grado en galactosa. En cambio, ninguna señal fue obtenida en las fuentes de carbono no fermentable. Empero, este tipo de análisis poseen la limitante de que se observan los productos finales de una serie de procesos que van desde la transcripción del gen hasta su traducción, por lo que no se puede discernir entre efectos sobre la regulación a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional.

Cuando se evaluó el efecto que tenía la eliminación de otros genes de NAC (Figuras 19 y 20) en los niveles proteicos de las dos proteínas en cuestión, se obtuvieron dos conclusiones importantes. La primera es que los niveles proteicos de β 2-NAC dependen de la presencia de cualquiera de los otros componentes de NAC; la segunda es que β 1-NAC se presenta sin cambios en ausencia de β 2-NAC y que su señal disminuye en las fuentes de carbono no fermentables dada la falta de la subunidad α -NAC. El primer resultado permite suponer varias causas para los patrones observados: la existencia de un mecanismo compensatorio que reduce la expresión de β 2-NAC cuando se afecta la estequiometría de NAC (por la ausencia de otros componentes del complejo) o que β 2-NAC se vuelve inestable y propenso a degradación en ausencia de otros componentes de NAC. Este fenómeno se asemeja a lo reportado en DeLuna, et al, 2010 y en Diss et al., 2017 en donde la

existencia de genes parálogos en complejos multimoleculares deriva en fragilidad de los mismos por una dependencia estequiométrica de sus componentes. Contrario a lo establecido en donde la función redundante de los parálogos suple, en parte, la ausencia de su duplicado, en este caso la ausencia, de un parólogo no se ve respaldada por la presencia de su duplicado, sino al contrario, resulta perjudicial puesto que se ve comprometida la estabilidad de los complejos moleculares en que participan. En cuanto a NAC, se ha reportado que las subunidades de este complejo son capaces de formar homo- y heterodímeros entre sí por la presencia del dominio barril β aplanado NAC (George, et al., 2002; Nyathi & Pool, 2015). Es posible que la ausencia de las subunidades α - o β 1-NAC desestabilice algún heterómero transitorio del cual β 2-NAC forme parte y sea necesario para su estabilidad y/o funciones.

En cuanto a los niveles proteicos de β 1-NAC, es posible que la estabilidad de esta subunidad dependa de su asociación con α -NAC, hecho particularmente relevante en las fuentes de carbono no fermentables. Sin embargo, no se descarta que exista un fenómeno de regulación transcripcional que module a esta subunidad como respuesta a las fuentes de carbono no fermentables.

Ahora bien, los análisis anteriores dan pie a suponer que las subunidades NAC podrían estar reguladas a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional, especialmente cuando se comparan los niveles de β -NAC en las cepas $P_{\beta 1}\beta 2$ y $P_{\beta 2}\beta 1$ con los de las cepas las cepas $\beta 1^{\Delta\alpha}$ y $\beta 2^{\Delta\alpha}$. Primero, la característica común de las cepas $P_{\beta 1}\beta 2$ y $\beta 1^{\Delta\alpha}$ es que las proteínas evaluadas (β 2-3HA y β 1-3HA, respectivamente) están bajo el control transcripcional de la misma región genómica (el locus del gen *EGD1*). Cuando se evaluaron los niveles proteicos en estas cepas, se encontró que ambas mostraban una disminución de las proteínas β 2-3HA y β 1-3HA en fuentes de carbono no fermentables. Considerando que la misma región controla la expresión de las proteínas en cuestión, es posible especular que, a nivel transcripcional, β 1-NAC está modulada a la baja en fuentes de carbono no fermentables. Sin embargo, las cepas con los genes *EGD1* y *BTT1* etiquetados poseen su región 3' UTR alterada por la inserción del módulo *3HA::hph*, por lo que

las anteriores aseveraciones tendrían que confirmarse en el contexto genómico endógeno.

De igual modo, ya que la eliminación del gen *BTT1* no repercute en los niveles proteicos de β 1-NAC comparado con la cepa silvestre (Figuras 18 y 19), es posible que la subunidad α -NAC (ausente únicamente en la cepa β 1 $\Delta\alpha$) participe de algún modo previniendo una posible degradación de β 1-NAC cuando las cepas crecen en fuentes de carbono no fermentables.

Por otro lado, los resultados obtenidos al evaluar los niveles proteicos de β 1-NAC regulados por el contexto genómico del gen *BTT1* en la cepa P_{β 2 β 1, ponen en evidencia una actividad transcripcional constitutiva en las cuatro fuentes de carbono evaluadas. En consecuencia, es probable que los niveles proteicos observados de β 2-NAC en las cepas β 2, β 2 $\Delta\beta$ 1 y β 1 $\Delta\alpha$ sean el resultado de una expresión constitutiva y una regulación postraduccional o, inclusive, una desestabilización de complejos heteroméricos como ocurre en algunos casos (Diss et al., 2017). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que lo determinado en la cepa P_{β 2 β 1 esté enmascarando una regulación a nivel transcripcional debido a una mayor vida media de la proteína β 1-NAC.

De los análisis sobre los niveles de β 2-NAC se determinó que la subunidad se ve modulada por la fuente de carbono en contraste con β 1-NAC, y que dicha modulación puede deberse a una regulación transcripcional o postraduccional. Con el motivo de discernir con mayor precisión entre las dos posibilidades, se generó la construcción p β 2Z en las que clonaron las regiones 5' y 3' UTR que presumiblemente contienen a las regiones de regulación de la transcripción (1000 pb y 500 pb, respectivamente) del gen *BTT1* en el vector pRS316 y se colocó al gen *lacZ* bajo su control.

Una vez obtenida la construcción p β 2Z, se transformó en las cepas *WT* y $\Delta\beta$ 1 y se estimó la actividad de la región promotora a través del ensayo de β -galactosidasa. La elección de las cepas a transformar estuvo basada en tratar de dilucidar si la diferencia marcada en los niveles proteicos de β 2-NAC en las cepas β 2 y β 2 $\Delta\beta$ 1 era causada por cambios a nivel transcripcional o por el fenómeno de desestabilización de complejos heteroméricos antes mencionado.

En la Figura 22 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad de β -galactosidasa de las cepas crecidas en las cuatro fuentes de carbono antes mencionadas. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de dos mecanismos de regulación, uno actuando a nivel transcripcional y el otro a nivel postraduccional, hecho notable cuando se contrastan las filas $\beta 2$ y $\beta 2^{\Delta\beta 1}$ de las Figuras 18 y 19 con los niveles de actividad de β -galactosidasa. Lo primero que salta a la vista es la diferencia significativa encontrada en los niveles de actividad de la enzima cuando la cepa silvestre es crecida en medio con glucosa o glicerol, lo cual recapitula a lo observado en los niveles proteicos de $\beta 2$ -NAC en las mismas fuentes de carbono. De igual modo, se observa una disminución no significativa de la actividad de la enzima cuando se evalúa a la cepa crecida en galactosa, de nuevo recapitulando los niveles proteicos $\beta 2$ -NAC de la cepa silvestre crecida en este azúcar.

Sorprendentemente, el nivel de actividad obtenido de la evaluación de lactato fue prácticamente el mismo al encontrado en galactosa y, a su vez, no correlaciona con los niveles proteicos observados en esta fuente de carbono. Dicho resultado permite suponer que, en fuentes de carbono no fermentables, de manera similar a lo que ocurre con $\beta 1$ -NAC, existe una regulación postraduccional que modula a la baja a $\beta 2$ -NAC, aunque en glicerol éste se vería reforzado por la regulación transcripcional.

Ahora bien, la base de datos *Eukaryotic Promoter Database* (<https://epd.epfl.ch/index.php>) no solamente sirvió para validar los sitios putativos presentes en las regiones 5' UTR de los genes *EGD1* y *BTT1*, sino que se pudo consultar el posicionamiento de nucleosomas reportada por Park, et al., 2014 para ambos genes. Se encontró que hay una ocupación diferencial de nucleosomas, la cual es mayor en el gen *BTT1*. Este resultado parecería indicar que el locus del gen *BTT1* se encuentra en un estado de heterocromatina. Con base en esto, es posible que la disminución general observada de los niveles proteicos de $\beta 1$ -NAC en la cepa *P $\beta 2$ $\beta 1$* se deba en parte a la relocalización del marco de lectura del gen *EGD1* al locus genómico de *BTT1*.

Por otro lado, cuando se evaluaron los niveles de actividad de β -galactosidasa en las mismas fuentes de carbono estudiadas, pero en un fondo genético $\Delta\beta 1$, se

observaron niveles de actividad similares a los encontrados en el fondo genético silvestre con la distinción de que no se observa diferencia significativa en glicerol como en la cepa *WT*. Asimismo, este resultado permite suponer la existencia de una modulación postraduccional que depende de la presencia de β 1-NAC dado que, aunque los niveles de actividad del promotor de *BTT1* no presentan grandes diferencias entre las cepas *WT* y $\Delta\beta$ 1, los niveles de actividad no recapitulan del todo los niveles de la proteína β 2-NAC.

Finalmente, en una serie de análisis globales se encontró la presencia diferencial de modificaciones postraduccionales en las proteínas β 1- y β 2-NAC. (Albuquerque et al., 2008; Holt et al., 2009; Swaney et al., 2013). Tanto la fosforilación como la ubiquitinación pueden desencadenar la degradación de las proteínas blanco (Finley, Ulrich, Sommer, & Kaiser, 2012; Gottschling & Nyström, 2017; Swaney et al., 2013), por lo que reportes arriba mencionados, junto con la evidencia obtenida en este trabajo, permiten suponer que las subunidades β 1- y β 2-NAC se regulen también por un mecanismo de postraduccional. Además, en Holt et al., 2009 se reportó que la modificación en T151 de β 1-NAC se debe a la cinasa Cdc28, lo cual relaciona la regulación de esta subunidad con el ciclo celular. Además, dado que el ciclo celular se ve regulado por la fuente de carbono, particularmente por las fuentes de carbono no fermentables, surge un nexo que explica en parte las variaciones en los niveles proteicos de β 1-NAC (Broach, 2012; Haase & Wittenberg, 2014). Las ubiquitinaciones son marcas que en su mayoría etiquetan a las proteínas para su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma, por lo que el hallazgo de dicha marca en β 2-NAC podría explicar la variación en los niveles proteicos observados. No obstante, hacen falta más estudios para determinar por qué la ausencia de β 1-NAC induce una posible degradación de β 2-NAC.

Queda pendiente estudiar la regulación transcripcional de *BTT1* en la cepa $\Delta\alpha$, aunque es posible especular que el efecto observado en los niveles proteicos de β 2-NAC se deban a una mayor inestabilidad de la proteína de manera análoga a lo que podría ocurrir con β 1-NAC en ausencia de α -NAC.

Hasta el momento, los resultados obtenidos permiten suponer que la regulación de las subunidades β -NAC recaía en parte en una modulación a nivel transcripcional, y que, para la subunidad β 2-NAC, dicha regulación depende de la fuente de carbono en contraste con la subunidad β 1-NAC que parece tener una expresión constitutiva. Como se mencionó en la introducción para la neo- y subfuncionalización, los cambios en la regulación de los genes parálogos se deben a mutaciones acaecidas en las regiones que controlan su expresión. Es por esta razón que se analizaron 1000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de los genes *EGD1* y *BTT1* en el sitio en línea www.yeasttract.com y en <https://epd.epfl.ch//index.php> para determinar si hay una presencia diferencial de sitios de unión a factores de transcripción presentes en las regiones de regulación. Se optó por analizar tal cantidad de pares de bases río arriba de los genes de interés para incluir aquellos elementos de regulación que pudiesen operar a distancia y que podrían intervenir en la regulación de los genes parálogos.

En tal análisis, se fijó el enfoque en aquellos factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés y a la fuente de carbono puesto que se ha reportado que las chaperonas cambian sus perfiles de expresión ante eventos de comprometan la estabilidad proteica (Boos et al., 2019; Hahn, et al., 2006), así como con aquellas fuentes de carbono que inducen el metabolismo mitocondrial (Abbas-Terki, et al., 2001; Boos et al., 2019; Verghese, et al., 2012).

Como se esperaba, al menos a nivel del análisis bioinformático, hay diferencias en los sitios putativos de unión a factores de transcripción entre ambos genes. La primera es la diferencia en los motivos de unión a factores de respuesta a estrés. Entre los factores que se encontraron en la región promotora de *EGD1* resaltan Gis1, Hac1, Hsf1, Msn2/4 y Yap1, elementos de respuesta a estrés ambiental en levadura (Gasch, 2007). La presencia diferencial de estos elementos de regulación permite suponer que *EGD1* es un gen controlado de manera constitutiva y que, en estímulos de estrés, se ve modulado para contender con la afectación al plegamiento proteico, hecho que se ha reportado previamente en Ott et al., 2015.

Con respecto a lo hallado para factores de transcripción de respuesta a la fuente de carbono, se encontraron ocho para el gen *EGD1* y siete para *BTT1*, de los cuales

seis están compartidos entre sí. De los factores encontrados diferencialmente están Gal4 para *EGD1* y, notablemente, el complejo Hap 2/3/4/5 en *BTT1*. Adicionalmente, se encontró un sitio de unión a Gcn4, el regulador maestro de la biosíntesis de aminoácidos, en este último gen (Natarajan et al., 2001).

A pesar de que los genes *EGD1* y *BTT1* comparten casi todos los sitios de unión a factores de transcripción involucrados en la respuesta a la fuente de carbono (inclusive un sitio de unión para Hap1), divergen en cuanto a la presencia de sitios de unión a factores de estrés, lo cual permite suponer que ambos genes están regulados diferencialmente a nivel transcripcional: mientras que el primer gen es regulado principalmente por la respuesta a estrés por la presencia de varias cajas de unión a factores de estrés, la predominancia de motivos de unión a factores de respuesta a carbono haría que el segundo gen se regule en mayor medida por la fuente de carbono, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio. Asimismo, la presencia de motivos de unión para el complejo Hap establece un vínculo entre la regulación de *BTT1* con la biogénesis mitocondrial, con la que se le ha relacionado funcionalmente (del Alamo et al., 2011; Guarente, et al., 1984; Ponce-Rojas et al., 2017).

La mayoría de los factores encontrados que poseen un sitio consenso de unión en las regiones analizadas pueden regular tanto positiva como negativamente la expresión, fenómeno estrictamente dependiente del gen regulado. Además, el análisis *in silico* tiene la limitante de basarse solamente en la secuencia de nucleótidos, por lo que experimentos de coimmunoprecipitación de cromatina serían necesarios para confirmar su asociación a las regiones estudiadas. Adicionalmente, parte de los motivos de unión encontrados en los 1000 pb analizados de los genes estudiados caen en la región codificante de genes río arriba. En particular, para *EGD1*, la región analizada incluye parte de los primeros 60 nucleótidos del marco de lectura abierto del gen *PMA2*, una ATPasa de membrana que bombea protones fuera de la célula involucrada en regular el pH citoplásmico. Es posible que las cajas de unión encontradas para *EGD1* sean parte de la región promotora de *PMA2*. Por otro lado, el gen río arriba más próximo cuya función se desconoce (*PAM1*) a *BTT1* posee su codón de paro a 306 pb del sitio de inicio de la traducción, por lo que el

promotor de este parálogo podría estar aún más restringido que el de *EGD1* en cuanto a regiones de regulación. No obstante, la información provista apoya la hipótesis de una regulación diferencial a nivel transcripcional de los genes *EGD1* y *BTT1*.

En conjunto, la evidencia obtenida en este trabajo sobre la regulación de las subunidades $\beta 1$ - y $\beta 2$ -NAC muestra que existe una regulación diferencial entre ambas subunidades y que sus niveles proteicos son el resultado de dos niveles de regulación, uno transcripcional y el otro postraduccional. No obstante, las diferencias en expresión y función halladas en los genes *EGD1* y *BTT1* por el momento no se pueden atribuir a alguno de los modelos de subfuncionalización o neofuncionalización puesto que poco se ha descrito en la literatura sobre las funciones de NAC en aquellos organismos donde no ocurrió la WGD. A pesar de ello, basado en los estudios reportados hasta el momento sobre $\beta 2$ -NAC (del Alamo et al., 2011; Ponce-Rojas et al., 2017), pareciera que las funciones de dicha subunidad son el resultado de una microneofuncionalización (Levasseur & Pontarotti, 2011). En este tipo de neofuncionalización, uno de los duplicados no experimenta una alteración diametral de la función de su gen ancestral, sino el cambio en alguna actividad metabólica o en la afinidad por un ligando.

En el caso de $\beta 2$ -NAC, su asociación preferencial a ribosomas acoplados a RNAm codificantes de proteínas mitocondriales (del Alamo et al., 2011) y su papel en la importación de algunas proteínas mitocondriales junto con Sam37 (Ponce-Rojas et al., 2017), permite apoyar el modelo de microneofuncionalización. Particularmente, una evidencia que apoya esta proposición es la reportada en Lesnik et al., 2014 en donde OM14 actúa como receptor del heterodímero $\alpha\beta 1$ -NAC y colabora en la importación cotraduccional de algunas proteínas. En vista de que del Alamo et al., 2011 reportó que $\alpha\beta 1$ -NAC se asocia a ribosomas en complejo con RNAm de proteínas de la vía de secreción y citosólicas, es posible que la asociación de los heterodímeros $\alpha\beta$ -NAC con componentes de la superficie mitocondrial sea una característica propia de esta chaperona, y que el heterodímero $\alpha\beta 2$ -NAC, a través de una microneofuncionalización, se haya especializado en la importación de proteínas mitocondriales. No obstante, hacen falta estudios comparativos sobre

NAC en aquellos organismos descendientes de la WGD que dio origen a *S. cerevisiae* para determinar qué tipo de cambio evolutivo ocurrió con las subunidades β -NAC.

Finalmente, en este estudio se determinó que la subunidad β 2-NAC es regulada diferencialmente de la subunidad β 1-NAC, y que dicha regulación depende de la fuente de carbono, con una regulación positiva en fuentes de carbono fermentables y negativa en aquellas no fermentables. Asimismo, se especula sobre una regulación traduccional o postraduccional en fuentes de carbono no fermentables sobre ambas subunidades β -NAC (Figura 24). Dichas evidencias refutan la hipótesis planteada al inicio de este estudio puesto que la regulación diferencial propuesta para la subunidad β 2-NAC no ocurre al alza en fuentes de carbono respiratorias, sino a la baja. Es posible que esta regulación ocurra a nivel de la regulación transcripcional y probablemente también a nivel postraduccional. Es plausible que dicha regulación involucre una interacción más estrecha entre β 1- y β 2-NAC, lo cual permite vislumbrar un fenómeno más complejo del que se pensaba para las subunidades β -NAC parálogas que queda para posteriores investigaciones.

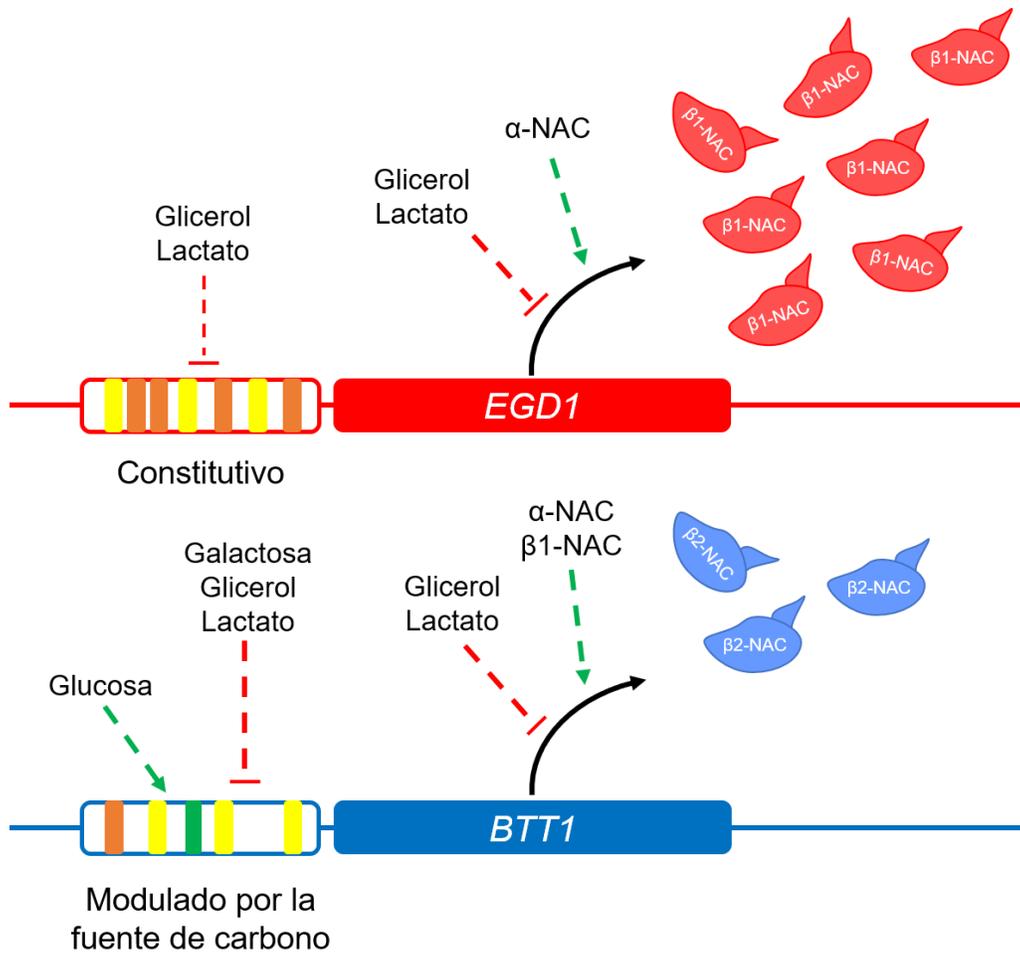


Figura 24. Modelo final. Se muestran las contribuciones positivas o negativas de los factores que en este estudio se determinaron que afectan los niveles proteicos de β 1- y β 2-NAC, así como el nivel (transcripcional o postranscripcional) en el que se propone que operan. Las regiones promotoras se muestran como recuadros vacíos con cajas de unión a factores de transcripción en colores.

11. CONCLUSIONES

- Los niveles proteicos de β 2-NAC son modulados a la baja en fuentes de carbono distintas a la glucosa.
- En ausencia de la subunidad α -NAC, los niveles proteicos de β 1-NAC se modulan a la baja en fuentes de carbono no fermentables.
- Son necesarias las subunidades α -NAC y β 1-NAC para la estabilidad de la proteína de β 2-NAC.
- Hay un mecanismo de regulación traduccional o postraduccional de las subunidades β -NAC en fuentes de carbono no fermentables.
- Las regiones promotoras de los genes *EGD1* y *BTT1* poseen diferentes motivos de unión a factores de transcripción que explican en parte la diferencia de regulación entre ambos genes.

12. PERSPECTIVAS

La regulación diferencial de las subunidades parece responder a la fuente de carbono, hecho particularmente remarcado en la subunidad β 2-NAC. Debido a que los genes parálogos cambian sus perfiles de regulación por la acumulación y que la fijación de mutaciones depende de la historia evolutiva del linaje en cuestión (Chandan & Indra, 2014; Innan & Kondrashov, 2010), los patrones de regulación de las subunidades β -NAC, en particular la dependencia de la fuente de carbono podría ser diferente en cepas de *S. cerevisiae* con adaptaciones a diferentes estilos de vida. Asimismo, la presencia del sitio de unión a Gcn4 permite especular que la fuente de nitrógeno tenga algún efecto sobre la regulación de la expresión del gen *BTT1*.

Además, en Ponce-Rojas et al., 2017 se ha reportado que, en ausencia de los genes *BTT1* y *SAM37*, algunas proteínas mitocondriales ven su importación comprometida, y que en ausencia del gen *EGD1* tal fenómeno no ocurre. En este estudio se determinó que los niveles proteicos de β 2-NAC dependen también de la subunidad β 1-NAC, por lo que queda la cuestión sobre cómo se correlaciona la participación de β 2-NAC en la importación de proteínas, así como su regulación. Por tanto, se proponen las siguientes estrategias para la continuación de este proyecto:

1. Evaluar la contribución de la fuente de carbono sobre los niveles proteicos de las subunidades β -NAC en cepas de *S. cerevisiae* distintas a las derivadas de la cepa parental S288C.
2. Comparar la expresión de los genes *EGD1* y *BTT1* en respuesta a la fuente de carbono en las cepas antes mencionadas.
3. Evaluar los niveles proteicos de β 2-NAC en cepas de fondo genético Δ *sam37* y Δ *egd1 Δ *sam37*.*
4. Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de la subunidad de β 2-NAC en diferentes fondos genéticos.

13. APÉNDICE

13.1 MEDIOS DE CULTIVO

- YPD: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v y glucosa 2 % w/v.
- YPGal: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v y galactosa 2 % w/v.
- YPGli: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v y glicerol 2 % v/v.
- YPLac: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v y DL-lactato 2 % w/v.
- YPEG: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v, etanol 1 % v/v y glicerol 1 % v/v.
- YPD + Hyg: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v, glucosa 2 % w/v e Higromicina B 250 µg/mL.
- YPD + G418: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v, glucosa 2 % w/v y G418 100 µg/mL.
- YPD + Hyg + G418: Extracto de levadura 1 % w/v, bactopectona 2 % w/v, glucosa 2 % w/v, Higromicina B 250 µg/mL y G418 100 µg/mL.
- LB: NaCl 1 % w/v, bactopectona 1 % w/v, extracto de levadura 0.5 % w/v.
- SD-ura: Base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7 mg/mL, (NH₄)₂SO₄ 5 mg/mL, adenina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 30 µg/mL, lisina 30 µg/mL, arginina 20 µg/mL y glucosa 2 %.
- SGal-ura: Base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7 mg/mL, (NH₄)₂SO₄ 5 mg/mL, adenina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 30 µg/mL, lisina 30 µg/mL, arginina 20 µg/mL y galactosa 2 %.
- SGli-ura: Base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7 mg/mL, (NH₄)₂SO₄ 5 mg/mL, adenina 20 µg/mL, triptófano 20 µg/mL, histidina 20 µg/mL, leucina 30 µg/mL, lisina 30 µg/mL, arginina 20 µg/mL y glicerol 2 %.

- SLac-ura: Base nitrogenada sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7 mg/mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mg/mL, adenina 20 $\mu\text{g/mL}$, triptófano 20 $\mu\text{g/mL}$, histidina 20 $\mu\text{g/mL}$, leucina 30 $\mu\text{g/mL}$, lisina 30 $\mu\text{g/mL}$, arginina 20 $\mu\text{g/mL}$ y DL-lactato 2 %.

Para los mismos medios, pero en estado sólido, se agregó agar hasta el 2 % w/v.

13.2 SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa

- TAE 50X: Tris 242 g/L, ácido acético glacial 57.1 mL/L, EDTA (0.5 M pH 8.0) 100 mL/L.
- Amortiguador de carga 6X: Azul de bromofenol 0.25 % w/v, xileno cianol 0.25 % w/v y glicerol 30 % v/v.

Soluciones para electroforesis desnaturizante de proteínas

- Amortiguador de corrida: Glicina 385 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y SDS 0.1% w/v.
- Amortiguador de transferencia: Glicina 191.8 mM, Tris-HCl 24.7 mM, SDS 0.1% w/v y Metanol 20 % v/v.
- Rojo de Ponceau: Ácido acético glacial 1 % v/v y pigmento rojo de Ponceau 1 % w/v.
- TBS: NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7.5.
- TBS-Tween: NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y Tween 20 0.1 % v/v.

13.3 TIEMPOS DE DUPLICACIÓN ESTIMADOS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Los siguientes datos se obtuvieron a partir de ensayos de crecimiento con la cepa *WT* con la siguiente ecuación

$$T_{\text{Duplicación}} = \frac{\ln 2 * t}{\ln \frac{DO_f}{DO_i}}$$

- $T_{\text{Duplicación}}$: Tiempo en horas que le toma a un cultivo duplicar su densidad óptica
- t : Tiempo de incubación del cultivo en horas
- DO_f : Densidad óptica a 600 nm del cultivo luego de t tiempo de incubación
- DO_i : Densidad óptica a 600 nm del cultivo al iniciar la incubación

Tiempos de duplicación de la cepa BY4741 para el análisis de los niveles proteicos de las subunidades β -NAC.

Medio	Tiempo de duplicación
YPD	1.93 h
YPGal	1.93 h
YPGli	4.5 h
YPLac	4.5 h

Tiempos de duplicación BY4741 para el ensayo de actividad de β -galactosidasa

Medio	Tiempo de duplicación
SD-ura	2.42 h
SGal-ura	5.01 h
SGli-ura	9.06 h
SLac-ura	7.48 h

14. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas-Terki, T., Donze, O., Briand, P.-A., & Picard, D. (2001). Hsp104 Interacts with Hsp90 Cochaperones in Respiring Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7569–7575. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.22.7569-7575.2001>
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J., & Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(7), 1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>
- Bailey, J. A., Liu, G., & Eichler, E. E. (2003). An Alu Transposition Model for the Origin and Expansion of Human Segmental Duplications. *American Journal of Human Genetics*, 73(4), 823–834. <https://doi.org/10.1086/378594>
- Baker, C. R., Hanson-Smith, V., & Johnson, A. D. (2013). Following Gene Duplication, Paralog Interference Constrains Transcriptional Circuit Evolution. *Science*, 342(6154), 104–108. <https://doi.org/10.1126/science.1240810>
- Barnett, J. A. (1976). The utilization of sugars by yeasts. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32(C), 125–234. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60337-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60337-6)
- Bateman, R., & DiMichele, W. (2002). Generating and filtering major phenotypic novelties. En J. A. Cronk, C. B., Bateman, RichardM. Hawkins (Ed.), *Developmental Genetics and Plant Evolution* (pp. 109–159). <https://doi.org/10.1201/9781420024982.ch7>
- Bhat, P. J. (2008). Galactose regulon of yeast: From genetics to systems biology. En *Galactose Regulon of Yeast: From Genetics to Systems Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74015-5>
- Bloss, T. A., Witze, E. S., & Rothman, J. H. (2003). Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Vol. 424, pp. 1066–1071. <https://doi.org/10.1038/nature01920>
- Boos, F., Krämer, L., Groh, C., Jung, F., Haberkant, P., Stein, F., ... Herrmann, J. M. (2019). Mitochondrial protein-induced stress triggers a global adaptive transcriptional programme. *Nature Cell Biology*, 21(4), 442–451.

<https://doi.org/10.1038/s41556-019-0294-5>

- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, *14*(2), 115–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2)
- Broach, J. R. (2012). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, *192*(1), 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Bull, A. L. (1966). Bicaudal, a genetic factor which affects the polarity of the embryo in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, *161*(2), 221–241. <https://doi.org/10.1002/jez.1401610207>
- Chandan, R., & Indra, D. (2014). Gene duplication: A major force in evolution and bio-diversity. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, *6*(1), 41–49. <https://doi.org/10.5897/IJBC2012.090>
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9, pp. 938–950. <https://doi.org/10.1038/nrg2482>
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2012). The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics*, *190*(1), 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>
- Dalal, C. K., & Johnson, A. D. (2017). How transcription circuits explore alternative architectures while maintaining overall circuit output. *Genes and Development*, Vol. 31, pp. 1397–1405. <https://doi.org/10.1101/gad.303362.117>
- del Alamo, M., Hogan, D. J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P. O., & Frydman, J. (2011). Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biology*, *9*(7), e1001100. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001100>
- DeLuna, A., Springer, M., Kirschner, M. W., & Kishony, R. (2010). Need-based up-regulation of protein levels in response to deletion of their duplicate genes. *PLoS Biology*, *8*(3), e1000347. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000347>

- Deng, J. M., & Behringer, R. R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Research*, 4(4), 264–269. <https://doi.org/10.1007/BF01969120>
- Diss, G., Ascencio, D., Deluna, A., & Landry, C. R. (2014). Molecular mechanisms of paralogous compensation and the robustness of cellular networks. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, Vol. 322, pp. 488–499. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22555>
- Diss, G., Gagnon-Arsenault, I., Dion-Coté, A. M., Vignaud, H., Ascencio, D. I., Berger, C. M., & Landry, C. R. (2017). Gene duplication can impart fragility, not robustness, in the yeast protein interaction network. *Science*, 355(6325), 630–634. <https://doi.org/10.1126/science.aai7685>
- Duan, S. F., Han, P. J., Wang, Q. M., Liu, W. Q., Shi, J. Y., Li, K., ... Bai, F. Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature Communications*, 9(1), 2690. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05106-7>
- Dujon, B. A., & Louis, E. J. (2017). Genome diversity and evolution in the budding yeasts (Saccharomycotina). *Genetics*, 206(2), 717–750. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216>
- Emery, M., Willis, M. M. S., Hao, Y., Barry, K., Oakgrove, K., Peng, Y., ... Conant, G. C. (2018). Preferential retention of genes from one parental genome after polyploidy illustrates the nature and scope of the genomic conflicts induced by hybridization. *PLoS Genetics*, 14(3), e1007267. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007267>
- Escalera-Fanjul, X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2019). Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life. *Trends in Genetics*, Vol. 35, pp. 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.008>
- Espinosa-Cantú, A., Ascencio, D., Barona-Gómez, F., & DeLuna, A. (2015). Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. *Frontiers in Genetics*, 6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00227>
- Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T., & Kaiser, P. (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 192(2), 319–360.

<https://doi.org/10.1534/genetics.112.140467>

- Force, A, Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151(4), 1531–1545. Recuperado de <http://www.genetics.org/content/genetics/151/4/1531.full.pdf>
- Force, Allan, Cresko, W. A., Pickett, F. B., Proulx, S. R., Amemiya, C., & Lynch, M. (2005). The origin of subfunctions and modular gene regulation. *Genetics*, 170(1), 433–446. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.027607>
- Gamerding, M., Hanebuth, M. A., Frickey, T., & Deuerling, E. (2015). The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science*, 348(6231), 201–207. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5335>
- Gamerding, M., Kobayashi, K., Wallisch, A., Kreft, S. G., Sailer, C., Schlömer, R., ... Deuerling, E. (2019). Early Scanning of Nascent Polypeptides inside the Ribosomal Tunnel by NAC. *Molecular Cell*, 75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.030>
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(2), 334–361. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618445> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98918>
- Garcia-Perez, J. L., Morell, M., Scheys, J. O., Kulpa, D. A., Morell, S., Carter, C. C., ... Moran, J. V. (2010). Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature*, 466(7307), 769–773. <https://doi.org/10.1038/nature09209>
- Gasch, A. P. (2007). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. En *Yeast Stress Responses* (pp. 11–70). https://doi.org/10.1007/3-540-45611-2_2
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., & Lithgow, T. (2002). The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2296–2301. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2296>

- Gerbeth, C., Schmidt, O., Rao, S., Harbauer, A. B., Mikropoulou, D., Opalinska, M., ... Meisinger, C. (2013). Glucose-induced regulation of protein import receptor tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metabolism*, 18(4), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.006>
- Gietz, R. D. (2014). Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Molecular Biology*, 1163, 33–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0799-1_4
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Golemis, E. A., Serebriiskii, I., Finley, R. L., Gyuris, J., & Brent, R. (2001). Interaction Trap/Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins (hunt by interaction mating) 2 , Mikhail G. Kolonin (hunt by interaction mating). *Current protocols in cell biology*, Chapter 17, Unit 17.3. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1703s08>
- Gottschling, D. E., & Nyström, T. (2017). The Upsides and Downsides of Organelle Interconnectivity. *Cell*, 169(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.030>
- Gould, S. J. (2002). The structure of evolutionary theory. En *Harvard University Press Cambridge MA* (Vol. 3). Recuperado de <http://www.loc.gov/catdir/toc/fy035/2001043556.html>
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., & Alani, E. (1984). Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, 36(2), 503–511. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90243-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90243-5)
- Haase, S. B., & Wittenberg, C. (2014). Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics*, 196(1), 65–90. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152595>
- Hahn, J. S., Neef, D. W., & Thiele, D. J. (2006). A stress regulatory network for coordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Molecular Microbiology*, 60(1), 240–251.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05097.x>

- Hancks, D. C., & Kazazian, H. H. (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0065-9>
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villen, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global analysis of cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325(5948), 1682–1686. <https://doi.org/10.1126/science.1172867>
- Hu, G. zhen, & Ronne, H. (1994). Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1093/nar/22.14.2740>
- Hufton, A. L., & Panopoulou, G. (2009). Polyploidy and genome restructuring: a variety of outcomes. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 19, pp. 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.005>
- Hurst, L. D. (2009). Fundamental concepts in genetics: Genetics and the understanding of selection. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10, pp. 83–93. <https://doi.org/10.1038/nrg2506>
- Innan, H., & Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: Classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 11, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2689>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
- Jackson, S., & Chen, Z. J. (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 13, pp. 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.11.004>
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., ... Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, 21(11), 947–962. <https://doi.org/10.1002/yea.1142>
- Johnson, J. M., Smith, J. S., & Schneider, D. A. (2014). *Yeast Genetics* (J. S. Smith

- & D. J. Burke, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1363-3>
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *15*(6), fov068. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *428*(6983), 617–624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J. M., & Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, Vol. 19, pp. 878–893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
- Koplin, A., Preissler, S., Llina, Y., Koch, M., Scior, A., Erhardt, M., & Deuerling, E. (2010). A dual function for chaperones SSB-RAC and the NAC nascent polypeptide-associated complex on ribosomes. *Journal of Cell Biology*, *189*(1), 57–68. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910074>
- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., & Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, *16*(6), 589–597. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>
- Kresnowati, M. T. A. P., Van Winden, W. A., Almering, M. J. H., Ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T. A., ... Daran, J. M. (2006). When transcriptome meets metabolome: Fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Molecular Systems Biology*, *2*, 49. <https://doi.org/10.1038/msb4100083>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., & Arava, Y. (2014). OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms6711>
- Levasseur, A., & Pontarotti, P. (2011). The role of duplications in the evolution of

- genomes highlights the need for evolutionary-based approaches in comparative genomics. *Biology Direct*, Vol. 6, p. 11. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-11>
- Liang, Z., & Schnable, J. C. (2018). Functional Divergence between Subgenomes and Gene Pairs after Whole Genome Duplications. *Molecular Plant*, Vol. 11, pp. 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.12.010>
- Liao, D. (1999). Concerted evolution: Molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics*, 64(1), 24–30. <https://doi.org/10.1086/302221>
- Liu, Y., Hu, Y., Li, X., Niu, L., & Teng, M. (2010). The crystal structure of the human nascent polypeptide-associated complex domain reveals a nucleic acid-binding region on the NACA subunit. *Biochemistry*, 49(13), 2890–2896. <https://doi.org/10.1021/bi902050p>
- Long, M. (2001). Evolution of novel genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 11, pp. 673–680. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00252-5)
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002220>
- Marsit, S., Leducq, J. B., Durand, É., Marchant, A., Filteau, M., & Landry, C. R. (2017). Evolutionary biology through the lens of budding yeast comparative genomics. *Nature Reviews Genetics*, 18(10), 581–598. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.49>
- Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B., & Wiedmann, M. (1998). Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Letters*, 441(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01440-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01440-9)
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., & Marton, M. J. (2001). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), 4347–4368.

<https://doi.org/10.1128/mcb.21.13.4347-4368.2001>

- Nyathi, Y., & Pool, M. R. (2015). Analysis of the interplay of protein biogenesis factors at the ribosome exit site reveals new role for NAC. *Journal of Cell Biology*, 210(2), 287–301. <https://doi.org/10.1083/jcb.201410086>
- Ohno, S. (1970). Evolution by Gene Duplication. En *Allen and Unwin, London* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-86659-3>
- Ott, A. K., Locher, L., Koch, M., & Deuerling, E. (2015). Functional dissection of the nascent polypeptide-associated complex in *saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 10(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143457>
- Park, D., Morris, A. R., Battenhouse, A., & Iyer, V. R. (2014). Simultaneous mapping of transcript ends at single-nucleotide resolution and identification of widespread promoter-associated non-coding RNA governed by TATA elements. *Nucleic Acids Research*, 42(6), 3736–3749. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1366>
- Payne, J. L., & Wagner, A. (2014). The robustness and evolvability of transcription factor binding sites. *Science*, 343(6173), 875–877. <https://doi.org/10.1126/science.1249046>
- Piškur, J., & Compagno, C. (2014). Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism. En *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3>
- Ponce-Rojas, J. C., Avendaño-Monsalve, M. C., Yañez-Falcón, A. R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., Torres-Quiroz, F., ... Funes, S. (2017). $\alpha\beta^1$ -NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *FEBS Journal*, 284(5), 814–830. <https://doi.org/10.1111/febs.14024>
- Rouquier, S., Blancher, A., & Giorgi, D. (2000). The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: Evidence for reduction of the functional fraction in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2870–2874. <https://doi.org/10.1073/pnas.040580197>
- Schmidt, O., Harbauer, A. B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., ... Meisinger, C. (2011). Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic

- kinases. *Cell*, 144(2), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.015>
- Schuller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 43, 139–160. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0381-8>
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *En Genetics* (Vol. 122).
- Spreter, T., Pech, M., & Beatrix, B. (2005). The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15849–15854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500160200>
- Swaney, D. L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., ... Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature Methods*, 10(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2519>
- Thompson, D. A., Roy, S., Chan, M., Styczynsky, M. P., Pfiffner, J., French, C., ... Regev, A. (2013). Evolutionary principles of modular gene regulation in yeasts. *eLife*, 2013(2), 603. <https://doi.org/10.7554/eLife.00603>
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y., & Morano, K. A. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115–158. <https://doi.org/10.1128/mnbr.05018-11>
- Viets, K., Eldred, K. C., & Johnston, R. J. (2016). Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates. *Trends in Genetics*, 32(10), 638–659. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.07.004>
- Vinckenbosch, N., Dupanloup, I., & Kaessmann, H. (2006). Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3220–3225. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511307103>
- Wang, S., Sakai, H., & Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent

- chains just emerging from the peptidyl transferase center. *Journal of Cell Biology*, 130(3), 519–528. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.519>
- Wegrzyn, R. D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C., & Deuerling, E. (2006). A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2847–2857. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511420200>
- Wendel, J. F., Lisch, D., Hu, G., & Mason, A. S. (2018). The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 49, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.01.004>
- Wiedmann, B., & Prehn, S. (1999). The nascent polypeptide-associated complex (NAC) of yeast functions in the targeting process of ribosomes to the ER membrane. *FEBS Letters*, 458(1), 51–54. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01118-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01118-7)
- Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A., & Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370(6489), 434–440. <https://doi.org/10.1038/370434a0>
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., ... Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901–906. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.901>
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the yeast whole-genome duplication. *PLoS Biology*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002221>
- Yue, J. X., Li, J., Aigrain, L., Hallin, J., Persson, K., Oliver, K., ... Liti, G. (2017). Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts. *Nature Genetics*, 49(6), 913–924. <https://doi.org/10.1038/ng.3847>
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: An update. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 18, pp. 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)