



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *GDH3* DE *Saccharomyces cerevisiae*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BRISA ARANZAZÚ CAMPOS OLIVER

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DR. JESÚS AGUIRRE LINARES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Ciudad de México, Abril 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS:

La presente tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Doy gracias a la Doctora Alicia por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el interés constante sobre los resultados del proyecto, las colaboraciones que se formaron durante mi estancia en el instituto y sobre todo por mostrarme su lado humano y bondadoso cuando más lo necesité. Gracias por su pasión a la ciencia, que me motiva cada día.

Agradezco a mi Comité Tutor: Dr. Jorge Luis Folch Mallol por ser mi guía en la Licenciatura y un apoyo importante durante la maestría. Dr. Jesús Aguirre Linares, quienes en conjunto, sumaron sus valiosos comentarios y aportaciones al proyecto para hacer de cada discusión y de cada experimento algo más enriquecedor.

Se reconoce a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por la ayuda en la síntesis de oligonucleótidos y el préstamo del equipo necesario para la realización de este proyecto.

Al Candidato a Doctor José Carlos Campero Basaldúa y Candidato a Doctor James Enrique González Flores, por la ayuda y asesoría en el método experimental.

A la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro por el apoyo y la asesoría técnica durante el proceso experimental.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) a través del donativo CB-2014-239492-B. De igual forma agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la referencia IN201015.

Se agradece al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo brindado para la asistencia a congresos nacionales que me permitió dar a conocer los avances y resultados del proyecto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS:.....	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ABREVIATURAS.....	
1. INTRODUCCIÓN:.....	1
1.1. Levaduras	1
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	2
1.3. Duplicación génica.....	2
1.4. El evento de duplicación completa del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.5. Síntesis de Glutamato.....	6
1.6. Glutamato Deshidrogenasas, dos isoenzimas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.7. Regulación transcripcional en levadura	12
1.8. Efecto de la estructura de la cromatina	14
2. ANTECEDENTES:	16
3. JUSTIFICACIÓN:.....	19
4. HIPÓTESIS:	20
5. OBJETIVO GENERAL:	20
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES:	20
6. METODOLOGÍA:.....	21
6.1. Cepas y condiciones de crecimiento	21
6.2. Construcción de mutantes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
6.3. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por acetato de Litio	25
6.4. Extracción de ARN	25
6.5. Northern Blot	26
6.6. Obtención de ADN genómico.....	27
6.7. Actividad de NADP-GDH.....	28
6.8. Zimograma para GDHs	29
6.9. Nucleosome Scanning Assay (NuSA)	30
7. RESULTADOS:	36
7.1. Obtención de las mutantes de estudio	36
7.2. Comprobación de las mutantes obtenidas por PCR.....	37
7.3. Análisis de la represión de <i>GDH3</i> en glucosa	41

7.3.1	Análisis de la participación de Nrg1/Nrg2 en la regulación de <i>GDH3</i>	43
7.3.2.	Estudio de triples mutantes para comprobar la participación de los TF's en la regulación de <i>GDH3</i>	45
7.3.3.	Análisis de la participación de remodeladores de la cromatina en la regulación de <i>GDH3</i>	48
7.3.4.	Mig1 y su participación en la regulación de <i>GDH3</i>	49
7.3.5.	El papel de Rtg3 en la regulación de <i>GDH3</i>	50
7.4.	Actividades específicas de NADP-GDH en cultivos con y sin glucosa.....	51
7.4.1.	Cuantificación de la actividad de Gdh3 en las cepas <i>sir2Δ</i> y <i>hda1Δ</i>	52
7.4.2.	Actividad específica de NADP-GDH en triples mutantes.....	53
7.5.	La actividad enzimática de Gdh1 se puede detectar en gel.....	55
7.6.	Análisis de la dinámica de la estructura de la cromatina en el promotor de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i>	57
8.	DISCUSIÓN.....	64
9.	CONCLUSIONES:	68
10.	PERSPECTIVAS:	69
11.	LITERATURA CITADA:.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo de los diferentes caminos que puede seguir un gen duplicado.	4
Figura 2.	Después de la divergencia entre los linajes de <i>Saccharomyces</i> y <i>Kluyveromyces</i>	5
Figura 3.	Esquema representativo del metabolismo del Carbono	7
Figura 4.	Análisis de la expresión del gen <i>GDH3</i> por northern blot.....	8
Figura 5.	Análisis de las proteínas purificadas.	9
Figura 6.	La expresión de <i>GDH3</i> aumenta cuando la glucosa del medio se ha agotado.	10
Figura 7.	Cuantificación de la actividad NADP-GDH	11
Figura 8.	Esquema representativo de la estructura de la cromatina.....	14
Figura 9.	Análisis de la expresión de <i>GDH3</i> en medio rico y glucosa amonio por northern blot.	16
Figura 10.	Análisis de la expresión por northern blot del gen <i>GDH3</i> en la cepa <i>pTETO7-GDH3</i>	17
Figura 11.	Esquema representativo del promotor de <i>GDH3</i>	18
Figura 12.	Esquema del procedimiento NuSA.....	33
Figura 13.	PCR de módulos de construcción de mutantes y sondas para Northern blot.	36
Figura 14.	Esquema representativo de la estrategia utilizada para confirmación de cepas.	37
Figura 15.	Productos de PCR de las verificaciones.....	40
Figura 16.	Expresión de la cepa silvestre con privación de glucosa.....	42
Figura 17.	Northern blot de la doble mutante <i>nrg1Δnrg2Δ</i> en Glucosa-Prolina.	43
Figura 18.	Northern blot de las mutantes sencillas y la doble mutante <i>nrg1Δnrg2Δ</i>	44
Figura 19.	Zimograma y gráfica de actividad en cepas que sobre-expresan Gdh3.....	45
Figura 20.	Análisis de expresión en la triple mutante <i>nrg1Δnrg2Δgdh3Δ</i>	46
Figura 21.	Northern blot de las mutantes <i>hda1Δ</i> , <i>tup1Δ</i> y <i>sir2Δ</i> en glucosa-amonio.....	48

Figura 22. Northern blot de las mutantes <i>mig1Δ</i>	49
Figura 23. Northern blot de la mutante <i>rtg3Δ</i> en glucosa prolina.....	50
Figura 24. Ensayo de actividad en medio mínimo glucosa-amonio.....	51
Figura 25. Ensayo de actividad NADP-GDH de dobles mutantes.....	52
Figura 26. Cuantificación de la actividad de Gdh3 para la triple mutante <i>nrg1Δnrg2Δgdh1Δ</i> con sus respectivos controles.	54
Figura 27. Zimograma para GDHs.	55
Figura 28. Zimograma y actividad específica en diferentes medios de cultivo.	56
Figura 29. Obtención de la fracción del monosoma para NuSA.	58
Figura 30. NuSA del promotor de <i>GDH1</i>	59
Figura 31. NuSA del promotor <i>GDH3</i>	60
Figura 32. Experimento de choque de glucosa, NuSA, Northern blot y actividad específica.	61
Figura 33. NuSA y northern blot de la cepa <i>nrg1Δnrg2Δ</i>	63
Figura 34. Modelo de la regulación de <i>GDH3</i> en etanol y glucosa.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Lista de cepas utilizadas en este trabajo y cepas de la colección del laboratorio.	21
Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la construcción y comprobación de mutantes.	23
Tabla III. Lista de reactivos necesarios para la cuantificación de la actividad enzimática de NADP-Gdh.	29
Tabla IV. Lista de preparación de un gel de 1.5 mm para zimograma de NADP-Gdh.	29
Tabla V. Preparación de 10 ml de solución de reacción para revelar el gel nativo.	30
Tabla VI. Lista de los pares de oligonucleótidos utilizados para NuSA de <i>GDH1</i>	31
Tabla VII. Lista de los pares de oligonucleótidos utilizados para NuSA de <i>GDH3</i>	32

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ATG	Codón de inicio de la transcripción
ATP	Adenosín trifosfato
bHLH	Motivo básico hélice-vuelta-hélice
CO ₂	Dióxido de Carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etildiaminotetracético
EtOH	Etanol

g (x g)	Gravedades, unidad de fuerza
GDH1	Gen de Glutamato Deshidrogenasa 1, dependiente de NADP(H)
Gdh1	Proteína producto del gen GDH1
GDH3	Gen de Glutamato Deshidrogenasa 3, dependiente de NADP(H)
Gdh3	Proteína producto del gen GDH3
Glu-NH ₄	Medio mínimo Glucosa-Amonio
GOGAT	Glutamato Sintasa
GS	Glutamina Sintetasa
H ⁺	Protón
H ₂ O	Agua
KAN	Geneticina
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MAE	Amortiguador MOPS + Acetato de Sodio + EDTA
MNasa	Nucleasa Micrococcal
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido oxidada
NADP(H) ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidada
Gdh's	Glutamato Deshidrogenasas dependientes de NADP
NAT	Nourseotricina
NFR	Región libre de nucleosomas
NH ₄	Amonio
nm	Nanómetros
NuSA	Ensayo de escaneo de nucleosomas (Nucleosome Scanning Assay)
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
P _i	Fósforo inorgánico
PM	Marcador de peso molecular
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluorido
Pol II	Polimerasa II
poli (dA:dT)	Elemento en el promotor que estimula la transcripción aumentando la accesibilidad a los TF's
q-PCR	PCR cuantitativo
RNasa	Nucleasa que cataliza la hidrólisis del ARN
RTG	Ruta retrógrada
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TA's	Activadores de la Transcripción
TBS	Amortiguador de Tris y NaCl
TCA	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
TE	Amortiguador Tris HCl + EDTA

TF's	Factores de transcripción
TR's	Represores de la Transcripción
UAS's	Secuencias activadores río arriba
URS's	Secuencias represoras río arriba
UTR	Región no traducida del extremo 3' o 5' (untranslated region)
UV	Ultra violeta
WGD	Duplicación completa del genoma
WT	Cepa silvestre (CLA1 <i>ura3- leu2-</i>)
YPD	Medio compuesto por extracto de levadura, peptona y dextrosa

1. INTRODUCCIÓN:

We have formerly seen that parts many times repeated are eminently liable to vary in number and structure; consequently it is quite probable that natural selection, during the long-continued course of modification, should have seized on a certain number of the primordially similar elements, many times repeated, and have adapted them to the most diverse purposes.

Charles Darwin, 1859

1.1. Levaduras

El término levadura, incluye a diversos hongos unicelulares que se reproducen por gemación o división celular, éstas son fácilmente manejables para técnicas genéticas-microbiológicas y el tamaño de su genoma facilita la caracterización por secuenciación. Éstas agrupan tanto a patógenos miembros del género *Candida* como a especies utilizadas como organismo modelo de investigación científica como lo son *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* (Dujon, 2010).

S. cerevisiae es probablemente el organismo domesticado más antiguo, pues ha sido utilizado desde el año 6000 a.C. en Sumeria, Babilonia y Egipto para la producción de cerveza. Casi en la misma época era de uso común en Georgia para la elaboración de vino (Feldmann, 2012). Su uso se extendió a través de los años para investigaciones científicas. En el laboratorio ha sido preferida como modelo de estudio en células eucariontes.

El nombre científico de esta levadura, podría dividirse en: *Saccharomyces*, derivado del griego y significa “hongo-azúcar”, mientras que la raíz de *cerevisiae* proviene de Ceres, diosa Romana de la cosecha. Es por ello que ésta levadura siempre ha tenido conexión con la producción de cerveza desde tiempos milenarios (Feldmann, 2012).

Una característica comúnmente conocida del metabolismo de *S. cerevisiae* es la capacidad de fermentar azúcares aún en presencia de oxígeno, generando CO₂ y etanol. A la fermentación que se lleva a cabo en condiciones aeróbicas se conoce como efecto Crabtree, por lo que las levaduras que pueden llevar a cabo este proceso se denominan Crabtree positivas (van Urk *et al.*, 1990).

1.2. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

Durante más de cien años la levadura *S. cerevisiae* se ha utilizado como organismo modelo para estudios de genética clásica, y estudios bioquímicos. Al comparar con otros organismos modelo, presenta diferentes ventajas, pues es un organismo unicelular que a diferencia de algunos otros eucariontes más complejos, puede estar en forma haploide o diploide, crece fácilmente en un medio definido, con un tiempo de generación relativamente corto, siendo entonces un organismo de fácil manejo en condiciones de laboratorio (Feldmann, 2012).

Existen múltiples técnicas moleculares para la obtención de ADN, ARNm, ARNt, herramientas genéticas para la fácil obtención de cepas mutantes; incluso existe la posibilidad de aislar organelos completos como núcleo y mitocondria (Feldmann, 2012). Todas estas características la convierten en uno de los modelos predilectos para investigación de ciencia básica.

Al secuenciar por primera vez el genoma completo de *S. cerevisiae* se descubrió la estructura genómica de una célula eucarionte y se dieron grandes avances en los estudios en ciencias genómicas y biología molecular. La levadura haploide tiene un genoma de 13,478 kb, en 16 cromosomas y un ADN mitocondrial de 86 kb (Dujon, 1996).

1.3. Duplicación génica

Los miembros de una familia de genes que comparten un ancestro común como resultado de un evento de duplicación, se denominan genes parálogos, que a menudo presentan divergencia de función. Por otro lado los ortólogos son genes que se encuentran en dos genomas diferentes, que derivan de un ancestro común por un evento de especiación (Van de Peer *et al.*, 2009; Hurles, 2004).

La duplicación génica es considerada una herramienta clave para procesos de especiación, innovación genética y que crea conjuntos de genes parálogos que después de divergir podrían permitir la especialización funcional de las copias de genes duplicados (Piškur, 2001).

La importancia de este evento para la evolución biológica ha sido subrayada desde 1930, cuando Susumo Ohno propuso un modelo que en escala evolutiva puede resultar en una nueva función (Conrad and Stylianou, 2007), por lo cual el estudio de este evento

genómico puede proveer mayor información sobre la evolución del genoma y la aparición de nuevas funciones (Kellis *et al.*, 2004).

Los eventos de duplicación génica se pueden deber a diferentes procesos, por ejemplo: **i)** entrecruzamiento no recíproco (unequal crossing-over), donde la posición del entrecruzamiento determina si la parte duplicada contiene parte de un gen, el gen completo o un conjunto de genes; **ii)** retro-transposición, ésta ocurre cuando un ARN mensajero es transcrito de manera retrógrada en ADN complementario y después es insertado en el genoma al azar; una manera común de identificar este proceso es la presencia de colas de poli A, secuencias cortas repetidas flanqueando la secuencia insertada, así como pérdida de intrones, pérdida de promotores y zonas regulatorias, que lo convierten en un pseudogen. Finalmente, **iii)** la duplicación cromosómica o genómica, esto ocurre probablemente por la falta de separación entre los cromosomas hijos después de la replicación de ADN (Zhang, 2003; Hurles, 2004).

Las rutas que pueden seguir las copias adicionales de genes son las siguientes:

- a) Pseudogenización: cuando una copia se pierde en la población por acumulación de mutaciones, ya sea en la región codificante o en la regulatoria, lo que lo convierte gradualmente en un pseudogen para eventualmente ser eliminado del genoma (Hurles, 2004; Zhang, 2003) (Figura 1a).
- b) Neo-funcionalización: resulta ser de los más importantes e interesantes y que como su nombre lo indica, es la generación de una nueva función que no estaba presente en el gen previo a su duplicación (Zhang, 2003) (Figura 1b).
- c) Sub-funcionalización: se cree que mantener dos genes con funciones idénticas afectan la estabilidad del genoma, por lo que una alternativa es que la función ancestral se re-distribuya en las copias de genes (Zhang, 2003; Hurles, 2006; Van de Peer *et al.*, 2009) (Figura 1c).
- d) Conservación por dosis génica: donde un aumento en la dosis de genes (aumento de número de copias por duplicación, por ejemplo) puede resultar en niveles más elevados de la formación del producto del gen.

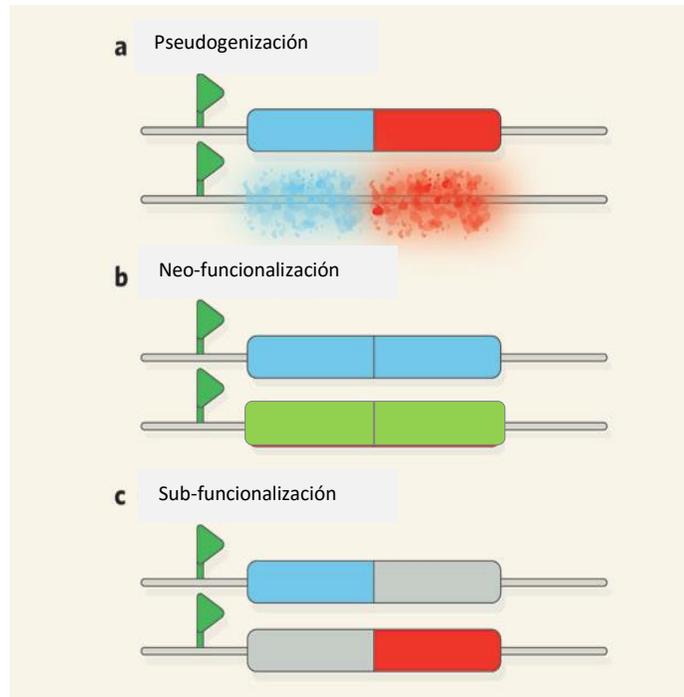


Figura 1: Esquema representativo de los diferentes caminos que puede seguir un gen duplicado. a) pseudogenización, donde se pierde una de las copias; **b)** neo-funcionalización, donde se adquieren funciones diferentes a las ancestrales y **c)** sub-funcionalización, donde ambas copias comparten parte de la función ancestral (Tomado y modificado de Louis, 2007).

Se ha observado que cerca en el 95% de los casos sólo uno de los dos parálogos muestran una evolución acelerada, lo que confirma la teoría de que mientras uno mantiene la función ancestral, el otro es libre de evolucionar más rápidamente (Kellis *et al.*, 2004).

Gran número de genomas que han sido secuenciados y analizados, presentan un alto grado de genes duplicados. Algunos de los ejemplos más estudiados son *Drosophilla melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *S. cerevisiae* y bacterias modelo como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Piškur, 2001).

1.4. El evento de duplicación completa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

La duplicación completa del genoma (**WGD** por sus siglas en inglés, Whole-genome duplication) ocurrió en levaduras hace aproximadamente 100 millones de años (Warren and Marullo, 2012). Este es considerado el primer caso descrito en eucariontes. Sin embargo recientemente se ha demostrado que el ciliado unicelular *Paramecium tetraurelia* ha atravesado por más de una duplicación completa del genoma (Van de Peer *et al.*, 2009).

El análisis del genoma de *S. cerevisiae* permitió localizar los genes parálogos, que dieron las primeras evidencias sobre la existencia de bloques de duplicación ancestral, los cuales fueron interpretados por Wolfe y colaboradores como una prueba de la veracidad del modelo de la duplicación completa del genoma. Este evento probablemente ocurrió después de la divergencia entre el linaje de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Wolfe y Shields, 1997) (Figura 2). Sin embargo, en un principio el modelo fue basado en sólo una pequeña proporción de genes (8%), que explicaría sólo la minoría de los genes redundantes, por lo cual surgieron algunos modelos alternativos, como que dichos segmentos se deben a eventos locales de duplicación (Kellis *et al.*, 2004).

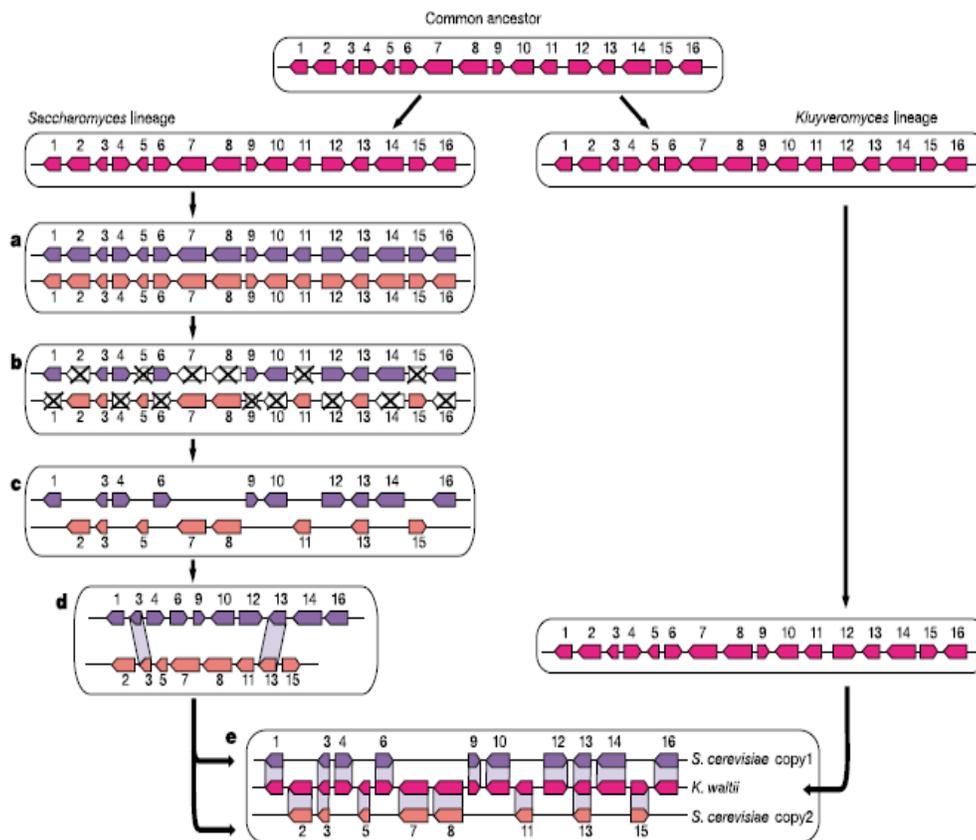


Figura 2. Después de la divergencia entre los linajes *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* se llevó a cabo a) el evento de la duplicación completa del genoma; b) la gran mayoría de los genes duplicados se eliminaron o sufrieron diversas mutaciones y c) sólo una pequeña parte de los genes se mantuvieron con dos copias, pues eran necesarios para llevar a cabo la función ancestral; d) el orden conservado de los genes duplicados en *Saccharomyces* es la única evidencia entre los diferentes segmentos del cromosoma, pero e) la comparación con *K. waltii* hace más evidente que *Saccharomyces* tiene su genoma duplicado, con segmentos hermanos con base en la dirección ancestral de los genes (Kellis *et al.*, 2004).

Posteriormente se analizaron las secuencias de especies relacionadas, que divergieron antes del evento de duplicación. Así se demostró que *S. cerevisiae* surgió de una duplicación completa de ocho cromosomas ancestrales, donde después perdió cerca del 90% de los genes duplicados mediante pequeñas deleciones. Éste modelo se confirmó por la presencia de 145 regiones emparejadas en *S. cerevisiae*, que representan el 88% del genoma y contienen 457 pares de genes duplicados (Kellis *et al.*, 2004).

Una evidencia de la duplicación es la existencia de familias de genes ampliamente distribuidas (Hurles, 2004). Otra, tal vez la más importante, es cuando dos regiones que surgieron de una duplicación ancestral, contienen genes parálogos en el mismo orden y orientación, dispersos entre otros genes no relacionados, es decir, conservan sintenia en algunas regiones; además la sintenia observada permite establecer cuáles son pares de genes provenientes de una duplicación global y cuáles de eventos de duplicación local (Kellis *et al.*, 2004). El grado de sintenia entre diversas especies de levadura disminuye considerablemente conforme aumentan las distancias filogenéticas (Piškur, 2001).

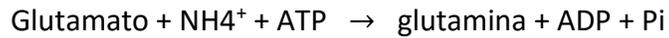
Se cree que el evento de duplicación completa del genoma de *S. cerevisiae* permitió una adaptación a nuevos nichos. Sin embargo tener más de un juego completo de cromosomas (llamado poliploidía), implica una mayor inestabilidad del genoma. La estabilidad se recupera después de eventos de mutación, re-arreglos genómicos o de una pérdida masiva de genes (Kellis *et al.*, 2004). En el caso de *S. cerevisiae*, sólo algunos genes duplicados fueron fijados y especializados, pues facilitaron la evolución hacia el metabolismo anaeróbico (Wolfe y Shields, 1997).

1.5. Síntesis de Glutamato

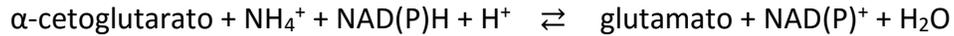
Las fuentes de Nitrógeno más comunes para la mayoría de los microorganismos de vida libre son el amonio y el nitrato. Gran parte del nitrógeno disponible se encuentra en estado gaseoso; sin embargo pocos microorganismos pueden asimilar el nitrógeno molecular para la síntesis de compuestos orgánicos. La asimilación de este elemento en otros compuestos es necesaria para el crecimiento del organismo. El glutamato con su grupo amino y la glutamina con su grupo amida, son los principales donadores de nitrógeno, contribuyendo con un 80 y 20% del nitrógeno celular respectivamente, para que se lleven a cabo las reacciones biosintéticas necesarias.

En *S. cerevisiae* se ha observado que puede crecer exitosamente en un medio que contiene glucosa como única fuente de carbono y amonio como única fuente de nitrógeno, donde el amonio es incorporado por dos vías (Magasanik, 2003):

Una glutamina sintetasa (GS) dependiente de ATP, codificada por *GLN1*, que cataliza la transferencia del amonio al glutamato para la producción de glutamina, seguido de la acción de una glutamato sintasa (GOGAT) dependiente de NAD, codificada por *GLT1*, que reduce y transfiere el grupo amida al α -cetoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Magasanik, 2003).



La ruta alternativa se lleva a cabo por la acción de dos glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP, (NADP-GDHs codificadas por *GDH1* y *GDH3*) que catalizan la aminación y reducción de α -cetoglutarato, usando NADPH como donador de electrones (Magasanik, 2003).



En *S. cerevisiae* el ciclo GS/GOGAT es la vía auxiliar para la biosíntesis de glutamato (Valenzuela *et al.*, 1998). Ambas vías son el punto de conexión entre los metabolismos del nitrógeno y del carbono (Figura 3).

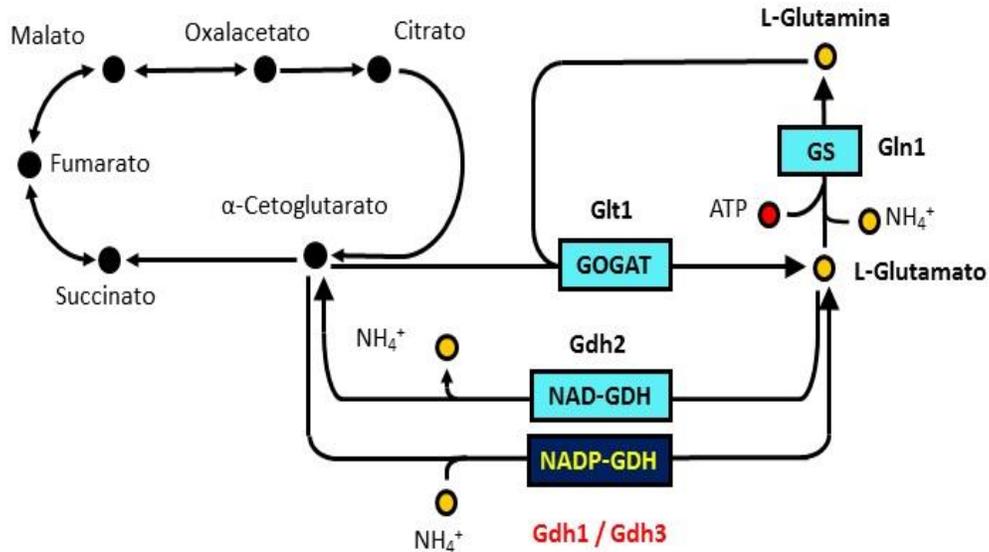


Figura 3. Esquema representativo del metabolismo del Carbono y nitrógeno, donde se ven involucradas la glutamino sintetasa (GS), las glutamato deshidrogenasas (NAD-GDH; NADP-GDH) y la glutamato sintasa (GOGAT).

1.6. Glutamato Deshidrogenasas, dos isoenzimas en *Saccharomyces cerevisiae*

DeLuna *et al.*, 2001 describió a dos glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP⁺ presentes en *S. cerevisiae*, las cuales están codificadas por los genes *GDH1* y *GDH3*, cuya expresión es regulada diferencialmente, dependiendo de la fuente de carbono. Se purificaron y caracterizaron dichas enzimas, mostrando diferentes propiedades alostéricas y tasas de utilización de α -cetoglutarato. El estudio fisiológico de mutantes que sobre-expresan o carecen de *GDH1* o *GDH3*, sugiere que participan en funciones fisiológicas no redundantes (DeLuna *et al.*, 2001).

Cuando la levadura crece en glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, Gdh1 es la vía primaria para la biosíntesis de glutamato; cuando la glucosa se agota, la expresión de *GDH3* aumenta considerablemente y la proteína contribuye más en el proceso de biosíntesis durante la transición diáuxica de *S. cerevisiae* pues su actividad aumenta un 40% y va incrementando conforme pasa el tiempo (DeLuna *et al.*, 2001).

La expresión de *GDH3* en presencia de etanol y su represión en glucosa, fue verificada por análisis tipo Northern blot (Figura 4), donde se observa claramente que si la fuente de carbono es glucosa *GDH3* se reprime, pero el efecto contrario se observa en etanol como fuente de carbono (Avendaño *et al.*, 2005).



Figura 4. Análisis de la expresión del gen *GDH3* por northern blot. El ARN fue extraído de células CLA1/pGDH3-1 a una DO_{600nm} de 0.3, crecidas en medio con glucosa (G) y en medio con etanol (E) como fuentes de carbono (Avendaño *et al.*, 2005).

Estas dos isoenzimas fueron purificadas, mostrando que la masa molecular de los monómeros es de 51 kDa para Gdh1 y de 49.6 kDa para Gdh3 (Figura 5A). Se determinó que la estructura activa es un hexámero; se cree que *in vivo* pueden existir varias isoformas por la oligomerización entre los monómeros (Figura 5B) (DeLuna *et al.*, 2001).

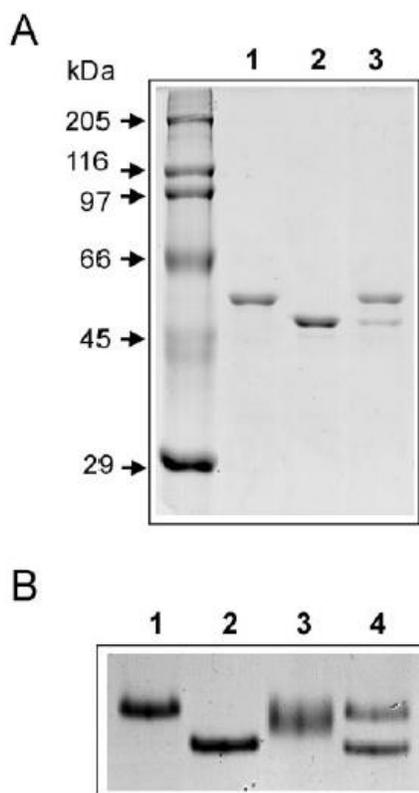


Figura 5. Análisis de las proteínas purificadas. **A)** SDS-PAGE de las proteínas purificadas provenientes de células cultivadas en medio con etanol, donde carril 1: Gdh1 (cepa: *gdh1Δ/gdh3Δ*pLAM11-*GDH1* 2μ URA3), carril 2: Gdh3 (cepa: *gdh1Δ/gdh3Δ*pLAM12-*GDH3* 2μ URA3), carril 3: NADP-Gdhs provenientes de la cepa silvestre. **B)** Electroforesis nativa de proteína purificada (2μg) donde carril 1: Gdh1, carril 2: Gdh3, carril 3: NADP-Gdhs provenientes de la cepa silvestre, carril 4: mezcla de enzimas purificadas Gdh1 y Gdh3.

También se reportó el análisis cinético de ambas isoenzimas en diferentes condiciones de temperatura y pH mostrando los valores óptimos, análisis de velocidad máxima y su comportamiento en presencia de inhibidores. La enzima obtenida de la cepa silvestre exhibió comportamientos similares a las preparaciones que contenían 75% Gdh1 y 25% Gdh3; lo cual indica que las cinéticas hacia el α -cetoglutarato depende de la abundancia relativa de los monómeros de Gdh1, Gdh3 y la asociación en estructuras heteroméricas (DeLuna *et al.*, 2001).

Se reportó que se pueden encontrar diferentes proporciones de Gdh1/Gdh3 en cultivos de levadura de largo plazo (DeLuna *et al.*, 2001). Se sabe que en medio rico *S. cerevisiae* crece fermentativamente, el cambio diáuxico ocurre después que la glucosa se agota y se adopta un metabolismo respiratorio utilizando el etanol producido durante el metabolismo

fermentativo (Figura 6 A). Con base en esto se llevó a cabo un análisis de expresión de *GDH3* en medio rico (YPD), reportando un aumento de la expresión del gen conforme pasa el tiempo del cultivo, siendo el máximo a las 24 horas de crecimiento cuando la glucosa se ha agotado completamente.

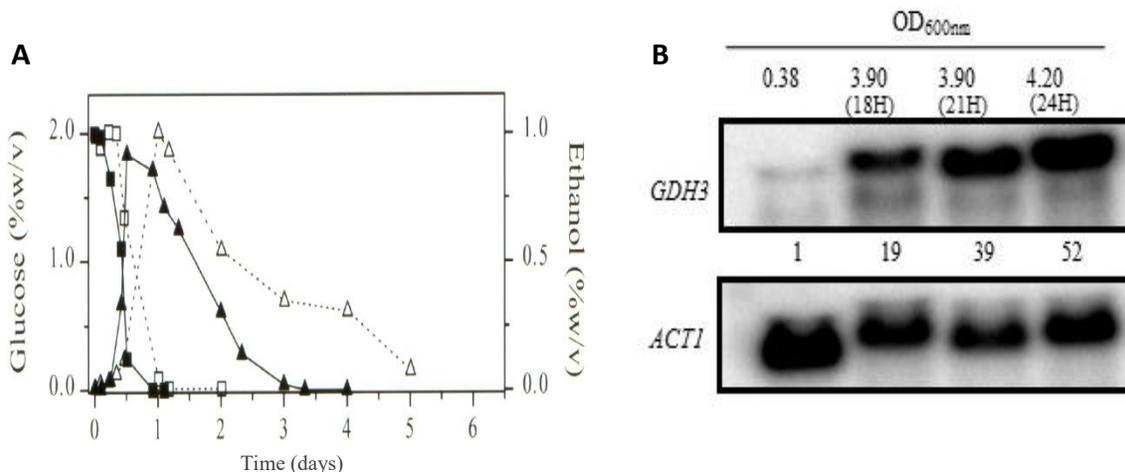


Figura 6. La expresión de *GDH3* aumenta cuando la glucosa del medio se ha agotado. A) Cuantificación del consumo de glucosa en medio rico (■) y en medio mínimo (□), así como la producción de etanol con el paso del tiempo en medio rico (▲) y medio mínimo (△). **B)** Análisis de expresión de *GDH3* por Northern Blot en medio rico (YPD) (Aranda *et al.*, en preparación).

En la figura 6 B podemos observar que la migración de las bandas de ARN fue irregular. Este problema se presentó en muchos de los experimentos realizados de este tipo, no sabemos con certeza a qué se debe pero suponemos que tiene que ver con el proceso de extracción o por degradación de la muestra.

Durante el crecimiento fermentativo, con la glucosa como única fuente de carbono, la actividad NADP-GDH se debe sólo a Gdh1. Sin embargo se observó que cuando llega a la etapa de crecimiento post-diáuxica se presentan diferentes proporciones de Gdh1/Gdh3 y después de 5 días de incubación el 70% de la actividad total de NADP-GDH, corresponde a Gdh3 (DeLuna *et al.*, 2001) (Figura 7).

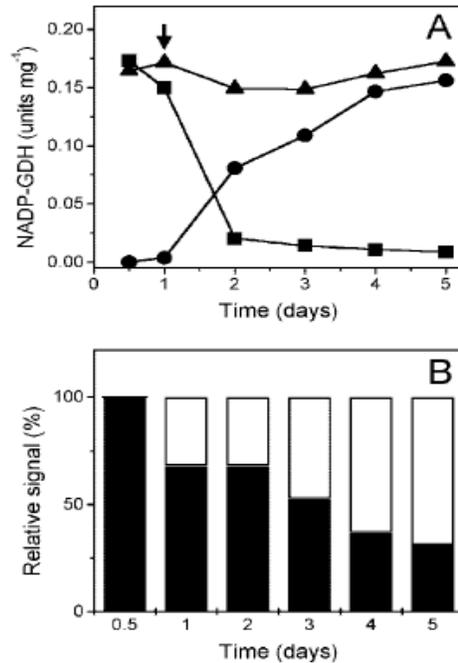


Figura 7. A) Cuantificación de actividad NADP-GDH. Análisis de la cepa *GDH3, gdh1*Δ (●) y de la cepa *GDH1, gdh3*Δ (■) y la cepa silvestre (▲) a través del tiempo, en medio rico (YPD); la flecha indica el momento en que se acaba la glucosa del medio. **B) Abundancia relativa de cada isoenzima del total de NADP-GDH de la cepa silvestre por análisis densitométrico de señales de inmunoblot;** las barras negras son Gdh1 y las blancas Gdh3 (DeLuna *et al.*, 2001).

Para determinar que la regulación de *GDH3* dependiente de la fuente de carbono es a nivel transcripcional, se construyeron varios plásmidos recombinantes, cambiando el promotor de *GDH1* por el de *GDH3* y viceversa. Estos estudios permitieron reportar que la actividad de Gdh1 es 27 veces mayor cuando se expresa bajo su propio promotor en medio glucosa amonio, que cuando se encuentra bajo la regulación del promotor de *GDH3* en el plásmido con la fusión *5'GDH3-GDH1*. Además la actividad de Gdh3 aumentó 20 veces cuando se encontró bajo la regulación del promotor de *GDH1* en comparación a cuando es expresado bajo su propio promotor. Los datos sugieren que la expresión de *GDH3* es menor que la de *GDH1* y pudiera estar reprimida a nivel transcripcional por la glucosa (DeLuna *et al.*, 2001).

Todos estos estudios nos permiten proponer que es importante realizar un estudio más detallado sobre la regulación de la represión del gen *GDH3* en presencia de glucosa, para entender la importancia de este gen parálogo en el metabolismo nitrogenado de *S. cerevisiae*.

1.7. Regulación transcripcional en levadura

La transcripción es uno de los procesos moleculares de mayor importancia en la célula; pues es el conjunto de transcritos (transcriptoma) el que determina la función celular, lo cual establece el tipo celular. Las características de cada célula están especificadas por los genes expresados ya que cada célula tiene el mismo material genético. Sin embargo, es la expresión regulada de estos genes la que determina la capacidad de la célula para interactuar con su ambiente, por lo cual no todos los genes se expresan al mismo tiempo (Ptashne and Gann, 2002).

La transcripción en eucariontes se lleva a cabo en ADN semi-empaquetado, en la fibra de 30 nm o solenoide, es decir, en presencia de nucleosomas y ADN desnudo. El cambio en la transcripción de algunos genes está correlacionado con cambios en la estructura de la cromatina (Rando and Winston, 2012).

La regulación transcripcional comienza con el reconocimiento de una secuencia específica con elementos únicos en el ADN por factores de transcripción (TFs, por sus siglas en inglés), ya sea por activadores de la transcripción (TAs) que se unen a secuencias de activación río arriba (UASs, upstream activation sequences) o represores (TRs) que se unen a secuencias represoras río arriba (URSs, upstream repression sequences). Las UASs y los TFs asociados son requeridos probablemente para la expresión de todos los genes que codifican para proteínas, transcritos por la Pol II, los cuales contienen uno o más UASs. Una transcripción eficiente requiere el acoplamiento con el UAS del promotor que reclutan a los co-activadores apropiados (Hahn and Young, 2011).

Además puede existir un nivel de transcripción basal *in vitro* que no depende de un activador. Por otro lado se sugiere que los nucleosomas reprimen el inicio de la transcripción *in vivo* no dependiente de TFs. Por lo tanto un promotor en levadura puede ser activado por uno o más TFs, elementos poli(dA:dT) y por una cromatina alterada para estimular la transcripción independiente de activadores. Además las secuencias de ADN en el inicio de la transcripción parecen ser determinantes para la iniciación (Hahn and Young, 2011).

Entre los diversos estudios realizados para entender cómo se regula la expresión de genes de levaduras se determinó que: **i)** Las cajas TATA (TATA-boxes) son sitios de inicio de la transcripción presentes en muchos genes de levadura, que se encuentran normalmente a 30 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción; sin embargo no son obligatorias, **ii)** “Upstream sequence elements” son los sitios de unión para activadores y represores transcripcionales, **iii)** en algunos casos la activación y represión se puede llevar a cabo por los mismos factores de transcripción, **iv)** reguladores globales están involucrados en la

regulación de genes relacionados funcionalmente, **v)** no se requiere de un alineamiento estricto entre el sitio de unión del activador transcripcional y la caja TATA de un gen de levadura, **vi)** los factores de transcripción están compuestos por dominios separables de unión a ADN y de función activadora de la transcripción, **vii)** en algunos casos particulares, algunos activadores y la expresión de estos mismos están regulados a nivel traduccional (Feldmann, 2012).

S. cerevisiae utiliza glucosa como la fuente de carbono preferencial, entrando a la vía glucolítica directamente y liberando etanol en el medio. Una vez que la glucosa ya no está disponible, puede utilizar fuentes alternativas de carbono para la producción de energía metabólica y biomasa, tales como galactosa, sacarosa, maltosa, así como algunas fuentes no fermentables como el etanol, lactato, glicerol y acetato (Turcotte *et al.*, 2009; Galdieri *et al.*, 2010).

Al no existir más glucosa disponible, las células entran en la fase diáuxica que se caracteriza por una disminución en el crecimiento celular y el cambio del metabolismo de glicólisis a la utilización aeróbica del etanol, conocidos como metabolismo fermentativo y respiratorio respectivamente (Galdieri *et al.*, 2010). Cuando ocurre esta transición, hay una reprogramación masiva de la expresión de muchos genes involucrados en distintas vías, por ejemplo la del metabolismo del carbono, síntesis de proteínas y almacenamiento de carbohidratos (DeRisi *et al.*, 1997). Se sabe que se requieren cerca de 600 genes para el crecimiento óptimo en fuentes de carbono no fermentables como el etanol. Dicha fuente de carbono es producida normalmente por la célula como consecuencia de la fermentación alcohólica, de tal forma que cuando es metabolizado se convierte en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (codificada por *ADH2*), y a acetato por una aldehído deshidrogenasa (*ALD6*). Posteriormente el acetato es transformado a acetil-CoA por la acetil-CoA sintetasa (*ACS1*) (Turcotte *et al.*, 2009).

La expresión de genes de la gluconeogénesis está regulada en conjunto con la expresión de varios genes respiratorios, pues éstos se requieren para la obtención de energía por fosforilación oxidativa durante el proceso de gluconeogénesis. Por esta razón, las mutantes deficientes en respiración son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables. Además se ha reportado que la estabilidad del ARNm de algunos genes de gluconeogénesis aumenta en presencia de fuentes de carbono no fermentables (Turcotte *et al.*, 2009).

1.8. Efecto de la estructura de la cromatina

La cromatina es un complejo de ADN y proteínas, cuya estructura está compuesta por unidades repetidas y ordenadas de nucleosomas. Estos a su vez se conforman como octámeros de histonas, con 147 pb de ADN a su alrededor en 1.65 vueltas (Figura 8). Se le considera una estructura de compactación del ADN para estar dentro del núcleo. Sin embargo, se ha demostrado que puede participar dinámicamente con otros complejos proteícos, en los procesos celulares como la transcripción, recombinación, reparación del ADN, formación del centrómero y del cinetocoro, regulación genética y epigenética (Li *et al.*, 2007)

Los nucleosomas eran vistos como una forma de empaquetar el ADN para poder estar dentro del núcleo, se le consideraba material estático y con estructuras que no eran de interés. Esta visión cambió notablemente al demostrar que la estructura de la cromatina juega un papel importante y dinámico, esencial en el control de la transcripción (Rando and Winston, 2012).

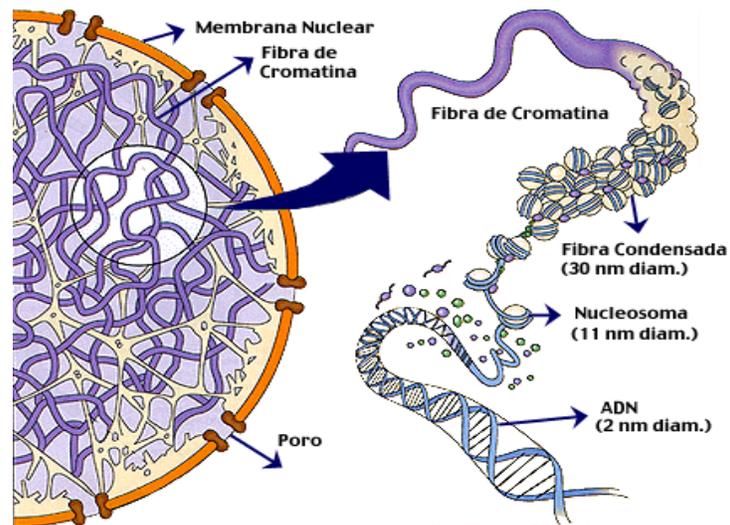


Figura 8. Esquema representativo de la estructura de la cromatina. Su empaquetamiento en los nucleosomas y la constitución de la fibra de 30 nm o solenoide, donde se lleva a cabo la transcripción. Tomado de grupos.emagister.com

La primera evidencia de su importancia proviene de estudios de la expresión genética, donde se mostraba que genes transcripcionalmente activos, eran más sensibles a las nucleasas que los genes que no son transcritos. Otros estudios sugirieron que la acetilación de las histonas puede afectar la transcripción (Rando and Winston, 2012).

Un aspecto importante de la función del promotor es la regulación de la ocupación y posicionamiento de los nucleosomas. En *S. cerevisiae* se reconoció que generalmente, las regiones promotoras estaban libres de nucleosomas. Además que algunos estudios del genoma encontraron una organización conservada de la cromatina en la mayoría de los promotores en levadura (Hahn and Young, 2011). La cromatina también puede jugar un papel pasivo en la regulación genética simplemente controlando cuáles sitios de unión a factores de transcripción están disponibles para su participación en la regulación genética (Zawadzki *et al.*, 2009).

La mayoría de los genes tienen **i)** una región libre de nucleosomas (NFR, por sus siglas en inglés, Nucleosome Free Region) de aproximadamente 200 pb en los promotores; **ii)** un nucleosoma +1 fuertemente posicionado, cuyo arreglo y anclaje de nucleosomas se extiende por el ORF, **iii)** un nucleosoma -1 bien posicionado, **iv)** una NFR al extremo 3' del transcrito; **v)** una NFR más profunda en los promotores de genes altamente expresados de aquellos que no lo son (Zawadzki *et al.*, 2009).

En general a mayor frecuencia de transcripción se puede observar una disminución en la ocupación del nucleosoma -1, pues éste se escinde, además de que se aumenta la longitud de la región libre de nucleosomas, y mayor espaciamiento internucleosomal más cercano a las regiones codificantes (Rando and Winston, 2012).

A tasas altas de la transcripción, la ocupación de nucleosomas disminuye sobre las regiones codificantes, y los nucleosomas de las regiones codificantes se encuentran cada vez más deslocalizados. Se observó en la comparación de los genes altamente transcritos con los pobremente transcritos en una condición de crecimiento, pero también se observó cuando los genes son activados y reprimidos en respuesta a cambios en el ambiente (Rando and Winston, 2012).

2. ANTECEDENTES:

Se corroboró que la regulación de *GDH3* es a nivel transcripcional, reemplazando por recombinación homóloga a la región promotora de *GDH3*, por el promotor *tetO7* (promotor que activa la expresión en ausencia de doxiciclina). Se hizo un análisis de la expresión de estas construcciones por Northern Blot, donde se observó que *GDH3* bajo la regulación del promotor *tetO7* si se expresa en medio rico (YPD) desde etapas tempranas del cultivo cuando aún hay glucosa en el medio y con el paso del tiempo se sigue expresando. Por el contrario, en la cepa silvestre, se observó que la expresión de este gen bajo su propio promotor, en ambas condiciones está reprimido.

El análisis de la expresión de *GDH3* en medio mínimo glucosa-amonio, mostró que cuando se expresa bajo su propio promotor, la expresión de este gen está reprimida, pero la cepa mutante con el promotor *tetO7* insensible a glucosa, el gen *GDH3* muestra niveles altos de expresión (Figura 9) (Campero-Basaldúa, en preparación).

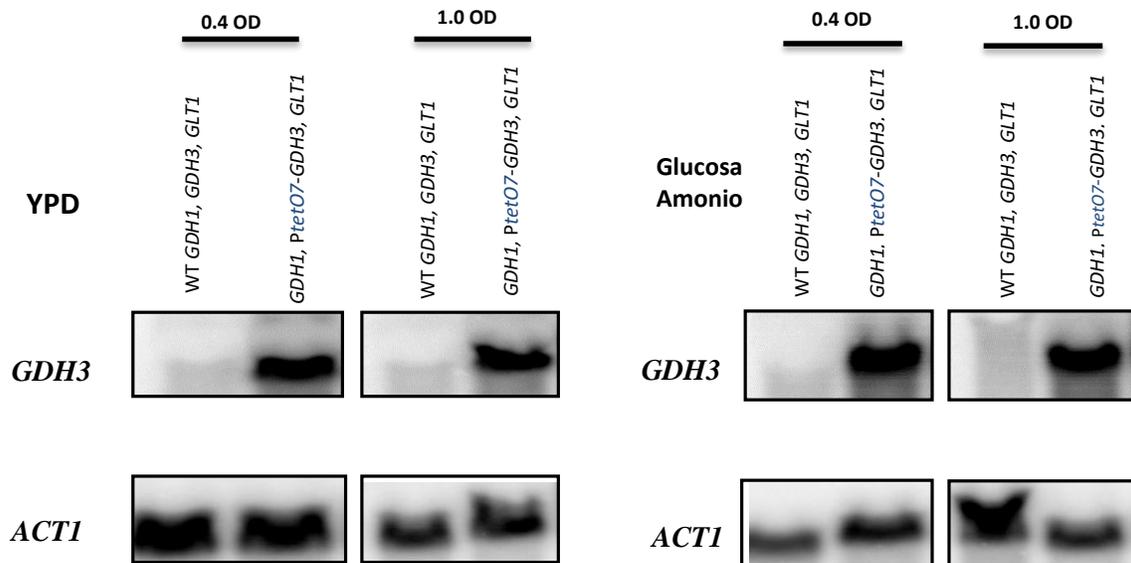


Figura 9. Análisis de expresión del gen *GDH3* en medio rico y en glucosa-amonio por northern blot. Cepa silvestre (*GDH1, GDH3, GLT1*) y la cepa que contiene a *GDH3* bajo el promotor *PtetO7* (Campero –Basaldúa, en preparación).

La elevada expresión del gen *GDH3* bajo la regulación del promotor *tetO7* se observa incluso al hacer un choque de privación de glucosa, donde después de obtener las células a una DO_{600nm} de 0.3, se hace un cambio por un medio de cultivo que no contiene glucosa ni ninguna otra fuente de carbono, el gen *GDH3* se expresa a niveles elevados después de 3,

6 y 9 horas de incubación en estas condiciones (Figura 10) (Campero-Basaldúa, en preparación).

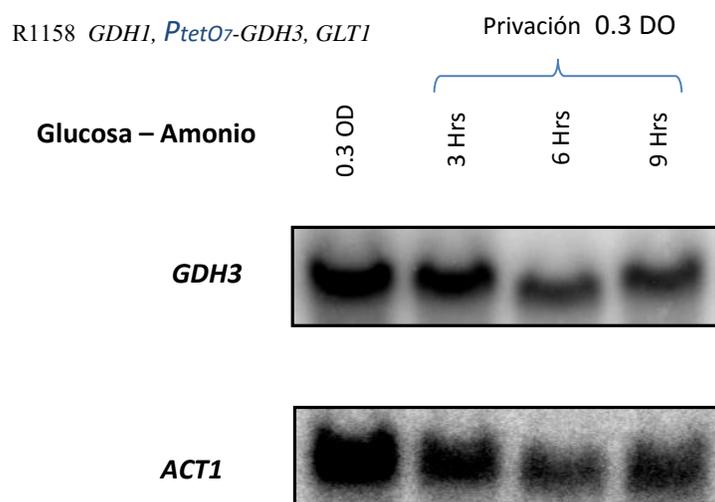


Figura 10. Análisis de expresión por Northern Blot del gen *GDH3* en la cepa *Ptet07-GDH3*. Medio glucosa-amonio y choque sin glucosa de 3, 6 y 9 horas.

Dado que el promotor es responsable de la regulación de *GDH3*, se llevó a cabo el análisis de las secuencias del género *Saccharomyces* y se obtuvieron los elementos *cis* conservados. Se pudieron identificar a algunos candidatos que pudieran participar como reguladores negativos como Nrg1/Nrg2 así como Mig1. Los candidatos como reguladores positivos pueden ser el complejo Hap, Gln3 y Rtg3 (Figura 11).

Proponemos construir las mutantes pertinentes involucradas en la interacción con el promotor, así como en co-represores y algunos factores involucrados en la remodelación de la cromatina con el objetivo de analizar su participación en la represión/activación de *GDH3*.

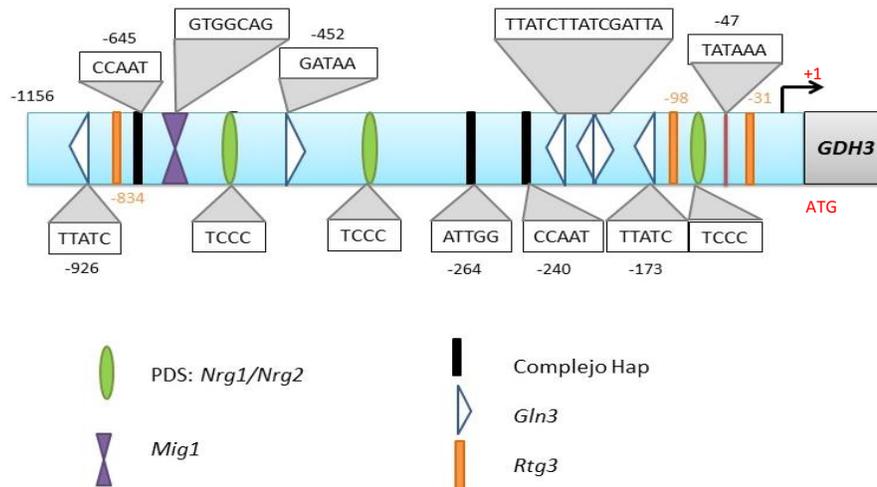


Figura 11. Esquema representativo del promotor de GDH3. Se muestran los sitios de reconocimiento para reguladores negativos y positivos.

Nrg1 y *Nrg2* son regulados diferencialmente en respuesta a la fuente de carbono, tanto a nivel ARN como de proteína. Los niveles de proteína de *Nrg1* aumentan en respuesta a la limitación de glucosa o el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, mientras los niveles de *Nrg2* se ven disminuidos. Se propone que *Nrg1* y *Nrg2* tienen distinta regulación, expresión e incluso función. Las proteínas *Nrg* están involucradas en la regulación de genes como *DOG2*, *SUC2*, *GAL*, *STA2*, *FLO11*, considerados genes reprimidos por glucosa (Berkey *et al.*, 2004).

Mig1 es un regulador transcripcional de la expresión de *MAL*, *GAL* y *SUC* en respuesta a glucosa, además es uno de los componentes más conocidos y estudiados en la regulación negativa en respuesta a glucosa. Es una proteína de unión al ADN que pertenece a la clase dedos de zinc (Hu *et al.*, 1995).

La actividad de *Mig1* está regulada por fosforilación y localización subcelular, donde a altas concentraciones de glucosa, la proteína *Mig1* es hipofosforilada y entra al núcleo, donde puede llevar a cabo su papel represor de la transcripción. Cuando la glucosa del medio se agota, *Mig1* es fosforilada y de forma inmediata es transportada al citoplasma (DeVit *et al.*, 1997)

Está reportado que *Mig1* se une a diversos promotores, como *GAL1*, *GAL4*, *SUC2* y que puede llevar a cabo la represión por la interacción con el co-represor global *Ssn6-Tup1* (Treitel y Carlson, 1995); además este mismo co-represor es requerido para la represión por *Nrg1* (Berkey *et al.*, 2004). En este trabajo proponemos construir mutantes *tup1Δ* pues es muy probable que esté funcionando como co-represor reclutado ya sea por *Nrg1* o *Mig1*.

Debido a que *GDH3* se encuentra en la región subtelomérica del cromosoma I, se podría pensar que las desacetilasas de histonas como Sir2 y Hda1 podrían estar participando en la regulación de la expresión mediante el remodelado de la cromatina, por lo que se decidió hacer mutantes de los dos genes que codifican para ambas proteínas.

En la mayoría de los organismos, los telómeros consisten en una secuencia repetida de ADN rica en G's que va de 5' a 3' hacia el final del cromosoma. Esta estructura protege al cromosoma de la degradación y las fusiones entre los extremos, previniendo la pérdida del ADN terminal que sirve de sustrato para la telomerasa. Todo lo anteriormente descrito es de vital importancia para el mantenimiento del cromosoma en eucariontes (Tham and Zakian, 2002).

La transcripción de los genes cercanos al telómero es reprimida, proceso conocido como efecto de la posición del telómero (TPE, por sus siglas en inglés). Este fenómeno es ampliamente estudiado en *Saccharomyces*, el cual involucra cambios en la conformación de la cromatina, siendo dependientes de la distancia y longitud del telómero, mediados a través de Sir2 una desacetilasa de histonas del tipo III (Pedram *et al.*, 2006, Tham and Zakian, 2002).

Además de la participación de los factores transcripcionales en la regulación de la transcripción, se sugiere que podría existir otro punto de control tal como regulación post-transcripcional, incluso post-traducciona para las Gdh's. Tal como se ha reportado anteriormente por Mazón *et al.*, en 1979 se conoce que la disminución de la actividad de Gdh se debe a que la NADP-Gdh1 es degradada durante la privación de glucosa. Por lo tanto la relación Gdh1/Gdh3 disminuye y la mayor parte de la actividad que se presenta se debe a Gdh3 (DeLuna *et al.*, 2001). Aún no se conoce exactamente qué otros factores podrían estar involucrados en la disminución de Gdh3 en presencia de glucosa.

3. JUSTIFICACIÓN:

La expresión de *GDH3* se reprime en glucosa, dicha represión termina cuando se agota la glucosa (DeLuna *et al.*, 2001). La represión pudiera depender en la interacción de elementos *trans* aún no identificados, con elementos *cis* que están presentes en el promotor de *GDH3*.

Es importante entender cómo se lleva a cabo la regulación de *GDH3* dependiendo de la fuente de carbono. Las Glutamato Deshidrogenasas son el punto de conexión entre el

metabolismo del carbono y del nitrógeno, por lo que al ser enzimas clave para la levadura, deben ser finamente reguladas para tener una utilización balanceada del α -cetoglutarato.

4. HIPÓTESIS:

La represión del gen *GDH3* depende de la acción concertada de más de un elemento de control negativo. Los altos niveles de expresión de *GDH3* en ausencia de glucosa se deben a la ausencia y/o inactivación de uno o más reguladores negativos y a la acción de uno o más reguladores positivos.

Además estos factores podrían reclutar a otros elementos que son capaces de modificar la estructura de la cromatina para llevar a cabo la regulación de *GDH3* tanto en glucosa como en etanol.

5. OBJETIVO GENERAL:

Identificar el o los reguladores (*trans*) positivos y negativos responsables de la regulación del gen *GDH3* de *S. cerevisiae* en presencia de glucosa como fuente de carbono.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Construir mutantes sencillas en diversos reguladores como Mig1, Tup1, Sir2, Nrg2.
- Analizar la expresión de *GDH3* por Northern blot utilizando las cepas obtenidas en el presente trabajo, así como de las mutantes *hda1Δ*, *nrg1Δ*, *nrg1Δnrg2Δ*, *gdh1Δ*, *gdh3Δ* y *gdh1Δgdh3Δ* previamente construidas en nuestro laboratorio. Las condiciones de crecimiento serán en medio rico (YPD); medio mínimo glucosa-amonio y medio mínimo glucosa-prolina.
- Generar mutantes *gdh1Δ*, para ser analizadas en los fondos genéticos pertinentes y analizar la expresión de *GDH3* por actividad enzimática.
- Analizar la dinámica de la estructura de la cromatina en condiciones represoras y activadoras del gen *GDH3* (glucosa y etanol) mediante la técnica de Nucleosome Scanning Assay (NuSA) (Infante *et al.*, 2012).

6. METODOLOGÍA:

6.1. Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas en este trabajo se presentan en la tabla I. Estas cepas se cultivaron en medio mínimo siguiendo la fórmula del medio Yeast Nitrogen Base, Difco o en medio rico YPD que contiene 1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína, 2% Dextrosa anhidra. Estas cepas fueron conservadas en medio sólido con los respectivos suplementos de selección (aminoácidos o antibióticos).

Tabla I. Lista de cepas utilizadas en este trabajo y cepas de la colección del laboratorio(*).

Silvestre (WT)	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ</i>
<i>hda1Δ*</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ hda1::KANMX4</i>
<i>tup1Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ tup1::KANMX4</i>
<i>sir2Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ sir2::KANMX4</i>
<i>mig1Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ mig1::KANMX4</i>
<i>nrg1Δ*</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ nrg1::KANMX4</i>
<i>nrg2 Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ nrg2::KANMX4</i>
<i>nrg1Δnrg2Δ*</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ nrg1::NAT nrg2::KANMX4</i>
<i>gdh1Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ gdh1::LEU2</i>
<i>gdh3Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ gdh3::URA3</i>
<i>gdh3Δ*</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ gdh3::LEU2</i>
<i>gdh1Δgdh3Δ*</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ gdh1::KANMX4 gdh3::LEU2</i>
<i>nrg1Δnrg2Δgdh1Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ nrg1::NAT nrg2::KANMX4 gdh1::URA3</i>
<i>nrg1Δnrg2Δgdh3Δ</i>	<i>MATa CLA1 ura3Δ leu2Δ nrg1::NAT nrg2::KANMX4 gdh3::LEU2</i>

El crecimiento de las cepas fue bajo temperatura controlada, 30°C y en el caso de medio líquido, se utilizó agitación orbital a 250 rpm.

Los pre-cultivos se realizaron en 10ml de medio YPD, inoculando a una DO_{600nm} inicial de 0.05.

6.2. Construcción de mutantes en *Saccharomyces cerevisiae*

Se llevó a cabo el diseño experimental para la construcción de diversas mutantes anteriormente mencionadas, utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del módulo de genética (*KANMX4*), del gen *URA3* o *LEU2* según sea el caso, y que reemplazarán el gen en cuestión por recombinación homóloga.

Se amplificó el módulo *NRG2-KANMX4* que reemplazará el ORF completo de *NRG2* con el gen que le confiere resistencia a genética para seleccionar las mutantes obtenidas.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la enzima Phusion High Fidelity® (New England, Biolabs) de acuerdo a las condiciones del fabricante. El programa utilizado para la síntesis del módulo *NRG2-KANMX4* fue: 98°C/5 minutos, 1 ciclo; (98°C/30 segundos, 56°C/1 minuto, 72°C/2 minutos) 30 ciclos; 72°C/10 minutos, 1 ciclo. El ADN templado fue utilizado a una concentración de 50 ng/μl.

La amplificación del módulo *GDH3-LEU2* se realizó para reemplazar a *GDH3* por *LEU2* en una cepa *CLA1 ura3⁻ leu2⁻* y obtener las mutantes por selección de auxotrofia.

El programa utilizado para obtener el módulo *GDH3-LEU2* con la enzima Phusion High Fidelity® (New England, Biolabs) fue el siguiente: 98°C/30 segundos, 1 ciclo; (98°C/10 segundos, 56°C/30 segundos, 72°C/2 minutos) 30 ciclos; 72°C/5 minutos, 1 ciclo. El ADN templado de la cepa *S288C*, fue utilizado a una concentración de 50 ng/μl.

Para la amplificación del módulo *GDH1-URA3* se utilizó el programa 98°C/30 segundos, 1 ciclo; (98°C/10 segundos, 59°C/30 segundos, 72°C/1.5 minutos) 30 ciclos; 72°C/5 minutos, 1 ciclo. El ADN templado del plásmido *pRS426*, fue utilizado a una concentración de 50 ng/μl.

Para verificar que se generaron las mutantes de forma correcta, se utilizaron los oligonucleótidos de construcción en combinación con los oligonucleótidos de verificación reportados en la tabla II para realizar reacciones de PCR, cada reacción se hizo por separado, verificando cada una de las mutaciones, en el caso de dobles y triples mutantes. Ningún producto de amplificación fue secuenciado para verificación de la mutación.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la construcción y comprobación de mutante, donde la secuencia subrayada es complementaria al módulo con el cual se reemplazará el gen por recombinación homóloga. (*) El módulo para la mutante *mig1Δ* se obtuvo de una mutante en el fondo BY4742, por lo cual no se requerían oligonucleótidos tan grandes.

OLIGONUCLEÓTIDOS DE CONSTRUCCIÓN		
	Nombre	Secuencia
<i>tup1Δ</i>	TUP1KanFw	AGC AGG GGA AGA AAG AAA TCA GCT TTC CAT CCA AAC CAA T <u>CGT</u> <u>ACG CTG CAG GTC GAC</u>
	TUP1KanRv	CAA TGA ATT GAA TAG TTT AGT TAG TTA CAT TTG TAA AGT GTT CCT T <u>ATC GAT GAA TTC GAG CTC G</u>
<i>sir2Δ</i>	SIR2KanFw	CAT TCA AAC CAT TTT TCC CTC ATC GGC CA TTA AAG CTG G <u>CGT ACG</u> <u>CT CAG GTC GAC</u>
	SIR2KanRv	TAT TAA TT GCC ACT TTT AA TTA TTA AAT TGC CTT CTA C <u>ATC GAT</u> <u>GAA TTC GAG CTC G</u>
<i>mig1Δ*</i>	KanMIG1Fw	AAC CTG GAG TGA TGG TAA AGG C
	KanMIG1Rv	GGG TTC CAC CAT CAG TAA AAG TAC
<i>nrg1Δ</i>	Mod.NRG1Fo	ATG TTT TAC CCA TAT AAC TAT AGT AAC CTC AAT GTT TCT ACT ATG CCC GCA <u>CCG TAC GCT GCA GGT CGA C</u>
	Mod.NRG1Re	TTA TTG TCC CTT TTT CAA ATG TGT TCT ATA GTG TTG CAA GCA ATT ATC ATG <u>ATC GAT GAA TTC GAG CTC G</u>
<i>nrg2Δ</i>	NRG2-Kan.Fo	GAC AGC TCA AAT GAA TTT CCG GCA CCA AGT CAT ATG AGC <u>ACC</u> <u>GTA CGC TGC AGG TCG AC</u>
	NRG2-Kan.Re	GAA CCG ACT ATC GTT CCT GCT ATT GTT CTT GGT GAG TAT TAC <u>ATC</u> <u>GAT GAA TTC GAG CTC G</u>
<i>gdh1Δ</i>	Gdh1URA3Rv	CTC CCG ATA ATC AAT TTT CTT AAT TAA TTA ATT GCG TTA CGA TTC CG <u>TTA GTT TTG CTG GCC GCA TC</u>
	Gdh1URA3Fw	GAT ACG TAC TAT CGC ATT ATT CTA ATA TAA CAG TTA GGA GAC CAA <u>AGT GCA CCA TAC CAC AGC TT</u>
<i>gdh3Δ</i>	Gdh3LEU2Fw	AAT GAC TTC TGA CTT TGA GCC GTT CGA ACT CAG TTA TAT AAA GGT ACA TAC ATA GGC <u>AGT AAT TGG TTG TTT GGC CGA G</u>
	Gdh3LEU2Rv	TGC ATA GTA AAT TAA AAG TAG ATT ACA CTA CTA CAT ACA CAG ATA GTT ACG AAC <u>TGC GTA TAT AGT TTC GTC TAC CC</u>
OLIGONUCLEÓTIDOS DE CONFIRMACIÓN		
<i>tup1Δ</i>	TUPconFW	CTT CAG CTA TAA AAC AAT GCG CTG AC
	TUPconRV2	CTG TAA GAT GAT GCA ACC ACA CTT AAC G
<i>sir2Δ</i>	SIR2conFW	AAG CTA CAT CTA GCA CTC CTT CC
	SIR2conRV	CTG AGA TTC TGA GGC TAT ACC ACC
<i>mig1Δ</i>	ConMIG1Fw	GTT GCT AGC ATA CTT GTT CGA GCT

	ConMIG1Rv	GAC CTG GTT CCA TGA ATG AGA G
<i>nrg1Δ</i>	Conf-nrg1Fo	CTT GGT TGC GGT CAA CAC CCT CAG C
	Conf-nrg1 Re	TTC GGA GAC AGT TCT GAT GCC TAG T
<i>nrg2Δ</i>	Nrg2Fo	GCA GTA GCT CCT ACA TCG CTA ACA GG
	Nrg2Re	CGT CAT CAC AGG AGA GGG TAA TCC
<i>gdh1Δ</i>	Congdh1URA3Fw	AAG CTG TTA TCA GCT GCT GCG
	Congdh1URA3Rv	TCA TCA AAT AAG CCT GGT GTC C
<i>gdh3Δ</i>	Congdh3LEU2fw	GGG ACA GTT TTA TCG TTG GTT AA
	Congdh3LEU2Rv	CTT CCG TAA TGC TGA ACC CTA TT
Módulo KAN	Kan3' Re	GGC AGT TCC ATA GGA TGG CA
Módulo NAT	NatRev	TAA GCC GTG TCG TCA AGA GTG G
Módulo URA3	ConfURA3Rv	TAT ACT GTT GAC CCA ATG CGT C
Módulo LEU2	ConLEU2fw	TAA GAC CAT GTA ACT TTG CAT CCG

En el caso de las mutantes *tup1Δ*, *mig1Δ*, *nrg2Δ*, *sir2Δ*, se amplificó el módulo de genética utilizando como templado el plásmido pFA6a::KANMX4 y utilizando los oligonucleótidos pertinentes para cada caso. Para eliminar el gen *MIG1* se realizó a partir de ADN genómico de la mutante *mig1Δ::KANMX4* de la colección BY4742 (*MatA*, *his3⁻* *leu2⁻* *lys2⁻* *ura3⁻*). El módulo *LEU2* se obtuvo amplificando el gen a partir de ADN genómico de la cepa S288c, y en el caso del módulo *URA3*, se utilizó como templado el plásmido pRS426 (Promega).

Una vez obtenido el módulo, se purificó el producto de PCR utilizando el paquete Promega, Wizard SV Gel and PCR clean-up system, para poder transformar levadura por el método de acetato de Litio, se aislaron ocho colonias de cada cepa obtenida, para llevar a cabo tres pasos de purificación en placa. Una vez obtenidas las cepas mutantes, se analizaron por PCR con los oligonucleótidos específicos para cada caso. Algunas mutantes se confirmaron por Northern blot cuando el resultado por PCR no fue contundente.

Además sobre la mutante *nrg1Δnrg2Δ* se eliminó el gen *GDH3* y por separado *GDH1* para generar las triples mutantes *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* y *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* utilizando los módulos de construcción con *URA3* o *LEU2*. Se comprobaron las tres mutaciones cada

construcción por separado, mediante PCR utilizando diversas combinaciones de los oligonucleótidos y además se verificaron las mutantes positivas mediante Northern blot.

6.3. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* por acetato de Litio

Se inoculó en 10 ml de medio YPD una colonia aislada de la cepa de interés, se incubó toda la noche a 30°C a 250 rpm en agitación orbital. Se utiliza éste pre-cultivo para inocular un matraz con 40 ml de YPD a una DO_{600nm} de 0.1-0.2, se incubó a 30°C en agitación orbital hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.3-0.4, se colectaron las células por centrifugación a 1500 x g por 5 min, se hizo un lavado con 40 ml de agua estéril y finalmente se homogenizaron las células en 1 ml de agua estéril para transferir a un tubo de 1.5 ml, se centrifugó a máxima velocidad por 5 seg y se eliminó el sobrenadante.

Se lavó con 1 ml de TE/LiOAc recién preparado (10 mM Tris HCl 1M pH 7.5, 100 mM acetato de litio, 1 mM EDTA). Se centrifugaron, y se eliminó el sobrenadante, para finalmente resuspender en 200 µl de TE/LiOAc, y colocando 50 µl de células en un tubo por cada transformación, incluidos los controles. Se agregaron 1-2 µg del producto de PCR purificado y 10 µl de ADN de esperma de salmón, previamente hervido por 5 min. Se mezcla y se adicionan 300 µl de PGE/TE/LiOAc al 50% recién preparado (PEG 50%, 100mM acetato de litio, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM EDTA).

Se incubaron las células a 30°C por 30 minutos, con agitación leve. Una vez terminado el tiempo de incubación, se hizo un choque térmico a 42°C por 15 min. Las células se colectaron por centrifugación y se homogenizó el paquete celular en 1 ml de YPD, para transferir a un tubo con 3 ml de YPD.

Se recuperaron las células incubando a 30°C, por 3 h. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron, para posteriormente realizar la selección, creciendo en medio YPD sólido suplementado con geneticina (200 mg/L). Las cajas se incubaron hasta tener colonias y se aislaron para re-estriar en cajas individuales para su posterior análisis por PCR.

6.4. Extracción de ARN

Se llevó a cabo el crecimiento de las cepas pertinentes para cada experimento en medio mínimo glucosa-amonio o etanol-amonio para la obtención de células y la posterior extracción de ARN total conforme al protocolo descrito a continuación, obteniendo muestras a una DO_{600nm} 0.3, o en alguna otra condición fisiológica, después se colectaron

las células por centrifugación, se lavaron y se cambiaron a un medio sin fuente de carbono, sólo en el caso de los experimentos de privación de glucosa. Todas las muestras obtenidas se visualizaron en un gel de agarosa al 1% para ARN.

Para llevar a cabo la extracción de ARN total de células de levadura, se inoculó una colonia de la cepa de interés en 10 ml de medio YPD para su crecimiento durante 15 h y ser utilizado como pre-inóculo de un nuevo cultivo de mayor volumen (2000 ml) a una densidad óptica de 0.05 $DO_{600\text{ nm}}$, una vez inoculado se dejó en crecimiento en agitación orbital a 30°C, hasta obtenerlo a la densidad óptica deseada (0.3, 0.5 $DO_{600\text{ nm}}$). Colectar las células en un tubo cónico estéril, descartar el sobrenadante y hacer un lavado del paquete celular con 10 ml de agua con DEPC, centrifugar y descartar el sobrenadante, congelar el paquete celular con nitrógeno líquido y almacenar a -70°C hasta el momento que tenga que ser procesado.

Una vez obtenidas todas las muestras de interés, se descongelan y se agregan 500µl de solución TES (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM, pH 8.0; SDS 0.5%) e inmediatamente se agregan 400 µl de fenol ácido y se agita vigorosamente durante 10 seg. Se incuban de 30 a 60 min a 65°C con ocasional agitación. Inmediatamente después se colocan los tubos en hielo durante 10 min. Se centrifugan durante 5 min a velocidad máxima a 4°C. Se transfiere la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml, añadir 400 µl de fenol ácido y se agita vigorosamente. Se incuban nuevamente los tubos en hielo durante 10 min y se centrifuga durante 5 min a velocidad máxima a 4°C. Se transfiere la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml, añadiendo 400 µl de cloroformo. Agitando vigorosamente y se centrifuga 5 min a velocidad máxima a 4°C. Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo, agregando 40 µl de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 1 ml de etanol absoluto frío y se precipita toda la noche.

Para precipitar el ARN, se centrifuga 15 min a 17000 x g, a 4°C. Se lava el precipitado de ARN con etanol al 70% frío. Se centrifuga y se decanta, se deja secando por unos minutos a temperatura ambiente para finalmente agregar 50µl de agua tratada con DEPC.

6.5. Northern Blot

Se decidió utilizar la técnica de Northern blot para estudiar la regulación de la expresión de *GDH3* debido a que era la técnica disponible y estandarizada en el laboratorio para llevar a cabo este tipo de análisis.

Se cuantificaron las muestras de ARN por espectrofotometría (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) para tener 30 µg de ARN de cada una de las

muestras para cada carril del gel de agarosa. Se sometieron a migración por voltaje (80 Volts) en un gel de agarosa-formaldehído (84ml H₂O DEPC, 10 ml MAE 10X, 6 ml de formaldehído 37%) con amortiguador de corrida MAE 1X (100 ml MAE 10X, 30 ml formaldehído, 870 ml en agua bidestilada).

Se observó el gel con las muestras de ARN total en el transiluminador. Si los ARNs no están degradados se procede a la transferencia en la membrana.

Previo a la transferencia en la membrana, se lava el gel de agarosa con 250 ml de SSC 10X (175.3 g de NaCl, 88.2 g de citrato de sodio, ajustar a 1L) en el agitador, dos lavados de 20 minutos cada uno, esto para eliminar el exceso de formaldehído del gel.

Se llevó a cabo la transferencia por capilaridad a la membrana de Hybond-Nylon utilizando el amortiguador SSC10X. La transferencia se llevó a cabo por 12-16 horas. Una vez obtenido el filtro se fijó con ayuda del Stratalinker (UV Stratalinker 1800, Stratagene).

Se realizó el marcaje de la sonda de *GDH3*, *GDH1* y *ACT1* con P³² con el método de Random Primer, se cuantificó el porcentaje de incorporación y finalmente se llevó a cabo la hibridación de cada una de las sondas, en eventos por separado.

Una vez obtenida la membrana se llevó a cabo la hibridación de ARN con la sonda radioactiva correspondiente, primero con solución de pre-hibridación (7ml SDS 10%, 3ml fosfato de sodio monobásico 1M pH 7.2, 10 µl de EDTA 0.5M) incubando una hora a 65°C. Después se hirvió la sonda radioactiva por 10 minutos, se enfrió en hielo para poder agregarla en la solución. La hibridación se llevó a cabo por aproximadamente 12 horas a 65°C.

Terminada la hibridación se hicieron cuatro lavados del filtro, dos de baja astringencia (SSC 2X + SDS 0.1X) y dos de alta astringencia (SSC 0.15X + SDS 0.1X) a 65°C. Se llevó a cabo la exposición del filtro, anotando las coordenadas de su ubicación. Después de 24 horas de exposición se llevó a cabo el análisis de la imagen.

6.6. Obtención de ADN genómico

Se inocularon 10 ml de medio YPD con una colonia aislada de la cepa elegida, se incubaron a 30°C, en agitación orbital por toda la noche.

Se centrifugó a 2000 x g por 2-5 min a temperatura ambiente para coleccionar las células. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 0.5 ml de agua bidestilada estéril para transferir a un tubo de 1.5 ml. Se centrifugó a 17000 x g por 5 seg. Se eliminó el

sobrenadante para adicionar 200 µl de una solución de: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM Na-EDTA.

Se adicionaron 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) preparado al momento. Se agregaron 0.3 g de perlas de vidrio a cada muestra para mezclar con agitación por vórtex (máxima velocidad) por 3-4 min. Se adicionaron 200 µl de amortiguador TE pH 8.0. Centrifugar a 17000 x g por 5 min.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se agregaron 400 µl de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 17000 x g por 5 min para transferir la fase acuosa a un microtubo limpio. Se repitió la extracción con Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico dos veces.

Finalmente se precipitó agregando 1 ml de etanol al 100% + 10 µl de acetato de amonio. Se mezcló por inversión y centrifugó a 17000 x g por 2 min, se eliminó el sobrenadante. El precipitado de ADN se resuspendió en 400 µl de amortiguador TE + 10µl de RNasa A (10 mg/ml). Se incubó a 37°C por 30 min.

Para precipitar el ADN se agregaron 10 µl de acetato de amonio 4 M + 1 ml de Etanol al 100%. Se mezcló por inversión. Se centrifugaron las muestras a 17000 x g por 2 min. Se eliminó el sobrenadante se lavó el precipitado con Etanol 80% y se secó a temperatura ambiente.

6.7. Actividad de NADP-GDH

El extracto total de proteína se obtuvo de acuerdo con DeLuna *et al.*, 2001. Se colectaron las células y se resuspendieron en 1ml de amortiguador A (100 mM Tris pH 7.5, 1mM de EDTA, 1mM de Ditiotreitól [DTT], 1 mM fenil-metil-sulfonil flurido [PMSF]), se rompieron las células en forma mecánica con perlas de vidrio en 8 ciclos de 1 min de agitación por vórtex y 1 min en hielo. Se centrifugaron terminados los 8 ciclos a 900 x g por 10 min, recuperando el sobrenadante.

El extracto obtenido se utilizó inmediatamente para la cuantificación de la actividad enzimática y posteriormente almacenado a 4°C por no más de 7 días para posteriores análisis o repeticiones.

Para la actividad de GDH se prepararon tres mezclas de 50 ml:

Tabla III. Lista de reactivos necesarios para la cuantificación de la actividad enzimática de NADP-Gdh.

	Completo	Sin α -cetoglutarato	Sin NH_4
α -cetoglutarato 50mM	4ml	-	2ml
NH_4Cl 500 mM	4ml	2 ml	-
Tris HCl 1 M pH 7.5	4 ml	2 ml	2 ml
Aforar con H_2O a	40 ml	20 ml	20 ml

El pH se ajustó a 7.2 antes de aforar al volumen final. Las alícuotas se guardaron en congelación a -20°C sin NADPH. El volumen final de la reacción fue de 1 ml, utilizando diferentes volúmenes de una dilución pertinente del extracto de proteína (2, 4, 8 y 16 μl), donde se fue observando la pendiente de actividad al reducirse el NH_4 y el α -cetoglutarato para convertirse en glutamato, mediante espectrofotometría (Cary 50 Bio, UV-visible Spectrophotometer, Varian).

Se llevó a cabo la cuantificación de proteína (Lowry *et al.*, 1951), en placas de microtitulación. La actividad específica se calculó mediante las pendientes obtenidas en la medición por espectrofotometría y la concentración de proteína total del extracto.

6.8. Zimograma para GDHs

Las cepas de interés se cultivaron en el medio elegido, hasta la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ deseada, incubando a 30°C con agitación orbital.

Se obtuvo el extracto de proteína total con el protocolo anteriormente descrito, utilizando un volumen de 400 μl de amortiguador A (100 mM Tris pH 7.5, 1mM de EDTA, 1mM de Ditionitrotol [DTT], 1 mM fenil-metil-sulfonil flurido [PMSF]) con el fin de obtener la proteína más concentrada y poder cargar en el gel nativo entre 50-100 μg de proteína.

Tabla IV. Lista de preparación de un gel de 1.5 mm para zimograma de NADP-Gdh.

Gel separador 5%		Gel concentrador	
Agua bidestilada	5.814 ml	Agua bidestilada	2.3 ml
Acrilamida 30%	1.67 ml	Acrilamida 30%	670 μl
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1 ml
Persulfato 15%	100 μl	Persulfato 15%	60 μl
TEMED	10 μl	TEMED	10 μl

Se dejaron polimerizar por al menos dos horas. Se preparó el amortiguador de corrida Tris-glicina 1X pH 8.8 (2X: 3g trizma base, 14.4g de glicina, ajustar pH con KOH, aforar a 1L) y el amortiguador de carga para las muestras (glicerol 40%, azul de bromofenol 0.04%, Tris HCl 0.5M pH 6.8). Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga a una concentración final 1X y éstas no fueron sometidas a alguna temperatura mayor a la del ambiente, para evitar la desnaturalización de las proteínas. La migración de las muestras se hizo a 110V, por 1.5 h a 4°C.

Una vez desmontado el gel de la cámara de electroforesis, se colocó en un recipiente donde se cubrió con la solución de reacción.

Tabla V. Preparación de 10 ml de solución de reacción para revelar el gel nativo.

Reactivo	Volumen	[final]
100 mM α -cetoglutarato	500 μ l	5 mM
1 M NH ₄ Cl	500 μ l	50 mM
1 M Tris HCl pH 7.5	1 ml	100 mM
H ₂ O	8 ml	-
NADP(H)	10 mg	1.19 mM

Se incubó por 30 minutos, para posteriormente ser observado por luz UV. Ésta metodología se basa en el hecho de que el NADP(H) es fluorescente y el NAD(P) no lo es, así que los sitios del gel donde hubo reacción se habrá consumido el NADP(H) y se podrá observar una banda oscura, mientras que el resto del gel será fluorescente.

6.9. Nucleosome Scanning Assay (NuSA)

La técnica descrita por Infante *et al.*, 2012 combina el aislamiento del ADN correspondiente al tamaño que es protegido por un nucleosoma (146 pb) después de ser digerido con nucleasa micrococcal (MNasa) y su posterior cuantificación por q-PCR. El ADN protegido por un nucleosoma, será amplificado debido a que hay una mayor concentración dentro de la población de moléculas, no así con el ADN desprotegido (Figura 12).

Para llevar a cabo este análisis, se diseñaron pares de oligonucleótidos para cada gen, descritos en la tabla VI y VII. Se obtuvieron 19 pares de oligonucleótidos para *GDH1* que abarcan aproximadamente 800 pb en total, de los cuales 600 pb son del promotor y 200 pb de una parte de la región codificante. Para el caso de *GDH3* se diseñaron 22 pares de oligonucleótidos que permitirán analizar cerca de 1000 pb, de los cuales aproximadamente

700 pb corresponden al promotor y los 300 pb restantes a la región codificante. Estos oligonucleótidos generaron productos de PCR de aproximadamente 100 pb, los cuales tienen una zona de empalme con el siguiente amplicón en la mitad del anterior y así sucesivamente a lo largo de toda la zona de estudio.

Tabla VI. Lista de los pares de oligonucleótidos utilizados para el NuSA de *GDH1*.

G1.0	G1Fw-595 CGT TTA CGA TTG GCT GGA TAA
	G1Rw-502 CAT AAG GGG AGC CTG ATA CA
G1.1	G1Fw-559 AAT ATG ATG CTA CAT CCA CTC A
	G1Rw-465 TAA GAT CAG GCC CGT TTC CA
G1.2	G1Fw-521 TGT ATC AGG CTC CCC TTA TG
	G1Rw-428 TCG AGG CCA TCC AAT CAG AT
G1.3	G1Fw-484 TGG AAA CGG GCC TGA TCT TA
	G1Rw-381 TGA AAA TGC ATG GGC CGG TT
G1.4	G1Fw-448 ATC TGA TTG GAT GGC CTC GA
	G1Rw-339 ACG TGG GGT CGT ACT ATT TC
G1.5	G1Fw-400 AAC CGG CCC ATG CAT TTT CA
	G1Rw-310 AGC TGA TAA CAG CTT CTC TCT
G1.6	G1Fw-359 GAA ATA GTA CGA CCC CAC GT
	G1Rw-264 TGC TGA TTT TCA TTA TGG TAC CT
G1.7	G1Fw-330 AGA GAG AAG CTG TTA TCA GCT
	G1Rw-228 CTA CTT CTT ACG CTT TCT TCT TC
G1.8	G1Fw-286 AGG TAC CAT AAT GAA AAT CAG CA
	G1Rw-189 ACG TAT ACT TTG CTT TAA CAA GA
G1.9	G1Fw-250 GAA GAA GAA AGC GTA AGA AGT AG
	G1Rw-166 TTC CAA TCT TCT CTT ACT TAG A
G1.10	G1Fw-212 TCT TGT TAA AGC AAA GTA TAC GT
	G1Rw-111 ATG GGT AAA CGC ATT TGT AAC T
G1.11	G1Fw-187 TCT AAG TAA GAG AAG ATT GGA A
	G1Rw-82 AAG TCA TTT AAA GAG TGA GAG A
G1.12	G1Fw-132 AGT TAC AAA TGC GTT TAC CCA T
	G1Rw-35 AGA ATA ATG CGA TAG TAC GTA T
G1.13	G1Fw-103 TCT CTC ACT CTT TAA ATG ACT T
	G1Rw+17 AAT TCT GGC TCT GAC ATT TC
G1.14	G1Fw ATA CGT ACT ATC GCA TTA TTC T
	G1RW AGG AGA CAA CTT CTT CGT AAG
G1.15	G1Fw GAA ATG TCA GAG CCA GAA TT
	G1Rw GCA AAA CCT TTC TGT ATT CTG
G1.16	G1Fw CTT ACG AAG AAG TTG TCT CCT

	G1Rw GTA TGA TTC TTT CTG GAA CAG
G1.17	G1Fw CAG AAT ACA GAA AGG TTT TGC
	G1Rw TTG AGC AAC TTC TTG TTC AC
G1.18	G1Fw CTG TTC CAG AAA GAA TCA TAC
	G1Rw CTT GGC GGA GTT ATA TTG CA

Tabla VII. Lista de los pares de oligonucleótidos utilizados para el NuSA de *GDH3*.

G3.0	G3Fw-689 TAC AAC TAA CAA GCA CCG GA
	G3Rw-584 TGC CAC AAG TAT GTT TAT AGA AG
G3.1	G3Fw-653 AGT GTA GAA GCT ATT ATT CTT GC
	G3Rw-541 CAG AGA CCC AAC AAA ACT TAA A
G3.2	G3Fw-606 CTT CTA TAA ACA TAC TTG TGG CA
	G3Rw-497 GCT CCG TTT TAT CAT ACT TTA CT
G3.3	G3Fw-562 TTT AAG TTT TGT TGG GTC TCT G
	G3Rw-472 ATG GGC GTT AAT TAC TTT GGC
G3.4	G3Fw-519 AGT AAA GTA TGA TAA AAC GGA GC
	G3Rw-408 TCT GTC AGC AGC CAT ATA TAT
G3.5	G3Fw-492 GCC AAA GTA ATT AAC GCC CAT
	G3Rw-397 AGT GCA GAA TAT CTG TCA GC
G3.6	G3Fw-428 ATA TAT ATG GCT GCT GAC AGA
	G3Rw-338 CAA TCA AGC AAA CTG AAC GG
G3.7	G3Fw-416 GCT GAC AGA TAT TCT GCA CT
	G3Rw-315 TTC CTT TCT TCA AAG AGC TGG
G3.8	G3Fw-357 CCG TTC AGT TTG CTT GAT TG
	G3Rw-259 TCG ATA AGA TAA GTA ATA TAC CCT
G3.9	G3Fw-335 CCA GCT CTT TGA AGA AAG GAA
	G3Rw-232 CTG TCC CTT TAA TAT CAA TAC TG
G3.10	G3Fw-282 AGG GTA TAT TAC TTA TCT TAT CGA
	G3Rw-175 CTC TTT TTA AGA AAG GCA TCA TG
G3.11	G3Fw-254 CAG TAT TGA TAT TAA AGG GAC AG
	G3Rw-142 ACT GTT TAT GTG AAA GTG AAA TA
G3.12	G3Fw-197 CAT GAT GCC TTT CTT AAA AAG AG
	G3Rw-111 AGT TCG AAC GGC TCA AAG TC
G3.13	G3Fw-164 TAT TTC ACT TTC ACA TAA ACA GT
	G3Rw-72 TGT GTG TGT GTG GCC TAT G
G3.14	G3Fw-130 GAC TTT GAG CCG TTC GAA CT
	G3Rw-29 GAC TGT TGC TAC TTC CCT ATA T
G3.15	G3Fw-90 CAT AGG CCA CAC ACA CAC A
	G3Rw+13 GTT CGC TTG TCA TTT TTT ACT T

G3.16	G3Fw-50 ATA TAG GGA AGT AGC AAC AGT C
	G3Rw+40 TCT CAT CGT AAG CCT GCT GA
G3.17	G3Fw-09 AAG TAA AAA ATG ACA AGC GAA C
	G3Rw+99 ACA CTT TTT TAT ACT GTG GGA
G3.18	G3Fw+21 TCA GCA GGC TTA CGA TGA GA
	G3Rw+120 CGG GAC AGA AAC AAT AGG TA
G3.19	G3Fw+79 TCC CAC AGT ATA AAA AAG TGT
	G3Rw+178 CCA CTT CTT GCT CGC CAT
G3.20	G3Fw+100 TAC CTA TTG TTT CTG TCC CG
	G3Rw+199 AAC TGC ACC CTG TAT CCT TG
G3.21	G3Fw+160 ATG GCG AGC AAG AAG TGG
	G3Rw+260 GAC AGG TTC ACT GAT GGG T

Esta técnica nos permitirá analizar con mayor detalle el promotor de nuestro interés y conocer la dinámica de la estructura de la cromatina que se lleva a cabo durante la represión o activación del gen en la condición en la cual se está analizando el promotor.

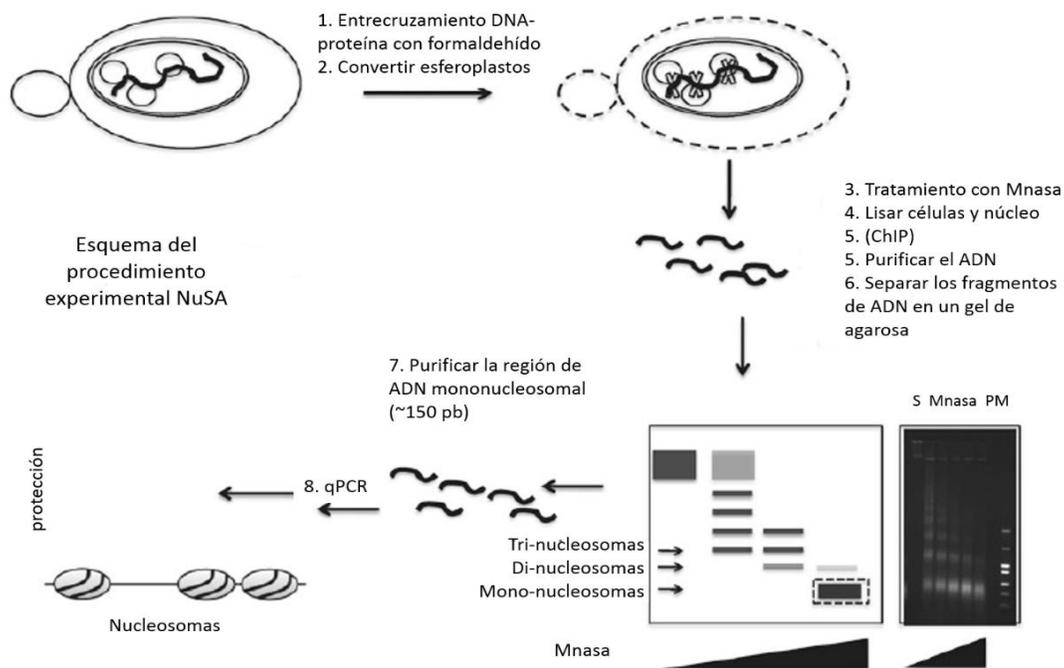


Figura 12. Esquema del procedimiento NuSA. En la figura se muestra un gel analítico de agarosa 2% hipotético para analizar el ADN digerido con MNasa. El gel muestra el peso molecular de los fragmentos generados a bajos niveles de digestión y la región de ADN mononucleosomal que está resaltada a mayores concentraciones de MNasa. Una reproducción de la digestión de la cromatina con MNasa (5, 10, 15, 20 y 40 unidades) se muestra en la fotografía de abajo, donde S es el ADN sin digerir y PM es el marcador de peso molecular. El enriquecimiento del ADN mononucleosomal en comparación al ADN no protegido es cuantificado por PCR tiempo real cuantitativo (qPCR). Tomado y modificado de Infante *et al.*, 2012.

Posteriormente se llevó a cabo el crecimiento celular de la cepa silvestre (*CLA1 ura3⁻ leu2⁻*) en el medio de cultivo de elección (glucosa-amonio; etanol-amonio), hasta llegar a una DO_{600nm} 0.3, al momento de obtener el cultivo se añadieron 3.1 ml de formaldehído 37% por cada 100 ml de cultivo, para obtener una concentración final del 1% y realizar el entrecruzamiento entre ADN y proteínas. Se incubaron las células por 20 min en agitación horizontal. Para detener la reacción y evitar interacciones inespecíficas se agregan 5.5 ml de glicina 2.5 M (preparada al momento) por cada 100 ml de cultivo, para tener una concentración final de 125 mM. Se incubaron las células por 5 min, sin agitación. Se colectaron las células por centrifugación a 800 x g por 2 min y se lavó dos veces el paquete celular con TBS 1X frío.

Después se procedió a la generación de esferoplastos, añadiendo 8ml del amortiguador Z (1M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM de β -mercaptoetanol, éste último se agrega antes de usar), una vez homogenizado el paquete celular, se agrega zimolasa (10 mg/ml). Se incubaron las células en agitación horizontal, a 300 rpm por aproximadamente 20 min a 30°C. Para coleccionar los esferoplastos se centrifugó a 3000 g, por 10 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante. Éste procedimiento puede ser optimizado para asegurar la posterior digestión del ADN.

Para realizar la digestión con MNasa (nucleasa micrococcal), se homogenizaron los esferoplastos en 1.5 ml de amortiguador NPS (0.5 mM espermidina, agregar fresca, 0.075% NP-40, 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM β -mercaptoetanol). Agregar el β -mercaptoetanol fresco. Se hicieron alícuotas de 600 μ l para cada digestión.

Se hicieron 3 digestiones por cada cepa y condición. Digerida con 50 U de MNasa disueltas en amortiguador MNasa (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 10 mM, 100 μ g/ml BSA), por 30 min a 37° C. Se necesita además una muestra de ADN genómico no digerido para la normalización en el q-PCR. Para parar la reacción de digestión se agregan 10 μ l de SDS 10% por cada 10 mg/ml de Proteinasa K. Se incubó a 65° C toda la noche.

Para extraer el ADN genómico que no fue digerido, es decir, aquél que estaba protegido por los nucleosomas, se hace dos veces, añadiendo un volumen igual (aproximadamente 685 μ l) de fenol pH 8.0 y se agita vigorosamente. Se hace una extracción con un volumen igual de cloroformo. Para precipitar se agregaron 20 μ l de NaCl 5M y 2.5 volúmenes de isopropanol, se incubó aproximadamente 30 min, a -20°C, centrifugar a 14000 g por 30 min a 4° C. El precipitado de ADN se dejó secar y se homogenizó en 40 μ l de TE 1:10. Se agregaron 2 μ l de RNasa A (10 mg/ml) e incubó a 37°C por 1 h.

Las muestras obtenidas se corrieron en un gel para ADN, con el respectivo marcador de peso molecular para poder observar el tamaño de las bandas correspondientes a

monosomas (aquella entre 100 y 200 pb) para poder aislar esa banda del gel y purificar el ADN utilizando un estuche de extracción por gel (Promega, Wizard SV Gel and PCR clean-up system), siguiendo el procedimiento recomendado por la compañía.

Para el análisis por q-PCR se hicieron diluciones 1:1000 del ADN digerido y para el no digerido se hicieron cuatro diluciones seriales. El análisis se realizó por duplicado para cada dilución de ADN no digerido, y nuestras muestras de interés, ADN digerido de la cepa silvestre en glucosa y etanol con todos los oligonucleótidos diseñados sobre el promotor tanto para *GDH1* como para *GDH3*. Se utilizó como control o curva estándar oligonucleótidos que amplifican al gen *VCX1*, el cual codifica para un transportador de Ca^{2+} altamente conservado en *S. cerevisiae*.

7. RESULTADOS:

7.1. Obtención de las mutantes de estudio

Para poder realizar el análisis de la expresión de *GDH3*, es necesario estudiar las mutantes de cada uno de los candidatos a represores tal como *Nrg2*, *Tup1*, *Sir2*, *Mig1* así como las dobles y triples mutantes pertinentes, comparando el resultado del análisis de la expresión con una cepa silvestre (*CLA1 ura3⁻ leu2⁻*) y los controles pertinentes para cada caso.

Se llevó a cabo la amplificación de los módulos con los cuales se generaron las mutantes por reemplazo mediante recombinación homóloga, cada uno de los productos se obtuvo mediante amplificación por PCR y se verificó que el peso molecular correspondiera al esperado.

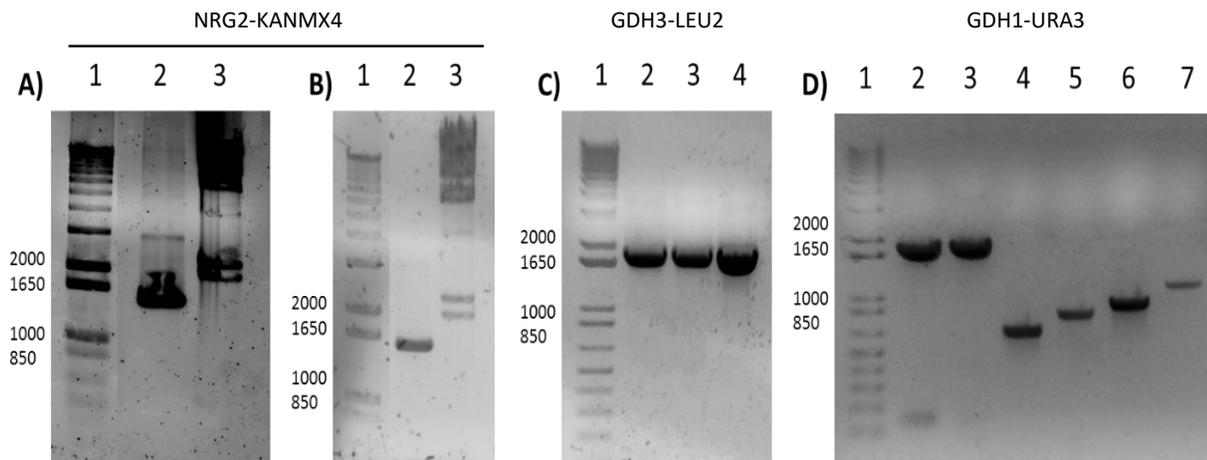


Figura 13. PCR de módulos de construcción de mutantes y sondas para Northern blot. **A)** Carril 1: Marcador 1 Kb plus, carril 2: Producto de PCR del módulo *NRG2-KANMX4* (1589 pb), carril 3: marcador λ /*Hind* III. **B)** Carril 1: Marcador 1 Kb plus, carril 2: módulo *NRG2-KANMX4* purificado, carril 3: marcador λ /*Hind* III. **C)** carril 1: Marcador 1 Kb plus, carril 2 y 3: Producto de PCR del módulo *GDH3-LEU2*, carril 4: módulo *GDH3-LEU2* purificado. **D)** Carril 1: Marcador 1 Kb plus, carril 2: Módulo *GDH1-URA3*, carril 3: Módulo *GDH3-URA3*, carril 4: Sonda *GDH1* (645 pb), carril 5: Sonda *GDH3* (788 pb), carril 6: Sonda *ACT1* (877 pb), carril 7: Sonda *NRG2* (1080 pb).

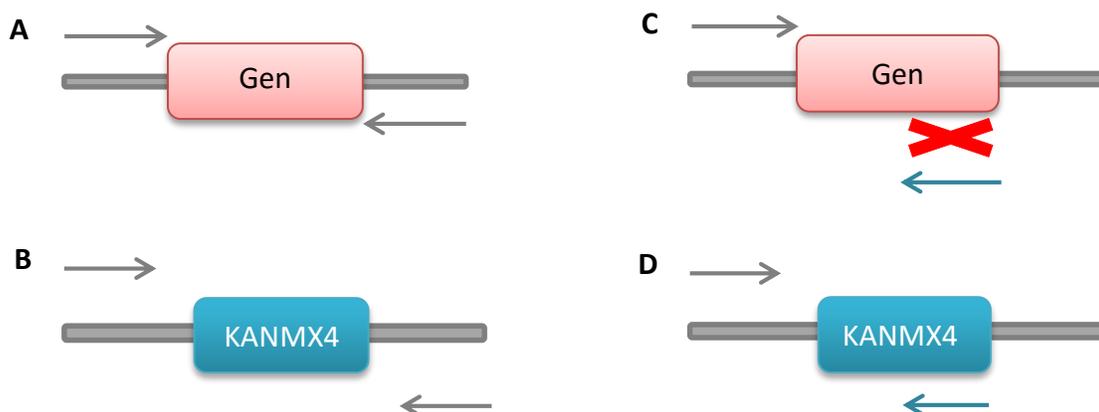
Finalmente durante el desarrollo del presente trabajo obtuvimos las cepas *nrg2Δ::KANMX4*, considerado un fuerte candidato como represor de *GDH3*, así como las mutantes *tup1Δ::KANMX4*, *sir2Δ::KANMX4*, que podrían estar colaborando en la remodelación de la estructura de la cromatina de nuestro gen de interés, y las triples mutantes *nrg1Δ::NATnrg2Δ::KANMX4gdh1Δ::URA3* y *nrg1Δ::NATnrg2Δ::KANMX4gdh3Δ::LEU2* para estudiar un poco más acerca del papel de estos reguladores. Además se confirmaron las siguientes cepas de la colección del laboratorio: *hda1Δ::KANMX4*, *nrg1Δ::KANMX4*, *nrg1Δ::NATnrg2Δ::KANMX4*.

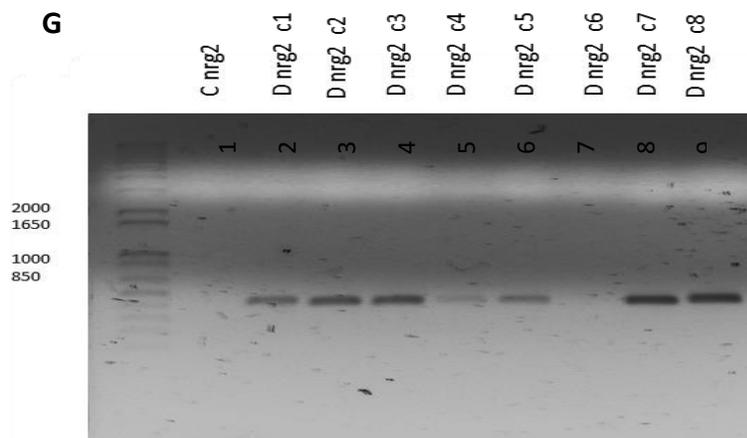
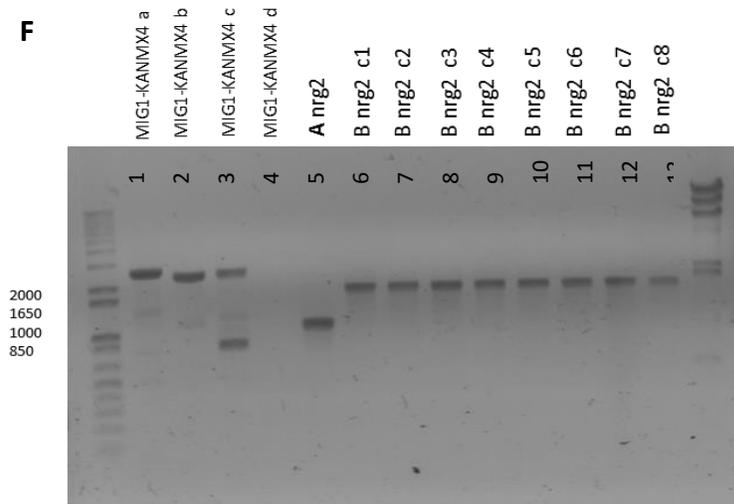
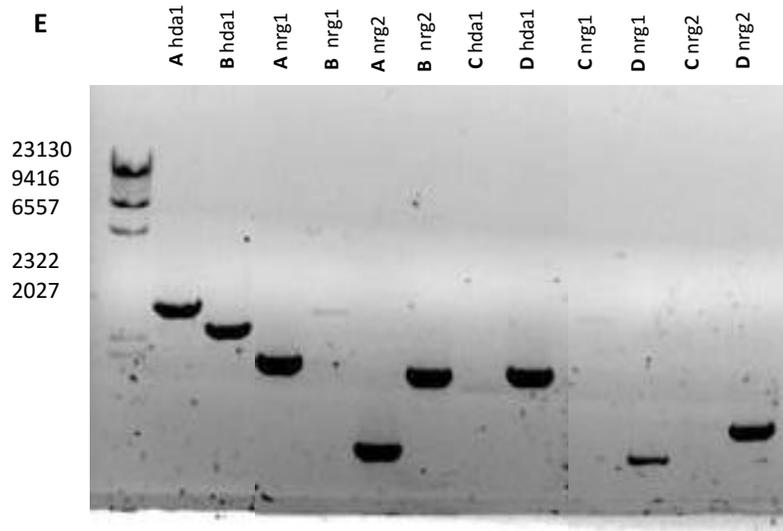
7.2. Comprobación de las mutantes obtenidas por PCR

Para llevar a cabo las comprobaciones por PCR de las mutantes obtenidas, primero se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas pertinentes.

Las cepas mutantes previamente obtenidas por el laboratorio también fueron verificadas mediante la técnica de PCR en las condiciones anteriormente mencionadas, se utilizaron dos combinaciones diferentes de oligonucleótidos, utilizando como templado ADN genómico proveniente de la cepa silvestre (control) y de las cepas mutantes a analizar.

Se utilizaron dos oligonucleótidos de confirmación sobre los UTR's, tanto en el ADN genómico de la cepa silvestre (Figura 14 A) como en el de la cepa mutante, donde se eliminó el gen de interés y se reemplazó con un marcador de selección como *KANMX4*, *NAT*, *URA3* o *LEU2* (Figura 14 B), esta combinación permite observar diferencias en el peso molecular de ambos productos de la síntesis, mayor, menor o igual según sea el caso. La otra combinación para la confirmación se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido sobre el UTR 5' del gen y el otro oligonucleótido que sólo alinee con el módulo de *KANMX4*, *NAT*, *URA3* o *LEU2* según corresponda, utilizando ADN genómico de la cepa silvestre (Figura 14 C) y ADN de la cepa mutante (Figura 14 D). Esta estrategia permite la amplificación en la cepa mutante, no así en la silvestre.





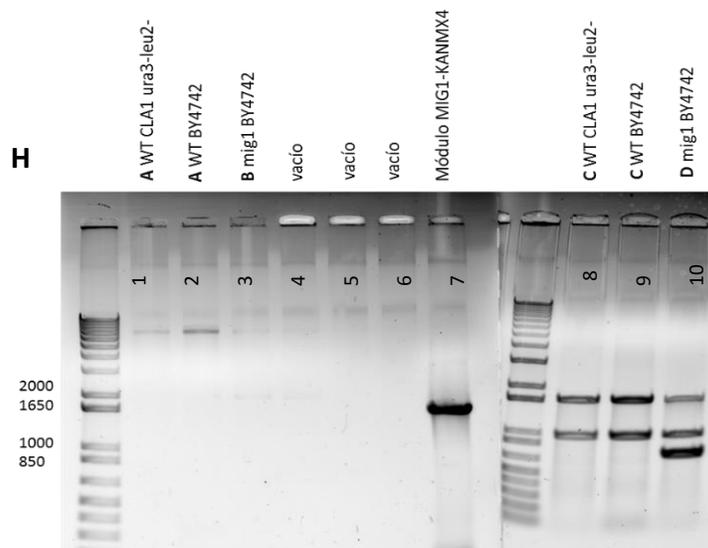


Figura 14. A-D: Esquema representativo de la estrategia utilizada para la confirmación de las cepas.

E-H: productos de la amplificación por PCR, donde las letras indican el esquema seguido para su verificación. En la figura E, se verificó la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* y la mutante sencilla *hda1Δ*, en el esquema F y G, se verificaron las 8 colonias elegidas de la mutante sencilla *nrg2Δ*. En la figura H se verificó la cepa *mig1Δ* de la colección BY4742.

Los tamaños esperados del producto de PCR son:

	A	B	C	D
<i>hda1Δ</i>	3005 pb	2390 pb	-	1764 pb
<i>nrg1Δ</i>	1924 pb	2596 pb	-	1075 pb
<i>nrg2Δ</i>	1080 pb	1786 pb	-	1264 pb
<i>mig1Δ</i>	2500 pb	2491 pb	-	574 pb

Las cepas de la colección del laboratorio fueron confirmadas, pues se obtuvo el resultado esperado en cuanto al tamaño estimado, con ambas estrategias (figura 14 E).

Se obtuvo la mutante sencilla *nrg2Δ*, donde se eligió la colonia 7 para los análisis posteriores (figura 14 F y G).

El módulo *MIG1-KANMX4* fue amplificado con diversas combinaciones de oligonucleótidos, debido a los problemas anteriores para amplificarlo se probó:

- Con los dos oligonucleótidos de confirmación
- Oligonucleótido forward de confirmación/oligonucleótido reverse para *KANMX4*
- Oligonucleótido forward para *KANMX4*/oligonucleótido reverse de confirmación
- Con los dos oligonucleótidos para *KANMX4*

Se observó que los oligonucleótidos diseñados para amplificar el módulo de *KANMX4* no funcionan en combinación, por lo tanto se utilizó la combinación B para obtener el módulo para la mutante *mig1Δ* (figura 14 F).

Como se puede observar en la figura 15, las comprobaciones por PCR de las cuatro colonias de las triples mutantes *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* no son del todo claras, puesto que en el esquema de comprobación C y D, donde se utiliza un oligonucleótido en el UTR 5' y otro oligonucleótido complementario al módulo con el cual se sustituye a *GDH3*, no se espera ninguna amplificación para la cepa silvestre; sin embargo en algunos casos está presente un producto de PCR inespecífico (carriles: 2, 5, 12, 15, 23, 27 y 29) .

	A	B	C	D
<i>nrg1Δ</i>	1924 pb	2596 pb	-	1075 pb
<i>nrg2Δ</i>	1080 pb	1786 pb	-	1264 pb
<i>gdh3Δ</i>	1700 pb	1723 pb	-	919 pb

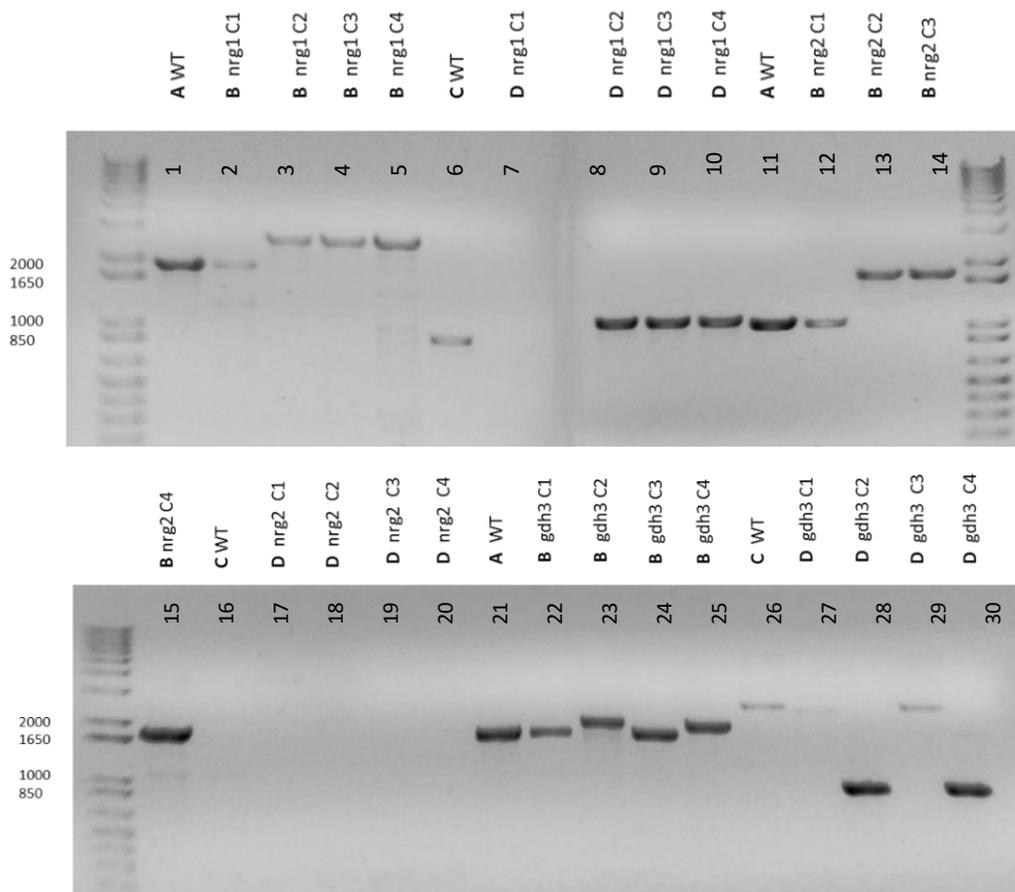


Figura 15. Productos de PCR de las verificaciones. Siguiendo el esquema de comprobación de la figura 11 A-D, se obtuvieron los productos de la amplificación por PCR, donde las letras indican el esquema seguido para su verificación. En donde se verificaron cuatro colonias (C1-C4) de triples mutantes *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ*, analizando cada mutación por separado, comparando con la cepa silvestre (WT).

Pese a lo anteriormente explicado, se consideró que las cepas 2 y 4 eran triples mutantes *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ::LEU2* puesto que se obtuvo el tamaño esperado, en al menos una de las formas de verificación, para cada mutación por separado (figura 15, carriles para C2: 3, 8, 13, 18, 23, 28 y carriles para C4: 5, 10, 15, 20, 25, 30).

De igual forma se realizaron pruebas de verificación para la cepa *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ::URA3* por PCR, de las 8 clonas probadas, sólo la clona 4 resultó positiva.

La mutante *mig1Δ* de la colección BY4742 se trató de comprobar por PCR, utilizando los mismos esquemas de comprobación (Figura 14 A-D); sin embargo en el método de comprobación A y B no tienen la amplificación del tamaño esperado (figura 14; carriles 1, 2 y 3), en el esquema C y D, donde en C no se espera amplificación, hay dos bandas producto de PCR que podemos denominar inespecíficas (figura 14; carriles 8 y 9), y en la comprobación bajo el esquema D, se espera un amplificado de aproximadamente 574 pb, el cual se observa claramente (figura 14; carril 10), además de las mismas dos bandas obtenidas en C, por lo cual se consideró que se corroboró la mutación de *MIG1* en la cepa de la colección BY4742.

Las cepas comprobadas por PCR se analizaron por Northern blot, obteniendo las células de cultivos líquidos de glucosa amonio, comparando con las cepas pertinentes como controles.

7.3. Análisis de la represión de *GDH3* en glucosa

En el primer experimento realizado se llevó a cabo un choque de privación de glucosa, se utilizó la cepa silvestre *CLA1 ura3⁻ leu2⁻* se creció en medio líquido glucosa amonio, hasta una DO_{600nm} 0.3, a partir de este momento se elimina la glucosa del medio, incubando las levaduras por 5 y 24 horas sin ninguna fuente de carbono.

Una vez hecha la extracción, se hizo un gel para ARN (figura 16 A) para observar la integridad de las muestras. A pesar de tener la muestra de 24 horas de poca calidad, se llevó a cabo la transferencia de la membrana y se hibridó con la sonda radioactiva de *GDH3*, es decir, nuestro gen de interés y *ACT1* por separado, ésta última para poder normalizar las muestras al momento de revelar y cuantificar.

El resultado muestra que la expresión de *GDH3* se ve reprimida en presencia de glucosa y se observa que cuando se hace el cambio de medio (privación de glucosa), incrementa su expresión conforme pasa el tiempo (Figura 16).

El cambio en el nivel de expresión obtenido por privación de glucosa como fuente de carbono no será tan fuerte como el aumento de expresión de *GDH3* observado anteriormente en cultivos provenientes de etanol (Avendaño *et al*; 2005). Sin embargo se considera que la expresión aumenta 6 veces sólo al estar 5 h sin glucosa, a las 24 h la expresión es 52 veces mayor. Cabe mencionar que este valor pudo haber sido sobre estimado puesto que como se puede observar en la figura 16, la calidad del ARN obtenido de las muestras con 24 h de privación de glucosa es mucho menor en comparación a las otras muestras.

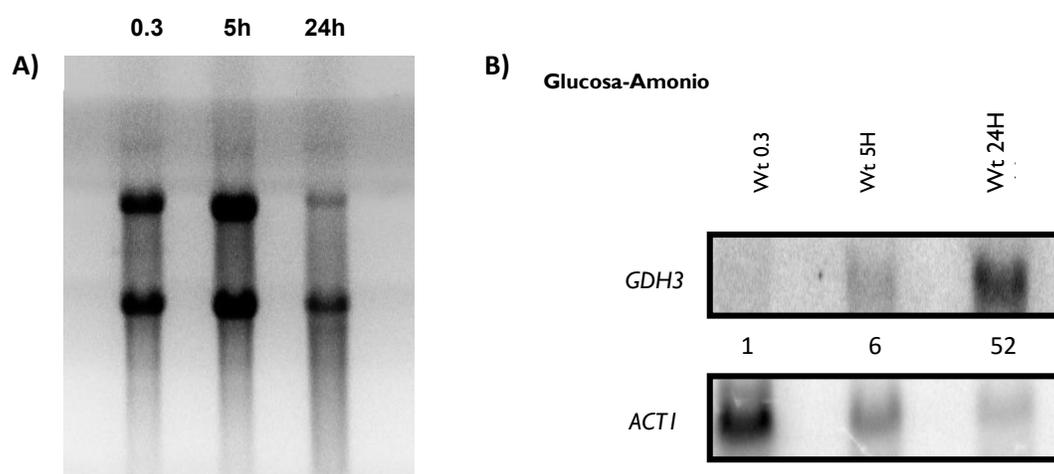


Figura 16. Expresión de la cepa silvestre con privación de glucosa. A) Gel de ARN de las muestras obtenidas de la cepa silvestre a una DO_{600nm} 0.3, y después de la privación de glucosa por 5 horas y 24 horas. B) Northern blot de las condiciones obtenidas de medio mínimo glucosa-amonio, de la cepa silvestre a una DO_{600nm} 0.3 y privación de glucosa de 5 y 24 horas. Los números calculados, se obtuvieron comparando respecto a lo observado en *ACT1*.

Como se mencionó anteriormente, *GDH3* forma parte de la vía metabólica del nitrógeno y su regulación transcripcional está controlada por la fuente de carbono, mientras que la regulación por efecto de la fuente de nitrógeno participa de forma secundaria (Avendaño *et al.*, 2005) por lo que propusimos analizar la expresión de *GDH3* en diferentes medios mínimos conteniendo diferente fuente de carbono, como glucosa o etanol o diferentes fuentes de nitrógeno como amonio y prolina.

7.3.1 Análisis de la participación de Nrg1/Nrg2 en la regulación de *GDH3*

Con el propósito de analizar si la expresión de *GDH3* depende de Nrg1 y Nrg2 se utilizó la mutante *nrg1Δnrg2Δ* y se analizó la expresión de *GDH3* en glucosa-prolina (fuente secundaria de nitrógeno) pues podrían estar involucrados algunos otros factores de transcripción (activadores) cuya localización dentro del núcleo depende de la calidad de la fuente de nitrógeno tal como sucede con Rtg3. En este experimento se utilizó como control positivo un gen regulado por Nrg1, como es el caso de *SUC2*, el cual también es reprimido por Mig1 y por la represión mediada por nucleosomas realizada por el complejo Ssn6/Tup1 (Zhou y Winston, 2001). Además en este experimento se realizó una privación de glucosa de 7 y 10 h.

Es importante utilizar la mutante *nrg1Δnrg2Δ* porque son genes parálogos cuya función como represores ha sido estudiada anteriormente en *S. cerevisiae*, creemos que al eliminar ambos genes el resultado del análisis de la expresión de *GDH3* será más contundente.

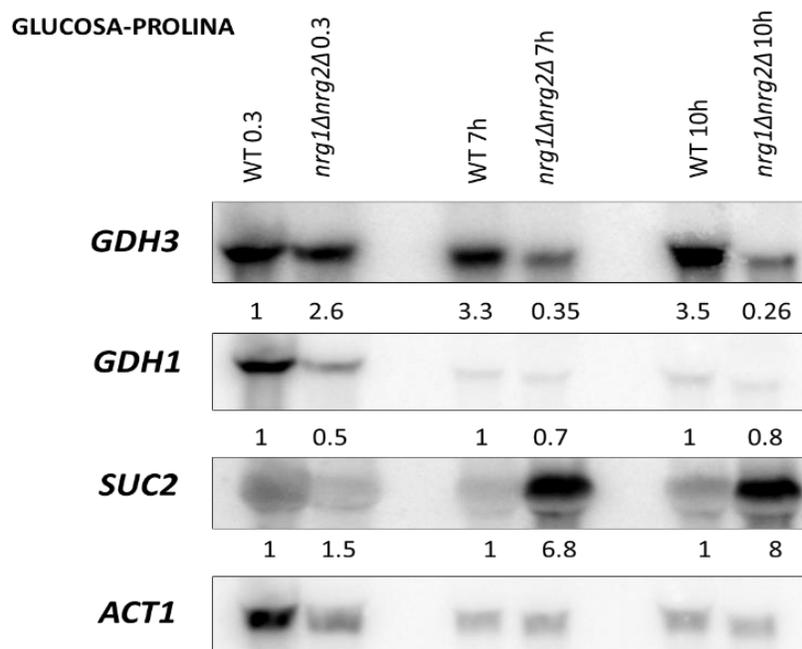


Figura 17. Northern blot de la doble mutante *nrg1Δ nrg2Δ* en Glucosa-Prolina. Se llevó a cabo en presencia y privación de glucosa, donde además se observa el comportamiento del gen control *SUC2*.

Como se puede observar en la figura 17, el comportamiento de la expresión de *GDH3* en la cepa silvestre es como se esperaba, va aumentando de 1 a 3 veces cuando ya no hay glucosa en el medio; sin embargo en la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* se observa un ligero aumento

de hasta 2.6 veces cuando hay glucosa en el medio. La normalización se llevó a cabo utilizando el software Image Quant 5.2, utilizando al gen de actina (*ACT1*) como referencia.

La expresión de *SUC2* en la doble mutante se observa que al eliminar su represor Nrg1, se expresa de 6 a 8 veces más con respecto a la cepa silvestre (figura 17), similar a lo reportado en la literatura.

Lo anterior nos podría sugerir que al trabajar con la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* y debido a los resultados obtenidos, no podremos definir si Nrg1 o Nrg2 funciona como activador o represor de la transcripción de *GDH3*. Para poder entender esto se debe realizar el mismo experimento con la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* y las mutantes sencillas *nrg1Δ* y *nrg2Δ*.

Para completar este estudio se decidió construir la mutante sencilla *nrg2Δ*, a fin de poder analizar por separado el efecto de Nrg1 y Nrg2. La condición elegida fue medio glucosa-amonio dado a que los análisis anteriormente descritos por Avendaño *et al.*, 2005 por medición de actividad de β-galactosidasa y por Northern blot demuestran que en ese medio de cultivo se puede observar una clara expresión/represión de *GDH3*.

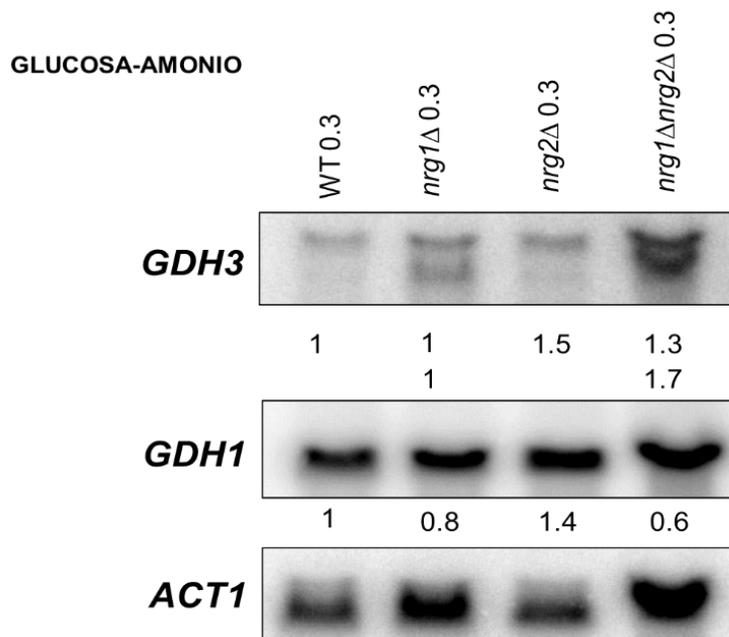


Figura 18. Northern blot de las mutantes sencillas y la doble mutante *nrg1Δ nrg2Δ*. Medio mínimo glucosa amonio, a una DO_{600nm} de 0.3.

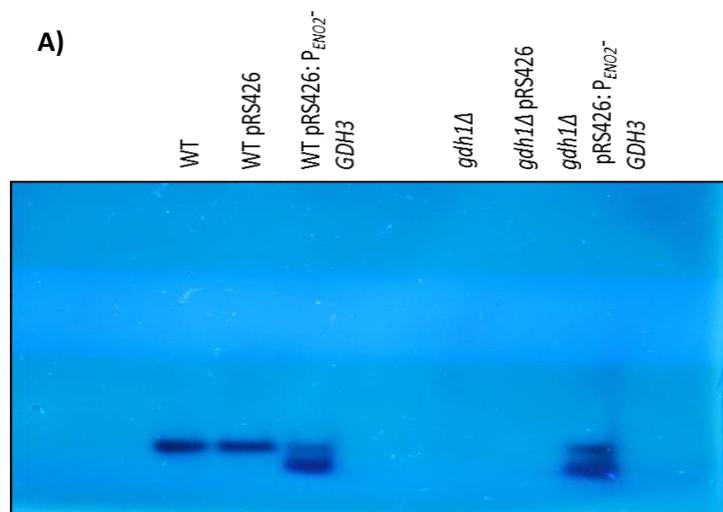
En la figura 18 se puede observar que en las mutantes *nrg1Δ* y *nrg1Δ nrg2Δ* existe un aumento en la expresión, pero también se observa una banda de menor peso molecular,

que no se observa en la cepa silvestre, por lo que si se cuantifica la aparición de ésta banda con respecto a la silvestre, aumenta su expresión 1 y 1.7 veces. La expresión de GDH1 no se ve regulada de gran manera por Nrg1/Nrg2, puesto que se puede considerar que es casi igual a la cepa silvestre. Este experimento se llevó a cabo con réplica biológica y los resultados fueron similares.

7.3.2. Estudio de triples mutantes para comprobar la participación de los TF's en la regulación de *GDH3*

Respecto al resultado obtenido para Nrg1 y Nrg2, para corroborar que las dos bandas observadas son transcritos de *GDH3*, fue necesario construir la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* y observar que ambas bandas desaparecieran, de ser así el análisis de un inicio alternativo de la transcripción será crucial para determinar la veracidad de este resultado, además de que se reportaría por primera vez que *GDH3* da lugar a dos transcritos, que podrían dar lugar a dos proteínas de Gdh3 con diferente peso molecular y tal vez diferentes características bioquímicas. También se decidió construir la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* para además medir la actividad enzimática y corroborar si aumenta la actividad de Gdh3 al no estar presentes los posibles represores.

Además para poder cuantificar la actividad específica de GDH3 se decidió sobre-expresar bajo el promotor de *ENO2* a la secuencia codificante de *GDH3*, en un plásmido multicopia pRS426 (pRS426::p*ENO2*-*GDH3*) en la cepa silvestre y en la cepa *gdh1Δ*, muestra la presencia de una doble banda de actividad de Gdh3 cuando se sobre-expresa *GDH3* tanto en el fondo genético de la cepa silvestre como en el de la mutante *gdh1Δ* (figura 19).



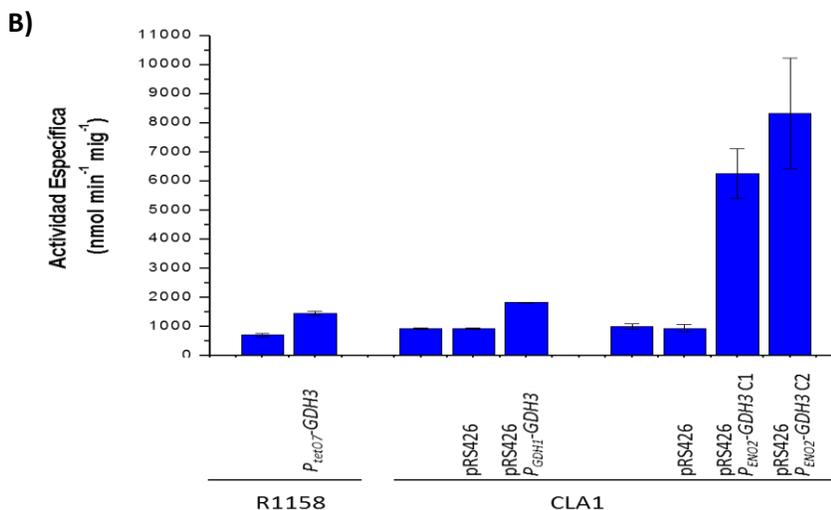
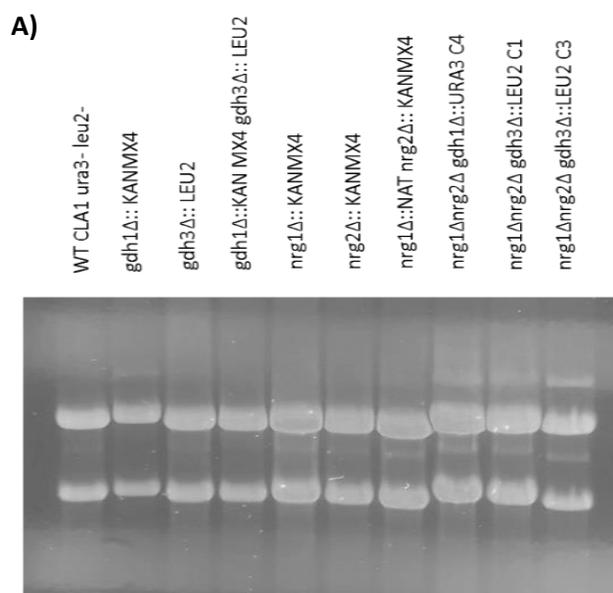


Figura 19. Zimograma y gráfica de actividad en cepas que sobre-expresan Gdh3. A) Zimograma de actividad de Gdh, donde se observan la cepa silvestre sin plásmido, con plásmido vacío y con la construcción que sobre-expresa *GDH3*. Lo mismo se observó para una cepa *gdh1Δ*. **B)** Gráfica de comparación de la actividad específica de Gdh3 al cambiar el promotor autóctono por *TET07*, *GDH1* o *ENO2*.

En un principio se pensaba que la doble banda correspondía, una para Gdh1 y otra para Gdh3 (figura 19 A), la cual era visible sólo cuando se sobre-expresaba y aumentaba 7 u 8 veces su actividad específica (figura 19 B). Sin embargo el experimento realizado en la cepa *gdh1Δ* corrobora que las dos bandas visibles, son dos isoformas de Gdh3. Sería importante comprobar si las dos bandas observables en el Northern blot de la cepa *nrg1Δnrg2Δ* dan lugar de igual forma a dos isoformas de Gdh3.

Se analizaron por Northern blot las cepas obtenidas *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* y *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* para posteriormente medir la actividad de Gdh3. Se realizaron los cultivos simultáneos para extracción de ARN y de proteína total (figura 20 y figura 26).



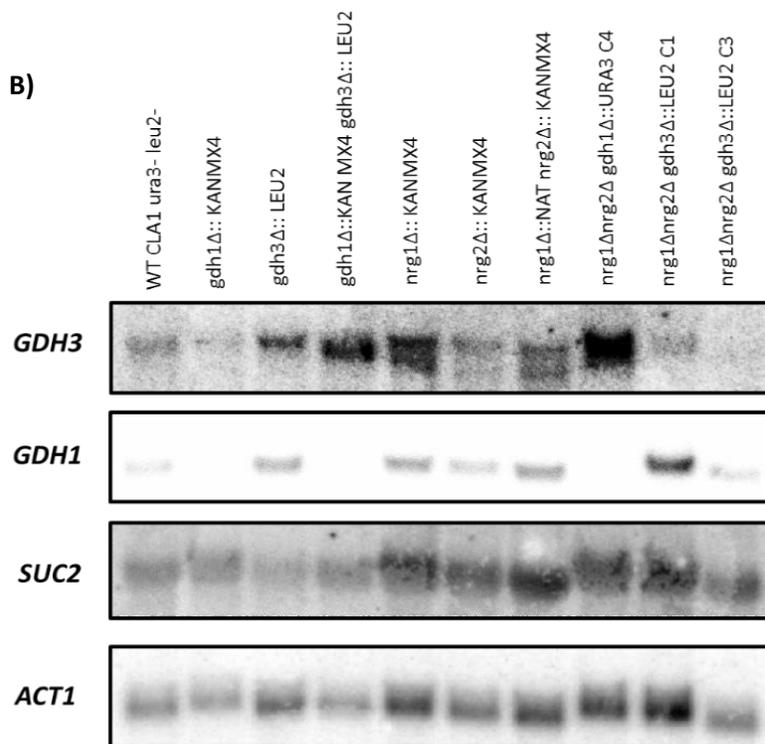


Figura 20. Análisis de expresión en la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* **A)** Extracción de ARN de la cepa silvestre, *gdh1Δ*, *gdh3Δ*, la doble mutante *gdh1Δgdh3Δ*, las cepas *nrg1Δ*, *nrg2Δ*, doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* y la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* y dos colonias de la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* en glucosa amonio a una DO_{600nm} de 0.3. **B)** Northern blot de las cepas anteriormente descritas.

Como se puede observar en la figura 20, se pudieron construir las triples mutantes: *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* C4 y la *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* C3, pues no hay hibridación en *GDH1* ni a *GDH3* respectivamente. Esto sumado a la comprobación por PCR nos permite definir que se obtuvieron las triples mutantes de forma exitosa. Los análisis de Northern blot nos permiten corroborar que las dos bandas que se observaron en la mutante *nrg1Δnrg2Δ*, representan dos isoformas diferentes de *GDH3*, pues al hacer la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* desaparecen ambas bandas.

Además pudimos observar que en la mutante sencilla *gdh3Δ* y en la doble mutante *gdh1Δgdh3Δ* obtenidas previamente en nuestro laboratorio, vemos que aún existe hibridación con el gen *GDH3*, esto se puede deber a que la construcción de estas mutantes se hizo por interrupción del gen con una inserción y no por eliminación del gen completo (Avenidaño *et al.*, 1997). Cabe mencionar que se volvió a obtener el resultado de la doble banda de hibridación para *GDH3* en la mutante *nrg1Δnrg2Δ*, lo cual nos permite confiar en los resultados obtenidos anteriormente. Las sondas para *GDH1* y *GDH3* abarcan aproximadamente el 75% de la región intermedia del ORF de cada gen.

7.3.3. Análisis de la participación de remodeladores de la cromatina en la regulación de *GDH3*

Se procedió a analizar el efecto en la expresión de *GDH3* utilizando las mutantes *hda1Δ*, *tup1Δ* y *sir2Δ*, comparando con la cepa silvestre (figura 21). Está reportado en la literatura que Hda1, Tup1 y Sir2 son factores de transcripción involucrados en la regulación de genes mediante la modificación de la estructura de la cromatina, tanto de forma individual como formando parte de un complejo con algunos otros represores.

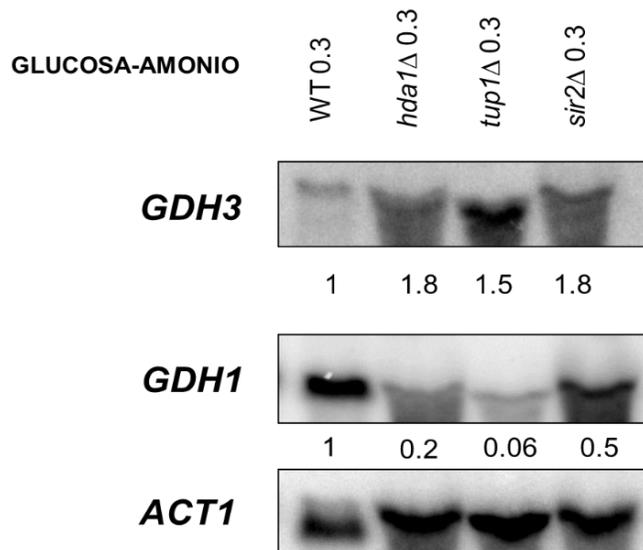


Figura 21. Northern blot de las mutantes *hda1Δ*, *tup1Δ* y *sir2Δ* en glucosa-amonio. Las muestras se obtuvieron a una DO_{600nm} de 0.3 en medio mínimo gluosa-amonio.

En la figura 21 se observa que *GDH3* pudiera estar regulado levemente por los tres remodeladores de la cromatina, sin embargo la figura no es lo suficientemente clara como para concluir que participan o no.

Para poder estudiar mejor los efectos de los diferentes reguladores en la expresión de *GDH3* se decidió que era necesario construir mutantes en todos los reguladores de interés a un fondo genético *gdh1Δ*, con el fin de cuantificar la actividad enzimática de NADP-GDH, de tal manera que un aumento en la expresión de *GDH3* se vea reflejado en la actividad enzimática.

7.3.4. Mig1 y su participación en la regulación de *GDH3*

Con la finalidad de corroborar si Mig1 es un represor para *GDH3* se intentó construir la mutante *mig1Δ* por diferentes estrategias; sin embargo las comprobaciones de la mutante no eran del todo claras, por lo cual se decidió hacer un análisis por Northern blot con las colonias obtenidas en el fondo genético *CLA1 ura3⁻ leu2⁻* y la mutante de la colección BY4742, en dos condiciones fisiológicas, glucosa amonio y etanol amonio (Figura 22).

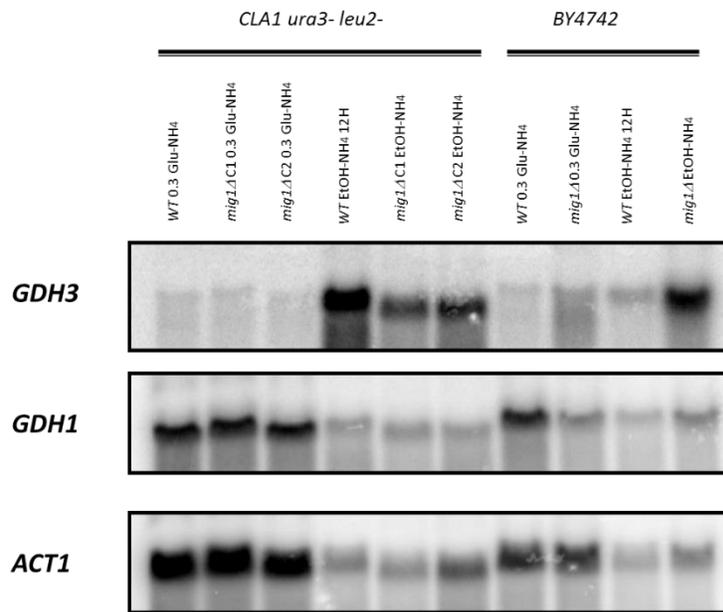


Figura 22. Northern blot de las mutantes *mig1Δ*. Medio mínimo glucosa-amonio y etanol amonio, a una DO_{600nm}

Como se puede observar en la figura 22, en el caso de las cepas con el fondo genético *CLA1 ura3⁻ leu2⁻* se analizaron la cepa silvestre y dos colonias *mig1Δ*, y para el fondo de la BY4742 sólo la cepa silvestre y la mutante *mig1Δ*. La condición fisiológica donde se espera observar el papel del represor, es en glucosa amonio, puesto que al quitar al represor, *GDH3* se debe expresar aún en esta condición. Es muy evidente que en el caso de las cepas obtenidas en el fondo *CLA1 ura3⁻ leu2⁻*, no es un regulador negativo para *GDH3*, puesto que se mantiene la expresión igual a la cepa silvestre (figura 22). En el caso de la *mig1Δ* de la cepa BY4742, en glucosa amonio, se observa un ligero aumento en la expresión.

Este experimento se llevó a cabo para determinar si Mig1 es un regulador negativo para *GDH3*, y a pesar de que las mutantes obtenidas no fueron comprobadas por completo, los datos obtenidos nos permiten pensar que Mig1 no es un represor para *GDH3*. Sin embargo,

cabe mencionar que se debería considerar construir una mutante que sea comprobada completamente para tener un resultado más concluyente.

7.3.5. El papel de Rtg3 en la regulación de *GDH3*

La respuesta retrógrada (RTG) es una vía de señalización intracelular descrita en *S. cerevisiae* por Parikh *et al.*, (1987). Esta vía comunica al núcleo que la mitocondria es disfuncional, debido a una interrupción en la cadena de transporte de electrones (Butow and Avadhani, 2004).

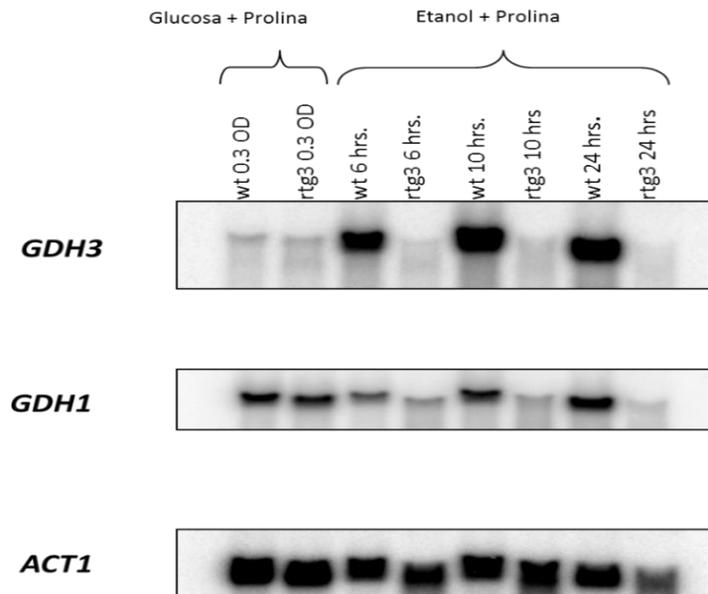


Figura 23. Northern blot de la mutante *rtg3Δ* en glucosa prolina. DO_{600nm} de 0.3 y después del choque de 6, 10 y 24 horas en etanol prolina.

Rtg1 y Rtg3 son factores transcripcionales tipo bHLH (basic helix loop helix) de la respuesta mitocondrial retrógrada en *S. cerevisiae*.

El experimento se realizó creciendo las células en glucosa prolina y después se hizo un choque de 6, 10 y 24 h en etanol prolina. El resultado obtenido del Northern blot sugiere que Rtg3 funciona como un activador importante para *GDH3* y en menor manera para *GDH1* (figura 23).

7.4. Actividades específicas de NADP-GDH en cultivos con y sin glucosa

La medición de las actividades detectadas por ensayo de actividad NADP-GDH en la cepa silvestre y *gdh1Δ* en medio mínimo glucosa-amonio, muestra que existe una correlación entre los cambios en RNA mensajero (ver figura 16) y la proteína. En la figura 24 se observa que en presencia de glucosa a una DO_{600nm} 0.3 la actividad de Gdh3 es de apenas un 3% en la cepa *gdh1Δ* cuando se compara con la silvestre, y después de hacer un cambio de medio sin ninguna fuente de carbono, es decir, a las 24 horas de privación de glucosa se observa un incremento de actividad GDH3 de hasta un 27% en la cepa *gdh1Δ* con respecto a la cepa silvestre (Figura 24).

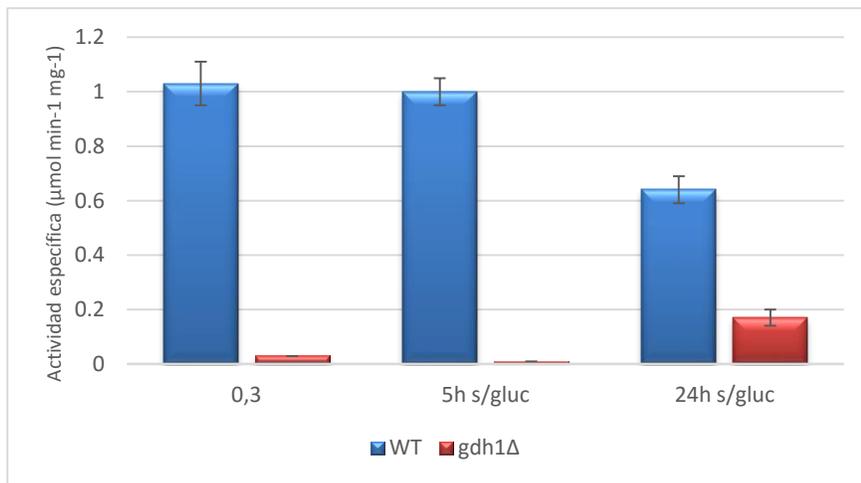


Figura 24. Ensayo de actividad en medio mínimo glucosa-amonio. Se observa que en presencia de glucosa (0.3), casi no existe actividad Gdh3, mientras que a las 24 horas sin glucosa aumenta su actividad, al igual que el transcrito.

La disminución de la actividad total de GDH en la cepa silvestre después de 24 horas de privación de glucosa se debe a que como se ha reportado por Mazón *et al.*, en 1979, la NADP-Gdh1 es degradada durante la privación de glucosa. Por lo tanto la relación Gdh1/Gdh3 disminuye y la mayor parte de la actividad que se presenta se debe a Gdh3 (DeLuna *et al.*, 2001).

7.4.1. Cuantificación de la actividad de Gdh3 en las cepas *sir2Δ* y *hda1Δ*

Se llevó a cabo el análisis de actividad enzimática en las dos clonas mutantes *sir2Δgdh1Δ* y tres clonas de *hda1Δgdh1Δ* para determinar la actividad sólo de Gdh3. Se cultivaron en medio glucosa-amonio a una DO_{600nm} de 0.3 y se comparó con la cepa silvestre, la *gdh1Δ*, *gdh3Δ* y la doble mutante *gdh1Δgdh3Δ* para observar el cambio de la actividad específica de NADP-GDH (Figura 25).

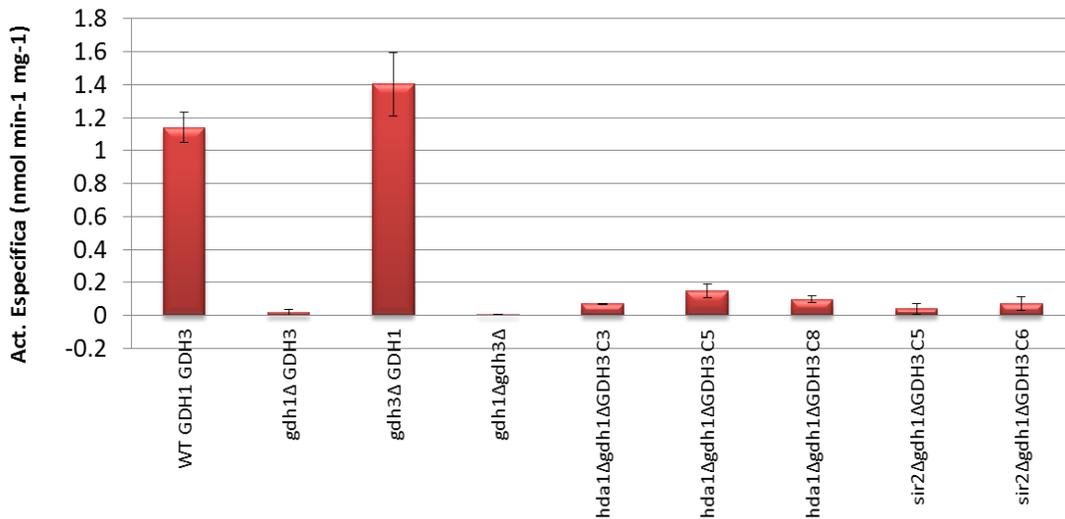


Figura 25. Ensayo de actividad NADP-GDH de dobles mutantes. Medio mínimo glucosa-amonio, DO_{600nm} 0.3, para la cepa silvestre, y diversas mutantes.

Como ya se había descrito anteriormente, la actividad específica de la cepa silvestre en presencia de glucosa, se debe principalmente a Gdh1, por lo cual al cuantificar la actividad de una cepa *gdh1Δ*, es decir, que sólo tiene *GDH3*, no se detecta actividad alguna pues en glucosa está reprimida su expresión. Por el contrario en una cepa *gdh3Δ* la actividad específica es como la de la cepa silvestre y en la doble mutante no se espera actividad alguna.

Las clonas fueron nombradas con la letra C (clona) y un número aleatorio. El análisis de actividad específica de NADP-GDH en la cepa *hda1Δ gdh1Δ* C5 muestra una mayor actividad. Este dato podría ser indicativo de que la desacetilasa de histonas Hda1 esté involucrada con la expresión de *GDH3*. Sin embargo es preciso hacer más estudios para poder concluir si participa como represor de *GDH3* puesto que en los estudios de Northern

blot tampoco fueron muy claros. El experimento fue realizado una sola vez y no se llevó a cabo ningún tipo de análisis estadístico para verificar si existe un cambio significativo.

El resto de las clonas analizadas, tanto para Hda1 y Sir2, pareciera no tener un efecto significativo en el aumento de la actividad, por lo que podría decirse que no participan en la represión de *GDH3*, a menos que sea de forma individual, ya que el cambio observado es muy pequeño.

7.4.2. Actividad específica de NAPD-GDH en triples mutantes

Finalmente una vez que obtuvimos todas las cepas necesarias para corroborar si Nrg1/Nrg2 participan en la represión de *GDH3*, se realizó la cuantificación de la actividad específica de las cepas pertinentes. Estos estudios se realizaron tanto en medio con glucosa como en etanol, puesto que el aumento de la actividad de Gdh3 es más notorio en la condición donde se expresa mayormente, que es etanol.

Como se puede observar en la figura 26 A, las muestras obtenidas en glucosa, la actividad de la cepa silvestre es alta y se debe principalmente a Gdh1, como anteriormente se ha descrito. En el caso de la cepa *gdh1Δ* la actividad se debe a Gdh3, la cual es muy baja pues en glucosa prácticamente no se expresa este gen (DeLuna *et al.*, 2001).

La cepa *gdh3Δ* presenta una actividad similar a la de una cepa silvestre, pues como sabemos, en glucosa Gdh1 es responsable de prácticamente toda la actividad. En la doble mutante *gdh1Δgdh3Δ* (control negativo) no debería detectarse actividad, sin embargo es registrada una actividad muy baja, ligeramente mayor que la cepa *gdh1Δ*. Esto se puede deber a la presencia de un gen alternativo, como se observó en el Northern blot de la figura 21 B, la cepa aún tiene el gen de *GDH3*, al igual que la cepa que creíamos era *gdh3Δ* es muy probable que aún tenga el gen de *GDH3*, pues fueron construidas de la misma manera.

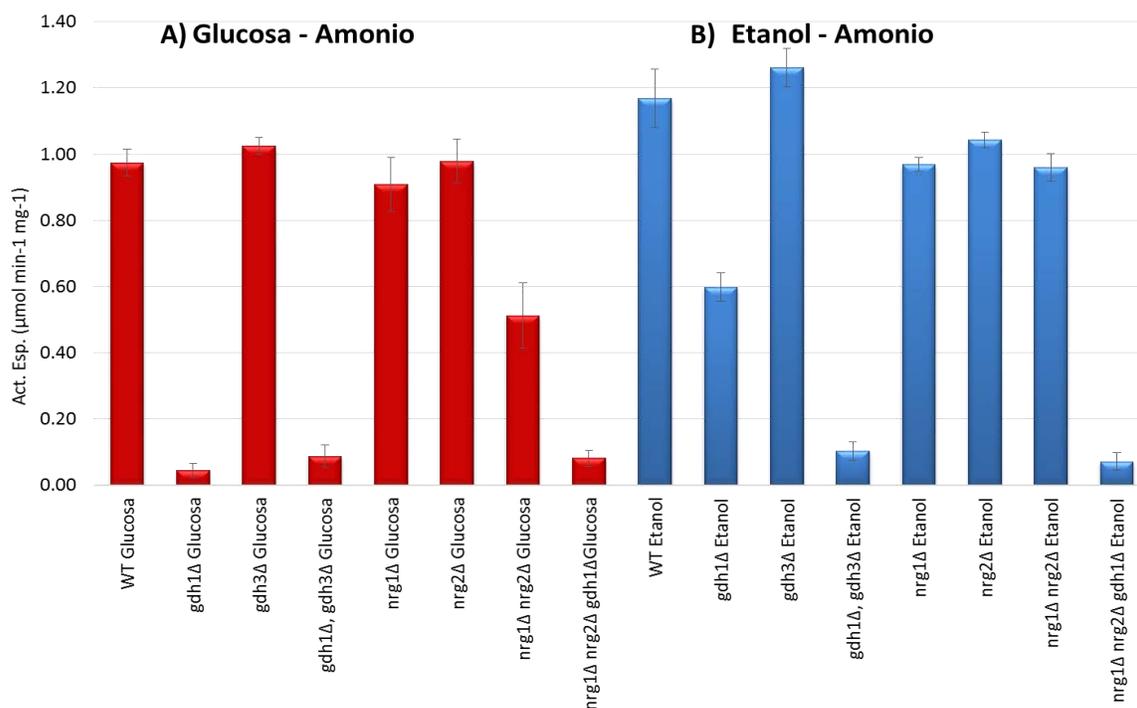


Figura 26. Cuantificación de la actividad de Gdh3 para la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* con sus respectivos controles. Gráfica con la actividad específica de cada cepa en glucosa-amonio y etanol-amonio, DO_{600nm} 0.3.

En las cepas *nrg1Δ*, *nrg2Δ*, la actividad observada es muy similar a la de la cepa silvestre, pero la disminución en la actividad es notoria cuando observamos a la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ*, que disminuye casi a la mitad (figura 26 A). Este dato concuerda con el análisis de la expresión de *GDH3* observada en la figura 17, donde dicha expresión aumenta en la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* en comparación con la cepa silvestre.

En la triple mutante se esperaba observar una actividad mayor de Gdh3, al no tener a los posibles represores de *GDH3* y además no tener a la enzima Gdh1 que interviene en el mayor porcentaje de actividad específica. Sin embargo en la figura 26 muestra que esto no fue así, incluso en condiciones de activación de *GDH3* como es el etanol, donde únicamente se observa que la cantidad de Gdh3 aumenta al no encontrarse Gdh1 en la cepa *gdh1Δ*, pero en las demás cepas se observa un comportamiento similar al que se encontró en glucosa (figura 26).

La figura 26 B nos permite concluir que Nrg1/Nrg2 no participan como represores para *GDH3*.

7.5. La actividad enzimática de Gdh1 se puede detectar en gel

Otra forma para determinar si las mutantes analizadas permiten la expresión de *GDH3*, es mediante un gel nativo donde se esperaría observar la actividad de la proteína en el gel, y se podría determinar la banda específica perteneciente a Gdh1 y la de Gdh3. Para realizar estos experimentos se utilizó la misma técnica que observamos en la figura 19, al sobre-expresar a Gdh3 con el promotor de *ENO2*.

Las cepas silvestre (*CLA1 ura3⁻ leu2⁻*), *gdh1Δ*, *gdh3Δ*, *gdh1Δgdh3Δ*, se cultivaron en medio glucosa-amonio a diversas DO_{600nm} como 0.3, 0.6, 0.9 así como 24 horas de cultivo continuo, para poder observar si Gdh3 aparece en alguna de esas condiciones. Además se utilizaron cultivos de la cepa silvestre crecidas en etanol-amonio, como control positivo, pues se sabe que en esta condición Gdh3 está presente (figura 27).

Se llevó a cabo el extracto total de proteínas de cada una de las muestras y se cargaron 50 μ g de proteína en cada caso.

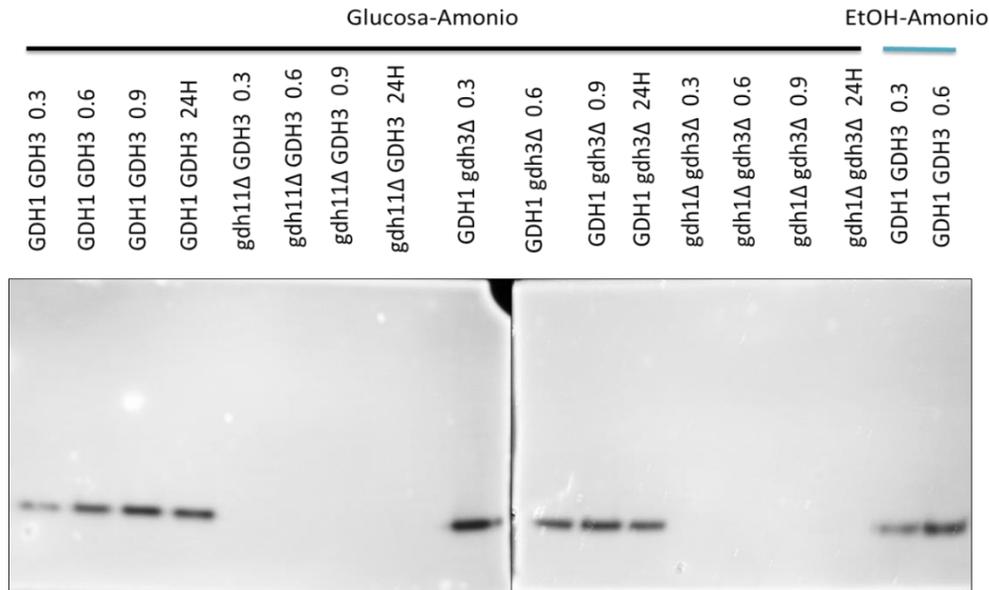


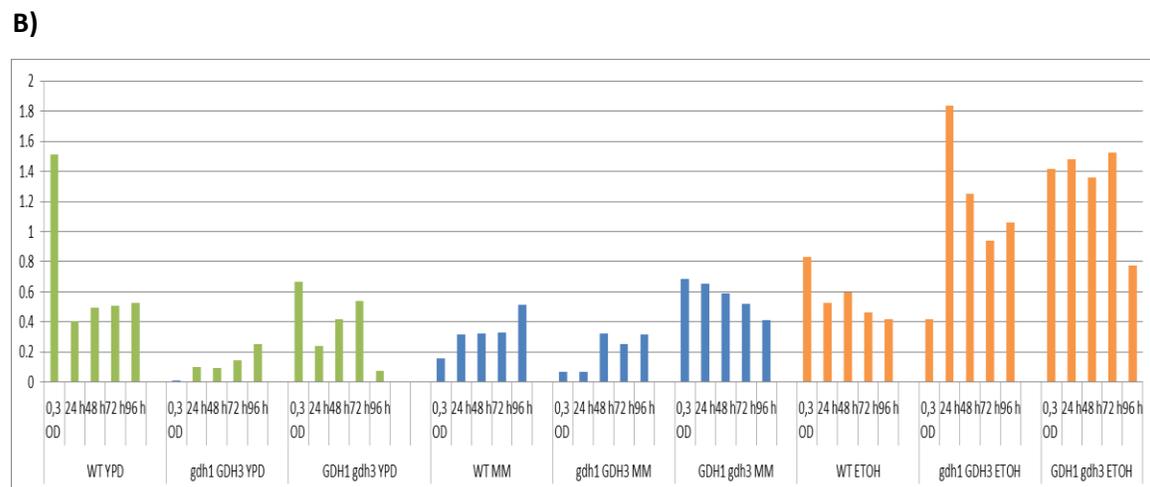
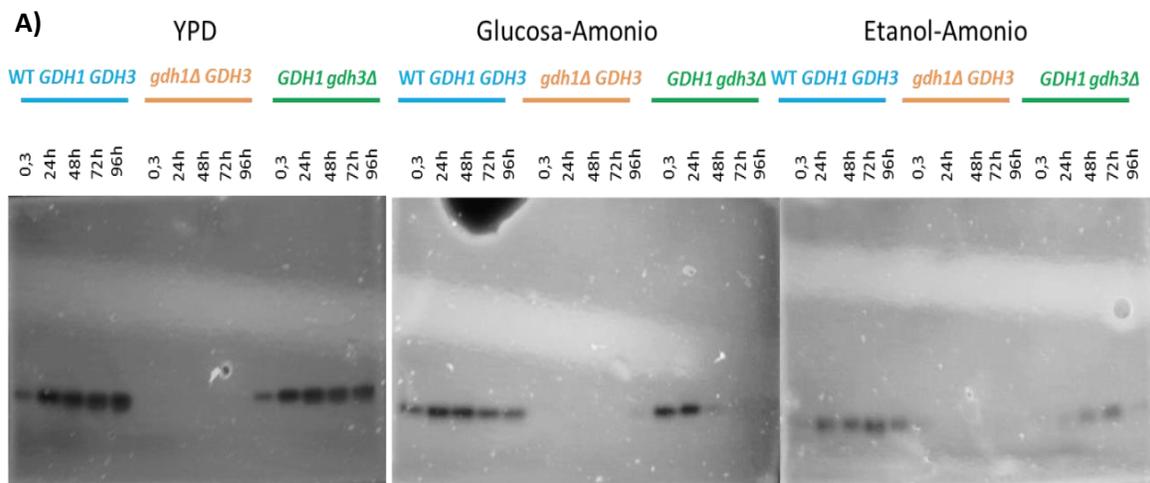
Figura 27. Zimograma para GDHs. Se obtuvieron las células de las cepas: silvestre, *gdh1Δ*, *gdh3Δ*, y la doble mutante a distintas densidades ópticas para poder observar la aparición de la banda correspondiente de Gdh3.

Sin embargo no se pudo observar ningún cambio en el patrón de bandas de actividad, pues a pesar de tener una condición óptima para que se exprese *GDH3* (24 h de cultivo, donde ya no hay glucosa disponible y en etanol, donde se expresa mayormente este gen), se propuso entonces hacer otro análisis por zimograma donde se creció la cepa silvestre, la

gdh1Δ y la *gdh3Δ*, en cultivos continuos de hasta 96 horas en medio YPD, glucosa-amonio y etanol-amonio (figura 28 A). El resultado fue el mismo, no se observó la banda de Gdh3.

El resultado sugiere que el método no es lo suficientemente sensible para detectar a Gdh3 en forma de una banda definida en el zimograma, tal vez por la baja concentración de proteína presente en el extracto. Se decidió medir actividad en celda con ayuda de un espectrofotómetro, para determinar si hay proteína Gdh3 activa aunque no la podamos observar en el gel.

Las gráficas obtenidas muestran que sí hay actividad de Gdh3 en las cepas y condiciones donde se esperaba que la hubiera (figura 28 B y C) pero no es lo suficientemente fuerte para poder ser detectada en el gel. Este ensayo es una medición sin réplicas debido a que es un experimento muy largo e implicó el manejo de muchas muestras de volúmenes grandes, al mismo tiempo. Se puede considerar realizar una réplica biológica posteriormente para poder determinar al menos una desviación estándar que nos pueda dar más información.



c)

Cepa	Tiempo	Act. Específica (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Cepa	Tiempo	Act. Específica (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Cepa	Tiempo	Act. Específica (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
WT YPD	0,3 OD	1.509	WT MM	0,3 OD	0.156	WT ETOH	0,3 OD	0.830
	24 h	0.402		24 h	0.315		24 h	0.526
	48 h	0.494		48 h	0.320		48 h	0.595
	72 h	0.505		72 h	0.331		72 h	0.463
	96 h	0.525		96 h	0.514		96 h	0.417
gdh1Δ GDH3 YPD	0,3 OD	0.012	gdh1Δ GDH3 MM	0,3 OD	0.067	gdh1Δ GDH3 ETOH	0,3 OD	0.417
	24 h	0.098		24 h	0.068		24 h	1.834
	48 h	0.093		48 h	0.319		48 h	1.249
	72 h	0.141		72 h	0.255		72 h	0.937
	96 h	0.250		96 h	0.316		96 h	1.061
GDH1 gdh3Δ YPD	0,3 OD	0.666	GDH1 gdh3Δ MM	0,3 OD	0.685	GDH1 gdh3Δ ETOH	0,3 OD	1.417
	24 h	0.240		24 h	0.652		24 h	1.478
	48 h	0.418		48 h	0.589		48 h	1.357
	72 h	0.536		72 h	0.522		72 h	1.522
	96 h	0.074		96 h	0.410		96 h	0.775

Figura 28. Zimograma y Actividad específica en diferentes medios de cultivo. A) Zimograma de las cepas: silvestre, gdh1Δ, gdh3Δ en cultivos continuos de YPD, Glucosa-amonio y Etanol-amonio. B) Análisis de actividad por celda en las muestras utilizadas para zimograma. Se demuestra que existe actividad de Gdh3, pero que la técnica no es tan sensible como la medición de actividad por celda. C) Tabla de valores de las actividades específicas de la gráfica.

Gdh3 tiene una menor participación en la actividad enzimática sobre todo en presencia de glucosa. Podemos concluir que en condiciones como etanol, donde Gdh3 tiene mayor actividad, no es suficiente la cantidad de proteína como para observarla en el zimograma, aunque su actividad sí es detectada al medirla en celda. Esta técnica no es tan sensible como para observar a Gdh3 a menos que se sobre-exprese aproximadamente 7 veces más, tal como se hizo en la figura 19 donde se tiene al gen *GDH3* bajo el promotor de *ENO2*, que es considerado un promotor fuerte.

7.6. Análisis de la dinámica de la estructura de la cromatina en el promotor de *GDH1* y *GDH3*

El análisis del posicionamiento de los nucleosomas en el promotor por el método de NuSA, es una herramienta poderosa que nos permitirá determinar la estructura de la cromatina en la condición represora y la que permite la expresión de *GDH3*.

Con esta metodología se espera poder observar un cambio considerable que ponga al descubierto las secuencias de las cajas para factores transcripcionales tanto para *GDH1* como para *GDH3*.

La digestión del ADN se realizó para las muestras de la cepa silvestre obtenidas de un cultivo de glucosa-amonio y de etanol-amonio utilizando nucleasa micrococcal por 50-65 min (figura 29). Lo mismo se llevó a cabo con la cepa silvestre y la *nrg1Δnrg2Δ*.

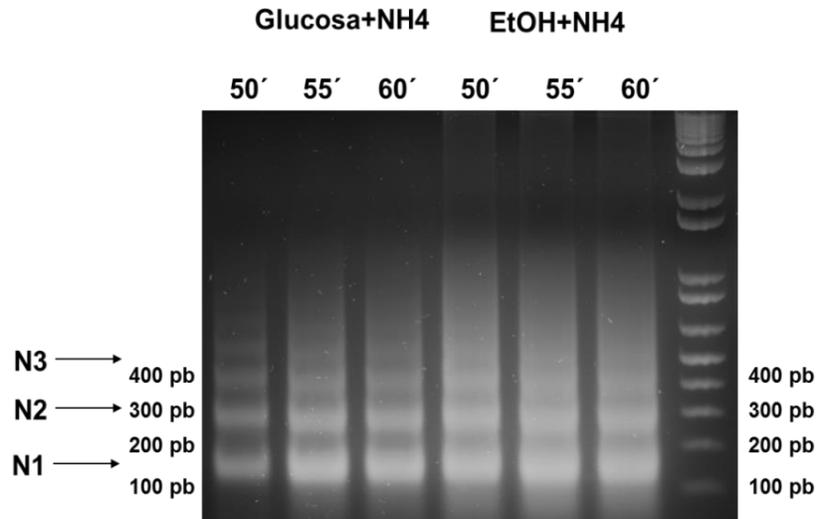


Figura 29. Obtención de la fracción del monosoma para NuSA. Digestión con MNasa de la cepa silvestre en glucosa-amonio y etanol-amonio. Se observa que la región entre 100 y 200 pb corresponde al monosoma, que será aislado y purificado.

Con la fracción de ADN purificada se realizaron diluciones seriales, para posteriormente ser analizada por q-PCR y graficar la protección relativa de los nucleosomas en el eje de las ordenadas y la posición de los nucleosomas en el promotor en el eje de las abscisas. De esta manera se genera un mapa de la estructura de la cromatina en ambas condiciones, para la región promotora de *GDH1* y de *GDH3*.

El promotor de *GDH1* presenta un remodelamiento de la cromatina en las condiciones probadas. Se ha reportado que la expresión de *GDH1* en condiciones respiratorias es controlada por *GLN3*, *GCN4* y *HAP4* (Riego *et al*, 2002), nuestros datos concuerdan con lo reportado (figura 30).

Se analizó el promotor de *GDH1* como control, pues como se ha mencionado antes, tienen una regulación inversa, es decir que cuando uno se expresa el otro se reprime.

GDH1

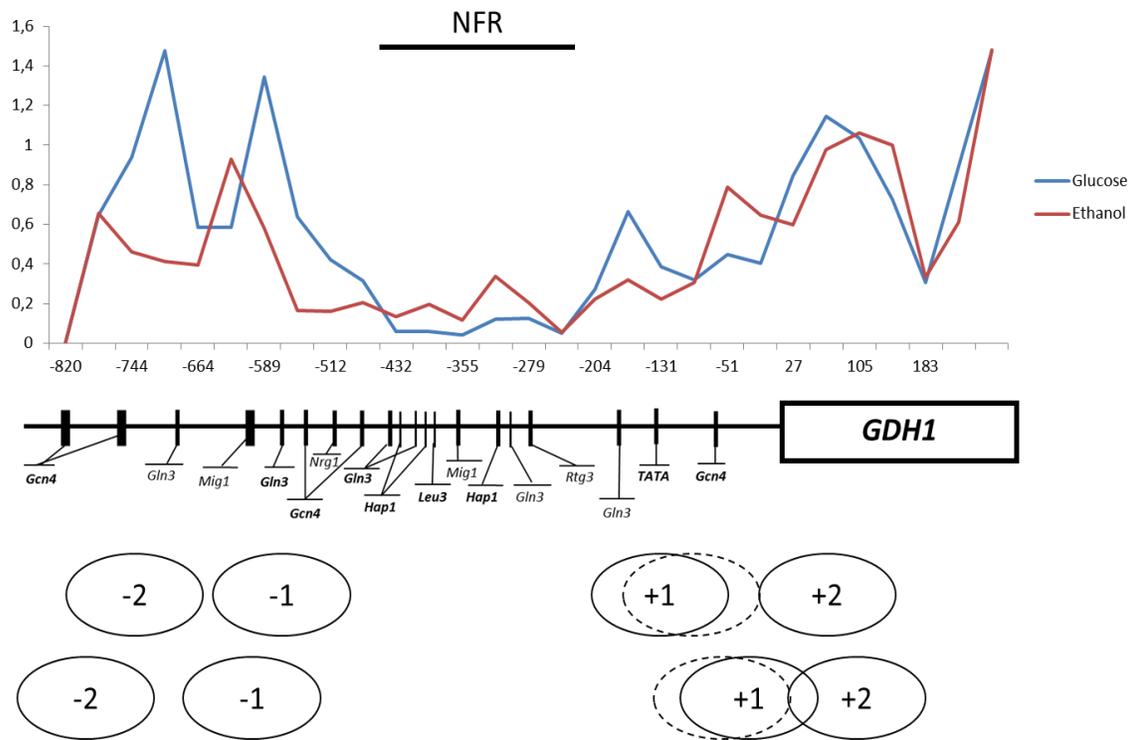


Figura 30. NuSA del promotor de *GDH1*. Mapa del promotor de *GDH1* en glucosa (azul) y etanol (rojo) donde se observa la zona libre de nucleosomas (nucleosome free region, NFR) y un ligero cambio en la estructura. Debajo de la gráfica se observa el posicionamiento de las cajas de ciertos factores transcripcionales y los nucleosomas detectados.

Para *GDH3* se pudo observar un cambio notable en la estructura de la cromatina, donde en condiciones de presencia de glucosa hay nucleosomas que impiden la transcripción. De forma contrastante, en etanol se observa una región totalmente libre de nucleosomas, que deja al descubierto las cajas de factores transcripcionales como *Nrg1*, *Gln3* y de algunos activadores como el complejo *Hap*, que podrían favorecer el inicio de la transcripción.

GDH3

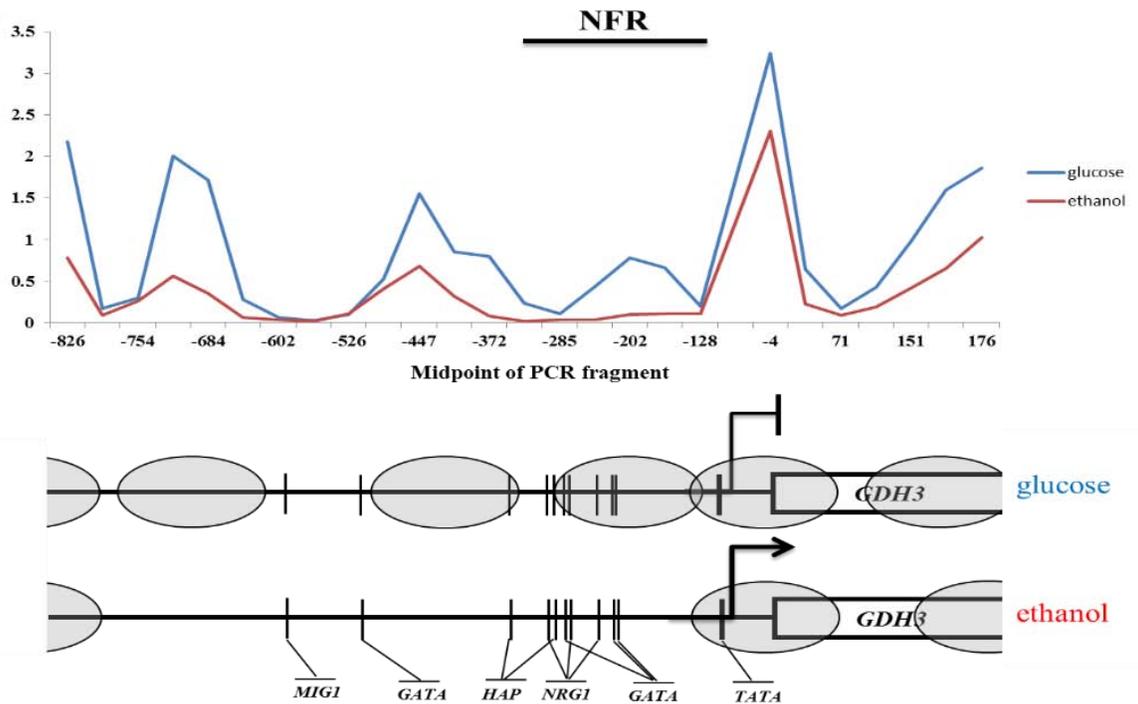
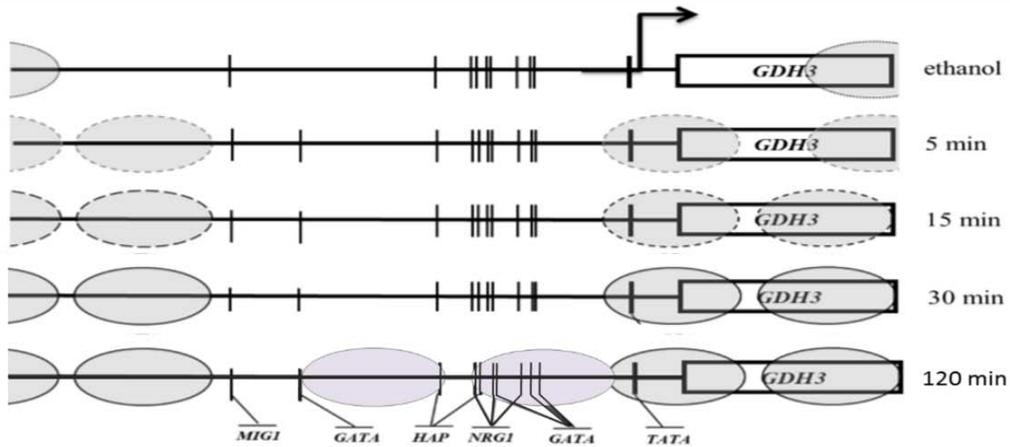
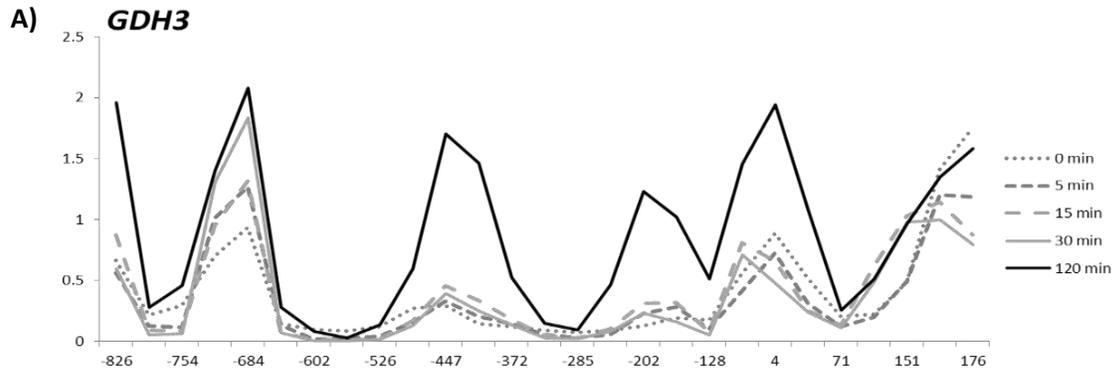


Figura 31. NuSA del promotor de *GDH3*. Mapa del promotor de *GDH3* en glucosa (azul) y etanol (rojo) donde se observa la zona libre de nucleosomas (nucleosome free region, NFR), el posicionamiento de las cajas de ciertos factores transcripcionales y los nucleosomas detectados.

Debido al resultado anterior, se decidió hacer un experimento a la inversa, donde se cultivaron las células en etanol hasta una DO_{600nm} 0.3 y se les dio un choque de glucosa al 2%, por 5, 15, 30 y 120 min, con el fin de observar el cambio progresivo de la estructura de la cromatina y determinar qué nucleosoma se recupera primero, lo cual nos mostraría las cajas que oculta al condensarse la cromatina lo cual nos podría indicar cuál es principal represor para *GDH3* (figura 32).



**B) Etanol-amonio
*S. cerevisiae***

WT Cla ura3- leu2-

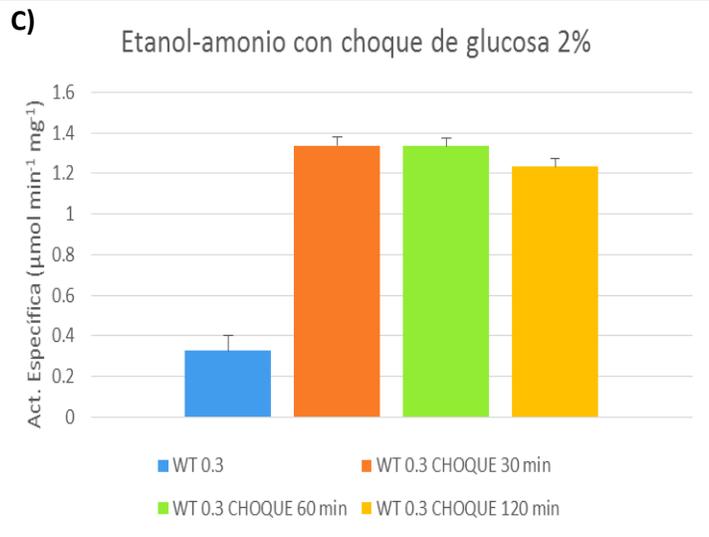
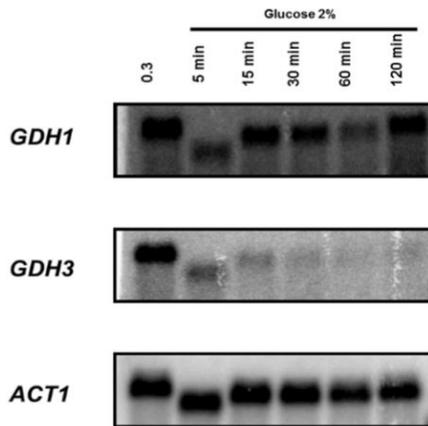


Figura 32. Experimento de choque de glucosa, NuSA, Northern blot y actividad específica. A) Mapa del promotor de *GDH3* de una cepa silvestre (*CLA1 ura3- leu2-*) en etanol y después de 5, 15, 30 y 120 minutos de choque de glucosa, no se muestran cambios significativos en el arreglo de los nucleosomas. **B)** Northern blot de la cepa silvestre en etanol a una DO_{600nm} 0.3 y después de 5, 15, 30, 60 y 120 minutos de exposición a glucosa. **C)** Gráfica de actividad específica de Gdh1 y Gdh3.

El análisis del cambio en la estructura de la cromatina comparando las dos condiciones de cultivo, mostró que en etanol tenemos una amplia región libre de y conforme aumenta el tiempo de exposición a glucosa, se van colocando nucleosomas en todo el promotor, especialmente a los 120 min (líneas discontinuas y continuas, figura 32 A) para bloquear la transcripción de *GDH3*.

En cambio el análisis de expresión por Northern blot muestra una represión casi inmediata al contacto con glucosa (figura 32 B). Además se cuantificó la actividad específica de Gdh3, donde se observa que en una cepa silvestre, en etanol a una DO_{600nm} de 0.3 la actividad total de Gdh es baja, puesto que la mayoría está dada por Gdh3, ya que Gdh1 se encuentra reprimida en estas condiciones. Cuando dimos el choque de glucosa en el medio de cultivo la actividad de Gdh dependiente de NADP(H) aumenta considerablemente pues se debe casi en su totalidad a Gdh1 (figura 32 C).

En la figura 32 B, podemos observar que en el carril de los 5 minutos de exposición a glucosa, el ARN migra por debajo del resto de las muestras, esto se puede deber a impurezas que no fueron eliminadas totalmente en el proceso de extracción o incluso a degradación.

El análisis de estructura de la cromatina de la cepa *nrg1Δnrg2Δ* en comparación a la cepa silvestre, realizada en condiciones represoras para *GDH3*, mostró que la cromatina se encuentra prácticamente de la misma forma que en la cepa silvestre en glucosa, con la NFR del nucleótido -600 al -150 aproximadamente (figura 33 A).

El Northern blot de este experimento mostró nuevamente las dos bandas de *GDH3* verificando nuevamente el resultado previamente obtenido (figura 33 B). Pese a que se repitió el dato de la doble banda en la doble mutante, no se pudo identificar algún cambio en la cromatina, esto puede indicar que no se requiere de un remodelado en la cromatina para la expresión observada de *GDH3*.

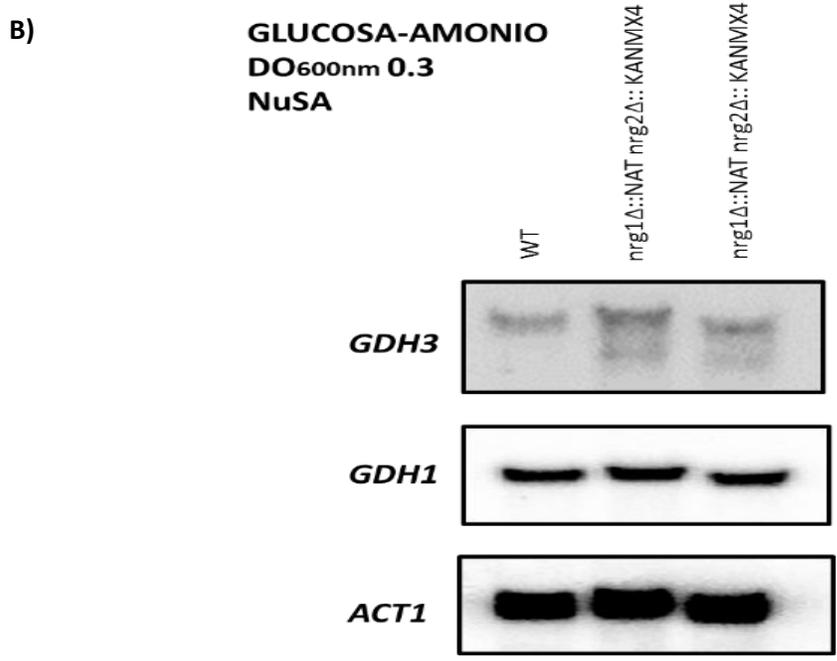
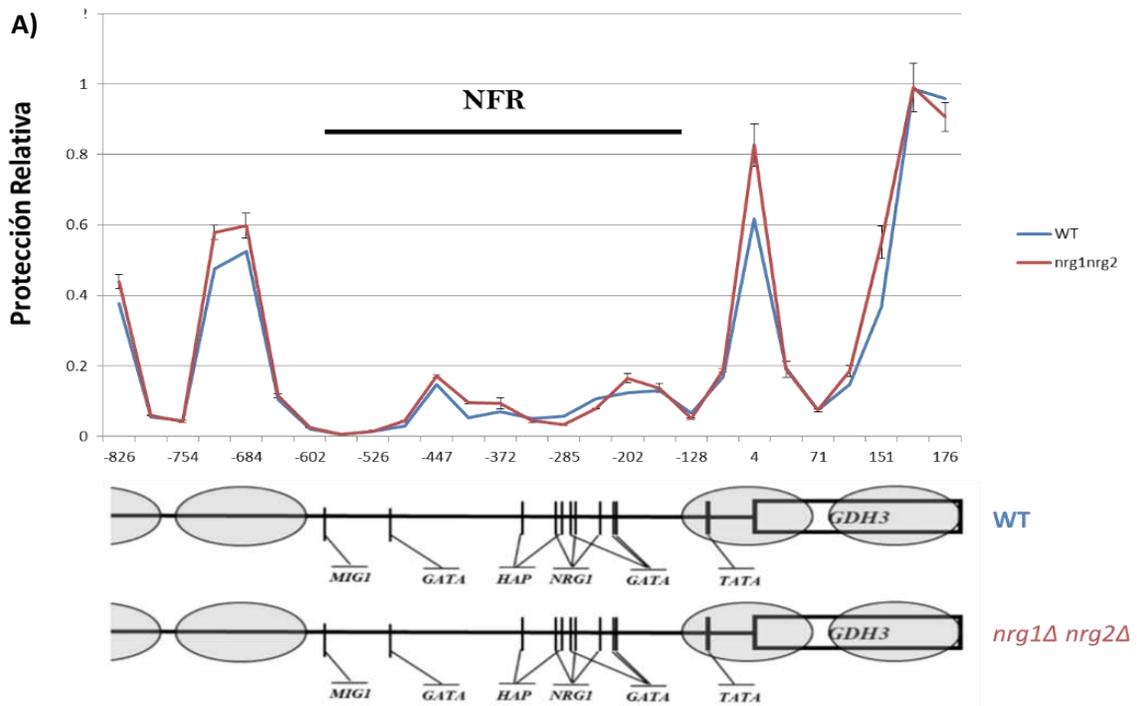


Figura 33. NuSA y northern blot de la cepa *nrg1Δnrg2Δ*. A) Mapa del promotor de *GDH3* de una cepa silvestre (CLA1 *ura3- leu2-*) y la cepa *nrg1Δnrg2Δ* en medio mínimo glucosa-amonio. **B)** Northern blot de las muestras obtenidas del NuSA.

8. DISCUSIÓN

Anteriormente se había reportado que *GDH3* presenta menor expresión cuando las células se encuentran en medio YPD, durante la represión catabólica por nitrógeno (NCR), es decir cuando la célula detecta fuentes ricas de nitrógeno (amonio, glutamina y asparagina), activando los genes necesarios para el transporte y metabolismo y reprimiendo aquellos genes que están involucrados en la utilización de fuentes pobres (arginina, glutamato, alanina), lo cual sugería que este gen podría ser regulado además de la fuente de carbono, por la calidad de la fuente de nitrógeno (Avenidaño *et al.*, 2005). En este trabajo, se eligió analizar la expresión de este gen en el medio de cultivo glucosa-amonio para continuar con el análisis de la regulación de *GDH3* por la fuente de carbono, ya que es una condición intermedia en cuanto a la calidad de la fuente de nitrógeno, donde se puede observar claramente la expresión y represión de *GDH3*.

Berkey *et al.*, demostraron que Nrg1 puede funcionar como un activador de la transcripción en ciertos contextos celulares. Se demostró que al fusionar LexA-Nrg1 activa la transcripción del gen reportero *lacZ* en células mutantes *ssn6Δ*. Además se demostró que la ausencia de glucosa en el medio de cultivo no evita la unión de Nrg1 al ADN, por lo tanto la liberación de la represión en glucosa implicaría tanto la pérdida de la actividad represora y la participación en la activación. Esta podría ser la razón por la cual en glucosa-prolina aumentó la expresión de *GDH3* 2.7 veces en una cepa *nrg1Δnrg2Δ*, como si hubiésemos eliminado un represor, pero al quitar la glucosa del medio, se comporta como si hubiésemos eliminado un activador, pues decae la expresión. Podríamos decir que es probable que Nrg1 se comporte como activador para *GDH3* dependiendo del contexto celular en el que se encuentre, tal vez influenciado por la represión catabólica del carbono y la de nitrógeno.

La propuesta de un posible sitio de inicio de la transcripción alternativo para *GDH3* surge del resultado obtenido en el Northern blot de la mutante *nrg1Δnrg2Δ*, donde se observaron dos bandas. Para comprobar este resultado se construyó la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* y se pudo concluir que ambas bandas corresponden a dos transcritos de diferente peso molecular. Sin embargo no podemos concluir que este transcrito alternativo da lugar a una proteína funcional, podría ser que exista un punto de control post-transcripcional o incluso, que la nueva banda de hibridación detectada sea un ARNm menos estable y que sea producto de la degradación el ARNm original.

Al cuantificar la actividad de las mutantes sencillas *nrg1Δ*, *nrg2Δ* con la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* se puede observar claramente que la actividad de la doble mutante disminuye a la mitad en comparación con las mutantes sencillas, lo cual sugiere que interviene en la expresión de alguna de las NADP-Gdh's, como un activador. Este dato concuerda con el

análisis de la expresión de *GDH3* en el Northern blot de la figura 17, en donde la expresión de *GDH3* aumenta en la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ* aumenta la expresión en comparación con la cepa silvestre, en condiciones de presencia de glucosa pero con una fuente secundaria de nitrógeno, como lo es prolina.

La construcción de la mutante *mig1Δ* nos permitió estudiar el papel de Mig1 en la represión de *GDH3* en cultivos con glucosa como fuente de carbono. Se considera que Mig1 es el mayor efector en la represión por glucosa en *S. cerevisiae*. Dicha represión pudiera darse de forma directa o indirecta a través de la represión de genes que codifican para activadores transcripcionales (Westholm *et al.*, 2008), por todo esto se consideró importante analizar a Mig1 como un posible regulador negativo de *GDH3*. La falta de una comprobación confiable de las mutantes y la falta de resultados concluyentes nos permiten sugerir volver a construir la mutante *mig1Δ*, para analizar su papel en la regulación de la transcripción de *GDH3*.

La actividad específica de Gdh3 en etanol aumenta considerablemente, incluso se sabe que en cultivos continuos, durante el metabolismo respiratorio el 70% de actividad total de NADP-GDH en una cepa silvestre corresponde a Gdh3; mientras que durante el metabolismo fermentativo, con glucosa como fuente de carbono, la actividad se debe sólo a Gdh1 (DeLuna *et al.*, 2001). Esto concuerda con lo observado en el análisis de actividad en cultivos de etanol y después del choque de glucosa (Figura 31 C), pues se detecta mayor actividad específica de NADP-GDH en presencia de glucosa debido a Gdh1 y en un cultivo con etanol hay menor actividad, pero prácticamente toda esa actividad es de Gdh3, esto se puede deber a las propiedades alostéricas de cada homohexámero o de los heterohexámeros.

Recientemente se ha descrito que Gdh3 pudiera ser necesaria para la resistencia a la apoptosis inducida por estrés y el envejecimiento cronológico en las células que se encuentran en estado estacionario (Lee *et al.*, 2012), por lo tanto se podría considerar que los posibles reguladores de este gen pueden ser aquellos que están involucrados en la respuesta a estrés tal como Msn2, Msn4, Cin5 o algunos otros candidatos responsables de la regulación en etanol como Adr1 y que fueron identificados como posibles reguladores por un análisis bioinformático en línea. Esto podría ser interesante para estudiar posteriormente en otro trabajo de investigación.

El análisis de la estructura de la cromatina de los promotores de *GDH1* y *GDH3* en condiciones contrastantes de fuente de carbono como lo son glucosa y etanol, nos permitió dilucidar a los posibles reguladores implicados en la represión/expresión de *GDH3*, ya que en la región libre de nucleosomas se encuentran varias cajas de unión de factores transcripcionales como Nrg1, Gln3, Gcn4, complejo Hap, entre otros candidatos. Al realizar

este ensayo en la mutante *nrg1Δnrg2Δ*, observamos que no existe un cambio en la estructura de la cromatina con respecto a la cepa silvestre, lo cual es sorprendente pues el cambio en la expresión (hibridación del transcrito) es evidente, mostrando una banda adicional en la expresión de *GDH3* en presencia de glucosa.

La participación de Nrg1 como regulador se apoya con el hecho de que éste regulador se pueda unir al promotor de *GDH3* al hacer ensayos de qChIP en medio glucosa-prolina, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (González Rangel, 2014).

Rtg1 y Rtg3 son factores transcripcionales tipo bHLH (basic helix loop helix) que forman heterodímeros y se translocan del citoplasma al núcleo cuando RTG es activada, dicha translocación depende del estado de fosforilación de Rtg3. El dominio de activación transcripcional está dentro de Rtg3 (Hashim *et al.*, 2004). Debido a esto, se realizó un análisis por Northern blot de la mutante *rtg3Δ* para determinar si es un activador transcripcional para *GDH3*. El resultado muestra que Rtg3 es un activador para *GDH3* y en menor manera para *GDH1*.

La RTG mantiene el suministro de 2-oxoglutarato, el cual es precursor de la biosíntesis de glutamato y glutamina mediante la activación del metabolismo anaplerótico de citrato y oxalacetato, a través del ciclo del glioxilato cuando el metabolismo respiratorio, es decir el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), está comprometido por falla en el funcionamiento de la mitocondria (Hashim *et al.*, 2014).

Zawadzky y colaboradores, en 2007 realizaron un estudio general de los nucleosomas y promotores en levadura tras la inducción en glucosa, para estudiar la re-programación transcripcional, pues es en esta condición donde más de la mitad del total de genes en la levadura cambian su expresión significativamente. La mayor parte de los genes que se inducen y se reprimen no muestran un cambio en el arreglo de los nucleosomas en su promotor, aunque los promotores que sí llevan a cabo la remodelación, suelen tener una caja TATA. *GDH3* cuenta con una caja TATA a -93 pb del ATG, lo cual corrobora que tal como pudimos observar por NuSA, sufre de remodelación de la cromatina. Además cuenta con tres sitios de unión para Nrg1/2, conocidas como cajas PDS (Post Diauxic Shift, por sus siglas en inglés), por lo que la participación de estos factores transcripcionales en su regulación, es muy probable (Avendaño *et al.*, 2005).

La complejidad de las vías regulatorias de represión por glucosa aún está lejos de nuestra comprensión, puesto que algunas de las actividades regulatorias operan a nivel transcripcional, en otros casos operan directamente en las enzimas involucradas. Además no se conoce aún si el mecanismo de represión por glucosa fue el paso original para la evolución hacia el efecto Crabtree o si éste mecanismo fue “adquirido” después durante la

evolución de algunos linajes de levaduras (Dashko *et al.*, 2014). En el caso del estudio de la regulación de *GDH3*, aún no hemos encontrado a un represor que participe mayoritariamente, a pesar de haber estudiado varios candidatos que se puedan unir al promotor e incluso, algunos factores que regulan de manera indirecta mediante el cambio de la estructura de la cromatina.

El sitio de unión adecuado para cada uno de los factores de transcripción puede estar dictado por el pre-posicionamiento de los nucleosomas, pero la regulación de la expresión a través de estos sitios de unión no está determinado por el re-posicionamiento de los nucleosomas, si no por ciertos cambios en la actividad del factor transcripcional (Zawadzky *et al.*, 2007). Incluso se sabe que en muchos promotores, la presencia de una región libre de nucleosomas no se correlaciona con el estado de transcripción y se encuentra en promotores activos e inactivos (Hahn and Young, 2011).

Los resultados obtenidos nos permitieron proponer un modelo de la regulación de la expresión de *GDH3* en condiciones de glucosa y etanol (figura 34), mostrando el cambio en la estructura de la cromatina del promotor y la posible participación de Nrg1/Nrg2 como represor de la transcripción y el papel de Rtg3 como activador.

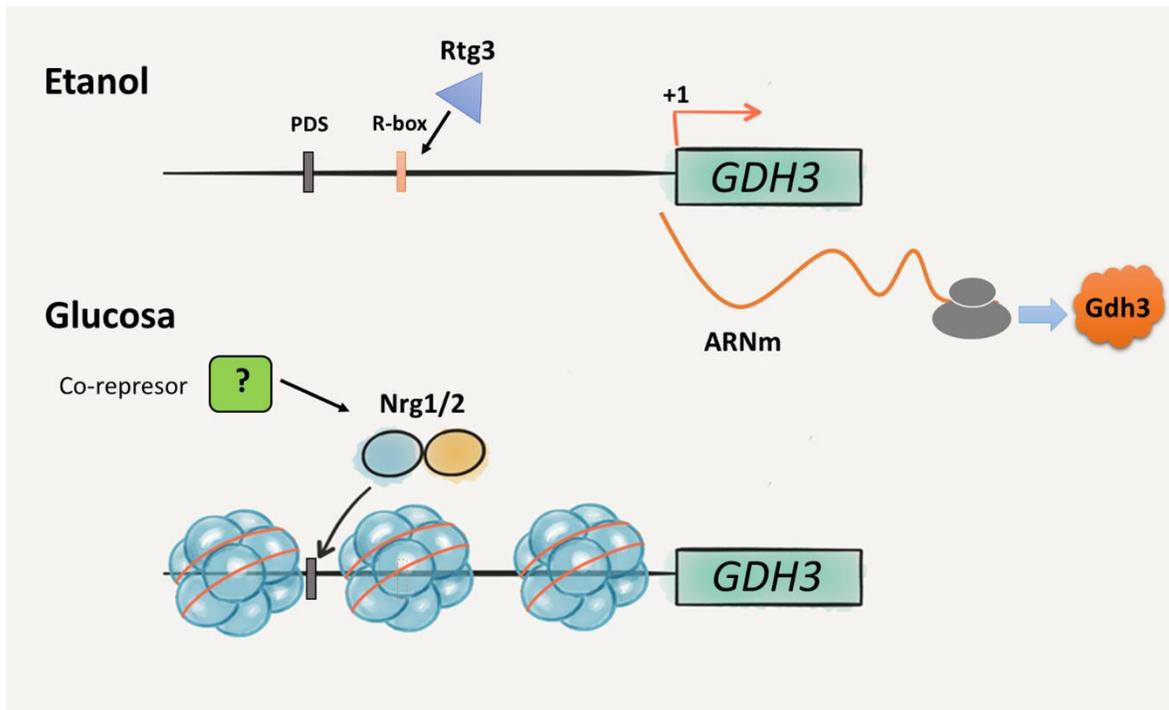


Figura 34. Modelo de la regulación de *GDH3* en etanol y glucosa. Esquema representativo del promotor de *GDH3* de una cepa silvestre (CLA1 *ura3-leu2*-) en medio mínimo etanol amonio y glucosa-amonio. Se muestran los posibles factores de transcripción involucrados en la represión/activación de *GDH3*.

Si eliminamos un represor que actúe en forma conjunta con otros represores (formando parte de un complejo), se espera que *GDH3* se exprese incluso en presencia de glucosa, pues no está presente alguno de los represores y por lo tanto no se puede formar el complejo que impide su transcripción. Sin embargo, si cada uno de los represores trabaja de forma individual, es probable que no podamos observar el cambio en la expresión, pues si falta algún represor, tal vez exista otro represor que pueda suplir este papel, manteniendo a nuestro gen de interés en estado reprimido.

9. CONCLUSIONES:

Se construyeron las mutantes *nrg2Δ*, *mig1Δ*, *tup1Δ*, *sir2Δ*, *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* y *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* que ayudarán al análisis de la regulación de *GDH3*.

Se analizó más de una condición fisiológica en todas las cepas, para determinar si la fuente de nitrógeno influye de igual forma en la represión/expresión del gen de estudio.

El análisis de expresión de las mutantes *hda1Δ* y *sir2Δ*, muestra que Hda1 y Sir2 no participan en la regulación de *GDH3* puesto que no se observan cambios considerables en el análisis por Northern blot ni por cuantificación de la actividad específica.

La mutante *mig1Δ* fue analizada en el fondo genético CLA1 *ura3⁻ leu2⁻* y en el de la colección BY4742 pero el análisis por Northern blot no muestra que participe como regulador negativo en la represión de *GDH3* en presencia de glucosa como fuente de carbono.

El análisis de la cepa *tup1Δ* indica que pudiera tener un papel en la represión de *GDH3*, eso aunado a que en la doble mutante *nrg1Δ nrg2Δ* se observa un ligero cambio, nos hacen poner especial atención al estudio de estas mutantes, pues se conoce que Nrg1 puede reclutar al complejo formado por Tup1/Ssn6 (Berkey *et al.*, 2004).

Cada una de las cepas mutantes que se construyeron en este trabajo se utilizó para analizar la expresión de *GDH3* por Northern blot, en diferentes condiciones fisiológicas, para determinar el efecto de la fuente de nitrógeno y de carbono en la represión/expresión del gen de estudio. Además se analizaron otras cepas mutantes que ya existían en la colección del laboratorio. El resultado más importante se obtuvo al analizar la cepa *nrg1Δnrg2Δ*.

El análisis de la doble mutante *nrg1Δnrg2Δ*, en glucosa-amonio indica que podría ser un represor y que el efecto es más fuerte en la doble mutante. El cambio más notable se

observa mediante la aparición de una nueva banda que podría deberse a la expresión de una isoforma de Gdh3.

Al analizar la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh3Δ* se determinó la que doble banda observada en la *nrg1Δnrg2Δ* pertenecen a *GDH3*, pues al eliminar el gen, ambas bandas desaparecen, lo cual indica que no es una hibridación inespecífica de la sonda. Además pudimos determinar que las cepas mutantes *gdh3Δ* y *gdh1Δgdh3Δ*, aún tienen *GDH3*, lo cual explica la actividad enzimática reportada en la figura 26.

El ensayo de cuantificación de la actividad enzimática en la triple mutante *nrg1Δnrg2Δgdh1Δ* nos permitió darnos cuenta que no existe un incremento en la actividad como en las bandas de expresión, lo cual nos sugiere que tal vez existe algún tipo de control post-transcripcional que haga que no todo el transcrito se traduzca y por lo tanto no se sintetiza suficiente proteína como para notar el cambio en nuestro ensayo de actividad en gel zimograma.

Por último el análisis del arreglo de los nucleosomas en los promotores de *GDH1* y de *GDH3* muestran que la estructura de la cromatina cambia en presencia de glucosa o en etanol, permitiendo la transcripción cuando se presenta una región libre de nucleosomas o reprimiendo la expresión al tener una estructura compacta de la cromatina. Este análisis nos da la pauta para conocer a los posibles reguladores que tienen su sitio de unión en la secuencia de ADN del promotor de estos genes.

Hasta el momento se ha observado que para el caso de *GDH3*, los cambios en la estructura de la cromatina no son tan rápidos a diferencia de lo observado por medio de los estudios de Northern blot (figura 31).

Cuando se analizó el arreglo de los nucleosomas en el promotor de *GDH3* en la cepa *nrg1Δnrg2Δ* en medio de cultivo glucosa amonio, por el método de NuSA se esperaba observar un cambio parecido al observado en etanol en una cepa silvestre. Sin embargo nuestros resultados nos muestran que no se requiere de un remodelado de la cromatina tan drástico para la expresión del gen, pues a pesar de tener una estructura compacta, se observa un aumento en la expresión.

10. PERSPECTIVAS:

Para corroborar si Tup1 está involucrada en el control de la regulación de *GDH3*, se podría construir la doble mutante *tup1Δgdh1Δ* para la cuantificación de actividad enzimática. Si existe un aumento en la actividad, aunado al ligero cambio observado por Northern blot, se

podría considerar que es un represor de *GDH3*. Además se sugiere realizar otro tipo de análisis como ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) para comprobar que Tup1 se une al ADN en el promotor de *GDH3*.

Construir nuevas mutantes candidatas de represores, incluso analizar la expresión de *GDH3* en condiciones de estrés tal como apoptosis y fase estacionaria, pues se ha descrito anteriormente el papel que desempeña Gdh3 evitando el envejecimiento celular y la pérdida de viabilidad de las células relacionada con apoptosis, tal como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, fragmentación nuclear, daño en el ADN, entre otros (Lee *et al.*, 2012)

Para determinar si existe otro ARNm de *GDH3* que podría ser potencialmente traducido, se podría llevar a cabo un 5' RACE-PCR para obtener la secuencia completa de dicho transcrito y definir si existe alguna otra isoforma funcional de la proteína.

11. LITERATURA CITADA:

- Avendaño A., Riego L., DeLuna A., Aranda C., Romero G., Ishida C., Vázquez-Acevedo M., Rodarte B., Recillas-Targa F., Valenzuela L., Zonszein S. and 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*". *Molecular Microbiology* **57(1)**, 291-305.
- Avendaño A., DeLuna A., Olivera H., Valenzuela L, Gonzalez A. (1997). "*GDH3* encodes a Glutamate-dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Bacteriology* **179(17)**, 5594-5597.
- Berkey C.D., Vyas K.V., Carlson M. (2004). "Nrg1 and Nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source". *Eukaryotic cell* **3(2)** 311-317.
- Butow R.A. and Avadhani N.G. (2004). "Mitochondrial signaling: the retrograde response". *Molecular Cell* **14(1)**,1-15.
- Conrad Bernard and Stylianos E. Antonarakis. (2007). "Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of Human disease". *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **8**, 17-35.
- Cox K. H., Tate J.J., Cooper T.G. (2002). "Cytoplasmic compartmentation of Gln3 during nitrogen catabolite repression and the mechanism of its nuclear localization during

- carbon starvation in *S. cerevisiae*". *The Journal of Biological Chemistry*. 4;277(40):37559-66.
- Dashko Sofia, Zhou Nerve, Compagno Concetta, Piškur Jure. (2014). Why, when and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*. **14**, 826-832.
- DeLuna A., Avendaño A., Riego L., González A. (2001). "NADP-Glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*". *The journal of biochemical chemistry*. **276(47)**, 43775-43783.
- DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O. (1997). "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale". *Science* **278**, 680-686.
- DeVit M.J., Waddle J.A., Johnston M. (1997). "Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor". *Molecular Biology of the Cell*. **8**,1603-1618.
- Feldmann Horst. *Yeast: Molecular and cell biology*. Segunda edición 2012.
- González Rangel Alan A. (2014). "Regulación transcripcional de los genes parálogos *GDH1* y *GDH3* en *Saccharomyces cerevisiae*" (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México.
- Hahn Steven, Young Elton T. (2011). "Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation and roles of activators and co-activators". *Genetics* **189**, 705-736.
- Hashim Z., Mukai Y., Bamba T., Fukusaki E. (2014). "Metabolic profiling of retrograde pathway transcription factors Rtg1 and Rtg3 knockout yeast". *Metabolites* **4**, 580-598.
- Hu Z., Nehlin J.O., Ronne H., Michels C.A. (1995). "Mig1-dependent and Mig1-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *Current genetics* **28**, 258-266.
- Hurles Matthew. (2004). "Gene duplication: the genomic trade in spare parts". *PLoS Biology* **2**, 0900-0904.
- Infante J.J., Lynn G., Young E.T. (2012). "Analysis of Nucleosome Positioning using a Nucleosome- Scanning Assay". *Chromatin remodeling: Methods and protocols, methods in molecular biology*, vol. 833, Chapter 5. Randall H. Morse Ed.
- Kellis M., Birren B. W., Lander E. S. (2004). "Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature* **428**, 617-624.

- Lee Y.J., Kim K.J., Kang H.Y., Kim H.R., Maeng P.J. (2012). "Involvement of *GDH3*-encoded NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary phase cells". *The Journal of biological chemistry*, **287(53)**, 44221-44233.
- Li Bing, Carey Michael, Workman Jerry L. (2007). "The role of chromatin during transcription". *Cell*, **128**, 707-719.
- Louis E. J. (2007). "Making the most of redundancy". *Nature News & Views*, **449**, 673-674.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *The Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Magasanik B. (2003). "Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic cell* **2(5)**, 827-829.
- Mazón M.J., Hemmings B.A. (1979). "Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase by proteolysis during carbon starvation". *Journal of Bacteriology* **139(2)**, 686-689.
- Parikh V.S., Morgan M.M., Scott R., Clements L.S., Butow R.A. (1987). "The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast". *Science* **30;235(4788)**, 576-580.
- Pedram M., Sprung C. N., Gao Q., Lo A.W.I., Reynolds G. E., Murnane J. P. (2006). "Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse". *Molecular and cellular biology* **26(5)**, 1865-1878.
- Piškur Jure. (2001). "Origin of the duplicated regions in the yeast genomes". *TRENDS in genetics* **17(6)**, 302-303.
- Ptashne Mark and Gann Alexander. *Genes & Signals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- Rando Oliver J., Winston Fred. (2012). "Chromatin and transcription in yeast". *Genetics* **190**, 351-387.
- Riego L., Avendaño A., DeLuna A., Rodríguez E., González A. (2002). "*GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4* and *HAP4* under respiratory growth". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**, 79-85.
- Tham Wai-Hong and Zakian Virginia A. (2002). "Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms". *Nature, Oncogene* **21**, 512-521.

- Treitel M.A., Carlson M. (1995). "Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92(3)**, 132-136.
- Treitel M.A., Kuchin S., Carlson M. (1998). "Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and cellular biology*. **18(11)** 6273-6280.
- Valenzuela L., Ballario P., Aranda C., Filetici P., González A. (1998). "Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Bacteriology* **180**, 3533-3540.
- Van de Peer Y., Maere S., Meyer A. (2009). "The evolutionary significance of ancient genome duplications". *Nature Reviews, Genetics* **10**, 725-732.
- Van Urk H., Voll L., Scheffers A., van Dijken J. (1990). "Transient-state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts". *Applied and environmental Microbiology* **56**, 281-287.
- Warren A. and Marullo P. (2012). "Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication". *Proceedings of the Royal Society B*. **279**, 2497–2509
- Wolfe K. H., Shields D. C. (1997). "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome". *Nature* **387**, 708-713.
- Westholm J.O., Nordberg N., Murén E., Ameer A., Komorowski J., Ronne H. (2008). "Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3". *BMC Genomics* **9**, 601.
- Zawadzki Karl A., Morozov Alexandre V., Broach James R. (2009). "Chromatin-dependent transcription factor accessibility rather than nucleosome remodeling predominates during global transcription restructuring in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular Biology of the Cell* **20**, 3503-3513.
- Zhou H., Winston F. (2001). "*NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*". *BMC Genetics* **2**, 5.