



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA
PAREJA DE GENES PARÁLOGOS *ALT1* Y
ALT2 DE *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

LUIS ROBLEDO ARRATIA



Tutora: DRA. MARÍA ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

MÉXICO, D. F.

Diciembre 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Regulación transcripcional de la pareja de genes parálogos *ALT1* y *ALT2* de *Saccharomyces cerevisiae*

Reconocimientos

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez, en el laboratorio 301 Oriente, Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la QFB Cristina Aranda Fraustro

Se reconoce la asesoría de la Dra. Laura Ongay Larios de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, en la construcción de quimeras moleculares y en la optimización de las condiciones de las PCRs utilizadas en este trabajo.

Se utilizaron los servicios de síntesis de oligonucleótidos (Bíol. Dolores Minerva Mora Cabrera), secuenciación de DNA (Bíol. Guadalupe Codiz Huerta) y lectura de membranas radiactivas en el Typhon, que provee la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Esta investigación fue apoyada por los siguientes proyectos: a) IN204209 de la Dirección de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, b) PIFUTP08-165 del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal,

Durante los estudios de maestría recibí una beca otorgada por CONACYT

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Antonio Peña Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Agradecimientos

A mi familia porque han sido siempre el motor en mi trabajo y en mi vida. A mi mamá que ha sacrificado todo por estar cada mañana soportando nuestro buen o mal humor, porque nos hemos enriquecido tanto nosotros como ella y por la fortaleza y el estoicismo que me transmite su personalidad; si ella se tambaleara, nada sería igual. A mi papá por sus consejos y su determinación, por su visión práctica de las situaciones, porque he aprendido a tomar decisiones como él lo hace, por el apoyo que siento.

A Yolanda y Diego porque tenemos más coincidencias que diferencias y por eso siempre debatiremos y criticaremos y nos burlaremos de todo aquello que esté alejado de nuestro modo de ver la vida; haremos uno contra la estupidez humana que, como dijera Einstein, no tiene límites.

A Javier por su compañía, por su apoyo y por encontrar siempre el ángulo positivo y hasta el divertido de cualquier situación, por hacerme ver que los problemas son más sencillos de lo que creo y que no vale la pena el drama que suelo hacer.

Agradezco a la Dra. Alicia González porque desde el primer momento me sedujo con su enorme pasión por la ciencia, porque me ha demostrado que a pesar de la generalidad, un científico sí puede ser culto; por lo exquisito de su plática y su sarcasmo certero.

A los miembros de miembros de mi comité tutorial, los Dres. Felipe Cruz y Dimitris Georgellis por tomarse el tiempo de escucharme. A mi jurado de tesis Dr. Antonio Peña, Dra. Guadalupe Espín, Dr. Roberto Coria y Dr. León Martínez, por leer mi manuscrito y enriquecerlo con sus comentarios y observaciones.

A Cristina Aranda, por todo lo que me enseñó, por todos los errores que evitó que cometiera y por todas las pláticas, diurnas y nocturnas, por su disposición y su tiempo.

A mis compañeros del 301-Oriente; a Florencia por iniciarme en este intrincado mundo de las ALTs y por todos sus consejos, a Maritrini por sus sugerencias de experimentos y de lecturas, a Gina y a Gustavo porque entendemos lo que significan las secuencias difíciles, a Fabiola por las disertaciones existenciales en las que nos enfrascamos, a Jorge por su visión del mundo, a Hugo por sus ocurrencias, a Karla y sus recomendaciones musicales, a Geovani por nuestras pláticas de libros, de ideas y del acontecer diario, a James, a Citlalli, a Mariana y a Eduardo. A todos ellos porque después de pasar juntos más de 8 horas diarias en el laboratorio, nos conocimos y sobretodo nos reímos y nos apoyamos.

A mis mejores amigos, Circe y Jhonatan, porque ya hace mucho forman parte de mí.

A la UNAM, por todo lo que me ha permitido aprender, por lo maravilloso de su ambiente y de sus profesores y de sus bibliotecas. A mi Universidad porque este año cumplo 10 años de pertenecer a ella y consecuentemente, de ser quien soy. Mucho le debo.

Índice

Resumen	4
Introducción	5
- Duplicación genómica	6
- El 40% de los parálogos retenidos codifica para enzimas del metabolismo del nitrógeno	17
- Metabolismo de la alanina	19
Antecedentes	20
Objetivos	24
Resultados y discusión	
- Regulación de <i>ALT1</i>	
La expresión de <i>ALT1</i> se induce en presencia de alanina.	25
En glucosa-amonio, Alt1p participa en la biosíntesis de alanina.	27
- Regulación de <i>ALT2</i>	
I. Análisis de estudios de expresión global realizados por otros grupos	
<i>ALT2</i> se expresa en medio rico en fase estacionaria y no se regula por <i>SWI/SNF</i> .	30
II. Análisis de la secuencia promotora	
El represor codificado por <i>NRG1</i> participa en la represión de la expresión de <i>ALT2</i>	34
Alt2p no sustituye la función de Alt1p cuando la levadura se cultiva en etanol	39
Conclusiones	42
Perspectivas	43
Materiales y métodos	
Cepas utilizadas	44
Condiciones de cultivo	45
Construcción del plásmido YEp353	45
Transformación de la levadura por acetato de litio	46
Ensayo de β -galactosidasa	47
Hibridación tipo Northern	47
Hibridación tipo Western	48
Extracción y medición de alanina intracelular	49
Referencias	50

Resumen

La duplicación genómica es considerada una vía ventajosa para la innovación evolutiva debido a que los genes duplicados pueden constituir material genético para el surgimiento de nuevas funciones. *Saccharomyces cerevisiae* duplicó su genoma hace 100 millones de años; sin embargo, la mayoría de las copias duplicadas (85%) fueron eliminadas, dejando a estos organismos con 5800 genes que incluyen muchos duplicados. A pesar de ello, quedó al menos una copia de cada gen del conjunto génico ancestral.

Las transaminasas de alanina (ALTs) son en teoría enzimas reversibles que producen piruvato y L-glutamato a partir de alanina y alfa-cetoglutarato. A pesar de que en *S. cerevisiae* no se ha descrito la vía que lleva a cabo la biosíntesis de L-alanina, se ha propuesto que los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* son los que codifican para estas enzimas, aunque únicamente se ha demostrado experimentalmente la participación de *ALT1*. Alt1p y Alt2p no son fisiológicamente redundantes; Alt1p es necesaria para la biosíntesis de alanina e indispensable para su catabolismo cuando las cepas se cultivan en etanol, mientras que en glucosa sólo es catabólica. Alt2p no reemplaza la función de Alt1p por lo que su función no es redundante; no se pudo concluir que *ALT2* constituyera un gen funcional pues la actividad de alanino aminotransferasa ha sido detectada únicamente para Alt1p.

A partir de estos antecedentes, los objetivos de este trabajo fueron: estudiar la regulación de la expresión de los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* bajo condiciones respiratorias y fermentativas, y encontrar las condiciones específicas bajo las cuales es posible que *ALT2* se exprese.

Por medio de experimentos tipo Northern y Western blot, se determinó que la expresión de *ALT1* se induce en presencia de alanina como fuente de nitrógeno, comparada con las células crecidas en amonio. A través de la cuantificación de las pozas intracelulares de alanina, se hizo evidente que cuando las células crecen en glucosa-amonio, Alt1p participa en la biosíntesis de la alanina pues la falta de *ALT1* disminuye notoriamente la concentración del aminoácido; a pesar de que el gen se elimine, la levadura es capaz de crecer, sugiriendo que la poza remanente es aportada por la vía de la omega amidasa. La falta de *ALT2* no repercutió en la poza de alanina y su expresión a partir de un plásmido multicopia presente en la cepa silvestre no resultó en un incremento de la poza de alanina al compararse con la poza acumulada por una cepa silvestre, sugiriendo que la expresión de este gen es baja, confirmando los datos de expresión.

Basándonos en un estudio de expresión global, se escogió una condición en la cual era factible que *ALT2* se expresara; por lo tanto, se analizó el nivel del transcrito en células crecidas en medio rico al llegar a fase estacionaria tardía; el resultado fue que sólo hasta los 4 días de cultivo, el gen se expresó; por lo tanto, esta es la primera condición en la que se demostró la expresión de *ALT2*. El transcrito de *ALT1* tiene un comportamiento opuesto al de *ALT2*, pues en las primeras etapas del crecimiento vemos su expresión pero al llegar a los 4 días se abate. El único sitio de unión a factores transcripcionales en *ALT2* es para Nrg1, un regulador negativo susceptible a represión por glucosa; este sitio no está presente en *ALT1*. La falta de Nrg1 provocó un aumento en los niveles de transcripción de *ALT2*, comparado con la cepa silvestre. Adicionalmente, se encontró que la expresión de *ALT2* aumentó cuando la cepa silvestre se cultivó en etanol como fuente de carbono, con respecto a la nula expresión observada en glucosa. Estos resultados confirmaron que en ausencia de glucosa, la expresión de *ALT2* aumenta. A pesar de esto, su producto fue incapaz de participar en la biosíntesis de alanina. Si esto se debe a que la traducción no se lleva a cabo o a que la proteína generada no es funcional, habría que pensar si esta copia de la pareja de parálogos está en proceso de convertirse en pseudogen y finalmente perderse.

Regulación transcripcional de la pareja de genes parálogos *ALT1* y *ALT2* de *Saccharomyces cerevisiae*

Introducción

Se han descrito alrededor de 80 000 especies de hongos; sin embargo, se estima que existen millones de ellas (Fitzpatrick et al., 2006). El phylum Ascomycota es el más grande y su origen monofilético ha sido comprobado con datos moleculares. Este phylum está compuesto por dos subphyla: Pezizomycotina (hongos hifales como *Neurospora crassa*) y Saccharomycotina (levaduras como *Candida albicans*) que divergieron aproximadamente hace 798 y 1166 millones de años (Figura 1), además el phylum está directamente relacionado con Archiascomycotina (que incluye al grupo externo *Schizosaccharomyces pombe*); datos moleculares señalan que las levaduras unicelulares evolucionaron a partir de progenitores hifales multicelulares (Scannell et al., 2007).

Dentro del subphylum Saccharomycotina, también llamado hemiascomicetos, existen tres grupos, uno de ellos es el complejo de *Saccharomyces*, aquel para el que se cuenta con más datos de secuencia (Figura 1). La mayoría de las especies de este grupo comparten un núcleo génico de aproximadamente 4281 genes, sin embargo, cualquier especie en particular se aleja de este núcleo como resultado de la pérdida o ganancia de genes, que ocurre por duplicación génica, transferencia horizontal o por la aparición *de novo* de ORFs (Fitzpatrick et al., 2006).

En los genomas eucariontes hay muy pocos genes (aproximadamente 3%) que parecerían ser redundantes debido a que las cepas no presentan fenotipos cuando se muta alguno de ellos. Por el contrario, casi la totalidad de los genes son necesarios y es de prever que aquellos que fueron redundantes en algún momento de la evolución sufrieron mutaciones que los llevaron a desaparecer, pues no constituían una ventaja para los organismos (Scannell et al., 2007).

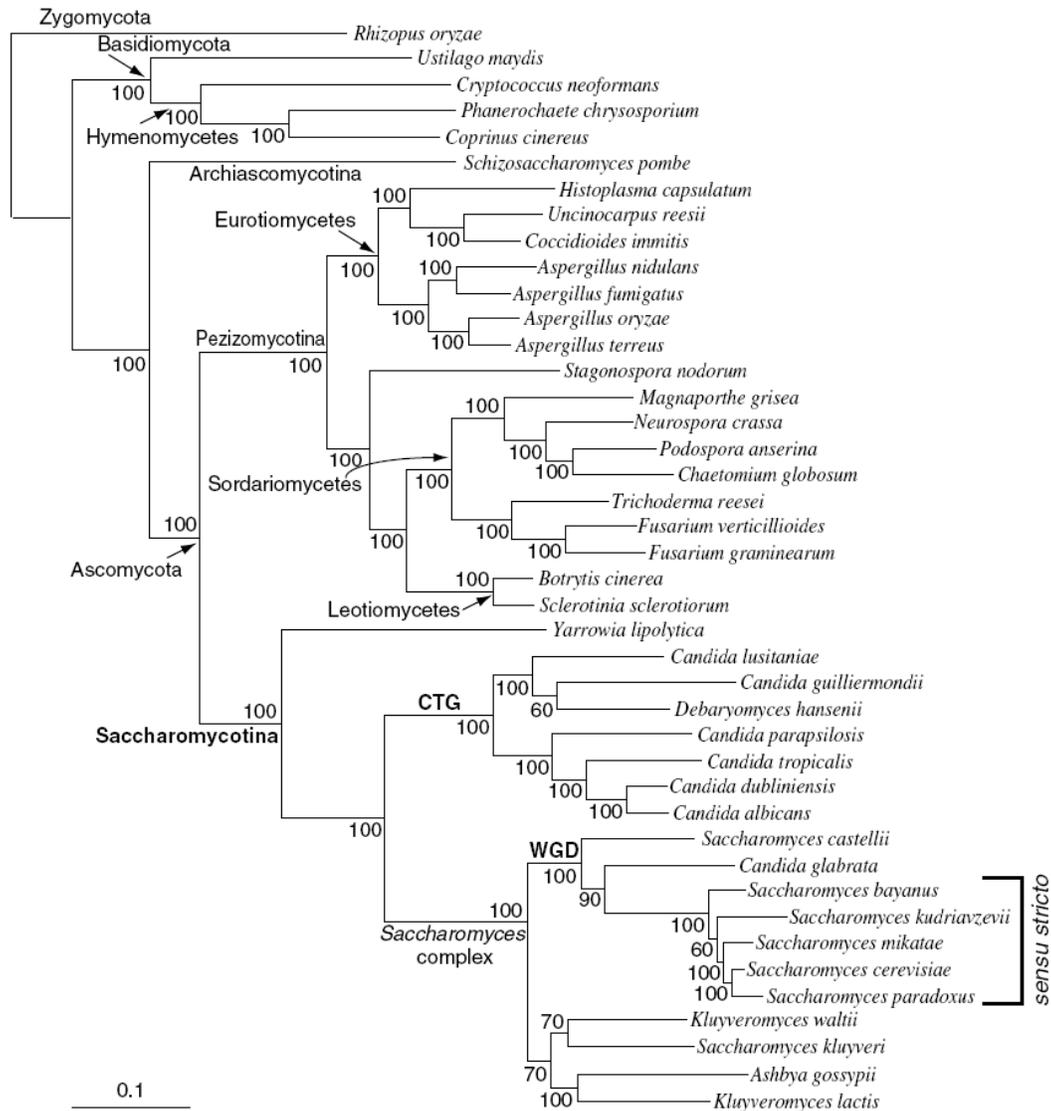


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los hongos. WGD indica el punto en la filogenia en el que se mapea el evento de duplicación total del genoma. CTG = clado con variaciones en el código genético. Los números en los nodos son los valores de Bootstrap. Tomado de Fitzpatrick et al. (2006).

Duplicación genómica

La duplicación genómica ha sido considerada una vía ventajosa para la innovación evolutiva debido a que los genes duplicados pueden constituir material genético para el surgimiento de nuevas funciones a través de la aparición de mutaciones y de selección natural (Kellis et al., 2004).

Por ejemplo, Ohno (1970) creía que las duplicaciones de genes y genomas tienen mayor importancia que lo que consideraba únicamente como fuerzas modificadoras de la selección natural, para dar forma a la evolución de novedades y al aumento en la complejidad. En cierto sentido tenía razón, ya que la mayoría de los aspectos relacionados con la evolución y la función del genoma están ligados a la duplicación génica, la cual ocurre en todas las formas de vida y ha tenido lugar desde antes del último ancestro común (LUCA, Last Universal Common Ancestor, por sus siglas en inglés) (Innan y Kondrashov, 2010).

Contrariamente, debido a que las duplicaciones génicas son segregadas en más de una copia en las poblaciones naturales, algunas llegan a producir enfermedades; tal es el caso del locus de la α -sinucleína que por presentar tres copias, desbalancean la estequiometría bioquímica del organismo y por tanto, genera Parkinson; su contribución es cuantitativa y no cualitativa (Singleton et al., 2003 e Innan y Kondrashov, 2010).

Las duplicaciones pueden involucrar genes individuales, segmentos genómicos o los genomas completos. La duplicación total del genoma (WGD, Whole Genome Duplication, por sus siglas en inglés) es un fenómeno intrigante pero poco comprendido; en principio este evento podría permitir una adaptación a nuevos ambientes a gran escala (Kellis et al., 2004). Una gran cantidad de plantas, vertebrados y organismos unicelulares descienden de ancestros que duplicaron sus genomas por autopoliploidía o aloploidia; entre ellos se encuentran la mayoría de las plantas con flores, los anfibios, los peces, el ciliado *Paramecium tetraurelia* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Van de Peer et al., 2009).

Se ha argumentado que la duplicación total de genomas (WGD) constituye un mecanismo que provee de nuevas oportunidades para el éxito evolutivo, lo que puede comprobarse fácilmente dado que ha generado grupos particularmente ricos en especies (Otto et al., 2007 y Comai et al., 2005). Los eventos de poliploidía que han perdurado son muy pocos, tres en los vertebrados, cuatro en las angiospermas y uno en los hongos; esto nos demuestra que a pesar de que los descendientes de eventos de este tipo en general no sobreviven, los que sí lo hacen, forman parte de linajes exitosos. Crow y Wagner (2006) argumentan que las duplicaciones de genomas disminuyen el riesgo de extinción, pues debido a la redundancia funcional, las especies son muy robustas ante las mutaciones. Al haber duplicaciones totales, aparece una gran variedad de novedades fisiológicas evidentes, producto de la adaptación y evolución al estrés ambiental que por

lo regular ocurren después de la aparición de las poliploidías; por ejemplo, se ha demostrado que las plantas e insectos poliploides son mucho más tolerantes a una gran variedad de ambientes comparados con sus parientes diploides y por lo tanto tienen una distribución geográfica más amplia (Van de Peer *et al.*, 2009).

En el genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado 55 regiones duplicadas, las cuales contienen 376 pares de genes homólogos cuya identidad varía entre el 24 y el 100%, con un promedio de 63% (Figura 2). Estas zonas son de aproximadamente 55 kb y contienen 6.9 pares de genes duplicados que abarcan el 50% del genoma (Wolfe y Shields, 1997).

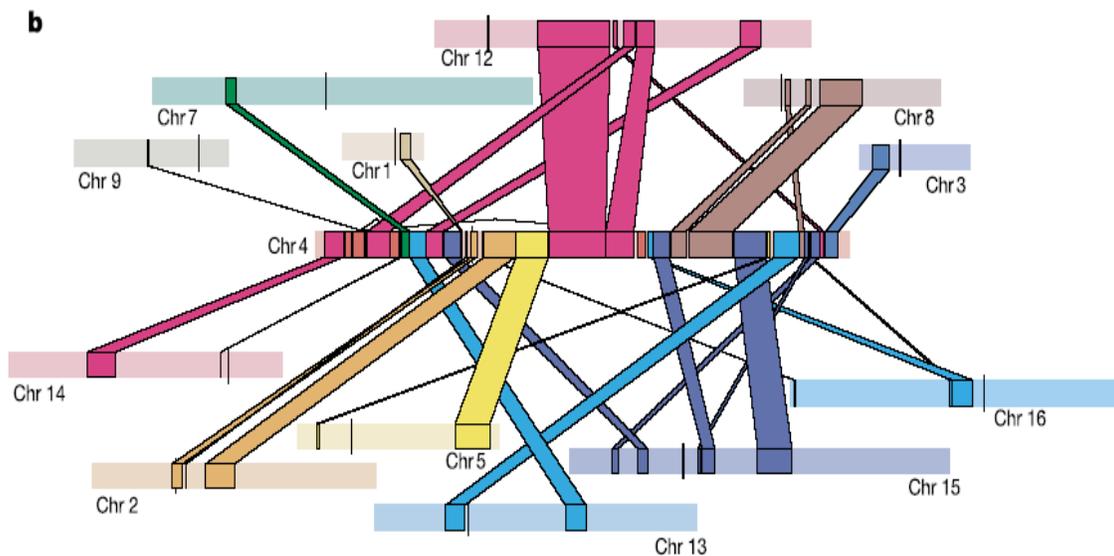


Figura 2. Bloques duplicados en *S. cerevisiae*. Detalle del cromosoma 4 con regiones hermanas en otros cromosomas. Tomado de Kellis, et al. (2004).

El origen por poliploidía del genoma de las levaduras se propuso en 1987 (Smith) y en 1997 se postuló el modelo de la tetraploidía y la translocación (Wolfe y Shields) debido a que 50 de las 55 regiones tienen la misma orientación transcripcional con respecto del centrómero en las dos copias. Además de esto, basados en una distribución de Poisson de los tamaños de los bloques, 55 duplicaciones sucesivas se esperaría que derivaran en alrededor de siete regiones triplicadas (es decir, duplicados de duplicados), sin embargo no existe ninguna.

A partir de esto Wolfe y Shields (1997) argumentan que *S. cerevisiae* es un antiguo tetraploide muy semejante al maíz y tal vez a algunos vertebrados; han propuesto que dos levaduras diploides ancestrales, cada una con 5000 genes aproximadamente, se fusionaron para formar un tetraploide; en total se duplicaron ocho cromosomas. Sin embargo, la poliploidía tiene como desventaja una mayor inestabilidad genómica, que perdura hasta que el genoma regresa a su ploidía normal funcional a través de mutaciones, pérdida de genes y rearrreglos genómicos (Kellis et al., 2004). Para que un gen se pierda deben existir condiciones adecuadas; por ejemplo, que desaparezca la presión de selección que hace que el gen se mantenga; que aparezca una nueva presión de selección que haga que el gen sea no adaptativo; o que aparezca otro gen que complemente la pérdida del primero (Wolfe y Shields, 1997).

Debido a esto fue que, después de la duplicación, estas especies se hicieron diploides (sufrieron un decaimiento de identidad de secuencia) y la mayoría de las copias duplicadas (cerca del 85%) fueron eliminadas, dejando a estos organismos con un ciclo de vida haploide/diploide y 5800 genes que incluyen muchos duplicados, por lo cual se dice que son poliploides degenerados. A pesar de ello, esta pérdida fue balanceada y complementaria en las regiones pareadas, dejando al menos una copia de cada gen del conjunto génico ancestral (Figura 3). Las zonas del cromosoma duplicadas fueron posteriormente partidas en pequeños fragmentos por translocaciones recíprocas (Scannell et al., 2007).

Una pregunta que se han hecho varios autores es qué tipos de genes son los que sufren duplicaciones y cuáles de ellos permanecen duplicados. Conant y Wolfe (2008) dicen que a pesar de que los genes que evolucionan lentamente son los que tienden a encontrarse en duplicado más frecuentemente, aquellos que son necesarios y que en principio también tienen tasas de evolución bajas, no los vemos en duplicado. Esto lo explican argumentando que ciertos tipos de genes podrían codificar para proteínas con características bioquímicas (como la promiscuidad enzimática) que les permiten adaptarse fácilmente a las nuevas funciones, o que para algunos tipos de genes la innovación biológica a través de la duplicación les resulta en un efecto perjudicial inmediato; es decir, es selectivamente desventajosa; al hecho de que la duplicación pueda interferir con sistemas celulares altamente regulados y por tanto ser selectivamente desfavorable, se le ha denominado hipótesis del balance de la dosis.

Un prerrequisito para el desarrollo de sistemas más complejos es un incremento en el número de genes reguladores, que las duplicaciones del genoma favorecen. Los reguladores transcripcionales y los transductores de señales se han retenido preferentemente en duplicado en *Arabidopsis thaliana*, en los vertebrados, en los peces y en las levaduras. De manera particular, hay varias familias génicas que nos demuestran que el repertorio regulatorio se ha ampliado gracias a las duplicaciones del genoma. Estas clases de genes no pueden ser expandidas fácilmente a través de duplicaciones de genes únicos. Ambos fenómenos pueden ser explicados por efectos del balance de dosis, lo cual es un proceso no adaptativo (Van de Peer *et al.*, 2009).

El poder de las duplicaciones del genoma no estriba en facilitar innovaciones a partir de cero, sino en perfeccionar versiones primitivas o precursores de ciertas características y explotar su potencial, por ejemplo, limitando a los genes pleiotrópicos y facilitando que se enfoquen en propósitos especializados. El hecho de que se duplique el genoma y que se retengan los reguladores en duplicado, no implica que el organismo vaya a ser morfológicamente más complejo; esto es evidente en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual sigue siendo unicelular al igual que su ancestro y aún así está perfectamente adaptada a su medio y ha evolucionado a partir del evento de duplicación (Van de Peer *et al.*, 2009).

Los genes ortólogos del género *Kluyveromyces* tienen una única copia, por lo cual el linaje de *Kluyveromyces* y el de *Saccharomyces* deben haber divergido antes de la duplicación del genoma (Figura 3); la fecha exacta no es conocida, sin embargo asumiendo un reloj molecular constante para el RNA ribosomal 18S y un tiempo de separación entre hongos y animales de 10^9 años, se estima que se dio hace 1.5×10^8 años, lo que coloca a la duplicación del genoma hace 10^8 años (Kellis *et al.* 2004). Antes de que el genoma se duplicara, las funciones separadas de las proteínas ortólogas actuales originadas en esa duplicación, debieron estar embebidas en una sola proteína, o una de las funciones no existía, (o, menos probable aún, una de las funciones era llevada a cabo por un gen distinto que fue reemplazado). Esto implica que la fisiología de la levadura ancestral era un poco distinta de la actual y era quizá más similar a la de *Kluyveromyces*.

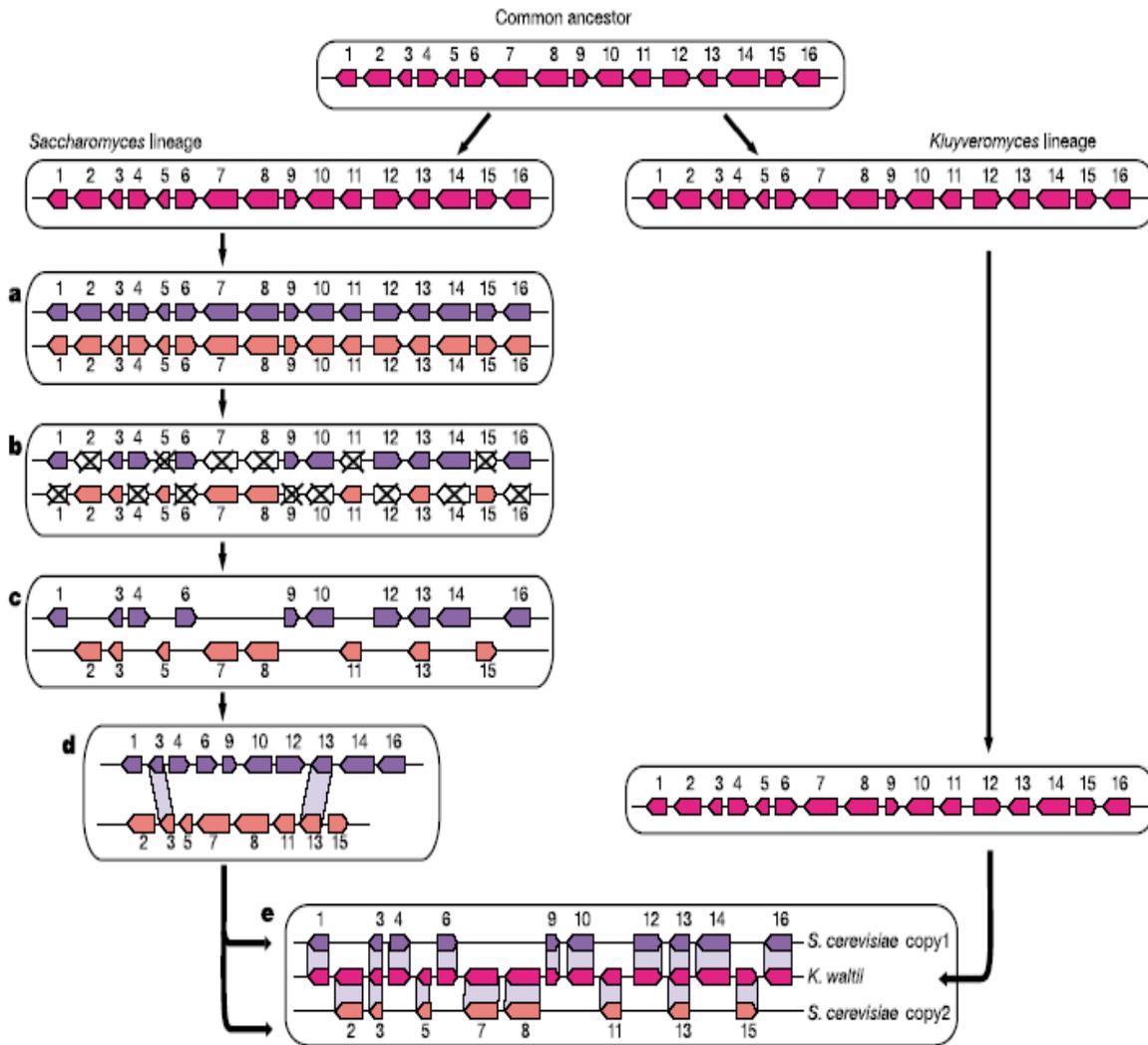


Figura 3. Después de la divergencia de *K. waltii*, el linaje de *Saccharomyces* duplicó su genoma, en cada cromosoma los genes mutaron o se perdieron; segmentos hermanos retuvieron diferentes subgrupos del grupo original y muy pocos permanecieron con dos copias. La comparación con *K. waltii* revela la naturaleza de los duplicados, ya que los segmentos hermanos tienen el mismo orden que los genes ancestrales, es decir, presentan sintenia (Tomado de Kellis, *et al.*, 2004)

La diferencia fisiológica más notable entre la moderna *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras, es su habilidad para fermentar azúcares bajo condiciones anaerobias, produciendo etanol. La duplicación del genoma pudo haber sido determinante en su adaptación evolutiva al crecimiento anaerobio; los genes duplicados incluyen varios pares que son regulados de manera distinta en condiciones aerobias y anaerobias y otros que codifican para transportadores de azúcares, siendo interesante resaltar que la duplicación

coincide con el tiempo en que las angiospermas se hicieron más abundantes (Conant y Wolfe, 2007).

Conant y Wolfe (2007) proponen que existe una relación entre la duplicación del genoma, un aumento en la concentración enzimática y la preferencia de *Saccharomyces cerevisiae* de fermentar glucosa en presencia de oxígeno. Encontraron que la levadura retuvo en duplicado genes de la glucólisis y que el aumento enzimático generó que el flujo glucolítico favoreciera la fermentación de etanol sobre la respiración oxidativa. Con esto también confirmaron que los organismos con metabolismos ineficientes pero rápidos tienen ventajas selectivas sobre parientes más eficaces bajo ciertas condiciones.

En el caso de que dos genes parálogos hayan adquirido funciones distintas, ambos serán retenidos en el genoma, aunque habrá poca evidencia de su duplicación ancestral debido a la disrupción global en el orden génico debido a los rearrreglos cromosomales. Al comparar los genomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *K. waltii* (una de las especies más cercanas filogenéticamente), se encontraron varios bloques con sintenia conservada y se vio que la mayoría de las regiones de la segunda levadura corresponden con dos regiones en la primera y cada una se relaciona con un sólo subconjunto de los genes de *K. waltii* (Figura 3).

Tras estos resultados se pudo concluir que un evento WGD ocurrió en el linaje de *Saccharomyces* después de su divergencia del linaje de *Kluyveromyces* (Figura 1). Como se mencionó anteriormente, se calcula que este fenómeno de duplicación global tuvo lugar hace aproximadamente 100 millones de años (Marques et al., 2008) y pudo haber ocurrido en la etapa haploide o en la diploide por endo-duplicación (auto-poliploidía) o por fusión de dos parientes cercanos (alopoliploidía). Debido a la pérdida de genes, el genoma de *S. cerevisiae* es únicamente 13% más grande que el de *K. waltii* y contiene sólo 10% más genes.

El grupo de Kenneth Wolfe reconstruyó el genoma que el ancestro de *S. cerevisiae* tendría justo antes de la duplicación total del genoma, encontrando que contenía 4703 loci en ocho cromosomas; se dieron cuenta que la levadura moderna únicamente ha ganado 124 genes desde entonces y que hay 88 loci ancestrales de los cuales se perdieron ambas copias ganadas en la duplicación. Con su estrategia comprobaron que los genes ganados por *S. cerevisiae* tienen funciones relacionadas con la producción y el consumo

de etanol, con el crecimiento en ambientes hipóxicos y con la asimilación de fuentes alternativas de nutrientes (Gordon et al., 2009).

En *S. cerevisiae*, el 44% del total de genes forma parte de alguna familia multigénica (Dujon et al., 2004), en donde los genes involucrados en alguna de las diferentes vías metabólicas están particularmente favorecidos; el 60% de los genes del metabolismo central del carbono y 40% de los del metabolismo nitrogenado están por duplicado (Marland et al., 2004); de estos últimos, el 13% se originó en el evento de poliploidización hace 100 millones de años (Seoighe y Wolfe, 1999). El estudio de las isoenzimas GDH1 y GDH3 (De Luna et al., 2001) así como LYS20 y LYS21 (Quezada et al., 2008) evidenció que la conservación y especialización de algunos parálogos del metabolismo del nitrógeno también pueden ser una consecuencia de la especialización hacia el metabolismo facultativo.

Existen varios destinos evolutivos posibles de las dos copias de genes duplicados; por ejemplo, una de las dos copias puede ser redundante y acumular mutaciones deletéreas que eventualmente la convierten en un pseudo-gen no funcional (Marques et al., 2008 y Ohno, 1970). Alternativamente, ambas copias pueden ser conservadas de manera funcional si un aumento en la dosis génica del gen ancestral resulta benéfico (Li, 2005), o si un cambio en la estequiometría de las proteínas en complejos fuera deletéreo (Marques et al., 2008). Por otro lado, la divergencia de los genes duplicados pudo haber ocurrido por dos formas tal y como se esquematiza en la figura 4: una es que después de la duplicación, una copia conservó la función original y por lo tanto la otra copia tuvo la libertad de divergir y adquirir una nueva función útil o tal vez las dos copias divergieron hacia nuevas funciones (neofuncionalización) (Ohno, 1970). La otra posibilidad es que los duplicados se reparten las funciones ancestrales y por tanto ambos se requieren para la total adecuación del organismo (subfuncionalización). Esta ganancia génica, al igual que la pérdida, es posible con o sin selección darwiniana positiva; de hecho, la subfuncionalización se ha descrito casi siempre como un mecanismo pasivo de preservación génica (Lynch y Force, 2000, Force et al., 1999 y Conant y Wolfe, 2008).

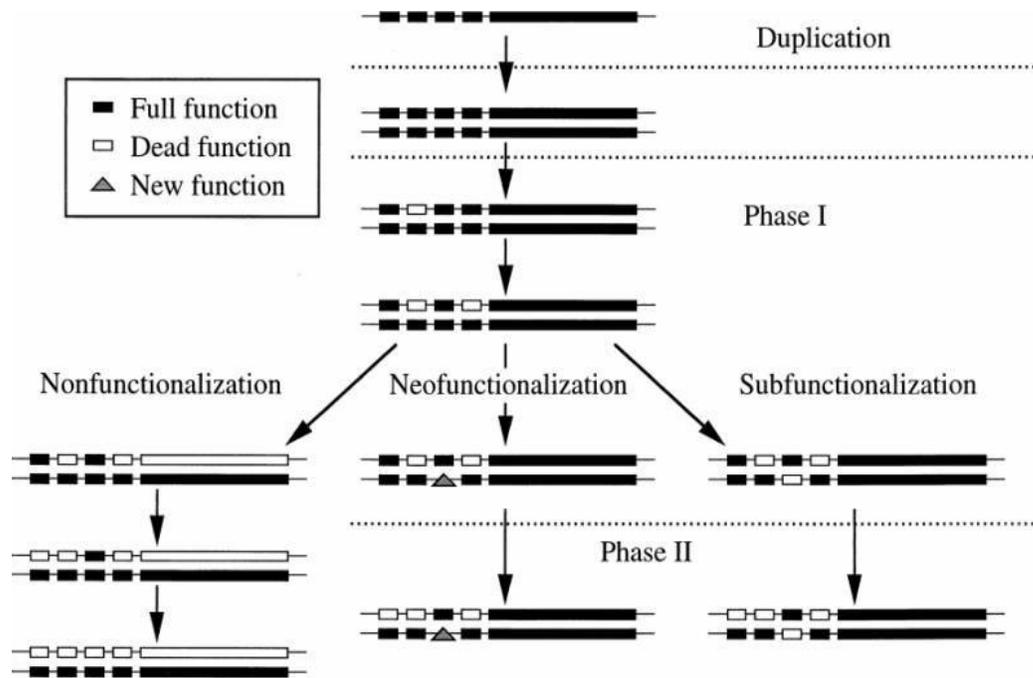


Figura 4. Destino de los genes duplicados. Tomado de Lynch y Force, 2000

Existen varios escenarios neutrales que pueden promover la especiación; un ejemplo puede ser en el que ambas copias de un gen que tiene gran cantidad de funciones, son retenidas en diferentes poblaciones después de un evento de duplicación. Si las poblaciones se aíslan geográficamente, entonces los genes duplicados en cada una podrán subfuncionalizarse, y los ortólogos en diferentes poblaciones podrán evolucionar distintas funciones. Los híbridos de ambas poblaciones se desarrollarán correctamente debido a que cada subfunción se lleva a cabo por uno de los genes de cada población. Sin embargo, una fracción de la descendencia carecerá de una de las subfunciones y morirá si esta función es esencial. Como resultado, la partición de la subfunción en linajes específicos acelera la especiación (Van de Peer *et al.*, 2009).

La pérdida de genes o la subfuncionalización se puede dar incluso millones de años después del evento de duplicación total del genoma y continuar promoviendo la especiación en largos periodos de tiempo, hasta que se presenten las condiciones ecológicas propicias. Un ejemplo de ese potencial de diversificación es *Xenopus laevis*, que mantiene entre 32 y 47% de sus genes por duplicado, 40 millones de años después de su más reciente evento de poliploidización; además, su genoma tiene pocos indicios de subfuncionalización o neofuncionalización (Van de Peer *et al.*, 2009).

Kellis *et al.* (2004) señala que la distinción funcional entre los parálogos derivados y los ancestrales se confirma por el fenotipo de las mutantes cuando crecen en medio rico. Se encontró que la eliminación del parálogo ancestral es letal en el 18% de los casos, mientras que la supresión del parálogo derivado nunca resultó letal; por tal motivo argumenta que éste parálogo no es esencial bajo estas condiciones, ya sea porque no funciona en medio rico o porque el parálogo ancestral complementa su función. Van más allá y explican que la copia derivada ha perdido algún aspecto esencial de su función y por tal razón no puede complementar la falta del gen ancestral.

Hasta este punto se entiende claramente cuál es la importancia de las duplicaciones; sin embargo, el modo en que éstas se conservan y evolucionan, es aún tema de discusión. Existe una gran cantidad de modelos que tratan de explicarlo; sin embargo, las duplicaciones tienen un comportamiento muy parecido al resto de los cambios génicos, por lo cual pasan por tres etapas principales para poder preservarse evolutivamente: 1) origen por medio de mutaciones, 2) fase de fijación en la cual se segregan en la población y 3) fase de preservación que es cuando los cambios fijados se mantienen (Innan y Kondrashov, 2010).

A estas etapas, las duplicaciones génicas agregan una más, que se da a partir del surgimiento de la nueva copia del gen y consiste en la adquisición de diferencias genéticas entre las copias, las cuales pueden modificar las posibilidades de ambas de ser preservadas. Innan y Kondrashov (2010) hacen una revisión muy extensa acerca de los diferentes modelos que existen y llegan a la conclusión de que en la mayoría de ellos, esta última etapa es crucial para la preservación de las nuevas copias, la llaman fase de determinación del destino (Figura 5). Ellos explican que durante la etapa de pre-duplicación, los genes de copia única están fijados en la población; cuando un duplicado aparece, empieza la fase de fijación, durante la cual lo más probable es que el duplicado se pierda por deriva génica, pero en algunas ocasiones puede conseguir fijarse. Es entonces cuando inicia la fase de determinación del destino; aquí los duplicados pueden convertirse en pseudogenes debido a la fijación de mutaciones nulas. Una vez en la etapa de preservación, las dos copias se mantienen de manera estable por selección. En algunos modelos, las etapas de fijación y de determinación del destino pueden estar superpuestas; por ejemplo, en el caso de que una mutación determinante del destino aparezca antes de que la copia duplicada se haya fijado o si el alelo preexistente como la mutación determinante del destino (Figura 5).

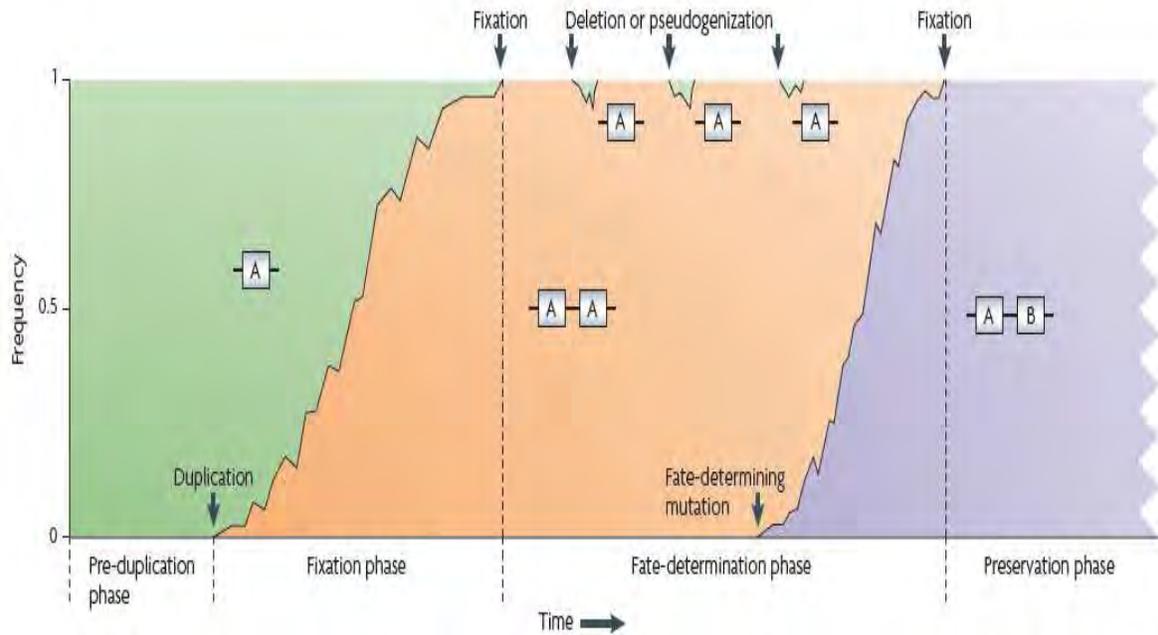


Figura 5. Fases que conducen a la preservación de un gen duplicado. Un gen de copia única fijado se duplica y empieza la fase de fijación; lo común es que se pierdan por deriva génica pero se pueden fijar y empieza la fase de determinación del destino, que termina hasta que se fija una mutación en alguna de las copias. En la etapa de preservación las dos se mantienen estables por selección. Tomado de Innan y Kondrashov (2010)

La localización subcelular de una proteína es importante para su función dentro de la célula; un mecanismo alternativo para la diversificación funcional de los genes duplicados, es precisamente la relocalización y adaptación subcelular de las proteínas que codifican (Marques et al., 2008). Al igual que en la función, se señala que los duplicados tienen dos tipos de divergencia subcelular; una es que los genes ancestrales se dividieron entre los compartimentos ancestrales o que se localizaron específicamente sólo en parte de los mismos, esto es, sub-localización; la otra es que se situaron en nuevos compartimentos no ocupados con anterioridad, o neo-localización. Los mismos autores proponen que la neo/sub-funcionalización de la actividad bioquímica o de la expresión de los duplicados sigue o acompaña a la divergencia de localización subcelular. Esta divergencia ha afectado a un tercio de los genes producto de la duplicación total del genoma, en particular a aquellos involucrados en procesos biológicos con una amplia distribución subcelular como los catabólicos. La neolocalización ha prevalecido y los genes duplicados adquieren nuevos roles, las proteínas generan nuevas interacciones

con otras proteínas y pierden las ancestrales; por otro lado, podrían adquirir adaptaciones en sus propiedades físico-químicas que coadyuvaran a esta nueva función.

Una conclusión importante de estos estudios es que la mayor consecuencia de la poliploidía es un incremento en el “morfoespacio” disponible. Sin embargo, este potencial fenotípico es poco útil cuando no hay nichos donde los nuevos fenotipos sean ventajosos; en los ecosistemas estables no pueden competir con los ocupantes que están perfectamente adaptados, incluyendo sus propios ancestros haploides o diploides. Van de Peer y colaboradores (2009) proponen que únicamente aquellos ecosistemas severamente perturbados o los que tengan disponibilidad de nichos, serán los que permitan la supervivencia y el éxito evolutivo a largo plazo de las duplicaciones totales del genoma. Los nichos pueden hacerse disponibles a través de evolución biótica. Por ejemplo, el auge de las angiospermas permitió la aparición de frutos ricos en azúcar. Conant y Wolfe (2007) sugieren que el éxito de la duplicación del genoma en las levaduras, se debió justamente al surgimiento de este nuevo nicho ecológico. Argumentan que la retención de los genes de las vías glucolíticas después de la duplicación total del genoma, promovió un incremento en el flujo glucolítico que les dio a las especies de levadura post-duplicación una ventaja de crecimiento en ambientes ricos en glucosa.

El 40% de los parálogos retenidos codifica para enzimas del metabolismo de nitrógeno

La duplicación genómica es de suma importancia para el metabolismo del nitrógeno, debido a que el 40% de los genes duplicados en la levadura se relacionan con dichas rutas; muchas de estas parejas de parálogos tienen que ver con la biosíntesis o catabolismo de los aminoácidos, entre ellas se encuentran *GDH1* y *GDH3*, *ASN1* y *ASN2*, *LEU4* y *LEU9*, *LYS20* y *LYS21*, *BAT1* y *BAT2*, entre otros.

S. cerevisiae es capaz de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno; aunque no todos los aminoácidos permiten una proliferación igualmente exitosa, la mayor parte de ellos pueden ser utilizados como única fuente de nitrógeno. Existe una preferencia de la levadura por la utilización de amonio y su presencia reprime la acción de las enzimas encargadas del catabolismo de los aminoácidos; lo mismo sucede cuando el hongo crece

en presencia de asparagina o glutamina (Magasanik y Kaiser, 2002). Alrededor del 88% del nitrógeno que se encuentra en las células de la mayoría de los microorganismos proviene de la utilización del grupo amino de la glutamina; la síntesis y catabolismo de glutamato y glutamina representan una parte central del metabolismo de nitrógeno. El amonio puede ser asimilado mediante dos vías: en una de ellas, la glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la biosíntesis de glutamato en una reacción reversible a partir de amonio y α -cetoglutarato. En la otra, la glutamina se sintetiza a partir de glutamato y amonio, mientras que la enzima glutamato sintasa (GOGAT) cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato (De Luna *et al.*, 2001 y Cogoni *et al.*, 1995).

Existen varios genes del metabolismo de aminoácidos que utilizan intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y que se duplicaron durante el evento de poliploidización. Las aminotransferasas o transaminasas catalizan la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un oxoácido en dos medias reacciones (Jansonius, 1998). La primera reacción se da entre un sustrato y un producto que son específicos para cada reacción, mientras que para la segunda, suelen intervenir el α -cetoglutarato y L-glutamato, aunque pueden utilizarse otros compuestos (Mehta *et al.*, 1993). Las aminotransferasas utilizan como cofactor el piridoxal 5'-fosfato (PLP), derivado de la vitamina B6, uno de los cofactores biológicos más utilizados por las enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Eliot y Kirsch, 2004).

Las transaminasas representan un grupo cuya homología ha sido difícil de establecer por alineamientos de secuencia; la determinación de su origen común así como su clasificación en cinco subfamilias se logró mediante el alineamiento de las estructuras tridimensionales cristalográficas disponibles (Pecudani y Peracchi, 2003). El modelo de reclutamiento en las transaminasas propone que los eventos de duplicación genética en las vías metabólicas primitivas pudieron facilitar la especialización hacia el amplio repertorio de sustratos que encontramos en los organismos en la actualidad (Jensen y Gu, 1996). En *Saccharomyces cerevisiae* las transaminasas juegan un papel muy importante pues permiten la utilización de fuentes de nitrógeno distintas a las del metabolismo central. En su genoma existen transaminasas descritas y otras hipotéticas cuya función real se desconoce, entre ellas están BAT1/BAT2, ALT1/ALT2, ARO8 y ARO9 (Kispal, 1996).

Metabolismo de la alanina:

Las rutas que permiten la biosíntesis y el catabolismo de la alanina aún no están claras y no se han aislado auxótrofos de alanina. El metabolismo de la L-alanina, el segundo aminoácido más abundante en la célula (con concentraciones intracelulares de hasta 100mM, que puede almacenarse en pozas endógenas en la vacuola y en el citoplasma; García Campusano, 2009), puede lograrse mediante la aminación reductiva del piruvato, utilizando una transaminasa reversible por lo que se asocia con la glucólisis, la gluconeogénesis y el ciclo del TCA; o bien mediante la racemasa de alanina, o a partir de glicina y glioxalato por la transaminasa de glioxalato y alanina (AGX1) (Takada y Noguchi, 1985).

En los mamíferos, hongos y bacterias, hay una ruta alternativa para la biosíntesis de alanina con la piruvato-glutamina transaminasa que forma parte de la vía de la ω -amidasa (Cooper y Meister 1977, Calderon et al. 1985, Soberón y González 1987, Soberón et al. 1989, Duran et al. 1995). En *S. cerevisiae* se ha propuesto que en condiciones fermentativas, la acción conjunta de la glutamina aminotransferasa dependiente de piruvato y la ω -amidasa podrían constituir la vía para la síntesis de alanina; sin embargo, esta ruta no interviene en el catabolismo ya que la reacción de la transaminasa es irreversible (Soberón et al. 1989).

Las transaminasas de alanina (ALTs), también conocidas como alanina aminotransferasas o transaminasas de glutámico y pirúvico, son en teoría enzimas reversibles (Figura 6) que producen piruvato y L-glutamato a partir de alanina y α -cetoglutarato (Takada y Noguchi, 1985), a diferencia de las GDHs o las Lys que son biosintéticas y de las Bats en la que una es biosintética y la otra catabólica. El tipo de reacción que catalizan las transaminasas es bifásica; consiste primero en la unión del aminoácido que transfiere el grupo amino al piridoxal fosfato unido a la enzima, produciendo el cetoácido correspondiente y la enzima aminada, seguido de la transferencia del grupo amino al cetoácido aceptor (García Campusano, 2009).

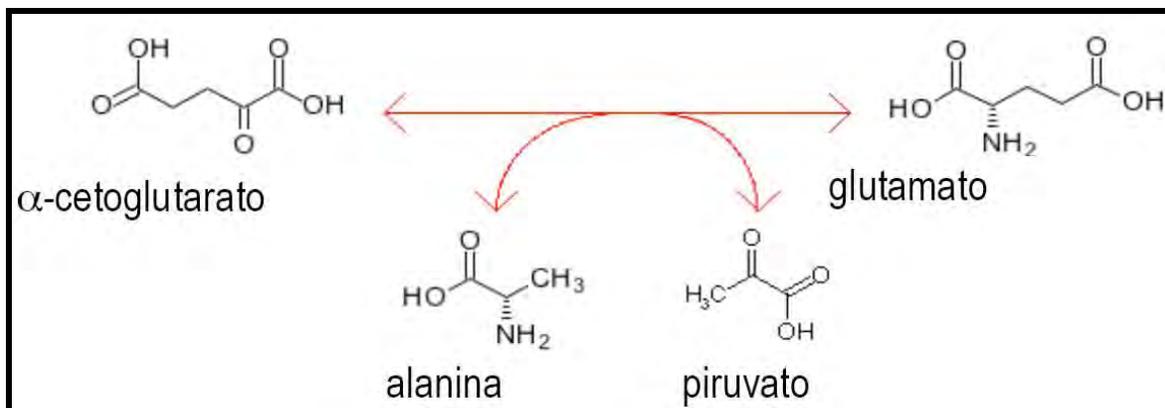


Figura 6. Esquema general de la reacción catalizada por las alanina aminotransferasas

A pesar de que en *S. cerevisiae* no se ha descrito la vía que lleva a cabo la biosíntesis de L-alanina, se ha propuesto que los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* son los que codifican para estas enzimas, aunque únicamente se ha demostrado experimentalmente la participación de *ALT1* (García Campusano et al. 2009). Estas dos proteínas presentan un 67% de identidad. *ALT1* tiene 1779 pb y está localizado en el cromosoma XII. *ALT2* tiene 1524 pb y está en el cromosoma IV.

Antecedentes

Víctor Hugo Anaya (2005, Tesis de Maestría) determinó que los ORFs YLR089c y YDR111c presumiblemente codifican para proteínas que tendrían actividad de alanina aminotransferasas, *ALT1* y *ALT2* (denominados así en el laboratorio de la Dra. Alicia González). Estableció que la primera se localiza en la mitocondria ya que cuenta con una presecuencia de 85 aminoácidos que determinan su importación hacia este compartimento; la segunda no tiene esta secuencia y por tanto se ha supuesto que se localiza en el citoplasma.

En un estudio fisiológico, se demostró, a través el estudio de los fenotipos de cepas silvestres y mutantes sencillas y dobles en *ALT1* y *ALT2* (*alt1Δ ALT2*, *ALT1 alt2Δ* y *alt1Δ alt2Δ*), que Alt1p y Alt2p no son fisiológicamente redundantes. Alt1p es necesaria

para la biosíntesis de alanina e indispensable para su catabolismo cuando las cepas se cultivan en etanol, mientras que en glucosa sólo es catabólica; se propone que esto representaría una forma de subespecialización y que la regulación de su expresión podría ser el mecanismo detrás de ello. Su doble capacidad se evidencia en condiciones de crecimiento respiratorias, ya que en la fermentación se ha propuesto que hay otra vía para la biosíntesis de la alanina. Un posible candidato es la aminotransferasa de glutamina, aunque esto aún no se ha demostrado (García Campusano et al., 2009); sin embargo, se sabe que la actividad de la transaminasa de glutamina aumenta diez veces en condiciones fermentativas comparada con condiciones respiratorias y esto podría deberse a que está más adaptada a utilizar piruvato (Soberón et al. 1989).

García-Campusano y colaboradores (2009) señalan que Alt2p no reemplaza la función de Alt1p por lo que su función no es redundante; al expresar *ALT2* a partir de plásmidos centroméricos o multicopia presentes en una cepa *alt1Δ alt2Δ*, no se logró recuperar el crecimiento en presencia de glucosa como fuente de carbono y alanina como fuente de nitrógeno y por tal motivo no se pudo concluir que *ALT2* constituyera un gen funcional. La determinación de la actividad de alanino aminotransferasa durante la fase exponencial de crecimiento de las levaduras fue detectada únicamente para Alt1p; además se puso en evidencia que en presencia de alanina aumenta la actividad enzimática de Alt1p, tal y como se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Actividad de la alanino aminotransferasa en diferentes fuentes de nitrógeno (actividad específica se define como μmol de NADH oxidado por $\text{min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$)
Tomada de García Campusano *et al.*, 2009.

Strain	Glucose		Ethanol		
	NH ₄	alanine	NH ₄	NH ₄ + alanine	alanine
CLAI-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.09±0.03	0.72±0.13	0.072±0.02	0.42±0.09	0.37±0.08
CLAI-2-M[(CLAI-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	0.08±0.02	0.75±0.06	0.072±	0.36±0.03	0.33±0.03
CLAI-2-1 (<i>alt1Δ ALT2</i>)	0.00	---	---	0.00	---
CLAI-2-2 (<i>ALT1 alt2Δ</i>)	0.07±0.02	0.67±0.04	0.081±0.02	0.44±0.02	0.39±0.04
CLAI-2-D(<i>alt1Δ alt2Δ</i>)	0.00	---	---	0.00	---
CLAI-2-DM[(CLAI-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	0.00	---	---	0.00	---
CLAI-2-D-1M[(CLAI-2-D(<i>ALT1</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	3.11±0.62	8.11±0.13	3.27±1.00	8.76±0.83	5.6±0.28
CLAI-2-D-2M[(CLAI-2-D(<i>ALT2</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.00	---	---	0.00	---

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la regulación de la expresión de los genes parálogos *ALT1* y *ALT2* bajo condiciones respiratorias y fermentativas

Objetivos específicos

Como se menciona en los antecedentes, la actividad enzimática de Alt1p aumenta en presencia de alanina como única fuente de nitrógeno. Por lo tanto uno de los objetivos específicos de este proyecto es:

1.- Determinar si en presencia de alanina como única fuente de nitrógeno se induce la expresión de *ALT1* con respecto a la expresión observada en amonio como fuente de nitrógeno.

Como también se menciona en los antecedentes, hasta ahora no se han encontrado condiciones fisiológicas en la que se exprese *ALT2*, por lo que el segundo de los objetivos específicos de este proyecto es:

2.- Encontrar las condiciones específicas bajo las cuales es posible que *ALT2* se exprese.

Resultados y discusión

Regulación de *ALT1*

La expresión de *ALT1* se induce en presencia de alanina.

Partiendo de los resultados obtenidos previamente en el laboratorio acerca de las actividades enzimáticas de la alanina transaminasa codificada por *ALT1*, el objetivo de esta parte del trabajo fue determinar si el incremento en la actividad de aminotransferasa en presencia de alanina se debía al aumento en la transcripción de *ALT1*.

Para tal propósito, se llevó a cabo un análisis de Northern blot. Se extrajo RNA total de cultivos creciendo en condiciones aeróbicas tanto en presencia de glucosa como de etanol, a los cuales se les agregó amonio o alanina como fuente de nitrógeno. En la figura 10 se muestran los resultados, los cuales indican que la expresión de *ALT1* aumentó de 8 a 10 veces en presencia de alanina como fuente nitrógeno y glucosa como fuente de carbono y de 3 a 4 veces en alanina como fuente de nitrógeno y etanol como fuente de carbono. Esta regulación podría estar mediada por el sistema de control que determina la respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno, ya que el amonio es una fuente represora, en tanto que la alanina constituye una fuente secundaria de nitrógeno, en cuya presencia se dereprimirían los genes implicados en el metabolismo nitrogenado. Sin embargo, para poder determinar si este es el caso, será necesario estudiar la expresión de *ALT1* en diferentes condiciones y determinar si la misma depende de Gln3, que constituye el activador transcripcional que determina la respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno.

En ninguna de las condiciones arriba mencionadas (glucosa amonio/alanina o etanol amonio/alanina) se observó expresión de *ALT2*, lo que sugiere que la regulación transcripcional de este gen está rigurosamente controlada.

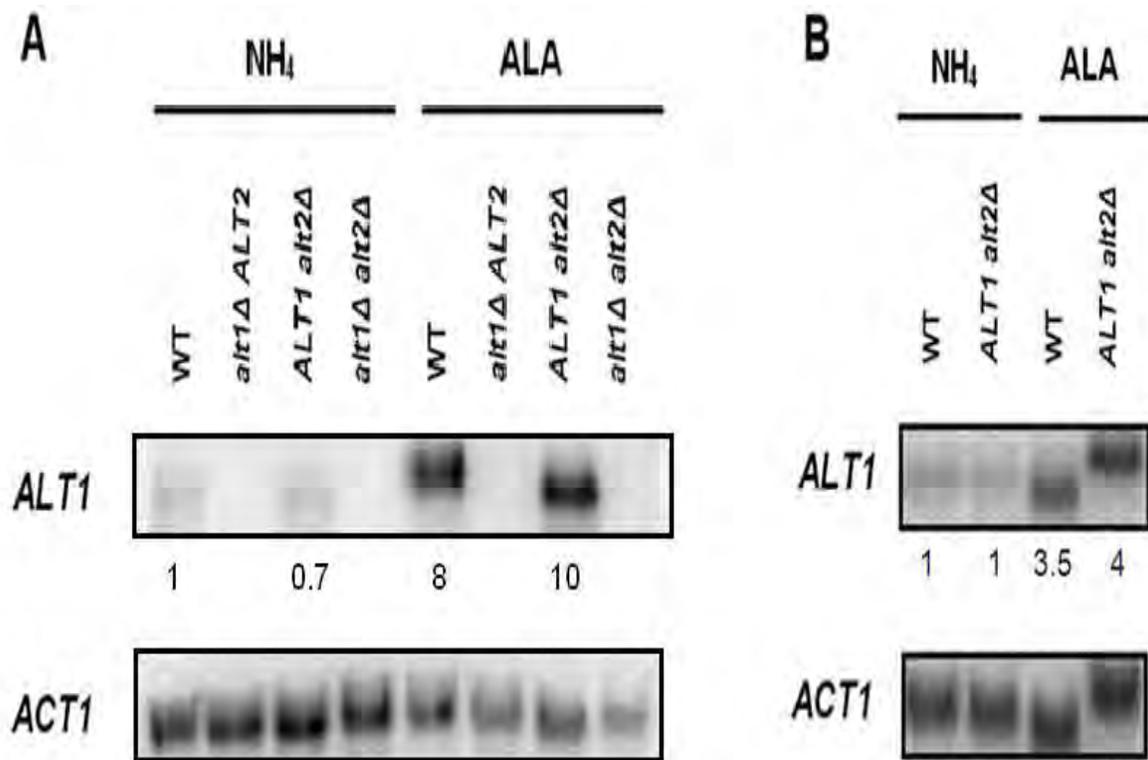


Figura 10. La expresión de *ALT1* se induce en presencia de alanina. Las células se cultivaron en 2% de glucosa (A) o en 2% de etanol (B), con amonio (NH_4) o alanina (Ala) como fuentes de nitrógeno y se extrajo el RNA total de la cepa silvestre (WT) y de las mutantes sencillas y dobles. Los filtros fueron probados con una sonda específica para *ALT1* y se usó actina (*ACT1*) como control de carga.

Para determinar la abundancia relativa de Alt1p en amonio o alanina, se llevó a cabo un análisis tipo Western. Como se observa en la Figura 11, los carriles que contienen los extractos de la cepa silvestre marcada como *ALT1*-TAP, crecida en glucosa o etanol más alanina, mostraron una mayor cantidad de antígeno que aquellos obtenidos de las células crecidas en glucosa o etanol más amonio, sugiriendo que la expresión inducida de *ALT1* por alanina resulta en la síntesis de una mayor cantidad de Alt1p en alanina que en amonio. Todos los casos se compararon contra la cepa silvestre cuyo *ALT1* no está etiquetado con el TAP, para corroborar que el anticuerpo es específico y no se generen falsos positivos.

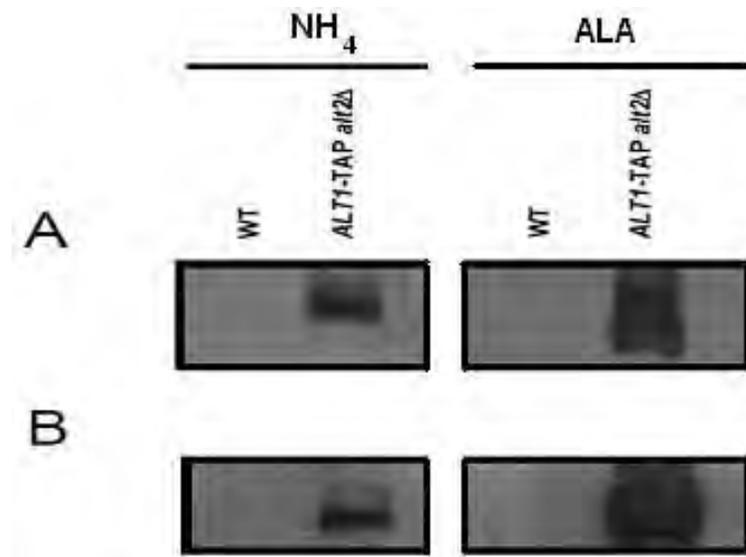


Figura 11. Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-TAP para la cepa silvestre (WT) y para la *ALT1-TAP* en (A) glucosa y en (B) etanol

Estos resultados sugieren que la alanina pudiera estar actuando como un co-inductor en la expresión de *ALT1*, o permitiendo la expresión de *ALT1* a través del sistema de control Gln3-dependiente. Así mismo, el incremento en la actividad de Alt1p en presencia de alanina sugiere que esta transaminasa pudiera jugar un papel catabólico degradando alanina a piruvato y por tanto constituyendo una vía anaplerótica. Por otro lado, el hecho de que en amonio se detecte actividad de Alt1p, indica que en condiciones biosintéticas (amonio-glucosa) esta enzima podría jugar un papel biosintético. Con el fin de analizar esta última posibilidad, se determinaron las pozas intracelulares de alanina en la cepa silvestre y en las mutantes *alt1Δ ALT2*, *ALT1 alt2Δ* y *alt1Δ alt2Δ*.

En glucosa-amonio, Alt1p participa en la biosíntesis de alanina.

Como se menciona en los antecedentes, cuando la levadura se cultiva en amonio glucosa, la falta de *ALT1* no resulta en una auxotrofia por alanina. Así mismo, la mutante *alt2Δ* o la doble mutante *alt1Δ alt2Δ* crecen con un tiempo de duplicación equivalente al de la cepa silvestre, sugiriendo que en estas condiciones la biosíntesis de alanina se lleva a cabo por una ruta alternativa y se ha propuesto a la vía de la ω -amidasa como la ruta

encargada de la biosíntesis de alanina en glucosa (Soberón y González, 1987; García Campusano et al., 2009).

Con el fin de analizar el impacto de la falta de Alt1p o Alt2p sobre la poza de alanina, se prepararon muestras de cada una de las cepas mencionadas a partir de cultivos de medio mínimo con glucosa y amonio, condición en la que toda la colección de cepas crece óptimamente. Los resultados mostraron que la falta de *ALT1* disminuye notoriamente la concentración intracelular de alanina, indicando que aun cuando una mutante *alt1Δ* crece perfectamente en esta condición, Alt1p contribuye de manera importante a la síntesis de alanina. Es posible que la poza remanente sea aportada a través de la vía de la ω -amidasa.

Tal y como se esperaba, en una cepa silvestre portadora del gen *ALT1* en un plásmido multicopia (10-20 copias), la poza de alanina aumentó 5 veces con respecto de la silvestre con el plásmido vacío (Figura 12). La falta de *ALT2* no repercutió en la poza de alanina y su expresión a partir de un plásmido multicopia presente en la cepa silvestre no resultó en un incremento de la poza de alanina al compararse con la poza acumulada por una cepa silvestre, sugiriendo que la expresión de este gen es baja, confirmando los datos de expresión por análisis tipo Northern (Figura 12); aún cuando se encuentre en varias copias, la cantidad de Alt2p puede no ser suficiente para contribuir a la poza de alanina. También es posible que la enzima posea propiedades fisicoquímicas tales que resulten en una pobre capacidad biosintética. Este análisis demostró que Alt1p contribuye al mantenimiento de los niveles de alanina; sin embargo, la poza aportada por la ruta alternativa es suficiente para mantener un crecimiento de tipo silvestre (Figura 12). Aparentemente la doble mutante *alt1Δ alt2Δ* se comporta del mismo modo que una mutante sencilla para *ALT1*.

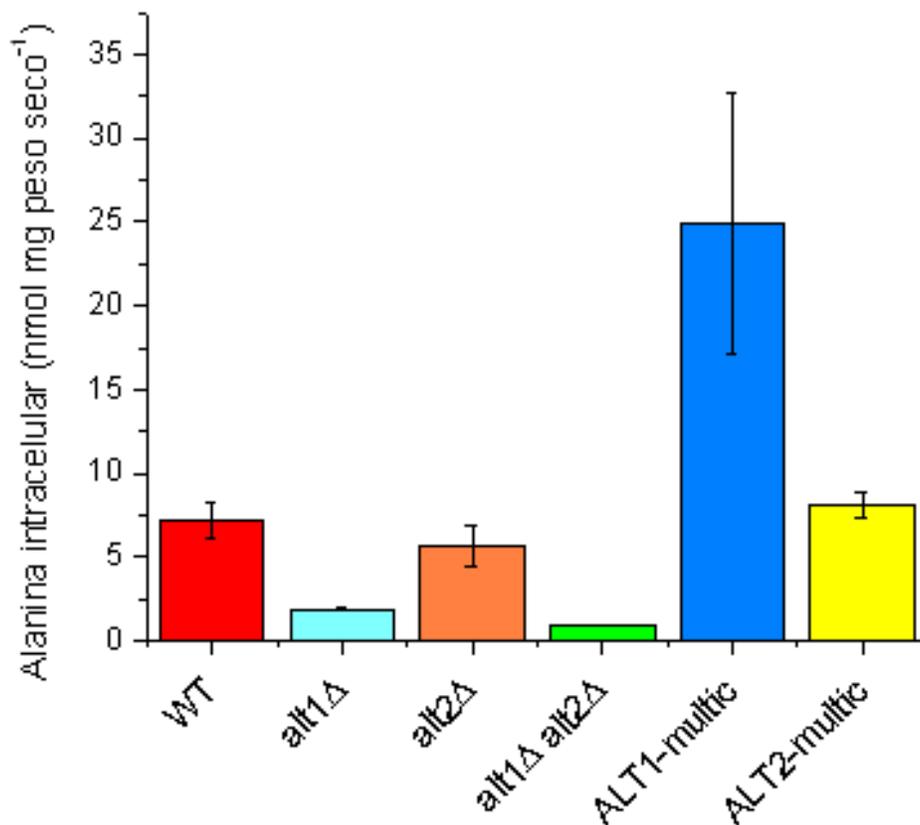


Figura 12: Concentración intracelular de alanina en medio mínimo glucosa- amonio

Con el fin de obtener un dato más exacto de la contribución de Alt1p y Alt2p a la poza de alanina, se determinó la misma en dobles mutantes *alt1Δ alt2Δ* que alternativamente eran portadoras del plásmido multicopia con *ALT1* o *ALT2*, en extractos obtenidos de cultivos crecidos en amonio-glucosa. Como se muestra en la Figura 13, la poza de la mutante portadora de *ALT1* es 8 veces mayor que la de la doble mutante, en tanto que la poza de la mutante portadora del plásmido conteniendo *ALT2*, resultó equivalente a la de la doble mutante, de nuevo confirmando que bajo estas condiciones Alt2p no contribuye a la poza de alanina. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que los niveles de alanina en la levadura cuando crece en condiciones de glucosa más amonio, son mantenidos por la acción conjunta de Alt1p y de otra vía, posiblemente la de la ω -amidasa, mientras que Alt2p no tiene ninguna intervención en la biosíntesis ni degradación de este metabolito. La doble mutante presenta niveles remanentes de alanina, seguramente aportados por la transaminasa de glutamina y la ω -amidasa (Figura 13).

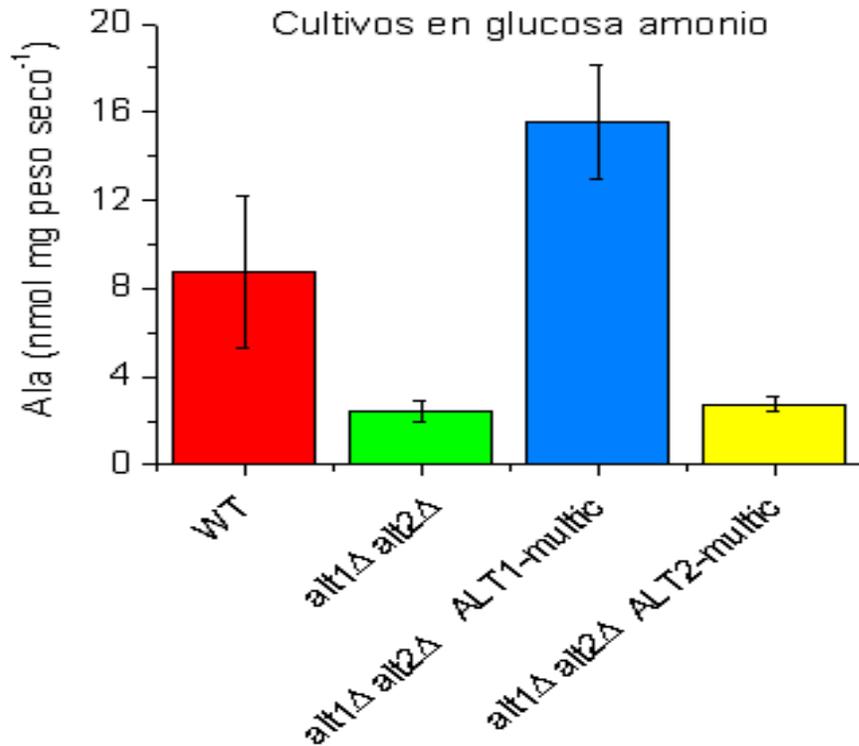


Figura 13. Medición de pozas de alanina en una doble mutante al ser transformada con los plásmidos multicopia para *ALT1* y *ALT2*. Plásmido multicopia = multic

Regulación de *ALT2*

I. Análisis de estudios de expresión global realizados por otros grupos:

***ALT2* se expresa en medio rico en fase estacionaria y no se regula por *SWI/SNF*.**

Con la finalidad de encontrar condiciones fisiológicas en las que se pudiera inducir la expresión de *ALT2*, decidimos llevar a cabo un análisis de algunos estudios de expresión global disponibles en la literatura. Así encontramos estudios que sugerían que *ALT2* se expresa en condiciones ambientales estresantes (Chu et al., 1998; Gasch et al., 2000; Sudarsanam et al., 2000). Por lo tanto, la actividad de Alt2p podría estar confinada a condiciones fisiológicas particulares, tal como ha sido demostrado para el parólogo *GDH3*,

cuya expresión está altamente reprimida y únicamente es inducida bajo condiciones respiratorias (De Luna et al., 2001 y Avendaño et al., 2005).

Chu y colaboradores (1998) analizaron la expresión génica en levaduras en etapa de esporulación, fase inducida por distintos tipos de estrés ambiental. *ALT2* incrementa aquí su expresión 3.7 veces, mientras que *ALT1* no se modifica. Con el mismo tipo de aproximación, Gasch y colaboradores (2000) reportan un aumento de 28 veces en la expresión de *ALT2* durante la fase estacionaria en cultivos prolongados, comparada con las mismas células pero en la etapa exponencial; en las mismas condiciones *ALT1* tiene un incremento mínimo (Figura 14).

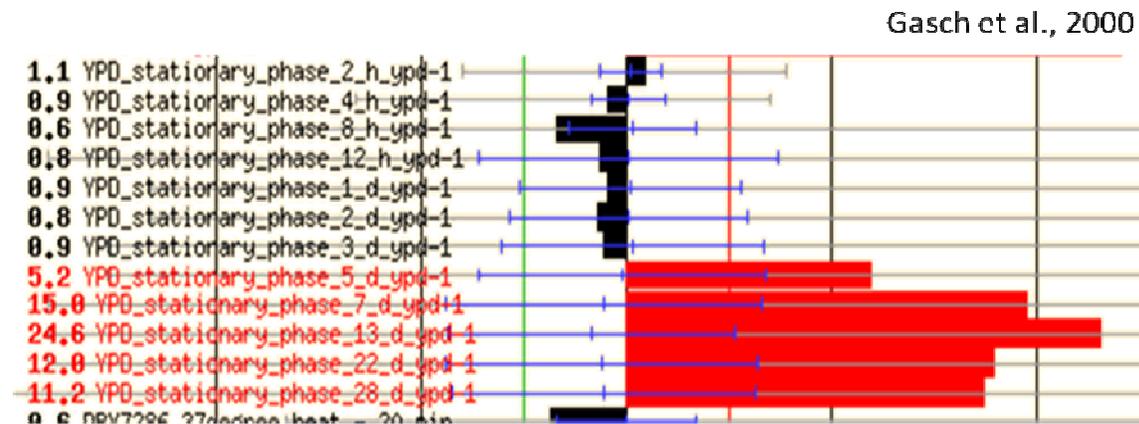


Figura 14. Expresión del transcrito de *ALT2* durante la fase estacionaria del crecimiento en YPD. El RNA mensajero es detectado sólo a partir del día 5 y alcanza su mayor concentración en el 13; luego disminuye.

Siguiendo el enfoque del grupo de Gasch (2000), se decidió analizar, en la condición descrita, el nivel de transcrito de *ALT2* a partir de muestras en fase estacionaria franca o tardía, aproximadamente a los 4 días de cultivo en medio rico (YPD). El resultado, después de obtener RNA total de varios tiempos de crecimiento, fue que el gen se expresa de manera clara al llegar a los cuatro días de cultivo, mientras que a las 4 y a las 24 horas, no se observa transcrito alguno (Figura 15). Esta es la primera condición en la que se demuestra la expresión de *ALT2*.

Por el contrario, se descubrió que el transcrito de *ALT1* tiene un comportamiento totalmente opuesto al de *ALT2*, al menos en estas condiciones de cultivo, pues a las 4

horas podemos ver una señal importante que nos indica la presencia del transcrito, y cuando avanzamos a las 24 y más aun a las 96 horas, la cantidad disminuye o desaparece por completo (Figura 15).

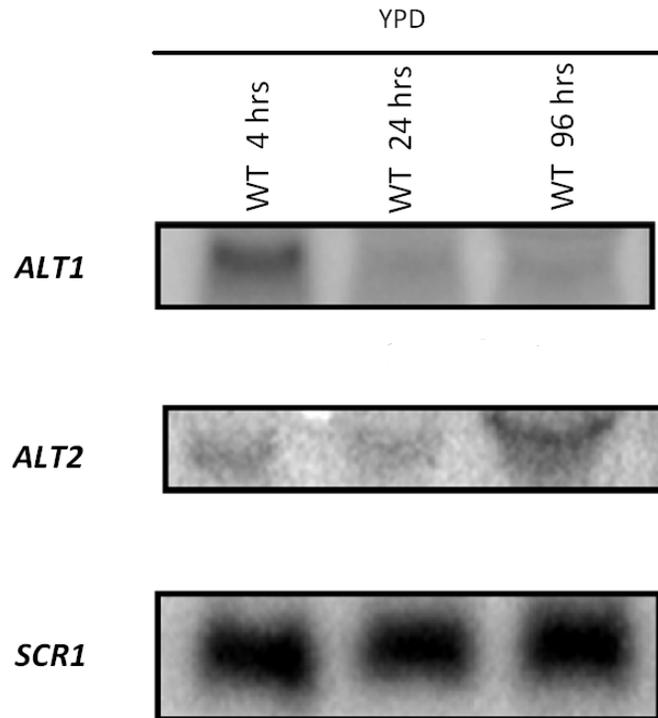


Figura 15. Expresión diferencial de *ALT1* y *ALT2* creciendo en medio rico, mientras el primero disminuye conforme pasa el tiempo, *ALT2* aparece en etapas tardías.

De manera indirecta, estos resultados nos están indicando que la función de Alt1p y Alt2p pudieran no ser redundantes, pues cada uno de los transcritos se presenta en etapas perfectamente definidas del crecimiento, sin superponerse uno con otro. La diferencia estriba en las condiciones ambientales en las cuales cada uno es transcrito, pues mientras que *ALT1* está presente durante la fase exponencial de crecimiento, cuando la división celular es muy activa y todos los nutrientes están disponibles, *ALT2* aparece cuando ya muchos de estos nutrientes se han agotado en el medio y este se encuentra saturado con productos de excreción, muchos de los cuales seguramente son nocivos; es decir, *ALT2* tal y como sugiere la literatura, es un gen que podría participar en condiciones de estrés nutricional.

Otro de los análisis globales que se ha hecho fue el que se enfocó en mutantes carentes del gen que codifica para Snf2, el cual constituye la subunidad catalítica del complejo remodelador de cromatina *SWI/SNF*; Snf2 se requiere para la hidrólisis de ATP, actividad necesaria para que el complejo actúe como remodelador. Sudarsanam et al., (2000) reportaron que en una mutante *snf2Δ* el transcrito de *ALT2* aumentaba 10 veces con respecto de la cepa silvestre; por el contrario, *ALT1* disminuía su expresión entre 1 y 2 veces. Snf2 forma parte de un complejo remodelador que determina la expresión de un grupo particular de genes y su función es facilitar la apertura de la cromatina, es decir, constituye un sistema de regulación positiva; sin embargo, para otro grupo de genes funciona dentro de los complejos represores que cierran la cromatina, impidiendo la activación transcripcional (Lorch et al., 1998).

En virtud de que estudios anteriores de nuestro laboratorio han mostrado que la remodelación de la cromatina constituye una instancia regulatoria que determina la diversificación funcional de algunos genes parálogos (Avendaño et al., 2005), nos pareció interesante analizar la expresión de *ALT1* y *ALT2* en mutantes *snf2Δ*. Para este propósito se utilizó una cepa *snf2Δ* obtenida de la colección de deleciones del Proyecto del Genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Tanto esta cepa mutante como la silvestre se transformaron independientemente con plásmidos portadores de construcciones en las que la región codificante del gen *LacZ* de *Escherichia coli* se fusionó a la región promotora de *ALT1* o de *ALT2*. Los resultados obtenidos a través de la determinación de la actividad de β galactosidasa, mostraron que a diferencia de lo reportado por Sudarsaman y colaboradores (2000), al comparar la cepa mutante con la silvestre, la expresión de *ALT2* no aumentaba, en tanto que la de *ALT1* disminuyó, particularmente la detectada en alanina como única fuente de nitrógeno, sugiriendo que la inducción de la expresión de *ALT1* por alanina depende de la remodelación de cromatina mediada por *SW1/SNF*, en tanto que la de *ALT2* parece no afectarse (Figura 16).

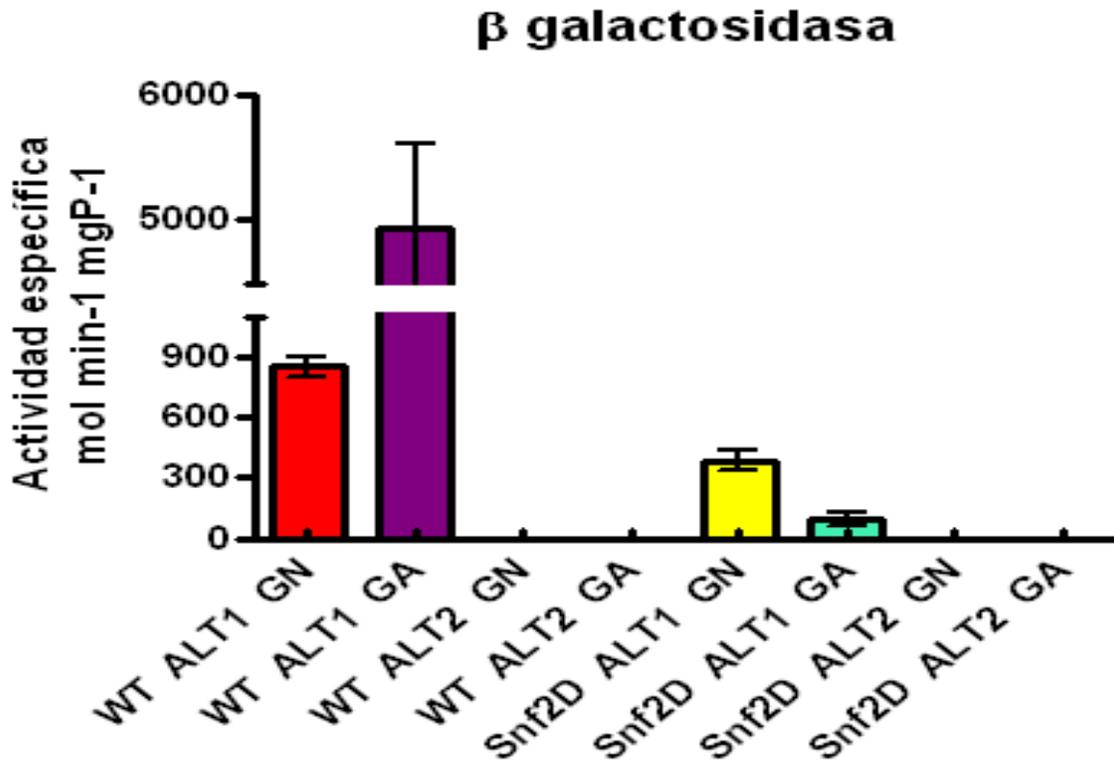


Figura 16. Actividad relativa de la cepa *Snf2Δ* con los plásmidos para los genes *ALT1* y *ALT2* en medio mínimo con glucosa. N=amonio, A=alanina

II. Análisis de la secuencia promotora

El represor codificado por *NRG1* participa en la represión de la expresión de *ALT2*

En la búsqueda de nueva información que nos orientara acerca de los factores que podrían influir en la expresión de *ALT2*, nos enfocamos en la secuencia del promotor de este gen; utilizando herramientas bioinformáticas nos dimos cuenta que el único sitio de unión a factores transcripcionales que se encontraba conservado entre las especies de *Saccharomyces sensu stricto*, es la caja consenso que corresponde al sitio de unión de Nrg1. En cambio, esta secuencia no está presente en el promotor de *ALT1* de todas las *sensu stricto* (Figura 17). El grupo de *sensu stricto* analizado incluyó a *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* y *S. mikatae*.

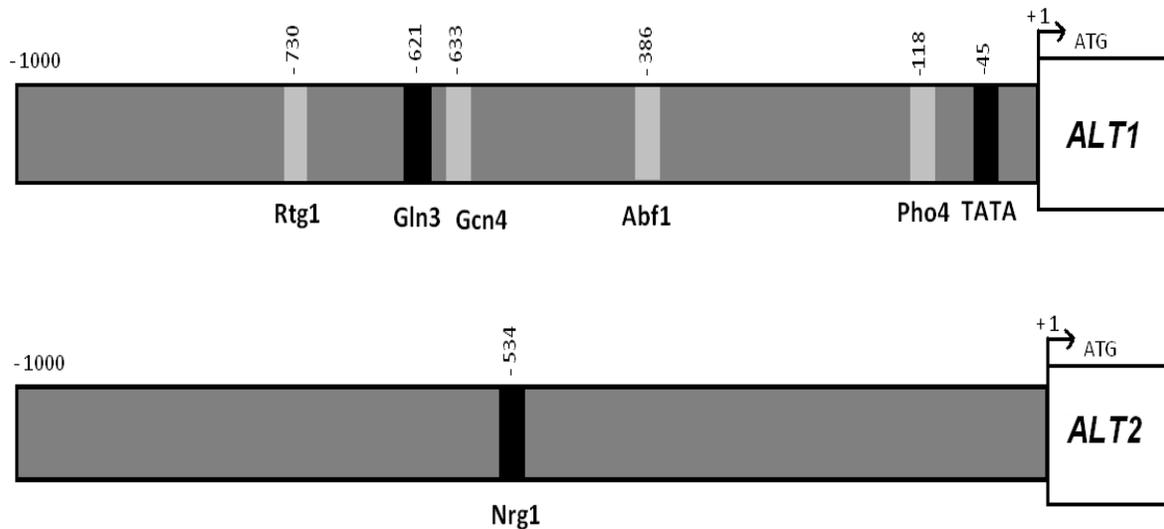


Figura 17. Sitios de unión a factores transcripcionales en los promotores de *ALT1* y *ALT2*. Los sitios conservados (los que son retenidos sin cambio a lo largo del tiempo en los descendientes de un ancestro común; se presentan en negro) y los consenso (secuencia patrón obtenida a través de la comparación entre varios genes u organismos descendientes de un ancestro común y a partir de los cuales se reconocen las posiciones más representadas; en cada descendiente se presenta sólo con ligeras variaciones; se observan en gris claro) según el alineamiento múltiple de las cuatro especies *sensu stricto*

Nrg1 es un represor transcripcional que recluta al complejo Cyc8p-Tup1p a los promotores; es susceptible a la represión por glucosa y regula negativamente una gran variedad de procesos, incluyendo el crecimiento filamentoso y la respuesta a pHs alcalinos; por su parte, *Nrg2* tiene características muy similares a las de *Nrg1*, incluyendo la secuencia de reconocimiento en el promotor (Zhou y Winston, 2001).

Se generaron cepas mutantes carentes tanto de *NRG1* como de *NRG2* y se cultivaron en medios con glucosa como fuente de carbono y prolina como fuente de nitrógeno. Considerando que el producto de *ALT2* podría estar regulado por represión catabólica nitrogenada, se decidió usar prolina con el fin de utilizar condiciones de derepresión. Se extrajo el RNA total en diferentes fases del crecimiento, a 0.5 y 1.6 D.O. y se compararon con la cepa silvestre en las mismas condiciones de cultivo. Los resultados que se muestran en la Figura 18, nos indican de manera evidente que la falta de *Nrg1* provoca un aumento de al menos cuatro veces en los niveles de transcripción de *ALT2*, comparado con la expresión del mismo gen en la cepa silvestre. Por el contrario, la

mutante para *NRG2* no presentó cambios en cuanto a la cantidad relativa de transcrito. Esta derepresión únicamente fue observada cuando las células se cosecharon en 1.6 D.O., ya que en muestras de cultivos cosechados a 0.5, pareciera que el gen se mantuvo reprimido pues no hubo presencia de mRNA específico para *ALT2*.

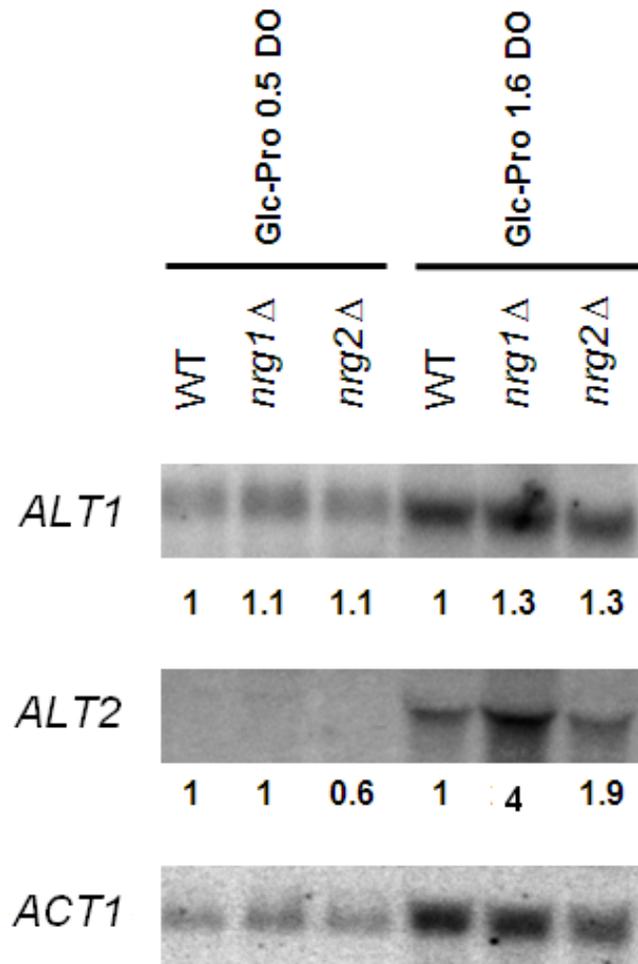


Figura 18. Expresión de *ALT1* y *ALT2* en cepas mutantes para *NRG1* y *NRG2* crecidas en glucosa prolina

Estos datos indican que efectivamente Nrg1 está actuando como un regulador negativo de *ALT2* cuando los niveles de glucosa en el medio son elevados. Es posible que la derepresión provocada por la falta de Nrg1 se observe también a densidades ópticas menores que 1.6, es decir durante la fase exponencial. El Northern blot

presentado en la Figura 18 muestra que a D.O. de 0.5 la cantidad de RNA total en esta membrana es muy baja, lo que dificultaría la detección del mRNA específico de *ALT2*. Por lo tanto, será importante hacer otra preparación de RNA y cargar la membrana con mayor cantidad.

El hecho de que en mutantes *nrg1Δ* aumente la transcripción de *ALT2*, ofrece la posibilidad de estudiar la presencia de Alt2p en estas condiciones a través de Western blot. Así mismo, constituye una condición ideal para desarrollar el ensayo enzimático correspondiente. La construcción de dobles mutantes *alt1Δ nrg1Δ* permitirá analizar si Alt2p es capaz de compensar la falta de Alt1p. Como se menciona en los antecedentes, una cepa *alt1Δ* es incapaz de crecer en glucosa-alanina, ya que la falta de *ALT1* impide el catabolismo de alanina. Será interesante determinar si una doble mutante *alt1Δ nrg1Δ* es capaz de crecer en esta condición.

Por otro lado, con el fin de demostrar que en presencia de glucosa la expresión de *ALT2* se reprime, será necesario llevar a cabo un análisis tipo Northern blot con muestras obtenidas de cultivos jóvenes (0.3-0.6 DO) intermedios y viejos con el objetivo de ver con claridad el efecto de la disminución de glucosa en el medio sobre la expresión de *ALT2*. Esperaríamos que a tiempos avanzados, cuando esta fuente de carbono ha sido consumida (2.5 D. O.), la represión mediada por glucosa desaparezca y el gen quede libre para expresarse.

Durante el curso de estos experimentos, que nos permitieron analizar la expresión de *ALT2* en medio rico durante la fase estacionaria, nos percatamos de que el marcaje radiactivo con el kit de *random primer* de la sonda específica para la detección de *ALT2*, era muy ineficiente debido posiblemente a su bajo contenido de G-C's, por lo que el porcentaje de incorporación de marca no superaba el 20%. Por lo tanto, se decidió sintetizar y marcar la sonda por medio de PCR radiactivo, lo que mejoró notablemente el porcentaje de incorporación de los residuos radiactivos (40%); finalmente, con esta estrategia pudimos detectar la expresión de *ALT2* en medio rico en fase estacionaria (Figura 15).

En virtud de estos hallazgos, se decidió reconsiderar la posibilidad de que *ALT2* pudiera expresarse en cultivos crecidos en etanol como fuente de carbono, ya que en presencia de fuentes de carbono no fermentables como el etanol, la represión por glucosa no operaría. Como se muestra en la Figura 19, la expresión de *ALT2* aumenta cuando la

cepa silvestre se cultiva en etanol como fuente de carbono, con respecto a la nula expresión observada en glucosa. Estos resultados confirman que en ausencia de glucosa, la expresión de *ALT2* aumenta y dejan abierta la posibilidad de que además de la falta de represión, en etanol pudiera actuar un mecanismo adicional de inducción, como se ha demostrado para la expresión de *GDH3* (Avendaño et al., 2005).

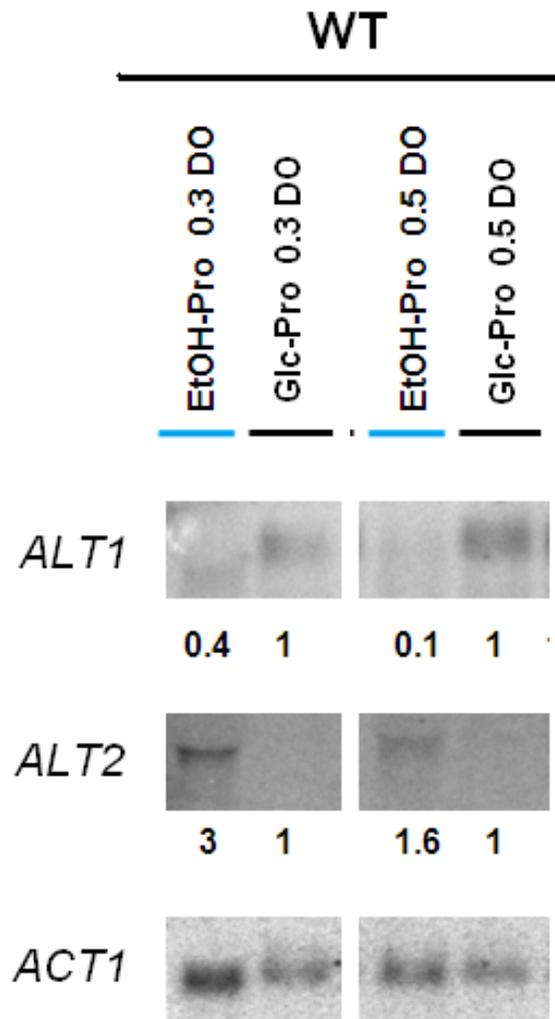


Figura 19. Expresión de *ALT1* y *ALT2* en etanol-prolina

Alt2p no sustituye la función de Alt1p cuando la levadura se cultiva en etanol.

En los experimentos anteriores se logró encontrar la presencia del transcrito de *ALT2* en etanol; entonces la pregunta que surge es ¿porqué Alt2p no sustituye a Alt1p en una cepa *alt1Δ ALT2*? Es decir, como se presenta en los antecedentes, una mutante *alt1Δ ALT2* no crece en etanol como fuente de carbono (Campusano et al., 2009), sugiriendo que en estas condiciones, aún cuando *ALT2* se expresa, su producto es incapaz de participar en la biosíntesis de alanina, ya que si así fuera, la mutante *alt1Δ ALT2* podría sintetizar alanina a través de Alt2p y por lo tanto crecería en etanol en ausencia de alanina. Esta paradoja podría explicarse de varias maneras:

1) El mensajero de *ALT2* no se traduce.

Es posible que el mensajero de *ALT2* no fuera traducible y por tanto no habría producto enzimático capaz de participar en el metabolismo de alanina. Esto tiene lógica si pensamos que el 90% de los genes duplicados que originalmente surgieron de la duplicación completa del genoma del ancestro de *S. cerevisiae* se han perdido por pseudogenización. Probablemente el que el mensajero de *ALT2* no se traduzca, estaría formando parte de los mecanismos que conducen a la generación de pseudogenes. Con el fin de analizar esta posibilidad se podrían generar cepas etiquetadas en *ALT1* o en *ALT2* con epítopes pertinentes, que permitan llevar a cabo un análisis tipo Western con el cual se podría cuantificar la cantidad de producto tanto de *ALT1* como de *ALT2*. Existe la posibilidad de que el mensajero de *ALT2* sí se esté traduciendo y dando como resultado una proteína funcional; sin embargo, la cantidad de proteína pudiera ser insuficiente para contribuir con la cantidad de metabolitos necesaria para sostener el crecimiento de la célula sólo a través de Alt2p.

2) El mensajero sí se traduce pero la enzima tiene propiedades cinéticas que no le permiten llevar a cabo la catálisis

En el caso de que el análisis tipo Western diera un resultado positivo, será necesario medir la actividad enzimática con el fin de determinar si el producto de *ALT2* en realidad corresponde a una enzima con actividad de transaminasa, ya que de existir el producto, podría haber perdido su función original. La inhabilitación de la función se da justamente por mutaciones en codones que codifican aminoácidos funcionalmente

irreemplazables, inserciones y deleciones que generan cambios en los marcos de lectura o mutaciones en regiones regulatorias y en sitios de procesamiento (Karro et al., 2007). De ser así, el caso de ALT2 no constituiría un ejemplo atípico, ya que en realidad así es como ha evolucionado el genoma de la levadura a partir de su duplicación total, pues en la actualidad, únicamente el 15% de los genes conservan a su copia, la mayoría de las cuales tienen productos perfectamente funcionales.

Se sabe por ejemplo, gracias a la descripción de la estructura cristalográfica de una alanina-glioxilato aminotransferasa (Meyer et al., 2005), que el sitio de unión al piridoxal fosfato, que funciona como cofactor, es de suma importancia; por lo tanto si esta zona o la que tiene que ver con la unión al sustrato, adyacente a la primera, tiene alguna mutación o algún cambio conformacional no covalente, será muy probable que tengan deficiencias. Los mismos autores señalan que la mayoría de las enzimas transferasas dependientes de piridoxal fosfato son homodímeros, cuyas subunidades están conectadas por regiones muy particulares; si por alguna razón Alt2p careciera de alguna de ellas o tuviera alguna mutación, entonces el dímero no se formaría y la actividad no se llevaría a buen término.

La estructura es un elemento de gran importancia para la actividad de las enzimas; el grupo de Meyer y colaboradores (2005) encontró que las aminotransferasas suelen adoptar un plegamiento tipo I, lo cual es muestra de que para determinadas actividades catalíticas se requieren conformaciones muy particulares, pues de ello depende que la función se realice o no, pues permitirá la estereoespecificidad, la estereoafinidad y algunas veces el mecanismo de catálisis específico. Estos autores mencionan que al comparar la alanina glioxilato transaminasa y su contraparte humana, todos los residuos de aminoácidos, excepto dos, involucrados en la unión a piridoxal fosfato, están estrictamente conservados; por lo tanto, la mínima variación en cuanto a la composición de aminoácidos, puede traer como consecuencia la desestabilización de la proteína e incluso la pérdida total de la actividad.

Una diferencia importante entre las aminotransferasas estudiadas y las ALTs, es que aquellas no requieren que se agregue de manera exógena el piridoxal fosfato a la reacción y aun así se alcanza una actividad máxima. Dado que este cofactor se une de manera covalente a la enzima, se sugiere que la holoenzima está en exceso comparada con su apoenzima, si es que siquiera existe. En cambio, ALT1 (que es la única del par de

la cual se ha logrado medir la actividad) requiere forzosamente que se adicione cofactor, o de lo contrario la actividad se ve drásticamente disminuida.

Dados estos escenarios, una manera de sortear las dificultades que se han presentado a lo largo del proyecto, sería generar una estrategia experimental que incluye la generación de quimeras entre la región codificante de *ALT1* y la regulatoria de *ALT2*, así como la inversa, la zona codificante de *ALT2* y la regulatoria de *ALT1*.

Esto nos permitiría conocer si la falta de expresión radica en el promotor de *ALT2* debido por ejemplo a su arreglo cromatínico o a la falta de sitios de unión a factores transcripcionales; de esto nos percataríamos si *ALT1* no se expresara bajo la influencia del promotor de *ALT2*. Si por el contrario, el problema radicara en la región codificante, aún bajo el control del promotor de *ALT1*, *ALT2* no lograría traducirse.

Conclusiones

I. *ALT1* aumenta su expresión y la cantidad de proteína traducida cuando se encuentra en presencia de alanina, tanto en glucosa como en etanol como fuentes de carbono; por lo tanto:

1) la alanina actúa como un coinductor, o

2) la expresión de *ALT1* responde a la calidad de la fuente de nitrógeno induciéndose en alanina, ya que este aminoácido constituye una fuente de nitrógeno no represora.

II. La inducción de la expresión de *ALT1* en alanina depende de *SNF2*, sugiriendo que esta inducción podría depender de la organización de la cromatina del promotor de *ALT1*.

III. Alt1p es la enzima responsable de la síntesis de alanina cuando las cepas se cultivan en glucosa más amonio.

IV. Por primera vez se encontraron condiciones fisiológicas en las que se expresa *ALT2*: durante el metabolismo respiratorio (etanol) o en cultivos en fase estacionaria.

V. La expresión de *ALT2* se reprime en glucosa a través de la acción del regulador negativo codificado por *NRG1*. *NRG2* no participa.

VI. En medio rico, la expresión de *ALT1* y *ALT2* ocurre de manera opuesta, pues mientras *ALT1* se expresa durante la fase exponencial, el mensajero de *ALT2* aparece en la fase estacionaria.

Perspectivas

- I Estudiar el papel de alanina en la inducción de la expresión de *ALT1*.
- II Probar si otros remodeladores de cromatina intervienen en la derepresión de *ALT1* y determinar la organización de la misma en las condiciones pertinentes.
- III Hacer una cinética de una cepa silvestre para comprobar si la disminución en la glucosa permite la expresión de *ALT2*.
- IV Estudiar la expresión de *ALT2* en una cepa *nrg1Δ* a lo largo de las diferentes etapas de crecimiento. En estas condiciones, comprobar la existencia de antígeno y montar el ensayo para determinar la actividad enzimática.
- V Generar quimeras entre los promotores de *ALT1* y *ALT2* y sus codificantes opuestas para evaluar el papel que tiene cada región en la expresión o represión.
- VI Construir quimeras entre la región codificante de *ALT2* y la región regulatoria de *GDH1*, que se sabe es un promotor que permite una expresión elevada en glucosa amonio. Comprobar la presencia de antígeno de Alt2p y ensayar la actividad enzimática.

Materiales y métodos

Cepas utilizadas

El fondo genético que se utilizó para este trabajo fue una cepa protótrofa para leucina, derivada de la cepa silvestre CLA1, la cual tiene como marcador de selección el alelo *ura3* que le confiere auxotrofia para uracilo. Para los fines de este trabajo, la cepa fue denominada CLA1-2.

La cepa parental de *S. cerevisiae* de la colección del laboratorio es W301/CLA1 y el fondo genético es *ura3Δ/leu2Δ*. Para los experimentos de β galactosidasa, se usó la cepa mutante de la colección *snf2Δ*, a la cual fue necesario curarle la auxotrofia de leucina reconstituyéndole el gen *LEU2*; éste se amplificó con Leu2Fo (5´ GAC CGC AGT TAA CTG TGG 3´) y Leu2Re (5´ CGA CTA CGT CGT TAA GGC 3´) (Hernández Lorenzo, 2010 Tesis de Maestría), se purificó por columnas de QIAgen y se transformó en la cepa de levadura ya mencionada.

Para la construcción de la mutante *alt1Δ*, se transformó la cepa CLA1-2 con un producto de PCR de 2612 pb que contenía el cassette *kanMX4* (módulo de interrupción que confiere resistencia al antibiótico geneticina) flanqueado por secuencias río arriba (756 pb) y río abajo (263 pb) del gen *ALT1*; para obtenerlo se utilizaron los oligonucleótidos ALT1Fo (5´ TCT TGC ACG GTC GCA TCT CTC G 3´) y ALT1Re (5´ GAT TAA CGG GTG TTC GAA CTA CGC 3´). Para la construcción de la cepa *alt2Δ* se transformó la cepa CLA1-2 con un producto de PCR de 2860 pb que contenía el cassette *kanMX4* flanqueado por secuencias río arriba (1078 pb) y río abajo (186 pb) del gen *ALT2*; para obtenerlo se usaron los oligonucleótidos ALT2Fo (5´ GAA ATA GCA CCA CAG AGG CAG G 3´) y ALT2Re (5´ ACA ATA GAT GCA GAG GAA TGC TCC 3´). Las transformantes se seleccionaron por su resistencia a geneticina y se verificaron por PCR utilizando el oligonucleótido 5´ respectivo para cada gen y el 3´Kan3Rev (5´ GGC AGT TCC ATA GGA TGG CA 3´).

La doble mutante *alt1Δ alt2Δ* se construyó reemplazando el cassette *kanMX4* de la mutante *alt1Δ* por el cassette *natMX*, el cual le confiere resistencia a nourseotricina, obtenido a partir de la digestión del plásmido p4339; la inserción se verificó por PCR utilizando los oligonucleótidos ALT2Fo y Nat1Re (5´ TAA GCC GTG TCG TCA AGA GTG G 3´). La cepa resultante se transformó con el cassette de interrupción obtenido de la

cepa Y02700 como se describió anteriormente y las transformantes se seleccionaron por la doble resistencia a G418 y nourseotricina. La inserción se verificó como en el caso anterior.

Para construir la cepa *nrg1Δ*, se amplificó el módulo de interrupción con *kanMX4* utilizando los oligonucleótidos Mod.NRG1-Fo (5' ATG TTT TAC CCA TAT AAC TAT AGT AAC CTC AAT GTT TCT ACT ATG CCC GCA CCG TAC GCT GCA GGT CGA C 3') y Mod.NRG1-Re (5' TTA TTG TCC CTT TTT CAA ATG TGT TCT ATA GTG TTG CAA GCA ATT ATC ATG ATC GAT GAA TTC GAG CTC G 3'); el módulo se transformó en la cepa CLA1-2. Las mutantes se seleccionaron por auxotrofia y se verificaron con los oligonucleótidos Conf.nrg1-Fo (5' CTT GGT TGC GGT CAA CAC CCT CAG G 3') y Conf.nrg1-Re (5' TTC GGA GAC AGT TCT GAT GCC TAG T 3').

Los genes *ALT1* y *ALT2* y su secuencia promotora se clonaron en el pGEM-T Easy Vector (Promega) y luego se subclonaron en el plásmido multicopia pRS426 digeridos con *NotI* (*ALT1*) o *EcoRI* (*ALT2*), generando los plásmidos pMUL1 y pMUL2 (*ALT1* y *ALT2* 2 μ URA3, respectivamente).

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en medios mínimos (MM) que contenían sales, elementos traza y vitaminas siguiendo la fórmula de Difco. Como fuente de carbono se utilizó glucosa (2% w/v) o etanol (2% v/v) y como fuente de nitrógeno se adicionó sulfato de amonio (40 mM), L-alanina (7 mM) o L-prolina (8.67 mM). El medio se suplementó con uracilo (20 mg L⁻¹) cuando era necesario complementar para la auxotrofia de las cepas. En algunos experimentos utilizamos medio rico (YPD), cuando fue así se indicó en el trabajo. Los precultivos también se realizaron en MM o en YPD dependiendo del cultivo al cual iban destinados. Todos los cultivos de este trabajo se incubaron a 30°C en agitación a 250 rpm iniciados con un inóculo de densidad óptica de OD_{600nm}=0.05.

Construcción del plásmido YEp353

Un método para medir el nivel de expresión de un gen es a través de la cuantificación de la actividad enzimática del gen traducido; es posible generar un gen heterólogo que esté

compuesto de la región regulatoria del gen de interés y la región codificante de un gen reportero como lo es *LacZ* de *Escherichia coli* que codifica para la enzima β galactosidasa. De esta manera se mide la actividad del producto proteico de *LacZ* que ha sido expresado mediante la dirección del promotor del gen en estudio.

De este modo se construyeron dos plásmidos que contienen el gen *LacZ* fusionado con el promotor de *ALT1* o de *ALT2*. El plásmido original es el YEp353 que contiene el gen *URA3*, utilizado como marcador. Para la clonación, primero se amplificó el módulo que contiene el promotor de *ALT1* con los oligonucleótidos ALT1-Fo-LacZ (5' GCG CGC GGA TCC TCT TGC ACG GTC GCA TC 3') y ALT1-Re-LacZ (5' GCG CGC GTC GAC AGT GAT AAC ATC GTG G 3'); por otro lado, para *ALT2* se utilizaron ALT2-Fo-LacZ (5' GCG CGC GGA TCC GAA ATA GCA CCA CAG AGG 3') y ALT2-Re-LacZ (5' GCG CGC GTC GAC ATT GTC ATG TGT TCT TAC TTC 3'); los sitios de restricción que se generan para ambos promotores son para *BamHI* y *Sall*.

Los productos de PCR se purificaron por columnas de QIAGEN y se digirieron con las enzimas *BamHI* y *Sall*, siendo usadas también para la digestión del plásmido YEp353 y después se colocó cada uno de los productos con el plásmido digerido para llevar a cabo la reacción de ligación con 1 unidad de T4 ligasa toda la noche a 16°C. Finalmente cada ligación diluida 1:10 se transformó a las células electrocompetentes TB1 de *E. coli*, dejándose recuperar en 1 ml de medio LB incubándose a 37°C por 1 hora. Se sembraron diluidas en cajas de LB con ampicilina [100 µg/ml]. Una vez que han crecido las colonias, es posible inocular 10 ml de LB para poder extraer el plásmido siguiendo la técnica de minipreps; el plásmido debe ser analizado mediante una reacción de restricción para asegurarnos que tenemos el fragmento insertado en el plásmido.

Transformación de la levadura por acetato de litio

Se inocularon cultivos de 50 mL de YPD y se incubaron a 250 rpm hasta una DO de 0.3 (4 h aproximadamente), las células obtenidas se resuspenden en 200 µL de solución TEL (Buffer TE 10x pH 7.5 y Acetato de Litio 1 M). A partir de este concentrado de células, se usan 50 µL por cada evento de transformación; se adiciona 1 µg de DNA transformante, 10 µL de DNA de esperma de salmón (previamente hervido 5 minutos y 5 minutos en hielo) y 300 µL de solución TELP (Buffer TE 10x pH 7.5, Acetato de Litio 1 M y PEG

4,000 al 50%), se incuba en agitación a 250 rpm y 30 °C durante 30 minutos. Inmediatamente, se añaden 40 µL de DMSO y se incuba en agitación a 42 °C durante 15 minutos. Se centrifuga y resuspende en 3 mL de YPD, se incuba en agitación a 30 °C durante 3 horas. Finalmente, se siembra en cajas de YPD más geneticina (200 µg/mL) y se incuba a 30 °C durante 2-3 días. Se seleccionan las probables mutantes y se realizan tres pases de purificación en cajas con el medio de selección adecuado.

Ensayo de β-galactosidasa

Se colectan las células que contienen el plásmido YEp353 con la fusión de los promotores de *ALT1* y *ALT2* al gen *LacZ*. Se elimina el medio y se resuspenden en 1 ml de agua, después se pasan a 600 µl de amortiguador de extracción (Solución de fosfato de potasio 100 mM; EDTA 0.1 M; DTT 1 mM), se ponen perlas de vidrio frías y se lisan las células mecánicamente, agitando en Vortex por 1 minuto y manteniendo en hielo otro minuto, repitiendo el proceso 7 veces. Se centrifuga para recuperar el extracto proteico 20 min a 13000 rpm y 4°C.

El experimento se realiza en tubos de ensayo donde se colocan 5, 10 y 15 ml de muestra proteica, aforando hasta llegar a 15 ml con amortiguador Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.06 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.04 M; KCl 0.01 M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, pH 7; DTT 1mM). Se incuban a 30°C después de haberle agregado ONPG (4 µg/µl) y se deja transcurrir la reacción por 1 minuto para posteriormente interrumpirla agregando 500 µl de Na_2CO_3 1M. Finalmente se mide la absorbancia del producto a 420 nm. La cantidad de proteína se midió por el método de Lowry et al. (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Hibridación tipo Northern

El RNA total de levadura se obtuvo de cultivos a la DO deseada dependiendo del experimento, se centrifugan agregándoles azida de sodio 1 mM, se lavan con H_2O -DEPC (di-etil-pirocarbonato); se lisan agregando 100 µl de 20 mM ATA y 100 µl de amortiguador de lisis, se agita con vortex en el cuarto frío y se agregan 200 µl de amortiguador LET IX, centrifugándose 15 min a 14000 rpm y 4°C. Se traspasa la fase acuosa a otro tubo y se

precipita con etanol frío dejándose a -20°C al menos 2 hrs. La pastilla se lava con $500\ \mu\text{l}$ de etanol 70% (en H_2O -DEPC) y se resuspende en $30\ \mu\text{l}$ de ATA 1 mM, conservándose la muestra a -70°C .

Se generaron sondas específicas, para *ALT1* se amplificó un fragmento de 1410 pb utilizando los oligonucleótidos ALT1NthnFo (5' AGA CCC GTC CTA CAG AGA CAT AGC 3') y ALT1NthnRe (5' GCG AGC TTC TTG AAC TGC CTT GAA 3'); para *ALT2* se amplificó un fragmento de 1542 pb con los oligonucleótidos ALT2NthnFo (5' GAC ACA CCA ACA GGA TTT GAA AGG 3') y ALT2NthnRe (5' CGG GTT CGC TTT CAC AAA GAG CTT 3'). Como control de carga se utilizó un fragmento de 1599 pb del gen *ACT1* (actina).

Se prepara un gel de 1.2% de agarosa con MAE IX y 6% de formaldehído; se mezclan $20\ \mu\text{g}$ de cada muestra de RNA total con amortiguador de cargado y se incuban 10 min a 65°C ; la electroforesis se realiza a 70 V o lts durante 6 hrs en amortiguador MAE IX con 3% de formaldehído. La transferencia del RNA a la membrana de nitrocelulosa se realiza con SSC 10X y se deja durante toda la noche, al final se fija con luz UV ($1200\ \mu\text{Joules}$). Se genera la sonda radiactiva para cada caso por medio del método de Random Primer (Statagen) y se hibrida en una solución con buffer de fosfatos disódico pH 7.2 [0.3 M], SDS 1.4%, EDTA pH 8 [0.5 M] a 65°C durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, la membrana se lava con soluciones de baja astringencia (SSC 2X, SDS 0.1%) y alta astringencia (SSC 0.15X, SDS 0.1%) a 65°C , dos veces cada uno (5 y 30 minutos). Se deja exponiendo sobre una pantalla variando el tiempo dependiendo de la sonda utilizada y después se lee en el Typhon a una resolución de $100\ \mu\text{m}$. Las imágenes se analizaron con el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) y se hacen los cálculos de densitometría.

Hibridación tipo Western

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de cepas de la colección BY4741 etiquetadas con TAP (OPEN Biosystems). Se realizó un SDS-PAGE utilizando los extractos de proteínas totales de la cepa silvestre BY4741 y de las cepas YDR111c-TAP (ALT2-TAP) y YLR089c (ALT1-TAP). Se cargaron 50 y $100\ \mu\text{g}$ de proteína en geles al 10% y luego la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La incubación con

anticuerpos se realizó de acuerdo a lo descrito por Towbin et al. (1979). Como anticuerpo primario se utilizó el policlonal Anti-TAP de conejo (CAB1001, OPEN Biosystems) a una dilución de 1:500; como anticuerpo secundario se utilizó HRP Anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:700.

Extracción y medición de alanina intracelular

Para esto se siguió el protocolo reportado por González et al (1997); se usaron 15 ml de cultivo en fase exponencial que se mezclaron con 15 ml de metanol al 60% amortiguado con Hepes 70 mM pH 7.5 pre-enfriado a -70°C; la temperatura final de la mezcla fue de -20°C. Esto permitió detener las reacciones metabólicas para que no cambiara la poza del metabolito. La mezcla se centrifugó y para la extracción el pellet se mezcló con 5 ml de etanol al 75% amortiguado con Hepes 250 mM, la suspensión celular se mantuvo en baño maría por 4 min y después de enfriarse en hielo, se secó en vacío a 45°C por 4 hrs. El residuo se suspendió en 1 ml de agua y se centrifugó 15 min a 13000 rpm y 4°C, el sobrenadante se usó para la determinación de alanina.

Las muestras fueron desproteinizadas con ácido perclórico y la alanina se midió mediante HPLC con una columna Ultrasphere ODS C18 (Beckman Coulter). Mediante fluorescencia se detectaron los derivados de los aminoácidos con OPA. La fase móvil fue 75% metanol y 25% amortiguador de acetato de potasio 0.1 M pH 5.5; esta mezcla fluía a 1.5 ml/min. Los datos se normalizaron dividiéndolos entre los mg de peso seco que correspondían a las muestras de acuerdo a una curva de calibración que relacionaba DO con peso seco.

Referencias

- Aalfs, J. y R. Kingston. 2000. What does "chromatin remodeling" mean? *TIBS* 25:584-555
- Anaya, V. H. 2005. Análisis funcional de dos genes para alanino aminotransferasas hipotéticas en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. 87pp
- Avendaño A, Riego L, DeLuna A, Aranda C, Romero G, Ishida C, Vázquez-Acevedo M, Rodarte B, Recillas-Targa F, Valenzuela L, Zonszein S, González A. 2005. Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of GDH3, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 57 (1): 291-305.
- Calderon, J., Morett, E., y Mora, J. 1985. Omega-amidase pathway in the degradation of glutamine in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 161(2): 807-809.
- Chu, S., J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P. O. Brown, I. Herskowitz. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science.* 282 699-705.
- Cogoni C, Valenzuela L, González-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P y González A. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol.* 177 (3): 792-798.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics.* 6, 836–846.
- Conant, G. C. y Wolfe, K. H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3, 129 (2007).
- Conant, G. C. y Wolfe, K. H. 2008. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics* (9) 938-950.
- Cooper, A.J. y Meister, A. 1977. The glutamine transaminase-omega-amidase pathway. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 4(3): 281-303.
- Crow, K. D. & Wagner, G. P. 2006. What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity? *Mol. Biol. Evol.* 23, 887–892.
- De Luna, A., A. Avendaño, L. Riego y A. González. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties and physiological roles. *J Biol Chem* 276, 43775-43783.
- Dujon, B., D. Sherman y G. Fisher. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35–44.
- Duran, S., Du Pont, G., Huerta-Zepeda, A., and Calderon, J. 1995. The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. *Microbiology* 141 (Pt 11): 2883-2889.

- Eliot, A. y J. Kirsch. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73, 383-415.
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE y Butler G. 2006. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 22; 6:99.
- Force, A. Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL y Postlethwait J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- García Campusano, F. 2009. Estudio funcional de los parálogos *ALT1* y *ALT2* de *Saccharomyces cerevisiae* durante el metabolismo respiratorio y fermentativo. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. 100 pp
- García Campusano, F., V. Anaya, L. Robledo-Arratia, H. Quezada, H. Hernández, L. Riego y A. Gonzalez. 2009. ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology* 55(4): 368-374
- Gasch, A., P. Spellman, C. Kao, O. Carmel-Harel, M. Eisen, G. Storz, D. Botstein y P. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* (11), 4241 – 4257.
- González, B., Francois, J. y Renaud M. 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347-1356.
- Gordon, J.L., K. P. Byrne y K. H. Wolfe. 2009. Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome. *PLoS Genetics* 5, 5
- Hernández Lorenzo, F. 2010. Regulación transcripcional de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría. UNAM 53 pp
- Innan, H. y F. Kondrashov. 2010. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics* (11) 97-108.
- Jansonius, J. 1998. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 8, 759-769.
- Jensen RA, Gu W. 1996. Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J Bacteriol.* 178 (8): 2161 - 2171
- Karro JE, Yan Y, Zheng D, Zhang Z, Carriero N, Cayting P, Harrison P, Gerstein M. 2007. Pseudogene.org: a comprehensive database and comparison platform for pseudogene annotation. *Nucleic Acid Research* 35: D55-D60

- Kellis, M., Birren B. y E. Lander. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* (428).
- Kispal, G., H. Steiner, D. Court, B. Rolinsky y R. Lill. 1996. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* 271, 24458-24464.
- Li, W. H., Yang, J. y Gu, X. 2005. Expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet.* 21, 602 – 607.
- Lorch Y, Cairns BR, Zhang M, Kornberg RD. 1998. Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* 10; 94 (1): 29 - 34.
- Lowry, O.H., N. Rosebrough, A. Farr y R. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 - 275
- Lynch, M. y Force, A. 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459–473.
- Magasanik, B. y C. A. Kaiser. 2002. Nitrogen regulation in 23 *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1-18.
- Marland, E., A. Prachumwat, N. Maltsev, Z. Gu y W. Li. 2004. Higher gene duplicabilities for metabolic proteins than for nonmetabolic proteins in Yeast and *E. coli*. *J. Mol. Evol.* 59 (6): 806-814
- Marques, A. C., Vinckenbosch, N., Brawand, D. y Kaessmann, H. 2008. Functional diversification of duplicate genes through subcellular adaptation of encoded proteins. *Genome Biol.* 9, R54.
- Mehta, P., T. Hale y P. Christen. 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* 214, 549-561.
- Meyer, P., Liger D., Leulliot, N., Quevillon-Cheruel S. y van Tilbeurgh, H. 2005. Crystal structure and confirmation of the alanine: glyoxylate aminotransferase activity of the YFL030w yeast protein. *Biochimie* 87. 1041-1047.
- Ohno, S. 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer, New York.
- Otto, S. P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452–462.
- Pecudani, R. y A. Peracchi. 2003. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep* 4, 850-854.
- Quezada H, Aranda C, DeLuna A, Hernández H, Calcagno ML, Marín-Hernández A, González A. 2008. Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 54 (Pt 6): 1656-1667.

- Scannell, D., G. Butler y K. Wolfe. 2007. Yeast genome evolution, the origin of the species. *Yeast* (24), 929 – 942.
- Seoighe C. y K. Wolfe. 1999. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 548 - 554
- Singleton, A: B. et al. 2003. α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* (302) p 841.
- Smith, M. 1987. Molecular evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* histone gene loci. *J. Mol. Evol.* 24, 252 – 259.
- Soberon, M. y Gonzalez, A. 1987a. Physiological role of glutaminase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1 - 8
- Soberon, M. y Gonzalez, A. 1987b. Glutamine degradation through the omega-amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133(1): 9-14.
- Soberon, M., Olamendi, J., Rodriguez, L. y Gonzalez, A. 1989. Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 135 (10): 2693-2697.
- Sudarsanam, P., V. Iyer, P. Brown y F. Winston. 2000. Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* (97)
- Takada, Y. y T. Noguchi. 1985. Characteristics of alanine: glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine biosynthesis from tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem J* 231, 157-163.
- Tirosh, I y Barkai, N. 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res.* 18: 1084-1091.
- Towbin, H., T. Staehelin y J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS.* 76: 4350 – 4354.
- Van de Peer, .Y, S. Maere y A. Meyer. 2009. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Genetics* (10) 725-732.
- Wolfe, K. y D. Shields. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* (387).
- Zhou H. y Winston F. 2001 NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* 2:5