



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El complejo represor híbrido Nrg1-Rtg3-Ala: Identificación de su organización y del  
circuito génico bajo su control

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Cecilia Carretero Camberos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Alicia González Manjarrez

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular.  
UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. A.C.

Dr. Enrique Merino Pérez

Instituto de Biotecnología. UNAM

Ciudad de México. Febrero de 2023



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.



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 está 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 lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**CARRETERO CAMBEROS CECILIA**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **16 de enero de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestra en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**El complejo represor híbrido Nrg1-Rtg3-Ala: Identificación de su organización y del circuito génico bajo su control**", dirigida por el/la Dr(a). **GONZÁLEZ MANJARRÉZ MARÍA ALICIA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

SOBERÓN CHÁVEZ GLORIA	PMDCBQ	PRESIDENTE
PERAZA REYES CARLOS LEONARDO	PMDCBQ	SECRETARIO
COCOTL YAÑEZ MIGUEL	PMDCBQ	VOCAL
GONZÁLEZ PEDRAJO BERTHA MARÍA JOSEFINA	PMDCBQ	VOCAL
HERNÁNDEZ LUCAS ISMAEL	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 7 de febrero de 2023



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Maestra en Ciencias del programa de “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la Dra. María Alicia González Manjarrez en el laboratorio 301-Oriente en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

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

Tutora principal:

Dra. Alicia González Manjarrez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Comité tutor:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. A.C.

Dr. Enrique Merino Pérez. Instituto de Biotecnología, UNAM.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo 101729 y por la Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No IN202521. Durante el desarrollo de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de becario: 1082910.

Se reconocen la dedicación y aportes de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz y el Dr. Enrique Merino Pérez que, con su tiempo, paciencia y experiencia, ayudaron a mejorar y hacer crecer este proyecto en cada reunión del comité tutor.

Se reconoce los aportes de la Doctora Gloria Soberón Chávez, el Doctor Carlos Leonardo Peraza Reyes, el Doctor Miguel Cocotl Yáñez, la Doctora Bertha María Josefina González Pedrajo y el Doctor Ismael Hernández Lucas por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron el trabajo de este manuscrito.

Se reconoce la invaluable ayuda del Dr. José Carlos Campero Basaulda que, por su experiencia, sus buenas y oportunas sugerencias, por brindar su apoyo siempre que se necesitó contribuyó a mejorar el desarrollo de este proyecto de maestría.

Se reconoce a la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta por los servicios de síntesis de oligonucleótidos y la disposición de los equipos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce al Dr. Yordanis Pérez Llano de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por el análisis de secuenciación de RNA-seq del cual surgen datos relevantes que complementan este trabajo.

Se reconoce al Dr. Edgar Adrián Ramírez del Instituto de Fisiología Celular y al Dr. Héctor Quezada del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez por el análisis de proteómica que se tiene destinado a realizar con el fin de identificar a los miembros del complejo híbrido.

Se reconoce el ejemplar trabajo de Cristina Jardínez Godínez por siempre poner a nuestra disposición lo indispensable para trabajar en el laboratorio.

Se reconoce a los integrantes de la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo y atención brindados, en especial al asistente de procesos Julio Ignacio Palacios Ordoñez por la excelente disposición, atención y paciencia para todos los trámites realizados.

Se reconoce al Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortíz Benavides, personal del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular, por conservar en buen estado todo el equipo del laboratorio, el cual se utilizó para el desarrollo de este trabajo.

Se reconoce la ayuda, disposición y apoyo secretarial de María del Rocío Romualdo Martínez, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce a la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por el mantenimiento de la red inalámbrica y los equipos del instituto.

Dar el ejemplo no es la principal manera de influir sobre los demás, es la única.  
– Albert Einstein

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Silvia Camberos y Jaime Carretero, por ser los primordiales promotores de mis sueños, por su apoyo incondicional, por siempre desear y anhelar lo mejor para mí. Gracias por cada consejo y por todas sus enseñanzas que me guiaron a lo largo de mi vida, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes, entre los que se incluye este.

A mis hermanas, Wendy y Yazmin que, pese a la distancia, siempre conté con sus palabras de ánimo y su compañía. Gracias por recibirme cada que regresaba a casa con los brazos abiertos, quiero verlas crecer, llegar muy lejos, las quiero como no tienen idea, siempre estaré para ustedes.

A Alicia, por recibirme en tu laboratorio y hacerme sentir parte del equipo desde el primer día que llegué. Muchas gracias por compartir esa pasión por la ciencia, por contagiar tu entusiasmo diariamente, por preguntar por cada experimento y ayudarme en cada momento del proyecto, infinitas gracias.

A Jaque, por todo el apoyo incondicional que me mostraste desde el día uno y que me has otorgado hasta la fecha, por acompañarme en los días más duros de trabajo y de la vida, por darme siempre los mejores consejos, tanto académicos como personales, por compartir todos tus conocimientos y motivarme para seguir adelante. Siempre estaré para ti.

A Carlos, por darme esa confianza que se había perdido en mí, por brindarme apoyo cuando lo necesité, por tus palabras de aliento, por tus consejos, gracias por siempre estar dispuesto a ayudarnos y resolver de la mejor manera nuestras dudas en el laboratorio, eres mi ejemplo para seguir. Agradezco haberte conocido en esta etapa de mi vida estudiantil.

A Nancy, por estar siempre ahí, gracias por tu amistad, por tu compañía, por escucharme, por compartir tus conocimientos y tus consejos. El contar contigo hizo más fácil terminar este proyecto.

A Norman, te agradezco por toda tu ayuda y aportes, no solo para el avance de mi tesis, sino además para mi vida. Gracias porque en todo instante fue un acompañamiento incondicional.



A Damián, por ser el mejor compañero que pude haber tenido en la maestría. Muchas gracias por tu apoyo en las clases y en el instituto, por los ánimos que me diste día con día, por incitarme a seguir adelante.

Gracias a Angie, Adrián, Raful, Dany Trejo, Brandon, Martí, Daniel, por las risas a la hora de la comida en los tiempos antes de la pandemia y los días que nos quedábamos a jugar en el laboratorio, por su compañía dentro y fuera del instituto, por sus consejos, el apoyo que siempre me han brindado. Por darme un respiro con sus palabras de alivio a pesar de encontrarnos en los pasillos y charlar por un par de minutos. Sin ustedes no habría sido lo mismo.

# ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Generalidades de <i>S. cerevisiae</i>	21
1.2. Metabolismo nitrogenado	21
1.3. La respuesta retrógrada: Regulador positivo Rtg3	22
1.4. Metabolismo del carbono: Represión mediada por glucosa y papel de Nrg1	25
2. ANTECEDENTES	27
2.1. Origen evolutivo del genoma de la levadura <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2. El destino de los genes duplicados	29
2.3. Diversificación funcional de los genes de <i>S. cerevisiae</i>	30
2.4. El caso particular de los genes parálogos <i>ALT1</i> y <i>ALT2</i>	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. OBJETIVO	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1. Cultivo y obtención de fenotipo	36
5.2. Extracción de RNA e hibridación tipo Northern blot	37
5.3. Coimmunoprecipitación	38
5.4. RNA-seq	39

5.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	39
5.6. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas (NuSA).	41
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1. Cinética de crecimiento	46
6.2. La alanina induce la expresión de <i>ALT1</i> y reprime la expresión de <i>ALT2</i>	47
6.3. La acción conjunta de Nrg1 y Rtg3 determina la represión de <i>ALT2</i> en presencia de alanina	48
6.4. El complejo Nrg1-Rtg3 se organiza preferencialmente en presencia de alanina	49
6.5. El complejo represor Nrg1-Rtg3 influye sobre la remodelación de la cromatina, lo que se refleja en el perfil de expresión de <i>ALT2</i>	53
6.6. Análisis de expresión por RNA-seq	56
6.7. Confirmación de los resultados por análisis de qPCR	61
7. CONCLUSIONES	65
8. PERSPECTIVAS	66
9. ANEXOS	67
Anexo 1. Medios de cultivo	67
1.1. YPD (medio de cultivo rico)	67
1.2. Medio mínimo (MM)	67
Anexo 2. Electroforesis desnaturizante sds-page	68
2.1. Gel separador	68
2.2. Gel concentrador	68
2.3. Solución 1	68
2.4. Solución 2	69

2.5. Solución 3	69
2.6. Solución de tinción de geles	69
2.7. Solución de distinción	69
2.8. Amortiguador de transferencia 5X	70
2.9. Amortiguador de corrida	70
2.10. Extracción de proteínas: Amortiguador pronasse	70
2.11. Amortiguador Thorner	71
Anexo 3. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas mediante un ensayo de barrido de nucleosomas	71
3.1. Amortiguador NPS	71
Anexo 4. Protocolos	72
3.2. Hibridación tipo Northern blot	72
Anexo 5. Extracción de proteína	73
Anexo 6. Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE	73
6.1. Transferencia	74
Anexo 7. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas mediante un ensayo de barrido de nucleosomas	74
7.1. Recolección de células para NuSA	75
Anexo 8. Extracción de DNA genómico para NuSA	75
Anexo 9. Obtención de DNA genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
Anexo 10. Extracción de RNA, protocolo Trizol	77
BIBLIOGRAFÍA	79

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS

Figura 1	La vía retrógrada	23
Figura 2	Regulación de la activación de la ruta retrógrada	24
Figura 3	Represión transcripcional mediada por Nrg1	25
Figura 4	Representación filogenética de las tres posibles topologías con respecto a la ubicación del post-WGD	27
Figura 5	Representación de los posibles escenarios del WGD en <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 6	El destino de los genes duplicados	30
Figura 7	Transaminación de alanina	32
Figura 8	Cinética de crecimiento de la cepa tipo silvestre (Wt) y las mutantes <i>nrg1Δ</i> y <i>rtg3Δ</i>	46
Figura 9	Análisis tipo Northern blot del ARN total obtenido de la cepa de tipo silvestre (Wt)	47
Figura 10	Análisis tipo Northern blot del ARN total obtenido de las cepas mutantes <i>nrg1Δ</i> , <i>rtg3Δ</i> y de tipo silvestre (Wt)	49
Figura 11	Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc <sup>13</sup> Rtg3-Tap	50
Figura 12	Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc <sup>13</sup> Rtg3-Tap	52
Figura 13	Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc <sup>13</sup> Rtg3-Tap	53
Figura 14	NuSA para la cepa de tipo silvestre (Wt) en el gen <i>ALT2</i> en las condiciones GABA y GABA más alanina	54
Figura 15	NuSA para la cepa mutante <i>nrg1Δ</i> en el gen <i>ALT2</i> en las	54

condiciones GABA y GABA más alanina

Figura 16	NuSA para la cepa mutante <i>rtg3Δ</i> en el gen <i>ALT2</i> en las condiciones GABA y GABA más alanina	55
Figura 17	Diseño experimental para el análisis de RNA-seq	56
Figura 18	Grupos de genes cuya expresión se reprime en presencia de alanina en una cepa tipo silvestre (Wt)	57
Figura 19	Efecto de la falta de Nrg1 sobre la expresión de un grupo de genes	58
Figura 20	Efecto de la falta de Rtg3 sobre la expresión de un grupo de genes	58
Figura 21	Mapa de calor, genes involucrados en el proceso de óxido-reducción	59
Figura 22	Mapa de calor, genes involucrados en el metabolismo de ácidos carboxílicos	60
Figura 23	Mapa de calor, genes involucrados en el transporte de metales de transición	60
Figura 24	qPCR del gen <i>ALT1</i> en condición glucosa GABA más alanina	61
Figura 25	qPCR del gen <i>ALT2</i> en condición glucosa GABA más alanina	62
Figura 26	qPCR del gen <i>SER3</i> en condición glucosa GABA más alanina	62
Figura 27	qPCR del gen <i>ENO1</i> en condición glucosa GABA más alanina	63
Figura 28	qPCR del gen <i>GLK1</i> en condición glucosa GABA más alanina	63

## TABLAS

Tabla 1	Cepas empleadas en este estudio	36
Tabla 2	Oligonucleótidos para amplificación de las sondas en este estudio	38
Tabla 3	Oligonucleótidos para el análisis de qPCR en este estudio	40
Tabla 4	Oligonucleótidos empleados para analizar la región promotora en el gen <i>ALT1</i>	43
Tabla 5	Oligonucleótidos empleados para analizar la región promotora en el gen <i>ALT2</i>	45

## ABREVIATURAS

<b>ALTs</b>	Alanino-aminotransferasas
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina (Chromatin immunoprecipitation)
<b>DNA</b>	Desoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Ft</b>	Factores de transcripción
<b>G</b>	Gramo
<b>GABA</b>	Gamma Aminobutyric Acid (Ácido $\gamma$ -aminobutírico)
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kda</b>	Kilodalton
<b>Leu</b>	Leucina
<b>Mb</b>	Megabases
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio



<b>NCR</b>	Represión catabólica nitrogenada (Nitrogen Catabolic Repression)
<b>NuSA</b>	Nucleosome-Scanning Assay (Análisis del posicionamiento de los nucleosomas)
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TCA</b>	Tricarboxylic Acid Cycle (Ciclo del ácido tricarbóxico)
<b>tRNAs</b>	Transfer RNAs (RNA de transferencia)
<b>Ura</b>	Uracilo
<b>μl</b>	Microlitro
<b>WGD</b>	Whole Genome Duplication (Duplicación del genoma completo)
<b>YPD</b>	Yeast extract-Peptone-Dextrose (Medio rico para levadura compuesto por extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa)

## RESUMEN

El estudio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a cambios en el medio ambiente ha contribuido al conocimiento de los mecanismos que determinan la activación o represión transcripcional. El proceso de adaptación lleva a la activación o represión de un grupo de genes, cuyos productos se requieren para desencadenar la respuesta fisiológica apropiada.

Los reguladores transcripcionales llevan a cabo tres funciones básicas: a) unión a secuencias específicas de DNA, b) promoción de la inducción o represión transcripcional y c) respuesta a señales que modulan al regulador. *S. cerevisiae* posee un solo regulador constituido por varias subunidades, siendo este el complejo HAP el cual está constituido por cuatro polipéptidos, tres de los cuales (Hap2, 3 y 5) forman el dominio de unión al DNA y la cuarta subunidad (Hap4) aporta el dominio de activación.

El descubrimiento de este complejo en 1989 permitió proponer que la levadura podría formar moduladores transcripcionales híbridos, combinando la acción de los diferentes dominios de un regulador con los de otro que normalmente actúan de manera independiente. Por ejemplo, el dominio de unión a DNA del complejo HAP (Hap2-3-5) podría interactuar con el dominio de activación de un regulador independiente como Gln3, formando el híbrido Hap2-3-5-Gln3. ¿Será posible incrementar el repertorio de reguladores que posee la levadura generando reguladores transcripcionales híbridos?

La levadura *S. cerevisiae* duplicó su genoma completo, un evento conocido como: Whole Genome Duplication (WGD). *ALT1* y *ALT2* son dos genes homeólogos que surgieron como consecuencia de la WGD. Resultados previos de nuestro laboratorio confirmaron que *ALT1* codifica para una alanino-aminotransferasa que sintetiza alanina transfiriendo el grupo amino del ácido glutámico al ácido pirúvico y remueve el grupo amino de la alanina para unirlo al 2-oxoglutarato para formar glutamato y piruvato, constituyendo la única enzima capaz de catabolizar alanina en *S. cerevisiae*. Por el contrario, no se ha determinado función alguna para *ALT2*. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que *ALT2* no constituye una alanino-aminotransferasa, incluso cuando estas dos enzimas comparten el 67% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos.

Recientemente, nuestros estudios sobre la diversificación funcional de los genes homeólogos *ALT1* y *ALT2* han sugerido la existencia de un modulador transcripcional híbrido que podría estar constituido por Nrg1 y Rtg3 (Nrg1-Rtg3). Nuestros resultados indican que este complejo reprime la expresión de *ALT2*, así mismo, su organización se incrementa en presencia de alanina, sugiriendo que la alanina juega el papel de correpressor, por lo que hemos nombrado a este posible complejo Nrg1-Rtg3-Ala.

Cabe mencionar que, la alanina juega un papel dual como corregulador, ya que además de su función como presumible regulador negativo de *ALT2*, se requiere para inducir (corregulador positivo) la expresión de *ALT1*, formando parte de un regulador aún no identificado.

Este trabajo permitirá determinar si en efecto, Nrg1 y Rtg3 forman un complejo transcripcional híbrido y si la alanina juega un papel en la organización del mismo. Así mismo se definirá si Nrg1 y Rtg3 juegan un papel en la organización de la cromatina ya que al funcionar como represor es posible que Nrg1 y/o Rtg3 participen en la organización cerrada o abierta de esta. Se presentarán resultados de RNA-seq que nos han permitido determinar la red de genes cuya expresión está bajo el control negativo de Nrg1-Rtg3-Ala.

## ABSTRACT

The response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to changes in the environment has contributed to increment the knowledge of the mechanisms that determine transcriptional expression or repression.

Transcriptional regulators carry out three basic functions: a) binding to specific DNA sequences, b) transcriptional induction or repression of targeted genes and c) response to signals that control the modulator. *S. cerevisiae* has a single regulator composed of four subunits, the HAP complex of four polypeptides of which three (Hap2, 3 and 5) constitute the DNA-binding domain while the fourth subunit (Hap4) provides the activation domain.

In 1989, the discovery of this complex, made it possible to propose that yeast could form hybrid transcriptional modulators, combining the different components of various transcriptional regulators which generally act independently. For example, the DNA binding domain of the HAP complex (Hap2-3-5) could form a novel complex recruiting the activation domain of an independent regulator such as Gln3 generating the hybrid modulator Hap2-3-5-Gln3. Is it possible to increase the repertoire of regulators that yeast possesses by generating hybrid transcriptional regulators?

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* duplicated its entire genome, in an event known as: Whole Genome Duplication (WGD). *ALT1* and *ALT2* are two paralogous genes that arose after the WGD. Previous results from our laboratory, have shown that *ALT1* encodes an alanine aminotransferase that synthesizes alanine from glutamate and pyruvate and catabolizes this amino acid by removing the amino group of alanine, generating 2-oxoglutarate to form glutamate and pyruvate. In *S. cerevisiae*, Alt1 is the only enzyme capable of catabolizing alanine. However, no function has been determined for Alt2. We have shown that this enzyme does not constitute an alanine aminotransferase even though it shares 67% amino acid identity with Alt1.

Recently, our studies on *ALT1* and *ALT2* functional diversification have suggested the existence of a hybrid transcriptional modulator that could be made up of Nrg1 and Rtg3 (Nrg1-Rtg3). Our results indicate that this complex represses *ALT2* expression. Complex formation is increased in the presence of alanine, suggesting that this amino acid could play a role in the formation of the

hybrid, playing a role as corepressor, we have thus named this complex Nrg1-Rtg3-Ala.

It is worth mentioning that alanine plays a dual role as co-regulator, since in addition to its function negative coregulator of *ALT2*, it is required to induce (positive coregulator) the expression of *ALT1*, forming part of a regulator which has not been yet identified.

This work will allow us to determine whether, in fact, Nrg1 and Rtg3 form a transcriptional hybrid complex, and whether alanine plays a role in its organization. Additionally, we have analyzed the role of Nrg1 and Rtg3 in the chromatin organization of the *ALT2* promoter. We will present RNA-seq analysis results, indicating the network of genes whose expression could be negatively regulated by the Nrg1-Rtg3-Ala complex.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades de *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* es un organismo modelo en genética de eucariontes. El éxito de este microorganismo para colonizar está íntimamente ligado a su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales variables (Morales *et al.*, 2010; Wolfe *et al.*, 2006). Las levaduras poseen infinidad de mecanismos regulatorios que le han permitido una capacidad adaptativa singular. Su genoma permite responder de manera específica y controlada ante diversos cambios en el ambiente, permitiendo su adaptación (Wolfe *et al.*, 2006).

Además de ser un modelo bien desarrollado y simple de estudiar, *S. cerevisiae* es unicelular ampliamente distribuido en el ambiente, tiene un ciclo de vida relativamente corto, existen medios de crecimiento definidos para esta, siendo capaz de crecer en un medio sólido donde puede formar colonias, o en un medio líquido donde presenta un crecimiento logarítmico dependiente de los nutrientes presentes en el medio. También tiene una alta tasa de recombinación homóloga, lo que facilita el diseño y construcción de mutantes para estudios genéticos (Sherman *et al.*, 1998).

Todo esto ha conducido a que *S. cerevisiae* sea el segundo eucarionte más estudiado, por ende, diversos mecanismos, vías o procesos han sido estudiados en este organismo. Dentro de los procesos que han sido analizados se encuentra el metabolismo del nitrógeno, siendo parte importante en este estudio.

## 1.2. Metabolismo nitrogenado

El Nitrógeno, junto a otros elementos, participa en la constitución de las moléculas orgánicas fundamentales de la vida. Los compuestos de carbono o nitrógeno son los nutrientes básicos para los organismos, empleados para la producción de biomoléculas y energía, siendo necesarios en la mayoría de los procesos biosintéticos de las células y deben ser asimilados en grandes cantidades (Large, P. 1986).

La levadura *S. cerevisiae* es capaz de transportar y utilizar diversos compuestos nitrogenados tales como aminoácidos, bases nitrogenadas y

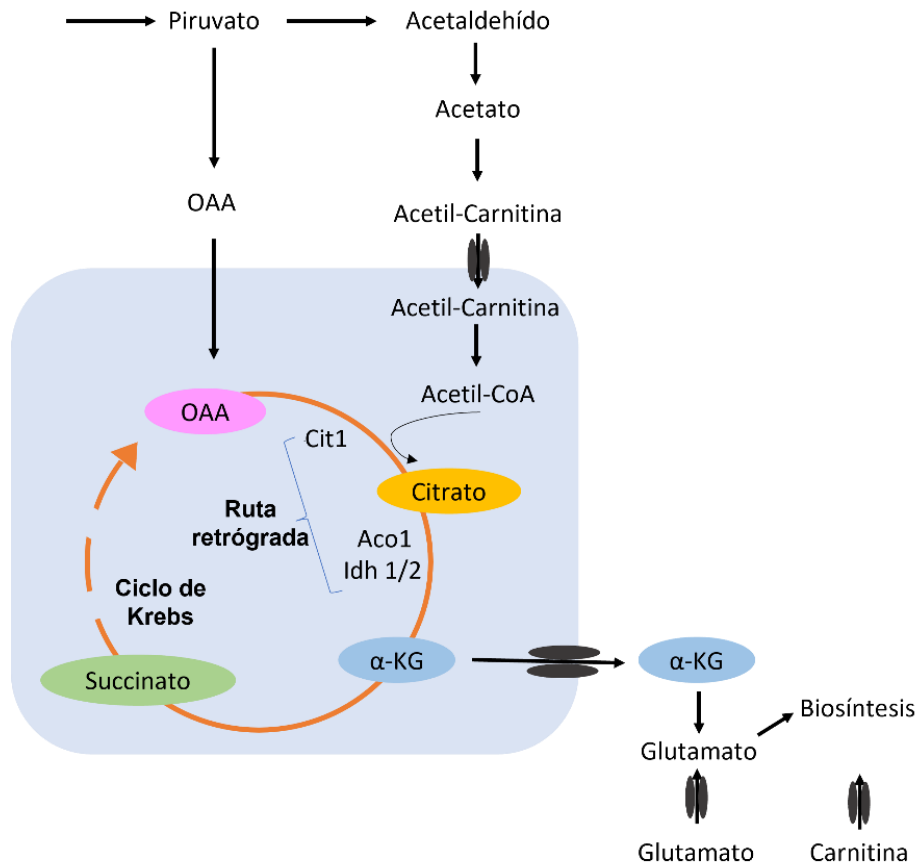
amónio (Cooper *et al.*, 1982). Existe una gran variedad de fuentes de nitrógeno disponibles, siendo las fuentes primarias o fuentes ricas de nitrógeno. Estas requieren menos pasos biosintéticos o catabólicos para transformarse en glutamato o glutamina, siendo los principales donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas para un crecimiento celular óptimo (Godard *et al.*, 2007). La interconversión entre amónio, glutamato y glutamina juega un papel central en el metabolismo del nitrógeno y es conocida como metabolismo central del nitrógeno (CNM: Central Nitrogen Metabolism) (Large, P. 1986).

La síntesis de aminoácidos se da inicialmente a partir de glutamato y glutamina, estos son producidos principalmente por el 2-oxoglutarato derivado del ciclo de Krebs. Cuando la célula crece en condiciones fermentativas, el ciclo de Krebs se ve afectado y ante una deficiencia mitocondrial se genera una respuesta nuclear, conocida como respuesta retrógrada (Márquez, D. 2015).

### **1.3. La respuesta retrógrada: Regulador positivo Rrtg3**

Las células de *S. cerevisiae* son capaces de monitorear e inducir la expresión de genes nucleares en respuesta a cambios en la función o estado mitocondrial (estrés), emitiendo una respuesta a través de la vía de señalización diana de rapamicina (TOR) (Koemeili *et al.*, 2000), de esta manera ajustan diversas actividades biosintéticas y metabólicas cuando se produce una disfunción en el organelo, denominando a esta respuesta como regulación retrógrada (RTG). La respuesta retrógrada es el principal mecanismo de comunicación entre las mitocondrias y el núcleo, siendo descubierta en *S. cerevisiae* (Liu *et al.*, 2006).

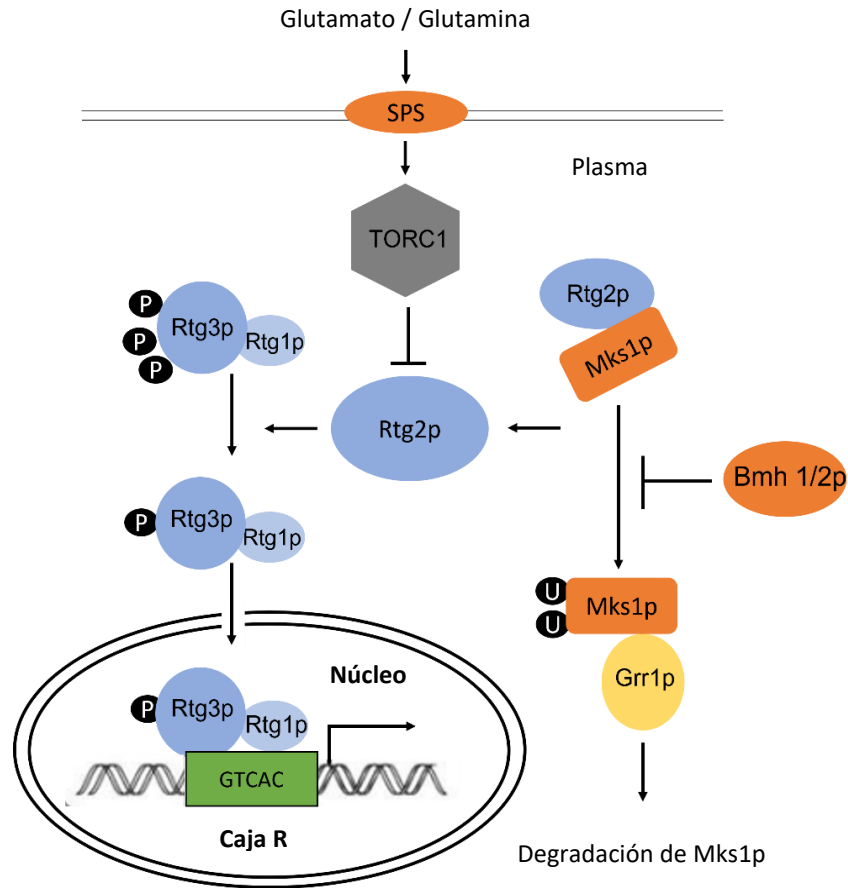
La regulación retrógrada abarca una amplia variedad de actividades celulares, incluida la detección de nutrientes, el control del crecimiento, el envejecimiento y otros procesos de señalización que funcionan en la homeostasis metabólica y de los organelos (Liu *et al.*, 2006), su objetivo principal es el mantenimiento parcial del ciclo de Krebs (Figura 1), a través del incremento en la expresión de los genes *CIT1*, *ACO1* y *IDH1,2* garantizando el suministro de  $\alpha$ -cetoglutarato para la biosíntesis de glutamato y glutamina, siendo una de las instancias regulatorias importantes que aseguran un suministro continuo de precursores indispensables para reacciones biosintéticas (Liu *et al.*, 2006).



**Figura 1.** La vía retrógrada. La vía retrograda asegura niveles suficientes de  $\alpha$ -cetoglutarato para la biosíntesis de glutamato, satisfaciendo la demanda de suministro de nitrógeno para las reacciones biosintéticas. Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2006

Los activadores transcripcionales clave de la vía RTG son los factores de transcripción Rtg1 y Rtg3 (Jia *et al.*, 1997). Mientras que Rtg3 es una fosfoproteína, Rtg1 no lo es; y se ha observado que la activación de Rtg3 correlaciona con su desfosforilación y su translocación nuclear con Rtg1 (Figura 2) (Liu *et al.*, 2006). Aunque la activación de la transcripción requiere tanto Rtg1 como Rtg3, solo se ha demostrado que Rtg3 contiene dominios de activación transcripcional (Jia *et al.*, 1997).





**Figura 2.** Regulación de la activación de la ruta retrógrada. El paso clave en la regulación de la vía RTG es la translocación nuclear de Rtg1/3p. Tomado y modificado de Liu et al., 2006.

A través de un análisis genético se identificaron tres genes como los responsables de la operación de la vía retrógrada, siendo: *RTG1*, *RTG2* y *RTG3* (Liu et al., 1999). *RTG3* es un gen que codifica una proteína bHLH/Zip de 54 kDa que regula la respuesta retrógrada, desencadenando diversos cambios a nivel de regulación de genes, funcionando como modulador positivo (activador) (Liu et al., 1999).

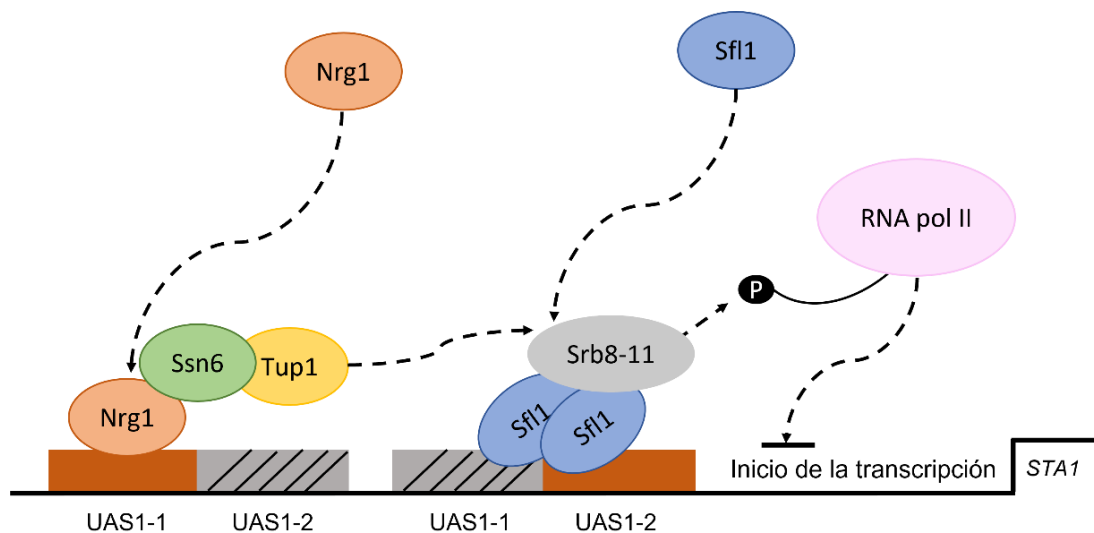
Se ha investigado cómo algunos genes se activan a través de distintos factores de transcripción y determinadas condiciones, sin embargo, para este trabajo es importante describir la existencia de factores de transcripción que reprimen genes en condiciones específicas.

#### 1.4. Metabolismo de carbono: Represión mediada por glucosa y papel de Nrg1

En la levadura, la expresión de una gran cantidad de genes se desactiva durante el crecimiento celular en condiciones que contienen glucosa como fuente de carbono. Se ha demostrado que la represión por glucosa de la transcripción en la levadura *S. cerevisiae* está controlada por varios factores, incluido el represor transcripcional, siendo Nrg1 (Ahn *et al.*, 1995).

Nrg1 determina la represión de genes en presencia de glucosa, como aquellos que codifican para enzimas de la gluconeogénesis, ciclo de Krebs y respiración (Ahn *et al.*, 1995; Park *et al.* 1999). Este sistema regulatorio se identificó por primera vez como inhibidor de la expresión del gen *STA1* (Figura 3) en *S. cerevisiae* el cual codifica una glucoamilasa extracelular cuya expresión se reprime en presencia de glucosa (Ahn *et al.*, 1995).

El efecto represor que generan los reguladores negativos no es directo, Nrg1 reprime la expresión de genes, reclutando correpresores que a su vez reclutan a otras proteínas que alteran la organización de la cromatina e impiden la transcripción (Kim *et al.* 2004).



**Figura 3.** Represión transcripcional mediada por Nrg1. Nrg1 actúa sobre *UAS1* en el promotor *STA1*, el complejo Srb8-11 activa la expresión de Nrg1 de manera indirecta, este al unirse al ADN recluta el correpresor Ssn6-Tup1 y el complejo Srb8-11 jugando un papel crítico en la represión de glucosa de la expresión del gen *STA1*. Tomado y modificado de Kim *et al.*, 2004.

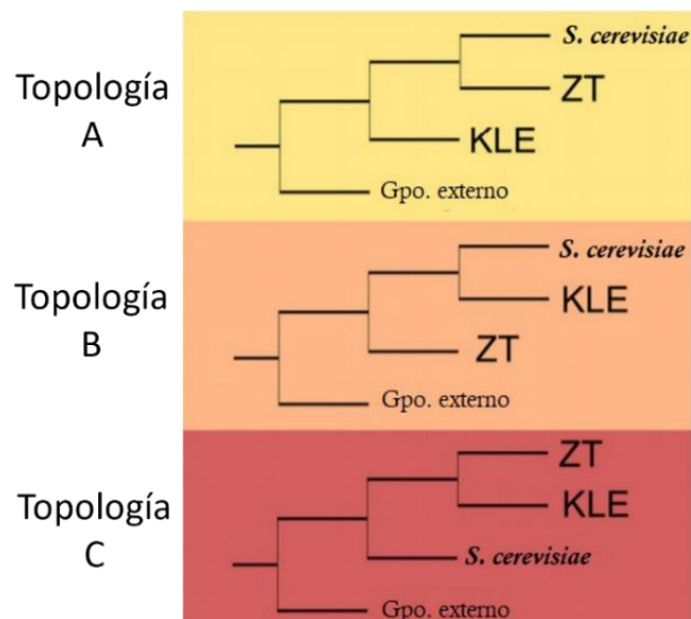
Los ejemplos aquí presentados ilustran que *S. cerevisiae* posee mecanismos regulatorios que han permitido que la levadura se desarrolle en diferentes medios, teniendo una capacidad adaptativa singular. El conjunto de ciertos reguladores permite responder de manera específica y controlada ante cambios abruptos en el ambiente que rodea a la levadura, permitiendo su adaptación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Origen evolutivo del genoma de la levadura *S. cerevisiae*

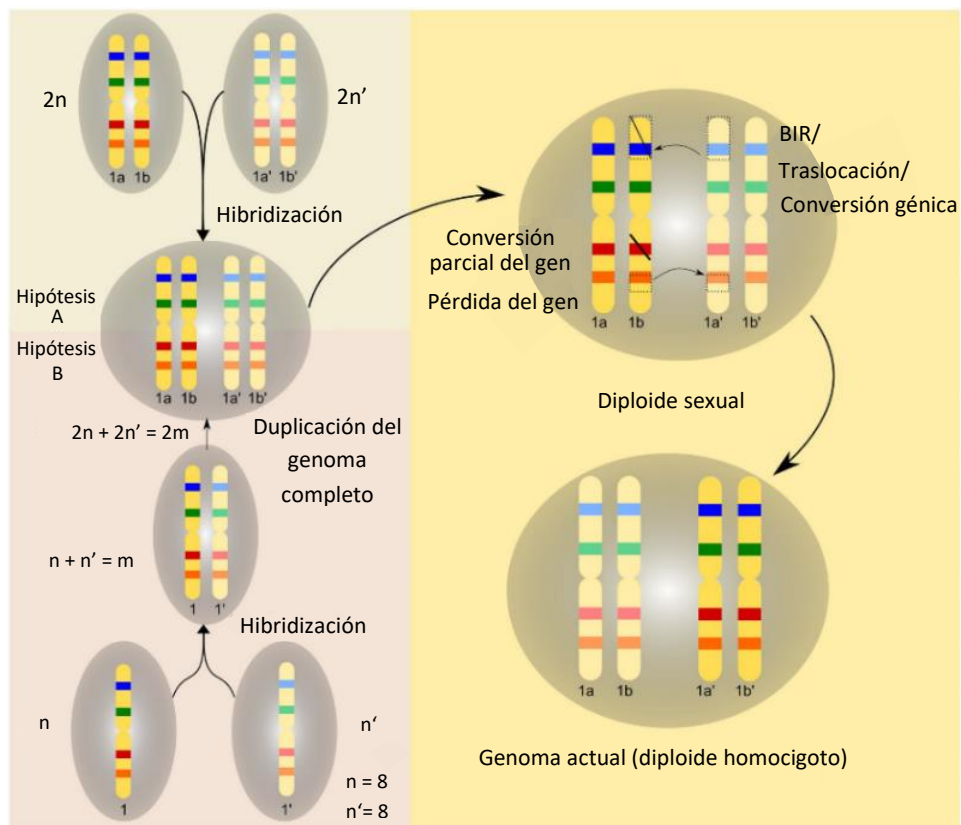
Durante muchos años se aceptó que el linaje de la levadura *S. cerevisiae* surgió de un evento de duplicación de su genoma completo (WGD), presenta un 26% de genes duplicados convirtiéndose en un modelo interesante para el estudio de la diversificación de genes duplicados (Wolfe *et al.*, 1997).

En el año 2015 Gabaldón y colaboradores realizaron un estudio evolutivo en el cual se analizó la filogenia de todos los genes de *S. cerevisiae*. Se reportó que no solamente ocurrió una duplicación, si no que la levadura original era un híbrido. Este estudio filogenético proporcionó evidencia fundamental que indica que el linaje de *S. cerevisiae* se generó de una hibridación interespecies entre las cepas del clado *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium* y del clado relacionado con *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulaspota delbrueckii* (Figura 4) (Marcet *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Representación filogenética de las tres posibles topologías con respecto a la ubicación del post-WGD y las secuencias parentales de los clados *Zygosaccharomyces* / *Torulaspota* (ZT), *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium* (KLE). Modificado de Marcet *et al.*, 2015.

Posterior a estos análisis, Gabaldón y colaboradores propusieron un modelo para el origen de la WGD en la levadura a través de la hibridación, presentando dos posibles escenarios (Figura 5). En el primer escenario, dos células diploides de distintas especies forman un alotetraploide. La recombinación posterior y la pérdida masiva de genes producirían un linaje en el que el número de cromosomas se ha duplicado de manera efectiva (Morales *et al.*, 2012). La hibridación da como resultado la duplicación del genoma completo observada, una fracción del conjunto de genes se retiene como pares "ohnólogos", ya sea de la misma o de diferentes especies parentales. El último escenario indica que, la fusión de dos células diploides de diferentes especies forma un alodiploide, dando origen al ancestro de *S. cerevisiae* (Marcet *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Representación de los posibles escenarios de WGD en *S. cerevisiae*. La hipótesis A muestra la fusión de dos diploides y la formación del alotetraploide. La hipótesis B muestra el apareamiento de dos haploides y la WGD posterior que conduce a la formación del alotetraploide. Tomado y modificado de Marcet *et al.*, 2015.

Aun cuando no se sabe si el híbrido surgió de la fusión de dos células diploides o dos células haploides, las cuales pudieron haber pasado por un evento de duplicación génica, eso llevó a la formación de un alotetraploide con dos copias de cada gen. Una vez constituido el alotetraploide ocurrieron varios procesos como conversión génica, eventos de recombinación, pérdida diferencial de genes y presión de selección que moldearon a *S. cerevisiae* para ser el organismo que observamos hasta el día de hoy, siendo portador de bloques conservados de genes duplicados (Marcet *et al.*, 2015).

## 2.2. El destino de los genes duplicados

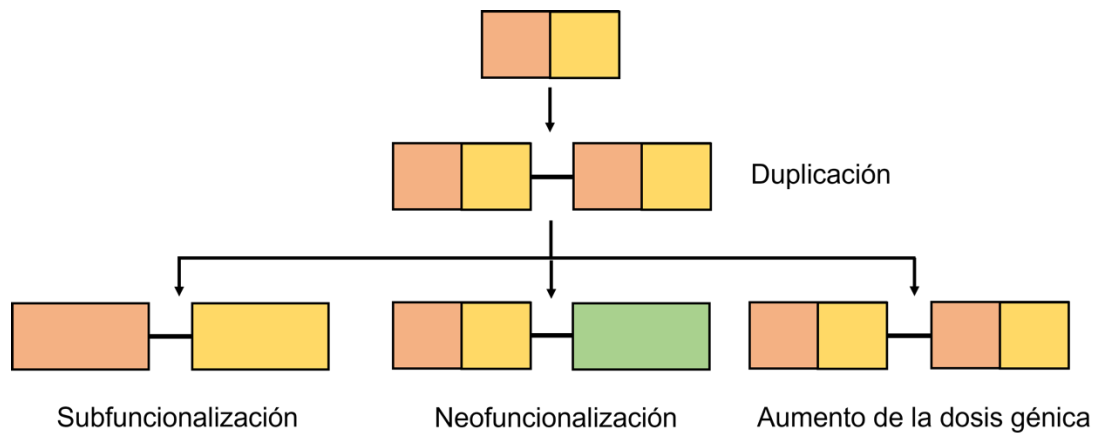
El mecanismo por el cual surgen nuevas funciones en los organismos permanece sin aclararse por completo. Existen dos tipos de duplicaciones genéticas; aquellas que son aisladas, en donde se duplica una región única en el genoma; y las duplicaciones de genoma completo, que son poliploidías (Ohno, S. 1970)

Estudios anteriores han intentado relacionar a la duplicación genética y las innovaciones adaptativas, por ejemplo, en el cretáceo tardío, la evolución de las angiospermas en la diversidad de sus frutos cada vez más azucarados pudo haber influido en la retención selectiva de aquellos genes duplicados involucrados en la adaptación de la levadura a condiciones anaerobias estrictas (Escalera *et al.*, 2019), la mayoría de ellas atravesaron por al menos una duplicación de genoma completo, que coincide a la explosión en la diversidad metabólica y fisiológica de las plantas (Taylor *et al.*, 2004).

En la década de 1970 Susumu Ohno propuso que la duplicación génica es uno de los principales mecanismos de innovación y evolución de genes. Sostiene que después de la duplicación genética, ésta produce dos copias génicas funcionalmente redundantes, parálogos y libres de las presiones de selección de cada uno (Marcet *et al.*, 2015).

Los genes duplicados se pueden modificar por diferentes fuerzas evolutivas dando como resultado que se fijen ambas copias, permaneciendo disponibles en el genoma (Wolfe *et al.*, 1997; Voordeckers *et al.*, 2015) o que se pierda alguna de las copias debido a la acumulación de mutaciones deletéreas (Kondrashov *et al.*, 2002). Sin embargo, la pérdida no es el único escenario donde pueden terminar éstos, hay otros posibles destinos (Figura 6), siendo: la

neofuncionalización en la cual mutaciones aleatorias generen una función distinta a la función original del gen, dando ventaja en su adaptación evolutiva (Ohno *et al.*, 1970), en la subfuncionalización ocurre la repartición de la función del gen original en dos copias, siendo necesarios la retención de estos dos genes para llevar a cabo su función y el aumento de dosis génica (Conrad *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Destino de los genes duplicados. La duplicación génica puede tener tres posibles escenarios: en primer lugar, en un gen multifuncional, las diferentes funciones se pueden dividir entre las copias posteriores a la duplicación (subfuncionalización). En segundo lugar, una copia conserva la función ancestral mientras que la otra adquiere mutaciones que pueden crear una nueva función (neofuncionalización). En tercer lugar, las dos copias son retenidas y tienen la misma función ancestral (aumento de la dosis génica) *Modificado de Voordeckers et al., 2015.*

### 2.3. Diversificación funcional de los genes de *S. cerevisiae*

El estudio detallado de los genes parálogos de *S. cerevisiae* contribuye a determinar los mecanismos de diversificación funcional que se llevaron a cabo en la levadura para adquirir un metabolismo fermentativo. Uno de los fenómenos en este metabolismo es la utilización de compuestos nitrogenados para reacciones de biosíntesis y catabolismo de aminoácidos en la levadura.

Las reacciones de algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de nitrógeno comparten intermediarios con el ciclo del ácido cítrico, por lo tanto, los genes que codifican para estas enzimas deben coordinarse con los que

participan en el metabolismo del carbono (glucólisis, ciclo de Krebs y vía de las pentosas-fosfato) (Colón *et al.*, 2011).

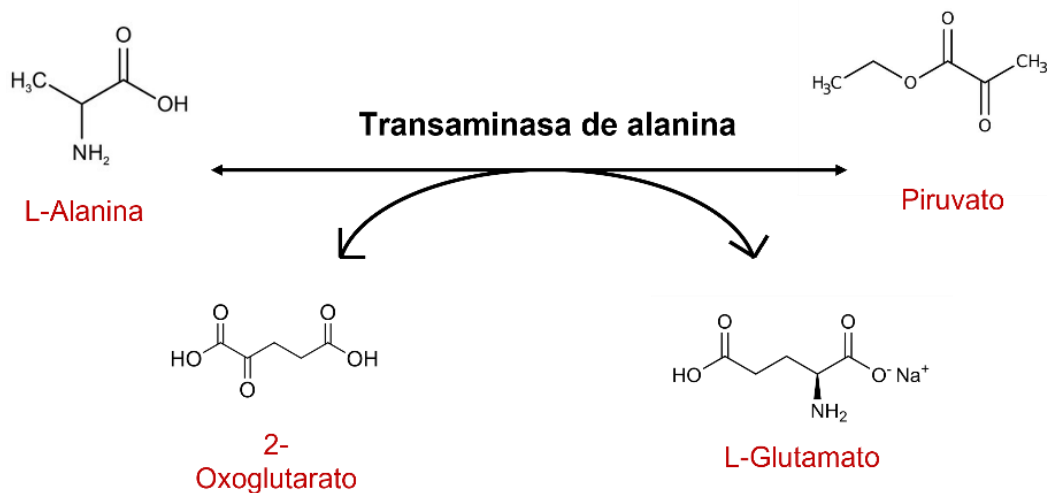
Alrededor del 44% de los genes asociados al metabolismo del nitrógeno se encuentran duplicados, de este porcentaje de genes sólo algunos presentaron un evento de poliploidización, dentro de estos se localizan un par de parálogos homólogos (genes que vuelven a converger por un evento de hibridación provenientes de la WGD) siendo *ALT1* y *ALT2*. (Escalera *et al.*, 2019).

#### **2.4. El caso particular de los genes parálogos *ALT1* y *ALT2***

En *S. cerevisiae*, se han reportado dos genes parálogos, *ALT1* y *ALT2*; Estos genes codifican alanino-aminotransferasas (ALTs) que participan en la biosíntesis y el catabolismo de alanina (Chico *et al.*, 1978). Son enzimas dependientes de piridoxal fosfato que llevan a cabo la traslocación del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato para formar piruvato y glutamato, las transaminasas pueden actuar en ambos sentidos de la reacción (Figura 7). (Peñalosa *et al.*, 2012).

Las vías catabólicas y anabólicas de alanina son centrales en las redes metabólicas de nitrógeno y carbono. Durante el crecimiento en condiciones de restricción de glucosa, el catabolismo de la alanina constituye una vía clave para la gluconeogénesis, ya que el piruvato se puede convertir fácilmente en oxaloacetato a través de la acción del piruvato carboxilasa, lo que lleva a la producción de glucosa (Feling *et al.*, 1973).





**Figura 7.** Transaminación de alanina. Las aminotransferasas son enzimas que catalizan reacciones reversibles que participan tanto en la síntesis como en el catabolismo de aminoácidos, estas pueden generar piruvato a partir de alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato o piruvato y glutamato. *Tomada y modificada de* (Márquez, D. 2015).

A pesar de que *ALT1* y *ALT2* codifican proteínas con un 67% de identidad en su secuencia de aminoácidos, sólo *ALT1* muestra actividad de alanina aminotransferasa; por el contrario, *ALT2* codifica una proteína catalíticamente inerte (Escalera *et al.*, 2019).

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que estos genes tienen perfiles reguladores opuestos: *ALT1* es inducida por alanina mostrando un perfil regulador de un gen que codifica una enzima involucrada en el catabolismo de aminoácidos, por el contrario, la expresión de *ALT2* está reprimida por este aminoácido, lo que indica un papel en la biosíntesis de alanina, aunque la proteína codificada no tiene actividad enzimática de alanina aminotransferasa (Peñalosa *et al.*, 2012). La retención de *ALT2* plantea la cuestión de si la proteína codificada desempeña una función particular y si esta función estaba presente en el gen ancestral. Podría plantearse la hipótesis de que *ALT2* divergió después de la duplicación, a través de la neofuncionalización o que la función *ALT2* estaba presente en el gen ancestral, con una función aún por descubrir (Escalera *et al.*, 2019).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La respuesta de *S. cerevisiae* a diferentes condiciones nutricionales constituye un modelo cuyo estudio ha contribuido a nuestro conocimiento de los mecanismos que determinan la regulación transcripcional. Los moduladores transcripcionales están compuestos de un dominio de unión a DNA que dirige estas proteínas a sitios de unión especializados localizados en los promotores de genes selectos y un dominio de activación. Como se mencionó anteriormente, en la levadura *S. cerevisiae* estos dos dominios están contenidos en un solo polipéptido, sin embargo, hay una excepción a esta regla, constituida por el complejo HAP. Dicho complejo se encuentra organizado en cuatro polipéptidos: Hap2, Hap3 y Hap5 constituyen el dominio de unión a DNA, en tanto que el cuarto polipéptido Hap4 representa el dominio de activación.

El hecho de que existan reguladores transcripcionales integrados por varios polipéptidos abre la posibilidad de la organización de factores transcripcionales que sean resultado de combinaciones de diferentes reguladores como se había propuesto por Guarente en 1989.

Aun cuando todos los organismos poseen un importante conjunto de proteínas regulatorias capaces de unirse al DNA, jugando un papel clave en la especificidad de las respuestas transcripcionales, la posibilidad de incrementar el repertorio de moduladores a través de la acción combinada de dominios de unión a DNA y dominios de activación, generando reguladores híbridos, podría dar lugar a respuestas nuevas, sutiles y precisas que permitan la adaptación exitosa de *S. cerevisiae* a una mayor variedad de cambios en el ambiente, afectando la expresión de un grupo selecto de genes.

En este trabajo estudiaremos la regulación transcripcional de los genes *ALT1* y *ALT2*, mediada por el regulador híbrido Nrg1-Rtg3-Ala. Esta investigación pretende identificar la organización y blancos de acción, constituyendo la caracterización funcional de este “regulador híbrido”. Así mismo se considerará el papel de la alanina como corregulador, lo que constituye uno de los primeros ejemplos en los que se considerará la importancia de una señal metabólica que determina la acción de un regulador.

Nuestros resultados han abierto la posibilidad originalmente propuesta por Guarente de que los reguladores híbridos puedan construirse tomando

“prestados” dominios de parejas no convencionales, permitiendo superar restricciones como la localización nuclear y la especificidad de unión, generando reguladores nuevos que puedan desencadenar respuestas transcripcionales refinadas específicas a variaciones sutiles o combinadas del medio ambiente. El análisis de la organización y papel funcional de los complejos reguladores híbridos constituye una nueva alternativa para atender y entender el proceso de recableado de redes regulatorias que juega un papel crucial en la retención selectiva y subfuncionalización de genes parálogos.

La pregunta de cómo se constituyen los reguladores híbridos heterodiméricos aún no ha sido abordado, así como el papel que juega la alanina. Nrg1-Rtg3-Ala es el primer regulador híbrido cuya organización depende de un aminoácido que se estudia y nuestro análisis no abarcó el mecanismo de unión ni el papel que juega la alanina.

#### **4. OBJETIVO**

Identificar el papel fisiológico del complejo Nrg1-Rtg3-Ala determinando la red de genes que controla y algunos de los componentes adicionales del complejo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental que se llevó a cabo parte del análisis fisiológico con el fin de conocer el fenotipo de las cepas que se emplearon para este trabajo.

El análisis de expresión se realizó para conocer cómo los reguladores Nrg1 y Rtg3 afectan la inducción o represión de los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* y de aquellos genes con un patrón similar a *ALT2*.

El ensayo de coimmunoprecipitación (CoIP) se realizó con el fin de identificar la interacción estable proteína-proteína Nrg1-Rtg3 y determinar si constituyen un híbrido.

Mediante análisis de RNA-seq se mostrarán los genes que pertenecen al circuito regulado de manera positiva o negativamente por alanina y posteriormente se identificará la red de genes regulados por el complejo Nrg1-Rtg3-Ala. Los resultados facilitarán el análisis del estudio de la expresión génica en diferentes mutantes o tratamientos.

El análisis de qPCR nos permitirá dar robustez a los datos obtenidos por RNA-seq, confirmando la expresión de los genes identificados.

A través del análisis del posicionamiento de los nucleosomas (NuSA) se podrá mapear las posiciones de los nucleosomas en la cromatina a lo largo de la región promotora del gen *ALT2*, observando el movimiento de estos a lo largo del promotor dependiendo si el factor o el cofactor influyen sobre la regulación, esto en función de la condición de nuestro estudio.

Las cepas empleadas en este trabajo se enlistan a continuación (Tabla 1).

Cepa	Genotipo	Fuente
CLA 1-2	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 NRG1 RTG3 TUP1 ura3 leu2::LEU2</i>	Quezada <i>et al.</i> , 2008
CLA11-713 ( <i>nrg1<math>\Delta</math></i> )	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 nrg1<math>\Delta</math>::KanMX4 RTG3 TUP1 ura3 leu2</i>	González <i>et al.</i> , 2017
CLA1-3 ( <i>rtg3<math>\Delta</math></i> )	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 NRG1 rtg3<math>\Delta</math>::KanMX4 TUP1 ura3 leu2</i>	Este estudio
BY4741 ( <i>RTG3<sup>TAP-</sup> NRG1<sup>-MYC13</sup></i> )	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 NRG1<sup>-MYC13</sup>::KanMX4 RTG3<sup>TAP-</sup>::HIS3 TUP1 ura3 leu2 met15</i>	Este estudio
CLA1-604 ( <i>NRG1<sup>-MYC13</sup></i> )	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 NRG1<sup>-MYC13</sup>::KanMX4 RTG3 TUP1 ura3 leu2</i>	Peñalosa <i>et al.</i> , 2012
BY4741 ( <i>RTG3<sup>TAP</sup></i> )	<i>MAT<math>\alpha</math> ALT1 ALT2 NRG1 RTG3<sup>TAP</sup>::HIS3 TUP1 ura3 leu2 met15</i>	Open Biosystems

**Tabla 1.** Cepas empleadas en este estudio.

## 5.1. Cultivo y obtención de fenotipo

Previo a la inoculación en medios de cultivo empleados para este estudio se usó un preinóculo en medio rico con extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa. (YPD). Posteriormente, las cepas se cultivaron en medio mínimo (MM) conteniendo sales, oligoelementos y vitaminas, siguiendo la fórmula de base nitrogenada de levadura (Difco). Se adicionó glucosa al 2% como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno 7 mM de GABA o 7 mM de GABA más 7 mM de alanina. En los casos de auxotrofías se utilizó uracilo 20 mg/L, leucina 100 mg/L y/o ácido glutámico 100mg/L.

Para la obtención de la cinética de crecimiento se inocularon tres matraces (réplicas biológicas) de MM con un inóculo proveniente de YPD. La densidad óptica (DO) inoculada fue de 0.05 en todos los casos; Para las cinéticas de crecimiento se determinó la densidad óptica del cultivo cada 2 horas a una longitud de 600nm.

Las lecturas se llevaron a cabo hasta llegar a fase estacionaria. Con estos datos, se calculó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación.

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

El análisis tipo Northern Blot se llevó a cabo de acuerdo con Struhl *et al.*, 1981. El análisis de transferencia se realizó como se describió previamente (Valenzuela *et al.*, 1998). El ARN total se extrajo siguiendo el método de Struhl *et al.*, 1981. El RNA de levadura total se preparó a partir de células cultivadas en 200 mL de MM en fase exponencial DO 600nm = 0.3.

Una vez que las células estaban en la DO indicada, fueron concentradas por centrifugación a 3,000 rpm y lavadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1 % v/v. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de fenol ácido (Protocolo en la sección de anexos). Se procesaron 15 µg de RNA total los cuales fueron visualizados en geles de agarosa 1% con formaldehído 6%. Los RNA se transfirieron a una membrana de nylon (Sigma-Aldrich, positively charge) mediante transferencia por capilaridad.

La expresión genética de los genes correspondientes fue visualizada con fragmentos de PCR marcados con <sup>32</sup>P. Se generaron sondas específicas amplificando un fragmento de PCR que contenían la región codificante de los genes *ALT1*, *ALT2*, o *ACT1* como control de carga (Tabla 2). Protocolo en la sección de anexos.

Las señales se cuantificaron utilizando un phosphorimager Typhoon 7000.

Gen	Secuencia 5' 3'
<i>ALT1</i>	<b>Fw:</b> TCTTTACTGCAGCTACCAAACCC <b>Rv:</b> GCGAGCTTCTTGAAGTGCCTTGAA
<i>ALT2</i>	<b>Fw:</b> GACACACCAACAGGATTTGAAAGG <b>Rv:</b> GCGTTCGCTTTCACAAAGAGCTT
<i>ACT1</i>	<b>Fw:</b> GTTTTGCCGGTGACGAC <b>Rv:</b> CTTTCGGCAATACCTGGG

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados para amplificación de las sondas en este estudio.

### 5.3. Coimmunoprecipitación

El experimento de coimmunoprecipitación se llevó a cabo adaptando el método descrito previamente (Hernández *et al.*, 2011). La coimmunoprecipitación de la cepa Nrg1-Myc<sup>13</sup> con Rtg3-Tap se realizó a partir de un extracto celular de una DO de 0.5 a 600nm en MM glucosa-amonio.

La extracción de proteínas fue llevada a cabo con amortiguador TEA (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 7.4, 1 mM PMSF, 20 mM de NaN<sub>3</sub> y una tableta de coctel de inhibidor de proteasa “Complete Mini, Roche”). Estos extractos fueron incubados toda la noche en amortiguador TNET (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM de NaCl, 5 mM EDTA y 1% Tritón X-100) con perlas de proteína A, anticuerpo anti-Myc<sup>13</sup> (diluido 1:2000).

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

## 5.4. RNA-seq

La extracción de RNA total de levadura se preparó a partir de células cultivadas hasta una fase exponencial (DO 600nm = 0.3) en cultivos de 200 mL de MM suplementado con GABA 7 mM o GABA 7 mM más alanina 7 mM como fuente de nitrógeno para las condiciones a estudiar a una OD 0.3.

Las células fueron concentradas por centrifugación a 3,000 rpm. La pastilla celular se congeló con nitrógeno líquido y se trabajaron mediante el método tradicional con fenol ácido. La integridad y pureza del ARN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1% de agarosa en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico); 0,9% formaldehído). Los siguientes pasos de este proceso para la secuenciación del ARNm mediante la técnica RNASeq se llevaron a cabo en las instalaciones de Macrogen, Korea. Se realizó secuenciación centrada en el RNA mensajero de las cepas a estudiar (Tabla 1) y se emplearon las condiciones pertinentes para el análisis del transcriptoma, siendo las siguientes:

- Cepa tipo silvestre (Wt) en medios de cultivo con GABA
- Cepa tipo silvestre (Wt) en medios de cultivo con GABA más alanina
- Cepa *nrg1Δ* en medios de cultivo con GABA más alanina
- Cepa *rtg3Δ* en medios de cultivo con GABA más alanina

## 5.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El RNA de levadura total se preparó a partir de células cultivadas hasta una fase exponencial (DO 600nm = 0.3) en cultivos de 200 mL de MM como se describió en el inciso anterior.

Posteriormente el RNA obtenido se trató con DNAsa (5 µg de RNA) por Kit RQ1 de Promega y se convirtió en cDNA por el kit Thermo Scientific: RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit, #cat: K1631. Protocolo enlistado en la sección de anexos.

Los oligonucleótidos para el análisis de qPCR se diseñaron utilizando Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y se analizaron con los programas DINAMelt (Markham *et al.*, 2005) y Mfold (Zuker, M. 2003). Todos los oligonucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla suplementaria 3.



El análisis de qPCR se realizó utilizando la máquina Corbett life Science Rotor Gene 6000. El colorante de detección utilizado fue SYBR Green (2 x KAPA SYBR FAST qBioline y Platinum SYBR Green de Invitrogen). La reacción de PCR en tiempo real se realizó de la siguiente manera: 94°C durante 5 minutos (1 ciclo), 94°C por 15 segundos, 58°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos (35 ciclos).

<b>Gen</b>	<b>Secuencia 5' 3'</b>
<i>ALT1</i>	<b>Fw:</b> TCGGACCAAGCAGAACGTAA <b>Rv:</b> TACATGGCACCTTGAGGCTT
<i>ALT2</i>	<b>Fw:</b> TCTCAAACAGGCCTGCTGAT <b>Rv:</b> TCGTCGCTGTTTGTAGACCA
<i>SER3</i>	<b>Fw:</b> CAAGTTGACTTAGACTACGC <b>Rv:</b> CTATCACCTAGTTGTCTTGC
<i>ENO1</i>	<b>Fw:</b> GTCTAAGTCCAAGACCTCTC <b>Rv:</b> AGGTCTTAGCACCAGTTG
<i>GLK1</i>	<b>Fw:</b> CTTGACTACACCTTTCCAG <b>Rv:</b> GACAACCTCTGTTTCACGTAG
<i>ACT1</i>	<b>Fw:</b> TGGATTCTGAGGTTGCTGCT <b>Rv:</b> AGATGGGAAGACAGCACGAG

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados para el análisis de qPCR en este estudio.

## 5.6. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas (NuSA)

El procedimiento para realizar el estudio del posicionamiento de nucleosomas en los promotores de *ALT1* y *ALT2* se realizó según lo descrito por Infante *et al.*, 2011. El NuSa se realizó a partir de los cultivos celulares de las cepas de interés crecidas ON en 45 mL de medio YPD. Posteriormente estas células se crecieron en 200 mL de medio mínimo suplementado con GABA 7 mM o GABA 7 mM más alanina 7 mM como fuente de nitrógeno para las condiciones a estudiar hasta una DO de 0.6.

Los cultivos fueron tratados con formaldehído al 37% y el cultivo se mantuvo en agitación constante por 15 minutos, el formaldehído genera enlaces covalentes entre las proteínas y el DNA, fijando la interacción proteína-DNA, este proceso de entrecruzamiento es denominado crosslinking, posteriormente se inhibió la actividad del formaldehído con glicina 2.5M. Protocolo en sección de anexos.

Los oligonucleótidos para el análisis de qPCR se diseñaron utilizando Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) y se analizaron con los programas DINAMelt (Markham *et al.*, 2005) y Mfold (Zuker, M. 2003). Todos los oligonucleótidos utilizados se enumeran en la Tabla suplementaria 4 y 5.

El análisis de qPCR se realizó utilizando la máquina Corbett life Science Rotor Gene 6000. El colorante de detección utilizado fue SYBR Green (2 x KAPA SYBR FAST qBioline y Platinum SYBR Green de Invitrogen).

Nombre	Secuencia 5' 3'
A1	<b>Fw:</b> ATGATGTTTCAGGGCAAGCTTT <b>Rv:</b> AGAGGAGACCGGTTATACGA
A2	<b>Fw:</b> AATCTCTTGACGGTCGCAT <b>Rv:</b> AAAGTAAGTACGCAGGTGTAGTT
A3	<b>Fw:</b> TCGTATAACCGGTCTCCTCT <b>Rv:</b> ATCTTAAGAGATATGCCGCTTG
	<b>Fw:</b> AACTACACCTGCGTACTTACTTT

A4	<b>Rv:</b> TTTGCCTCTCTGCCTTTCTTT
A5	<b>Fw:</b> CAAGCGGCATATCTCTTAAGAT <b>Rv:</b> ACGAGCCATCCTCTGCAGA
A6	<b>Fw:</b> TTTGCCTCTCTGCCTTTCTTT <b>Rv:</b> TGCTGTGCAATCCTTGTTTCT
A7	<b>Fw:</b> TCTGCAGAGGATGGCTCGT <b>Rv:</b> TATGTGTGTGGGGCAGCG
A8	<b>Fw:</b> AGAAACAAGGATTGCACAGC <b>Rv:</b> TATATGGATTATATAGCCACGAAT
A9	<b>Fw:</b> CGCTGCCCCACACACATA <b>Rv:</b> ACGTCTAATGGGAAGTGCTA
A10	<b>Fw:</b> ATTCGTGGCTATATAATCCATATA <b>Rv:</b> AGTGAAAAAAAAACCAGTACTGTAA
A11	<b>Fw:</b> TAGCACTTCCCATTAGACGT <b>Rv:</b> CTTGGACCCCTTCAGAATGA
A12	<b>Fw:</b> TTACAGTACTGGTTTTTTTTTCACT <b>Rv:</b> TTGTCTCAACGAAAGGTCGAA
A13	<b>Fw:</b> TCATTCTGAAGGGGTCCAAG <b>Rv:</b> AACCACAGCAGGTCAGAAGA
A14	<b>Fw:</b> TTCGACCTTTCGTTGAGACAA <b>Rv:</b> ATCGTTTACAAAGGGCGCAG
A15	<b>Fw:</b> TCTTCTGACCTGCTGTGGTT <b>Rv:</b> GTAGTAACGGAAGAGCTTTTC
A16	<b>Fw:</b> CTGCGCCCTTTGTAAACGAT <b>Rv:</b> ACAACTAGAGTAAAATAGCGAGAA

A17	<b>Fw:</b> GAAAAGCTCTTCCGTTACTAC <b>Rv:</b> AAGCTGGTCCTGTTCTCGA
A18	<b>Fw:</b> TTCTCGCTATTTTACTCTAGTTGT <b>Rv:</b> TGC GTTCAATTGAGAAGCAGA
A19	<b>Fw:</b> TCGAGAACAGGACCAGCTT <b>Rv:</b> CAAAATAAAGACTGGGGAAAT
A20	<b>Fw:</b> TCTGCTTCTCAATTGAACGCA <b>Rv:</b> TGAAGTGATTTTTGGCAGACAGT
A21	<b>Fw:</b> ATTTCCCCAGTCTTTATTTTGCT <b>Rv:</b> GAGTTATAGAATTA CTCACTGTG
A22	<b>Fw:</b> ACTGTCTGCCAAAAATCACTTCA <b>Rv:</b> TTTCTGCGCTTGAAGTGAGA
A23	<b>Fw:</b> CACAGTGAGTAATTCTATAACTC <b>Rv:</b> AAAGGAGTAGTGATATGTGGCA
A24	<b>Fw:</b> TCTCACTTCAAGCGCAGAAA <b>Rv:</b> AATCCAGGAAGAGCTATGTCT
A25	<b>Fw:</b> TGCCACATATCACTACTCCTTT <b>Rv:</b> AATCCAGGAAGAGCTATGTCT

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados para analizar la región promotora en el gen *ALT1*.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' 3'</b>
B1	<b>Fw:</b> TTCAAAGAAGTTGCCGCCGT <b>Rv:</b> TGTATGTGAATGAGCAGTGGAT
B2	<b>Fw:</b> CTGAAGAAGACTAGAGGACTTAGT <b>Rv:</b> CAGGAGCAACCGCTTTTAAC
B3	<b>Fw:</b> ATCCACTGCTCATTACATACA <b>Rv:</b> TGGGTGAGGCCGCAGATT
B4	<b>Fw:</b> GTTAAAAGCGGTTGCTCCTG <b>Rv:</b> TTGCCAATCAAGGGTGAAGC
B5	<b>Fw:</b> ACCGCCATTGTTTCGTACGT <b>Rv:</b> GAAACAATAGTATCGTGATGTGA
B6	<b>Fw:</b> GCTTCACCCTTGATTGGCAA <b>Rv:</b> AAGACGTGTGGAGGACATCA
B7	<b>Fw:</b> TCACATCACGATACTATTGTTTC <b>Rv:</b> ATAATGAAGTAATTATGACGAAG
B8	<b>Fw:</b> TGATGTCCTCCACACGTCTT <b>Rv:</b> TTCTTAGGTATAATGAAGTAATT
B9	<b>Fw:</b> TACTTCGTCATAATTACTTCATTA <b>Rv:</b> TTGCGAATGAGGCCAAACTT
B10	<b>Fw:</b> AATTACTTCATTATACCTAAGAA <b>Rv:</b> ACAAGCCGTTTCCATGGAGA
B11	<b>Fw:</b> AAGTTTGGCCTCATTGCGAA <b>Rv:</b> AATAAAATCGCCAAACAAGTAGG
B12	<b>Fw:</b> TCTCCATGGAAACGGCTTGT <b>Rv:</b> TATGGGACCATAAGAGTAGGA

B13	<b>Fw:</b> TCCTACTTGTTTGGCGATTTTATT <b>Rv:</b> AAGTGTATTGGTAATTTGAAGAG
B14	<b>Fw:</b> TCCTACTCTTATGGTCCCATA <b>Rv:</b> TTCCCACACGAAGTAGTAAATTT
B15	<b>Fw:</b> ATCTCTTCAAATTACCAATACACT <b>Rv:</b> AAAGGATCAAAAAGAAAAGTGA
B16	<b>Fw:</b> AAATTTACTACTTCGTGTGGGAA <b>Rv:</b> TATTTACTGAATGAGAAAAGGAT
B17	<b>Fw:</b> TGTTCACTTTTTCTTTTTGATCCTTT <b>Rv:</b> TCTTATCTTTTATGCCTCTAGAGA
B18	<b>Fw:</b> TCATCCTTTTCTCATT CAGTAAAT <b>Rv:</b> ACTTACAAAAACAACACTACTGT
B19	<b>Fw:</b> TCTCTAGAGGCATAAAAGATAAG <b>Rv:</b> TGTCATTGTCATGTGTTCTTACTT
B20	<b>Fw:</b> CACAGTAGTGTTGTTTTGTAAAGT <b>Rv:</b> TCCTTTGCGGTGAACACAC
B21	<b>Fw:</b> AAGTAAGAACACATGACAATGAC <b>Rv:</b> TAATCTTGCCAGCGGGCTTA
B22	<b>Fw:</b> GTGTGTT CACCGCAAAGGA <b>Rv:</b> AGCATATTCTGCCTTAGTGACA
B23	<b>Fw:</b> TAAGCCCGCTGGCAAGATTA <b>Rv:</b> TTAGCTCGTCAGCTCTGGTT

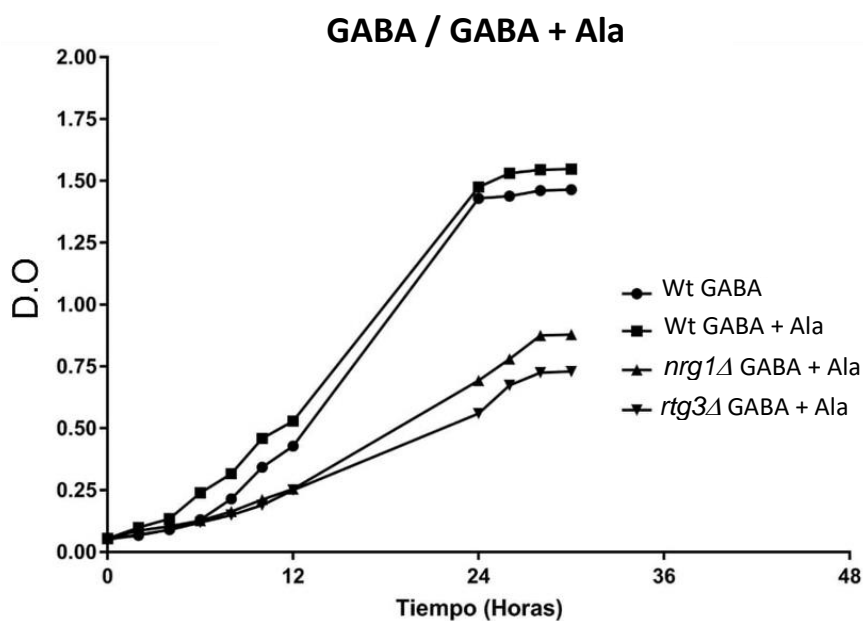
**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados para analizar la región promotora en el gen *ALT2*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Cinética de crecimiento

La caracterización fenotípica se llevó a cabo con el fin de reproducir los datos obtenidos por otros miembros del laboratorio y verificar el fenotipo de la cepa tipo silvestre (Wt) y las mutantes de los reguladores transcripcionales *nrg1* $\Delta$ , *rtg3* $\Delta$ , estos experimentos, se llevaron a cabo en las condiciones GABA o GABA más alanina como únicas fuentes de nitrógeno (Figura 8).

La obtención de la cinética de crecimiento permitió conocer el tiempo necesario para que los cultivos alcanzaran una DO de 0.3, requerida para obtener la muestra y realizar extracción de RNA para distintos experimentos de expresión tales como Northern blot, análisis de RNA-seq y qPCR.



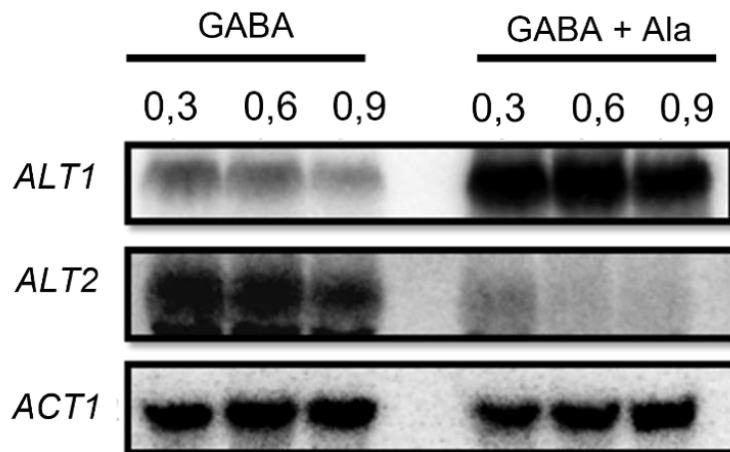
**Figura 8.** Cinética de crecimiento de la cepa de tipo silvestre (Wt) y las mutantes *nrg1* $\Delta$  y *rtg3* $\Delta$ .

## 6.2. La alanina induce la expresión de *ALT1* y reprime la expresión de *ALT2*

Con el fin de analizar la expresión de los genes *ALT1* y *ALT2*, se llevaron a cabo análisis tipo Northern blot, confirmado el resultado previamente obtenido por Dariel Márquez (Tesis de Maestría), confirmando que la expresión de *ALT1* se induce en presencia de alanina, en tanto que la de *ALT2* se reprime (Figura 9).

El RNA total se obtuvo a partir de cultivos preparados en MM con glucosa como fuente de carbono y GABA o GABA más alanina como fuentes de nitrógeno.

La figura 9 presenta resultados que indican que la expresión de *ALT1* en la cepa tipo silvestre (Wt) aumentó en presencia de alanina y de manera contrastante se observó que *ALT2* despliega una regulación opuesta, reprimiendo su expresión en alanina.



**Figura 9.** Análisis tipo Northern blot del ARN total obtenido de la cepa tipo silvestre (Wt).

En la Figura 9 se observa claramente que, en GABA, la expresión de *ALT1* es muy baja, sin embargo, al agregar alanina al medio de cultivo, la expresión de este gen alcanza una inducción superior por lo tanto la alanina actúa como co-inductor. Por el contrario, *ALT2* en GABA se expresa sin embargo cuando se adiciona alanina se reprime su expresión, fungiendo como correpresor. Son



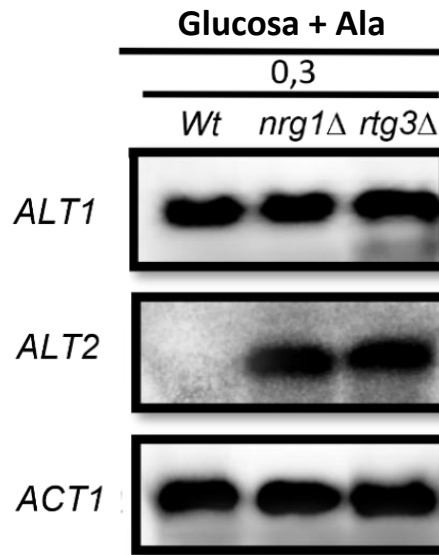
perfiles opuestos, hay una regulación diferencial. Se puede concluir que *ALT1* tiene un perfil de expresión catabólico ya que se induce cuando está presente el metabolito a degradar que en este caso es la alanina, mientras que *ALT2* tiene un perfil biosintético porque cuando no hay alanina se reprime la expresión.

### **6.3. La acción conjunta de Nrg1 y Rtg3 determina la represión de *ALT2* en presencia de alanina**

En base a los resultados obtenidos del perfil de expresión de *ALT2* nos interesó saber quiénes era los genes que estaban involucrados en la represión de este gen, para ello se probó con los genes Nrg1 y Rtg3 ya que, al analizar la secuencia promotora de *ALT1*, se encontraron sitios de unión para Nrg1 y Rtg3, para el caso de *ALT2* únicamente se encontraron secuencias de unión para Nrg1.

Se llevó a cabo un análisis de expresión tipo Northern blot, el RNA total se obtuvo a partir de cultivos preparados en MM con glucosa como fuente de carbono y alanina como única fuente de nitrógeno, empleando la cepa de tipo silvestre (Wt) y las mutantes de los genes a evaluar (*nrg1* $\Delta$  y *rtg3* $\Delta$ ).

La Fig. 10 presenta resultados que indican que la expresión de *ALT1* no cambia al deletar cualquiera de los reguladores, sin embargo, el perfil de expresión de *ALT2* se incrementa en cualquiera de las dos mutantes, sugiriendo que la represión de *ALT2* en alanina depende de la acción conjunta de Nrg1 y Rtg3.



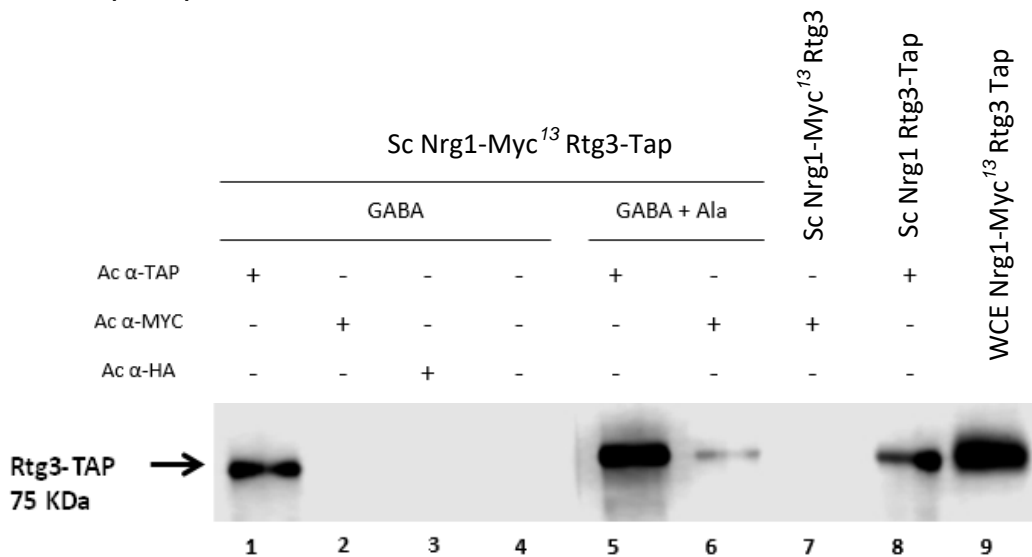
**Figura 10.** Análisis tipo Northern blot del RNA total obtenido de las cepas mutantes *nrg1*Δ, *rtg3*Δ y de tipo silvestre (Wt).

La alanina indujo la expresión de *ALT1* y reprimió la de *ALT2* en la cepa tipo silvestre, sin embargo, la regulación mediada por la delección de Nrg1 y Rtg3 muestra que hay un efecto sobre el perfil de expresión de *ALT2*, siendo inducida la expresión del gen en presencia de alanina, sugiriendo que actúan en combinación. En ambas cepas mutantes, *nrg1*Δ o *rtg3*Δ, la expresión de *ALT1* no se reprime en presencia de alanina, no cambia su comportamiento al deletar a Nrg1 o a Rtg3 ya que la expresión de este gen no se reprime por el complejo Nrg1-Rtg3-Ala.

#### 6.4. El complejo Nrg1-Rtg3 se organiza preferencialmente en presencia de alanina

De acuerdo con los resultados arriba descritos se sugiere una interacción entre proteínas Nrg1-Rtg3 que reprimirían al gen *ALT2*. Para comprobar esta hipótesis se realizó una coimmunoprecipitación para analizar si Nrg1 y Rtg3 interactúan. Para tal propósito se construyó una mutante etiquetada con Tap y Myc<sup>13</sup>.

La Figura 11 señala que las muestras que a continuación se describen y en las que se prepararon los filtros se revelaron con anti- Tap. Se preparó un extracto de proteínas a partir de un cultivo de la cepa Nrg1-Myc<sup>13</sup> Rtg3- Tap, en el primer carril se observa la banda de una proteína que corresponde al corrimiento de Rtg3-Tap (control positivo), según se observa en el carril nueve que corresponde a un extracto total de proteína obtenido de un cultivo de la doble cepa etiquetada sin tratamiento con anticuerpos. En el segundo carril se observa el extracto de la muestra experimental en la que se inmunoprecipitó un extracto de la cepa doble etiquetada con anti-Myc, no se observó ninguna banda sugiriendo que no se había formado el complejo Nrg1- Rtg3. En el carril tres se corrió una muestra obtenida tratándola con un anticuerpo de hemaglutinina (HA), este no está relacionado con las proteínas de la levadura, por lo tanto no presenta señal, esto nos indica que lo observado no es un artefacto y depende de la interacción de Tap con anti-Tap. En el carril cuatro se corrió una muestra que no se trató con anticuerpo y por ende no se observa inmunoprecipitación.



**Figura 11.** Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc<sup>13</sup> Rtg3-Tap. Toda la membrana es revelada contra Tap.

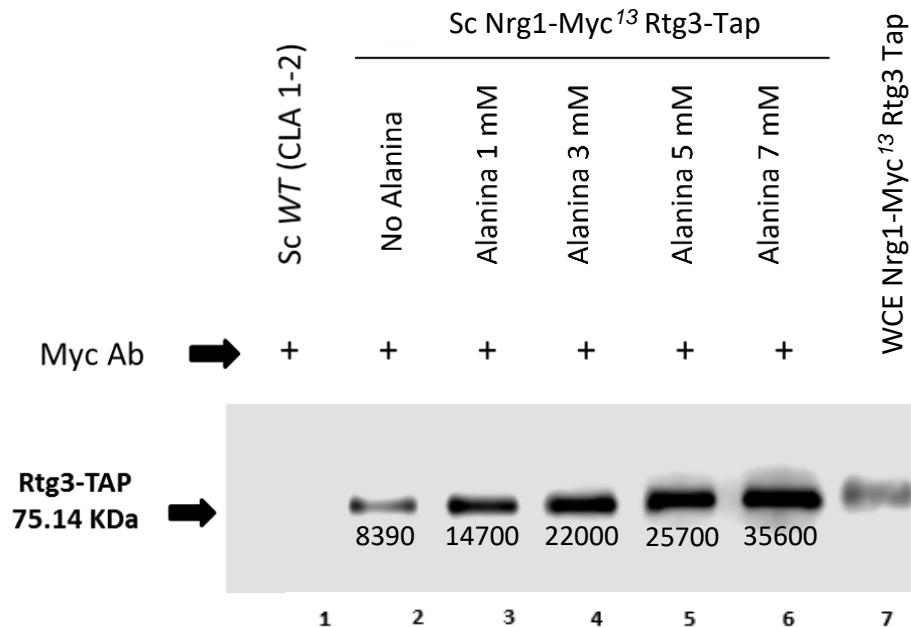
Los carriles cinco y seis corresponden a las muestras obtenidas de la cepa doble etiquetada crecida en GABA más alanina, en el carril cinco se observa la banda de inmunoprecipitación obtenida con anti-Tap, similar a lo observado en el carril uno. De manera interesante, el carril seis muestra la coinmunoprecipitación entre Myc<sup>13</sup> y Tap, ya que aquí se corrió el extracto obtenido de la cepa etiquetada inmunoprecipitada con Myc<sup>13</sup> y revelada con

anti-Tap, indicando coinmunoprecipitación entre Rtg3-Tap y Nrg1-Myc<sup>13</sup>. En el séptimo carril se muestra un control negativo, es una cepa sencilla con el fondo Nrg1-Myc<sup>13</sup>, no se observa ninguna señal, el octavo carril es un control positivo, es una cepa sencilla con el fondo Rtg3-Tap, en el que se observa la proteína Rtg3-Tap. El carril nueve muestra un extracto celular que no recibió tratamiento experimental y sirve como estándar, este nos indica todo el tiempo a qué nivel migra Rtg3.

Se demuestra que existe una interacción entre las dos proteínas Rtg3-Tap y Nrg1-Myc<sup>13</sup>, indicando que se forma el complejo de acuerdo con los análisis de expresión que regulan al promotor de *ALT2*. Esto demuestra que la represión observada para *ALT2* es, al menos, llevada a cabo por el regulador híbrido constituido por Nrg1 y Rtg3 en presencia de alanina. El hallazgo de que se necesite alanina para que se forme el complejo interesante, reafirmamos que este aminoácido cumple con el papel de corregulador.

Con el fin de validar esta observación y en colaboración con el Dr. Edgar Ramírez, se llevó a cabo el experimento que se presenta en la figura 12. En este caso podemos ver que en la condición de cultivos obtenidos de GABA sin alanina se observa coinmunoprecipitación. Así mismo, se observa que si se preparan extractos de cultivos crecidos con concentraciones crecientes de alanina se incrementa la producción de inmunoprecipitado, indicando que la alanina tiene un efecto positivo sobre la producción del coinmunoprecipitado.

La diferencia entre este experimento y el que se presentó en la Figura 11, consistió en que se obtuvo el extracto de un cultivo de 500 mL de GABA, en lugar del de 250 mL que se utilizó en el descrito en la Figura 11. Este resultado indica que en GABA hay suficiente alanina para que se forme el coinmunoprecipitado Nrg1-Myc<sup>13</sup> Rtg3-Tap.

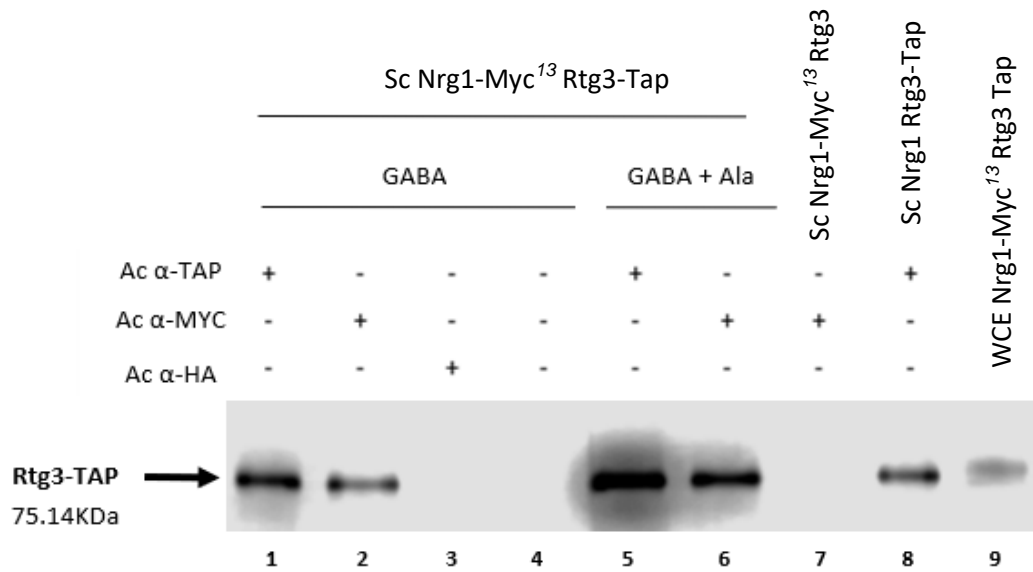


**Figura 12.** Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc<sup>13</sup> Rtg3- Tap. Toda la membrana es revelada contra Tap, Cada carril se cargó con muestras cultivadas en concentraciones crecientes de alanina y el número indica la intensidad de la banda de Rtg3-Tap al compararse con el fondo de la membrana.

La Figura 13 muestra un experimento similar al de la Figura 11, que se llevó a cabo con muestras de cultivos crecidos en GABA o en GABA más alanina: En esta ocasión las muestras de cultivo que se tomaron fueron de 500 mL, para tener mayor concentración y obtener inmuno y coinmunoprecipitados más abundantes.

Tal y como se observa en la figura 13, en esta ocasión se observa coinmunoprecipitado en GABA, indicando que en presencia de GABA se sintetiza suficiente alanina para obtener coinmunoprecipitado.

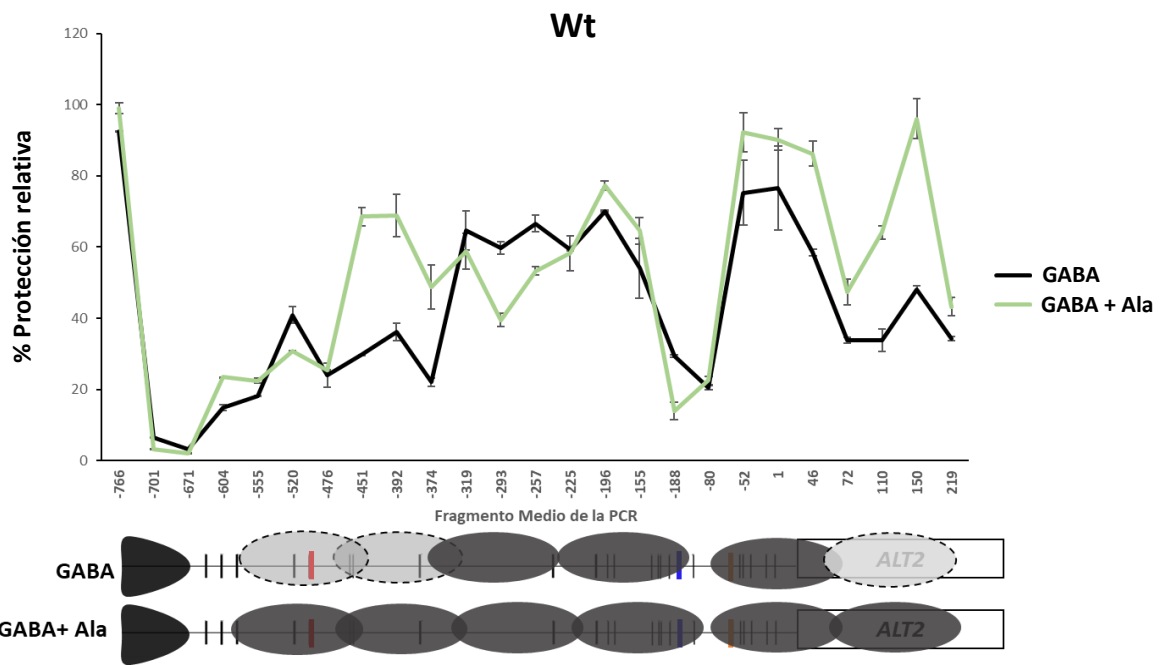
Estos resultados confirman que Nrg1 y Rtg3 pueden formar un regulador híbrido y que la alanina juega un papel positivo en la formación del complejo. La identificación del papel de la alanina será fundamental, constituyendo un proyecto nuevo que el grupo deberá atender en su momento.



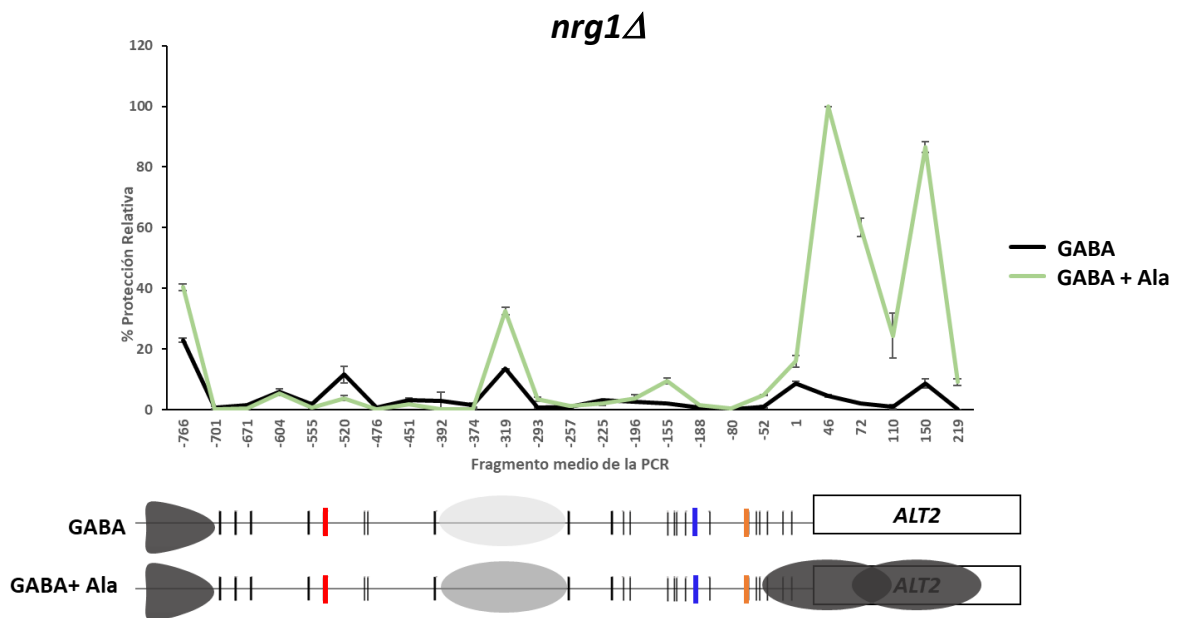
**Figura 13.** Coinmunoprecipitación para una cepa etiquetada Nrg1-Myc<sup>13</sup> Rtg3- Tap. Membrana revelada contra Tap.

### 6.5. El complejo represor Nrg1-Rtg3 influye sobre la remodelación de la cromatina, lo que se refleja en la represión de *ALT2*

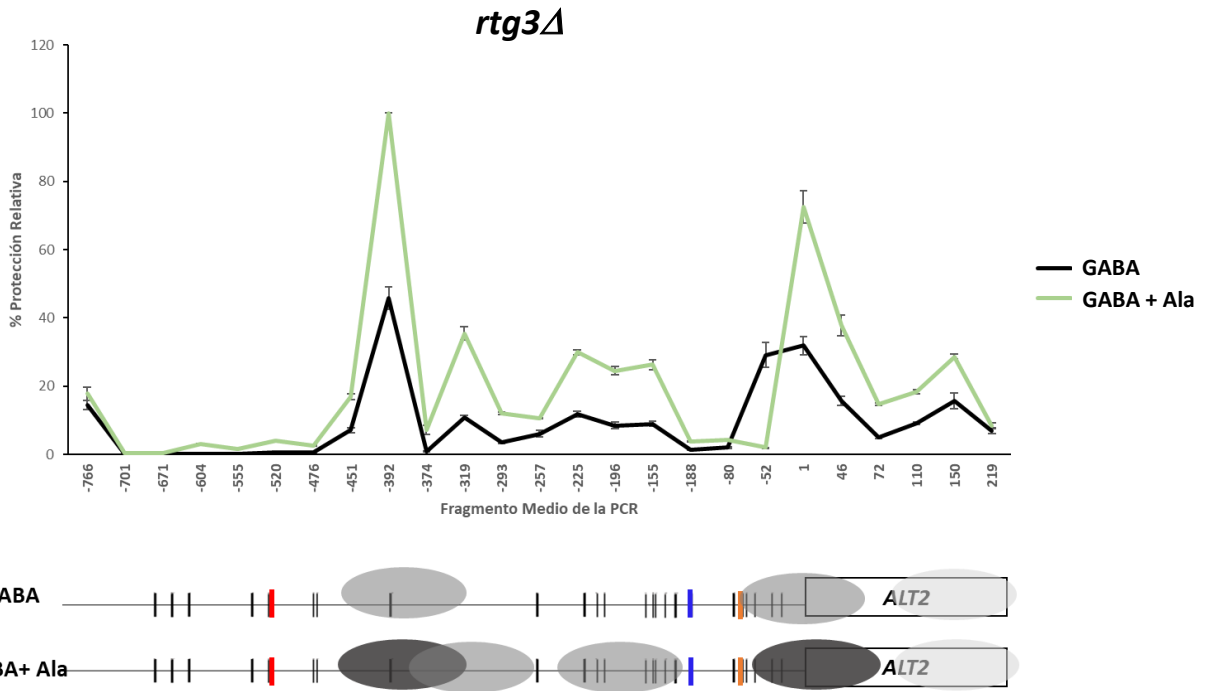
Con el objetivo de analizar posibles cambios sobre la remodelación de la cromatina del promotor *ALT2* y determinar si ocurre la exposición o encubrimiento de cajas que regulen la expresión del gen de interés, se realizó el análisis de la organización de la cromatina del promotor de *ALT2* (NuSA: Nucleosome Scanning Assay) en colaboración con el Dr. José Carlos Campero Basaldua. Esta técnica nos permite mapear las posiciones de los nucleosomas en la cromatina a lo largo de la región promotora de un gen, de esta manera se puede observar los cambios en la organización de la cromatina. Estos análisis se realizaron en la cepa tipo silvestre (Wt) (Figura 14) y en las mutantes *nrg1Δ* (Figura 15) y *rtg3Δ* (Figura 16) bajo la condición glucosa GABA y glucosa GABA más alanina.



**Figura 14.** NuSA para la cepa tipo silvestre (Wt) en el gen *ALT2* en las condiciones GABA y GABA más alanina.



**Figura 15.** NuSA para la cepa mutante *nrg1Δ* en el gen *ALT2* en las condiciones GABA y GABA más alanina.



**Figura 16.** NuSA para la cepa mutante *rtg3Δ* en el gen *ALT2* en las condiciones glucosa GABA y glucosa GABA más alanina.

En la parte inferior se presenta un esquema del promotor señalando en rojo el dominio de unión a DNA de Nrg1, en azul el de Gcn4 y en naranja el de Gln3, en la parte superior se presentan las gráficas que indican las regiones cubiertas por nucleosomas que impiden el acceso de la RNA polimerasa y, por lo tanto, la síntesis del RNA mensajero correspondiente. Las gráficas muestran picos altos, que nos indican la protección por un nucleosoma o picos bajos o nulos, mostrando regiones libres de nucleosomas.

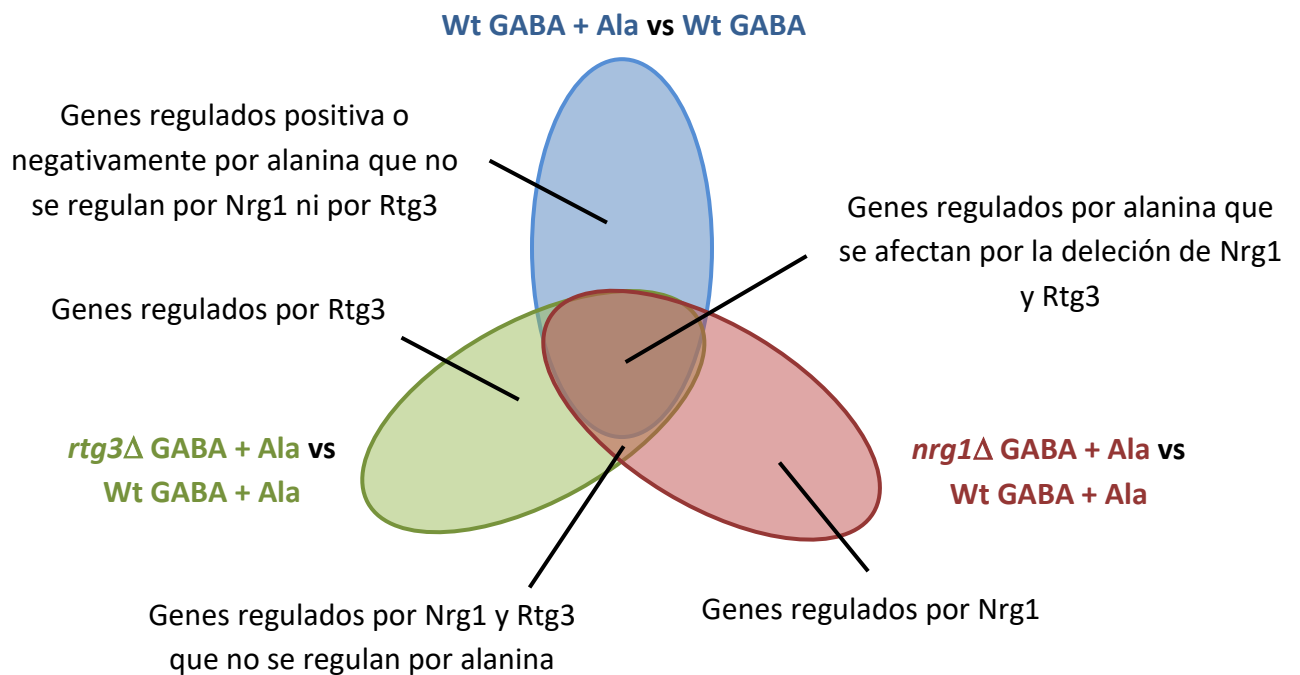
Estos estudios mostraron que, cuando se lleva a cabo el análisis de la organización de la cromatina tanto en GABA como en GABA más alanina, en mutantes carentes de Nrg1 (*nrg1Δ*) o Rtg3 (*rtg3Δ*) se observa la eliminación o disminución de picos que representan la relajación de la organización de la cromatina que permite el acceso de la RNA polimerasa y la transcripción de *ALT2*.



## 6.6. Análisis de expresión por RNA-seq

Con el fin de determinar que otros genes se regulan por el complejo híbrido Nrg1-Rtg3, se llevó a cabo un estudio de RNA-seq. Esta técnica permitió identificar al grupo de genes que pueden constituir el circuito regulado de manera negativa por el complejo Nrg1-Rtg3-Ala al que pertenece *ALT2*.

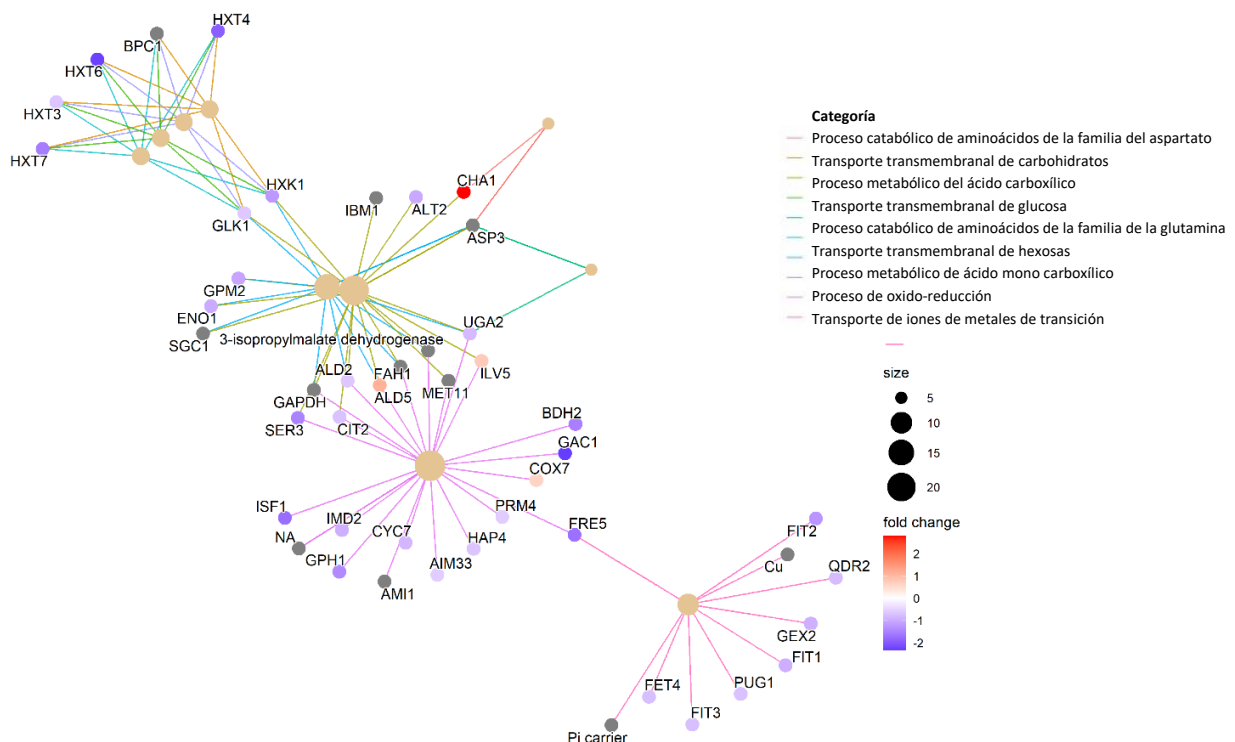
Para ello se realizaron cultivos de la cepa tipo silvestre (Wt), las mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ* en presencia de GABA o GABA más alanina como fuentes de nitrógeno tal como se presentó en la Figura 8. A partir de cultivos como los descritos en la figura 8 se prepararon muestras de RNA total con el fin de identificar los genes cuya expresión aumenta o disminuye en la mutante *nrg1Δ* y *rtg3Δ*, de acuerdo con el siguiente diseño experimental, mostrado en la figura 17.



**Figura 17.** Diseño experimental. Análisis de RNA-seq de la cepa tipo silvestre (Wt), *nrg1Δ* y *rtg3Δ* en las condiciones GABA o GABA más alanina.

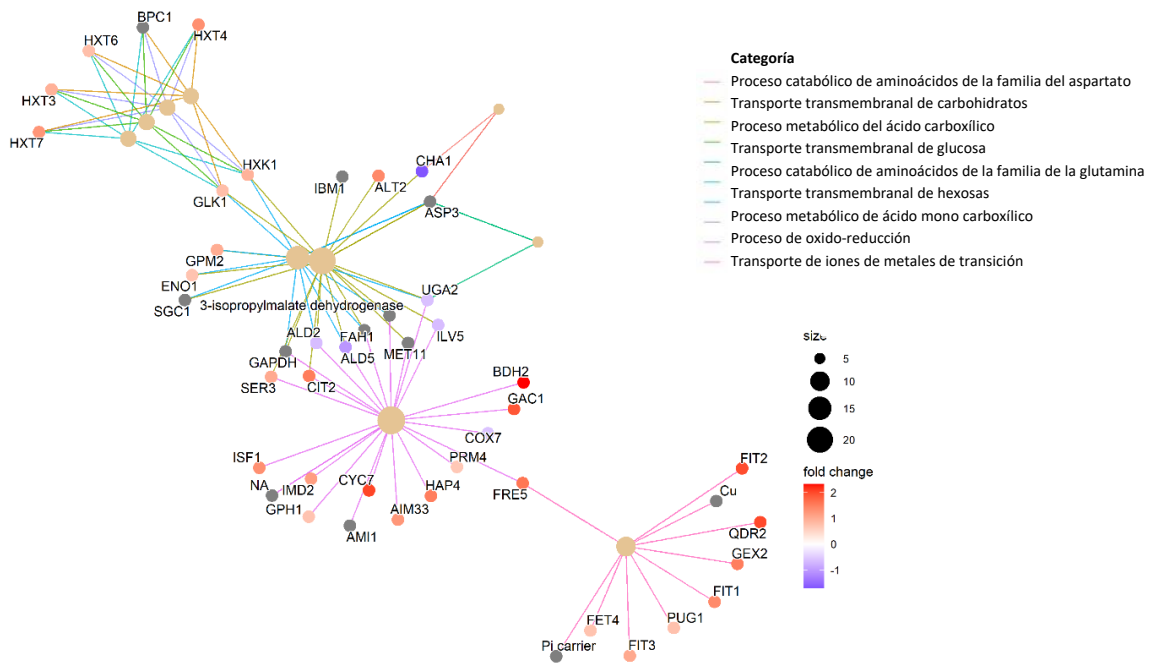
La figura 17 muestra en la parte central aquellos genes regulados por alanina cuya expresión se reprime en presencia de Nrg1 y Rtg3 que se afectan por la delección de Nrg1 y Rtg3, estos son los que se regulan por el complejo Nrg1-Rtg3-Ala, siendo uno de los grupos que nos interesan. Otro grupo importante se muestra en la zona azul, encontrando aquellos genes regulados positiva o negativamente por alanina que no se regulan ni por Nrg1 ni por Rtg3. Los que se pretende en este análisis es averiguar en el genoma de *S. cerevisiae* cuántos genes hay que se regulen por nuestro complejo en las condiciones mencionadas.

El análisis preliminar de los resultados obtenidos por RNA-seq permitieron la identificación de grupos de genes que presentan un patrón de expresión similar al de *ALT2*: reprimidos por alanina y desreprimidos en mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ*. Las muestras nos dicen cuánto es la tasa de recambio del fold change de cada uno de estos. Realizando estudios bioinformáticos se observa la expresión de los genes que se están reprimiendo en la cepa tipo silvestre (Wt) (Figura 18) en presencia de alanina y cuáles de ellos incrementan su expresión en mutantes *nrg1Δ* (Figura 19) o *rtg3Δ* (Figura 20).

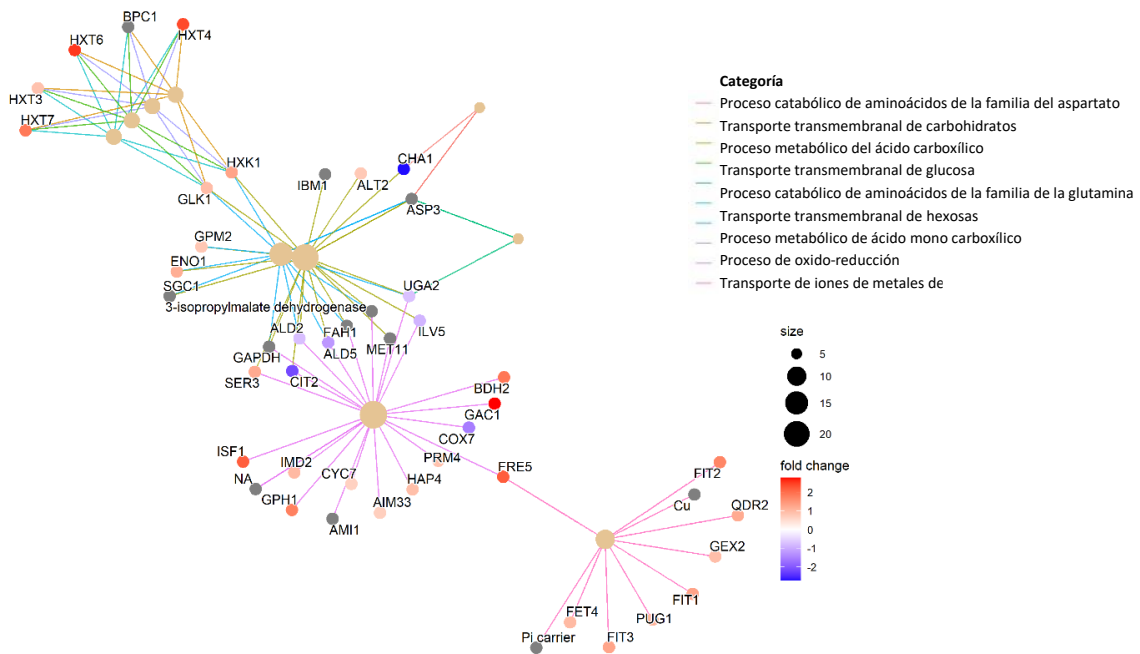


**Figura 18.** Grupos de genes cuya expresión se reprime en presencia de alanina en una cepa tipo silvestre (Wt). Se logran observar tres grupos sobresalientes: Procesos de oxido-reducción (zona

central), metabolismo de ácidos carboxílicos (zona superior), y transporte de metales de transición (zona inferior).

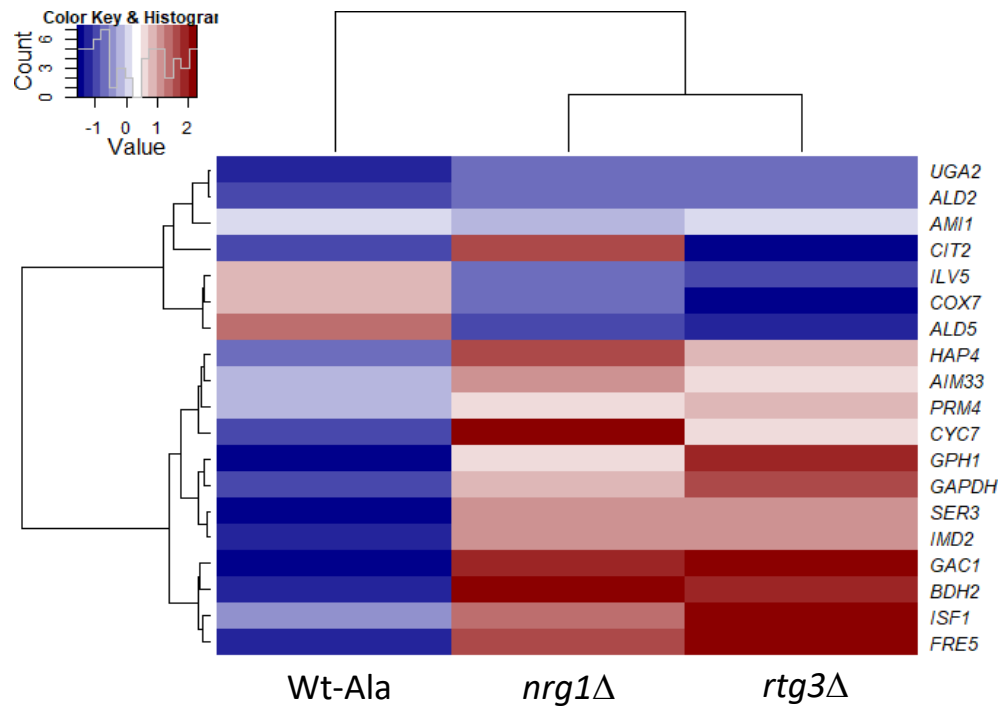


**Figura 19.** Efecto de la falta de Nrg1 sobre la expresión de un grupo de genes.

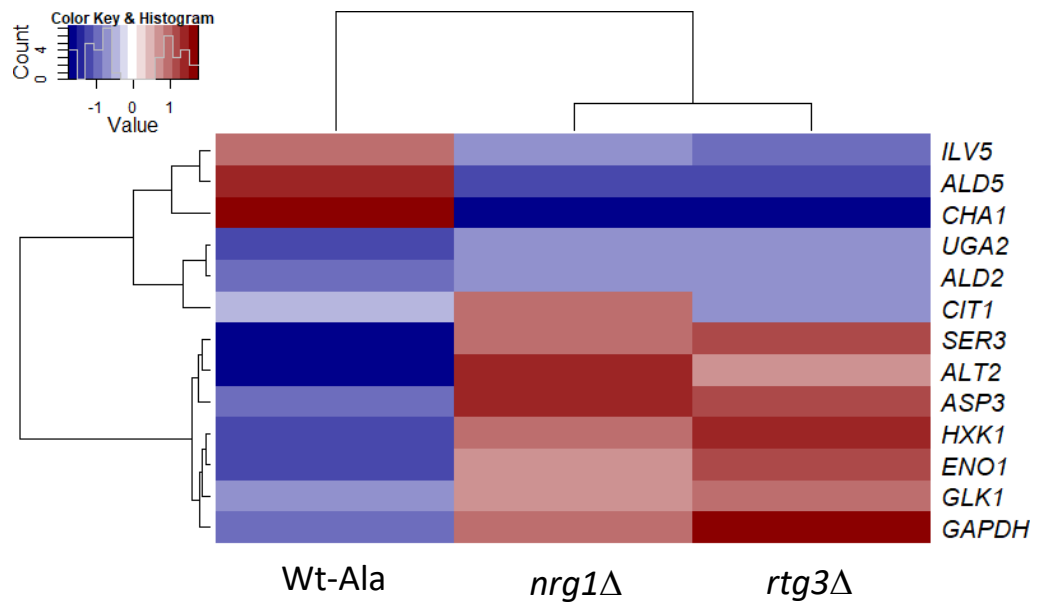


**Figura 20.** Efecto de la falta de Rtg3 sobre la expresión de un grupo de genes.

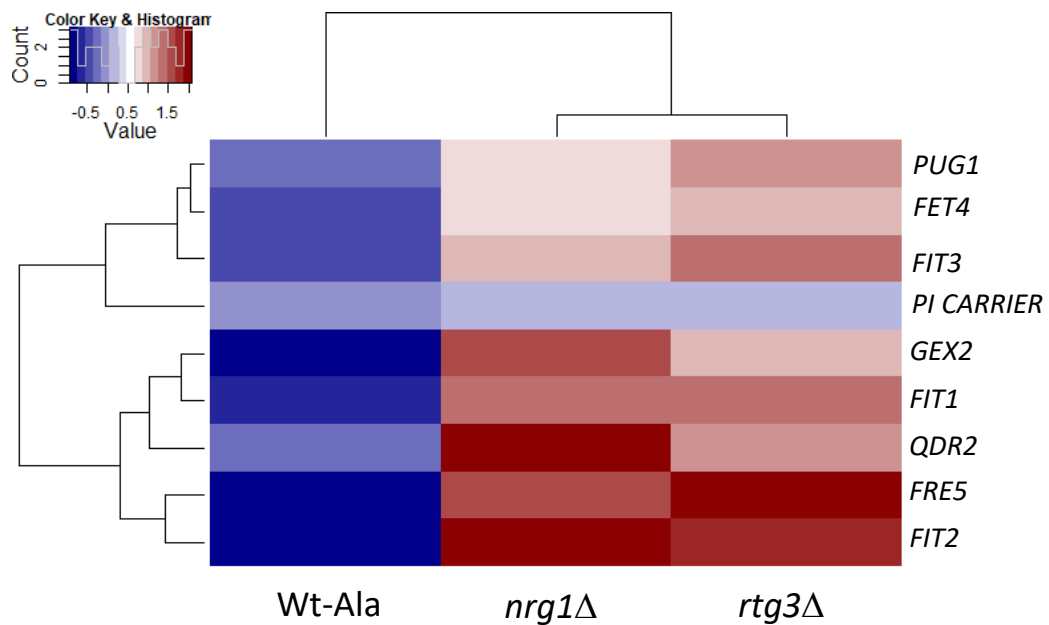
Una vez que se filtraron los datos de RNA-seq se rescataron los principales genes que tenían un cambio que compartían las condiciones de nuestro modelo. Para hacer más evidente la interpretación de los datos, se realizaron mapas de calor por procesos los cuales nos permiten identificar el cambio en la expresión de los genes. Para ello, se seleccionaron los procesos más representativos, siendo: proceso de óxido-reducción (Figura 21), metabolismo de ácidos carboxílicos (Figura 22) y transporte de metales de transición (Figura 23).



**Figura 21.** Mapa de calor de los genes involucrados en el proceso de óxido-reducción.



**Figura 22.** Mapa de calor de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos carboxílicos.



**Figura 23.** Mapa de calor de los genes involucrados en el transporte de metales de transición.

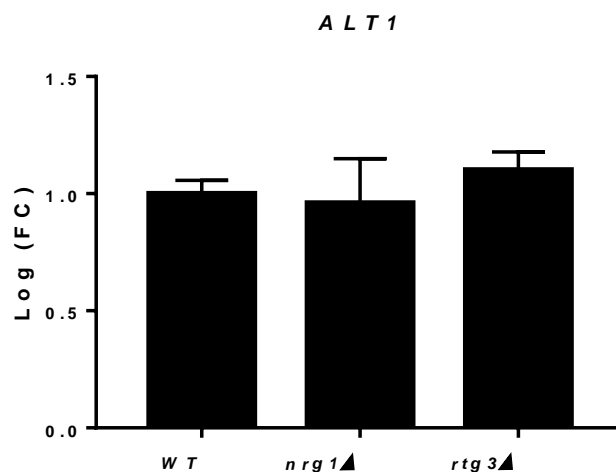
Se puede observar en los mapas de óxido reducción (Figura 21), metabolismo de ácidos carboxílicos (Figura 22) y transporte de metales de transición (Figura

23) que, en la condición GABA más alanina, la cepa tipo silvestre (Wt) está en un tono azul y de acuerdo con la escala se encuentra cerrada su expresión pero al quitar Nrg1 o Rtg3 vemos que aumenta el fold change, observándose un cambio al color rojo ya que el nivel de expresión cambia, entonces observamos el mismo comportamiento que obtuvimos al realizar el Northern blot, claramente en todos los casos ocurre una desrepresión en presencia de cualquiera de las dos mutaciones *nrg1*Δ o *rtg3*Δ.

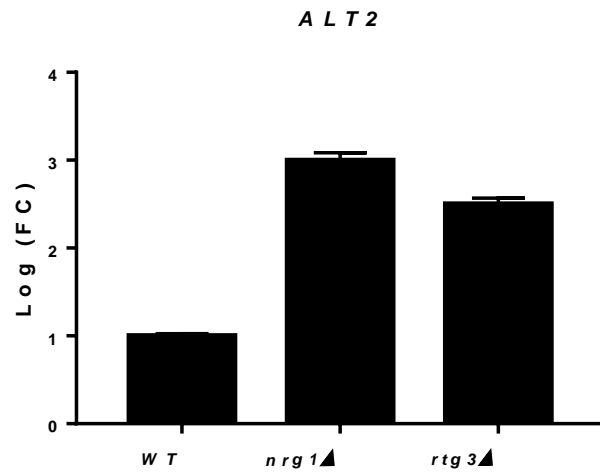
### 6.7. Confirmación de los resultados por análisis de qPCR

Con el fin de dar credibilidad a los datos obtenidos por RNA-seq y verificar los perfiles de expresión de manera experimental se realizaron análisis por PCR cuantitativo, con este análisis se observa el comportamiento de los genes identificados en el sistema confirmando la regulación de estos por el complejo.

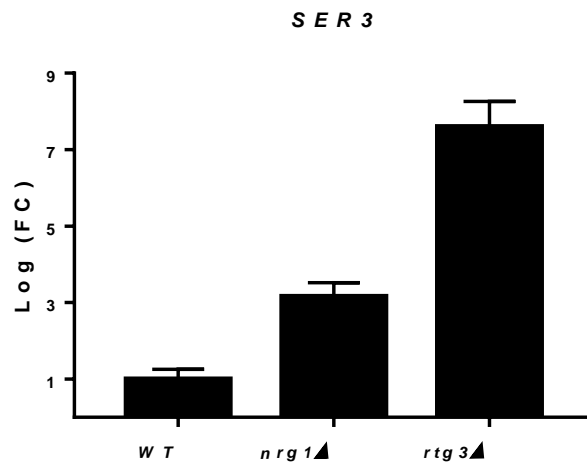
El RNA total se obtuvo a partir de cultivos de glucosa con GABA más alanina como fuente de nitrógeno. Los genes que se trabajaron fueron *ALT1* (Figura 24) como control, ya que nuestros análisis por Northern blot mostraron que la expresión de este gen no se regula por el híbrido Nrg1-Rtg3, y *ALT2* cuya expresión se regula negativamente por Nrg1-Rtg3 (Figura 25), el resto de los genes se seleccionaron entre aquellos que mostraron un perfil de expresión similar al de *ALT2*, es decir genes cuya expresión se reprime por Nrg1-Rtg3 (Figura 26, 27 y 28).



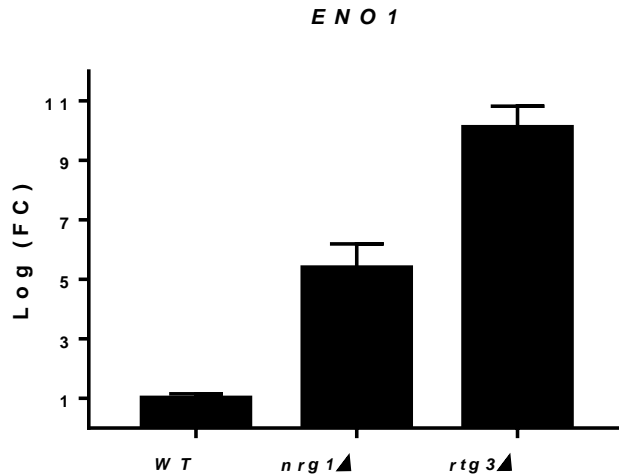
**Figura 24.** qPCR del gen *ALT1* en condición glucosa GABA más alanina.



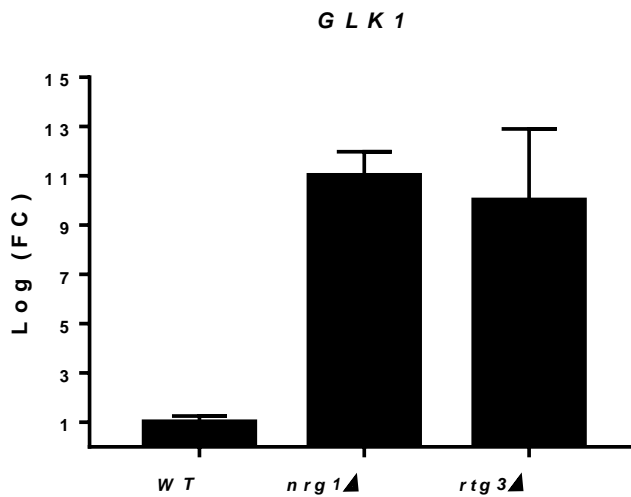
**Figura 25.** qPCR del gen *ALT2* en condición glucosa GABA más alanina.



**Figura 26.** qPCR del gen *SER3* en condición glucosa GABA más alanina.



**Figura 27.** qPCR del gen *ENO1* en condición glucosa GABA más alanina.



**Figura 28.** qPCR del gen *GLK1* en condición glucosa GABA más alanina.

Con los datos obtenidos anteriormente por RNA-seq, se logra hacer la comparativa y se observa que, *ALT1* (Figura 24), no cambia su comportamiento al deletar a *Nrg1* o a *Rtg3*, ya que la expresión de este gen no se reprime por el complejo *Nrg1-Rtg3-Ala*, reproduciendo los datos obtenidos por análisis tipo Northern blot.



Para el caso de *ALT2* (Figura 25), la cepa tipo silvestre Wt se reprime y al deletar a los reguladores Nrg1 y Rtg3 ocurre una desrepresión, y por lo tanto se incrementa su perfil de expresión. Lo mismo ocurre para los genes *SER3* (Figura 26), *ENO1* (Figura 27) y *GLK1* (Figura 28) que, como recordarán, tienen un perfil de expresión similar a *ALT2* y claramente en todos los casos, al deletar a Nrg1 o a Rtg3 se desreprime la expresión, confirmando los datos obtenidos por nuestro análisis.

## 7. CONCLUSIONES

La regulación del gen *ALT2* es completamente opuesta a su parálogo *ALT1*. Este estudio permitió identificar la existencia de un regulador híbrido Nrg1-Rtg3 cuya organización se estimula en presencia de alanina y que juega un papel represor, definiendo a este aminoácido como un corregulador en la generación del modulador Nrg1-Rtg3.

Mutantes *nrg1Δ* o *rtg3Δ* desreprime la expresión de *ALT2*. La inducción de la expresión de *ALT1* no se estudió y por tanto se requerirá llevar a cabo un estudio de los reguladores que determinan la inducción de la expresión de *ALT1* en presencia de alanina.

El complejo represor Nrg1-Rtg3 influye sobre la remodelación de la cromatina, jugando un papel importante en la regulación de *ALT2*, reflejado en su perfil de expresión. El reposicionamiento de los nucleosomas a lo largo del promotor de *ALT2* permite el acceso de distintos factores de transcripción que pueden inducir o reprimir la expresión del gen. Desde luego que para probar cuales son los factores que participan sería necesario hacer y estudiar deleciones de la región. Lo que si queda demostrado es que la falta de los represores Nrg1 y Rtg3 relaja la organización de la cromatina e induce la expresión de *ALT2*.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de RNA-seq, se podría proponer que el complejo Nrg1-Rtg3 en presencia de alanina podría estar implicado en la regulación de la glicólisis.

## 8. PERSPECTIVAS

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si la regulación Nrg1-Rtg3-dependiente es directa o indirecta en los genes blanco del RNA-seq.

Determinar la importancia de la regulación del híbrido en la glicólisis.

Analizar los circuitos restantes de genes regulados por Nrg1-Rtg identificados en el análisis de RNA-seq.

Análisis proteómico para determinar que otras proteínas están formando parte del complejo.

Determinar qué papel juega la alanina en la función del complejo Nrg1-Rtg3. Para determinar la participación de la alanina en la formación del complejo Nrg1-Rtg3-Ala, se llevará a cabo una colaboración con investigadores expertos en docking.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Medios de cultivo

#### 1.1. YPD (medio de cultivo rico)

		<b>Final</b>
Extracto de levadura	10g	1%
Peptona de caseína	20g	2%
Dextrosa anhidra	20g	2%
Agar (solo medio sólido)	20g	2%
Agua bidestilada	Aforar a 1 L	

#### 1.2. Medio mínimo (MM)

		<b>Final</b>
Stock vitaminas 1000x	1 mL	1%
Stock trazas 1000x	1 mL	1%
Stock sales 50x	20 mL	2%
Dextrosa anhidra o etanol	20 g o mL	2%
Sulfato de amonio	5 g	0.05 %
Agar (solo medio sólido)	25 g	2.5 %
Agua bidestilada	Aforar a 1 L	

## Anexo 2. Electroforesis desnaturizante sds-page

### 2.1. Gel separador

Reactivos	Proteínas citoplasmáticas				Proteínas ribosomales	
	7%	10%	12%	13%	15%	18%
<b>Sol 1</b>	5.2 mL	7.4 mL	8.8 mL	9.7 mL	11 mL	13.2 mL
<b>Sol 2</b>	11 mL	11 mL	11 mL	11 mL	11 mL	8.8 mL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5.8 mL	3.5 mL	2.2 mL	1.3 mL	-	-
<b>TEMED</b>	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
<b>APS 10%</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

### 2.2. Gel concentrador

Reactivos	1D	2D
<b>Sol 1</b>	1.66 mL	2.5 mL
<b>Sol 3</b>	5 mL	7.5 mL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3.3 mL	5 mL
<b>TEMED</b>	10 µL	10 µL
<b>APS 10%</b>	100 µL	100 µL

### 2.3. Solución 1

<b>Acrilamida</b>	29.2%	29.2 g
<b>Bis-acrilamida</b>	0.8%	0.8 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar a 100 mL

#### 2.4. Solución 2

<b>Tris-HCl pH 8.8</b>	9.075%	9.075 g
<b>SDS</b>	0.2%	0.2 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar a 100 mL

#### 2.5. Solución 3

<b>Tris-HCl pH 6.8</b>	3.03 %	3.03 g
<b>SDS</b>	0.2%	0.2 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar a 100 mL

#### 2.6. Solución de tinción de geles

<b>Azul Coomassie R-250</b>	0.25%	1.25 g
<b>Metanol</b>	50%	250 mL
<b>Ácido acético</b>	7%	35 mL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar a 500 mL

#### 2.7. Solución de distinción

<b>Ácido acético</b>	7%	7 g
<b>Metanol</b>	30%	30 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar a 100 mL

## 2.8. Amortiguador de transferencia 5x

Reactivos	Concentración	1L	2L	10x
Tris base	48mM	5.8 g	11.6 g	58 g
Glicina	390mM	29.28 g	58.5546 g	292.8 g
Metanol	20%	200	400	
SDS	37.5%	0.375 g	0.75 g	3.75 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar			

## 2.9. Amortiguador de corrida

Reactivos	1.5L	1.5L (2X)
Tris-HCl pH 8.3	4.541 g	9.08 g
Glicina	21.4 g	42.8 g
SDS	1.5 g	3 g
dH <sub>2</sub> O	Aforar	

## 2.10. Extracción de proteínas: Amortiguador pronasse

Sorbitol	1.4M	70 mL (Stock 2M)
Tris-Cl pH 7.5	25 mM	2.5 mL (Stock 1M)
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	200 µL (Stock 1M)
NaN <sub>3</sub>	20 mM	1 mL (Stock 2M)

### 2.11. Amortiguador Thorner

<b>Urea</b>	8M	24g
<b>SDS</b>	5%	25 mL (Stock 10%)
<b>TRIS-Cl pH 6.8</b>	40 mM	2 mL (Stock 1M)
<b>EDTA</b>	0.1 mM	10 $\mu$ L (Stock 0.5M)
<b>BPB (azul de bromofenol)</b>	0.4 mg/mL	20 mg

### Anexo 3. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas mediante un ensayo de barrido de nucleosomas

#### 3.1. Amortiguador NPS

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>	<b>Stock de los reactivos</b>	<b>Para 300 mL</b>
<b>Espermidina</b>	0.5 mM	-	22 mg
<b>NP-40</b>	0.075%	10%	2.25 mL
<b>NaCl</b>	50 mM	5M	3 mL
<b>Tris-Cl pH 7.5</b>	10 mM	1M	3 mL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	5 mM	1M	1.5 mL
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1 mM	1M	0.3 mL
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol</b>	1 mM	14.3 M	20 $\mu$ L
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Aforar	Aforar	290 mL



## PROTOSCOLOS

### Anexo 4. Hibridación tipo *Northern blot*

1. Mezclar 1 g de agarosa con 84 mL de agua y 10 mL de MAE 10X; llevar a ebullición por 30 segundos y enfriar a una temperatura de 55°C, añadir 6 mL de formaldehído
2. Para el amortiguador de corrida (MAE 1X) mezclar 100 mL de MAE 10X y 30 mL de formaldehído; aforar a 1 L con agua bidestilada. Preparar las muestras con 8 µl del ARN extraído de cada una de las cepas de *S. cerevisiae*, con 40 µl de tampón 1.25X y 2 µl de bromuro de etidio
3. Llevar a 65°C durante 15 minutos. Correr los RNAs a 80 volts durante 3:30 horas con una temperatura de -4°C
4. Previo a la transferencia por capilaridad, eliminar el exceso de formaldehído del gel haciendo un lavado de 20 minutos con 250 mL de SSC 10X
5. Para llevar a cabo la transferencia por capilaridad, cortar un papel filtro 3MM de 35 x 14 cm y dos de 12 x 14 cm, así como un papel Hybon-Nylon de 12 x 14 cm (membrana de Nylon cargada positivamente)
6. Posicionar un vidrio apoyado en los bordes de un recipiente Pyrex y vertir 400 mL de SSC 10X
7. Colocar sobre el vidrio papel filtro de mayor tamaño, de manera que las orillas quedaron sumergidas en el SSC 10X en ambos lados del vidrio
8. Colocar el gel arriba del papel filtro, eliminando cualquier burbuja atrapada entre el papel y el gel
9. Humedecer la membrana de Hybon con agua bidestilada y sumergirla en SSC 10X durante 5 minutos para colocarla sobre el gel.
10. Apilar sobre el papel filtro de 7 a 10 cm de toallas de papel y un libro de aproximadamente 1 kg
11. Dejar transfiriendo por 24 horas
12. Lavar la membrana de nylon con SSC 1X y baja agitación durante 30 segundos para retirar los restos adheridos de agarosa y cristales de sal
13. Fijar los RNAs covalentemente a la membrana de nylon iluminando con luz ultravioleta durante 5 minutos haciendo uso del Stratalinker
14. Hibridar la membrana con una sonda para *ALT1*, *ALT2* ó *ACT1* empleando como isótopo radioactivo *P32*, incorporado a citocinas

15. Dejar exponer la membrana hibridizada con las sondas por 48 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se reveló la membrana haciendo uso del instrumento Typhoon

### **Anexo 5. Extracción de proteínas**

1. Tomar un cultivo de 15 mL en fase log (0.2-0.3 DO 600nm). Colectar las células por centrifugación a 3,000 rpm durante 5 min
2. Resuspender la pastilla celular obtenida en 280  $\mu$ L de amortiguador Pronase (w/o BME). Transferir la pastilla celular a un tubo de microcentrífuga nuevo y adicionar 50  $\mu$ L de TCA 85% y 2.8  $\mu$ L de PMSF
3. Añadir al tubo de microcentrífuga aproximadamente 280  $\mu$ L de perlas de vidrio estériles. Homogeneizar durante un minuto y colocar en hielo el mismo tiempo. Repetir este pasó entre 7-10 veces
4. Obtener el sobrenadante, depositarlo en un tubo de microcentrífuga nuevo y mantenerlo en hielo
5. Lavar las perlas dos veces con 280  $\mu$ L de TCA al 5%. Repetir el paso 4 por cada lavado (solo una vez). Combinar el sobrenadante de los lavados con el sobrenadante obtenido en el paso 5 sin arrastrar las perlas
6. Mantener los tubo de microcentrífuga en hielo durante 5 minutos. Centrifugar 10 minutos a 4°C y 5,000 rpm
7. Remover el volumen total del sobrenadante
8. Solubilizar la pastilla celular en 30  $\mu$ L de amortiguador Thorner. Añadir 1/10 del volumen de Tris base no amortiguado 1M hasta que exista un cambio en la coloración a azul
9. Mantener las muestras congeladas a -70°C

### **Anexo 6. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE**

1. Preparar del gel separador de acuerdo a la tabla 1. La concentración de reactivos se determina de acuerdo al tipo de proteína y al tamaño de la misma. Una proteína de mayor tamaño necesita una concentración menor, por el contrario, en una de menor tamaño será necesario mayor concentración. Se agrega además etanol para evitar la formación de burbujas, mismo que se retira con papel filtro antes de colocar el gel concentrado

2. Una vez solidificado el gel separador, preparar el gel concentrado (tabla 1), colocar el peine y dejar solidificar
3. Solidificado el gel completo (gel separador y concentrado), retirar el peine y transferirlo a la cámara de electroforesis
4. Preparar la muestra de acuerdo a lo siguiente: Colocar en un tubo nuevo 3  $\mu\text{L}$  de muestra y 17  $\mu\text{L}$  de amortiguador de corrida
5. Transferir el gel a una membrana de nitrocelulosa. Las instrucciones a seguir para el montaje del equipo de transferencia serán de acuerdo a las características del equipo empleado

### **6.1 Transferencia**

1. Separar el gel de los cristales con ayuda del amortiguador de transferencia, evitando que se quiebre. A continuación, en un cassette de transferencia colocar en el orden siguiente: una esponja, 3 papeles filtros, el gel de acrilamida, la membrana de nitrocelulosa, 3 papeles filtros y otra esponja, todos impregnados con el amortiguador de transferencia. Cerrar el cassette, colocarlo en la cámara y llevar a cabo la transferencia a 200mA durante 2 horas en cuarto frío
2. Almacenar la membrana a  $-4^{\circ}\text{C}$  con 20 mL de PBS 1x (1 día)

### **Anexo 7. Análisis del posicionamiento de los nucleosomas mediante un ensayo de barrido de nucleosomas**

1. Cultivar la cepa de interés en 45 mL de medio YPD O.N
2. Cultivar la pastilla celular centrifugando el volumen total de los preinóculos a 3,000 rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante
3. Realizar dos lavados a la pastilla celular obtenida con  $\text{dH}_2\text{O}$  estéril y centrifugar nuevamente a 3,000 rpm por 5 minutos c/u, homogenizando cada muestra. Eliminar el sobrenadante
4. Resuspender la pastilla celular en  $\text{dH}_2\text{O}$  estéril (1-3 mL) y medir la densidad óptica con una dilución 1:100. Realizar los cálculos necesarios para determinar el volumen necesario de células a inocular, de acuerdo a la densidad deseada
5. Inocular las células en 200 mL de medio mínimo (previamente preparado con los requerimientos necesarios de cada cepa)

6. Cultivar las células hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.6

### **7.1 Recolección de células para NuSA**

1. Adicionar a los cultivos celulares de medio mínimo 6.22 mL de formaldehído al 37% (concentración final 1.15%). El formaldehído provoca parálisis del metabolismo celular
2. Incubar las células durante 20 minutos a temperatura ambiente
3. Añadir 2.5 mL de glicina 2.5M (concentración final 125mM). La glicina inhibe la actividad del formaldehído
4. Incubar las células durante 5 minutos a temperatura ambiente
5. Transferir las células a un tubo de microcentrifuga nuevo y colectarlas por centrifugación a 2,200 rpm por 2 minutos. Decantar el sobrenadante
6. Lavar dos veces la pastilla celular obtenida con TBS 1x frío en tubos cónicos a 3,000 rpm por 5 minutos. En cada lavado homogenizar con ayuda de una micropipeta y retirar el sobrenadante
7. Almacenar la pastilla celular obtenida a -20°C

### **Anexo 8. Extracción de DNA genómico para NuSA**

1. Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante
2. Resuspender la pastilla celular en el remanente tubo de microcentrifuga y transferir a un vial de 1.5 mL
3. A continuación, añadir 400 µL de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), (esta solución se debe preparar al momento de su uso). Homogenizar
4. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 mL
5. Añadir 400 µL de la solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Homogenizar
6. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga nuevo 1.5 mL. Agregar 400 µL de cloroformo y homogenizar
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos. Transferir la fase acuosa a tubo de microcentrifuga nuevo de 1.5 mL

8. Precipitar con 20  $\mu$ L de NaCl 5M más 700  $\mu$ L de isopropanol y mezclar por inmersión de 4 a 6 veces
9. Incubar 30 minutos a -20° C
10. Centrifugar a 14,000 rpm por 20-30 minutos 4°C
11. Resuspender la pastilla celular en 40  $\mu$ L de amortiguador TE 1x, adicionar 2  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL)
12. Incubar a 37°C durante 1 hora
13. Centrifugar a 4°C, 14,000 rpm durante 30 minutos y eliminar el sobrenadante
14. Secar la pastilla celular a temperatura ambiente por aproximadamente 30-60 minutos
15. Hidratar la pastilla celular con 40  $\mu$ L TE 1x
16. Verificar la integridad y corte monosomal en un gel de agarosa al 1%

### **Anexo 9. Obtención de DNA genómico de *S. cerevisiae***

1. Inocular 10 mL de medio YPD con la cepa a trabajar. Incubar a 30°C toda la noche a 250 rpm
2. Colectar las células por centrifugación a 3,000 rpm por 2-5 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante
3. Resuspender en 1 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada que haya sido estéril y transferir a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL
4. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 s. Eliminar el sobrenadante
5. Adicionar 200  $\mu$ l de una solución de: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8, 1mM Na-EDTA
6. Agregar 300  $\mu$ l de Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
7. Agregar 0.3 g de perlas de vidrio (de ~0.5 mm) a cada muestra
8. Homogeneizar con un mezclador de vórtice a máxima velocidad por 5 min. Adicionar 200  $\mu$ l de amortiguador TE (10mM Tris-HCl 1mM EDTA NA2) pH 8
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL
10. Agregar 400  $\mu$ l de Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL. Repetir pasos 10 y 11
12. Agregar 1 mL de etanol al 100% más 10  $\mu$ l de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión

13. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante con pipeta hasta dejar completamente seco
14. Resuspender la pastilla celular en 400  $\mu$ l de TE más 10  $\mu$ l de RNasa A (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 30 min
15. Agregar 1 mL de etanol al 100% más 10  $\mu$ l de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión
16. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante
17. Lavar con 200  $\mu$ l de etanol al 70% frío y dejar secar la pastilla celular a temperatura ambiente por 30 min (o hasta que esté completamente seco)
18. Resuspender en un volumen adecuado (50-100  $\mu$ l) de H<sub>2</sub>O bidestilada que haya sido estéril
19. Cuantificar y mantener a -20°C

#### **Anexo 10. Extracción de RNA, protocolo Trizol**

1. Colectar las células por centrifugación a 3,000 rpm durante 5 minutos y decantar el sobrenadante
2. Congelar la pastilla celular con nitrógeno líquido y macerarlo en el mortero con nitrógeno líquido
3. Poner en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL 400 mg de pastilla celular aproximadamente. Añadir 1 mL de Trizol
4. Homogeneizar con un mezclador de vórtice durante 15 segundos
5. Incubar en hielo por 5 minutos
6. Centrifugar durante 5 min a 13,500 rpm a 4°C (Esto es para remover el material insoluble: membrana extracelular, polisacáridos y DNA de alto peso molecular). El sobrenadante contiene RNA y proteínas
7. Colectar el sobrenadante y depositarlo en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL frío
8. Añadir al sobrenadante colectado 200  $\mu$ l de cloroformo
9. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C

Se obtendrán tres fases:

**Fase acuosa:** Contiene el RNA

**Interfase:** Contiene el DNA genómico

**Fase orgánica:** Contiene las proteínas

10. Tomar la fase acuosa sin tomar la interfase y colocarla en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL previamente frío
11. Añadir isopropanol 100% a una proporción 1:1
12. Homogeneizar e incubar 10 minutos en hielo
13. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C
14. Desechar el sobrenadante
15. Al precipitado añadir 1 mL de etanol al 75% con agua de DEPC
16. Resuspender la pastilla celular con ayuda de una micropipeta
17. Centrifugar a 13,000 rpm durante 7 minutos a 4°C
18. Colectar el sobrenadante y añadir 500 µl de etanol al 75% con dH<sub>2</sub>O DEPC nuevamente
19. Centrifugar a 13,000 rpm durante 7 minutos a 4°C
20. Colectar el sobrenadante y dejar secar la pastilla celular. Hidratar con 30 µl de dH<sub>2</sub>O DEPC
21. Mantener a -70

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahn JH, Park SH and Kang HS, (1995). Inactivation of the *UAS1* of *STA1* by glucose and *STA10* and identification of two loci, *SNS1* and *MSS1*, involved in *STA10*-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 246(5):529-37.
- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L and González A, (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179 5594–5597.
- Berkey, C. D, V. K. Vyas, and M. Carlson, (2004). Nrg1 and Nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source. *Eukaryot. Cell* 3:311–317.
- Bertram, P. G, Choi, J. H, Carvalho, J, Ai, W, Zeng, C., Chan, T. F, and Zheng, X. F, (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J. Biol. Chem.* 275, 35727–35733.
- Blinder, D, Coschigano, P. W and Magasanik, B, (1996). Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 4734–4736.
- Bone, J.R., and Roth, S.Y, (2001). Recruitment of the yeast Tup1p- Ssn6p repressor is associated with localized decreases in histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 276: 1808\_813.
- Cardenas, M. E, Cutler, N. S, Lorenz, M. C., Di Como, C. J and Heitman, J, (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13, 3271–3279.
- Carvalho, J and Zheng, X. F, (2003). Domains of Gln3p interacting with karyopherins, Ure2p, and the target of rapamycin protein. *J. Biol. Chem.* 278, 16878–16886.
- Chico E, Olavarria J.S, Nuñez de Castro I, (1978). L-Alanine as an end product of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under different hypoxic conditions. *Antonie Leeuwenhoek* 44: 193–201.



- Colón-González, M. (2011). Las aminotransferasas Bat1 y Bat2 de *Saccharomyces cerevisiae* divergieron funcionalmente del ortólogo tipo ancestral K/Bat1 de *Kluyveromyces lactis* (tesis doctoral). Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.
- Connelly C.F, Wakefield J and Akey J.M. (2014). Evolution and genetic architecture of chromatin accessibility and function in yeast. *PLoS Genet.*10(7): e1004427.
- Conrad B, and Antonarakis S.E. (2007). Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8,17-35.
- Cooper, T. (1982) Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Cold Spring Harbor Monograph Archive:39-99.
- Márquez, D. (2015). Divergencia regulatoria en los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* en *Saccharomyces cerevisiae* (tesis de maestría). Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L and González A, (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276: 43775–43783.
- Di Como, C. J. and Arndt, K. T, (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* 10, 1904–1916.
- Dietvorst J and Brandt A, (2010). Histone modifying proteins Gcn5 and Hda1 affect flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* during high-gravity fermentation. *Curr Genet* 56:75–85.
- Dilova I, Chen CY and Powers T, (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, Vol. 12, 389–395.
- Escalera-Fanjul. X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L., and González, A. (2019). Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life. *Trends in genetics*, 32, 42-54.

- García-Campusano F, Anaya VH, Robledo-Arratia L, Quezada H, Hernández H, Riego L and González A, (2009). *ALT1*-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 2009 Apr; 55: 368-74.
- Georis I, Feller A, Vierendeels F, Dubois E, (2009). The Yeast GATA Factor Gat1 occupies a central position in nitrogen catabolite repression-sensitive gene activation. *Mol Cell Biol* 29: 3803-3815.
- Godard, P., *et al.* 2007 Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27:3065-86.
- Grbavec D, Lo R, Liu Y, Greenfield A and Stifani S, (1999). Groucho/transducinlike enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor *SSN6* and mammalian *SSN6*-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms. *Biochem J* 337 (Part 1):13–17.
- Green SR and Johnson AD, (2004). Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15:4191– 4202.
- Hernández H, Aranda C, López G, Riego L and González A, (2011). Hap2-3-5-Gln3 determine transcriptional activation of *GDH1* and *ASN1* under repressive nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 157, 879–889.
- Infante J.J, Glynn L, and Elton Y. (2011). Chromatin remodeling and protocols. *Methods in Molecular Biology* 833, 63-87.
- Jia Y, Rothermel B, Thornton J, Butow R.A. (1997). A basic helix-loop-helix leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17, 1110–1117.
- Kim J.D, Kaiser K, Larive C.K, and Borkovich K.A. (2011). Use of (1) H nuclear magnetic resonance to measure intracellular metabolite levels during growth and asexual sporulation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 10, 820-831.

- Kimura M, and King J.L. (1979). Fixation of a deleterious allele at one of two “duplicate” loci by mutation pressure and random drift. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:2858-2861.
- Komeili A, Wedaman K.P, O’Shea E.K and Powers T, (2000). Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J Cell Biol.* 157:863-78.
- Kondrashov F.A, Rogozin I.B, Wolf YI and Koonin E.V, (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol.*
- Large, P.J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *Yeast* 2, 1-34
- Liu L, Zhong S, Yang R, Hu H and Yu D, (2008). Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in high-five insect cells. *Prot. Exp. Pur.* 60: 225–231.
- Magasanik B, (2005). The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16537-16538.
- Markham N. R, and Zuker M. (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic acids research*, 33, W577-W581.
- Marcet-Houben M., and Gabaldón T. (2015). Beyond the Whole-Genome Duplication: phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker’s yeast lineage. *PLoS Biol.*
- Minehart, P.L., and Magasanik, B, (1991). Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 11: 6216-6228.
- Morales L, Dujon B, (2012). Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*; 76: 721–739.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*, London: George Allen and Unwin Ltd. Berlin: Springer-Verlag.

- Park S.H, Koh S.S, Chun J.H, Hwang H.J and Kang H.S. (1999) Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of *STA1* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19(3):2044-50.
- Peñalosa-Ruiz G, Aranda C, Ongay-Larios L, Colon M, Quezada H, and González A. (2012). Paralogous *ALT1* and *ALT2* retention and diversification have generated catalytically active and inactive aminotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7 (9), e45702.
- Piskur J, (2001). Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* 17:302-3.
- Puria R and Cardenas ME, (2008). Rapamycin bypasses vesicle-mediated signaling events to activate Gln3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Communicative and Integrative Biology* 1:1, 23-25.
- Puria R, Zurita-Martínez S and Cardenas M.E. (2008). Nuclear translocation of Gln3 in response to nutrient signals requires Golgi-to-endosome trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 105;7194-7199.
- Riego L, Avendaño A, DeLuna A, Rodríguez E and González A, (2002). *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 79–85.
- Rodrigues F, Ludovico P, Leão C, (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: Springer Berlin Heidelberg.* pp. 101-121.
- Sekito T, Thornton J, Butow R.A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell* 11, 2103–2115.
- Sherman F. (1998). An introduction to the Genetics and Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*, ppl. 302-325, Vol. 6. Edited by R. A. Meyers, VCH Pub., Weinheim, Germany, 1997.
- Struhl K, and Davis R.W. (1981). Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152,535-552.

- Taylor JS, and Raes J, (2004). Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Rev Genet* 38:615-643.
- Tsankov AM, Thompson DA, Socha A, Regev A and Rando O.J. (2010). The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol.* 8:e1000414.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, and Leunissen J. A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research.* W71-W74.
- Valenzuela L, Ballario P, Aranda C, Filetici A, González A, (1998). Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180:3533-3540.
- Voordeckers K, and Verstrepen K, (2015). Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 28, 1-9.
- Wang MD, Buckley L, Berg CM, (1987). Cloning of genes that suppress an *Escherichia coli* K-12 alanine auxotroph when present in multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 5610–5614.
- Wu J, Noriyuki S, Carlson M and Grunstein M, (2001). *TUP1* Utilizes Histone H3/H2B–Specific *HDA1* Deacetylase to repress gene activity in yeast. *Molecular Cell.*
- Wolfe K and Shields D. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387; 708-713.
- Zhang Z, Varanasi U, Carrico P and Trumbly R.J. (2002). Mutations of the WD repeats that compromise Tup1 repression function maintain structural integrity of the WD domain trypsin-resistant core. *Arch Biochem Biophys* 406:47–54.
- Zuker M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*, 31, 3406-3415.