



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN DE CISTEÍNAS SUSCEPTIBLES A
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES EN UNA
FAMILIA DE PROTEÍNAS DE DEDOS DE ZINC EN
LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*”

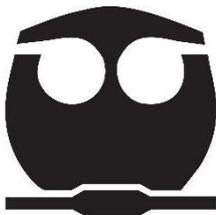
T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

LIGIA ESTELA SANTIAGO RÍOS



DIRECTOR DE TESINA:
Dr. JOSÉ FRANCISCO TORRES QUIROZ

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MUÑOZ CLARES ROSARIO ADELAIDA

VOCAL: Profesor: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA

SECRETARIO: Profesor: TORRES QUIROZ JOSE FRANCISCO

1er. SUPLENTE: Profesor: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO

2° SUPLENTE: Profesor: CUEVAS VELAZQUEZ CESAR LUIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Instituto de Fisiología Celular UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FRANCISCO TORRES QUIROZ
(nombre y firma)


Torres Quiroz José Francisco

SUSTENTANTE (S): LIGIA ESTELA SANTIAGO RÍOS
(nombre (s) y firma (s))


Santiago Ríos Ligia Estela

Índice general

| | |
|---|-----|
| 1. Símbolos y abreviaturas | 11 |
| 2. Resumen | 14 |
| 3. Marco teórico | 15 |
| 3.1 Zinc Fingers (dedos de Zn)..... | 15 |
| 3.2 Factores de transcripción | 24 |
| 3.3 Modificaciones postraduccionales en cisteínas | 25 |
| 3.4 Proteínas de estudio en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 26 |
| 4. Objetivo general | 61 |
| 5. Objetivos particulares | 61 |
| 6. Procedimiento | 61 |
| 6.1 Obtención de las secuencias de proteínas | 62 |
| 6.2 Alineamientos de las proteínas de estudio | 62 |
| 6.3 Obtención de los modelos tridimensionales de las proteínas | 62 |
| 6.4 Visualización y manipulación de los modelos para la identificación de cisteínas de interés..... | 62 |
| 6.5 Cambio de cisteína a serina <i>in silico</i> | 67 |
| 7. Resultados | 68 |
| 7.1 Alineamientos | 68 |
| 7.2 Identificación de cisteínas de interés | 69 |
| 7.3 Resultados del programa IUPred2A (cambio de cisteína a serina) | 77 |
| 8. Discusión | 104 |
| 8.1 Alineamiento de las proteínas..... | 104 |
| 8.2 Predicción de los modelos de las proteínas con AlphaFold..... | 104 |
| 8.3 Identificación de cisteínas de interés | 104 |
| 8.4 Mutaciones puntuales para cambiar cisteína por serina <i>in silico</i> | 105 |
| 9. Conclusión | 107 |
| 10. Bibliografía | 108 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Genes regulados por ACE2 y SWI5, (McBride et al., 1999) | 29 |
| Tabla 2. Cisteínas sensibles al medio oxidante en las proteínas ACE, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1 | 69 |
| Tabla 3. Cisteínas sensibles al medio oxidante en las proteínas ACE, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1 que se encuentran en la superficie.. | 70 |
| Tabla 4. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en ACE2 | 70 |
| Tabla 5. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en AZF1 | 71 |
| Tabla 6. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en COM2 | 71 |
| Tabla 7. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en MET31 | 72 |
| Tabla 8. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en MIG1 | 73 |
| Tabla 9. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en MIG3..... | 73 |
| Tabla 10. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en RIM101 | 74 |
| Tabla 11. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en RPH1 | 75 |
| Tabla 12. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en ZAP1..... | 76 |
| Tabla 13. Cisteínas que son susceptibles a modificaciones postraduccionales | 77 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de dedos de zinc clásicos (Eom Et al., 2016) | 16 |
| Figura 2. Ionización del grupo tiol de la cisteína, modificado de Kluska et al. (2018) | 17 |
| Figura 3. Reactividad según el tipo de enlace de Zn-S, modificado de Kluska et al. (2018)..... | 18 |
| Figura 4. Ejemplo de persulfuración, modificado de Petrovic et al. (2021)..... | 22 |
| Figura 5. Dedos de zinc tipo CCHH, (Kluska et al., 2018)..... | 23 |
| Figura 6. Estructura de dedos de zinc tipo Zn ₂ Cys ₆ (Kluska et al., 2018) | 24 |
| Figura 7. Estructura de la proteína ACE2 (AlphaFold, 2021) | 27 |
| Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína AZF1 (AlphaFold, 2021) | 30 |
| Figura 9. Estructura tridimensional de la proteína COM2 (AlphaFold, 2021) | 34 |
| Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína MET31 (AlphaFold, 2021) | 37 |
| Figura 11. Estructura tridimensional de la proteína MIG1 (AlphaFold, 2021) | 41 |
| Figura 12. Estructura tridimensional de la proteína MIG3 (AlphaFold, 2021) | 43 |
| Figura 13. Estructura tridimensional en la proteína RIM101 (AlphaFold, 2021) | 47 |
| Figura 14. Estructura tridimensional de la proteína RPH1 (AlphaFold, 2021) | 51 |
| Figura 15. Estructura tridimensional de la proteína ZAP1 (AlphaFold, 2021)..... | 54 |
| Figura 16. Resultados de long disorder en ACE2 de IUPred2A | 65 |
| Figura 17. Gráfica de long disorder de ACE2..... | 65 |
| Figura 18. Resultados de Short disorder en IUPred2A de ACE2 | 65 |
| Figura 19. Gráfica de Short disorder en ACE2 | 66 |
| Figura 20. Resultados de Structured Domains de ACE2 en IUPred2A | 66 |
| Figura 21. Gráfica de Structured Domains de ACE2 en IUPred2A | 66 |
| Figura 22. Ejemplo de mediciones con wizard en PyMOL (PyMOL,2021) | 67 |
| Figura 23. Alineamiento de las proteínas ACE2, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1, por medio de la plataforma CLUSTAL OMEGA..... | 68 |
| Figura 24. Alineamiento de las proteínas ACE2, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1, por medio de la plataforma T-COFFEE | 69 |

Índice de gráficas

| | |
|--|----|
| Gráfica 1. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 sin mutar en regiones largas desordenadas..... | 78 |
| Gráfica 2. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 664 por serina en regiones largas desordenadas | 78 |
| Gráfica 3. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 666 por serina en regiones largas desordenadas | 79 |
| Gráfica 4. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 sin mutar en regiones cortas desordenadas..... | 79 |
| Gráfica 5. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 664 por serina en regiones cortas desordenadas | 80 |
| Gráfica 6. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 666 por serina en regiones cortas desordenadas | 80 |
| Gráfica 7. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 sin mutar en dominios estructurados..... | 80 |
| Gráfica 8. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 664 por serina de dominios estructurados | 81 |
| Gráfica 9. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 666 por serina de dominios estructurados | 81 |
| Gráfica 10. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 sin mutar en regiones largas desordenadas | 81 |
| Gráfica 11. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 651 por serina en regiones largas desordenadas | 82 |
| Gráfica 12. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 654 por serina en regiones largas desordenadas | 82 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 13. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 82 |
| Gráfica 14. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 651 por serina en regiones cortas desordenadas | 83 |
| Gráfica 15. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 654 por serina en regiones cortas desordenadas | 83 |
| Gráfica 16. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 sin mutar en dominios estructurados | 83 |
| Gráfica 17. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 651 por serina en dominios estructurados | 84 |
| Gráfica 18. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en AZF1 después de la mutación de la cisteína 654 por serina en dominios estructurados | 84 |
| Gráfica 19. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 sin mutar en regiones largas desordenadas..... | 84 |
| Gráfica 20. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 420 por serina en regiones largas desordenadas | 85 |
| Gráfica 21. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 423 por serina en regiones largas desordenadas | 85 |
| Gráfica 22. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 sin mutar en regiones cortas desordenadas..... | 85 |
| Gráfica 23. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 420 por serina en regiones cortas desordenadas | 86 |
| Gráfica 24. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 423 por serina en regiones cortas desordenadas | 86 |
| Gráfica 25. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 sin mutar en dominios estructurados..... | 86 |

| | |
|---|----|
| Gráfica 26. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 420 por serina en dominios estructurados | 87 |
| Gráfica 27. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en COM2 después de la mutación de la cisteína 423 por serina en dominios estructurados | 87 |
| Gráfica 28. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 sin mutar en regiones largas desordenadas | 88 |
| Gráfica 29. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 125 por serina en regiones largas desordenadas | 88 |
| Gráfica 30. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 128 por serina en regiones largas desordenadas | 88 |
| Gráfica 31. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 89 |
| Gráfica 32. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 125 por serina en regiones cortas desordenadas | 89 |
| Gráfica 33. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 128 por serina en regiones cortas desordenadas | 89 |
| Gráfica 34. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 sin mutar en dominios estructurados | 90 |
| Gráfica 35. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 125 por serina en dominios estructurados | 90 |
| Gráfica 36. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MET31 después de la mutación de la cisteína 128 por serina en dominios estructurados | 90 |
| Gráfica 37. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 sin mutar en regiones largas desordenadas | 91 |

| | |
|--|----|
| Gráfica 38. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 después de la mutación de la cisteína 43 por serina en regiones largas desordenadas | 91 |
| Gráfica 39. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 92 |
| Gráfica 40. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 después de la mutación de la cisteína 43 por serina en regiones cortas desordenadas | 92 |
| Gráfica 41. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 sin mutar en dominios estructurados | 92 |
| Gráfica 42. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG1 después de la mutación de la cisteína 43 por serina en dominios estructurados | 93 |
| Gráfica 43. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 sin mutar en regiones largas desordenadas | 93 |
| Gráfica 44. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 después de la mutación de la cisteína 22 por serina en regiones largas desordenadas | 94 |
| Gráfica 45. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 94 |
| Gráfica 46. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 después de la mutación de la cisteína 22 por serina en regiones cortas desordenadas | 94 |
| Gráfica 47. Puntuación del desorden sensible a redox en los dominios estructurados con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 sin mutar en dominios estructurados | 95 |
| Gráfica 48. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en MIG3 después de la mutación de la cisteína 22 por serina en dominios estructurados | 95 |
| Gráfica 49. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 sin mutar en regiones largas desordenadas | 96 |
| Gráfica 50. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 después de la mutación de la cisteína 189 por serina en regiones largas desordenadas | 96 |

| | |
|--|-----|
| Gráfica 51. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 96 |
| Gráfica 52. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 después de la mutación de la cisteína 189 por serina en regiones cortas desordenadas | 97 |
| Gráfica 53. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 sin mutar en dominios estructurados | 97 |
| Gráfica 54. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 después de la mutación de la cisteína 189 por serina en dominios estructurados | 97 |
| Gráfica 55. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 en regiones largas desordenadas | 98 |
| Gráfica 56. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 después de la mutación de la cisteína 740 por serina en regiones largas desordenadas | 98 |
| Gráfica 57. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 después de la mutación de la cisteína 743 por serina en regiones largas desordenadas | 98 |
| Gráfica 58. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 99 |
| Gráfica 59. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 después de la mutación de la cisteína 740 por serina en regiones cortas desordenadas | 99 |
| Gráfica 60. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RPH1 después de la mutación de la cisteína 743 por serina en regiones cortas desordenadas | 99 |
| Gráfica 61. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en <i>RPH1</i> sin mutar en dominios estructurados | 100 |
| Gráfica 62. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 después de la mutación de la cisteína 740 por serina en dominios estructurados | 100 |
| Gráfica 63. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en RIM101 después de la mutación de la cisteína 743 por serina en dominios estructurados | 100 |

| | |
|--|-----|
| Gráfica 64. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 en regiones largas desordenadas..... | 101 |
| Gráfica 65. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 581 por serina en regiones largas desordenadas | 101 |
| Gráfica 66. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 586 por serina en regiones largas desordenadas | 101 |
| Gráfica 67. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 sin mutar en regiones cortas desordenadas | 102 |
| Gráfica 68. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 581 por serina en regiones cortas desordenadas | 102 |
| Gráfica 69. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 586 por serina en regiones cortas desordenadas | 102 |
| Gráfica 70. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 sin mutar en dominios estructurados | 103 |
| Gráfica 71. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 581 por serina en dominios estructurados | 103 |
| Gráfica 72. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 586 por serina en dominios estructurados | 103 |

1. Símbolos y abreviaturas

Å. Angstrom

A. Adenina

AD. Dominio de activación

Ala. Alanina

Arg. Arginina

Asp. Ácido aspártico

ATP. Adenosín trifosfato

C. Citosina

C-terminal. Grupo carboxilo al final de la proteína

Cys. Cisteína

D. Ácido aspártico

DNA. Ácido desoxirribonucleico

dNTP. Deoxinucleósido trifosfato

F. Fenilalanina

FDM. Furandimetanol

FM. Furanmetanol

G. Glicina

G. Guanina

Glu. Ácido glutámico

H. Histidina

His. Histidina

HMF. 5-hidroximetil-2-furaldehido o furfural

HU. Hidroxiurea

I. Isoleucina

IDR. Regiones Intrínsecamente Desordenadas

IUPRED.

K. Lys

KLF. Krüppel-like Factors, Factores similares a Krüppel

L. Leucina

Lys. Lisina

M. Metionina

mg / L. miligramo por litro

MMS. Metil Metano Sulfonato
MT. Metalotioneína
mtFAS. Ácidos grasos mitocondriales
N. Asparagina
N-terminal. Grupo amino al final de la proteína.
Na⁺. Ion sodio
NADPH. Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato
NPC. Complejos de poros nucleares
ORF. Marco abierto de lectura. Open Reading Frame
P. Prolina
PCR. Polimerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
pH. Menos logaritmo de la concentración de iones H⁺
Phe. Fenilalanina
pKa. Menos logaritmo de la constante de disociación de acidez
PrD. Dominios formadores de priones
PTM. Modificaciones Postraduccionales, Post-translational modifications
Q. Glutamina
R. Arginina
RC. Restricción calórica
ROS. Reactive Oxygen Species, Especies Reactivas de Oxígeno
RNS. Reactive Nitrogen Species, Especies Reactivas de Nitrógeno
RNA. Ácido ribonucleico
S. Serina
Ser. Serina
SNP. Polimorfismo de nucleótido único
SO₂. Dióxido de azufre
SO₃²⁻. Sulfito
T. Timina
T. Treonina
TF. Transcription Factor, Factor de transcripción
Trp. Triptofano
Tyr. Tyr
UAS. Upstream activation secuencias
UV. Ultravioleta

V. Valina
Y. Tirosina
W. Triptofano
WT. Wild type
ZF. Zinc Finger, dedo de zinc
Zn. Zinc
ZnF. Dedo de zinc
ZRE. Elemento palindrómico sensible al zinc
Δ. Mutante

2. Resumen

La presente tesina tiene la finalidad de dar a conocer la investigación *in silico* de nueve proteínas de la familia de dedos de zinc en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales tienen diferentes funciones entre sí. Esta investigación es parte de la línea de investigación “Modificaciones postraduccionales en respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” en el Instituto de Fisiología Celular, en donde previamente se encontró que durante la fermentación se libera H₂S, y éste modifica las proteínas de la glucólisis favoreciendo la producción de etanol. Una de las proteínas bajo estudio en este trabajo es AZF1, el cual es un factor de transcripción con dedos de zinc que regula la expresión de genes cuando la glucosa es la fuente de carbono, hay ocho proteínas similares a ésta (ACE2, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1), por lo que se decidió indagar si alguna de ellas es susceptible a ser modificada en sus residuos de cisteína.

Los dedos de zinc son dominios que se encuentran en regiones de algunas proteínas que están formados por compuestos de coordinación, los cuales se componen de un ion central (Zn²⁺) y los ligandos (grupo tiol de cisteína y nitrógeno del imidazol de histidina). Se sabe que el grupo tiol de la cisteína es de las especies más reactivas de entre todos grupos R laterales de los aminoácidos que conforman las proteínas de los seres vivos y que este puede sufrir modificaciones postraduccionales, por lo que en este estudio se realizaron mutaciones puntuales en cada proteína para cambiar una cisteína por serina y así evaluar en un futuro el efecto de la posible modificación postraduccional. Las proteínas que se investigaron en este trabajo son en su mayoría factores de transcripción (ACE2, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3 y ZAP1), RPH1 es una histona desmetilasa y RIM101 es un represor transcripcional. Los factores de transcripción son proteínas que controlan positiva o negativamente la expresión de los genes y es importante su investigación en diversos ámbitos: industrial, para la producción de algún fármaco; en el sector alimentario la utilización de cepas que produzcan mayor cantidad de etanol o cualquier metabolito de interés.

En este trabajo se describe todo el procedimiento que se realizó para seleccionar las cisteínas que al ser mutadas por serinas evitarían que estos residuos puedan ser susceptibles a modificación postraduccional. Se empleó la base de datos de

Saccharomyces, por sus siglas en inglés SGD (Saccharomyces Genome Database) para obtener la información de cada gen, su secuencia, sus funciones y su regulación. Para realizar los alineamientos de todas las proteínas que se investigaron se emplearon las siguientes plataformas: T-COFFEE, KALIGN, MUSCLE, CLUSTAL OMEGA y MAFFT, se comparó el resultado de cada una y se eligieron las que realizaron un mejor alineamiento. Los modelos tridimensionales de cada proteína se obtuvieron en AlphaFold y se pudieron visualizar y manipular con el programa PyMOL, el cual fue el software principal para localizar las cisteínas de interés. Con ayuda de la plataforma IUPred2A se identificaron regiones de la proteína intrínsecamente desordenadas en las que al estar en un medio oxidante o reductor cambian su conformación, y, por lo tanto, las cisteínas que se localizan en estas zonas.

Se espera que esta investigación teórica se pueda aplicar experimentalmente y se analice la función de cada dedo de zinc mutado para estudiar su efecto en la regulación de los genes que controla. Adicionalmente, el cambio de estabilidad del dedo de zinc CysSerHis2 puede ser evaluado en un futuro.

3. Marco teórico

3.1 Zinc Fingers (dedos de Zn)

3.1.1 Generalidades

Las proteínas de dedo de zinc son metaloproteínas reguladoras de la transcripción y la traducción. La mayoría de las proteínas con dedos de zinc tienen más de un dominio. Un solo dominio generalmente tiene 28-30 aminoácidos involucrados en su función estructural para realizar interacciones específicas de DNA, algunos con RNA, proteínas y lípidos. Estos dominios, en muchos casos, muestran homología de secuencia y similitud estructural en proteínas con dedos de zinc (Eom et al., 2016).

Los dedos de zinc clásicos (Figura 1) representan la familia más grande de proteínas de zinc y desempeñan funciones en los sistemas fisiológicos, desde procariontes hasta eucariotas. Dos residuos de cisteína y dos de histidina (Cys₂His₂) se coordinan con el ion zinc para que las funciones estructurales generen un pliegue $\beta\beta\alpha$, y esta

estructura secundaria admite interacciones específicas con sus socios de unión, incluidos DNA, RNA, lípidos, proteínas y moléculas pequeñas a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. El ion zinc 2^+ es estructuralmente importante para generar la estructura secundaria de dedos de zinc tanto clásicos (Cys2His2) como no clásicos (otras combinaciones de coordinación de zinc excepto Cys2His2), (Eom et al., 2016).

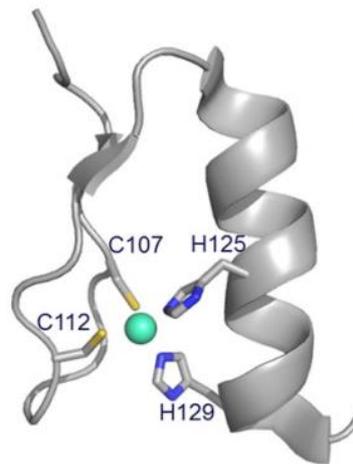


Figura 1. Estructura de dedos de zinc clásicos (Eom Et al., 2016)

La esfera de color cian representa el ion zinc 2^+ .

Hay regiones enlazadoras entre cada dedo de zinc que suelen mostrar patrones repetidos en eucariotas. Estas regiones enlazadoras tienen una secuencia TGE (Q) KP que genera bucles entre cada dominio. Los residuos aromáticos e hidrófobos son cruciales para el plegado de los dedos de zinc, y los residuos polares e hidrófilos son cruciales para el plegado para la generación de interacciones específicas a través de la hélice α (Elrod-Erickson et al., 1996; Knapska y Kaczmarek, 2004).

Actualmente, existen más de 10 clases conocidas de ZF, con diversas arquitecturas, modos de unión de metales, funciones y reactividad. Entre ellas se encuentran la familia de dedos de zinc $\beta\beta\alpha$, dedos de zinc tipo TAZ, Gag knuckle, cintas de zinc (zinc ribbons), dedos de zinc tipo CCCH, tipo CCHHC, clave de sol, (treble clef), dominios RING, LIM, FYVE, PDH, B-Box, HIT, dedos de zinc tipo Zn2Cys6, entre otras.

2.1.2 Reactividad

2.1.2.1 Cisteína

Entre los 20 aminoácidos que forman las proteínas, la cisteína (Cys) se considera comúnmente como el más reactivo química y funcionalmente. Además, es el residuo de unión de Zn (II) más conservado entre todas las clases de dedos de zinc. Estas propiedades de Cys se deben a la presencia de un grupo funcional tiol (R – SH) que es ionizable (Figura 2), (Kluska et al., 2018).

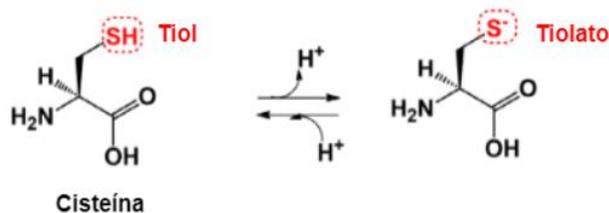


Figura 2. Ionización del grupo tiol de la cisteína, modificado de Kluska et al. (2018)

El átomo de azufre tiene seis electrones de valencia y un orbital 3d sin llenar, por lo que pueden existir los estados de oxidación de 2⁻ a 6⁺. El cisteinil tiol tiene un átomo de azufre en el estado de oxidación más bajo posible (2⁻), pero no influye en la reactividad y función biológica. Los tioles reaccionan con muchos oxidantes, lo que en consecuencia da como resultado la formación de varios estados oxidados del átomo de azufre. Algunas de las reacciones de oxidación de Cys son reversibles en condiciones celulares, mientras que otras no lo son. El estado oxidado más conocido de la cisteína es la cistina, presente en todas las proteínas con enlaces disulfuro (–S – S–), que es un factor estructural crítico para la formación de estructuras terciarias e incluso cuaternarias, así como la estabilidad química y térmica. Debido a la facilidad para aceptar y donar electrones, el cisteinil azufre facilita muchas reacciones redox que ocurren en las células. Los tioles experimentan un intercambio de tiol al tiolato con mayor carga nucleofílica, que es capaz de atacar a los electrófilos y oxidantes (Kluska et al., 2018).

La reactividad de los cisteiniltioles está relacionada principalmente con la fuerza del carácter nucleofílico del azufre. La entidad de azufre-metal, que forma parte de las

metaloproteínas, muestra una reactividad significativamente diferente en comparación con el tiol libre. La diferencia de reactividad entre el tiol unido a proteínas y el tiol libre se debe a su menor o mayor exposición al disolvente y al carácter covalente del enlace de coordinación que está relacionado con la tendencia a la polarización del ión metálico y el ligando. Comúnmente, la reactividad de los núcleos de zinc en las proteínas está asociada con el carácter químico del enlace Zn-S, que puede ser más electrostático o más covalente. En el caso de una interacción electrostática, los electrones de azufre están mucho más cerca de los núcleos aumentando la carga negativa en el átomo de azufre y, en consecuencia, mejoran el carácter nucleófilo de tiolato (Figura 3). En caso de una interacción covalente, los electrones de azufre se alejan de su núcleo, pero se acercan al ion Zn (II). Por lo tanto, el azufre retira parcialmente la carga positiva del ión metálico, lo que da como resultado una disminución del carácter nucleofílico del tiolato y su reactividad. Los dedos de zinc CCHH funcionan principalmente como dominios de reconocimiento estructural y están altamente protegidas contra la oxidación y otras modificaciones que ocurren en los residuos de Cys. Los núcleos de zinc con menor afinidad, típicamente Zn (Cys) 4, son mucho más propensos a la oxidación y otras modificaciones relacionadas con Cys (Kluska et al., 2018).

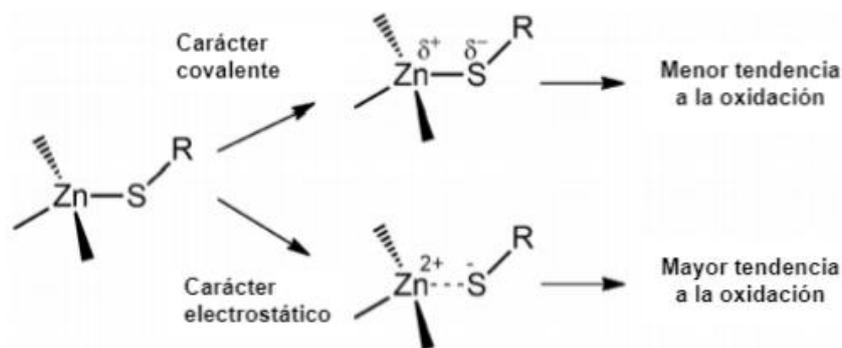


Figura 3. Reactividad según el tipo de enlace de Zn-S, modificado de Kluska et al. (2018)

2.1.2.2 Efecto del pH en los dedos de zinc

En los dedos de zinc, la unión de Zn (II) suele producirse por su coordinación con el cisteinil azufre y el nitrógeno imidazol de la histidina. Por lo general, la unión de Zn (II)

a las proteínas se produce mediante la desprotonización de tiol de Cys. El grupo tiol en los péptidos que se unen al zinc es bastante básico y en la mayoría de los sitios estructurales su valor de pKa varía de 8 a 9 (Nelson, 1994). Por otro lado, las especies protonadas de imidazol tienen un valor de pKa de 6-6,5 y, como resultado, el pH fisiológico se desprotona a imidazol neutro que se une además al Zn (II) sin desprotonación adicional. Por lo tanto, está claro que la afinidad de Zn (II) por los motivos de dedos de zinc depende en gran medida de la acidez del residuo de Cys de unión y su orientación espacial. Se ha demostrado que la ionización del tiol puede ser promovida por grupos vecinos cargados positivamente debido al efecto de inducción, que en consecuencia da como resultado una disminución del valor de pKa del grupo tiol. Por el contrario, la presencia de grupos cargados negativamente cerca del tiol provoca un aumento de su valor de pKa. En muchos dedos de zinc, las propiedades ácido-base de los residuos de Cys son significativamente diferentes entre sí (Kluska et al., 2018).

2.1.2.3 Oxidación y nitrosilación

Se sabe comúnmente que el ion Zn (II) en los ZF reduce el potencial de oxidación del tiol, pero cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies de nitrógeno (RNS) reaccionan con los dominios ZF, el ion Zn (II) se libera de la esfera de coordinación, lo que resulta en la pérdida de la función ZF, que se puede restaurar en condiciones reductoras. Sin embargo, la exposición constante a ROS / RNS conduce a una disfunción fisiológica (Kluska et al., 2018).

Las (ROS) y (RNS) se producen debido a un estilo de vida aeróbico para mantener la homeostasis y regular las vías de señalización fisiológica. Su control adecuado tiene un impacto significativo en la salud y las enfermedades. El desequilibrio entre ROS / RNS y sus eliminadores (antioxidantes), llamado estrés oxidativo, se debe a la sobreproducción de ROS / RNS y tiene un impacto importante en el desarrollo de diversos trastornos, por ejemplo, cáncer, inflamación, diabetes y muchos otros. Debido a la naturaleza altamente reactiva de ROS / RNS, pueden formar especies radicales y no radicales que son capaces de reaccionar con el DNA y las proteínas para inducir mutagénesis o influenciar el plegamiento, respectivamente. Por lo tanto,

ROS / RNS puede tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre la fisiología del organismo vivo (Kluska et al., 2018).

En las proteínas blanco, los residuos de Cys pueden oxidarse a diversos productos a través de un mecanismo de oxidación reversible o irreversible (Dickinson, 2011). Esta diversidad está relacionada con el tipo de oxidante involucrado en la reacción. Por lo tanto, la reacción del radical del tiol (RS, tiilo) con residuos de Cys (mecanismo de un electrón) da un anión radical disulfuro que pierde un electrón para formar disulfuro. Se sabe que el peróxido de hidrógeno realiza una oxidación de dos electrones a ácido sulfénico, que puede reaccionar además con otro cisteinil tiol para formar disulfuro. Sin embargo, en ausencia del grupo tiol, el ácido sulfénico puede oxidarse irreversiblemente a especies de ácido sulfínico y sulfónico (Kluska et al., 2018).

Se investigó la reactividad de las ZF artificiales con el H_2O_2 . Se encontró que en todos los motivos de ZF se oxidan en su mayoría cisteinil sulfuros, disminuyendo la afinidad del ion Zn (II) y desestabilizando el complejo. La oxidación con H_2O_2 a pH 7,0 conduce a la formación de bis-disulfuro como producto principal, mientras que a pH superior a 7,5 se forman otros productos (sulfonatos, sulfinatos) (Kluska et al., 2018).

También se conoce sobre la reactividad hacia el O_2 . En comparación con el H_2O_2 , durante la oxidación con dedos de zinc con O_2 , solo el 10% de los productos formados son disulfuros, mientras que los sulfinatos comprenden el 90% de todos los productos de oxidación (Kluska et al., 2018).

El ion Zn (II) aumenta la reactividad de la cisteína hacia HClO, que contrasta con la oxidación de H_2O_2 o O_2 , donde los iones Zn (II) en realidad disminuyen la actividad de la cisteína hacia estos oxidantes (Kluska et al., 2018).

En las células de mamíferos, el óxido nítrico (NO) se sintetiza bajo demanda de una manera estrictamente regulada por la NO sintasa endotelial y neuronal. Durante la activación de las citocinas inflamatorias, se induce y prolonga la síntesis de NO; por tanto, el número acumulado de especies de NO puede reaccionar para producir especies más reactivas como el óxido nítrico, el dióxido de nitrógeno, el nitrito y el ácido nitroso. El NO también puede reaccionar con el anión superóxido, produciendo

el oxidante fuerte peroxinitrito que induce la destrucción de los dominios ZF. La concentración de NO está íntimamente relacionada con su comportamiento, por lo que puede actuar como molécula señal o cuando se sobreproduce puede inducir estrés nitrosativo. Bajo estrés nitrosativo, se ha demostrado que el RNS reacciona con los tioles, produciendo S-nitrosotioles para regular la respuesta al estrés celular. Aunque los cisteiniltioles de los sitios ZF son lábiles y propensos a la S-nitrosilación, lo que da como resultado la disociación de Zn (II), el cambio conformacional y la pérdida de la capacidad de unión al DNA, se ha demostrado que su S-nitrosilación, de manera similar a algunos productos de oxidación, es reversible (Kluska et al., 2018).

S-nitrosoglutación (GSNO), que se forma espontáneamente durante la transnitrosilación del glutati6n (GSH) con el grupo NO, causa efectos irreversibles de estrés nitrosativo cuando su nivel se excede en gran medida (Kluska et al., 2018).

2.1.2.4 Reactividad del H₂S con cisteínas

La reactividad del H₂S en los sistemas biol6gicos se puede dividir en tres grupos: (i) reacci6n con/eliminaci6n de especies reactivas de ox6geno y nitr6geno reactivo (ROS y RNS); (ii) uni6n y/o reacciones redox posteriores con centros metálicos; y (iii) reacci6n con prote6nas, denominada aqu6 persulfidaci6n (alternativamente, S-sulfhidrataci6n) (Petrovic et al., 2021).

La persulfidaci6n de prote6nas se reconoce cada vez más como el principal mecanismo por el cual el H₂S controla las funciones celulares. El grupo persulfuro (-SSH) es un tipo de disulfuro asimétrico que contiene dos átomos de azufre con diferentes propiedades (Figura 4). Su azufre interior se considera un azufre sulfano con un estado de oxidaci6n de 0, que tiene una naturaleza ligeramente electrof6lica (por lo tanto, susceptible al ataque nucleof6lico). Sin embargo, su azufre exterior tiene un estado de oxidaci6n de -1, lo que lo hace nucle6filo (por lo tanto, puede reaccionar con electr6filos) (Petrovic et al., 2021).

Un concepto err6neo com6n es que los persulfuros se forman a trav6s de una reacci6n directa de H₂S y un tiolato de ciste6na. Sin embargo, esta reacci6n es termodinámicamente desfavorable. Los principales mecanismos por los cuales los

persulfuros se forman de forma no enzimática son a través de reacciones de H₂S con cisteínas oxidadas, como P-SOH, disulfuros, o en reacciones de residuos de cisteína con radicales sulfuro, polisulfuros y otros persulfuros (la llamada transpersulfidación). Además, las metaloproteínas con hierro o zinc en el sitio activo podrían servir como catalizadores para la formación de persulfuro (Petrovic et al., 2021).

Se considera que la persulfidación es una modificación reversible y, dada la creciente evidencia de su destacado papel de señalización, su eliminación endógena es esencial. Dos estudios paralelos demostraron que el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa reduce eficientemente los persulfuros restaurando el residuo de cisteína (Petrovic et al., 2021).

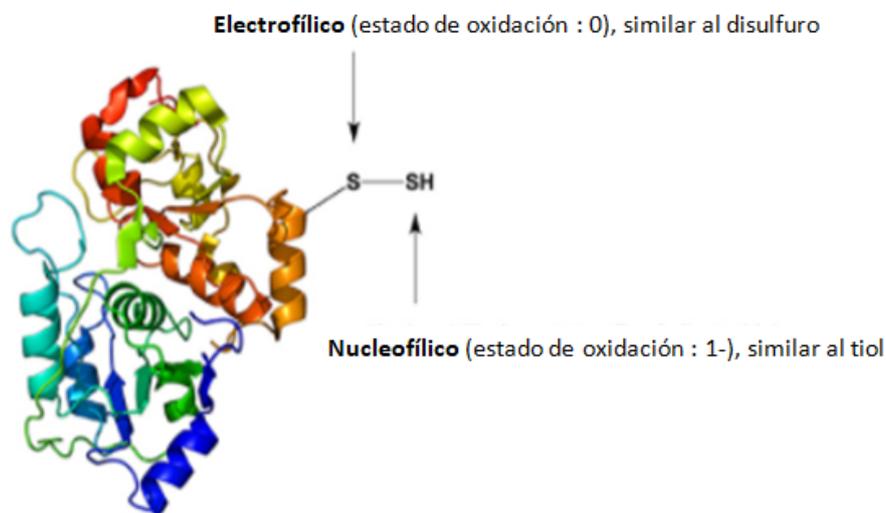


Figura 4. Ejemplo de persulfuración, modificado de Petrovic et al. (2021)

2.1.3 Clasificación de los dedos de zinc bajo estudio

2.1.3.1 Familia de dedos de zinc $\beta\beta\alpha$

La familia $\beta\beta\alpha$ ZF es el grupo más grande de todas las proteínas que contienen ZF presentes en eucariotas. El motivo CCHH que se presenta comúnmente dentro de la familia $\beta\beta\alpha$ ZF con el patrón de consenso (Y / F) -XC-X_{2,4}-C-X₃-XL-X₂-H-X_{3,4}-H generalmente consta de 28-30 aminoácidos secuencia con unión de metal conservada (Cys, His), núcleo hidrófobo (Tyr, Phe, Leu) y residuos variables (X). Sin

embargo, son posibles otras combinaciones de Cys e His como ligandos (Figura 5), (Kluska et al., 2018).

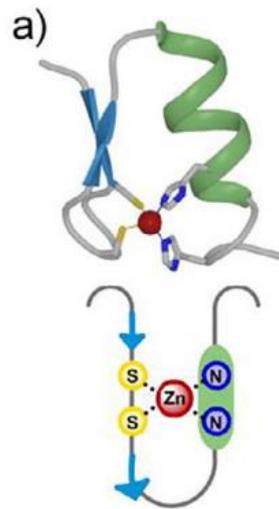


Figura 5. Dedos de zinc tipo CCHH, (Kluska et al., 2018)

2.1.3.2 Dedos de zinc tipo Zn₂Cys₆

El tipo Zn₂Cys₆ de dedos de zinc es un sitio de unión a la proteína de zinc estructuralmente único que en general se divide en dos grupos: reguladores transcripcionales (por ejemplo, proteína GAL4) con dos dedos de zinc y factores de transcripción sensibles al cobre con un dedo de zinc. Los estudios estructurales en la proteína GAL4 mostraron que el dominio de unión al DNA en esta proteína consiste en un motivo en el que seis residuos de Cys se encuentran en las dos hebras helicoidales extendidas conectadas por un bucle largo (Figura 6). Los iones metálicos están coordinados con seis residuos de Cys, donde dos de ellos forman ligandos puente entre dos iones metálicos, lo que sugiere la formación de un grupo binuclear estable (Kluska et al., 2018).

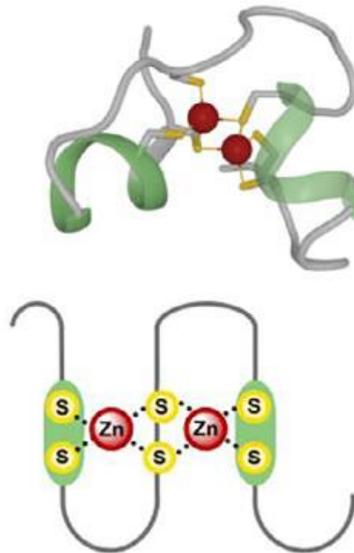


Figura 6. Estructura de dedos de zinc tipo Zn₂Cys₆ (Kluska et al., 2018)

3.2 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas de unión al DNA que controlan la expresión génica (Strachan, 2019). Cada una de estas proteínas se une a una secuencia dentro del promotor para facilitar la alineación adecuada de la RNA polimerasa en la hebra molde del DNA. Muchas de estas proteínas parecen tener al menos dos dominios químicos importantes: un dominio de unión al DNA y un dominio de activación transcripcional. Estos dominios pueden ocupar partes separadas de la molécula o pueden solaparse (Snustad, 2015). Un factor de transcripción que se ha unido a un potenciador puede entrar en contacto con una o más proteínas en otros potenciadores, o puede interactuar directamente con proteínas que se han unido en la región promotora. A través de estos contactos e interacciones, el dominio de activación transcripcional del factor puede entonces inducir cambios conformacionales en las proteínas ensambladas, allanando el camino para que la RNA polimerasa inicie la transcripción (Strachan, 2019).

La expresión génica está controlada principalmente por el factor de transcripción y un fragmento de DNA corto específico en el promotor o potenciador. Estos fragmentos cortos de DNA se denominan sitios de unión de factores de transcripción donde

ocurren ciertas reacciones químicas para controlar la expresión génica (Strachan, 2019).

El sitio de unión del factor de transcripción (TFBS) está compuesto por un tramo corto de nucleótidos, que es el elemento regulador de una manera específica de secuencia. Generalmente, cuando un factor de transcripción particular se une a un sitio de unión del factor de transcripción específico, el proceso de transcripción es iniciado. Si hay otros factores de transcripción en competencia involucrados en apropiarse del sitio de unión del factor de transcripción, el proceso de transcripción se verá afectado. Por tanto, el reconocimiento de los sitios de unión del factor de transcripción es de gran importancia para la expresión génica (Strachan, 2019).

3.3 Modificaciones postraduccionales en cisteínas

La cisteína (Cys) es un objetivo importante para las modificaciones postraduccionales redox (PTM) que se producen en respuesta a cambios en el entorno redox celular (Rookyard et al., 2021).

Debido a la alta reactividad, la cisteína podría ser el residuo nucleofílico que ataca al sustrato. Su cadena lateral tiol también podría reaccionar entre sí y formar un enlace disulfuro que estabilice las estructuras tridimensionales, cambiando el estado redox y quelando los iones metálicos en algunas metaloproteínas. Además, los diferentes tipos de PTM a menudo ocurren en la cisteína, que se pueden dividir en tres tipos principales según la diferencia de moléculas precursoras: PTM de oxidación (S-nitrosilación, S-sulfenilación, S-glutationilación, persulfuración, puentes disulfuro S-sulfenilación y S-sulfonilación), PTM de lípidos (S-palmitoilación y S-prenilación) y PTM de metabolitos (S-carbonilación, S-itaconación, S-succinación y S-AcoAlación) según Meng y Li (2021).

Las PTM de la cisteína (Cys) cumplen muchas funciones en la estructura terciaria de la proteína y la señalización redox. Algunas PTM de Cys son estables (por ejemplo, disulfuros), mientras que otras son transitorias y están influenciadas por el estado redox de la célula. Las PTM de Cys no son catalizadas por enzimas específicas y ocurren por reacción directa de tioles con especies reactivas de oxígeno (ROS), nitrógeno, cloro y especies electrofílicas, metales y otros tioles (Rookyard et al., 2021).

Las PTM de Cys oxidantes que pueden reducirse se consideran "reversibles" e incluyen S-nitrosilación (SNO), S-glutación (SSG), S-acilación, S-cisteinilación, S-sulfhidratación y S-sulfenilación (Cys-SOH), así como disulfuros intra e intermoleculares. Aquellas PTM sin medios conocidos de reducción (ácido Cys-sulfínico y sulfónico; Cys-SO₂H / SO₃H) se consideran "irreversibles", se asocian con "daño" oxidativo y se consideran marcadores de disfunción y degradación de las proteínas. Existe una única excepción; reducción enzimática de peroxiredoxinas sulfeniladas (Prx I-IV) a su forma activa por sulfiredoxina (Rookyard et al., 2021).

Algunas proteínas, en particular las proteínas de membrana se modifican mediante la adición de grupos acilo graso o prenilo. Los grupos agregados normalmente sirven como anclajes de membrana y las secuencias de aminoácidos hidrófobos aseguran una proteína recién sintetizada dentro de una membrana plasmática o del retículo endoplásmico (Strachan, 2019).

Las modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación, acetilación, metilación o nitrosilación afectan con frecuencia a la función de las ZF a través de cambios en la estructura y dinámica de las proteínas (Kluska et al., 2018).

La reactividad de los ZF con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o agentes de metilación influye en la estructura del ZF, provocando una modificación reversible o irreversible del azufre del cisteinilo, que en consecuencia disminuye la afinidad del Zn (II) al péptido y la disociación de iones metálicos y, por lo tanto, la pérdida de la Función ZF. Por el contrario, la fosforilación y la acetilación, que ocurren en las serinas, no afectan los sitios de coordinación de las ZF, sino que tienen la oportunidad de controlar el mecanismo de regulación de la transcripción. Estas modificaciones postraduccionales tienen lugar dentro de las regiones enlazadoras ZF conservadas (Kluska et al., 2018).

3.4 Proteínas de estudio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las proteínas que se abordaron en la presente tesina (*ACE2*, *AZF1*, *COM2*, *MET31*, *MIG1*, *MIG3*, *RIM101*, *RPH1* y *ZAP1*) son factores de transcripción, además *RPH1* es histona desmetilasa.

3.4.1 ACE2

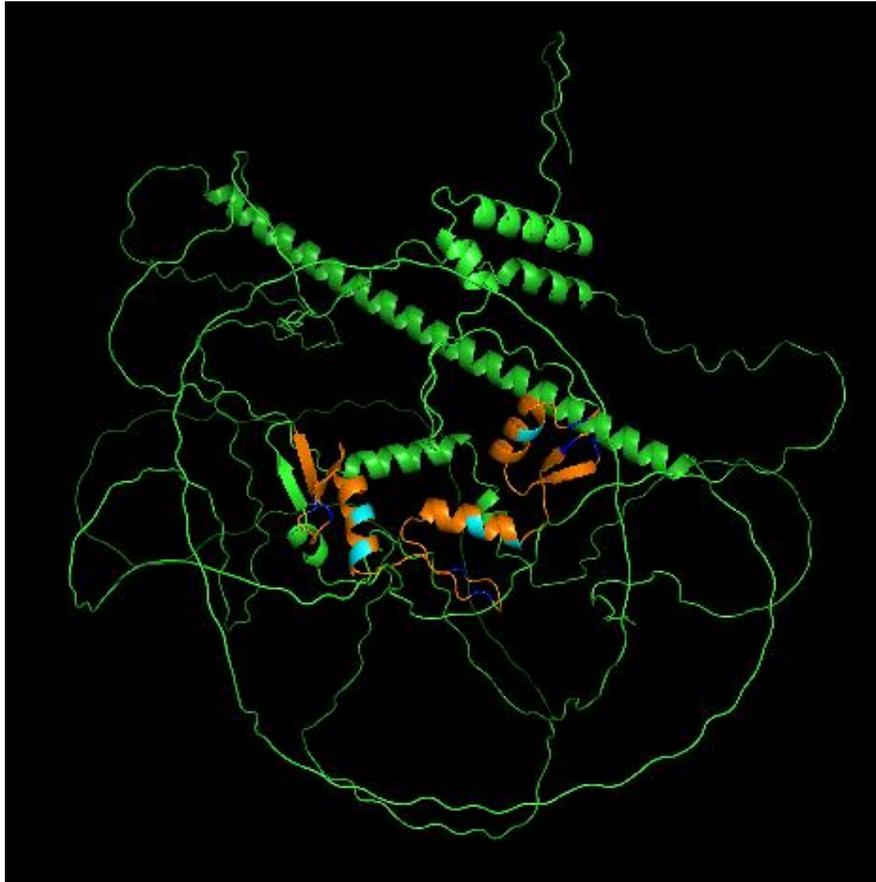


Figura 7. Estructura de la proteína *ACE2* (AlphaFold, 2021)

La Figura 7 muestra la estructura de la proteína *ACE2*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.1.1 Modificaciones postraduccionales

Se han encontrado fosforilaciones en las serinas 80, 113, 122, 137, 140, 242, 247, 249, 253, 292, 296, 303, 305, 317, 372, 385, 390, 392, 402, 428, 436, 473, 482, 483, 491, 511, 537, 557, 562, 564, 701, 705, 709, 714 y 764, en las treoninas 135, 161,

245, 259, 384, 422, 486, 501, 531, 563, 700 y 713 (*Saccharomyces* Genome Database, 2021).

3.4.1.2 Funciones y regulación de *ACE2*

Los genes de metalotioneína (MT) codifican pequeñas proteínas de unión a metales ricas en Cys que sirven tanto para mantener los niveles intracelulares de metales (Weser et al. 1973; Churchich et al., 1989) como para proteger las células contra la toxicidad por metales pesados (Hamer, 1986; Butt y Ecker, 1987). Los invertebrados y los mamíferos contienen múltiples genes MT y la transcripción aumenta enormemente en respuesta a metales pesados como cadmio, zinc y cobre (Hamer, 1986; Harlow et al. 1989).

La proteína MT en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está codificada por el gen *CUP1* (Fogel y Welch, 1982; Butt et al., 1984). *ACE2*, actúa como un supresor específico de alto número de copias del fenotipo sensible al cobre de una delección *ace1* aumentando los niveles basales de mRNA de *CUP1*. El gen *ACE2* puede desempeñar un papel en la activación de la expresión de nivel basal de *CUP1*. *ACE2*, que cuando está presente en múltiples copias en una cepa con delección *ace1* permite el crecimiento en un medio que contiene niveles significativos de sulfato de cobre exógeno. La eliminación del dominio C-terminal del marco de lectura abierto de *ACE2*, incluida la región del dedo de zinc, da como resultado una disminución en los niveles de estado estacionario de mRNA de *CUP1* (Butler y Thiele, 1991).

ACE2 es un activador transcripcional del gen *CTS1* (que codifica quitinasa, la cual es necesaria para la separación de las células madre e hija durante el crecimiento mitótico). Las células con una mutación *ace2* tienen defectos en la separación celular. La interrupción de *ACE2* permite la producción de pseudohifas en algunos antecedentes genéticos (King y Butler, 1998).

La alteración de los niveles de fosforilación es un mecanismo común para regular el transporte de diversas proteínas al núcleo (Jans et al., 1995; Vandromme et al., 1996). En muchos casos, la fosforilación se asocia con el transporte al núcleo (Mosialos et al., 1991; Rihs et al., 1991; Vancurova et al., 1995). La entrada regulada por el ciclo celular de Ace2p en el núcleo está asociada con la desfosforilación de una treonina y

dos residuos de serina. La proteína está asociada con la cinasa Cdc28 *in vivo*, lo que sugiere que esta puede ser la cinasa responsable del evento de fosforilación (O'Conallain et al., (1999).

ACE2 regula los genes que se indican en la Tabla 1. ACE2 es necesaria para la expresión máxima de *RME1*, que codifica un regulador negativo de la meiosis (Toone et al., 1995), *ASH1* necesaria para la expresión específica de células madre de *HO* (Bobola et al. 1996), el inhibidor de ciclina cinasa Sic1 (Knapp et al., 1996; Toyn et al., 1997) y la transcripción temprana de *EGT2* (Kovacech et al., 1996).

Tabla 1. Genes regulados por ACE2 (McBride et al., 1999)

| Gen | Función |
|-------------|---|
| <i>ASH1</i> | Represor específico hijo de la expresión de <i>HO</i> |
| <i>CDC6</i> | Iniciador de la replicación del DNA |
| <i>EGT2</i> | Requerido para la separación celular |
| <i>PCL2</i> | Socio para la cinasa dependiente de ciclina Pho85 |
| <i>PCL9</i> | Socio para la cinasa dependiente de ciclina Pho85 |
| <i>RME1</i> | Represor de la meiosis; activador de la transcripción <i>CLN2</i> |
| <i>SIC1</i> | Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina Cdc28 |

Los mutantes de delección para *ACE2* muestran rendimientos de etanol incrementados. La sobreexpresión de *ACE2* en células de tipo silvestre redujo sus rendimientos de etanol. Por lo tanto, Ace2 es un regulador negativo del rendimiento de etanol durante la fermentación estática de las células de levadura, y tanto *CTS1* como *RPS4a* son los principales efectores que median estos dos factores de transcripción en la regulación de la producción de etanol (Wu et al., 2016).

3.4.2 AZF1

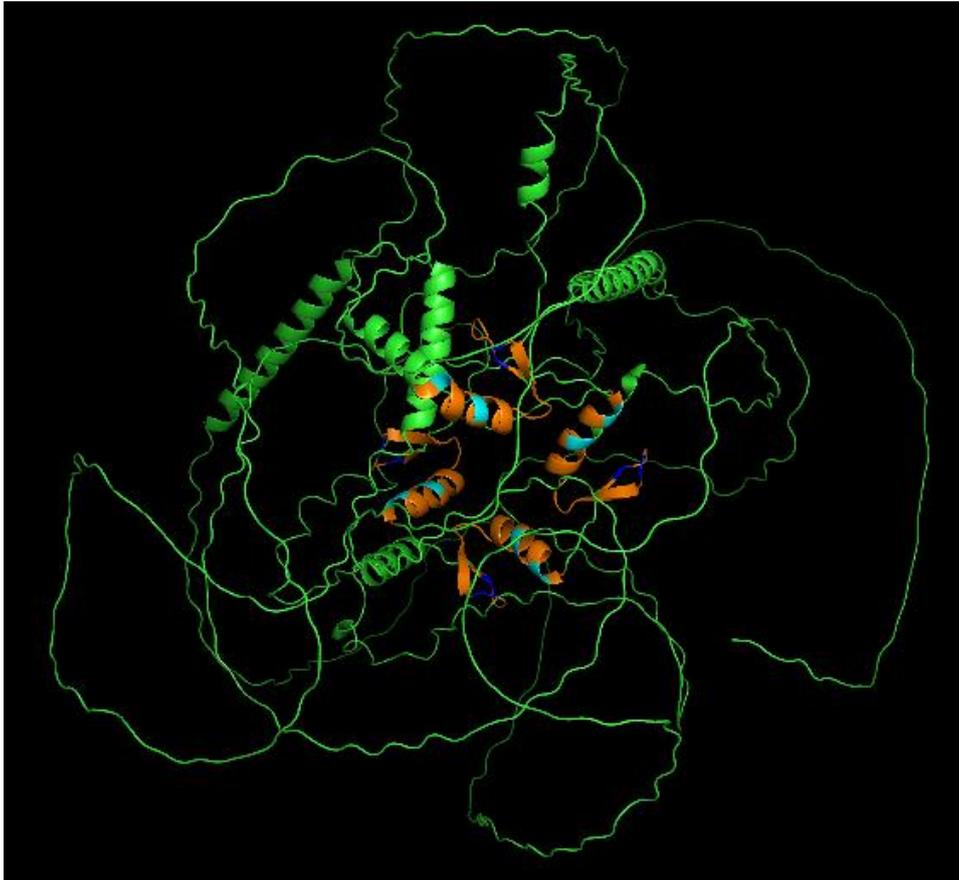


Figura 8. Estructura tridimensional de la proteína *AZF1* (AlphaFold, 2021)

La Figura 8 muestra la estructura de la proteína *AZF1*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.2.3 Modificaciones postraduccionales

No se señalan modificaciones postraduccionales en los aminoácidos de la proteína en la literatura.

3.4.2.5 Funciones y regulación de *AZF1*

Azf1p es un factor de transcripción de levadura formadora de priones que contiene dos dominios de homorrepetición, un dominio de poliglutamina y uno de poliasparagina. Las repeticiones enriquecidas en un solo aminoácido se consideran homorrepetidas. Los priones son proteínas que tienen múltiples conformaciones, al menos una de las cuales es autorreplicativa y epigenéticamente hereditaria. Los dominios formadores de priones (PrD) se caracterizan por secuencias de aminoácidos de baja complejidad que a menudo son ricas en N (Asn) y Q (Gln) e intrínsecamente desordenadas en su estado nativo. Existe una creciente evidencia de que los priones de levadura actúan como estrategias de adaptación, especialmente durante el estrés ambiental.

Azf1p tiene un conjunto de genes blanco en gran parte que no se superponen durante el crecimiento en fuentes de carbono fermentables y no fermentables, y se ha demostrado que el mutante nulo tiene un defecto de crecimiento severo en el glicerol. *AZF1* también es importante para la integridad de la pared celular. El confórmero priónico, designado [*AZF1* +], confiere resistencia al fármaco radicicol en una forma de ganancia de función, pero disminuye la expresión de los genes blanco de Azf1p. Azf1p contiene un dominio polyN y polyQ. El dominio polyN de Azf1p juega un papel sutil en la transcripción, pero no es necesario para la localización de Azf1p o la formación de priones (Stewart et al., 2021).

Se ha informado anteriormente que Azf1p es un activador transcripcional que es importante para el crecimiento de glicerol y otras fuentes de carbono no fermentables. La delección del dominio polyN acorta moderadamente la fase de retraso en la glucosa (Stewart et al., 2021). La delección del dominio polyN afecta la expresión génica tanto en glucosa como en glicerol, lo que sugiere que este dominio está involucrado en la actividad TF de Azf1p.

Durante el crecimiento en ambas fuentes de carbono, más genes se regulan al alza que se regulan a la baja tras la delección del dominio polyN. Este resultado es consistente con la hipótesis de que el dominio polyN juega un papel en la función represiva de Azf1p. La eliminación del dominio polyN no parece afectar a la localización de Azf1p. Es consistente con el resultado de que la eliminación del dominio polyN afecta la expresión de sólo un subconjunto de los genes blanco de Azf1p, ya que la

localización alterada probablemente afectaría a todos los objetivos de Azf1p. En cambio, el dominio polyN puede actuar como un dominio de unión con cofactores transcripcionales. Los diferentes genes diana tienen diferentes combinaciones de reguladores transcripcionales. El dominio polyN puede ser importante para unirse con solo un subconjunto de los cofactores de Azf1p, lo que hace que la delección de este dominio afecte la expresión de sólo un subconjunto de los genes diana de Azf1p (Stewart et al., 2021).

Azf1 sensible al azúcar y Mga2 sensible al oxígeno, juegan papeles importantes, pero sutiles, en la mediación de la fermentación anaeróbica de xilosa en la cepa Y128. Hay sitios de unión en tándem de Azf1, un factor de transcripción (TF) que responde a azúcares no preferidos. Más de la mitad (68) de los 128 genes inducidos progresivamente albergaban motivos Azf1 río arriba, incluidos casi todos los genes hipóxicos clásicos. De hecho, la sobreexpresión de *AZF1* aumentó las tasas de crecimiento, el consumo de xilosa y la producción de etanol en la cepa Y128, pero solo cuando las células se cultivaron en xilosa y de forma anaeróbica. Por el contrario, la delección de *AZF1* disminuyó el crecimiento y la fermentación del azúcar, en crecimiento de xilosa anaeróbica (Myers et al., 2019).

Azf1 puede unirse a los segmentos 5 y 6 del promotor *FLO11*. Azf1 es un activador de la expresión de *FLO11* que funciona, al menos en parte, al unirse al segmento 6. Azf1 se localiza en el promotor *FLO11* y es necesario para la expresión adecuada de *FLO11* cuando las células se exponen a medios frescos que contienen glucosa (Mirzaei et al., 2013).

La expresión de Azf1p aumentaba en condiciones de crecimiento no fermentables (Stein et al., 1998; Zampar et al., 2013). En presencia de glucosa, Azf1p activa la transcripción de genes implicados en el crecimiento y metabolismo del carbono, como *VID24*, *TKL2*, *HOR2* y *SIP4*, y se sabe que se une a las regiones promotoras de *CLN3* y *FLO11* para regular positivamente su transcripción. Durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, Azf1p regula positivamente la transcripción de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, como *ECM33*, *GAS1* y *SRL1*. Mientras que la unión de Azf1 al promotor *FLO11* fue

detectada en condiciones postdiaúxicas, *AZF1* no fue necesaria para la expresión de *FLO11* en estas condiciones (Mirzaei et al., 2013).

Azf1p está localizado en el nucleoplasma. Tiene al menos cuatro dedos de zinc que se predice que se unirán al DNA (Böhm et al., 1997). Por tanto, Azf1p es probablemente un factor de transcripción nuclear que regula la expresión de otros genes en el núcleo (Stein et al., 1998).

Los niveles más altos de transcripción de *AZF1* se encuentran en las células cuando se cultivan con glicerol o ácido oleico como única fuente de carbono. Una fuente de carbono no fermentable sola no es suficiente para la inducción de altos niveles de transcripción para *AZF1*, como lo indica el bajo nivel de transcripción en medio de etanol. Las malas condiciones nutricionales o las fuentes de carbono no fermentables inducen la expresión de Azf1p. Se suprime a niveles basales muy bajos en medios completos ricos en glucosa (Stein et al., 1998).

Las células que carecen de *AZF1* son incapaces de transcribir eficazmente varios genes implicados en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Slattery et al., 2006).

La restricción calórica (RC) es la intervención mejor estudiada conocida por retrasar el envejecimiento y extender la vida útil en organismos evolutivamente distantes que van desde levaduras hasta mamíferos en el laboratorio. Se descubrieron los principales reguladores río arriba de esos genes significativamente modificados, incluidos *AZF1* (*YOR113W*), *HSF1* (*YGL073W*) y *XBP1* (*YIL101C*). Se confirmó que las deleciones de dos genes, *AZF1* y *XBP1* (*HSF1* es esencial y, por lo tanto, no se probó), disminuyen la extensión de la vida útil mediada por la restricción calórica (Choi et al., 2013).

En muchos casos, el estado priónico mejoró la tasa de crecimiento de la levadura en diferentes estreses ambientales, incluido el estrés osmótico y por presencia de ácido en el medio (Chakrabortee et al., 2016; Stewart et al., 2021).

3.4.3 COM2

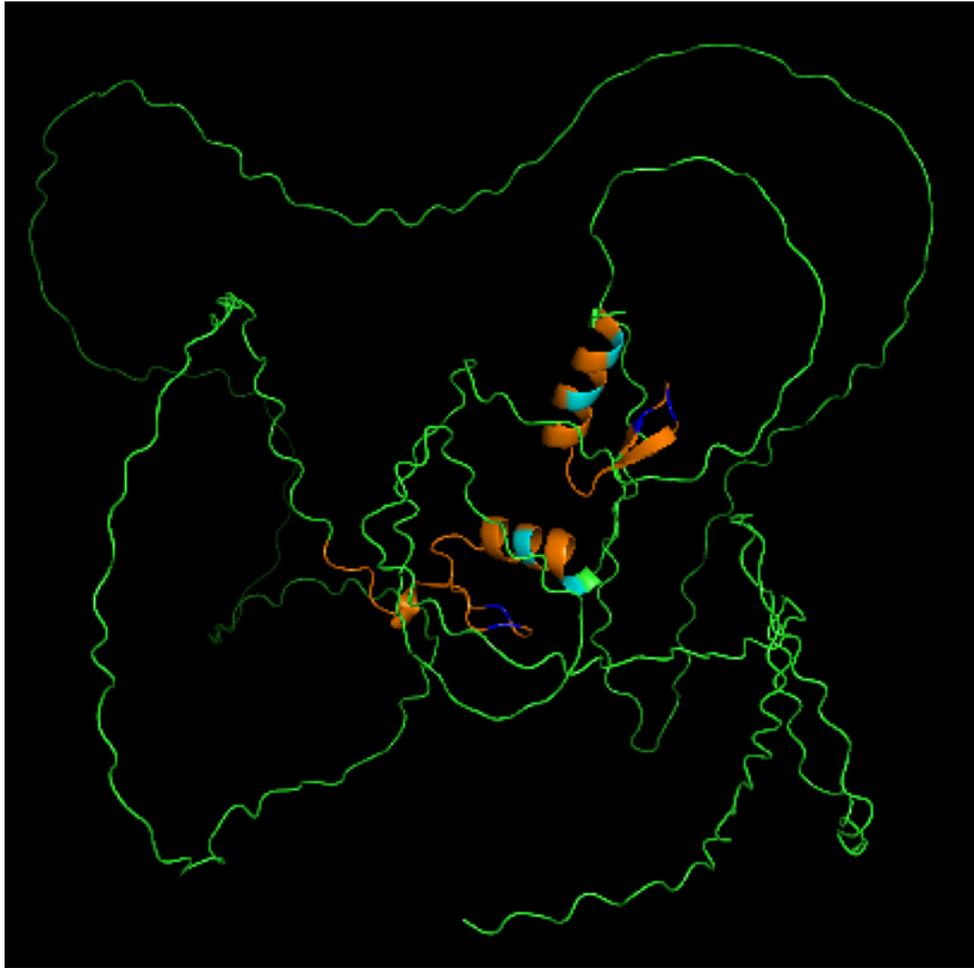


Figura 9. Estructura tridimensional de la proteína *COM2* (AlphaFold, 2021)

La Figura 9 muestra la estructura de la proteína *COM2*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.3.5 Funciones y regulación de *COM2*

El dióxido de azufre (a menudo abreviado como sulfito o SO_2). El SO_2 se suele añadir al mosto (en la elaboración de vinos) en forma de metabisulfito de sodio o potasio que, en solución, tiene una especiación dependiente del pH. A pH bajo, la especie más abundante es el SO_2 molecular ($\text{pK}_a \sim 1.8$), sin embargo, en el pH del vino (entre

3 y 3.8) el bisulfito (HSO_3^- ; pKa 6.9) es la forma más abundante. Se cree que el potencial antimicrobiano del SO_2 resulta de su capacidad para penetrar la membrana plasmática microbiana por difusión pasiva, similar a lo que se sabe que ocurre con los ácidos orgánicos carboxílicos débiles que también se utilizan como conservadores (p. Ej., Ácido acético o propiónico). Una vez dentro de las células microbianas, el SO_2 molecular se disocia en bisulfito (HSO_3^-) y sulfito (SO_3^{2-}) debido a que el pH interno supera los valores de pKa. Se describió que los efectos deletéreos causados por la acumulación de SO_2 , HSO_3^- o SO_3^{2-} dentro de las células de *Saccharomyces cerevisiae* incluyen el agotamiento de ATP causado por la inhibición de gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasas, perturbación de la estructura de la membrana plasmática y daños a proteínas, vitaminas o coenzimas. Aunque se observa una variabilidad significativa de cepa a cepa con respecto a la tolerancia al SO_2 , los estudios han identificado cepas de levadura deterioradas capaces de crecer en presencia de concentraciones tan altas como 600 mg / L, muy por encima de los niveles permitido legalmente en enología que se encuentran en el rango de 150 a 400 mg / L. Durante la vinificación, las células de *Saccharomyces cerevisiae* se exponen con frecuencia a altas concentraciones de dióxido de azufre (SO_2) que se utiliza para evitar el crecimiento excesivo de bacterias u hongos no deseados presentes en el mosto. Com2 controla, directa o indirectamente, la expresión de más del 80% de los genes activados por SO_2 (Lage et al., 2019).

El gen *SSU1*, que codifica una bomba de membrana plasmática esencial para la salida de sulfito y bisulfito. Este aumento de la transcripción de *SSU1* observado en cepas de vino tolerantes al SO_2 es el resultado de reordenamientos cromosómicos que intercambian el promotor nativo por uno más fuerte. El factor de transcripción Fzf1 es el regulador de la expresión de *SSU1* de su promotor endógeno, sin embargo, no juega ningún papel en el control de la expresión más alta de las cepas más tolerantes, ya que no tiene un sitio de unión en los promotores *SSU1* modificados que estas cepas albergan. Aunque se encontró que la transcripción de Com2 aumentaba en las células de *S. cerevisiae* expuestas a ácidos acético, propiónico o benzoico (a pH 4), no se pudo atribuir ningún efecto protector contra estos ácidos a este regulador. La delección de *COM2* abolió la activación transcripcional de 503 genes y redujo, en más del 50%, la activación inducida por SO_2 de otros 15 genes. Desde el punto de vista funcional, este conjunto de dianas de Com2 estaba altamente enriquecido para

genes implicados en la asimilación de sulfatos (*MET8*, *MET10*, *MET3*, *MET5*, *MET14*, *MET1*, *MET22* y *MET16*) y transporte (*SUL1* y *SUL2*), así como otros genes asociados con el metabolismo y la regulación de la Met y Cys (*MET32*, *SAM2*, *HOM3*, *MET13*, *MET1*, *MHT1*, *SAM1*, *MET4*, *STR2*, *MET30* y *STR3*). También se incluyen en este regulón genes implicados en la biosíntesis de Lys (*LYS2*, *LYS21*, *LYS20*, *LYS14*, *LYS4*, *LYS5*, *LYS1* y *LYS9*), Arg (*ARG5*, *ARG4*, *ARG2*, *ARG3*, *ARG7*, *ARG8*, *ORT1* y *CPA1*) o biotina (*BIO2*, *VHR1*, *ISA1*, *BIO5*, *BIO4* y *BIO3*), una vitamina que contiene azufre. En total, se encontró que 47 genes activados por Com2 en respuesta al SO₂ contribuyen a la tolerancia máxima a esta sustancia química, incluidos no solo los genes de la vía de activación del sulfato, sino también los genes necesarios para la biosíntesis de Lys y Arg, entre otros que tienen funciones más generales en respuesta al estrés ambiental. De manera constante, las fermentaciones de vino realizadas en presencia de SO₂ agotan rápidamente la Arg disponible en el mosto (en comparación con el consumo observado en ausencia de SO₂), lo que también se observa para la Lys, aunque en un grado mucho menos significativo (Lage et al., 2019).

En ausencia de SO₂, Com2 no tiene un efecto significativo sobre el transcriptoma de levadura, lo que sugiere que se vuelve activo solo cuando las células están expuestas a esta sustancia química (Lage et al., 2019).

3.4.4 MET31

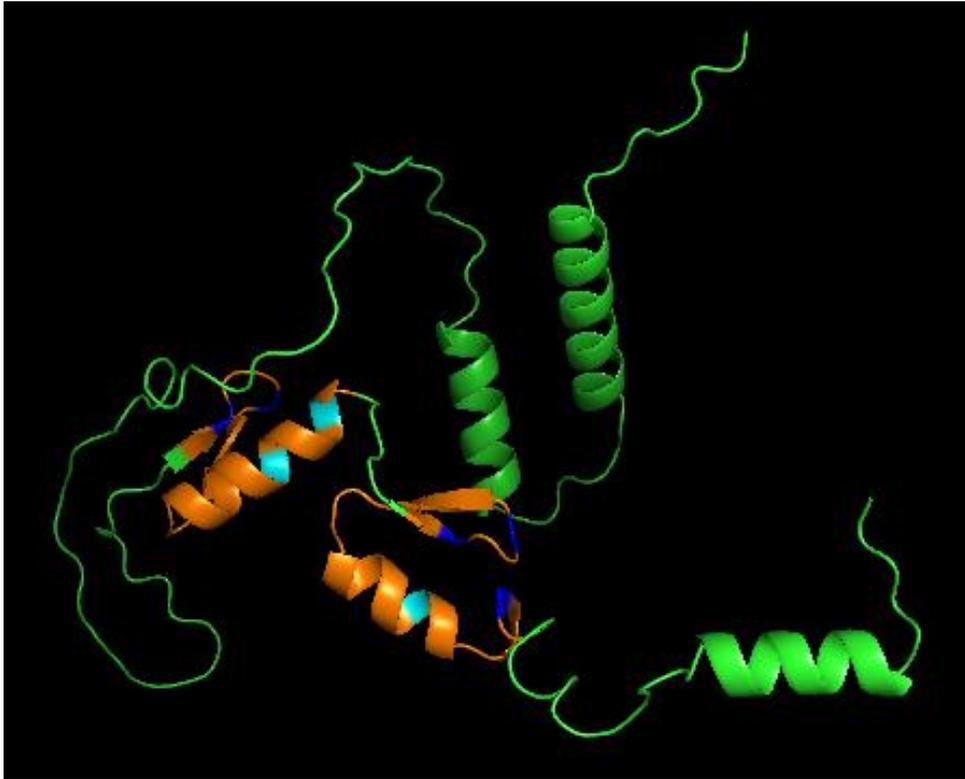


Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína MET31 (AlphaFold, 2021)

La Figura 10 muestra la estructura de la proteína *MET31*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.4.3 Modificaciones postraduccionales

Se han encontrado fosforilaciones en las serinas 45, 46, 142 y 158 (Saccharomyces Genome Database, 2021).

3.4.4.5 Funciones y regulación de *MET31*

MET31 codifica un factor de transcripción de dedos de zinc de la familia beta-beta-alfa. Met31p reconoce motivos de unión de la secuencia 5'-GTGGCG-3' y sirve como un adaptador dedicado para reclutar el activador transcripcional Met4p, que carece de actividad de unión al DNA, a los promotores. La expresión de la mayoría de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del azufre requiere Met4p. Met32p también puede servir como adaptador Met4p. Se han identificado promotores dependientes de Met4p en 45 genes, y cada uno contiene un sitio de unión a Met31p / Met32p. La asociación de Met31p / Met32p con sus sitios de unión en los promotores de *MET* proporciona una plataforma para reclutar e interactuar con Met4p. Bajo la limitación de azufre, estas interacciones permiten que Met4p active la transcripción a través del reclutamiento de los complejos coactivador mediador y acetiltransferasa de histona SAGA. Los grupos de Met31p y Met32p no asociados con Met4p se degradan de manera constitutiva (Ljungdahl y Daignan-Fornier, 2012).

El metabolismo del azufre de la levadura está regulado transcripcionalmente por el activador Met4. Met4 carece de capacidad de unión al DNA y se basa en interacciones con Met31 y Met32, proteínas parálogas que se unen al mismo elemento regulador cis, para activar sus objetivos. Aunque Met31 y Met32 son redundantes para el crecimiento en ausencia de metionina, los estudios indican que Met32 tiene un papel prominente sobre Met31 cuando Met30, un regulador negativo de Met4 y Met32, está inactivo. Met32 se superponía precisamente con todas las regiones unidas a Met4, lo que respalda a Met32 como la plataforma principal para Met4 (Carrillo et al., 2012).

Hay dos categorías de cofactores de Met4 que se unen al DNA: 1) Met31 y Met32 son proteínas con dedos de zinc C₂H₂ muy similares, y cada una se une a un elemento regulador en cis de Met31 / Met32 (con la secuencia de consenso de AACTGTGGC), y 2) Cbf1 es una proteína básica hélice-bucle-hélice que se homodimeriza para unirse a un elemento regulador en cis de Cbf1 (que consta de un motivo CACGTGA; Thomas et al., 1989, 1992; Kuras y Thomas, 1995; Kuras et al., 1996; Blaiseau et al., 1997; Blaiseau y Thomas, 1998; Lee et al., 2010). Todos los promotores de regulones centrales de Met4 contienen motivos Met31 / Met32, lo que indica un papel esencial

para la unión del promotor Met31 / Met32 en la transcripción activada por Met4. Solo un subconjunto de promotores blanco contiene sitios Cbf1. La delección de Met31 y Met32 elimina la transcripción activada por Met4 de todo el regulón del núcleo de Met4 (Carrillo et al., 2012).

Met31 y Met32 desempeñan algunas funciones distintas en la célula. Primero, las células *met32Δ* son significativamente más grandes que las células *met31Δ* (Jorgensen et al., 2002). En segundo lugar, las respuestas de crecimiento dependientes de Met4 son diferentes en las células *met31Δ* y *met32Δ*. Esta diferencia es más evidente cuando Met4 y Met32 no están regulados por Met30, un componente del complejo de ubiquitina ligasa SCFMet30. SCFMet30 regula Met4 por ubiquitinación usando dos mecanismos: 1) poliubiquitinación de Met4 dirige Met4 al proteasoma para su degradación, y 2) oligoubiquitinación de Met4 inhibe la capacidad de activación transcripcional de la proteína estable Met4 (Patton et al., 1998; Kaiser et al., 2000; Rouillon et al., 2000; Kuras et al., 2002; Flick et al., 2004). La pérdida de Met30 da como resultado una forma transcripcionalmente activa de Met4 que no está dirigida a la degradación. Si la actividad de Met4 se prolonga, se producen una serie de defectos del ciclo celular y del crecimiento que conducen a la detención del crecimiento y, finalmente, a la muerte celular (Patton et al., 2000; Su et al., 2005). Met4 y Met32 son los únicos blancos de ubiquitinación confirmadas de SCFMet30 (Patton et al., 1998; Ouni et al., 2010). La delección de MET4 o la inactivación de mutaciones dentro de su dominio de activación de la transcripción evita la letalidad de *met30Δ* (Patton et al., 2000). De los cofactores de Met4, sólo la delección de MET32 evita la letalidad de *met30Δ* (Patton et al., 2000).

El papel destacado de Met32 se demuestra aún más cuando las células se exponen al cadmio. Tras la exposición, Met30 no puede apuntar a Met4 para la ubiquitinación, y Met4 se activa (Barbey et al., 2005). Como resultado, los genes del metabolismo del azufre se expresan y el glutatión antioxidante que contiene azufre se produce en grandes cantidades para permitir la desintoxicación del cadmio (Li et al., 1997; Fauchon et al., 2002). Para desviar el uso de azufre hacia la producción de glutatión, las células experimentan un cambio dependiente de Met4 del uso de enzimas ricas en azufre comúnmente utilizadas a isoenzimas con menor contenido de azufre (Fauchon et al., 2002). De acuerdo con el papel que desempeña Met4 en la

desintoxicación de cadmio, las células *met4Δ* y *met31Δmet32Δ* son sensibles al cadmio. Aunque no son tan sensibles al cadmio como las células *met31Δmet32Δ*, las células *met32Δ* son más sensibles al cadmio que las células *met31Δ* (Barbey et al., 2005).

La levadura industrial *S. cerevisiae* es generalmente más tolerante a los estímulos ambientales que las cepas modelo de laboratorio. Mostró más resistencia contra los compuestos inhibidores liberados de la conversión de biomasa lignocelulósica (Zhou et al., 2014; Liu et al., 2018). La moderada resistencia innata de la levadura industrial permitió su adaptación para adquirir una mayor aptitud resistente al 2-furaldehído (furfural) y al 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), compuestos tóxicos comunes derivados de la conversión de biomasa lignocelulósica (Liu, 2018). La cepa adaptada Y-50049 es capaz de soportar desafíos sinérgicos de furfural y HMF y convertir estas sustancias tóxicas en compuestos no dañinos de furanmetanol (FM) y furandimetanol (FDM), respectivamente, mientras produce etanol (Liu et al., 2004).

Entre muchos factores de transcripción importantes, Yap1, Met4, Met31 / 32, Msn2 / 4 y Pdr1 / 3 aparecieron con la frecuencia más alta en relación con los fenotipos tolerantes recientemente identificados involucrados en la supervivencia de la biosíntesis de aminoácidos, el REDOX defensivo reforzado, el transporte celular y la desintoxicación celular. Se ha documentado que el aumento de la respuesta de expresión contra el arsenito en la levadura está controlado por Yap1 y Met4 (Thorsen et al., 2007). Met4 regula la expresión de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre, el metabolismo del glutatión, la respuesta a metales pesados y la respuesta ahorradora de azufre (Wheeler et al., 2003). Dado que Met4 no tiene actividad de unión al DNA, regula los genes diana al asociar los cofactores Met31 / 32 de unión al DNA. La expresión de otros genes como *MET3* y *MET14* también depende de la presencia de Met31 / 32 (Liu y Ma, 2020).

3.4.5 MIG1

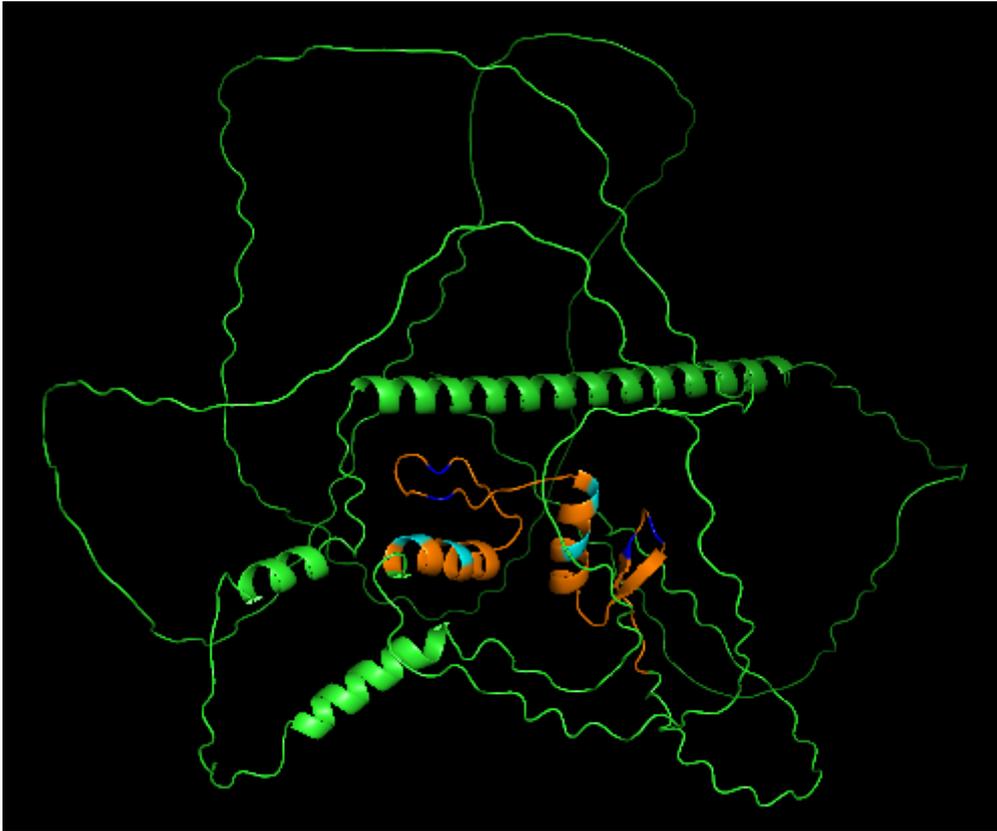


Figura 11. Estructura tridimensional de la proteína MIG1 (AlphaFold, 2021)

La Figura 11 muestra la estructura de la proteína *MIG1*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.5.3 Modificaciones postraduccionales

Se han encontrado fosforilaciones en las serinas 80, 108, 129, 138, 178, 179, 214, 216, 218, 220, 222, 230, 231, 262, 264, 278, 302, 310, 311, 314, 328, 350, 367, 370, 377, 379, 381, 400, 402, 403 y 451, en las tirosinas 267 y treoninas 280, 369, 371, 374 y 455 (Saccharomyces Genome Database, 2021).

3.4.5.5 Funciones y regulación de *MIG1*

La glucosa, fructosa y manosa son las fuentes de carbono y de energía preferidas para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La ausencia de fuentes de energía preferidas activa la desrepresión de la glucosa, que está regulada por la cinasa Snf1. Cuando las fuentes de energía preferidas se vuelven limitantes, la cinasa Snf1 se fosforila y activa (Schmidt y McCartney 2000; Chandrashekarappa et al., 2013). El Snf1 activado fosforila Mig1 que se exporta desde el núcleo al citosol, lo que conduce a la desrepresión de genes para la utilización de fuentes de energía alternativas. Cuando las fuentes de energía preferidas están disponibles, Snf1 y Mig1 se desfosforilan (Ludin et al., 1998) y Mig1 vuelve a entrar en el núcleo y reprime la transcripción de genes blanco mediante el reclutamiento del complejo represor Tup1 / Ssn6 (Schmidt et al., 2020).

Durante el crecimiento en glucosa, los genes de las vías alternativas de utilización del carbono, por ejemplo, los genes de galactosa (*GAL*), maltosa (*MAL*) y sacarosa (*SUC*), se reprimen activamente. *MIG1* codifica un factor de transcripción de dedos de zinc Cys2His2 de la familia beta-beta-alfa. Mig1p es el principal efector en la represión de glucosa de los genes *SUC*, *MAL* y *GAL*, y se une a motivos 5'-MCCCCRS-3' (Laidlaw et al., 2021).

La proteína *MIG1* se une a dos sitios en la región río arriba de *SUC2*, un gen de levadura que está reprimido por la glucosa. Un conjunto de genes para los que se ha estudiado la represión de la glucosa son los genes *GAL*. Estos genes están sujetos tanto a la inducción de galactosa como a la represión de la glucosa. El gen *SUC2*, codifica la enzima invertasa que degrada la sacarosa y la rafinosa. La expresión de *SUC2* está controlada únicamente por la glucosa, y se han identificado varios genes implicados en la regulación de *SUC2* (Nehlin y Ronne, 1990).

En las células de levadura, Snf1 se activa cuando las células carecen de glucosa, y esta activación conduce a la inhibición de la acetil-coenzima A-carboxilasa y a la expresión de un gran conjunto de genes necesarios para la gluconeogénesis, la respiración y el metabolismo de las fuentes de carbono alternativas. Mig1 se inactiva por fosforilación en múltiples sitios en minutos cuando las células están agotadas en

glucosa. Esta fosforilación depende de Snf1 y conduce a la exclusión nuclear de Mig1 y la desrepresión de genes necesarios para el metabolismo de fuentes de carbono distintas de la glucosa (Dubacq et al.,2004). La eliminación del represor *MIG1* relacionado de la cepa de laboratorio, que en otros estudios se demostró que afecta la expresión de ~200 genes en condiciones de crecimiento estándar (Lutfiyya et al., 1998; Westholm et al., 2008; Lewis y Gasch, 2012).

3.4.6 *MIG3*

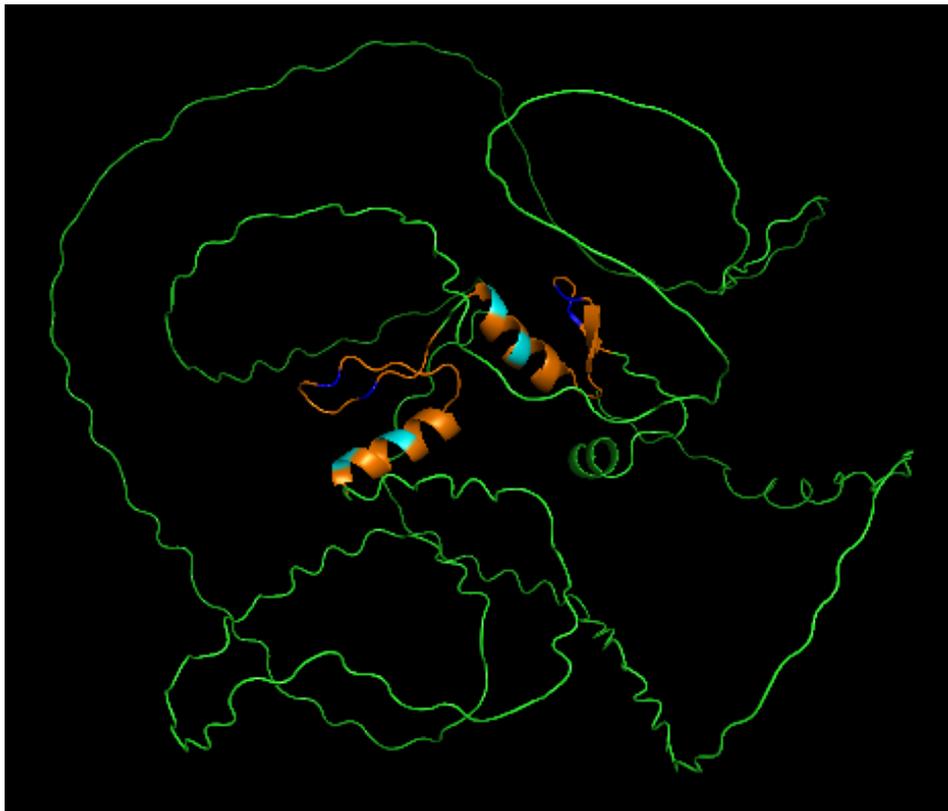


Figura 12. Estructura tridimensional de la proteína *MIG3* (AlphaFold, 2021)

La Figura 12 muestra la estructura de la proteína *MIG3*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.6.3 Modificaciones postraduccionales

Se ha reportado sitio de modificación en la serina 265 (*Saccharomyces Genome Database*, 2021).

3.4.6.5 Funciones y regulación de *MIG3*

El estrés genotóxico se refiere a todas las situaciones en las que se compromete la duplicación o la integridad del genoma. Las células han desarrollado amplias respuestas a este tipo de estrés, incluida la inhibición de la progresión del ciclo celular; regulación transcripcional y postranscripcional de las vías de replicación, reparación y recombinación del DNA; y apoptosis. Los niveles de mRNA de *MIG3* aumentan cuando las células se someten a estrés genotóxico. El mRNA de *MIG3* aumenta cinco veces cuando las células se tratan con MMS (metil metano sulfonato), HU (Hidroxiurea), UV, fleomicina y cadmio. El aumento de mRNA de *MIG3* y la fosforilación inducida de la proteína Mig3 en presencia de daño en el DNA sugirió que es parte de una vía de respuesta al daño del DNA (Dubacq et al., 2004).

Mig3 es un represor transcripcional de algunos genes blanco no identificados cuando las células se cultivan con glucosa como fuente de carbono. En presencia de un estrés genotóxico, Mig3 se fosforila e inhibe de una manera dependiente de las cinasas Snf1 y Mec1 (Dubacq et al., 2004).

Se encontró que Mig3p afecta la expresión de cientos de genes sensibles a la glucosa en la cepa *YPS163*, tanto durante el crecimiento en condiciones estándar como en el tratamiento con etanol. Se sugiere que Mig3p puede actuar como un activador / represor multifuncional que desempeña papeles separados en condiciones estándar frente a condiciones de estrés y que esta función se ha perdido en gran medida en las cepas de laboratorio. La cepa de laboratorio y varias cepas silvestres albergan mutaciones que disminuyen la función de Mig3p, en la figura 21 se ilustra lo dicho anteriormente (Lewis y Gasch, 2012).

La cepa de laboratorio S288c tiene una respuesta aberrante al etanol, se identificaron nuevos genes y procesos involucrados en la tolerancia al etanol (Lewis et al., 2010). *MIG3* se descubrió como un gen que se expresaba diferencialmente entre las cepas que respondían al etanol (con una fuerte represión dependiente del etanol en la cepa de laboratorio pero no en las cepas silvestres). Mig3p es una proteína de dedo de zinc Cys2His2 que comparte similitud de secuencia con otros dos factores de transcripción, Mig1p y Mig2p. Aunque Mig2p y Mig3p son más similares entre sí, los tres factores de transcripción comparten una identidad extensa (> 70%) en sus dominios de unión al DNA, y se unen a secuencias casi idénticas *in vitro* (Lutfiyya et al., 1998).

Mig3p no juega un papel significativo en la represión catabólica por glucosa (Lutfiyya et al., 1998; Westholm et al., 2008). Un estudio separado implicó a Mig3p en la respuesta transcripcional al daño del DNA (Dubacq et al., 2004), mientras que otro estudio encontró que la sobreexpresión de Mig3p podría conferir resistencia al arsénico (Takahashi et al., 2010).

Las cepas de laboratorio son notablemente más proliferativas en medios ricos, pero crecen relativamente deficientemente en fuentes de carbono respiratorio. La cepa de laboratorio S288c también tiene un defecto importante en la respuesta al etanol en comparación con otras cepas. Es posible que el paso de laboratorio en medios enriquecidos haya hecho que Mig3p sea prescindible o haya conducido a una pérdida selectiva de función. A través del análisis de secuencia, se identificó un SNP en *MIG3* que conduce a una sustitución de V36G no conservadora. Esta sustitución se encuentra junto al primer dedo de zinc C2H2 en el dominio de unión al DNA de Mig3p, que posiblemente podría afectar la función de Mig3p. Este SNP se identificó en sólo 4 de 53 cepas de *S. cerevisiae*. Dos de ellas son cepas silvestres que albergan la sustitución V36G, así como un codón de término prematuro en el residuo 50 que probablemente produce la pérdida total de la función Mig3p. La pseudogeneización podría haber ocurrido después de la sustitución de V36G debido a la pérdida de la restricción evolutiva (Lewis y Gasch, 2012).

MIG3 codifica un factor de transcripción de dedos de zinc Cys2His2 de la familia beta-beta-alfa. Mig3p se une a motivos 5'-CCCCRSV-3'. Como Mig1p y Mig2p, Mig3p reprime la transcripción de genes que codifican enzimas para la utilización de

azúcares maltosa, sacarosa o galactosa cuando hay glucosa presente. En algunas cepas, esta contribución a la represión de la glucosa por Mig3p es marginal. En otras cepas, Mig3p afecta la expresión de cientos de genes que responden a la glucosa. Mig3p participa en la respuesta transcripcional al daño del DNA y reprime la transcripción de la histona desacetilasa *SIR2* involucrada en el silenciamiento de genes y el control del envejecimiento. *Mig3* está bajo control de doble nivel por glucosa, es decir que la transcripción de *MIG3* es inducida por glucosa, y Mig3p está sujeta a fosforilación dependiente de *Snf1* y posterior degradación en ausencia de glucosa. (*MIG3* | *SGD*, s. f.).

Mig3 regula negativamente el gen *SIR2* que codifica una histona desacetilasa involucrada en el silenciamiento de genes y el control del envejecimiento. Mig3 no se dirige a los mismos genes que Mig1 y Mig2, sino que regula negativamente el gen *SIR2* (Westholm et al., 2008).

El gen *MIG3* es inducido por glucosa (Kaniak et al., 2004), y la proteína Mig3 está sujeta a fosforilación dependiente de *Snf1* y degradación subsiguiente en ausencia de glucosa (Dubacq et al., 2004). El gen *MIG3* también es inducido por estrés genotóxico, y hay evidencia de que Mig3 funciona como un efector descendente en la respuesta dependiente de *Snf1* a la hidroxiaurea (Dubacq et al., 2004; Westholm et al., 2008).

Mig3 contribuye marginalmente a la represión de algunos genes reprimidos por glucosa, es decir, *SUC2*, *HXT2*, *SNF3*, *MRK1* y *MTH1* (Kaniak et al., 2004), pero sólo uno de ellos, *MRK1*, se vio afectado en la delección *mig3*. *MRK1* es una proteína cinasa involucrada en la señalización de estrés (Hirata et al., 2003). Sin embargo, el efecto más significativo de una delección de *mig3* es en el gen *SIR2*. *SIR2* codifica una histona desacetilasa que participa en el silenciamiento, pero Sir2 también se ha implicado en el mantenimiento de la integridad del genoma (Gottlieb y Esposito, 1989) y en contrarrestar el envejecimiento tanto en levaduras como en animales. Una delección de *sir2* reduce la duración de la replicación (Kaeberlein et al., 2005) pero aumenta la duración cronológica de la levadura (Fabrizio, 2005). Mig3 regula negativamente *SIR2* proporciona una posible explicación para la observación de que la actividad reducida

de Snf1 conduce a un envejecimiento acelerado en la levadura, ya que Snf1 inhibe Mig3 (Dubacq et al., 2004).

3.4.7 *RIM101*

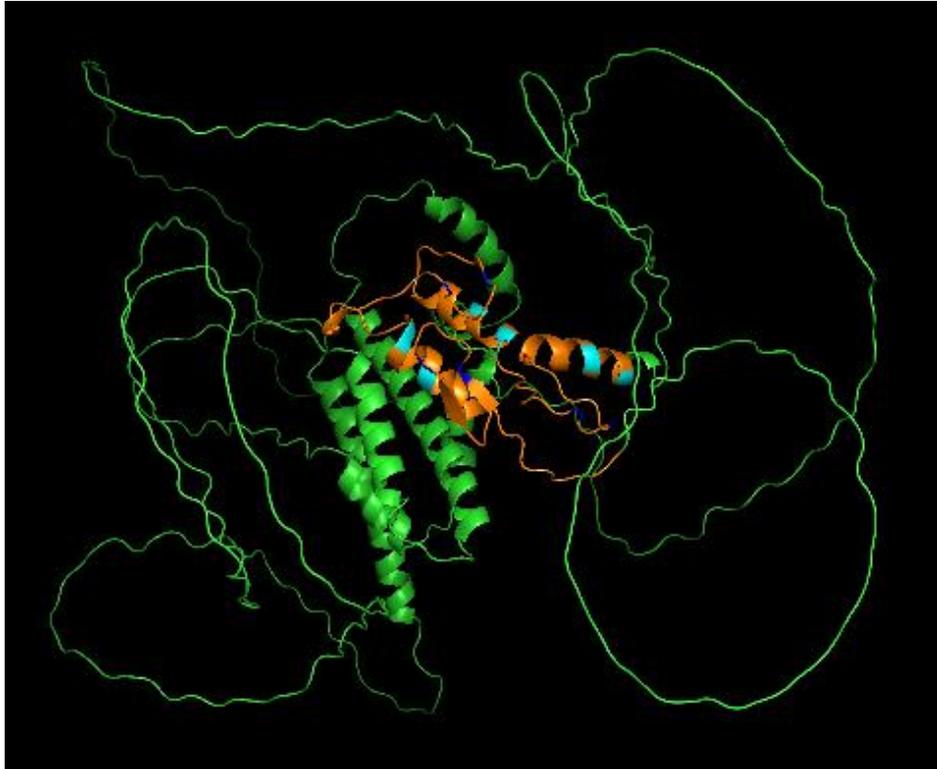


Figura 13. Estructura tridimensional en la proteína *RIM101* (AlphaFold, 2021)

La Figura 13 muestra la estructura de la proteína *RIM101*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C₂H₂.

3.4.7.3 Modificaciones postraduccionales

Se encontraron fosforilaciones en las serinas 42, 76 y 329 y una N-glicosilación en la asparagina 369 (Saccharomyces Genome Database, 2021).

3.4.7.5 Funciones y regulación de *RIM101*

Represor transcripcional de dedos de zinc Cys²His²; implicado en la represión de genes de respuesta alcalina como parte de la adaptación a condiciones alcalinas; involucrado en el ensamblaje de la pared celular; requerido para el crecimiento invasivo y la esporulación haploide alcalina estimulado por pH; activado por procesamiento proteolítico alcalino-dependiente que da como resultado la eliminación de la cola C-terminal; similar a *A. nidulans* PacC (*RIM101*|SGD, s.f.).

La represión transcripcional es la principal función biológica de Rim101p. El objetivo de represión Rim101p, Nrg1p es a su vez necesario para la represión de dos genes alcalinos inducibles por pH, incluido el gen de la bomba de Na⁺ *ENA1*, que es necesario para la tolerancia a los iones. Por tanto, Nrg1p, un represor transcripcional conocido, funciona como inhibidor de las respuestas de pH alcalino (Lamb y Mitchell, 2003).

Una característica ambiental con amplias consecuencias para la adaptación y diferenciación es el pH extracelular. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el pH extracelular gobierna la expresión de genes que especifican las bombas de iones y los transportadores que promueven la adaptación a los cambios de pH. El pH extracelular también gobierna dos programas de diferenciación, es decir, crecimiento invasivo haploide y esporulación; estos se inhiben en condiciones ácidas y se favorecen en condiciones alcalinas. Varias de estas respuestas dependen de una vía reguladora conservada que actúa a través del factor de transcripción Rim101p (Lamb y Mitchell, 2003).

Rim101p, se identificó por primera vez mediante análisis de mutantes como un regulador positivo de la expresión y esporulación del gen meiótico. Rim101p es parte de una vía o complejo que también incluye Rim8p, Rim9p y Rim13p. La posibilidad de que estos productos génicos actúen en una vía de respuesta al pH provino del hallazgo de que el regulador de respuesta al pH de *Aspergillus nidulans* PacC es un homólogo de Rim101p. PacC y Rim101p se activan mediante la escisión proteolítica C-terminal que se estimula a pH alcalino. Varios productos génicos necesarios para la escisión de PacC y Rim101p son homólogos entre sí e incluyen la proteasa de tipo calpaína de *S. cerevisiae* Rim13p (también llamada Cpl1p), el andamio de proteasa Rim20p, las supuestas proteínas transmembrana Rim9p, Rim21p y Rim8p, de origen

bioquímico desconocido. Los estudios con *Yarrowia lipolytica* y *Candida albicans* han establecido que Rim101p y su vía de procesamiento se conservan y que son necesarios para las respuestas dependientes del pH (Lamb y Mitchell, 2003).

Los mutantes de *S. cerevisiae rim101* son sensibles a los iones Na⁺ o Li⁺ y crecen mal a bajas temperaturas (Lamb y Mitchell, 2003).

Nrg1p tiene un papel importante en la regulación de genes sensibles al pH y la tolerancia a los iones. Una función clave de Nrg1p es regular negativamente *ENA1*, un gen de la bomba de salida de Na⁺ que es fundamental para el crecimiento en medios alcalinos y para la tolerancia a Na⁺ y Li⁺. Estudios anteriores indican que la actividad de Nrg1p es inhibida por la proteína cinasa Snf1p, que media la represión de la glucosa. Se sabe que Snf1p promueve la expresión de *ENA1* en parte mediante la inhibición del represor Mig1p, pero es posible que Snf1p también promueva la expresión de *ENA1* mediante la inhibición de Nrg1p (Lamb y Mitchell, 2003).

Nrg1p es un regulador negativo de un segundo gen inducido por pH alcalino, *ZPS1*. La función de Zps1p es incierta, pero tanto *ZPS1* como su homólogo de *C. albicans*, *PRA1*, son genes inducidos por pH alcalino dependientes de Rim101p (Lamb y Mitchell, 2003).

RIM101 contiene un dominio de unión al DNA también conocido como grupo de zinc binuclear Zn₂Cys₆ o nudillo de zinc. Dos de los principales objetivos de la represión de Rim101p son *NRG1* y *NRG2*, que codifican represores transcripcionales. Rim101p regula una variedad de procesos, ya sea directa o indirectamente a través de la represión de *NRG1* y *NRG2*: respuesta al pH alcalino, estrés ácido débil y condiciones anaeróbicas; crecimiento filamentoso; meiosis y esporulación; montaje de septo divisional, respuesta a la asimetría lipídica alterada en la bicapa de la membrana plasmática; y montaje de pared celular. Rim101p reprime la transcripción reclutando el complejo Cyc8p-Tup1p en los promotores. La actividad de Rim101p está regulada por proteólisis. En condiciones ácidas, Rim101p existe como una forma inactiva de larga duración. A pH alto, la cola C-terminal es eliminada por la proteasa Rim13p, activando Rim101p como represor transcripcional. La localización nuclear de Rim101p también está regulada mediante fosforilación. Esta regulación depende de la cinasa Pho85p, pero no se sabe si Rim101p es un objetivo directo de Pho85p *in vivo* (*RIM101* | *SGD*, s. f.).

Varios de los genes regulados por la vía *RIM101* en *S. cerevisiae* codifican actividades de remodelación de la pared celular, como *CRH1*, *CRH2* o *CTS1* (Castrejon et al., 2006).

Formalmente, Rim101p es un regulador positivo del gen activador meiótico *IME1* y de varios genes alcalinos inducidos por pH. Sin embargo, ni *IME1* ni los genes inducidos por pH alcalino que responden a *RIM101* tienen sitios PacC en sus promotores, lo que sugiere que pueden ser dianas indirectas (Lamb y Mitchell, 2003).

Las mutaciones por delección de dos dianas de represión de Rim101p, *NRG1* y *SMP1*, suprimen cada una un subconjunto de fenotipos mutantes de *rim101Δ*. Rim101p está asociado con muchas regiones promotoras diana, independientemente de si se procesa o no; sin embargo, se requiere el procesamiento de Rim101p para su actividad como represor. Como el complejo correpresor Tup1p-Ssn6p también regula negativamente todos los objetivos directos de represión de Rim101p, es posible que se requiera el procesamiento de Rim101p para la interacción funcional de Rim101p-Tup1p-Ssn6p. Aunque los hallazgos difieren en varios aspectos del paradigma PacC, se argumenta que las funciones de represión biológica y molecular de Rim101p y PacC pueden conservarse (Lamb y Mitchell, 2003).

3.4.8 *RPH1*

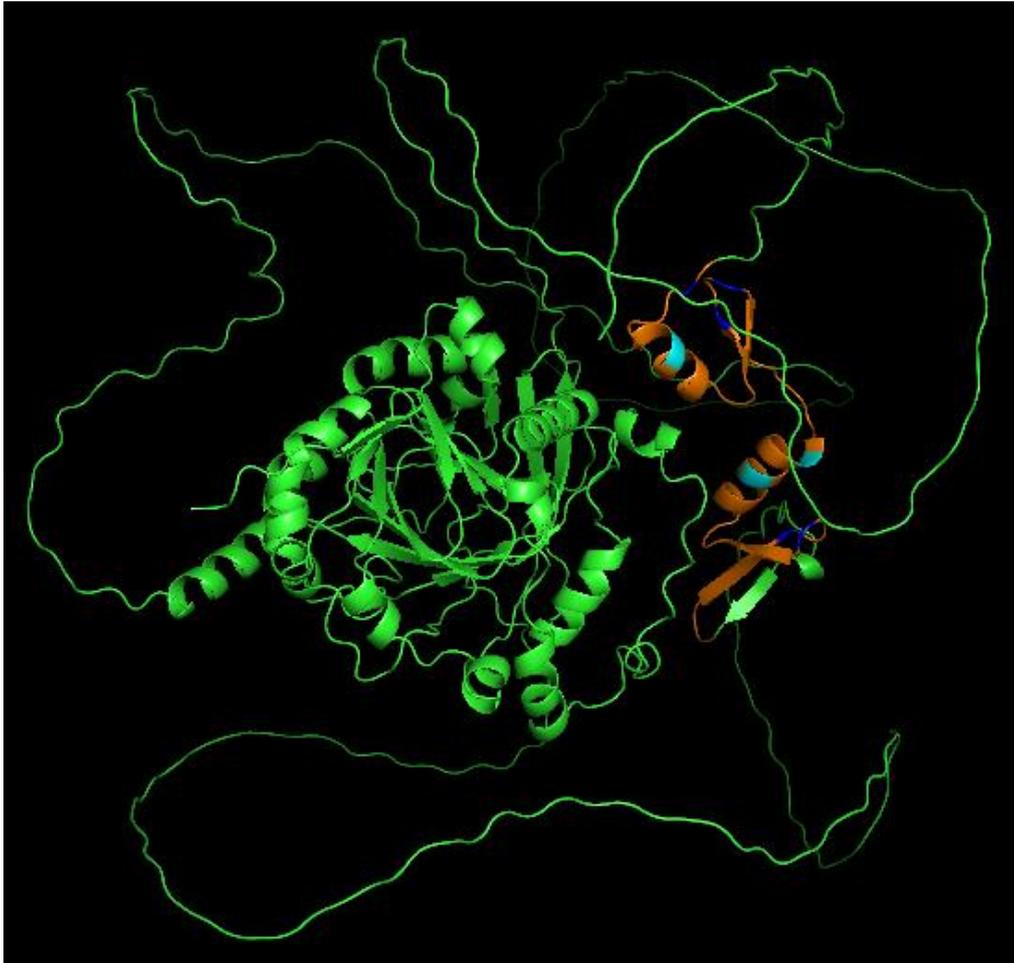


Figura 14. Estructura tridimensional de la proteína *RPH1* (AlphaFold, 2021)

La Figura 14 muestra la estructura de la proteína *RPH1*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.8.3 Modificaciones postraduccionales

Se presentan fosforilaciones en las serinas 124, 139, 405, 412, 425, 426, 429, 430, 434, 458, 459, 497, 501, 511, 552, 555, 557, 561, 575, 584, 587, 588, 590, 626, 652, 656, 668, 688 y 689 y en las treoninas 381, 399 y 480, acetilaciones en las lisinas 3, 214, 288, 424 y 705 (Saccharomyces Genome Database, 2021).

3.4.8.5 Funciones y regulación de *RPH1*

El gen de reparación del DNA de *Saccharomyces cerevisiae* *PHR1* codifica una fotoliasa que cataliza la reparación dependiente de la luz de los dímeros de pirimidina. La expresión de *PHR1* es inducida a nivel de transcripción por una variedad de agentes que dañan el DNA. El regulador principal de la respuesta al daño de *PHR1* es una secuencia de 39 pb llamada *URSPHR1* que es el sitio de unión para una proteína que constituye el represor PRP sensible al daño. Rph1p y Gis1p regulan la expresión de *PHR1* a través de *URSPHR1*. Ambas proteínas contienen dos dedos de zinc putativos que son idénticos en toda la región de unión al DNA, y se requiere la delección de *RPH1* y *GIS1* para desreprimir completamente *PHR1* en ausencia de daño. La desrepresión de *PHR1* aumenta la velocidad y el alcance de la fotorreactivación *in vivo*, lo que demuestra que la respuesta al daño de *PHR1* mejora la capacidad de reparación celular. Los estudios de competencia de unión y de huella *in vitro* indican que la secuencia AG4 (C4T) dentro de *URSPHR1* es el sitio de unión para Rph1p y Gis1p y sugiere que al menos un componente de unión de DNA adicional está presente en el complejo PRP (Sancar y Smith, 1989).

Se sugiere que Rph1p y Gis1p reconocen secuencias idénticas. Junto con la observación de que tanto *RPH1* como *GIS1* deben eliminarse para desreprimir completamente la expresión de *PHR1*, los datos indican que *RPH1* y *GIS1* son funcionalmente redundantes con respecto a la represión de *PHR1* (Jang et al., 1999).

El represor Rph1 se fosforila en respuesta al daño del DNA y esta modificación está mediada por la vía del punto de control del daño del DNA. Además, la proteína cinasa Rad53 es necesaria para la fosforilación de Rph1. La proteína Rph1 se fosforila en residuos de Ser / Thr (Kim et al., 2002).

La metilación de histonas es una modificación postraduccional importante que contribuye a los procesos basados en la cromatina, incluida la regulación transcripcional, la reparación del DNA y la herencia epigenética. En la levadura en *Saccharomyces cerevisiae*, la metilación de la Lys de la histona se produce en las Lys 4, 36 y 79 de la histona H3, y su depósito se acopla principalmente a la transcripción. Hasta hace poco, se consideraba que la metilación de histonas era irreversible, pero

la identificación de las enzimas histonas desmetilasa ha revelado que esta modificación puede regularse dinámicamente. En la levadura, hay cinco proteínas que contienen el dominio JmjC, un motivo característico que se encuentra en una gran familia de histonas demetilasa que abarcan muchos organismos. Una proteína que contiene el dominio JmjC en la levadura es Jhd1, que se ha identificado recientemente como una histona desmetilasa que se dirige a H3K36 modificada en el estado di- y monometil. Se identificó una segunda histona desmetilasa que contiene el dominio JmjC, Rph1, que puede desmetilar específicamente estados de modificación de tri- y dimetilo de H3K36. Sorprendentemente, Rph1 puede eliminar la metilación de H3K9, una modificación de histona que no se encuentra en la cromatina de levadura. La capacidad de Rph1 para desmetilar H3K9 proporciona la primera indicación de que *S. cerevisiae* puede haber codificado alguna vez un sistema de metilación de H3K9 y sugiere que Rph1 es un vestigio funcional de este sistema de modificación. La desmetilación de H3K9 mediada por Rph1 puede ser un vestigio funcional de un sistema de metilación de H3K9 extinto en *S. cerevisiae*. Rph1 es una desmetilasa H3K36, estos datos revelan la primera histona desmetilasa de levadura capaz de eliminar el estado de modificación de me³ y demuestran que Rph1 se dirige a la desmetilación de H3K36me³ y H3K36me² (Klose et al., 2007).

La delección de RPH1 no causa ningún fenotipo celular manifiesto (Klose et al., 2007). Rph1 funciona para desmetilar H3K36 *in vivo* y los niveles elevados de Rph1 conducen a defectos de crecimiento que son independientes de la actividad desmetilasa (Klose et al., 2007).

Rph1 no es una molécula alargada, sino que consta de cuatro subunidades Rph1 de 90,2 kDa (masa teórica). Es sorprendente que Rph1 no forme un complejo proteico heterogéneo estable en la levadura dado que muchas otras enzimas modificadoras de la cromatina se encuentran en complejos de alto peso molecular que tienen proteínas accesorias implicadas en dirigir la actividad enzimática a la cromatina. Una explicación de la aparente ausencia de un complejo Rph1 estable podría ser la capacidad intrínseca de Rph1 para unirse directamente al DNA a través de su dominio ZF C-terminal. Las propiedades de unión al DNA de Rph1 pueden permitirle funcionar independientemente de los factores asociados en el reconocimiento de sitios diana en la cromatina y permitir interacciones más transitorias con factores proteicos adicionales mientras antagoniza la metilación de H3K36. La delección de *RPH1* no

afecta los perfiles de metilación de la histona H3K36 global, y las cepas de delección son viables, sin mostrar defectos morfológicos o celulares obvios (Klose et al., 2007).

3.4.9 ZAP1

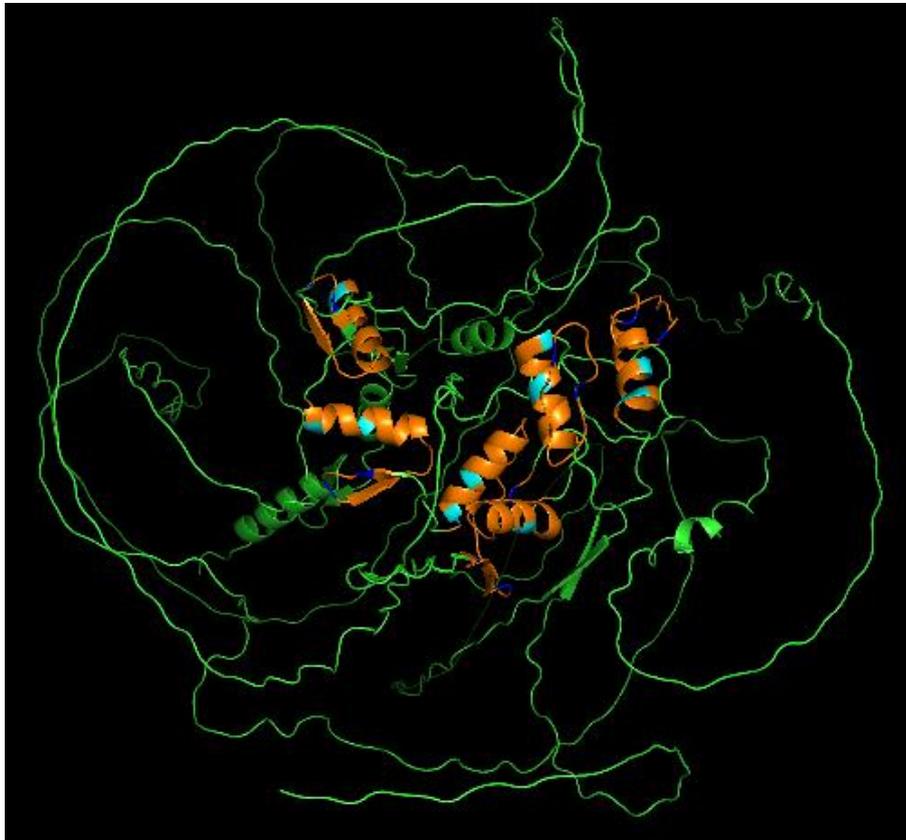


Figura 15. Estructura tridimensional de la proteína ZAP1 (AlphaFold, 2021)

La Figura 15 muestra la estructura de la proteína *ZAP1*. Los dominios donde se localizan los dedos de zinc se encuentran en las regiones de color naranja, las zonas de color azul son las cisteínas y las de color cian son las histidinas que forman los dedos de zinc C2H2.

3.4.9.3 Modificaciones postraduccionales

Se presentan fosforilaciones en las serinas 9, 151, 156, 166, 515, 856 y 858 y en la treonina 5 (Saccharomyces Genome Database, 2021).

3.4.9.5 Funciones y regulación de ZAP1

ZAP1 codifica una proteína de 93 kDa con una secuencia similar a los activadores transcripcionales; los 174 aminoácidos C-terminales contienen cinco dominios de dedos de zinc C₂H₂, y el extremo N (residuos 1 a 706) tiene dos dominios de activación ácidos potenciales. Regula la transcripción de su propio promotor en respuesta al zinc a través de un mecanismo autorregulador positivo (Zhao y Eide, 1997).

Los genes blanco de Zap1p están involucrados en la homeostasis del zinc y la adaptación metabólica a la deficiencia de zinc. Zap1p se inactiva cuando hay abundancia de zinc (ZAP1 | SGD, s. f.).

En las células deficientes en zinc, Zap1p se une como monómero a un elemento palindrómico sensible al zinc (ZRE), 5'-ACCTTNAAGGT-3'. Los promotores regulados por Zap1p contienen típicamente uno o algunos ZRE reconocibles.

Los siete dedos de Zap1 se ajustan a la secuencia consenso de dedos de zinc y se prevé que formen la estructura ββ α encontrada para otros dominios de este tipo. Zap1 ZnF1 y ZnF2 no son necesarios para la unión de ZRE de alta afinidad. ZnF1 y ZnF2 se unen a Zn²⁺ con menor afinidad que los otros cinco dominios de dedos de Zap1 (Bird et al., 2000).

Zap1 usa cuatro de sus siete dominios de dedos de zinc para contactar el ZRE y dos de estos dominan la interacción al contactar los extremos esenciales de ACC-GGT. Dos dominios de dedo de Zn (ZF1 y ZF2) no entran en contacto con el DNA, ZF3 puede ser más importante para las interacciones proteína-proteína entre dedos. Los dedos 4 y 7 hacen contacto con los extremos ACC-GGT, mientras que los dedos 5 y 6 hacen contacto con la secuencia central de ZRE de 5 pb (Evans-Galea et al., 2003).

De los dedos 4 a 7, el 4 y, en menor medida, el 7 desempeñan los papeles principales en el contacto con la ZRE. Las mutaciones en estos dedos redujeron en gran medida la afinidad de Zap1 por el ZRE de tipo silvestre. Las mutaciones en los dedos 5 y 6 tuvieron poco efecto, lo que sugiere que estos dedos son mucho menos importantes en la unión específica del sitio (Evans-Galea et al., 2003).

La región requerida para la capacidad de respuesta al zinc del dominio de activación de AD1, denominada 'ZRDAD1, se asignó a los residuos 182–502. AD1 está incrustado dentro de su dominio sensible al zinc más grande. Se identificaron residuos clave dentro de ZRDAD1 requeridos para su regulación por zinc. La mayoría de estos residuos son cisteínas e histidinas que potencialmente podrían servir como ligandos de Zn (II). Tanto la AD1 como la AD2 son fundamentales para el control total de la expresión génica en respuesta al zinc. La regulación de AD2 por zinc requiere un par de dedos de zinc C2H2 adicionales, ZF1 y ZF2. AD2 se encuentra dentro de los puntos finales de ZF2. AD2 está activo cuando el zinc no está unido a estos dedos y esta función de activación es inhibida por la unión de Zn (2+) tanto a ZF1 como a ZF2. Por tanto, ZF1 y ZF2 pueden servir como sensores de zinc para controlar la función AD2. AD1 se localizó en los residuos 332-402 (Drysdale et al., 1995; Triezenberg, 1995).

Los residuos en ZRDAD1 que son importantes para la capacidad de respuesta del zinc de AD1 son: C202, C203, H207 y H461–464, como particularmente críticos. La mutación de estos residuos afecta en gran medida la capacidad de respuesta del zinc. AD1 es menos activo en células limitadas en zinc bajo estrés por calor y AD2 juega un papel más importante en esas condiciones. Estos resultados sugieren que AD2 puede contribuir más a la función de Zap1 cuando la deficiencia de zinc se combina con otras tensiones ambientales. La respuesta al choque térmico se induce en condiciones de deficiencia severa de zinc (Frey y Eide, 2011). AD1 juega el papel principal en todos los promotores regulados por Zap1. Con respecto a la función de AD2, los genes diana de Zap1 se clasifican en dos clases generales, aquellos genes que son activados de manera eficiente por AD2 y aquellos en los que AD2 está inactivo. AD2 es un dominio más débil que AD1 y esto puede explicar por qué es menos capaz de activar algunos promotores. AD2 puede ser necesario para ayudar a AD1 cuando la deficiencia de zinc se combina con otras tensiones como el estrés por calor (Frey y Eide, 2012).

En abundancia de zinc, el almacenamiento de zinc está mediado por dos transportadores en la membrana vacuolar, Cot1p y Zrc1p. En condiciones de deficiencia de zinc, las reservas vacuolares de zinc se movilizan mediante la actividad de Zrt3p, un transportador de la familia ZIP en la membrana vacuolar. *ZRC1* también

es inducido por Zap1p durante la deficiencia de zinc como una medida protectora para las células expuestas a un influjo repentino de zinc producido por la expresión de sistemas de absorción en niveles altos (MacDiarmid, 2000).

Fet4p es un transportador de metales de baja afinidad y amplia especificidad, cuya expresión es inducida por Zap1p en condiciones limitantes de zinc. Zrg17p, parte de un transportador heterodimérico con Msc2p que transfiere zinc desde el citosol a la luz del ER, y miembro de la familia de bombas de eflujo de facilitadores de difusión de cationes, también está regulado por zinc directamente a través de Zap1p (*ZAP1* / *SGD*, s. f.).

ZAP1 también puede regular otros genes implicados en la utilización de fuentes de fosfato y carbono (*PHO13* y *ADH4*), el control de la biosíntesis de aminoácidos (*MET30*) y el transporte de cationes intracelulares (*PMR2* y *ZRC1*). Muchas proteínas dependientes de zinc se encuentran dentro de orgánulos, por ejemplo, mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.; por lo tanto, es importante que el zinc se transporte a estos orgánulos de manera eficiente. Como se describió anteriormente, Zrc1p puede cumplir este papel en la vacuola. Varios otros genes en nuestra lista de objetivos de Zap1p también codifican proteínas transportadoras de zinc potenciales, incluidas *YNR039c* y *YOL002c* (Zhao y Eide, 1997).

DPP1 (*ZRG1*) depende completamente de la función de *ZAP1*, lo que sugiere un papel en la homeostasis del zinc (Zhao y Eide, 1996). La estructura de la proteína *DPP1* sugirió un papel en el transporte de zinc, con seis dominios transmembrana y un conjunto altamente conservado de tres residuos de histidina (Toke et al., 1998).

La movilización del zinc almacenado en la vacuola está mediada por el transportador Zrt3p (MacDiarmid et al., 2000). La expresión de *ZRT1*, *ZRT2* y *ZRT3* aumenta en las células limitadas en zinc. Esta inducción está mediada por el activador transcripcional Zap1p. Un solo ZRE es suficiente para conferir expresión dependiente de Zap1p (MacDiarmid et al., 2000; Zhao et al., 1998).

Las isoenzimas (Adh1p, Adh2p, Adh3p y Adh5p) en *S. cerevisiae* utilizan zinc como cofactor. Por el contrario, Adh4p puede utilizar hierro en lugar de zinc. Las cuatro isoenzimas de ADH dependientes de zinc se expresan a niveles más bajos en

condiciones limitantes de zinc. Varias enzimas involucradas en el metabolismo del etanol (p. Ej., Las aldehído deshidrogenasas codificadas por *ALD2* y *ALD3* también se ven afectadas de manera dependiente de Zap1p, lo que sugiere que esta vía bioquímica es particularmente sensible a la deficiencia de zinc). La proteína *ADH4* se ha caracterizado como una alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc que se pensó que se expresaba mínimamente (Drewke y Ciriacy, 1988). La inducción de la expresión de *ADH4* en condiciones de bajo contenido de zinc sugiere que esta proteína funciona en estas condiciones como respaldo de la alcohol deshidrogenasa fuertemente expresada codificada por *ADH1*. Durante la inanición de zinc, se requiere Zap1 para la represión de la expresión de *ADH1*. *ADH1* codifica la principal alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc que se utiliza durante la fermentación. Durante la inanición de zinc, Zap1 se une río arriba del activador Zap1 e induce una transcripción de RNA intergénica, *ZRR1*. La expresión de *ZRR1* conduce al desplazamiento transitorio de Rap1 del promotor *ADH1* que da como resultado la represión de *ADH1*. *ADH3*, la principal alcohol deshidrogenasa mitocondrial, está regulada de manera similar a *ADH1*. Por lo tanto, durante la deficiencia de zinc, Zap1 media la represión de dos de las enzimas que requieren zinc más abundantes. Adh1 y Adh3 que contienen Zn están reprimidos en células limitadas con zinc, mientras que el gen de la alcohol deshidrogenasa similar al hierro, *ADH4*, se induce al máximo. Adh4 es la única alcohol deshidrogenasa en levadura que se asemeja a las alcohol deshidrogenasas que contienen hierro. Aunque los ligandos de unión al hierro se conservan en Adh4, la purificación de Adh4 de *S. cerevisiae* reveló la presencia de zinc unido y no de hierro. Además, los estudios de reconstitución de Adh4 *in vitro* demostraron que solo el Zn (II) y no el Fe (II) podían activar la enzima (Drewke y Ciriacy, 1988; Lyons et al., 2000; Bird et al., 2006).

La localización nuclear de Zap1 no cambia en respuesta al zinc, lo que sugiere que el zinc regula la unión al DNA y / o la función del dominio de activación. Es probable que el zinc nuclear esté en equilibrio con la reserva citoplasmática porque el ión metálico probablemente puede difundirse sin obstáculos a través de grandes estructuras de canales que se encuentran en los complejos de poros nucleares (Paine et al., 1975; Hinshaw et al., 1992).

El agotamiento de zinc del medio de crecimiento de las células de tipo silvestre da como resultado cambios en el metabolismo de los fosfolípidos, incluido un aumento en el contenido de fosfatidilinositol (Iwanyshyn et al., 2004). Se examinaron los efectos del agotamiento del zinc sobre la regulación de la fosfatidilinositol sintasa codificada por *PIS1*, la enzima que cataliza la formación de fosfatidilinositol a partir de CDP-diacilglicerol e inositol. La regulación de la expresión del gen *PIS1* por la depleción de zinc estaba mediada por el factor de transcripción regulado por zinc Zap1p. La actividad de la PI sintasa está elevada en las células con depleción de zinc (Iwanyshyn et al., 2004; Han et al., 2005).

La regulación de la etanolamina cinasa mediada por zinc y la síntesis de fosfolípidos a través de la rama CDP-etanolamina de la vía Kennedy están controladas en parte por Zap1p. Esa regulación por depleción de zinc no se perdió totalmente en el mutante *zap1Δ* se indicó que factores de transcripción adicionales estaban involucrados en la regulación de *EK11* por zinc (Kersting y Carman, 2006).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* también experimenta estrés oxidativo cuando tiene deficiencia de zinc. El gen *TSA1* es uno de esos objetivos de Zap1p cuya expresión aumenta con la deficiencia de zinc. *TSA1* codifica una peroxidasa citosólica dependiente de tiorredoxina responsable de degradar el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos (Wu et al., 2007).

El agotamiento de zinc dio como resultado una inducción de la expresión de *CK11* dependiente de la concentración. Esta regulación fue mediada por el activador transcripcional inducible por zinc y sensible al zinc Zap1p (Soto y Carman, 2008).

Existe un mecanismo de represión génica mediada por Zap1 mediante el cual la transcripción de los genes *MET3*, *MET14* y *MET16* se reprime en células limitadas en zinc. Estos genes codifican las tres primeras enzimas de la vía de asimilación de sulfatos. *MET30*, que codifica un componente de la ubiquitina ligasa SCF_{Met30}, es un gen diana directo de Zap1. La expresión de *MET30* aumenta en células limitadas en zinc, y esto conduce a la degradación de Met4, un factor de transcripción responsable de la expresión de *MET3*, *MET14* y *MET16* cuando los niveles de estos compuestos que contienen azufre son bajos. Esta vía media la conversión de SO_4^{2-}

en metionina, S-adenosilmetionina, cisteína y glutatión. Met4 es inactivada por la ubiquitina ligasa SCFMet30 a través del sistema ubiquitina-proteasoma cuando estos compuestos se acumulan a niveles altos. Zap1 promueve la degradación de la proteína Met4 en células limitadas en zinc activando la expresión del gen *MET30*. De esta manera, la acumulación de proteína Met4, la expresión de *MET3*, *MET14* y *MET16* y la asimilación de sulfato disminuyen en las células limitadas en zinc. De acuerdo con una disminución en la asimilación de sulfato en las células limitadas en zinc, un estudio anterior sugirió que *SAM3* es un objetivo potencial de la activación de Zap1. *SAM3* codifica una permeasa de S-adenosilmetionina que puede transportar S-adenosilmetionina extracelular al interior de la célula (Rouillon et al., 1999). La S-adenosilmetionina importada podría usarse como fuente de metionina o como fuente de homocisteína para la síntesis de cisteína y glutatión. Por tanto, el aumento de la captación de S-adenosilmetionina extracelular por Sam3 puede evitar la asimilación disminuida de sulfato que se produce en las células limitadas en zinc (Wu et al., 2009).

Las proteínas Msc2 y Zrg17 de *Saccharomyces cerevisiae* son miembros de la familia de transportadores de zinc que facilitan la difusión de cationes. Estas proteínas forman complejos heteroméricos que transportan zinc al RE (retículo endoplásmico). Los niveles de mRNA de *ZRG17* estaban elevados en las células limitadas con zinc de una manera dependiente de Zap1 y también estaban elevados en las células repletas de zinc que expresaban un alelo constitutivamente activo de Zap1. *ZRG17* es un gen blanco directo de Zap1 y su regulación tiene importancia biológica para mantener la función del RE (Wu et al., 2011).

Se ha demostrado que el metabolismo de triacilglicerol (TAG) está regulado por el factor de transcripción Pho4 en condiciones bajas de fosfato (Yadav et al., 2015). La delección del factor de transcripción *ZAP1* mostró un aumento significativo de triacilglicerol (TAG). Encontramos que la expresión de *ETR1*, una enzima involucrada en la vía de síntesis de ácidos grasos mitocondriales (mtFAS), está regulada a la baja en la cepa *zap1Δ*, y la delección de *ETR1* da como resultado un aumento significativo de lípidos neutros. El *ETR1* cataliza la reducción dependiente de NADPH de 2-enoil tioésteres. La vía mtFAS se conserva en eucariotas y produce ácido octanoico, que es un precursor del cofactor ácido lipoico (LA). LA es indispensable para la función de varias enzimas mitocondriales (Schonauer et al., 2009; Hiltunen et al.,

2010). Estudios anteriores demostraron que la delección o los cambios en la expresión de cualquier gen involucrado en mtFAS dieron como resultado mitocondrias rudimentarias que eran deficientes en la competencia respiratoria (Hiltunen et al., 2009). Los genes de la ruta MtFAS en *zap1Δ* mostraron un nivel de expresión comprometido. El *ETR1*, al igual que otros genes diana regulados por Zap1p, tiene una secuencia ZRE en su promotor que responde moderadamente a los cambios en las condiciones del zinc. La regulación de los genes de la vía mtFAS a nivel transcripcional no se comprende bien. *ZAP1* afecta la función mitocondrial a través de la regulación transcripcional de *ETR1*. Una reducción en el nivel de expresión de *ETR1* en ausencia de Zap1p provoca una disminución de la competencia respiratoria debido a alteraciones en la morfología y funciones mitocondriales, lo que a su vez conduce a una acumulación de TAG en la cepa *zap1Δ* (Singh et al., 2016).

UBI4 codifica cinco monómeros de ubiquitina en tándem y es esencial para el crecimiento en condiciones de deficiencia de zinc. Zap1 controla *UBI4* induciendo la transcripción de un promotor intragénico, y el mRNA truncado resultante codifica solo dos de las cinco repeticiones de ubiquitina (MacDiarmid et al., 2016).

4. Objetivo general

Identificar cisteínas susceptibles a modificación postraduccional en nueve proteínas de la familia de dedos de zinc.

5. Objetivos particulares

- Conocer los tipos de modificaciones postraduccionales en las cisteínas.
- Determinar si las cisteínas susceptibles a modificación postraduccional se encuentran en los dominios de dedos de zinc.

6. Procedimiento

Para cumplir con el objetivo principal se siguió el siguiente procedimiento.

6.1 Obtención de las secuencias de proteínas

En la página de Saccharomyces Genome Database se descargaron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA, las cuales se emplearon en los programas mencionados en los objetivos, tales como: AlphaFold, CLUSTAL-OMEGA, KALIGN, T-COFFEE, MAFFT, MUSCLE y IUPred2A.

6.2 Alineamientos de las proteínas de estudio

Se emplearon cinco plataformas (CLUSTAL-OMEGA, KALIGN, T-COFFEE, MAFFT y MUSCLE) para realizar los alineamientos de las proteínas *ACE2*, *AZF1*, *COM2*, *MET31*, *MIG1*, *MIG3*, *RIM101*, *RPH1* y *ZAP1*. En todos los programas, se colocaron las secuencias de las proteínas de interés en una sola corrida y se obtuvieron los alineamientos. Se eligieron los que obtuvieron una mejor alineación

6.3 Obtención de los modelos tridimensionales de las proteínas

Una vez obtenidas las secuencias de aminoácidos de Saccharomyces Genome Database, se insertaron en el software de AlphaFold, el cual predice las estructuras tridimensionales de las secuencias de aminoácidos a partir de un sistema de inteligencia artificial desarrollado por la empresa DeepMind (Jumper et al.,2021).

6.4 Visualización y manipulación de los modelos para la identificación de cisteínas de interés

Los modelos obtenidos en la página web de AlphaFold se visualizaron en el programa PyMOL, el cual es un software que permite la visualización y la manipulación de las estructuras tridimensionales de las proteínas.

Se identificaron las cisteínas que cumplan con todas las siguientes características:

1. Aquellas que se encuentran en la superficie.

2. Tienen aminoácidos básicos (Arg, Lys e His) o aromáticos (Tyr, Phe, Trp e His) a menos de 7 Å de distancia entre el azufre del grupo tiol de la cisteína y el último átomo del grupo funcional del aminoácido de interés.
3. Pueden sufrir alguna modificación postraduccional en medio oxidante o reductor.

6.4.1 Cisteínas sensibles al medio oxidante o reductor

La plataforma de IUPred2A (por sus siglas en inglés Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins) identifica regiones de proteínas intrínsecamente desordenadas basándose en un modelo basado en la biofísica, el cual permite calcular la energía de cada residuo en función de sus interacciones con otros residuos en contacto en la estructura, con base en la estimación de energía, los residuos que tienen energías favorables se pronostican ordenados y los residuos con energías desfavorables se pronostican desordenados. El usuario puede ingresar cualquier secuencia de proteína e IUPred2A devuelve una puntuación entre 0 y 1 para cada residuo, correspondiente a la probabilidad de que el residuo dado sea parte de una región desordenada. Los residuos con una puntuación predicha superior a 0,5 se consideran desordenados, mientras que los residuos con puntuaciones más bajas se consideran ordenados. Se basa en las cisteínas para predecir las regiones desordenadas que se ven afectadas por el ambiente reductor u oxidante en el que se encuentra la cisteína. En condiciones reductoras, los residuos de cisteína pueden comportarse como aminoácidos polares, muy similares a la serina. Las cisteínas pueden desempeñar funciones esenciales en la estabilización de la conformación plegada mediante la coordinación de iones Zn^{2+} en condiciones reductoras, o mediante la formación de enlaces disulfuro que suelen utilizar las proteínas extracelulares que experimentan condiciones oxidativas (Mészáros et al., 2018).

En IUPred2A los residuos de cisteína se cambian a serina en la secuencia de aminoácidos. Así, se generan dos perfiles de predicción de desorden, uno correspondiente al estado que se logra a través de la estabilización de cisteína (redox-plus) y otro sin estabilización de cisteína (redox-minus), modelados por un intercambio de cisteína/serina. En muchos casos, los dos perfiles no difieren significativamente. Sin embargo, la suposición es que, en el caso de proteínas redox condicionalmente

desordenadas, los dos perfiles estarían separados y resaltarían regiones sensibles a redox (zonas de color lila) en función de sus diferentes tendencias de desorden. Estas regiones se definen cuando la línea redox-menos (con cisteína) predice el desorden para una región mínima de 10 residuos, mientras que el perfil redox-más (con serina) no predice ningún desorden para la misma región (Mészáros et al., 2018).

IUPred2A ofrece tres tipos diferentes de predicción de trastornos, cada uno con diferentes parámetros optimizados para aplicaciones ligeramente diferentes. Estos son: desorden largo, desorden corto y dominios estructurados. En la opción del desorden largo predice el desorden estructural global que abarca al menos 30 residuos consecutivos de la proteína. En el desorden corto, IUPred2A predice regiones desordenadas cortas, como residuos faltantes en la estructura de rayos X de una proteína globular. En los dominios estructurados, el algoritmo encuentra regiones continuas ordenadas. Las regiones vecinas cercanas entre sí se fusionan, mientras que las regiones más cortas que el tamaño de dominio mínimo de al menos 30 residuos se ignoran. Cuando se selecciona este tipo de predicción, se devuelven las regiones previstas para corresponder a dominios estructurados/globulares.

Con la plataforma de IUPred2A se buscaron aquellas cisteínas que en medio oxidante pudieran ser inestables, para ello, se insertaron las secuencias de aminoácidos en tres opciones (desorden largo, desorden corto y dominios estructurados) y se obtuvo una lista de todos los aminoácidos, aquellos que tienen un 1 en lugar de un 0 (Figura 16, Figura 18 y Figura 20) son aquellos que son sensibles en medio oxidante y son de interés para este estudio, en particular las cisteínas. Además, se obtuvieron gráficas donde se señala la sensibilidad al medio oxidante en la secuencia de la proteína (Figura 17, Figura 19 y Figura 21).

15/3/2021

<https://iupred2a.elte.hu/raw%3F3077679>

```
# IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding
# Balint Meszaros, Gabor Erdos, Zsuzsanna Dosztanyi
# Nucleic Acids Research 2018, Submitted
# IUPred2 type: long
# POS  AMINO ACID      IUPRED2 REDOX PLUS      IUPRED2 REDOX MINUS      REDOX REGION
```

| | | | | |
|-----|---|--------|--------|---|
| 616 | R | 0.2849 | 0.4619 | 0 |
| 617 | R | 0.3494 | 0.5382 | 0 |
| 618 | Y | 0.3667 | 0.5533 | 0 |
| 619 | N | 0.3599 | 0.5493 | 0 |
| 620 | I | 0.3494 | 0.5342 | 0 |
| 621 | R | 0.4766 | 0.5456 | 0 |
| 622 | S | 0.4864 | 0.5533 | 0 |
| 623 | H | 0.4051 | 0.4685 | 0 |
| 624 | I | 0.4507 | 0.5211 | 0 |
| 625 | Q | 0.4292 | 0.6427 | 1 |
| 626 | T | 0.4330 | 0.6427 | 1 |
| 627 | H | 0.3321 | 0.5139 | 1 |
| 628 | L | 0.3426 | 0.5296 | 1 |
| 629 | Q | 0.4186 | 0.6269 | 1 |
| 630 | D | 0.3053 | 0.6089 | 1 |
| 631 | R | 0.3704 | 0.6991 | 1 |
| 632 | P | 0.3631 | 0.6906 | 1 |
| 633 | Y | 0.3460 | 0.6661 | 1 |

Figura 16. Resultados de long disorder en ACE2 de IUPred2A

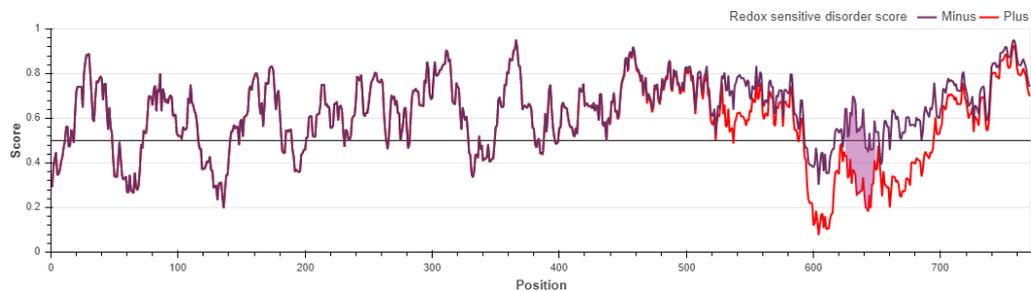


Figura 17. Gráfica de long disorder de ACE2

15/3/2021

<https://iupred2a.elte.hu/raw%3F8258045>

IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding
 # Balint Meszaros, Gabor Erdos, Zsuzsanna Dosztanyi
 # Nucleic Acids Research 2018, Submitted

IUPred2 type: short

| # POS | AMINO ACID | IUPRED2 | REDOX PLUS | IUPRED2 | REDOX MINUS | REDOX REGION |
|-------|------------|---------|------------|---------|-------------|--------------|
| 622 | S | 0.2786 | 0.4078 | 0 | | |
| 623 | H | 0.2122 | 0.3456 | 0 | | |
| 624 | I | 0.2748 | 0.4037 | 0 | | |
| 625 | Q | 0.2255 | 0.4781 | 1 | | |
| 626 | T | 0.2167 | 0.4651 | 1 | | |
| 627 | H | 0.1416 | 0.3762 | 1 | | |
| 628 | L | 0.1667 | 0.4037 | 1 | | |
| 629 | Q | 0.2255 | 0.4703 | 1 | | |
| 630 | D | 0.1266 | 0.4600 | 1 | | |
| 631 | R | 0.1698 | 0.5253 | 1 | | |
| 632 | P | 0.1805 | 0.5331 | 1 | | |
| 633 | Y | 0.1566 | 0.5173 | 1 | | |
| 634 | S | 0.1150 | 0.4458 | 1 | | |
| 635 | C | 0.1205 | 0.4600 | 1 | | |
| 636 | D | 0.1178 | 0.4458 | 1 | | |
| 637 | F | 0.1205 | 0.4556 | 1 | | |

Figura 18. Resultados de Short disorder en IUPred2A de ACE2

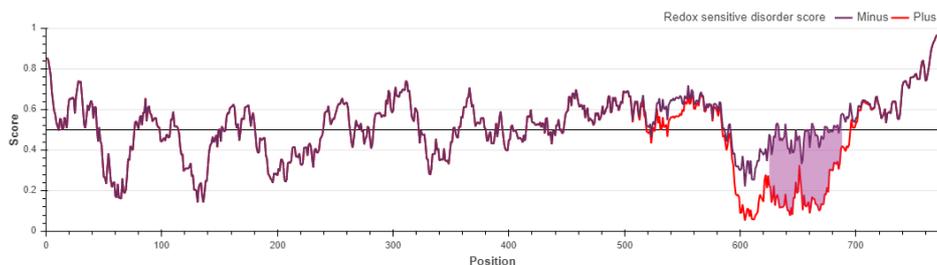


Figura 19. Gráfica de Short disorder en ACE2

15/3/2021 <https://iupred2a.elte.hu/raw%3F2080392>

IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding
 # Balint Meszaros, Gabor Erdos, Zsuzsanna Dosztanyi
 # Nucleic Acids Research 2018, Submitted
 # IUPred2 type: glob

| # POS | AMINO ACID | IUPRED2 | REDOX PLUS | IUPRED2 | REDOX MINUS | REDOX REGION |
|-------|------------|---------|------------|---------|-------------|--------------|
| 1 | M | 0.3494 | 0.3494 | 0 | | |
| 2 | D | 0.3667 | 0.3667 | 0 | | |
| 3 | N | 0.4051 | 0.4051 | 0 | | |
| 4 | V | 0.4256 | 0.4256 | 0 | | |
| 5 | V | 0.4685 | 0.4685 | 0 | | |
| 6 | D | 0.4979 | 0.4979 | 0 | | |
| 7 | P | 0.5296 | 0.5296 | 0 | | |
| 8 | W | 0.5620 | 0.5620 | 0 | | |
| 9 | Y | 0.5055 | 0.5055 | 0 | | |

Figura 20. Resultados de Structured Domains de ACE2 en IUPred2A



Figura 21. Gráfica de Structured Domains de ACE2 en IUPred2A

Cuando se obtuvieron los resultados de IUPred2A para todas las proteínas se recopilaron en una tabla aquellas cisteínas sensibles al medio redox. Estas cisteínas se localizaron en los modelos de las proteínas con ayuda del programa PyMOL.

5.4.2 Cisteínas en superficie y con aminoácidos básicos y aromáticos cercanos

Se identificaron aminoácidos básicos y aromáticos que estuvieran a 7 Å de distancia del grupo tiol de las cisteínas y se recopilaron las cisteínas con sus respectivos aminoácidos vecinos (básicos y aromáticos) en las tablas de la sección de resultados.

Aquellas cisteínas que no tuvieran ese tipo de aminoácidos a esa distancia se descartaron. Solamente se seleccionaron las cisteínas que estuvieran en la superficie.

Para encontrar los aminoácidos que se encuentran alrededor se empleó la herramienta “wizard” en PyMOL, la cual te permite medir la distancia entre los átomos que conforman la proteína (Figura 22).

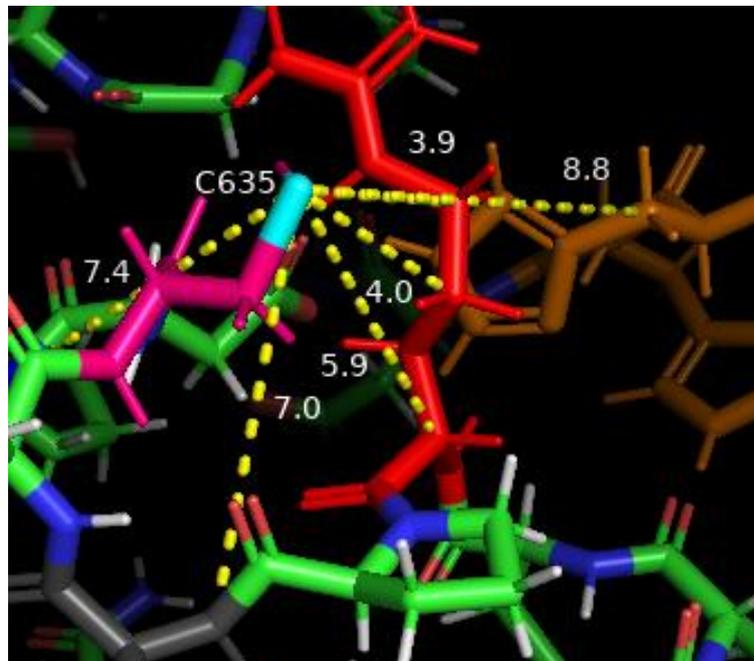


Figura 22. Ejemplo de mediciones con wizard en PyMOL (PyMOL,2021)

6.5 Cambio de cisteína a serina *in silico*

Las cisteínas que tuvieron las características de estar en la superficie, que tienen aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms y son sensibles en medio oxidante se cambiaron por serinas (*in silico*) y se evaluó la estructura obtenida en IUPred2A. Esto con el fin de averiguar qué cisteínas son más sensibles en medio oxidante, estas cisteínas se pueden identificar porque al ser cambiadas por serinas, la región sensible al medio oxidante que ocasiona la cisteína se elimina parcial o totalmente de la gráfica. Lo anterior se realiza para evaluar en un futuro las modificaciones postraduccionales que pueden tener.

7. Resultados

7.1 Alineamientos

Se realizaron alineamientos de las 9 proteínas de estudio en programas de alineación de secuencias múltiples: Clustal Omega, Kalign, Muscle, T-COFFEE y MAFFT

7.1.1 CLUSTAL OMEGA

| | | |
|--------|--|-----|
| MIG3 | -----MNYLRDRFPPDNDQRPFRCE--ICSRGFHRLEHK | 32 |
| MIG1 | ---MQSPYPMTQ--VSNVDDGSLLESKSKSKVAAKSEAPRPHACP--ICHRAFHRLEHQ | 53 |
| ACE2 | DKLFECLYPNCNKVFK-----RRYNIRSHIQTHLQDRPYSCDFPGCTKAFVRNHDL | 650 |
| RIM101 | -----LCHDHVGR-----KSHKNLQLNCHWGDCTTKTEKRDHI | 199 |
| COM2 | PSPSVQSSSSSHGLVVRKKTGS--MQKTRGRKPSLIPDASKQFGCE--FCDRRFKRQEHL | 404 |
| AZF1 | VKKHECP--YCHRLF-----SQATHLEVHVRSHIGYKPFVCD--YCGKRFTQGQNL | 636 |
| ZAP1 | YKPYKCK--TCKRCF-----SSEETLVQHTRTHSGEKPYKCH--ICNKKFAISSSL | 811 |
| RPH1 | -----F-----A-----PEEIVLSGKNKIYICK--ECQRFKSSGHHL | 724 |
| MET31 | -----GGNNHSEGAQLYSCA--KCQLKFSRSSDL | 110 |
| | * * | |
| MIG3 | KRHG-RTHTGEKPHKCTVQGCPKSFSRSDELKRHLRTHTKGVQRRRIKS---KGSRKT-- | 86 |
| MIG1 | TRHM-RIHTGEKPHACDFPGCVKRFSRSEDLTRHRIHTNSHPRGKR-----GRKKK-- | 104 |
| ACE2 | IRHK--ISHNAKKYIC---PCGKRNFREDALMVHRSRMICTGGKKLE----- | 692 |
| RIM101 | TSHL-RVHVPLKPFGCS--TCSKKFKRPQDLKKHLKIHLESGGILKRKRGPKWGSKRTSK | 256 |
| COM2 | KRHVRSLSHMCEKPF TCH--ICNKNFSRSDNLNQHVKTHASL----- | 443 |
| AZF1 | RTHE-RLHTGEKPYSCD--ICDKKFSRKGNLAAHLVTHQKLPFVCK----- | 680 |
| ZAP1 | KIHI-RTHTGEKPLQCK--ICGKRNFESSNLSKHIKTHQKKYK----- | 851 |
| RPH1 | TRHKKSVHSGEKPHSCP--KCGKRFRRDHVLQHLNKK---IP----- | 762 |
| MET31 | RRHE-KVHSLVLPHICS--NCGKGFARKDALKRHSNT---LT----- | 146 |
| | * * * * * ; * | |

Figura 23. Alineamiento de las proteínas ACE2, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1, por medio de la plataforma CLUSTAL OMEGA

Se puede observar en los alineamientos de la figura 23 que las Cys e His (ambas de color verde) se marcan con asteriscos, además de Lys (color morado) y Phe (color rojo).

7.1.2 T-COFFEE



Figura 24. Alineamiento de las proteínas ACE2, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1, por medio de la plataforma T-COFFEE

Las zonas marcadas con asteriscos muestran las Cys, His, Phe y Lys alineadas (Figura 24).

7.2 Identificación de cisteínas de interés

Tabla 2. Cisteínas sensibles al medio oxidante en las proteínas ACE, AZF1, COM2, MET31, MIG1, MIG3, RIM101, RPH1 y ZAP1

| Proteína | Cisteínas |
|----------|---|
| ACE2 | C635, C640, C664, C666, C685 |
| AZF1 | C595, C598, C623, C626, C651, C654, C679, C684 |
| COM2 | C391, C394, C414, C420, C423 |
| MET31 | C97, C100, C125, C128, C147 |
| MIG1 | C40, C43, C68, C73 |
| MIG3 | C19, C22, C47, C52 |
| RIM101 | C148, C153, C168, C184, C189, C214, C217, C261, C269 |
| RPH1 | C711, C714, C740, C743, C763 |
| ZAP1 | C96, C102, C108, C192, C194, C202, C203, C256, C286, C290, C294, C323, C326, C335, C352, C387, C570, C581, C586, C590, C618, C623, C631, C639, C670, C707, C712, C740, C745, C770, C773, C776, C798, C801, C826, C829, C852, C855, C872 |

Las cisteínas sensibles al medio oxidante se localizaron con ayuda del programa IUPred2A, se puede notar en la Tabla 2 que existen más de una cisteína con esta característica.

Tabla 3. Cisteínas sensibles al medio oxidante en las proteínas *ACE*, *AZF1*, *COM2*, *MET31*, *MIG1*, *MIG3*, *RIM101*, *RPH1* y *ZAP1* que se encuentran en la superficie

| Proteína | Cisteínas |
|---------------|------------------------------------|
| <i>ACE2</i> | C664, C666 |
| <i>AZF1</i> | C651, C654 |
| <i>COM2</i> | C420, C423 |
| <i>MET31</i> | C97, C100, C125, C128, C147 |
| <i>MIG1</i> | C40, C43 |
| <i>MIG3</i> | C19, C22, C52 |
| <i>RIM101</i> | C148, C153, C184, C189 |
| <i>RPH1</i> | C711, C714, C740, C743 |
| <i>ZAP1</i> | C581, C586, C618, C623, C798, C801 |

Tabla 4. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *ACE2*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 664 | Phe 670 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 664 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 670. |
| | His 679 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 664 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 679. |
| 666 | Lys 668 | 5.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 666 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 668. |
| | Phe 670 | 6.0 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 666 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 670. |
| | His 679 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 666 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 679. |

La proteína *ACE2* tiene dos cisteínas en superficie con aminoácidos (básicos y aromáticos) a menos de 7 angstroms.

Tabla 5. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *AZF1*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 651 | Phe 658 | 6.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 651 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 658. |
| | His 667 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 651 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 667. |
| | His 671 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 651 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 671. |
| 654 | Lys 656 | 5.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 654 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 656. |
| | Phe 658 | 6.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 654 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 658. |
| | His 667 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 654 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 667. |
| | His 671 | 4.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 654 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 671. |

AZF1 tiene 2 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 6. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *COM2*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 420 | His 421 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 420 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 421. |
| | Phe 427 | 6.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 420 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 427. |
| | His 436 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 420 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 436. |
| | His 440 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 420 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 440. |
| 423 | Lys 425 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 423 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 425. |

| | |
|---------|--|
| Phe 427 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 423 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 427. |
| His 436 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 423 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 436. |
| His 440 | 3.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 423 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 440. |

COM2 tiene 2 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 7. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *MET31*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|---|
| 97 | His 113 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 97 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 113. |
| | His 117 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 97 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 117. |
| | Phe 104 | 6.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 97 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 104. |
| 100 | His 113 | 4.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 100 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 113. |
| | His 117 | 6.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 100 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 117. |
| | Phe 104 | 6.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 100 al hidrógeno en posición para del grupo fenil de la Phe 104. |
| 125 | His 141 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 125 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 141. |
| | Phe 132 | 6.8 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 125 al hidrógeno en posición para del grupo fenil de la Phe 132. |
| 128 | Lys 130 | 6.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 128 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 130. |
| | His 141 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 128 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 141. |
| | Phe 132 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 128 al hidrógeno en posición para del grupo fenil de la Phe 132. |

| | | |
|-----|---------|--|
| 147 | His 141 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 147 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 141. |
| | Phe 132 | 6.8 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 147 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 132. |

MET31 tiene 5 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 8. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *MIG1*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|--------|--|
| 40 | Phe 47 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 40 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 47. |
| | His 56 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 40 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 56. |
| | His 60 | 6.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 40 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 60. |
| 43 | Phe 47 | 6.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 43 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 47. |
| | His 56 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 43 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 56. |
| | His 60 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 43 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 60. |

MIG1 tiene 2 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 9. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *MIG3*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|--------|--|
| 19 | Phe 26 | 6.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 19 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 26. |
| | Lys 32 | 6.7 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 19 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 32. |

| | | |
|----|--------|--|
| | His 35 | 3.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 19 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 35. |
| | His 39 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 19 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 39. |
| 22 | Phe 26 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 22 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 26. |
| | His 35 | 3.0 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 22 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 35. |
| | His 39 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 22 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 39. |
| 52 | Lys 54 | 5.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 52 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 54. |
| | His 69 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 52 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 69. |
| | Phe 56 | 6.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 52 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 56. |
| | His 65 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 52 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 65. |

MIG3 tiene 3 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 10. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *RIM101*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 148 | Phe 157 | 6.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 148 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 157. |
| | His 166 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 148 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 166. |
| | His 171 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 148 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 171. |
| 153 | Phe 157 | 6.0 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 153 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 157. |
| | His 166 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 153 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 166. |

| | | |
|-----|---------|--|
| | His 171 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 153 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 171. |
| 184 | His 202 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 184 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 202. |
| | His 206 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 184 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 206. |
| 189 | His 202 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 189 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 202. |
| | His 206 | 3.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 189 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 206. |

RIM101 tiene 4 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 11. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *RPH1*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 711 | Phe 718 | 6.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 711 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 718. |
| | His 727 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 711 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 727. |
| | Lys 728 | 5.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 711 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 728. |
| | His 732 | 3.6 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 711 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 732. |
| 714 | Arg 716 | 5.7 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 714 al hidrógeno del último grupo amino del grupo R de la Arg 716. |
| | Phe 718 | 5.7 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 714 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 718. |
| | His 727 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 714 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 727. |
| | His 732 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 714 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 732. |
| 740 | Phe 747 | 6.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 740 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 747. |

| | | |
|-----|---------|--|
| | His 756 | 3.5 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 740 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 756. |
| 743 | Lys 745 | 5.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 743 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 745. |
| | Phe 747 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 743 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 747. |
| | His 756 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 743 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 756. |

RPH1 tiene 4 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

Tabla 12. Aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms en las cisteínas de interés en *ZAP1*

| Cys | No. AA | Distancia (Å) |
|-----|---------|--|
| 581 | His 599 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 581 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 599. |
| | His 604 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 581 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 604. |
| 586 | His 599 | 3.1 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 586 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 599. |
| | His 604 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 586 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 604. |
| 618 | His 636 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 618 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 636. |
| | His 641 | 3.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 618 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 641. |
| 623 | His 636 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 623 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 636. |
| | His 641 | 3.8 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 623 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 641. |
| 798 | His 799 | 5.9 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 798 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 799. |
| | Phe 805 | 6.4 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 798 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 805. |

| | | |
|-----|---------|--|
| | His 814 | 3.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 798 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 814. |
| | His 818 | 3.8 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 798 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 818. |
| 801 | Lys 803 | 5.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 801 al hidrógeno del amino del grupo R de la Lys 803. |
| | Phe 805 | 6.3 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 801 al hidrógeno en posición para del grupo fenil del grupo R de la Phe 805. |
| | His 814 | 3.2 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 801 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 814. |
| | His 818 | 5.0 Å Del azufre del grupo tiol de la Cys 801 al hidrógeno del nitrógeno del grupo imidazol de la His 818. |

ZAP1 tiene 6 cisteínas en superficie con aminoácidos básicos y aromáticos a menos de 7 angstroms.

7.3 Resultados del programa IUPred2A (cambio de cisteína a serina)

La interfaz de IUPred2A permitió identificar cisteínas sensibles al medio redox (Tabla 13), pues estas cambian la estructura de la proteína. En las gráficas se puede observar cómo zonas de sensibilidad al medio redox, que se muestran de color lila. Si al cambiar estas cisteínas por serinas, las zonas de color lila disminuyen, la cisteína se seleccionaba.

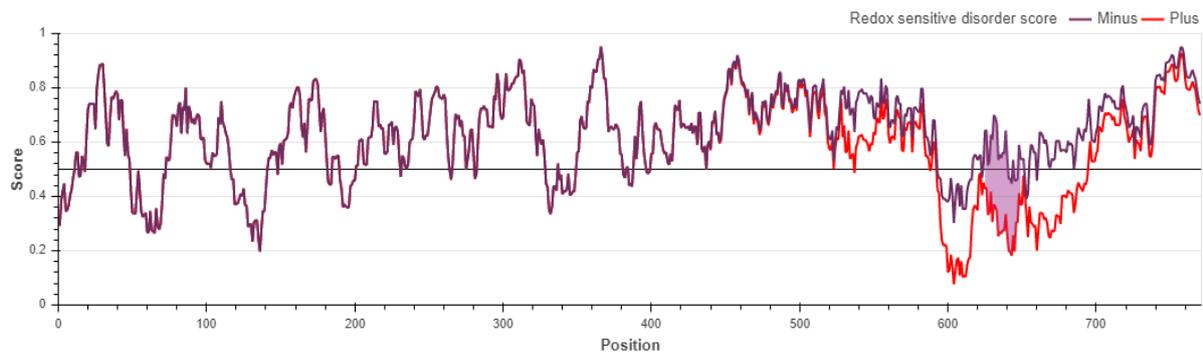
Tabla 13. Cisteínas que son susceptibles a modificaciones postraduccionales

| Proteína | Cisteína (s) |
|-----------------|---------------------|
| <i>ACE2</i> | C664 y C666 |
| <i>AZF1</i> | C651 y C654 |
| <i>COM2</i> | C420 y C423 |
| <i>MET31</i> | C125 y C128 |
| <i>MIG1</i> | C43 |
| <i>MIG3</i> | C22 |
| <i>RIM101</i> | C189 |
| <i>RPH1</i> | C740 y C743 |
| <i>ZAP1</i> | C581 y C586 |

En cada gráfica, el eje de las ordenadas representa la puntuación adimensional de 0 a 1 que indica qué tan desordenadas están las zonas de la proteína, donde 0 significa que hay menor desorden y 1 mayor desorden. En el eje de las abscisas se encuentra la posición de los aminoácidos de la proteína. Los resultados obtenidos que forman la línea de color morado en la gráfica, también denominada “Minus”, representa la predicción del desorden si a la proteína no se le realiza ningún cambio. Por otro lado, la línea de color rojo “Plus” señala el resultado de que a la proteína se le cambiaran las cisteínas por serinas. Las zonas donde ambas líneas se separan, dejan un espacio y se ilumina de color lila indica que hay cisteínas que son sensibles a un medio oxidante, ya que hubo un cambio en la estructura. Además, para cada cisteína que se cambió se obtuvieron 3 gráficas distintas que corresponden regiones largas desordenadas, regiones cortas desordenadas y dominios estructurados.

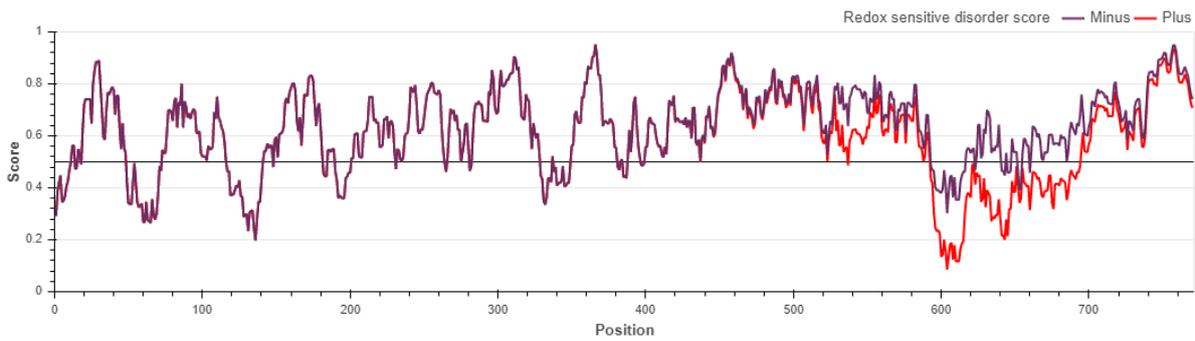
7.3.1 ACE2

Gráfica 1. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 sin mutar en regiones largas desordenadas



Gráfica 2. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 664 por serina en

regiones largas desordenadas

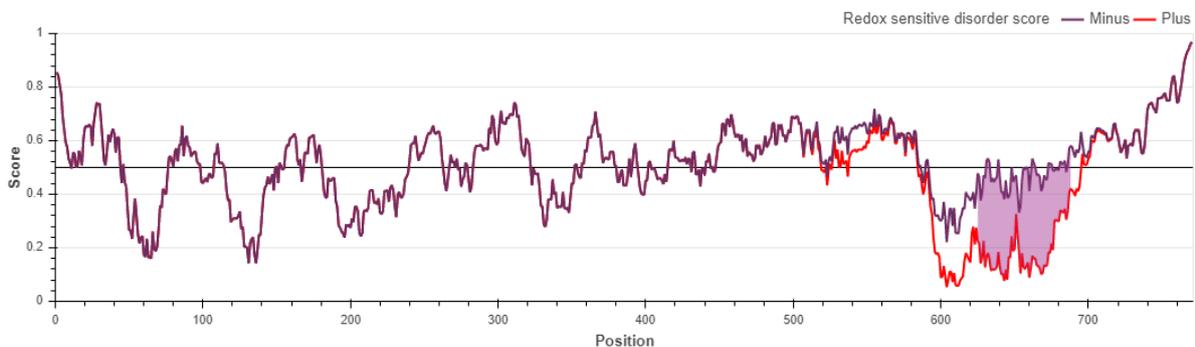


Gráfica 3. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 después de la mutación de la cisteína 666 por serina en regiones largas desordenadas

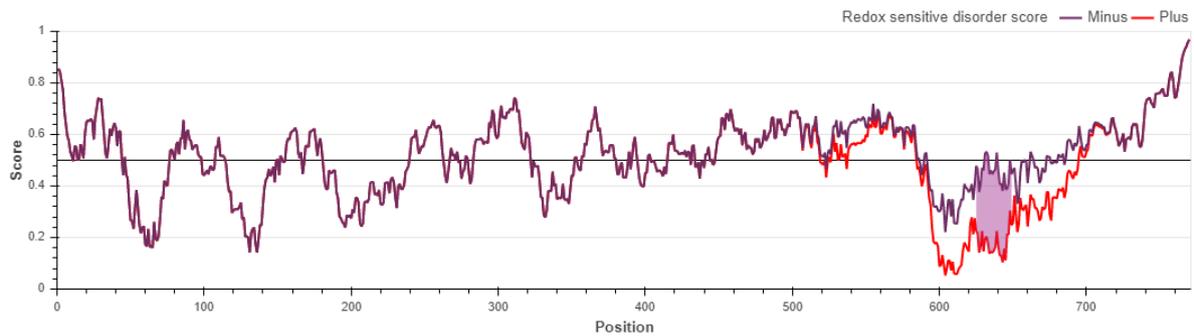


La Gráfica 1 muestra el antes y las Gráficas 2 y 3 el después de que las cisteínas 664 y 666 de ACE2 se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

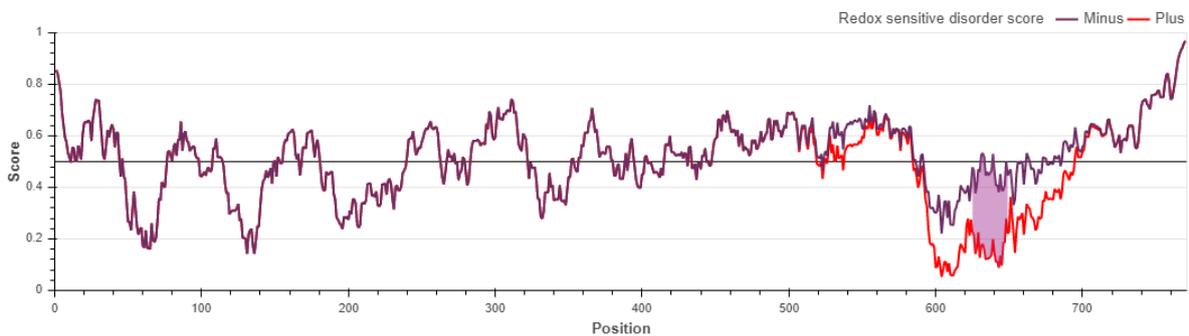
Gráfica 4. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ACE2 sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 5. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ACE2* después de la mutación de la cisteína 664 por serina en regiones cortas desordenadas

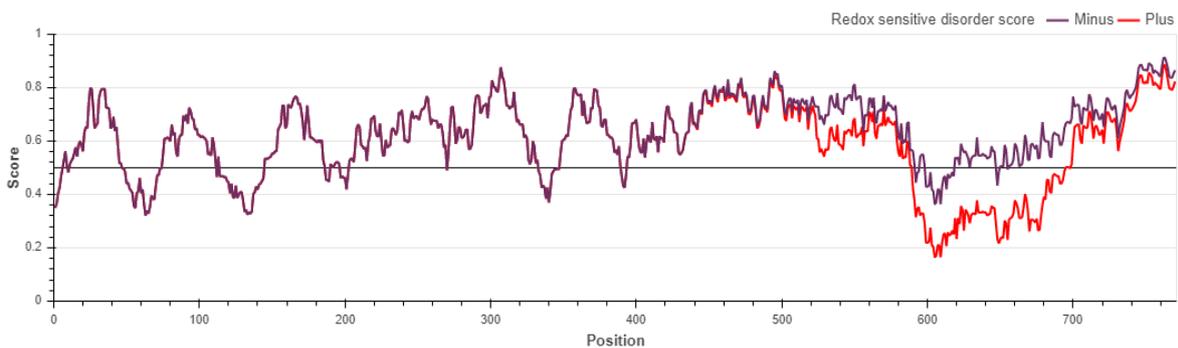


Gráfica 6. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ACE2* después de la mutación de la cisteína 666 por serina en regiones cortas desordenadas



La Gráfica 4 muestra el antes y la Gráfica 5 y 6 el después de que las cisteínas 664 y 666 de *ACE2* se mutaran por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

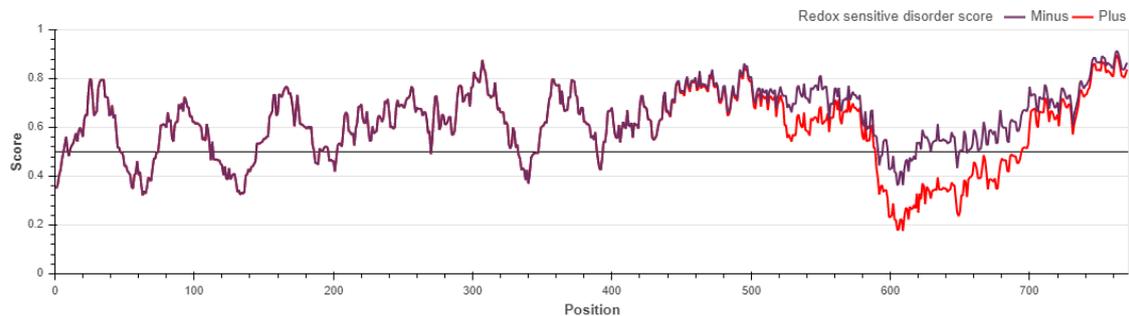
Gráfica 7. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ACE2* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 8. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ACE2* después de la mutación de la cisteína 664 por serina de dominios estructurados



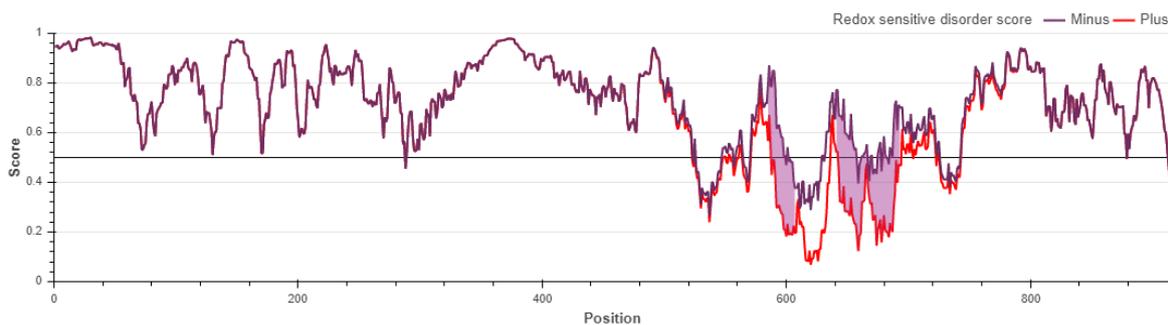
Gráfica 9. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ACE2* después de la mutación de la cisteína 666 por serina de dominios estructurados



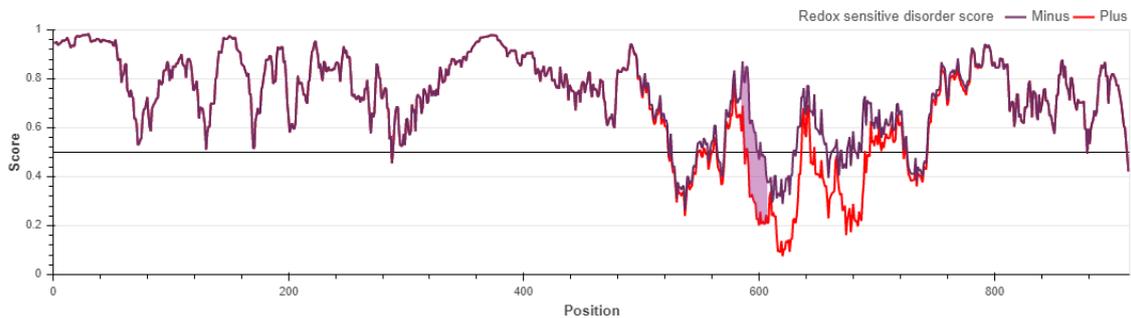
La Gráfica 7 muestra el antes y las Gráficas 8 y 9 el después de que las cisteínas 664 y 666 de *ACE2* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.2 AZF1

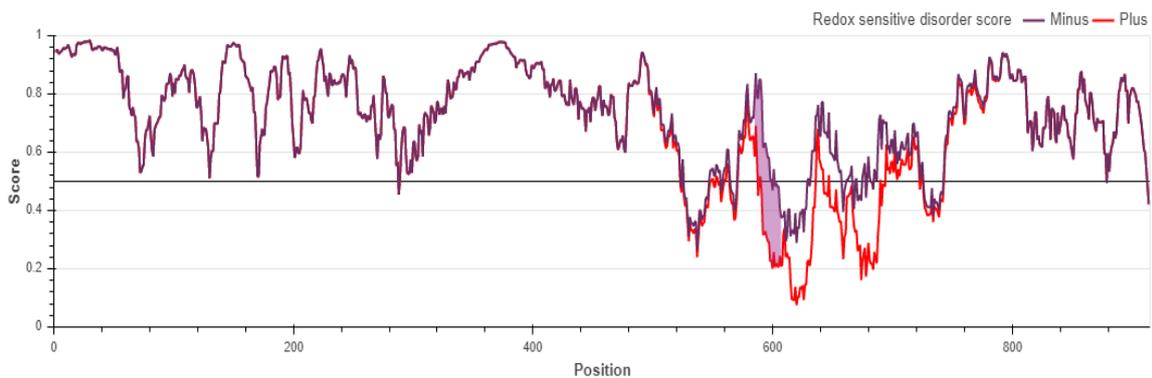
Gráfica 10. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* sin mutar en regiones largas desordenadas



Gráfica 11. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 651 por serina en regiones largas desordenadas

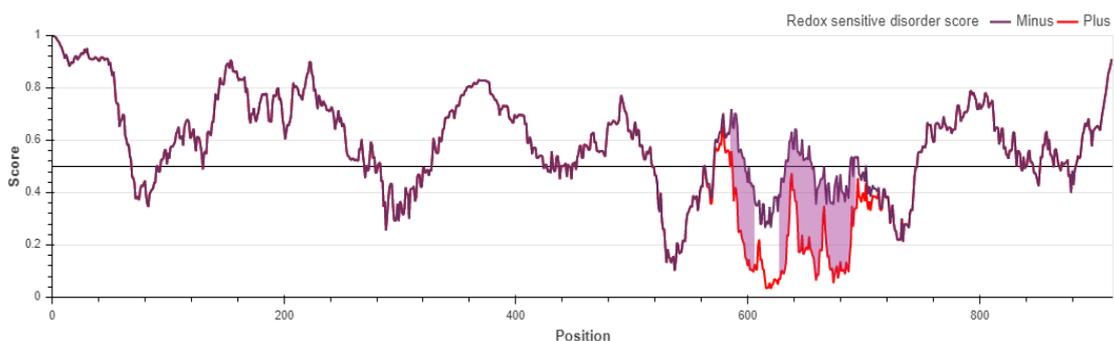


Gráfica 12. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 654 por serina en regiones largas desordenadas

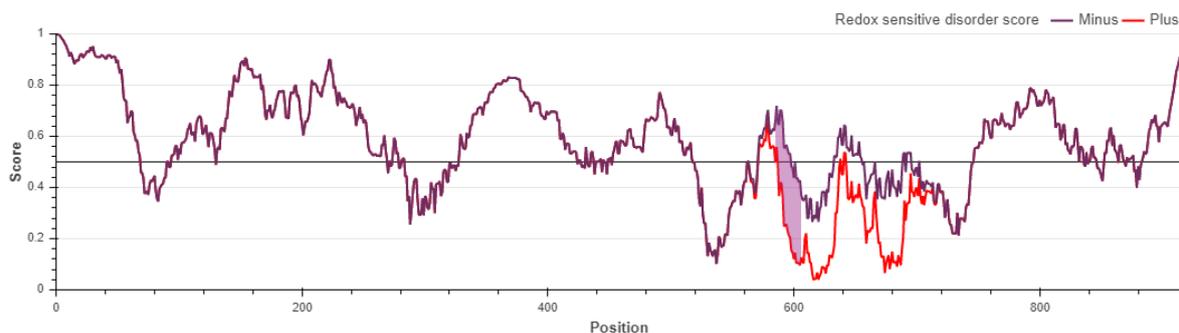


La Gráfica 10 muestra el antes y las Gráficas 11 y 12 el después de que las cisteínas 651 y 654 de *AZF1* se mutaran por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

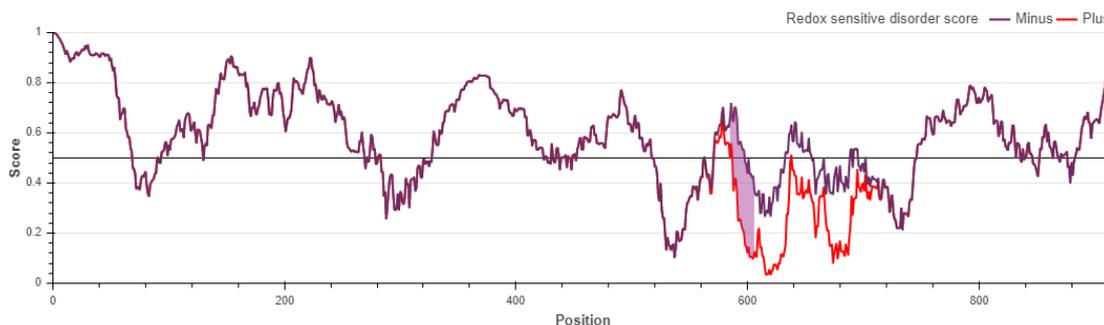
Gráfica 13. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 14. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 651 por serina en regiones cortas desordenadas

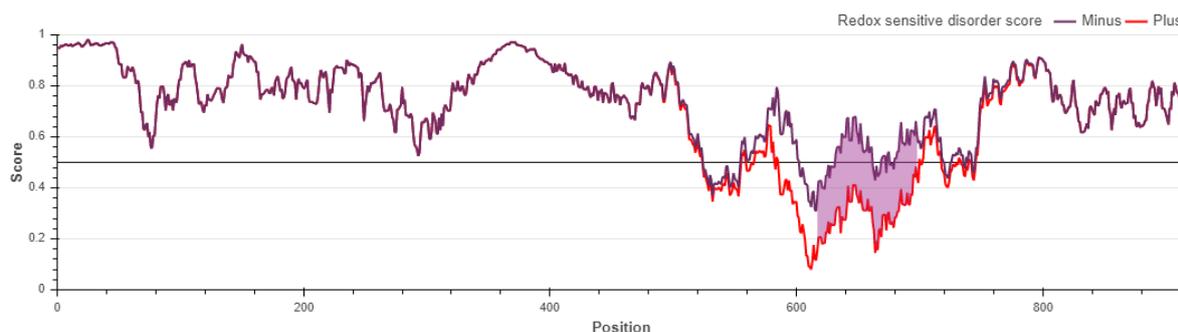


Gráfica 15. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 654 por serina en regiones cortas desordenadas

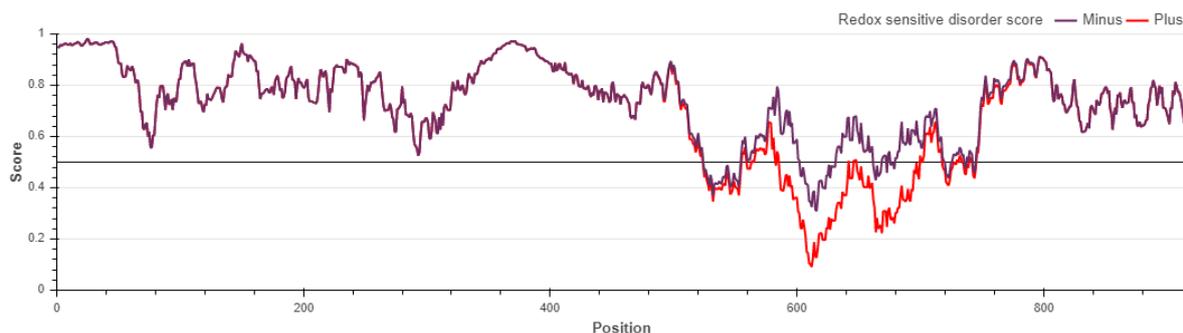


La Gráfica 13 muestra el antes y las Gráficas 14 y 15 el después de que las cisteínas 651 y 654 de *AZF1* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

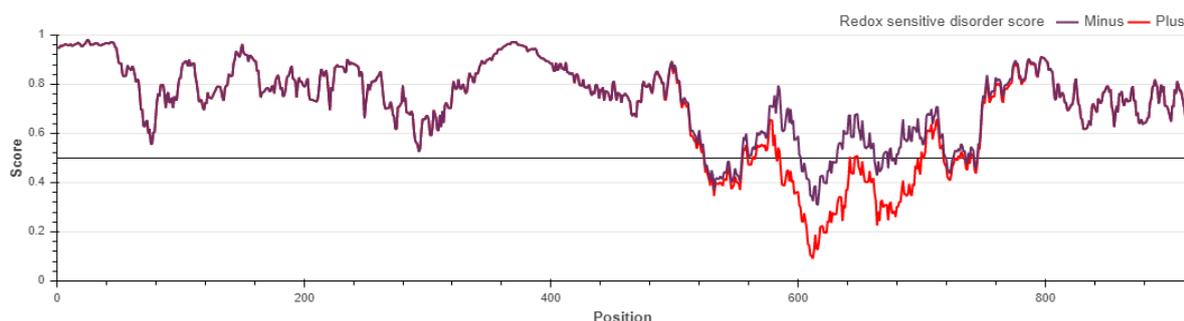
Gráfica 16. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 17. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 651 por serina en dominios estructurados



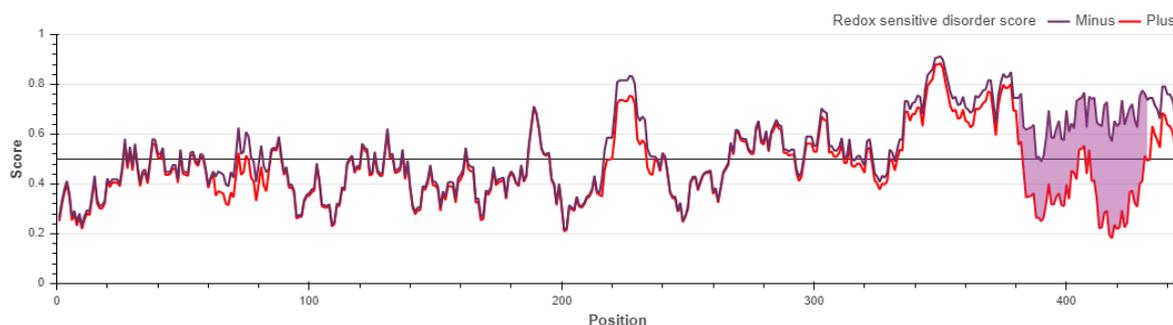
Gráfica 18. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *AZF1* después de la mutación de la cisteína 654 por serina en dominios estructurados



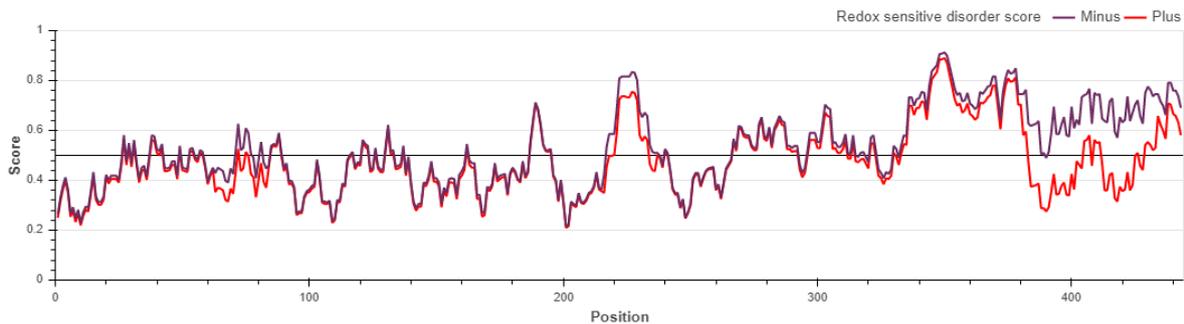
La Gráfica 16 muestra el antes y las Gráficas 17 y 18 el después de que las cisteínas 651 y 654 de *AZF1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.3 *COM2*

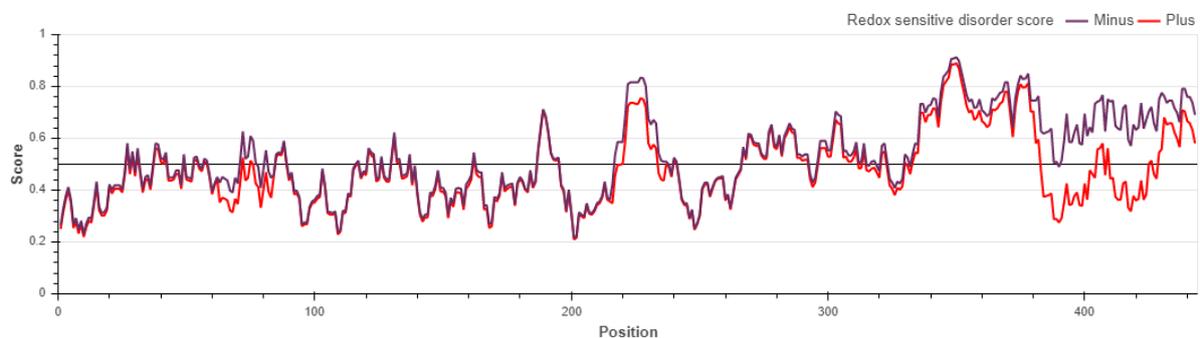
Gráfica 19. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* sin mutar en regiones largas desordenadas



Gráfica 20. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 420 por serina en regiones largas desordenadas

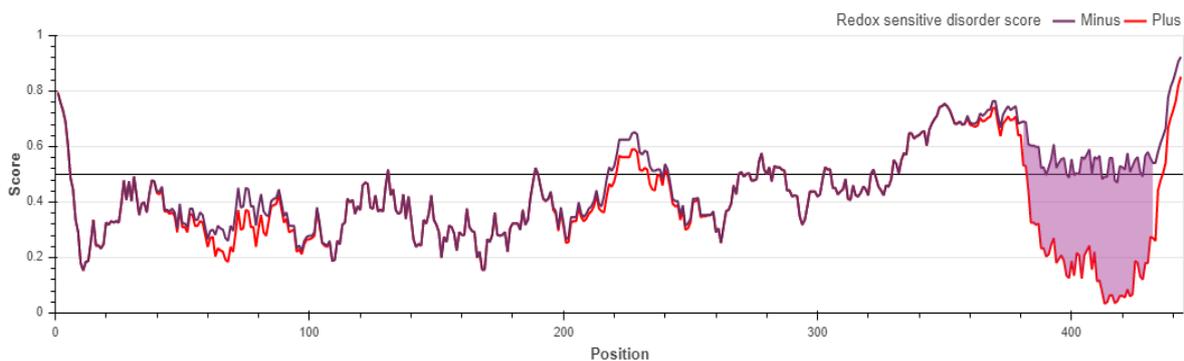


Gráfica 21. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 423 por serina en regiones largas desordenadas

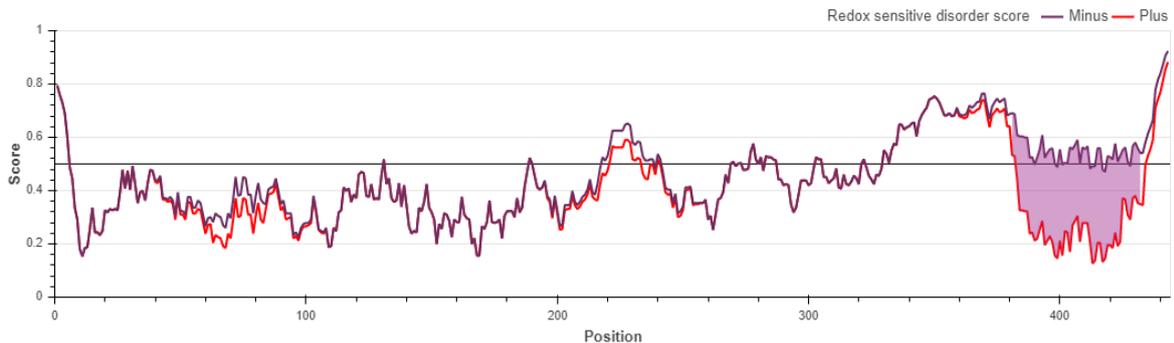


La Gráfica 19 muestra el antes y las Gráficas 20 y 21 el después de que las cisteínas 420 y 423 de *COM2* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

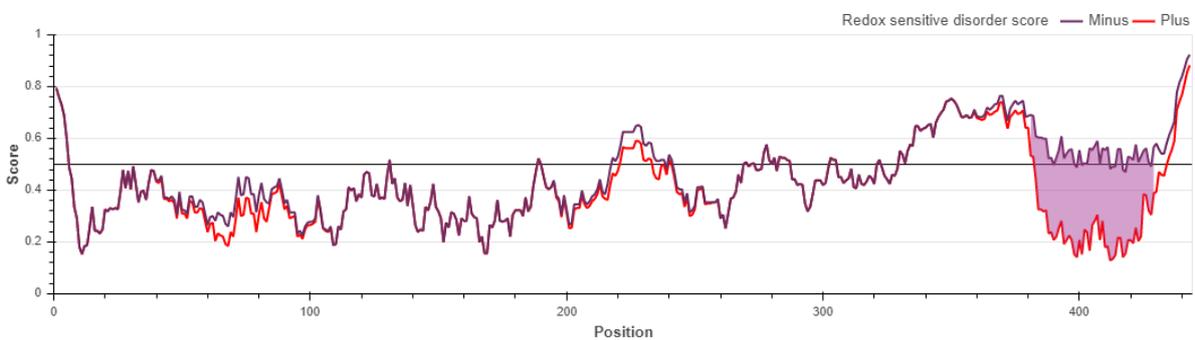
Gráfica 22. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 23. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 420 por serina en regiones cortas desordenadas



Gráfica 24. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 423 por serina en regiones cortas desordenadas



La Gráfica 22 muestra el antes y las Gráficas 23 y 24 el después de que las cisteínas 420 y 423 de *COM2* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

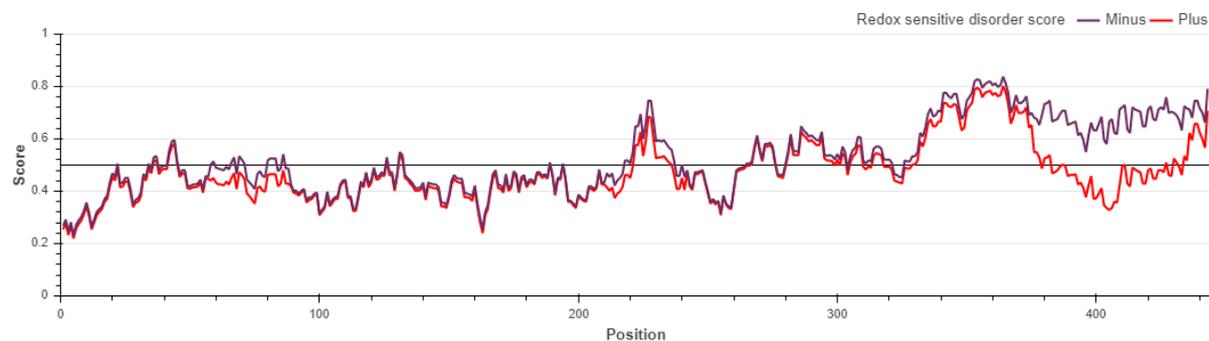
Gráfica 25. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 26. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 420 por serina en dominios estructurados



Gráfica 27. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *COM2* después de la mutación de la cisteína 423 por serina en dominios estructurados



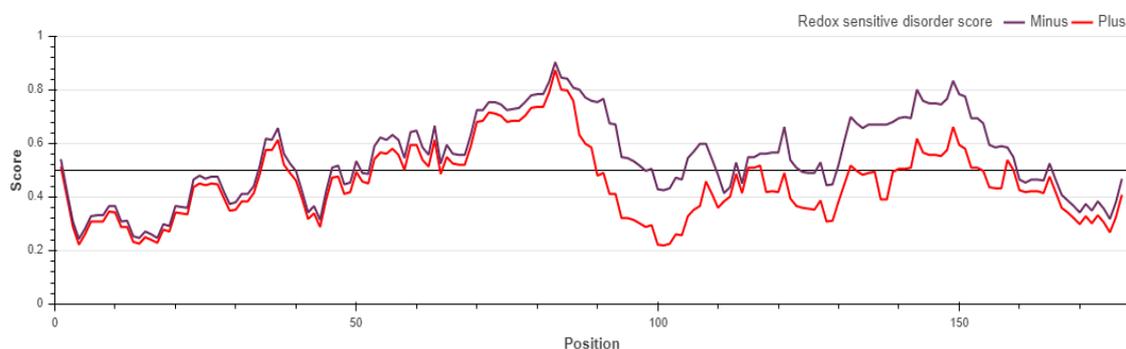
La Gráfica 25 muestra el antes y las Gráficas 26 y 27 el después de que las cisteínas 420 y 423 de *COM2* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.4 MET31

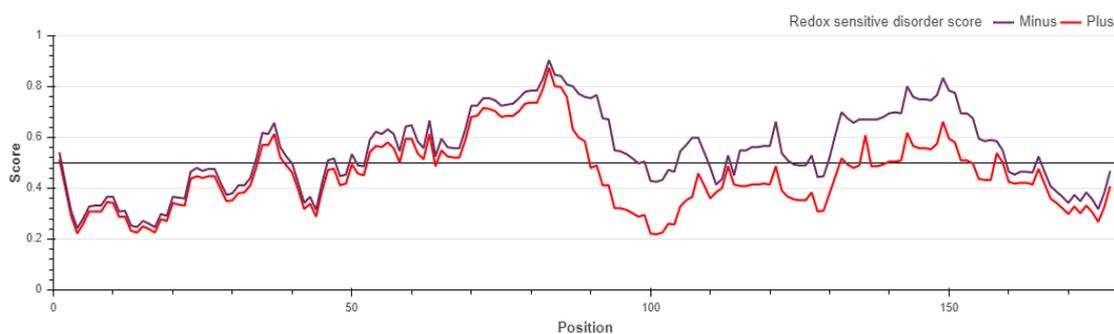
Gráfica 28. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* sin mutar en regiones largas desordenadas



Gráfica 29. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 125 por serina en regiones largas desordenadas

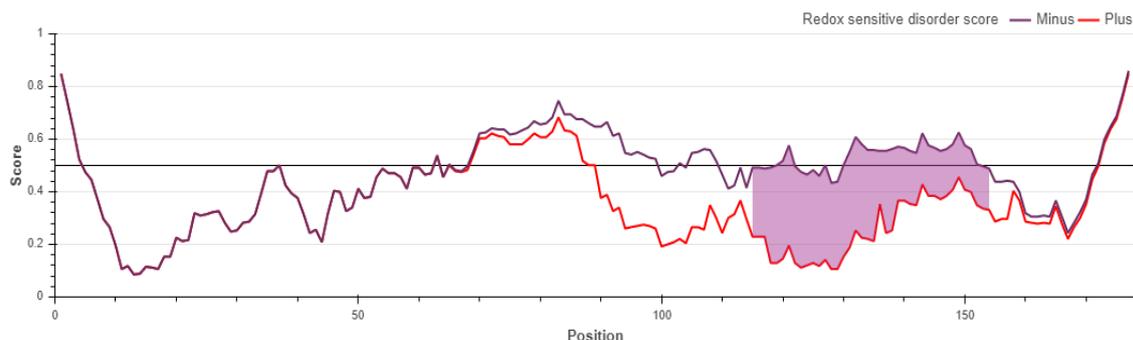


Gráfica 30. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 128 por serina en regiones largas desordenadas

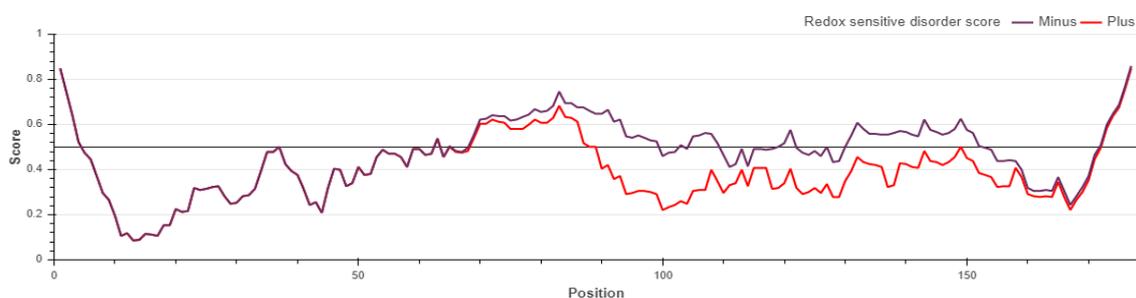


La Gráfica 28 muestra el antes, la Gráfica 29 y 30 el después de que las cisteínas 125 y 128 de *MET31* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

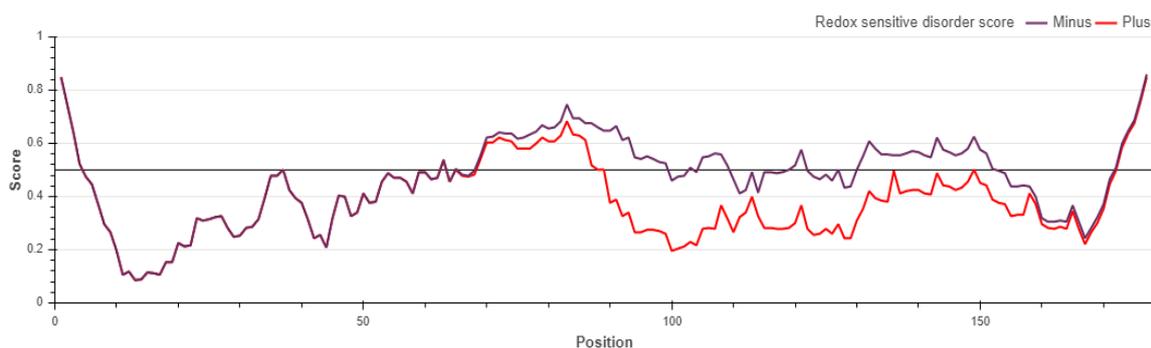
Gráfica 31. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 32. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 125 por serina en regiones cortas desordenadas

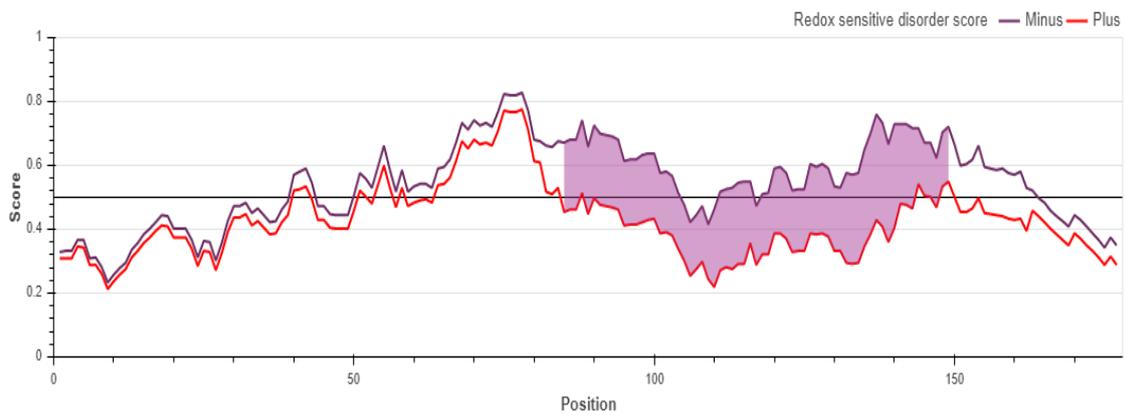


Gráfica 33. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 128 por serina en regiones cortas desordenadas

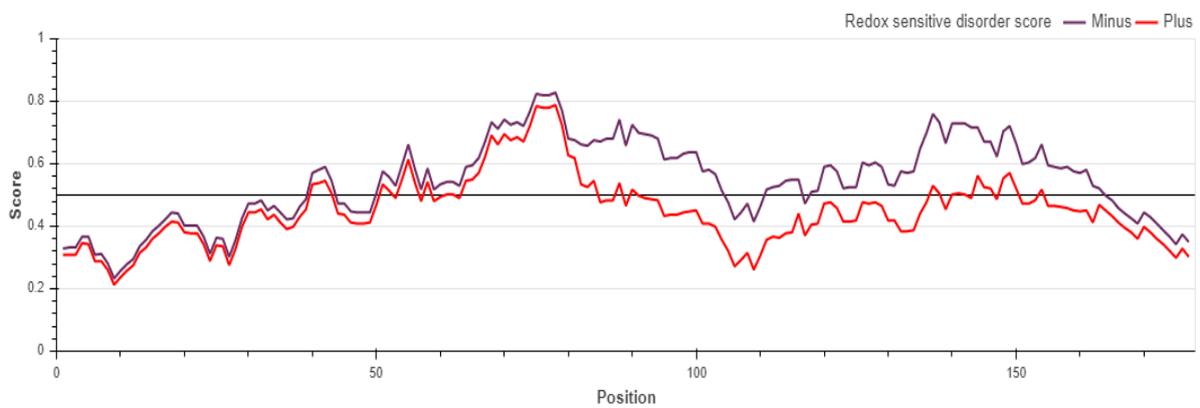


La Gráfica 31 muestra el antes, la Gráfica 32 y 33 el después de que las cisteínas 125 y 128 de *MET31* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

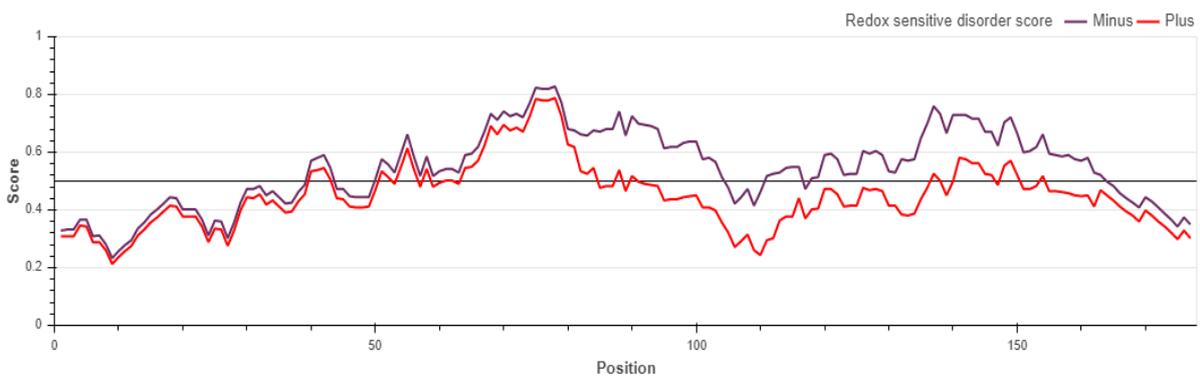
Gráfica 34. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 35. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 125 por serina en dominios estructurados



Gráfica 36. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MET31* después de la mutación de la cisteína 128 por serina en dominios estructurados



La Gráfica 34 muestra el antes, la Gráfica 35 y 36 el después de que las cisteínas 125 y 128 de *MET31* respectivamente se mutaran por serina. Se puede observar que la

zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.5 *MIG1*

Gráfica 37. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* sin mutar en regiones largas desordenadas

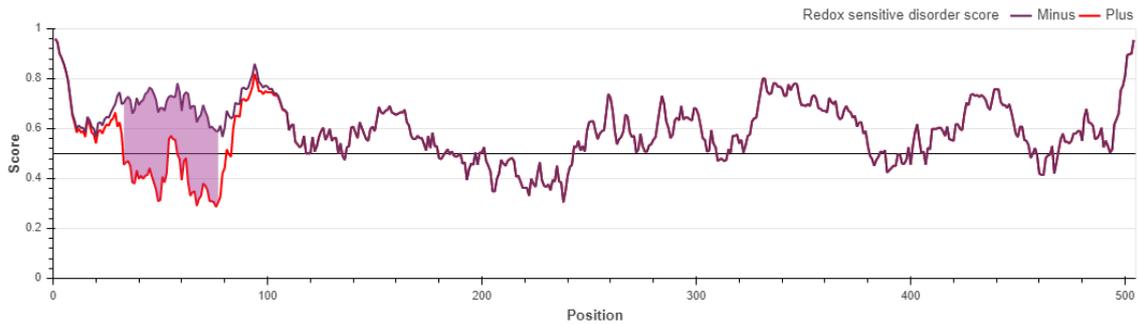


Gráfica 38. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* después de la mutación de la cisteína 43 por serina en regiones largas desordenadas

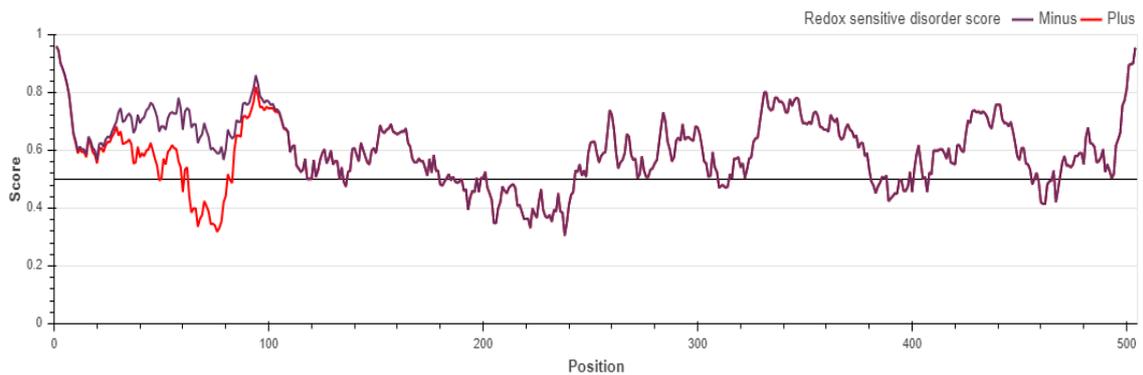


La Gráfica 37 muestra el antes, la Gráfica 38 el después de que la cisteína 43 de *MIG1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 39. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 40. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* después de la mutación de la cisteína 43 por serina en regiones cortas desordenadas

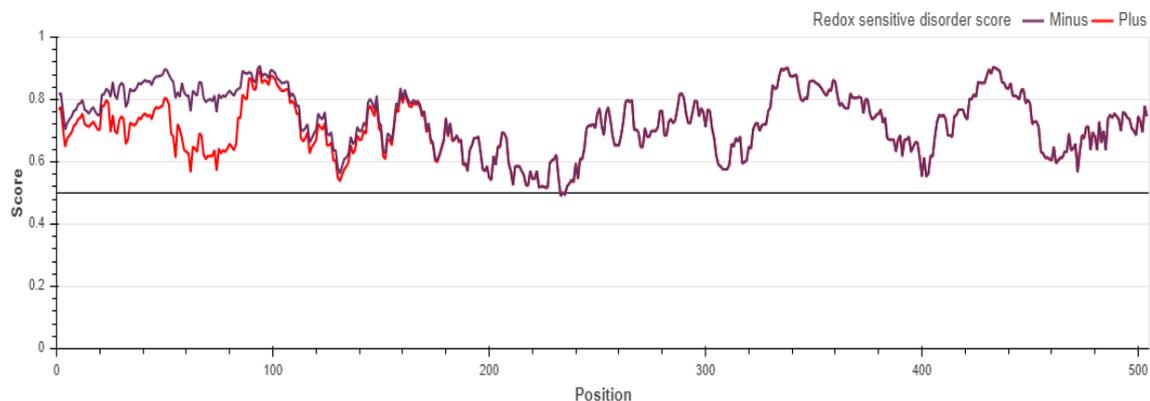


La Gráfica 39 muestra el antes, la Gráfica 40 el después de que la cisteína 43 de *MIG1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 41. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* sin mutar en dominios estructurados



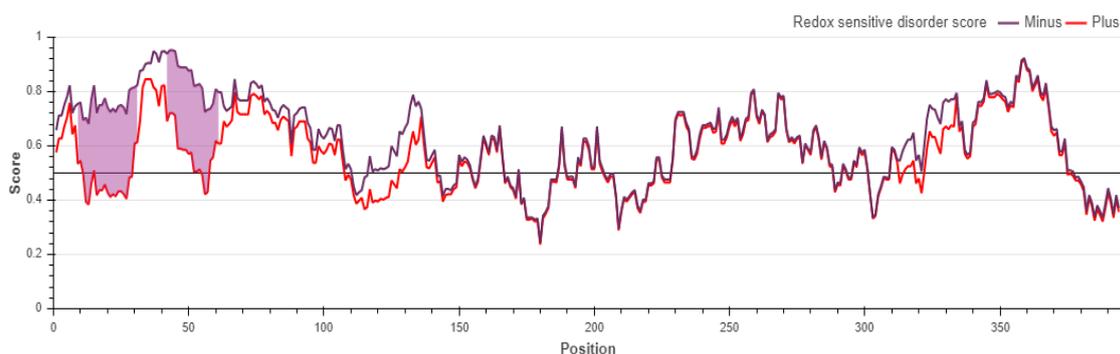
Gráfica 42. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG1* después de la mutación de la cisteína 43 por serina en dominios estructurados



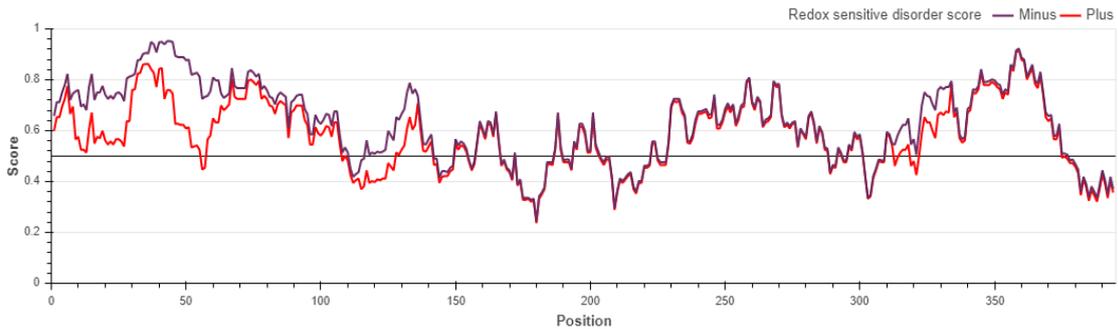
La Gráfica 41 muestra el antes, la Gráfica 42 el después de que la cisteína 43 de *MIG1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.6 *MIG3*

Gráfica 43. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* sin mutar en regiones largas desordenadas

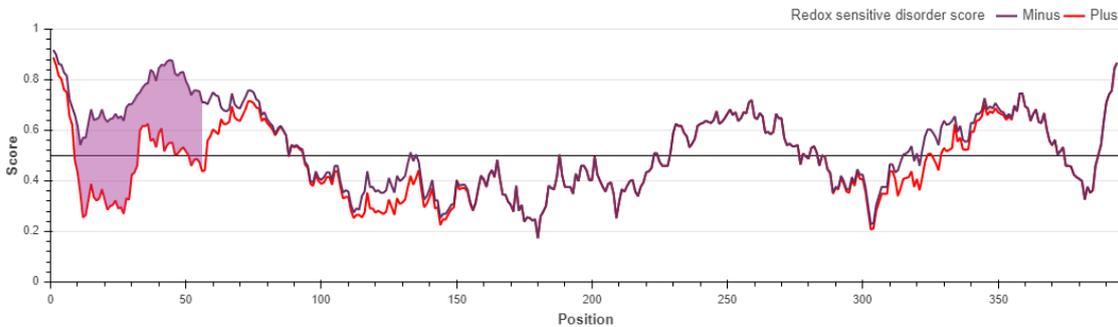


Gráfica 44. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* después de la mutación de la cisteína 22 por serina en regiones largas desordenadas

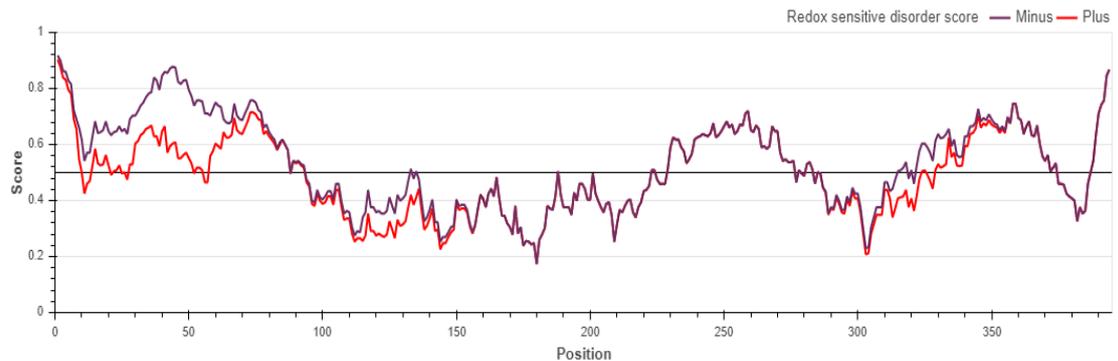


La Gráfica 43 muestra el antes, la Gráfica 44 el después de que la cisteína 22 de *MIG3* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 45. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* sin mutar en regiones cortas desordenadas



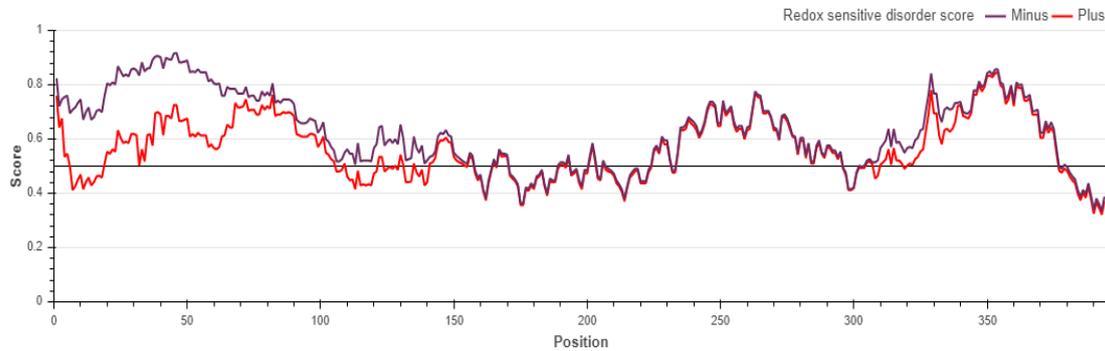
Gráfica 46. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* después de la mutación de la cisteína 22 por serina en regiones cortas desordenadas



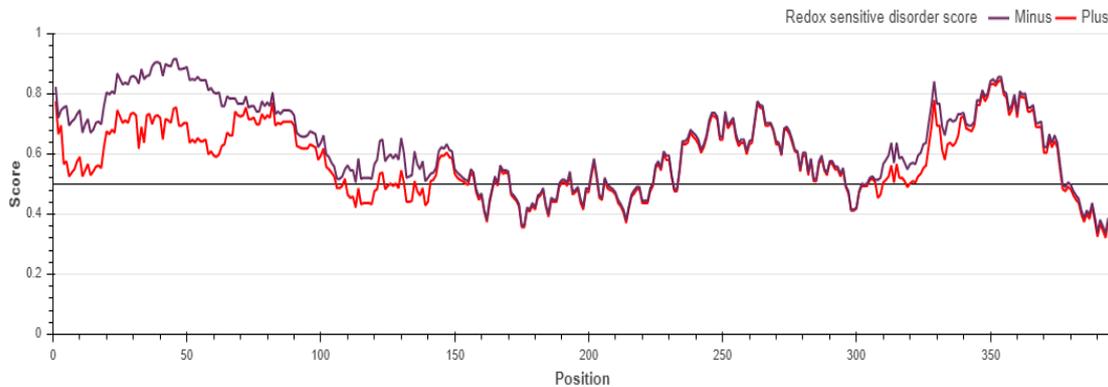
La Gráfica 45 muestra el antes, la Gráfica 46 el después de que la cisteína 22 de *MIG3* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó

considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 47. Puntuación del desorden sensible a redox en los dominios estructurados con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* sin mutar en dominios estructurados



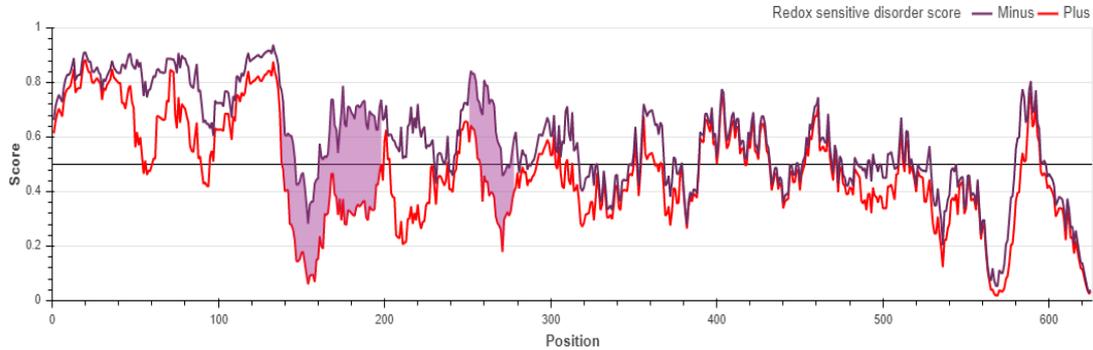
Gráfica 48. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *MIG3* después de la mutación de la cisteína 22 por serina en dominios estructurados



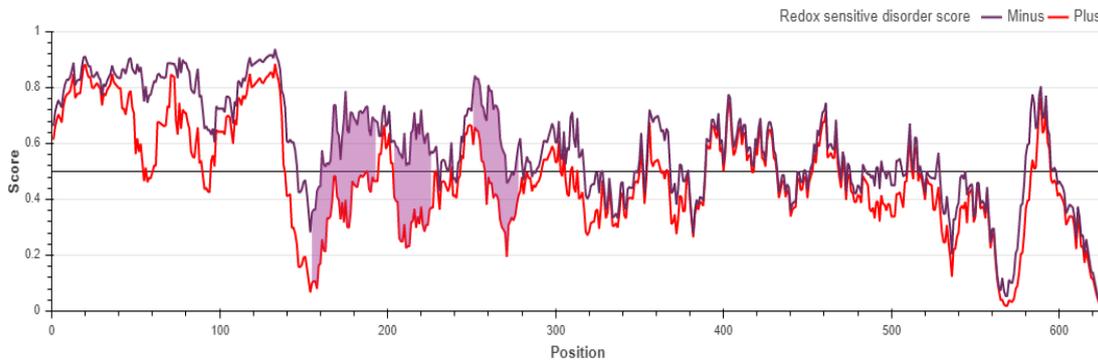
La Gráfica 47 muestra el antes, la Gráfica 48 el después de que la cisteína 22 de *MIG3* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.7 RIM101

Gráfica 49. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* sin mutar en regiones largas desordenadas

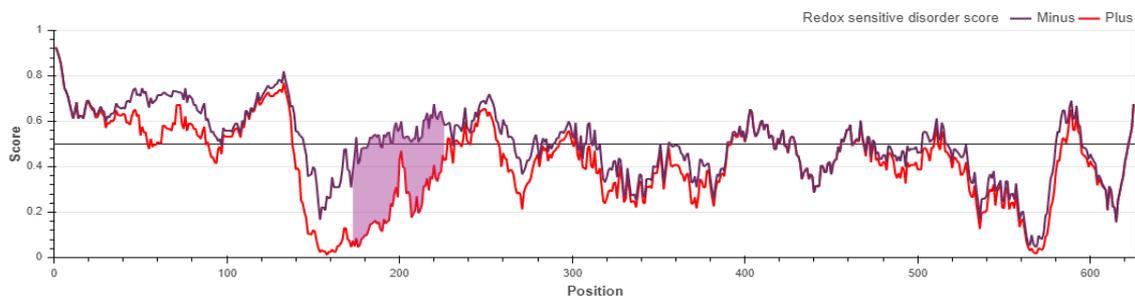


Gráfica 50. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* después de la mutación de la cisteína 189 por serina en regiones largas desordenadas

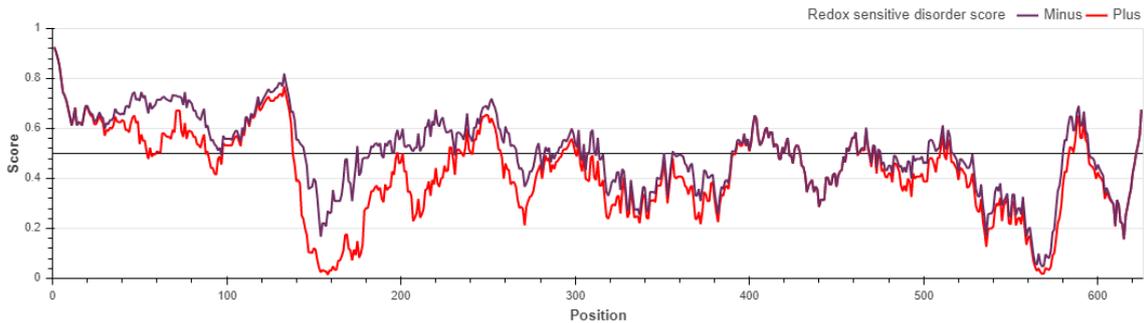


La Gráfica 49 muestra el antes, la Gráfica 50 el después de que la cisteína 189 de *RIM101* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 51. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* sin mutar en regiones cortas desordenadas

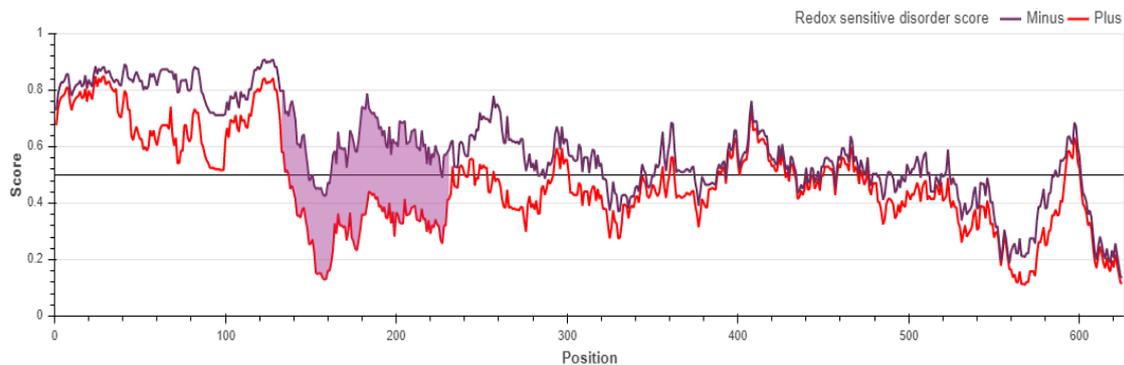


Gráfica 52. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* después de la mutación de la cisteína 189 por serina en regiones cortas desordenadas

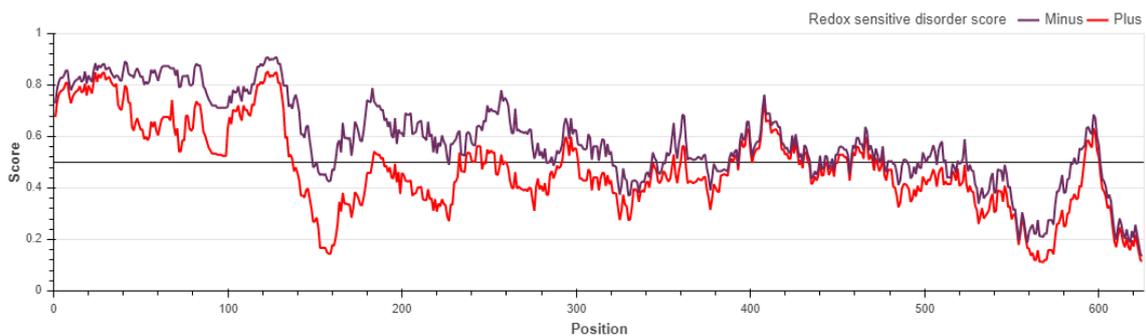


La Gráfica 51 muestra el antes, la Gráfica 52 el después de que la cisteína 189 de *RIM101* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

Gráfica 53. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 54. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* después de la mutación de la cisteína 189 por serina en dominios estructurados

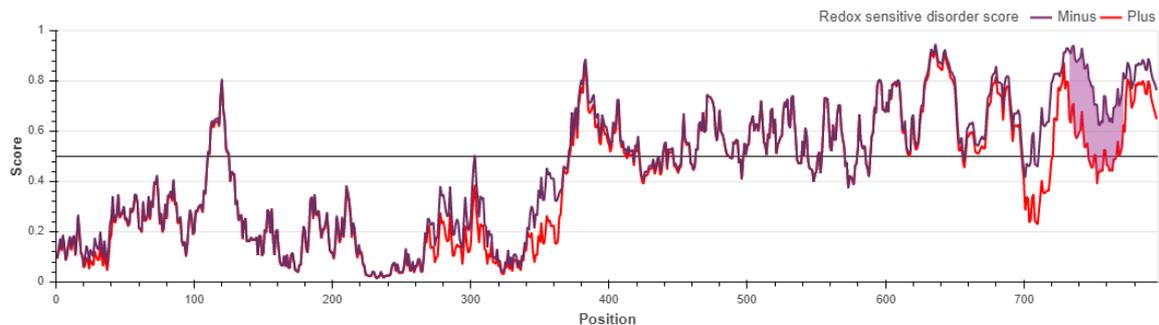


La Gráfica 53 muestra el antes, la Gráfica 54 el después de que la cisteína 189 de *RIM101* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó

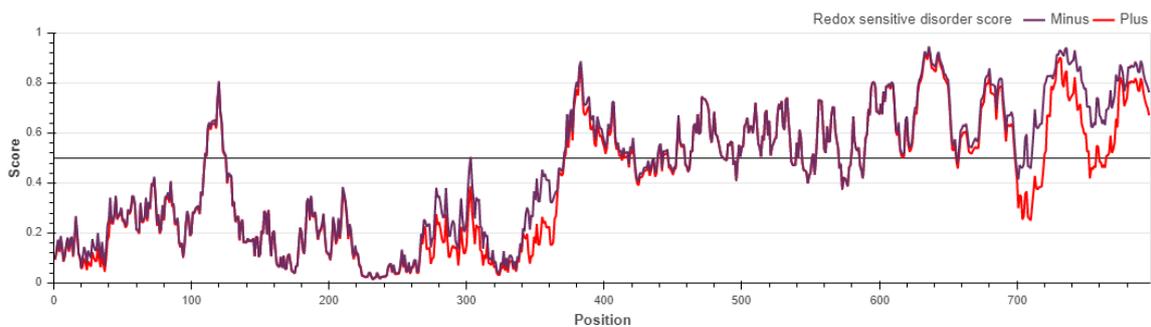
considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.8 RPH1

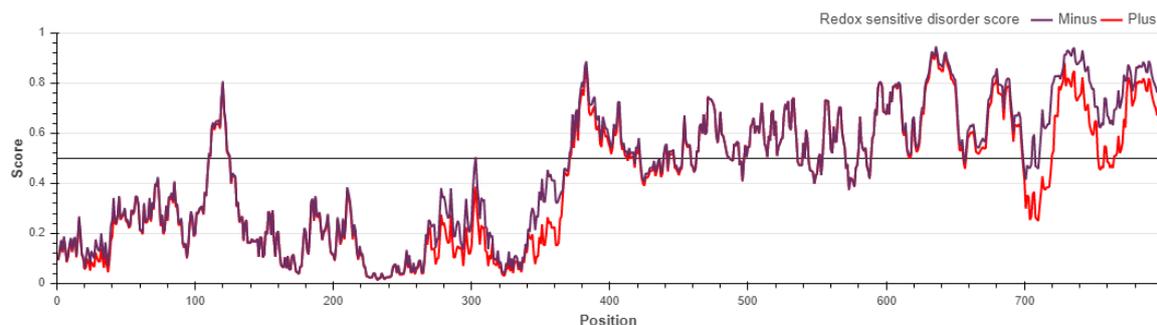
Gráfica 55. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* en regiones largas desordenadas



Gráfica 56. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* después de la mutación de la cisteína 740 por serina en regiones largas desordenadas



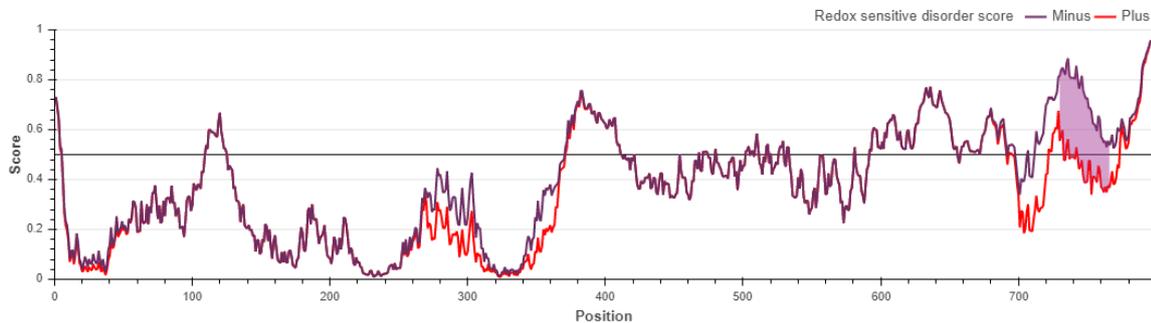
Gráfica 57. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* después de la mutación de la cisteína 743 por serina en regiones largas desordenadas



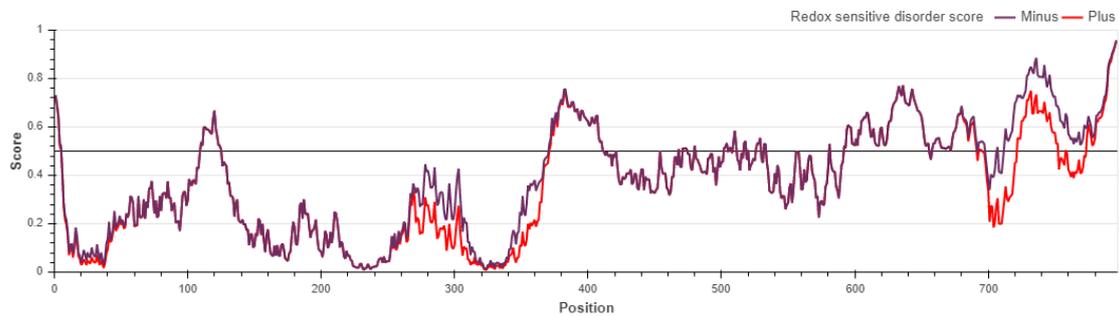
La Gráfica 55 muestra el antes, las Gráficas 56 y 57 el después de que las cisteínas 740 y 743 de *RPH1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila

disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

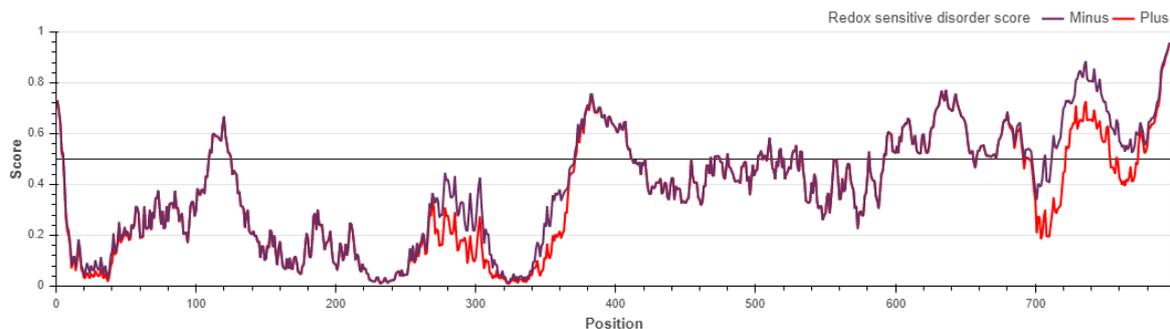
Gráfica 58. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 59. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* después de la mutación de la cisteína 740 por serina en regiones cortas desordenadas

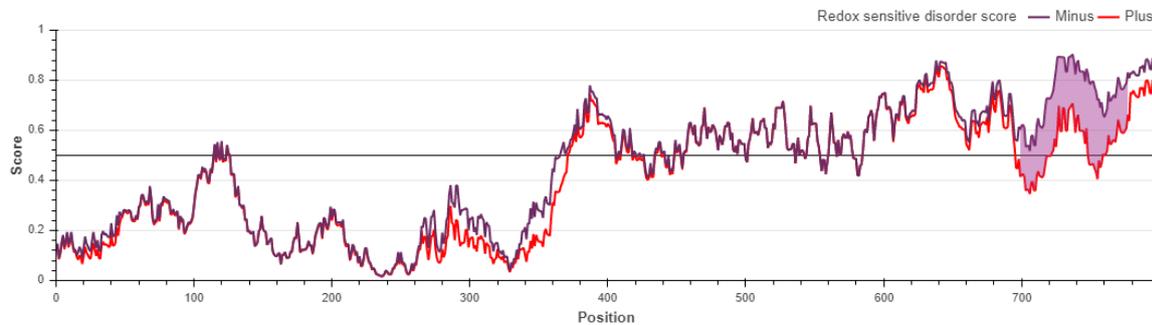


Gráfica 60. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* después de la mutación de la cisteína 743 por serina en regiones cortas desordenadas

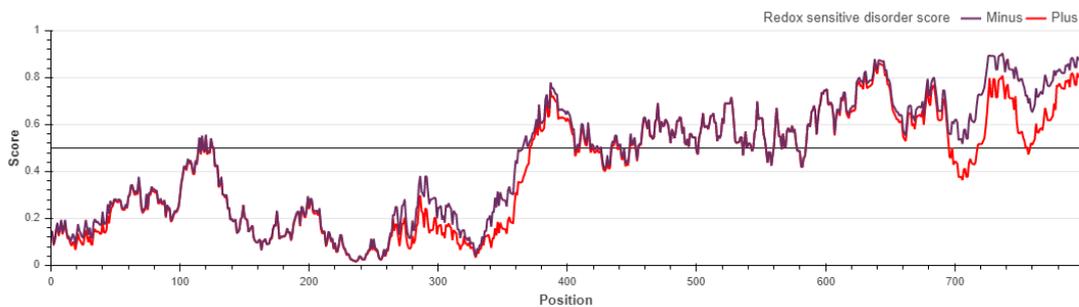


La Gráfica 58 muestra el antes, las Gráficas 59 y 60 el después de que las cisteínas 740 y 743 de *RPH1* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

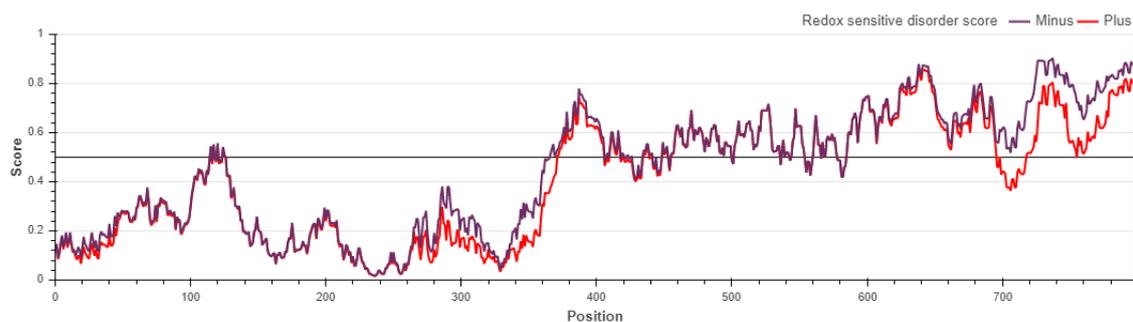
Gráfica 61. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RPH1* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 62. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* después de la mutación de la cisteína 740 por serina en dominios estructurados



Gráfica 63. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *RIM101* después de la mutación de la cisteína 743 por serina en dominios estructurados

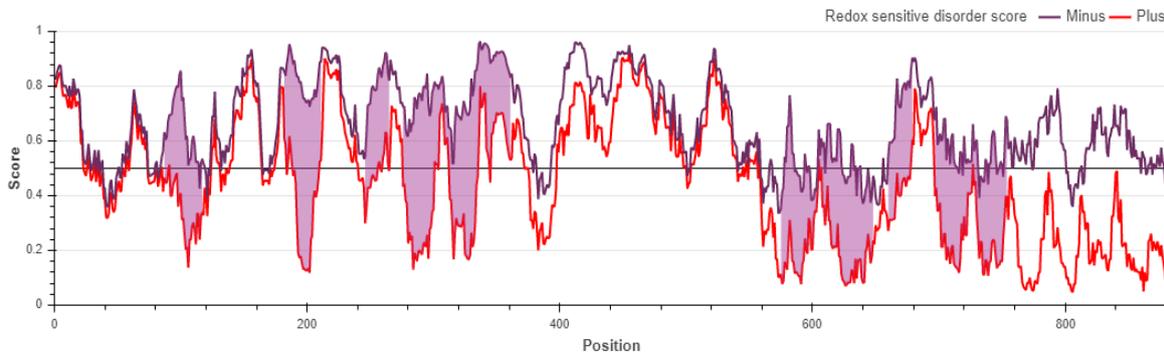


La Gráfica 61 muestra el antes, las Gráficas 62 y 63 el después de que las cisteínas 740 y 743 de *RPH1* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color lila

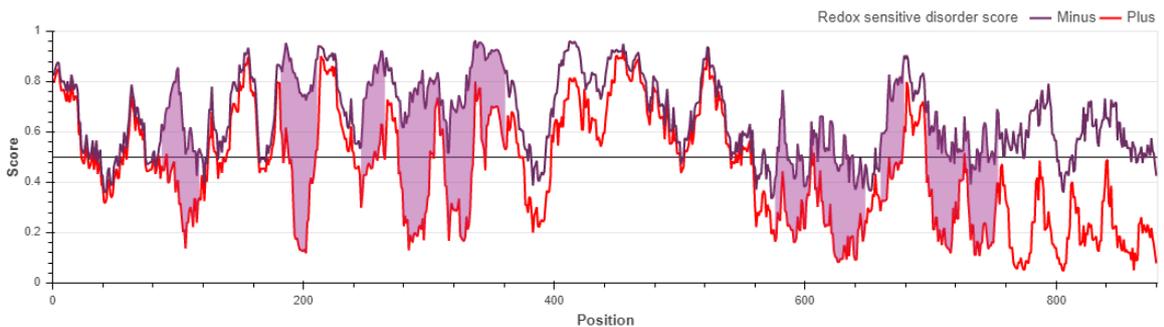
lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

7.3.9 ZAP1

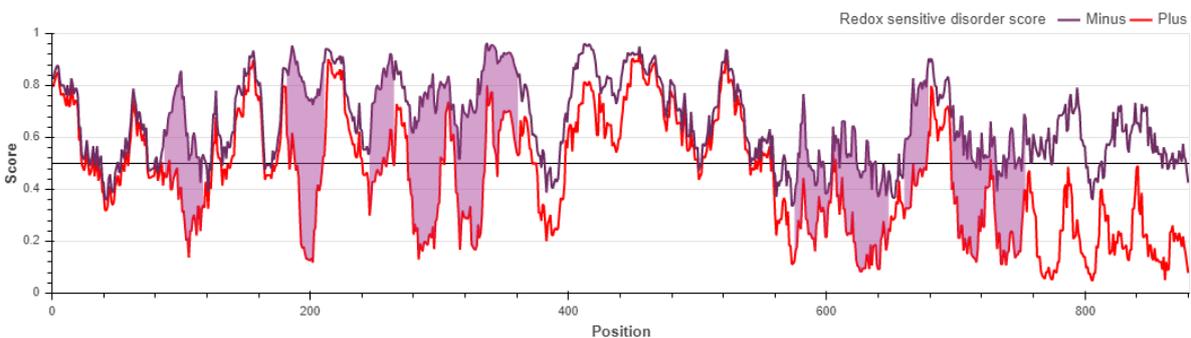
Gráfica 64. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 en regiones largas desordenadas



Gráfica 65. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 581 por serina en regiones largas desordenadas

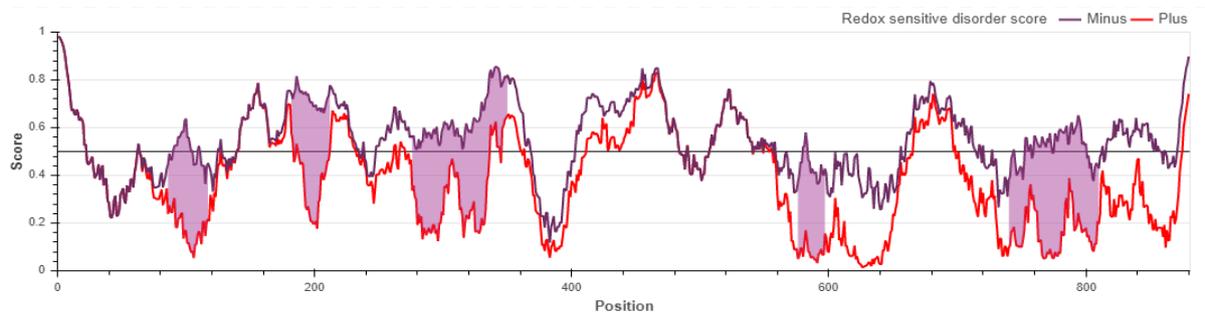


Gráfica 66. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en ZAP1 después de la mutación de la cisteína 586 por serina en regiones largas desordenadas

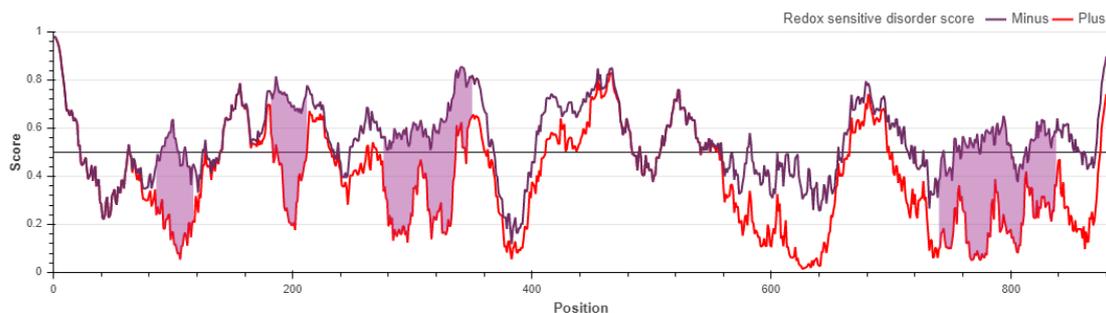


La Gráfica 64 muestra el antes, las Gráficas 65 y 66 el después de que las cisteínas 581 y 586 de *ZAP1* se mutara por serina. Se puede observar que la zona de color lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

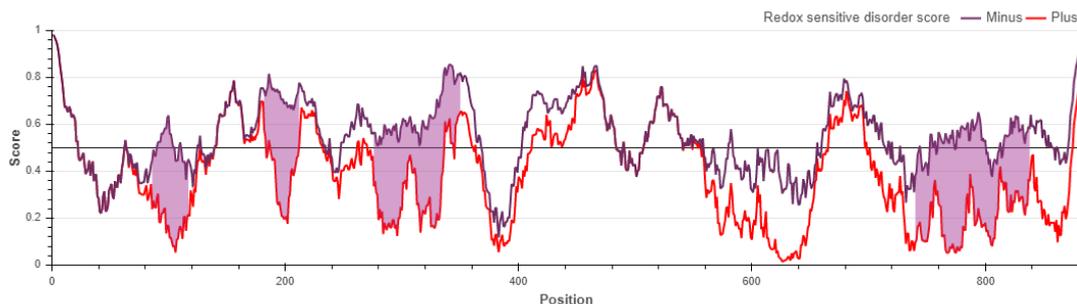
Gráfica 67. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* sin mutar en regiones cortas desordenadas



Gráfica 68. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* después de la mutación de la cisteína 581 por serina en regiones cortas desordenadas



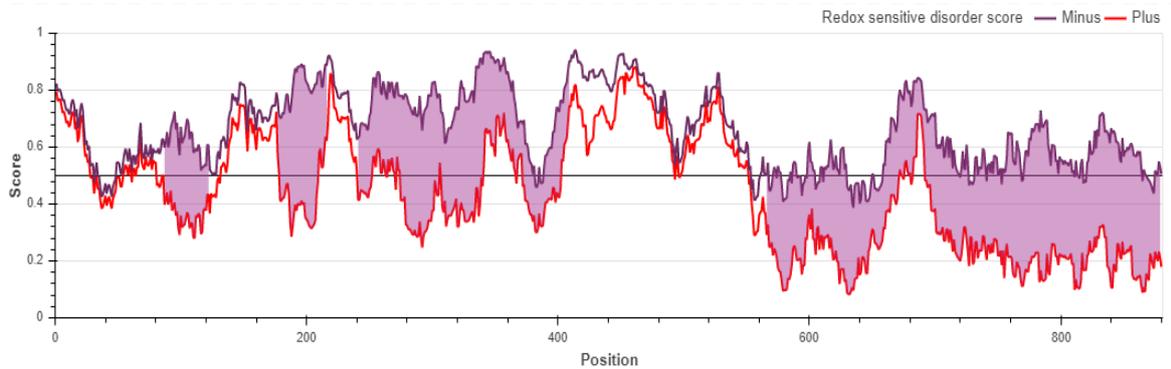
Gráfica 69. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* después de la mutación de la cisteína 586 por serina en regiones cortas desordenadas



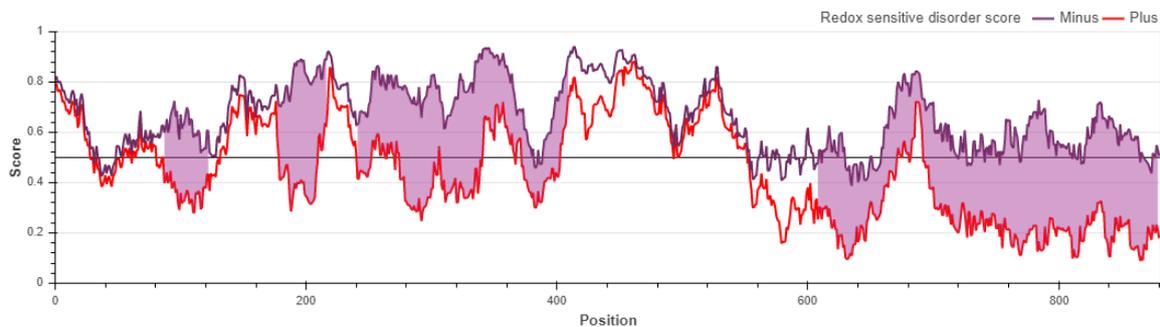
La Gráfica 67 muestra el antes, las Gráficas 68 y 69 el después de que las cisteínas 581 y 586 de *ZAP1* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color

lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

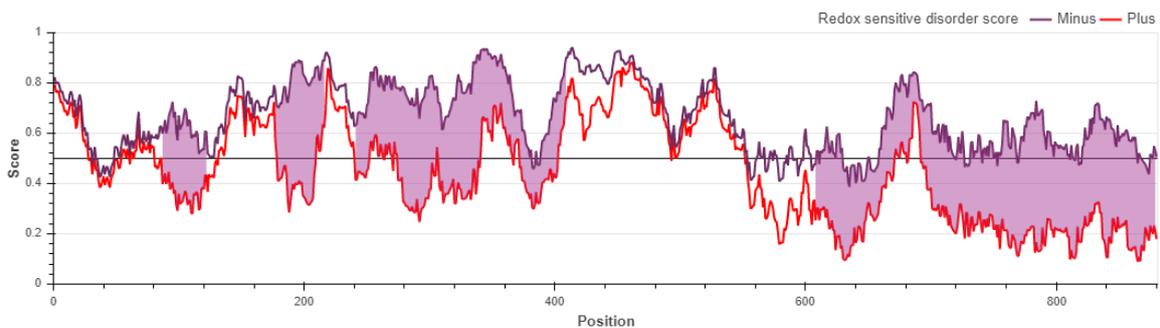
Gráfica 70. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* sin mutar en dominios estructurados



Gráfica 71. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* después de la mutación de la cisteína 581 por serina en dominios estructurados



Gráfica 72. Puntuación del desorden sensible a redox con respecto a la posición de los aminoácidos en *ZAP1* después de la mutación de la cisteína 586 por serina en dominios estructurados



La Gráfica 70 muestra el antes, las Gráficas 71 y 72 el después de que las cisteínas 581 y 586 de *ZAP1* se mutaran por serinas. Se puede observar que la zona de color

lila disminuyó considerablemente, lo cual indica que la cisteína es sensible en medio redox y causa un cambio en la estructura de la proteína.

8. Discusión

8.1 Alineamiento de las proteínas

Se llevaron a cabo alineamientos para ubicar las zonas de homología de las proteínas bajo estudio, las cuales pertenecen a la familia de dedos de zinc clásicos (C₂H₂) y en el caso de RIM101 que contiene un dedo de zinc tipo Zn₂Cys₆. Se realizaron los alineamientos en las interfaces de MAFFT, KALIGN, T-COFFEE, MUSCLE y Clustal Omega. Se obtuvieron buenos alineamientos en T-COFFEE y Clustal Omega, en las demás no todas las cisteínas e histidinas se alinearon adecuadamente.

8.2 Predicción de los modelos de las proteínas con AlphaFold

En los modelos que se obtuvieron de cada proteína bajo estudio, se puede apreciar que se predice poca estructura terciaria, a excepción de los dominios de zinc, los cuales al ser manipulados con la herramienta PyMOL se pudieron observar las estructuras características de dedos de zinc. Esto se debe a que hay regiones proteicas intrínsecamente desordenadas (IDPR's) y/o proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs), ya que son dominios funcionales que carecen de una estructura secundaria y/o terciaria estable (Darling & Uversky, 2018). De hecho, con el software de IUPred-2A, se encontraron varias regiones desordenadas, cuyas gráficas se encuentran en la sección resultados. Las IDP's y IDPR's, junto con las modificaciones postraduccionales (PTM's) que puedan existir en las proteínas dan lugar a conformaciones dinámicas que no dan lugar a una estructura única (Darling y Uversky, 2018).

8.3 Identificación de cisteínas de interés

En todas las proteínas se pudieron encontrar al menos una cisteína con las características deseadas (que se encuentren en superficie, que tengan aminoácidos básicos o aromáticos a menos de 7 angstroms y que sean sensibles en un medio oxidante).

8.4 Mutaciones puntuales para cambiar cisteína por serina *in silico*

A la secuencia de aminoácidos de cada proteína se le cambió una cisteína por serina a la vez, esto permitió identificar cuál de todas las cisteínas que se seleccionaron (que estuvieran en la superficie, que son sensibles al medio oxidante y que tuvieran aminoácidos básicos o aromáticos a menos de 7 angstroms) es más sensible en medio oxidante y por lo tanto más susceptible a ser modificada postraduccionalmente. Cada secuencia de proteína con su respectivo cambio se introdujo en la página de IUPred2A para verificar si hubo algún cambio en la gráfica con respecto a las zonas de la proteína que indicaran sensibilidad al medio oxidante, si no se observaba una considerable disminución de zonas sensibles en medio oxidante (que se representan de color lila), la cisteína no se seleccionaba, por lo que se eligieron las cisteínas que eliminaran en mayor parte la zona de color lila. Todas las proteínas poseen al menos una cisteína que es susceptible a modificación postraduccional y estas cisteínas se encuentran en los dedos de zinc.

Las cisteínas 664 y 666 de *ACE2* se encuentran en el tercer dedo de zinc de tipo CCHC según el alineamiento de Butler y Thiele (1991), los 3 dedos de zinc son importantes, pues se ha informado previamente que la delección del gen *ACE2* conduce a defectos en la separación de las células pero incrementa la producción de etanol durante la fermentación (Wu et al., 2016).

C651 y C654 de *AZF1* se localizan en el tercer dedo de zinc, sus dedos de zinc activan genes cuando la levadura *S. cerevisiae* crece en medios sin glucosa en fuente de glicerol (Stewart et al., 2021), la delección de *AZF1* disminuye el crecimiento y la fermentación del azúcar, en crecimiento de xilosa anaeróbica (Myers et al., 2019).

COM2 es un regulón que induce una gran cantidad de genes para regular el exceso de SO₂ que se forma por la adición del conservador metabisulfito de sodio o potasio en los vinos, (Lage et al., 2019), *COM2* tiene dos dedos de zinc, se cambiaron C420 y C423 por S420 y S423 respectivamente y ambas están en el segundo dedo de zinc.

La proteína *MET31* y su parólogo *MET32* inducen la expresión del regulón *MET4*, el cual está implicado en la vía de asimilación de sulfatos (Carrillo et al., 2012), aunque *MET32* tiene un papel más importante, su delección ocasiona que las células sean más grandes y sensibles al cadmio (Barbey et al., 2005), la delección de ambos genes elimina la transcripción activada por *Met4* (el metabolismo del azufre de la levadura está regulado transcripcionalmente por el activador *Met4*). Se realizaron las mutaciones puntuales en C125 y C128 de *MET31* y ambas se hallan en el segundo dedo de zinc de la forma CCHC.

Durante el crecimiento en glucosa, los genes de las vías alternativas de utilización del carbono, por ejemplo, los genes de galactosa (*GAL*), maltosa (*MAL*) y sacarosa (*SUC*), se reprimen activamente por *MIG1* (Gancedo, 1998), se cambió C43 de *MIG1*, la cual está en su primer dedo de zinc.

La expresión de *MIG3* confiere resistencia al estrés genotóxico (Dubacq et al., 2004), se eligió C22 para la mutación puntual, ésta se ubica en el primer dedo de zinc.

La represión de genes de respuesta alcalina como parte de la adaptación a condiciones alcalinas se debe a *RIM101* (*RIM101|SGD*, s.f.), C189 de *RIM101* aparece en el segundo dedo de zinc, aunque en la página de Saccharomyces Genome Database los tres dedos de zinc juntos los considera un dominio Zn₂Cys₆, por lo que la mutación se encuentra dentro de este dominio.

En *RPH1* se determinó que C740 y C743 se encuentran en el segundo dedo de zinc. *RPH1* es un represor de la fotoliasa *PHR1* y una histona desmetilasa, sin embargo, se ha reportado que la delección de este gen da lugar a células viables sin defectos (Klose et al., 2007).

En *ZAP1* las cisteínas 581 y 586 se encuentran en el primer dedo de zinc. Este dedo de zinc es importante debido que tanto el ZF1 y ZF2 sensan la cantidad de zinc en el ambiente y controlan la expresión génica en respuesta al zinc.

Se sabe que la estabilidad del dedo de zinc en términos de reactividad es mayor en un dedo de zinc C₂H₂ y disminuye a medida que aumenta el número de cisteínas y es consistente con el tercer dedo de *ACE2* en donde se encuentran las cisteínas 664 y 666 y el segundo dedo de zinc de *MET31* el cual está formado por las cisteínas 125 y 128, estas cisteínas son susceptibles a modificaciones postraduccionales (Kluska et al., 2018).

9. Conclusión

Se identificaron las cisteínas susceptibles a modificación postraduccional en todas las proteínas bajo estudio (*ACE2*, *AZF1*, *COM2*, *MET31*, *MIG1*, *MIG3*, *RIM101*, *RPH1* y *ZAP1*) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con ayuda de softwares que permitieron la manipulación de la secuencia de cada proteína, localizando las cisteínas que se encontraban en la superficie, que tuvieran residuos aromáticos o básicos a menos de 7 angstroms y estuvieran en zonas sensibles al medio redox. Se eligieron las cisteínas que al ser mutadas puntualmente disminuyeron las regiones sensibles al medio redox, dichas mutaciones *in silico* consistieron en cambiar cisteína por serina. Se espera que este estudio se pueda llevar a cabo experimentalmente en un futuro con la finalidad de determinar qué tipo de modificaciones producidas por la exposición a H₂S se realizan en particular en estos residuos de cisteína, y los efectos de estas modificaciones como puede ser: un cambio en la estructura del dedo de zinc en el que se encuentra la cisteína, el aumento o disminución en la producción de etanol o algún otro metabolito.

10. Bibliografía

1. *ACE2* | SGD. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000004121>
2. *AZF1* | SGD. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005639>
3. Barbey, R., Baudouin-Cornu, P., Lee, T. A., Rouillon, A., Zarzov, P., Tyers, M., y Thomas, D. (2005a). Inducible dissociation of SCFMet30 ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium. *The EMBO Journal*, 24(3), 521–532. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600556>
4. Bird, A. J. (2003). Zinc fingers can act as Zn²⁺ sensors to regulate transcriptional activation domain function. *The EMBO Journal*, 22(19), 5137–5146. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg484>
5. Bird, A. J., Gordon, M., Eide, D. J., y Winge, D. R. (2006). Repression of *ADH1* and *ADH3* during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. *The EMBO Journal*, 25(24), 5726–5734. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601453>
6. Bird, A. J., Swierczek, S., Qiao, W., Eide, D. J., y Winge, D. R. (2006). Zinc Metalloregulation of the Zinc Finger Pair Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25326–25335. <https://doi.org/10.1074/jbc.m600655200>
7. Bird, A. J., Zhao, H., Luo, H., Jensen, L. T., Srinivasan, C., Evans-Galea, M., Winge, D. R., y Eide, D. J. (2000). A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator. *The EMBO Journal*, 19(14), 3704–3713. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3704>
8. Blaiseau, P. L., Isnard, A. D., Surdin-Kerjan, Y., y Thomas, D. (1997). Met31p and Met32p, two related zinc finger proteins, are involved in transcriptional

regulation of yeast sulfur amino acid metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3640–3648. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.7.3640>

9. Blaiseau, P. L., y Thomas, D. (1998). Multiple transcriptional activation complexes tether the yeast activator Met4 to DNA. *The EMBO Journal*, 17(21), 6327–6336. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6327>
10. Bobola, N., Jansen, R. P., Shin, T. H., y Nasmyth, K. (1996). Asymmetric Accumulation of Ash1p in Postanaphase Nuclei Depends on a Myosin and Restricts Yeast Mating-Type Switching to Mother Cells. *Cell*, 84(5), 699–709. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81048-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81048-x)
11. Bohm, S., Frishman, D., y Mewes, H. W. (1997). Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 25(12), 2464–2469. <https://doi.org/10.1093/nar/25.12.2464>
12. Bröhl, S., Lisowsky, T., Riemen, G., y Michaelis, G. (1994). A new nuclear suppressor system for a mitochondrial RNA polymerase mutant identifies an unusual zinc-finger protein and a polyglutamine domain protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(6), 719–731. <https://doi.org/10.1002/yea.320100604>
13. Buchman, C., Skroch, P., Welch, J., Fogel, S., y Karin, M. (1989). The *CUP2* gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9), 4091–4095. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.9.4091-4095.1989>
14. Butler, G., y Thiele, D. J. (1991). *ACE2*, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to *SWI5*. *Molecular and Cellular Biology*, 11(1), 476–485. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.1.476-485.1991>

15. Butt, T. R., y Ecker, D. J. (1987). Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiological Reviews*, 51(3), 351–364. <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.351-364.1987>
16. Butt, T. R., Sternberg, E., Herd, J., y Crooke, S. T. (1984). Cloning and expression of a yeast copper metallothionein gene. *Gene*, 27(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90235-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90235-x)
17. Carrillo, E., Ben-Ari, G., Wildenhain, J., Tyers, M., Grammentz, D., y Lee, T. A. (2012). Characterizing the roles of Met31 and Met32 in coordinating Met4-activated transcription in the absence of Met30. *Molecular Biology of the Cell*, 23(10), 1928–1942. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-06-0532>
18. Castrejon, F., Gomez, A., Sanz, M., Duran, A., y Roncero, C. (2006). The *RIM101* Pathway Contributes to Yeast Cell Wall Assembly and Its Function Becomes Essential in the Absence of Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2p. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 507–517. <https://doi.org/10.1128/ec.5.3.507-517.2006>
19. Chakrabortee, S., Byers, J. S., Jones, S., Garcia, D. M., Bhullar, B., Chang, A., She, R., Lee, L., Fremin, B., Lindquist, S., y Jarosz, D. F. (2016). Intrinsically Disordered Proteins Drive Emergence and Inheritance of Biological Traits. *Cell*, 167(2), 369–381.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.017>
20. Chandrasekaran, S., Deffenbaugh, A. E., Ford, D. A., Bailly, E., Mathias, N., y Skowyra, D. (2006). RETRACTED: Destabilization of Binding to Cofactors and SCF^{Met30} Is the Rate-Limiting Regulatory Step in Degradation of Polyubiquitinated Met4. *Molecular Cell*, 24(5), 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.028>
21. Choi, K. M., Kwon, Y. Y., y Lee, C. K. (2013). Characterization of global gene expression during assurance of lifespan extension by caloric restriction in budding yeast. *Experimental Gerontology*, 48(12), 1455–1468. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.10.001>

22. Churchich, J. E., Scholz, G., y Kwok, F. (1989). Activation of pyridoxal kinase by metallothionein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 996(3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90245-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90245-8)
23. Colman-Lerner, A., Chin, T. E., y Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 Activate Daughter-Specific Genetic Programs to Induce Asymmetric Cell Fates. *Cell*, 107(6), 739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00596-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00596-7)
24. *COM2* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000000932>
25. Darling, A. L., y Uversky, V. N. (2018). Intrinsic Disorder and Posttranslational Modifications: The Darker Side of the Biological Dark Matter. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00158>
26. Dohrmann, P. R., Butler, G., Tamai, K., Dorland, S., Greene, J. R., Thiele, D. J., y Stillman, D. J. (1992). Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators *SWI5* and *ACE2* differentially control transcription of *HO* and chitinase. *Genes & Development*, 6(1), 93–104. <https://doi.org/10.1101/gad.6.1.93>
27. Dohrmann, P. R., Voth, W. P., y Stillman, D. J. (1996). Role of negative regulation in promoter specificity of the homologous transcriptional activators Ace2p and Swi5p. *Molecular and Cellular Biology*, 16(4), 1746–1758. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.4.1746>
28. Doolin, M. T., Johnson, A. L., Johnston, L. H., y Butler, G. (2001). Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Molecular Microbiology*, 40(2), 422–432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02388.x>
29. Drewke, C., & Ciriacy, M. (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 950(1), 54–60.
[https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90072-3](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90072-3)

30. Drysdale, C. M., Dueñas, E., Jackson, B. M., Reusser, U., Braus, G. H., y Hinnebusch, A. G. (1995). The transcriptional activator GCN4 contains multiple activation domains that are critically dependent on hydrophobic amino acids. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1220–1233.
<https://doi.org/10.1128/mcb.15.3.1220>
31. Dubacq, C., Chevalier, A., y Mann, C. (2004). The Protein Kinase Snf1 Is Required for Tolerance to the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Hydroxyurea. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2560–2572.
<https://doi.org/10.1128/mcb.24.6.2560-2572.2004>
32. Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., y Pabo, C. O. (1996). Zif268 protein–DNA complex refined at 1.6Å: a model system for understanding zinc finger–DNA interactions. *Structure*, 4(10), 1171–1180.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(96\)00125-6](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(96)00125-6)
33. Eom, K. S., Cheong, J. S., y Lee, S. J. (2016). Structural Analyses of Zinc Finger Domains for Specific Interactions with DNA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2019–2029. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09021>
34. Evans-Galea, M. V., Blankman, E., Myszka, D. G., Bird, A. J., Eide, D. J., y Winge, D. R. (2003). Two of the Five Zinc Fingers in the Zap1 Transcription Factor DNA Binding Domain Dominate Site-Specific DNA Binding. *Biochemistry*, 42(4), 1053–1061. <https://doi.org/10.1021/bi0263199>
35. Fabrizio, P., Gattazzo, C., Battistella, L., Wei, M., Cheng, C., McGrew, K., y Longo, V. D. (2005). Sir2 Blocks Extreme Life-Span Extension. *Cell*, 123(4), 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.042>
36. Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M., y Labarre, J. (2002). Sulfur Sparing

in the Yeast Proteome in Response to Sulfur Demand. *Molecular Cell*, 9(4), 713–723. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00500-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00500-2)

37. Finley, R. L., y Brent, R. (1994). Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12980–12984. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12980>
38. Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., y Kaiser, P. (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nature Cell Biology*, 6(7), 634–641. <https://doi.org/10.1038/ncb1143>
39. Fogel, S., y Welch, J. W. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(17), 5342–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5342>
40. Frey, A. G., y Eide, D. J. (2011). Roles of Two Activation Domains in Zap1 in the Response to Zinc Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6844–6854. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.203927>
41. Frey, A. G., y Eide, D. J. (2012). Zinc-responsive coactivator recruitment by the yeast Zap1 transcription factor. *Microbiology Open*, 1(2), 105–114. <https://doi.org/10.1002/mbo3.8>
42. Fürst, P., Hu, S., Hackett, R., y Hamer, D. (1988). Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell*, 55(4), 705–717. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90229-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90229-2)
43. Gottlieb, S., y Esposito, R. E. (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, 56(5), 771–776. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90681-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90681-8)

44. Hamer, D. H. (1986). METALLOTHIONEIN. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), 913–951. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004405>
45. Hamer, D. H., Thiele, D. J., y Lemontt, J. E. (1985). Function and Autoregulation of Yeast Copperthionein. *Science*, 228(4700), 685–690. <https://doi.org/10.1126/science.3887570>
46. Han, S. H., Han, G. S., Iwanyshyn, W. M., y Carman, G. M. (2005). Regulation of the *PIS1*-encoded Phosphatidylinositol Synthase in *Saccharomyces cerevisiae* by Zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29017–29024. <https://doi.org/10.1074/jbc.m505881200>
47. Harlow, P., Watkins, E., Thornton, R. D., y Nemer, M. (1989). Structure of an ectodermally expressed sea urchin metallothionein gene and characterization of its metal-responsive region. *Molecular and Cellular Biology*, 9(12), 5445–5455. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.12.5445>
48. Herbig, A., Bird, A. J., Swierczek, S., McCall, K., Mooney, M., Wu, C. Y., Winge, D. R., & Eide, D. J. (2005). Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status. *Molecular Microbiology*, 57(3), 834–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04734.x>
49. Hiltunen, J. K., Autio, K. J., Schonauer, M. S., Kursu, V. S., Dieckmann, C. L., y Kastaniotis, A. J. (2010). Mitochondrial fatty acid synthesis and respiration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797, 78. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.04.237>
50. Hinshaw, J. E., Carragher, B. O., y Milligan, R. A. (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*, 69(7), 1133–1141. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90635-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90635-p)

51. Hirata, Y., Andoh, T., Asahara, T., y Kikuchi, A. (2003). Yeast Glycogen Synthase Kinase-3 Activates Msn2p-dependent Transcription of Stress Responsive Genes. *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), 302–312. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0247>
52. Hollenhorst, P. C., Bose, M. E., Mielke, M. R., Müller, U., y Fox, C. A. (2000). Forkhead Genes in Transcriptional Silencing, Cell Morphology and the Cell Cycle: Overlapping and Distinct Functions for *FKH1* and *FKH2* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 154(4), 1533–1548. <https://doi.org/10.1093/genetics/154.4.1533>
53. Huibregtse, J. M., Engelke, D. R., y Thiele, D. J. (1989). Copper-induced binding of cellular factors to yeast metallothionein upstream activation sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1), 65–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.65>
54. Iwanyshyn, W. M., Han, G. S., y Carman, G. M. (2004). Regulation of Phospholipid Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by Zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 21976–21983. <https://doi.org/10.1074/jbc.m402047200>
55. Jang, Y. K., Wang, L., y Sancar, G. B. (1999). *RPH1* and *GIS1* Are Damage-Responsive Repressors of *PHR1*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7630–7638. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.11.7630>
56. Jans, D. A. (1995). The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 311(3), 705–716. <https://doi.org/10.1042/bj3110705>
57. Jensen, T. H., Neville, M., Rain, J. C., McCarthy, T., Legrain, P., y Rosbash, M. (2000). Identification of Novel *Saccharomyces cerevisiae* Proteins with Nuclear Export Activity: Cell Cycle-Regulated Transcription Factor Ace2p Shows Cell Cycle-Independent Nucleocytoplasmic Shuttling. *Molecular and Cellular*

Biology, 20(21), 8047–8058. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.8047-8058.2000>

58. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
59. Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., y Kennedy, B. K. (2005). Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(4), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.10.007>
60. Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., y Reed, S. I. (2000). Regulation of Transcription by Ubiquitination without Proteolysis. *Cell*, 102(3), 303–314. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00036-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00036-2)
61. Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J. H., y Johnston, M. (2004). Regulatory Network Connecting Two Glucose Signal Transduction Pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 3(1), 221–231. <https://doi.org/10.1128/ec.3.1.221-231.2004>
62. Kersting, M. C., y Carman, G. M. (2006). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *EK1*-encoded Ethanolamine Kinase by Zinc Depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13110–13116. <https://doi.org/10.1074/jbc.m601612200>
63. Kim, E. M. (2002). Phosphorylation of Rph1, a damage-responsive repressor of *PHR1* in *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent upon Rad53 kinase. *Nucleic Acids Research*, 30(3), 643–648. <https://doi.org/10.1093/nar/30.3.643>
64. King, L., y Butler, G. (1998). Ace2p, a regulator of *CTS1* (chitinase) expression, affects pseudohyphal production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 34(3), 183–191. <https://doi.org/10.1007/s002940050384>

65. Klose, R. J., Gardner, K. E., Liang, G., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., y Zhang, Y. (2007). Demethylation of Histone H3K36 and H3K9 by Rph1: a Vestige of an H3K9 Methylation System in *Saccharomyces cerevisiae* ? *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), 3951–3961. <https://doi.org/10.1128/mcb.02180-06>
66. Kluska, K., Adamczyk, J., y Krężel, A. (2018). Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coordination Chemistry Reviews*, 367, 18–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.009>
67. Knapp, D., Bhoite, L., Stillman, D. J., y Nasmyth, K. (1996). The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5701–5707. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5701>
68. Knapska, E., y Kaczmarek, L. (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Progress in Neurobiology*, 74(4), 183–211. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.007>
69. Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., y Sone, H. (1998). Region of Flo1 Proteins Responsible for Sugar Recognition. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6503–6510. <https://doi.org/10.1128/jb.180.24.6503-6510.1998>
70. Koranda, M., Schleiffer, A., Endler, L., y Ammerer, G. (2000). Forkhead-like transcription factors recruit Ndd1 to the chromatin of G2/M-specific promoters. *Nature*, 406(6791), 94–98. <https://doi.org/10.1038/35017589>
71. Kovacech, B., Nasmyth, K., y Schuster, T. (1996). *EGT2* gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(7), 3264–3274. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.7.3264>
72. Kumar, R., Reynolds, D. M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Goldstone, S. D., y Dalton, S. (2000). Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p,

collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Current Biology*, 10(15), 896–906. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00618-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00618-7)

73. Kuranda, M., y Robbins, P. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(29), 19758–19767. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55057-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55057-2)
74. Kuras, L., Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., y Thomas, D. (1996). A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *The EMBO Journal*, 15(10), 2519–2529. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00609.x>
75. Kuras, L., Rouillon, A., Lee, T., Barbey, R., Tyers, M., y Thomas, D. (2002). Dual Regulation of the Met4 Transcription Factor by Ubiquitin-Dependent Degradation and Inhibition of Promoter Recruitment. *Molecular Cell*, 10(1), 69–80. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00561-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00561-0)
76. Kuras, L., y Thomas, D. (1995). Identification of the yeast methionine biosynthetic genes that require the centromere binding factor 1 for their transcriptional activation. *FEBS Letters*, 367(1), 15–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00528-h](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00528-h)
77. Laabs, T. L., Markwardt, D. D., Slattery, M. G., Newcomb, L. L., Stillman, D. J., y Heideman, W. (2003). ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10275–10280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1833999100>
78. Lage, P., Sampaio-Marques, B., Ludovico, P., Mira, N. P., y Mendes-Ferreira, A. (2019). Transcriptomic and chemogenomic analyses unveil the essential role of Com2-regulon in response and tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to stress induced by sulfur dioxide. *Microbial Cell*, 6(11), 509–523. <https://doi.org/10.15698/mic2019.11.697>

79. Laidlaw, K. M. E., Bisinski, D. D., Shashkova, S., Paine, K. M., Veillon, M. A., Leake, M. C., y MacDonald, C. (2021). A glucose-starvation response governs endocytic trafficking and eisosomal retention of surface cargoes in budding yeast. *Journal of Cell Science*, 134(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.257733>
80. Lee, T. A., Jorgensen, P., Bognar, A. L., Peyraud, C., Thomas, D., y Tyers, M. (2010). Dissection of Combinatorial Control by the Met4 Transcriptional Complex. *Molecular Biology of the Cell*, 21(3), 456–469. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-05-0420>
81. Lewis, J. A., y Gasch, A. P. (2012). Natural Variation in the Yeast Glucose-Signaling Network Reveals a New Role for the Mig3p Transcription Factor. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 2(12), 1607–1612. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004127>
82. Li, Z. S., Lu, Y. P., Zhen, R. G., Szczypka, M., Thiele, D. J., y Rea, P. A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 42–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.42>
83. Lisowsky, T., y Michaelis, G. (1988). A nuclear gene essential for mitochondrial replication suppresses a defect of mitochondrial transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 214(2), 218–223. <https://doi.org/10.1007/bf00337714>
84. Liu, Z. L., y Ma, M. (2020). Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistant to furfural and HMF. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), 3473–3492. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10434-0>
85. Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P., y Gorsich, S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-

hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(8), 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0148-3>

86. Liu, Z. L., Wang, X., y Weber, S. A. (2018). Tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* posses a more robust cell wall integrity signaling pathway against 2-furaldehyde and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. *Journal of Biotechnology*, 276-277, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.002>
87. Ljungdahl, P. O., y Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3), 885–929. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133306>
88. Lundin, M., Nehlin, J. O., y Ronne, H. (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein *MIG1*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 1979–1985. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1979-1985.1994>
89. Lutfiyya, L. L., Iyer, V. R., DeRisi, J., DeVit, M. J., Brown, P. O., y Johnston, M. (1998). Characterization of Three Related Glucose Repressors and Genes They Regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150(4), 1377–1391. <https://doi.org/10.1093/genetics/150.4.1377>
90. Lyons, T. J., Gasch, A. P., Gaither, L. A., Botstein, D., Brown, P. O., y Eide, D. J. (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 7957–7962. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7957>
91. MacDiarmid, C. W. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(12), 2845–2855. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2845>

92. MacDiarmid, C. W., Taggart, J., Jeong, J., Kerdsomboon, K., y Eide, D. J. (2016). Activation of the Yeast *UBI4* Polyubiquitin Gene by Zap1 Transcription Factor via an Intragenic Promoter Is Critical for Zinc-deficient Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 291(36), 18880–18896. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.743120>
93. McBride, H. J., Yu, Y., y Stillman, D. J. (1999). Distinct Regions of the Swi5 and Ace2 Transcription Factors Are Required for Specific Gene Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (30), 21029–21036. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21029>
94. Meng, Y., y Li, L. (2021). Cysteine post-translational modifications: ten years from chemical proteomics to bioinformatics. *arXiv preprint arXiv:2105.13582*
95. *MET31* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000005959>
96. *MIG1* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003003>
97. *MIG3* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000000830>
98. Mirzaei, H., Knijnenburg, T. A., Kim, B., Robinson, M., Picotti, P., Carter, G. W., Li, S., Dilworth, D. J., Eng, J. K., Aitchison, J. D., Shmulevich, I., Galitski, T., Aebersold, R., y Ranish, J. (2013). Systematic measurement of transcription factor-DNA interactions by targeted mass spectrometry identifies candidate gene regulatory proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3645–3650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216918110>
99. Mosialos, G., Hamer, P., Capobianco, A. J., Laursen, R. A., y Gilmore, T. D. (1991). A protein kinase-A recognition sequence is structurally linked to transformation by p59v-rel and cytoplasmic retention of p68c-rel. *Molecular and*

Cellular Biology, 11(12), 5867–5877. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.12.5867-5877.1991>

100. Myers, K. S., Riley, N. M., MacGilvray, M. E., Sato, T. K., McGee, M., Heilberger, J., Coon, J. J., y Gasch, A. P. (2019). Rewired cellular signaling coordinates sugar and hypoxic responses for anaerobic xylose fermentation in yeast. *PLOS Genetics*, 15(3), e1008037. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008037>
101. Nasmyth, K., Adolf, G., Lydall, D., y Seddon, A. (1990). The identification of a second cell cycle control on the *HO* promoter in yeast: Cell cycle regulation of *SWI5* nuclear entry. *Cell*, 62(4), 631–647. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90110-z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90110-z)
102. Nehlin, J. O., y Ronne, H. (1990). Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *The EMBO Journal*, 9(9), 2891–2898. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07479.x>
103. Newcomb, L. L., Hall, D. D., y Heideman, W. (2002). *AZF1* Is a Glucose-Dependent Positive Regulator of *CLN3* Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 22(5), 1607–1614. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.5.1607-1614.2002>
104. O'Conalláin, C., Doolin, M. T., Taggart, C., Thornton, F., y Butler, G. (1999). Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (*CTS1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(2), 275–282. <https://doi.org/10.1007/s004380051084>
105. Ouni, I., Flick, K., y Kaiser, P. (2010). A Transcriptional Activator Is Part of an SCF Ubiquitin Ligase to Control Degradation of Its Cofactors. *Molecular Cell*, 40(6), 954–964. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.018>

106. Paine, P. L., Moore, L. C., y Horowitz, S. B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature*, 254(5496), 109–114. <https://doi.org/10.1038/254109a0>
107. Patton, E. (2000). SCFMet30-mediated control of the transcriptional activator Met4 is required for the G1-S transition. *The EMBO Journal*, 19(7), 1613–1624. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1613>
108. Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L., y Tyers, M. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes & Development*, 12(5), 692–705. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.692>
109. Pavletich, N., y Pabo, C. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, 252(5007), 809–817. <https://doi.org/10.1126/science.2028256>
110. Pic, A., Lim, F. L., Ross, S. J., Veal, E. A., Johnson, A. L., Sultan, M. R., West, A. G., Johnston, L. H., Sharrocks, A. D., y Morgan, B. A. (2000). The forkhead protein Fkh2 is a component of the yeast cell cycle transcription factor SFF. *The EMBO Journal*, 19(14), 3750–3761. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3750>
111. Racki, W. J. (2000). Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(17), 4524–4532. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4524>
112. Riemen, G., y Michaelis, G. (1993). A point mutation in the core subunit gene of yeast mitochondrial RNA polymerase is suppressed by a high level of specificity factor MTF1. *Molecular and General Genetics MGG*, 237(1–2), 49–57. <https://doi.org/10.1007/bf00282783>

113. Rihs, H. P., Jans, D. A., Fan, H., y Peters, R. (1991). The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *The EMBO Journal*, 10(3), 633–639. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07991.x>
114. *RIM101* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000001019>
115. Rookyard, A. W., Paulech, J., Thyssen, S., Liddy, K. A., Puckeridge, M., Li, D. K., White, M. Y., y Cordwell, S. J. (2021). A Global Profile of Reversible and Irreversible Cysteine Redox Post-Translational Modifications During Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury and Antioxidant Intervention. *Antioxidants & Redox Signaling*, 34(1), 11–31. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7765>
116. Rouillon, A., Barbey, R., Patton, E., Tyers, M., y Thomas, D. (2000). Feedback-regulated degradation of the transcriptional activator Met4 is triggered by the SCFMet30 complex. *The EMBO Journal*, 19(2), 282–294. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.2.282>
117. *RPH1* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000000971>
118. Sancar, G. B., y Smith, F. W. (1989). Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 4767–4776. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.4767>
119. Schmidt, G. W., Welkenhuysen, N., Ye, T., Cvijovic, M., y Hohmann, S. (2020). Mig1 localization exhibits biphasic behavior which is controlled by both metabolic and regulatory roles of the sugar kinases. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(6), 1489–1500. <https://doi.org/10.1007/s00438-020-01715-4>
120. Schmidt, M. C. (2000). beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *The EMBO Journal*, 19(18), 4936–4943. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4936>

121. Schonauer, M. S., Kastaniotis, A. J., Kursu, V. A. S., Hiltunen, J. K., y Dieckmann, C. L. (2009). Lipoic Acid Synthesis and Attachment in Yeast Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23234–23242. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.015594>
122. Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M., y Nasmyth, K. (1999). APC^{Cdc20} promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature*, 402(6758), 203–207. <https://doi.org/10.1038/46080>
123. Siggers, T., Reddy, J., Barron, B., y Bulyk, M. (2014). Diversification of Transcription Factor Paralogs via Noncanonical Modularity in C2H2 Zinc Finger DNA Binding. *Molecular Cell*, 55(4), 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.019>
124. Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, C. T., Rinaldi, N. J., Volkert, T. L., Wyrick, J. J., Zeitlinger, J., Gifford, D. K., Jaakkola, T. S., y Young, R. A. (2001). Serial Regulation of Transcriptional Regulators in the Yeast Cell Cycle. *Cell*, 106(6), 697–708. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00494-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00494-9)
125. Singh, N., Yadav, K. K., y Rajasekharan, R. (2016). ZAP1-mediated modulation of triacylglycerol levels in yeast by transcriptional control of mitochondrial fatty acid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 100(1), 55–75. <https://doi.org/10.1111/mmi.13298>
126. Slattery, M. G., Liko, D., y Heideman, W. (2006). The Function and Properties of the Azf1 Transcriptional Regulator Change with Growth Conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5(2), 313–320. <https://doi.org/10.1128/ec.5.2.313-320.2006>
127. Snustad, P. D., y Simmons, M. J. (2015). *Principles of Genetics* (7th Binder Ready Version ed.). Wiley.

128. Soto, A., y Carman, G. M. (2008). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CKI1*-encoded Choline Kinase by Zinc Depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 10079–10088. <https://doi.org/10.1074/jbc.m800502200>
129. Soto-Cardalda, A., Fakas, S., Pascual, F., Choi, H. S., y Carman, G. M. (2012). Phosphatidate Phosphatase Plays Role in Zinc-mediated Regulation of Phospholipid Synthesis in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 968–977. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.313130>
130. Stein, T., Kricke, J., Becher, D., y Lisowsky, T. (1998). Azf1p is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 34(4), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s002940050398>
131. Stewart, T., Wolfe, B. E., y Fuchs, S. M. (2021). Defining the role of the polyasparagine repeat domain of the *S. cerevisiae* transcription factor Azf1p. *PLOS ONE*, 16(5), e0247285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247285>
132. Strachan, T., & Read, A. (2019). *Human Molecular Genetics* (5th ed.). Garland Science.
133. Su, N. Y., Flick, K., y Kaiser, P. (2005). The F-Box Protein Met30 Is Required for Multiple Steps in the Budding Yeast Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), 3875–3885. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.10.3875-3885.2005>
134. Su, S. S., y Mitchell, A. P. (1993). Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3789–3797. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3789>
135. Takahashi, T., Yano, T., Zhu, J., Hwang, G. W., y Naganuma, A. (2010). Overexpression of *FAP7*, *MIG3*, *TMA19*, or *YLR392c* confers resistance to

arsenite on *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(6), 945–946. <https://doi.org/10.2131/jts.35.945>

136. Tatip, S., Taggart, J., Wang, Y., MacDiarmid, C. W., y Eide, D. J. (2019). Changes in transcription start sites of Zap1-regulated genes during zinc deficiency: Implications for *HNT1* gene regulation. *Molecular Microbiology*, 113(1), 285–296. <https://doi.org/10.1111/mmi.14416>
137. Teunissen, A. W. R. H., van den Berg, J. A., y Yde Steensma, H. (1995). Transcriptional regulation of flocculation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11(5), 435–446. <https://doi.org/10.1002/yea.320110506>
138. Thiele, D. J., y Hamer, D. H. (1986). Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(4), 1158–1163. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.4.1158-1163.1986>
139. Thomas, D., Cherest, H., y Surdin-Kerjan, Y. (1989). Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *MET25* gene. *Molecular and Cellular Biology*, 9(8), 3292–3298. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.8.3292-3298.1989>
140. Toke, D. A., Bennett, W. L., Dillon, D. A., Wu, W. I., Chen, X., Ostrander, D. B., Oshiro, J., Cremesti, A., Voelker, D. R., Fischl, A. S., y Carman, G. M. (1998). Isolation and Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *DPP1* Gene Encoding Diacylglycerol Pyrophosphate Phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3278–3284. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3278>
141. Toone, W. M., Johnson, A. L., Banks, G. R., Toyn, J. H., Stuart, D., Wittenberg, C., y Johnston, L. H. (1995). Rme1, a negative regulator of meiosis, is also a positive activator of G1 cyclin gene expression. *The EMBO Journal*, 14(23), 5824–5832. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00270.x>

142. Toyn, J. H., Johnson, A. L., Donovan, J. D., Toone, W. M., y Johnston, L. H. (1997). The Swi5 Transcription Factor of *Saccharomyces cerevisiae* Has a Role in Exit From Mitosis Through Induction of the cdk-Inhibitor Sic1 in Telophase. *Genetics*, 145(1), 85–96. <https://doi.org/10.1093/genetics/145.1.85>
143. Treitel, M. A., Kuchin, S., y Carlson, M. (1998). Snf1 Protein Kinase Regulates Phosphorylation of the Mig1 Repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6273–6280. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6273>
144. Triezenberg, S. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(2), 190–196. [https://doi.org/10.1016/0959-437x\(95\)80007-7](https://doi.org/10.1016/0959-437x(95)80007-7)
145. van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E., y Babu, M. M. (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews*, 114(13), 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>
146. Vancurova, I., Paine, T., Lou, W., y Paine, P. (1995). Nucleoplasmin associates with and is phosphorylated by casein kinase II. *Journal of Cell Science*, 108(2), 779–787. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.2.779>
147. Vandromme, M., Gauthier-Rouvière, C., Lamb, N., y Fernandez, A. (1996). Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(2), 59–64. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)80182-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)80182-4)
148. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora,

- A., Lutfi, M., . . . Velankar, S. (2021). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
149. Voth, W. P., Olsen, A. E., Sbia, M., Freedman, K. H., y Stillman, D. J. (2005). *ACE2*, *CBK1*, and *BUD4* in Budding and Cell Separation. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 1018–1028. <https://doi.org/10.1128/ec.4.6.1018-1028.2005>
150. Welch, J., Fogel, S., Buchman, C., y Karin, M. (1989). The *CUP2* gene product regulates the expression of the *CUP1* gene, coding for yeast metallothionein. *The EMBO Journal*, 8(1), 255–260. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03371.x>
151. Weser, U., Rupp, H., Donay, F., Linnemann, F., Voelter, W., Voetsch, W., y Jung, G. (1973). Characterization of Cd, Zn-Thionein (Metallothionein) Isolated from Rat and Chicken Liver. *European Journal of Biochemistry*, 39(1), 127–140. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03111.x>
152. Westholm, J. O., Nordberg, N., Murén, E., Ameer, A., Komorowski, J., y Ronne, H. (2008). Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. *BMC Genomics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-601>
153. Wright, C. F., Hamer, D. H., y McKenney, K. (1988). Autoregulation of the yeast copper metallothionein gene depends on metal binding. *Journal of Biological Chemistry*, 263(3), 1570–1574. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)57342-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)57342-2)
154. Wu, C. Y., Bird, A. J., Winge, D. R., y Eide, D. J. (2007). Regulation of the Yeast TSA1 Peroxiredoxin by ZAP1 Is an Adaptive Response to the

- Oxidative Stress of Zinc Deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2184–2195. <https://doi.org/10.1074/jbc.m606639200>
155. Wu, C. Y., Roje, S., Sandoval, F. J., Bird, A. J., Winge, D. R., y Eide, D. J. (2009). Repression of Sulfate Assimilation Is an Adaptive Response of Yeast to the Oxidative Stress of Zinc Deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27544–27556. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.042036>
156. Wu, Y., Du, J., Xu, G., y Jiang, L. (2016). The transcription factor Ace2 and its paralog Swi5 regulate ethanol production during static fermentation through their targets Cts1 and Rps4a in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 16(3), fow022. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow022>
157. Wu, Y. H., Frey, A., y Eide, D. (2011). Transcriptional regulation of the Zrg17 zinc transporter of the yeast secretory pathway. *Biochemical Journal*, 435(1), 259–266. <https://doi.org/10.1042/bj20102003>
158. Yadav, K., Singh, N., y Rajasekharan, R. (2015). The *PHO4* Transcription Factor Regulates Triacylglycerol Metabolism under Low Phosphate Conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *The FASEB Journal*, 29(S1). https://doi.org/10.1096/fasebj.29.1_supplement.715.38
159. Zampar, G. G., Kümmel, A., Ewald, J., Jol, S., Niebel, B., Picotti, P., Aebersold, R., Sauer, U., Zamboni, N., y Heinemann, M. (2013). Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 651. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.11>
160. *ZAP1* | *SGD*. (s. f.). Saccharomyces Genome Database. <https://www.yeastgenome.org/locus/S000003592>
161. Zhao, H., y Eide, D. J. (1997). Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5044–5052.
<https://doi.org/10.1128/mcb.17.9.5044>

162. Zhou, Q., Liu, Z. L., Ning, K., Wang, A., Zeng, X., y Xu, J. (2014). Genomic and transcriptome analyses reveal that MAPK- and phosphatidylinositol-signaling pathways mediate tolerance to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde for industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/srep06556>
163. Zhu, G., Spellman, P. T., Volpe, T., Brown, P. O., Botstein, D., Davis, T. N., y Futcher, B. (2000). Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature*, 406(6791), 90–94.
<https://doi.org/10.1038/35017581>