



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS GLOBAL DE LOS GENES REGULADOS DIRECTA O
INDIRECTAMENTE POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL Leu3 EN LA
LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QB. FULVIA STEFANY ARGUETA ZEPEDA

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. M. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM.](#)

Dr. JORGE LUIS FOLCH MALLOL
[Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM.](#)

Ciudad de México, Marzo 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se elaboró para cumplir con los requisitos y obtener el grado de Maestra en Ciencias del programa de “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

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

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

Dra. Bertha González Pedrajo Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Jorge Luis Folch Mallol Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM

El jurado de examen de maestría, que a su vez participó en las correcciones finales de la tesis, estuvo constituido por:

Presidente Dr. Jesús Aguirre Linares
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Secretario Dr. Roberto Coria Ortega
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Vocal Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Vocal Dr. Luis Servín González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Vocal Dr. Enrique Merino Pérez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la asesoría y apoyo técnico brindado por la Q.F.B. Beatriz Aguirre López.

Se reconoce la colaboración del estudiante de Doctorado James Enrique González durante el desarrollo de este proyecto.

Se reconoce la invaluable ayuda y apoyo secretarial brindado por María del Rocío Romualdo Martínez del departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

A los ingenieros de la unidad de cómputo Ing. Ivette Rosas Arciniega e Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo por colaboración con el mantenimiento y soporte técnico del equipo de cómputo personal y del laboratorio.

Se reconoce la importante colaboración del personal del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular por mantener el equipo del laboratorio en buen estado.

Se utilizaron los servicios de síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de DNA que provee la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, del cual es responsable la Dra. Laura Ongay Larios y se agradece por el préstamo de equipo que fue indispensable para la realización de este proyecto.

Se utilizaron los servicios de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD) del Instituto de Biotecnología, UNAM y se reconoce la asesoría y apoyo en el análisis bioinformático del Dr. Alejandro Flores Sánchez y la M.C. Verónica Jiménez Jacinto.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) a través del donativo CB-2014-239492-B y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo número: IN201015 (<http://dgapa.unam.mx>).

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con número de becario: 659308

Se reconoce la ayuda del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al congreso internacional EMBO conference series 2016, "Gene Transcription in Yeast: from chromatin to RNA and back. En el cual pude presentar los avances de este proyecto de investigación.

Se reconoce la ayuda de la Asociación Mexicana de Bioquímica (SMB), por el apoyo brindado para asistir a congresos nacionales y presentar los avances del proyecto.

Se reconoce la ayuda recibida en base a la convocatoria BECAS MIXTAS 2016 – MZO 2017 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO (291062), para participar en una estancia de investigación en la UNIVERSIDAD DE ROMA "LA SAPIENZA", Italia, en Junio-Julio del 2016.

Se reconoce el aporte único por concepto de gastos de instalación que la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID) de la Secretaría de Relaciones Exteriores me proporcionó como becario seleccionado en el marco de la primera reunión del Comité de Asignación de Beneficios del Programa CONACYT-OEA-AMEXCID, 2015. Él cual facilito mi instalación en la ciudad de México, permitiendo el desarrollo de este proyecto.

La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutora principal,

Dra. Alicia González, por haber depositado su confianza en mí y haberme recibido en su laboratorio con los brazos abiertos. Porque amar a la ciencia es muy fácil, cuando día a día usted nos contagia su entusiasmo y su curiosidad por aprender cosas nuevas. Gracias por su cariño, por sus consejos y por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio,

Aquellos a los que ya no veo a diario: Citlali, Mijail, Geovanni, Jimena, aranzazú y Cristy; con los que sigo compartiendo diariamente desde mi llegada: Eréndira, Lupita, James, Dariel, José Carlos y Alejandra y a los que llegaron después de mí: Estefany, Elena, Beatriz, David, Mónica y Andrea. Porque de cada uno de ustedes me llevo un aprendizaje o una anécdota y porque en más de una oportunidad me tendieron la mano, me dieron algún consejo o simplemente me hicieron sonreír.

A James Gonzáles, por acompañarme en todo el desarrollo del proyecto, por estar siempre dispuesto a discutir los datos y por todas esas buena ideas que surgieron de nuestras pláticas.

A Citlali Flores, por que sentarme junto a ti fue muy afortunado. Gracias por enseñarme a diseñar mis primeros experimentos, a realizar cálculos rápidamente y a entender que muchas veces se debe iniciar desde cero para tener buenos resultados.

A Eréndira Rojas, por brindarme tu ayuda en cualquier momento, bajo cualquier circunstancia y por ayudarme siempre a ver el lado positivo de las cosas.

A los miembros de mi comité tutor,

Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Bertha González Pedrajo y Dr. Jorge Luis Folch Mallol, por tomarse el tiempo para asistir a cada uno de mis tutorales y por participar activamente en el desarrollo del proyecto al analizar los datos desde puntos de vista diferentes y por todas las recomendaciones para mejorar.

A mis revisores de tesis,

Dra. Laura Camarena, Dr. Luis Servín, Dr. Enrique Merino, Dr. Jesús Aguirre y Dr. Roberto Corea. Por tomarse el tiempo de leer y corregir el escrito de la tesis. Todas sus recomendaciones hicieron que el trabajo se presentara de la mejor manera.

A los amigos del instituto de biotecnología,

Dr. Alejandro Sánchez por su apoyo al becarme en los cursos de bioinformática impartidos por su equipo de trabajo, fueron indispensables en mi formación académica y a la M. en C. Verónica Jiménez por su apoyo en el análisis de los datos de expresión diferencial y por estar siempre dispuesta a resolverme dudas.

A Esteban Pegueros y a Enrique Merino, por su ayuda en el análisis y presentación de los resultados de este proyecto. Gracias por recibirme en su laboratorio y brindarme parte de su valioso tiempo. Gracias por su apoyo y su amistad, por todas las risas compartidas y esos deliciosos cafecitos mañaneros.

A mis amigos incondicionales,

A Karina Vásquez, por estar al pendiente de mí, querer mi bienestar y disfrutar mis logros. Gracias por su apoyo y su cariño.

A Emily Melgar, por compartir conmigo etapas importantes de mi vida, por estar siempre disponible para platicar y escucharme, por tus consejos, tu apoyo y tener siempre una palabra de ánimo para mí.

Erédira, José, Eddy y Citlali, porque cuando uno es extranjero los amigos se convierten en familia. Gracias por haberme abierto las puertas de su casa, por apoyarme en los buenos y malos momentos, por su cariño, su solidaridad y su amistad desinteresada e incondicional.

Tocaya granados, gracias por estos meses de risas y amistad, me alegra mucho haberte conocido.

A mi familia,

A mis hermanos Jenner y Analucia, por su cariño y su apoyo en todo momento, gracias por ser un ejemplo de lucha y perseverancia para mí.

A mis sobrinas Scarlet y Natalia, porque cuando pienso en rendirme ustedes son mi motivación para tomar impulso y salir adelante.

A mis padres Fredy y Sandra, por ser mi porra personal, por quererme tanto y apoyarme en todo momento, por animarme a tomar decisiones con valentía, por ayudarme a ver siempre las cosas positivas de la vida y a tener un corazón humilde y luchador. Sin ustedes nada de esto sería posible.

Al resto de mi familia, abuelos, tíos y primos, porque se alegran y disfrutan mis logros tanto como yo.

A esas personas que llevaré toda la vida en mi corazón, mi abuelito Ruperto y mi hermana Guisela. Porque disfrutar y aprender de las personas que amamos es una de las cosas más valiosas e importantes en la vida.

ÍNDICE

	Página
I. ABREVIATURAS	15
II. NOMENCLATURA Y DEFINICIONES	19
III. RESUMEN	22
IV. INTRODUCCIÓN	23
A. Duplicación de genes en los organismos.	23
B. Implicaciones de la duplicación genética: fuente evolutiva de diversidad biológica.	24
C. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	27
D. Duplicación genética en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
E. Implicaciones de la WGD en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
F. Metabolismo nitrogenado en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
G. Genes parálogos <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
H. Regulación transcripcional en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
I. Regulación y Expresión de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	35
J. Mecanismo de regulación del factor transcripcional Leu3 y su cofactor α -IPM	36
K. Genes regulados por el factor Leu3	38
L. Secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing, NGS)	40

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
VI. HIPOTESIS	43
VII. OBJETIVOS	44
VIII. METODOLOGÍA	45
IX. RESULTADOS	54
X. DISCUSIÓN	77
XI. CONCLUSIONES	83
XII. PERSPECTIVAS	84
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
XIV. ANEXOS	92
XV. APÉNDICES	108

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

		Página
Tablas		
Tabla 1.	Comparación entre técnicas para el análisis de transcriptomas.	41
Tabla 2.	Genotipo de las cepas utilizadas en este estudio.	45
Tabla 3.	Componentes de la PCR para la confirmación de la mutante <i>leu3Δ</i> .	47
Tabla 4.	Condiciones para la PCR de confirmación de la mutante <i>leu3Δ</i> .	47
Tabla 5.	Oligonucleótidos directo y reverso utilizado para la PCR de confirmación de la mutante <i>leu3Δ</i> .	48
Tabla 6.	Lecturas y porcentaje de mapeo en la réplica biológica 1 de la cepa WT y la mutante <i>leu3Δ</i> .	55
Tabla 7.	Lecturas y porcentaje de mapeo en la réplica biológica 2 de la cepa WT y la mutante <i>leu3Δ</i> .	56
Tabla 8.	Lecturas y porcentaje de mapeo en las réplica biológicas 1 y 2 de las mutantes $P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ$ y $leu4Δ/leu9Δ$.	56
Tabla 9	Punto de corte y filtrado de datos del análisis de expresión diferencial.	57
Tabla 10.	Análisis de sitios de unión a DNA para los factores transcripcionales Leu3, Gcn4 y Gln3.	68

Figuras

Figura 1.	Reacciones involucradas en la utilización de fuentes de nitrógeno por <i>S. cerevisiae</i> .	31
Figura 2.	Mecanismo de regulación del complejo Leu3- α IPM.	37
Figura 3.	Ruta metabólica de la Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada.	39
Figura 4.	Control de calidad de las muestras de RNA total.	54
Figura 5.	Validación de los resultados de expresión diferencial.	59
Figura 6.	Número de gene con expresión diferencial cuando la cepa WT de <i>S. cerevisiae</i> creció en diferentes fuentes de nitrógeno.	62
Figura 7.	Número de genes con expresión diferencial entre la cepa mutante <i>leu3</i> Δ y la cepa WT cuando crecieron en diferentes fuentes de nitrógeno.	63
Figura 8.	Redes de interacción proteína-proteína.	64
Figura 9.	Redes de asociación funcional.	65
Figura 10.	Procesos biológicos y vías metabólicas	70
Figura 11.	Papel del α -IPM en la regulación de los genes con expresión diferencial regulados por Leu3.	73
Figura 12.	Modelo gráfico de los mecanismos de regulación de Leu3, cuando <i>S. cerevisiae</i> crece en glutamina, ácido γ -aminobutírico o V I L como fuentes de nitrógeno.	75

Anexos

Anexo A	Medios de cultivo.	92
Anexo A1	Concentración final de los componentes del medio YPD utilizado en este estudio.	92
Anexo A2.	Cantidad de componentes para preparar un litro de medio mínimo.	92
Anexo A3.	Concentración final de las diferentes fuentes de nitrógeno en el medio.	92
Anexo B.	Preparación de reactivos.	93
Anexo C.	Genes con expresión diferencial: WT vs <i>leu3Δ</i> .	94
Anexo C1.	Lista de genes con expresión diferencial en un medio con glutamina.	94
Anexo C2.	Lista de genes con expresión diferencial en un medio con ácido γ -aminobutírico.	101
Anexo C3.	Lista de genes con expresión diferencial en un medio con valina, isoleucina y leucina.	104

Apéndices

Apéndice A.	Experimentos control	108
Apéndice 1.	Resultados de la confirmación de la mutante <i>leu3Δ</i> .	108
Apéndice 1.1.	Fenotipo de crecimiento de la cepa WT y la mutante <i>leu3Δ</i> en un medio con diferentes fuentes de nitrógeno.	108
Apéndice 1.2.	Confirmación por PCR	109
Apéndice 1.3.	Confirmación de expresión por northern blot	110

Apéndice 2.	Confirmación de las mutantes $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$ y $leu4\Delta/leu9\Delta$.	111
Apéndice 2.1.	Fenotipo de crecimiento	111
Apéndice 2.2.	Caracterización fenotípica	113
Apéndice 2.3.	Confirmación de expresión por northern blot	114
Apéndice B	Trabajo de colaboración entre la Universidad de Roma “La Sapienza” y la Universidad Nacional Autónoma de México. Reporte de investigación 2016.	115

I. ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
aa	aminoácido (s)
BCAA	aminoácidos de cadena ramificada (branched-chain amino acids)
cDNA	DNA complementario
ChIP	inmunoprecipitación de cromatina (chromatin immunoprecipitation)
cm	centímetro (s)
DDC	duplicación, degeneración y complementación
DEPC	pirocarbonato de dietilo (<u>diethyl pyrocarbonate</u>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
ED	expresión diferencial
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EST	marcador de secuencia expresada (expressed sequence tag)
FDR	false discovery rate
g	gramo (s)
GAAC	control general de aminoácidos (general amino acid control)

GABA	ácido gamma-aminobutírico
GLN	glutamina
h	hora (s)
Kan	antibiótico Geneticina
KDa	kilodaltons
kg	kilogramo (s)
Ln2	logaritmo natural base 2
log10	logaritmo base 10
logFC	log fold change
M	molaridad
min	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
mm	milímetro (s)
MM	medio mínimo
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mRNA	RNA mensajero
NaAc	acetato de sodio
Nat	antibiótico nourseotricina
NB	northern blot
NCR	represión catabólica nitrogenada (nitrogen

	catabolite repression)
nm	nanómetros
NSG	secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing)
ORF	marco de lectura abierto (open reading frame)
p	pendiente
p_{adj}	valor de p ajustado
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PLP o P5P	piridoxal 5'-fosfato (pyridoxal 5'-phosphate)
prob	probabilidad
RIN	número de integridad del RNA (RNA integrity number)
RNA	ácido ribonucleico
RNA-seq	RNA-sequencing
RNA_t	RNA total
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo (s)
SDS	dodecilsulfato sódico
TBP	TATA-binding protein
T_d	tiempo de duplicación

TF	factor transcripcional
V I L	valina, isoleucina, leucina
WGD	duplicación total del genoma (whole genome duplication)
WT	cepa silvestre (wild type)
X	Por (representa la concentración de una solución)
YPD	dextrosa-peptona extracto de levadura (yeast extract peptone dextrosa)
μ	velocidad específica de crecimiento
μg	Microgramo (s)
μl	Microlitro (s)
μm	micromolar

II. NOMENCLATURA Y DEFINICIONES

::	símbolo que hace referencia a una inserción
Δ	símbolo que hace referencia a una deleción
%	porcentaje
ASP1	gen que codifica para la L-asparaginasa citosólica involucrada en el catabolismo de asparagina
ASP3	grupo de genes idénticos que codifican para 4 proteínas que forman el complejo L-asparaginasa II asociada a la pared celular involucrada en el catabolismo de asparagina
BAP2	gen que codifica para una permeasa de leucina de alta afinidad
Bat1	aminotransferasa mitocondrial de BCAA
Bat2	aminotransferasa citosólica de BCAA
Dal80 y Deh1	Represores transcripcionales en el mecanismo de NCR
Elemento regulatorio cis	regiones no codificantes del DNA que regulan la transcripción de los genes cercanos
Elemento regulatorio trans	gen que codifica una molécula difusible (proteína o RNA) que actúa sobre otro gen a distancia y lo regula.
FCI	solución que se prepara con fenol cloroformo y alcohol isoamílico (ver anexo B)
GAT1	gen que codifica a la enzima Gat1
Gcn4	factor transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de aa

GCN4	gen que codifica al factor transcripcional Gcn4
GDH3	gen que codifica a la enzima Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
Gln3 y Gat1	activadores transcripcionales de los genes que se regulan por NCR
His4	enzima multifunción involucrada en varios pasos de la biosíntesis de histidina
ILV2	gen que codifica para la acetolactato sintasa que cataliza el primer paso en la biosíntesis de valina e isoleucina
ILV3	gen que codifica para una deshidroácido deshidratasa que cataliza el primer paso de la biosíntesis de BAAC
ILV5	gen que codifica para una acetohidroxiácido reductoisomerasa que participa en la biosíntesis de BAAC
ILV6	subunidad regulatoria de la acetolactato sintetasa que cataliza el primer paso de la biosíntesis de BAAC
KIBAT1	gen que codifica para la enzima bifuncional KIBat1
KIBat1	aminotransferasa que participa en la biosíntesis y catabolismo de V I L en <i>kluveromyces lactis</i>
leu1Δ	gen <i>LEU1</i> ausente
LEU3	gen que codifica el factor transcripcional Leu3
Leu3	factor transcripcional pleiotrópico que regula los genes involucrados en la biosíntesis de BCAA y asimilación de amonio
leu3Δ	gen <i>LEU3</i> ausente

<i>leu3Δ/Gcn4Δ</i>	genes <i>LEU3</i> y <i>GCN4</i> ausentes en un mismo fondo genético
<i>LEU9</i>	gen que codifican para la enzima α-Isopropil malato sintasa II que participan en la biosíntesis de leucina
<i>leu4Δ/leu9Δ</i>	genes <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> ausentes en un mismo fondo genético
MAE	solución amortiguadora que se prepara con MOPS, acetato de sodio y EDTA (ver anexo B)
Mot1	proteína esencial involucrada en la regulación de la transcripción
OAC1	gen que codifica para un transportador mitocondrial de membrana interno. Transporta oxaloacetato, sulfato, thiosulfato y α-IPM
P_{ENO2}[gen]	hace referencia a un gen determinado que se encuentra bajo el promotor del gen <i>ENO2</i>
Put3	factor transcripcional que regulan los genes que metabolizan prolina
SCC	solución amortiguadora que se prepara con las sales cloruro de sodio y citrato de sodio (ver anexo B)
TFIID	factor de transcripción II D, constituye el complejo de pre-iniciación de la RNA II polimerasa
Trp3	sintetasa de indol-3-glicerol fosfato
URA3	gen que codifica para la descarboxilasa de ornitina 5 fosfato
Ure2	regulador transcripcional de la NCR
α-IPM	alfa - isopropil malato

III. RESUMEN

En este estudio se presenta un análisis detallado de los genes regulados por el factor transcripcional Leu3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuando la cepa crecen en diferentes fuentes de nitrógeno.

Se crecieron células de la cepa WT y de una mutante con genotipo *leu3Δ* en un medio con glucosa como fuente de carbono y con glutamina, ácido γ -aminobutírico o valina, isoleucina y leucina como fuentes de nitrógeno. Se extrajo el RNA total de las células cuando se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. El RNA total se envió a secuenciar por medio de la técnica de RNA-seq y con los datos obtenidos se realizó un análisis de expresión diferencial por métodos computacionales y bioinformáticos.

De las cepas que crecieron en un medio con glutamina se obtuvieron 54 genes con expresión diferencial, 20 genes con expresión diferencial en un medio con γ -aminobutírico y 15 genes con expresión diferencial en un medio con valina, isoleucina y leucina.

Se ha descrito que Leu3 regula positivamente a sus genes blancos solo en presencia de su co-activador, el α -Isopropil malato. Esta molécula pequeña, es un intermediario que se sintetiza en el primer paso de la biosíntesis de leucina. En ausencia de α -Isopropil malato, Leu3 actúa como un represor, pero únicamente de la expresión basal de sus genes blancos (Kohlhaw, 2003).

Para estudiar el efecto del α -isopropil malato en la regulación de Leu3, se hicieron análisis de expresión diferencial de la cepa WT contra dos mutantes, una doble mutante que no tiene la capacidad de producir α -isopropil malato (genotipo: *leu4Δleu9Δ*) y una triple mutante que acumula α -isopropil malato (genotipo: $P_{TENO2}LEU4$ - $P_{TENO2}LEU9$ *leu1Δ*)

De los 54 genes con expresión diferencial en la mutante *leu3Δ* se obtuvo un total de 26 genes con expresión diferencial en la doble mutante y un total de 19 genes con expresión diferencial en la triple mutante.

IV. INTRODUCCIÓN

A. La duplicación de genes en los organismos

Se entiende por duplicación génica el aumento en el número de genes a partir de secuencias preexistentes (Ohno, 1970). Existen diferentes mecanismos por medio de los cuales se duplican los genes: 1. Entrecruzamiento desigual, es decir errores en la recombinación homóloga, el cual da como resultado tándems de genes duplicados. 2. Transposición replicativa del DNA, la cual puede ser por recombinación homóloga no alélica o por unión de extremos no homólogos y 3. Retrotransposición, que ocurre cuando un RNA mensajero (mRNA) es retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) e insertado al genoma, 4. Poliploidización, en donde hay un cambio numérico en la serie completa de cromosomas, resultado de una división celular anormal o de la hibridación irregular de dos células. Si los genomas de una especie poliploide provienen de la misma especie ancestral, se dice que es autopoliploide o autoploide; si provienen de dos especies ancestrales diferentes, se dice que es alopoliploide o aloploide (Hahn, 2009; Hurles, 2004).

Las duplicaciones parciales del genoma se dan principalmente por entrecruzamiento desigual y retrotransposición. Esta última da lugar a pérdidas de intrones y secuencias regulatorias; para que estos genes sean expresados es necesario que se integren cerca de regiones regulatorias (Hahn, 2009; Zhang, 2003). La duplicación total del genoma (WGD, por sus siglas en inglés) ocurre mediante fenómenos de poliploidización, con posterior pérdida de genes y un arreglo del genoma. Esta clase de duplicación es poco frecuente ya que el genoma se vuelve inestable; a pesar de esto se ha encontrado que muchos organismos han divergido a partir de un evento de WGD (Van de Peer, Maere y Meyer, 2009). Para el linaje de *S. cerevisiae* se ha propuesto que la estabilidad de la célula aloploide fue proporcionada por la hibridación de dos células ancestrales, considerando tal hibridación como la consecuencia directa de su WGD (Marcet-Houben y Gablado, 2005).

Aun cuando existe controversia acerca de la contribución relativa de la

duplicación del genoma completo respecto a la duplicación de genes individuales (Sankoff, 2001), hay suficiente evidencia molecular para afirmar que la estructuras actuales de algunos genomas eucariontes son el resultado de uno o más eventos de duplicación genómica (Friedman y Hughes, 2001; Wolfe, 2001).

Los estudios comparativos de genomas completos han mostrado que la duplicación de grandes segmentos de DNA constituye un proceso continuo durante la evolución genómica de diferentes organismos (Friedman y Hughes, 2001; Ohno, 1970). Li y colaboradores han estimado que los genes duplicados constituyen un 15% del genoma humano (Li et al., 2001). De la misma forma, se ha encontrado que las secuencias duplicadas representan el 17% en *Haemophilus influenzae*, 8% del genoma de *Drosophila melanogaster*, el 20% en *Caenorhabditis elegans*, el 25% en *Arabidopsis thaliana* y 20% en *S. cerevisiae* (Mewes et al., 1997; Wolfe, 2001; Lynch y Conery, 2000).

Se considera que la WGD ha tenido un fuerte impacto en varios linajes tales como plantas, animales, hongos y protozoos (Jaillon et al., 2009). En plantas la WGD se ha identificado en las monocotiledóneas y dicotiledóneas (Coghlan et al., 2005), el evento más antiguo sugiere que todas las plantas con flor provienen de un ancestro poliploide (Blanc, 2004; Bowers, 2003). En animales se sugieren dos WGD ancestrales (Coghlan et al., 2005).

B. Las implicaciones de la duplicación génica: fuente evolutiva de diversidad biológica

El interés por descubrir cuáles son los mecanismos por los cuales un organismo adquiere nuevas características ha prevalecido desde antes de que Darwin publicara su famoso libro “El Origen de las Especies” en 1859, en el cual introduce la teoría de que las poblaciones evolucionan a través de las generaciones por un proceso de selección natural. Las duplicaciones genéticas constituyen una fuente primaria de material para el origen de novedades evolutivas; se ha propuesto que estos nuevos genes tienen inicialmente una función redundante, sin embargo, después de ser sometidos a una presión de

selección, los genes desarrollan diferentes tasas de evolución. El gen que tiene una capacidad evolutiva lenta, conserva la misma función mientras que el gen que se adapta a los cambios de las condiciones ambientales, evoluciona con rapidez y puede adquirir mutaciones que le permitan realizar nuevas funciones (Ohno, 1970).

Un modelo alternativo al modelo clásico mencionado anteriormente, es el modelo llamado duplicación, degeneración y complementación (DDC, por sus siglas en inglés) (Force et al., 1999; Hughes, 1994). Este modelo establece que muchos genes tienen dos funciones, después de la duplicación ambos duplicados mutan para llevar a cabo una de las dos funciones ancestrales. De manera que cada copia se especializa en una función única. Por ejemplo, en el caso de *K. lactis* que es una levadura tipo ancestral de *S. cerevisiae*, el gen *KIBAT1* codifica para una enzima bifuncional; que participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, por sus siglas en inglés), mientras que en *S. cerevisiae* existen dos enzimas que llevan a cabo esta función, Bat1 se especializó en la biosíntesis y Bat2 en el catabolismo (Colon et al., 2011).

La diferencia intrínseca de ambos modelos radica en que, el modelo clásico propone la evolución de nuevas funciones posterior a la duplicación genética, mientras que el modelo DDC propone que las funciones que realizan los genes duplicados ya existían anteriormente en su gen ancestral. Hay numerosos estudios que demuestran que los genes duplicados pueden adquirir nuevas funciones y patrones de expresión, considerándose como un elemento clave en la generación de la diversidad biológica (Conant y Wolfe, 2008; Kellis, Birren y Lander, 2004; Piskur y Langkjaer, 2004; Sidow, 1996). Por otra parte, también existen numerosos estudios que demuestran que el modelo DDC es importante en diversas especies de eucariontes (van Hoof, 2005; Yu et al, 2005; Jaillon et al., 2004; Force et al., 1999).

La duplicación génica conlleva la retención de genes en diversas especies. De manera general, se consideran cuatro destinos que pueden tener los genes

parálogos posteriormente a la duplicación:

1. Pérdida de función. Es un proceso neutral que elimina como gen funcional una de las copias duplicadas, que puede permanecer como un pseudogen o eliminarse por un re-arreglo cromosomal (Rastongi y Liberles, 2005; Schacherer et al., 2004; Sankoff, 2001).
2. Conservación de la función ancestral. Se da principalmente cuando la dosis adicional representa una ventaja y se mantiene por conversión génica constante. Es común en proteínas que forman complejos macromoleculares y en donde es importante mantener la estequiometría de las subunidades del complejo (Kellis et al., 2004).
3. Nueva función. Comprende un proceso adaptativo donde después de la duplicación una copia del gen conserva la función ancestral, mientras la otra copia muta (cambiando su secuencia codificante o regulatoria) hacia una función o especialización de algún aspecto de su actividad, que no estaba presente en el gen previo a la duplicación. Este mecanismo permite la retención de ambas copias (Rastongi y Liberles, 2005; Schacherer et al., 2004; Sankoff, 2001).
4. Sub-funcionalización. Consiste en la división de la función del gen ancestral entre los dos duplicados. Frecuentemente, la expresión de cada uno de los genes cambia, de tal manera que se expresan en diferentes condiciones ambientales o en diferentes fases del desarrollo del organismo. La sub-funcionalización también puede ocurrir a nivel de la proteína y puede llevar a una especialización funcional, cuando una de las dos proteínas adquiere la capacidad para llevar a cabo de manera más eficiente una de las funciones del gen parental (Peñalosa et al., 2012; Quezada et al., 2008; DeLuna et al., 2001).

Una duplicación genómica representa el aumento abrupto en el número de genes y el aumento en el número de genes se ha relacionado con transiciones importantes entre grupos de organismos, por ejemplo entre vertebrados e

invertebrados (Bird, 1995). En el caso de la levadura *S. cerevisiae* se hipotetiza que la retención selectiva de genes en doble copia contribuyó al desarrollo de su metabolismo facultativo (Merico, 2007; Piskur, 2004).

C. *S. cerevisiae* como modelo de estudio

La levadura *S. cerevisiae* se ha convertido en un modelo biológico importante de organismos eucariotas, debido a múltiples características (Zarin y Moses, 2014). Dentro de estas características caben mencionar las siguientes: comparte una arquitectura celular con eucariotas superiores con un genoma mucho más pequeño, es un organismo unicelular no patógeno que se puede cultivar fácilmente en el laboratorio con un tiempo de generación relativamente corto, presenta un ciclo de vida con fases biológicas, una haploide que facilita generar, aislar y caracterizar mutantes y una diploide idónea para realizar estudios de complementación; posee la capacidad de realizar recombinación homóloga a muy alta frecuencia, facilitando la obtención de mutantes para el estudio de la función de diversos genes; el 72% de su genoma codifica para proteínas (baja cantidad de intrones) y baja cantidad de secuencias repetidas, lo que permitió una rápida secuenciación y ensamblaje de su genoma. Además se cuenta con las secuencias de los genomas de 18 *Saccharomyces* relacionados, con los cuales se pueden realizar estudios comparativos (Mell, 2003; Wolfe, 2006).

D. Duplicación génica en la levadura *S. cerevisiae*

Con un poco más de 6,000 genes distribuidos en 16 cromosomas, el genoma de *S. cerevisiae* fue el primer genoma eucariote secuenciado, proyecto que tuvo una duración de 6 años (1990 a 1996) y en el que participaron varios consorcios internacionales (Wolfe, 2015). El análisis de la secuencia genómica de la levadura puso de manifiesto la existencia y la magnitud de la redundancia génica. Alrededor del 20% de su genoma está duplicado (Wolfe, 2015; Mewes, 1997).

Diversos estudios han demostrado que estos genes parálogos son el resultado tanto de una duplicación total del genoma que involucró la pérdida y retención selectiva de algunos de ellos, así como de eventos independientes de duplicación génica a menor escala.

En 1997 Wolf y Shields propusieron un modelo que propone que la duplicación total del genoma de *S. cerevisiae* era consistente con la hipótesis de Ohno que refleja la importancia de la poliploidía como mecanismo evolutivo (Wolfe, 2001). Ellos propusieron un modelo en el cual el ancestro de *S. cerevisiae* era una célula tetraploide degenerada a causa de la duplicación total del genoma, una serie de translocaciones entre cromosomas mediante la cual el material genético sufrió un re-arreglo y que finalmente, sólo una pequeña fracción de estos genes duplicados se retuvo (Gordon, 2011; Seoighe, 1998; Wolfe, 1997). Esta hipótesis fue apoyada por estudios realizados en el 2004, donde se encontraron en *S. cerevisiae* numerosos bloques parálogos de material genético que mostraban sintenia; de igual manera se hizo una comparación con *Kluyveromyces waltii*, que diversificó antes de la WGD, encontrando sintenia entre segmentos parálogos de *S. cerevisiae* y segmentos ortólogos de *K. waltii* (Kellis, 2004). Otros grupos secuenciaron especies de ascomicetos relacionados y confirmaron la hipótesis de Wolf y Shields. Los genomas de las levaduras que no sufrieron WGD conservaban una doble sintenia en relación con el genoma de *S. cerevisiae* como en el caso de *K. waltii*, es decir, en lugar de tener un par de regiones duplicadas tenían una región única que contenía todos los genes en un orden diferente (Dietrich, 2004; Dujon, 2004).

Basado en el alto nivel de sintenia encontrado entre los bloques de genes ancestrales duplicados que fueron reconstruidos, se propuso que la WGD en levaduras se originó a partir de un evento de autoploidización y se postuló que la WGD podría generar ciertas características para la adaptación a nuevos ambientes por medio de la diversificación de funciones (Gordon, 2011; Kellis, 2004). Sin embargo, también se sabe que la poliploidía se produce a costa de generar una inestabilidad genómica aun cuando la célula regrese a su ploidía

normal a través de mutaciones, pérdida de genes o re-ordenamientos (Mayer, 1990). Por otra parte, la mayoría de trabajos experimentales que comparan poblaciones con diferentes ploidías generalmente proporcionan apoyo a la superioridad de la ploidía normal frente a los aumentos de ésta (Gerstein, 2009).

En un estudio reciente que utilizó un nuevo enfoque filogenético (no utilizado en el linaje de *S. cerevisiae* anteriormente) analizaron la antigua duplicación del genoma, encontrando evidencia convincente de que el origen de la WGD se deriva de la hibridación entre especies ancestrales y no de una autoploidización como se había establecido y que además sirvió para dar estabilidad a la forma aloploide.

Finalmente se postula que la naturaleza de la ventaja evolutiva inicial de la WGD en la levadura sigue siendo una pregunta abierta y que brinda una nueva perspectiva a la interpretación de las consecuencias de la misma así como en las implicaciones de nuestra comprensión de la evolución de los genomas eucariontes en general (Marcet-Houben y Gabaldon, 2015).

E. Implicaciones de la WGD en *S. cerevisiae*

Todos los estudios sobre las implicaciones que trajo consigo la WGD se han realizado bajo el enfoque de autoploidía y han reflejado una divergencia funcional rápida después de la WGD, sin embargo si se contempla un escenario de un ancestro híbrido (aloploidía) una fracción de los genes duplicados previstos se originan de especies distintas, por lo que las diferencias funcionales no necesariamente serían causa de la presión evolutiva. Esto aunado a que la hibridación entre especies reúne diferentes propiedades fisiológicas y aísla sexualmente el linaje recién formado, proporcionando una ventaja selectiva inicial para explicar la WGD observada en los eucariontes (Marcet-Houben y Gabaldon 2015).

Aunque se desconocen las ventajas evolutivas iniciales que confirió la WGD a través de una antigua hibridación de dos especies, es evidente que la WGD tuvo

profundas consecuencias ya que el contenido doble del material génico en una especie dada crea de manera inmediata una barrera reproductiva entre ellos y sus ancestros, y proporciona materia prima para la divergencia de las funciones génicas entre parálogos (Wolfe, 2015).

Kluyveromyces lactis es una levadura relacionada con *S. cerevisiae*, que divergió del linaje de *Saccharomyces* antes del evento de duplicación génica. *K. lactis* posee un metabolismo estrictamente aerobio y la respiración no se reprime en presencia de glucosa; este fenómeno constituye una diferencia fisiológica importante entre *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Kellis et al., 2004).

Al igual que *S. cerevisiae* todas las levaduras que sufrieron WGD poseen características que les otorgan un metabolismo facultativo: a) degradan la glucosa o fructosa a etanol (fermentación), incluso en presencia de oxígeno (Efecto Crabtree); b) pueden crecer en ausencia de oxígeno; y c) generan mutantes mitocondriales deficientes en respiración, llamadas petites. Se ha propuesto que la conservación de genes parálogos facilitó la adquisición de este metabolismo facultativo en el periodo Cretácico, periodo en el cual surgieron las angiospermas, y el metabolismo facultativo fue un arma biológica importante para conquistar nichos ecológicos nuevos ya que mediante la producción de etanol las levaduras impedían el crecimiento de otros microorganismos (Merico et al., 2007; Force et al., 1999). Este hallazgo ha generado una ventana abierta hacia el interés en el estudio de los genes parálogos y su divergencia funcional.

Estudios recientes también proporcionan evidencias importantes para el entendimiento de la adaptación evolutiva independiente de la WGD. Un estudio muestra como especies que no duplicaron su genoma completo, pudieron desarrollar mediante una evolución independiente, rasgos parecidos a las especies que sufrieron WGD. Un ejemplo es la levadura *Dekkera bruxellensis* que al igual que *S. cerevisiae* es capaz de tolerar altas concentraciones de glucosa y etanol y consecuentemente llevar a cabo fermentación aeróbica. Es importante mencionar que *D. bruxellensis* se separó del linaje de *Saccharomyces* hace aproximadamente 200 millones de años, mucho antes de la duplicación total del

Existen dos grupos de fuentes de nitrógeno en base a la velocidad de crecimiento de las células. Un en el cuál, las células crecen rápidamente y tienen un mecanismo de NCR (Represión Catabólica Nitrogenada) muy activo y otro en el cuál, las células crecen más lento y se caracterizan por la activación del mecanismo de GAAC (Control General de Aminoácidos) (Gordon, 2007).

La NCR se activa cuando *S. cerevisiae* crece en fuentes primarias de nitrógeno, también llamadas fuentes represoras debido a que, el mecanismo consiste en reprimir la expresión de genes que codifican para permeasas (que transportan nitrógeno) y enzimas que participan en el catabolismo de fuentes no represoras o secundarias de nitrógeno (Magasanik y Kaiser, 2002). En *S. cerevisiae*, este mecanismo está regulado por cuatro factores transcripcionales (TF, por sus siglas en inglés) Gln3 y Gat1, que actúan como activadores y Dal80 y Deh1 que actúan como represores. Estos TF se unen a la secuencia consenso 5' GATAA 3' de la región promotora de sus genes blanco (Hofman-Bang, 1999). A su vez, se sabe que la activación por NCR está regulada por el complejo de proteínas sensible a rapamicina (TORC1, por sus siglas en inglés). En una fuente limitada de nitrógeno, la represión de TORC1 promueve la unión de Gln3 a la proteína citoplasmática Ure2 (por medio de fosforilación). Al unirse a Ure2, el TF Gln3 no puede entrar al núcleo y por lo tanto no puede activar a sus genes blanco (Beck y Hall, 1999).

El GAAC es un mecanismo que responde al estrés y a la disponibilidad de nutrientes en el medio. Cuando la levadura crece en un medio con pocos nutrientes la proteína Gcn2 se fosforila y promueve la transducción del TF Gcn4. Gcn4 es capaz de activar a más de 30 genes biosintéticos uniéndose a la secuencia 5' GAAC 3' de sus promotores (Hinnebusch, 2005).

Un estudio muestra que Gcn4 también puede ser activado a través de la represión de TORC1 y que bajo un tratamiento con rapamicina Gcn4 induce genes involucrados en biosíntesis de aminoácidos, intermediarios metabólicos y procesos de transporte en un número similar a los genes regulados por Gln3. Se determinó que Gcn4 actúa en conjunto con Gln3 activando genes que se

requieren para la asimilación de fuentes secundarias de nitrógeno tales como GABA. (Staschke, 2010).

G. Los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*

Existe un grupo de pares de genes (algunos provenientes del evento ancestral de aloploidización) en *S. cerevisiae*, que son particularmente interesantes debido a que están implicados en el metabolismo del nitrógeno y codifican enzimas que utilizan como sustratos algunos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo cual su actividad también debe estar acoplada al metabolismo central del carbono. Esto sugiere que su conservación en doble copia podría ser una adaptación a las necesidades del metabolismo facultativo (Colon et al., 2011).

Dentro de estas parejas de genes parálogos cabe mencionar a *GDH1* y *GDH3* que codifican para dos isozimas con actividad de glutamato deshidrogenasa (DeLuna et al., 2001), *LEU4* y *LEU9* que codifican para dos isopropilmalato sintasas (López et al., 2015), *LYS20* y *LYS21* que codifican para dos homocitrato sintasas (Quezada et al., 2008), *ALT1* y *ALT2* que codifican para transaminasas de alanina (Peñalosa, 2012), y *BAT1* y *BAT2* que codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (Colon et al., 2011).

Las transaminasas de aminoácidos o aminotrasferasas son un conjunto de enzimas del grupo de las transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido, usando como donador y receptor de amonio al glutamato y 2-oxoglutarato, respectivamente. Su reacción es libremente reversible y su constante de equilibrio es cercana a la unidad. Estas enzimas utilizan como cofactor al piridoxal 5'-fosfato (PLP, por sus siglas en inglés), derivado de la vitamina B6, que es uno de los cofactores biológicos más utilizados por enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Jansonius, 1998). Las transaminasas juegan un papel muy importante dentro del metabolismo de nitrógeno, ya que permiten la utilización de fuentes de nitrógeno diferentes a las involucradas directamente en el metabolismo central del nitrógeno (Colon et al.,

2011).

Los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* codifican para las aminotrasferasas de cadena ramificada Bat1 y Bat2 que participan en el último paso de la biosíntesis de BCAA y en el primer paso de su catabolismo (vía de Ehrlich) (Eden, Simchen y Benvenisty, 1996). El perfil de expresión en *BAT1* es predominantemente biosintético, mientras que en *BAT2* es predominantemente catabólico.

Es importante mencionar que, la única forma de obtener amonio a partir de los aminoácidos de cadena ramificada es a través de la transaminación mediada por Bat1 y Bat2. Se ha propuesto que el significado biológico de la vía de Ehrlich es mantener una baja concentración intracelular de α -cetóácidos con lo cual se empuja el flujo de la vía en sentido de la degradación de aminoácidos (Hazelwood et al., 2008).

El único ortólogo a los genes *BAT1* y *BAT2* presente en la levadura tipo ancestral *K. lactis* es el gen *KIBAT1* que codifica para una enzima bifuncional, que participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de BCAA. La enzima KIBat1 es 82% idéntica a Bat1 y 80% idéntica a Bat2.

En *S. cerevisiae* las funciones biosintética y catabólica se redistribuyó en las enzimas Bat1 y Bat2, respectivamente, a través de un proceso de subfuncionalización de los mecanismos que determinan la expresión de *BAT1* y *BAT2*. Bat1 es una proteína de 393 aa y 43,6 KDa con un punto isoeléctrico de 8.7. En el extremo amino terminal tiene un péptido señal de 16 aa que la dirige a la matriz mitocondrial. Bat2 es una proteína citosólica de 376 aa y 41,6 KDa con un punto isoeléctrico de 6.9 (Colon et al., 2011).

H. Regulación transcripcional en *S. cerevisiae*

Muchos mecanismos de genes regulatorios importantes han sido conservados en eucariotes. La levadura *S. cerevisiae* ha sido un modelo de estudio fundamental en el descubrimiento y elucidación de estos mecanismos conservados, incluyendo estructura y secuencias de activación río arriba en el

promotor, clasificación y regulación de TF (Hahn y Young, 2011).

Se han generado preguntas interesantes: ¿Cómo afecta a la maquinaria transcripcional básica el efecto de los activadores y represores? ¿Cómo son reguladas las actividades de los reguladores? ¿Cómo se integran las diversas vías de regulación para coordinar el crecimiento de la célula y responder a señales externas? (Struhl, 1995).

Se han hecho enormes avances para dar respuesta a estas preguntas y entender a cabalidad los mecanismos de regulación; sin embargo, aún queda mucho que explorar de estas áreas para determinar cómo cooperan entre sí la gran gama de factores transcripcionales y como mediante diversas interacciones son capaces de regular la expresión genética positiva o negativamente.

A lo largo de los años se ha tomado un interés particular en el estudio de la biosíntesis de BCAA en la levadura *S. cerevisiae* debido a las interesantes observaciones de sus mecanismos de regulación. La biosíntesis de BCAA tiene dos proteínas de regulación claves. Gcn4, que participa en la respuesta general a la escasez de aminoácidos y purinas y Leu3, que se creía un regulador específico de la biosíntesis de leucina y que ahora se ha comprobado que tiene efectos regulatorios en genes que participan en otras vías metabólicas (Boer et al., 2005; Kohlhaw, 2003).

I. Regulación y Expresión de los genes *BAT1* y *BAT2*

La expresión de *BAT1* se induce durante la fase logarítmica de crecimiento en condiciones que promueven la síntesis de BCAA (perfil biosintético) y su expresión disminuye en presencia del producto final. La expresión de *BAT2* aumenta en la fase estacionaria o en condiciones que requieren catabolismo de BCAA y es esencial para el crecimiento de *S. cerevisiae* en fuentes de carbono no fermentables. Además, las actividades enzimáticas de Bat1 y Bat2 son consistentes con su perfil de expresión (Colon, 2011; Schoondermark-Stolk et al., 2005, Eden et al., 1996).

Análisis *in silico* muestran que el promotor del gen *BAT1* tiene secuencias consenso para unión al DNA de los TF Gcn4 y Leu3 en muchas especies de levadura *sensu stricto* (levaduras que no sufrieron duplicación del genoma completo). Mientras que, en el promotor de *BAT2* se conservaron las cajas consenso de Gln3, Put3 y Leu3. En un estudio que se ha realizado recientemente en el laboratorio, a cerca de los elementos regulatorios *cis* y *trans* de *BAT1* y *BAT2* se ha demostrado que estos genes se encuentran bajo la regulación de más TF y que su expresión depende en gran parte de la concentración de metabolitos en la célula (Tesis de Doctorado, James Enrique González).

J. Mecanismo de regulación del factor transcripcional Leu3 y su cofactor α -IPM

Leu3 es un TF que pertenece a la familia de dedos de zinc, específicamente a la familia Zn(II)Cys₆, motivo conservado únicamente en los ascomicetos. Los miembros de esta familia contienen complejos de zinc binucleados donde los dos iones de zinc están unidos a seis residuos de cisteína y tienen la peculiaridad de reconocer el sitio de unión 5'CGGX_nCCG3' en la secuencia del promotor de sus genes blanco y de unirse como homodímero a esta secuencia (MacPhearson, 2006).

Leu3 puede actuar como represor o activador de genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de BCAA (Kohlhaw, 2003). La señal inmediata para llevar a cabo una regulación positiva de la transcripción, es un intermediario de la biosíntesis de leucina, el α -IsoPropil Malato (α -IPM), que se acumula durante la escasez de este aminoácido en el medio de cultivo. Leu3 permanece unido al DNA en ausencia de α -IPM, causando un efecto de represión basal por un mecanismo desconocido (Hahn and Young, 2011; Gou y Kohlhaw, 1996; Brisco y Kohlhaw, 1990).

Se han realizado experimentos del mecanismo de regulación de Leu3 en células de mamíferos, las cuales carecen de las vías metabólicas para biosintetizar BCAA. Se ha observado que, la regulación depende únicamente de la

concentración de α -IPM y que sigue el mismo mecanismo descrito en levadura. Estos experimentos descartan la posible existencia de un co-represor que intervenga en la represión basal ejercida por Leu3 en sus genes blancos y al mismo tiempo, se propone que la unión de α -IPM provoca un cambio conformacional que exhibe el dominio de activación de Leu3 para llevar a cabo la activación transcripcional. (Wang et al., 1997; Guo y Kohlhaw, 1996).

Existen estudios genéticos de mutantes del gen *LEU3* que también sugieren que el descubrimiento del dominio de activación de Leu3 se debe a interacciones intramoleculares e intermoleculares (Wang et al., 1999; Friden, et al., 1989). Por otro lado se encontró que *in vitro* la capacidad de Leu3 para ejercer represión en ausencia de α -IPM, se correlaciona con la presencia del TF TBP (proteína de unión a la caja TATA) asociada al TF Mot1 (involucrado en la represión de muchos genes codificantes en levadura) (Wade y Jaehning, 1996). Sin embargo, se desconoce el mecanismo.

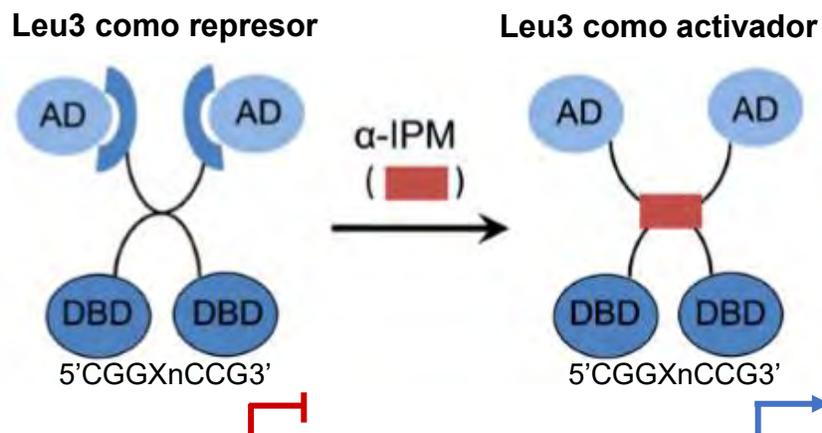


Figura 2. **Mecanismo de regulación de Leu3- α -IPM:** Las enzimas α -isopropil malato sintasas catalizan el primer paso de la biosíntesis de leucina, produciendo α -IPM como intermediario. Cuando hay mucha leucina en el medio, se produce una regulación negativa sobre las α -isopropil malato sintasas y la concentración de α -IPM disminuye. Cuando no hay suficiente leucina en el medio, la producción de α -IPM aumenta. Leu3 siempre se encuentra unido como homodímero a las secuencias palíndricas de unión a DNA de los genes que regula, por medio de un dominio de unión a DNA (DBD), independiente de su dominio de activación (AD). En ausencia de α -IPM, el AD de Leu3 se encuentra oculto entre interacciones intra e intermoleculares y actúa como un represor basal de los genes que regula. Sin embargo, cuando α -IPM se une a Leu3 tiene lugar un cambio conformacional que deja al descubierto su dominio de activación, de tal manera que Leu3 actúa como un activador. Imagen modificada, tomada de Hahn, 2011.

El complejo Leu3- α -IPM se ha caracterizado por ser un regulador transcripcional importante de la biosíntesis de BCAA. El GAAC ejerce una regulación de esta vía a un nivel más alto, mediado por Gcn4. El efecto de Gcn4 se realiza por dos mecanismos. Por un lado Gcn4 aumenta el nivel de Leu3 y por lo tanto la expresión de los genes que regula este TF. Por otro lado, Gcn4 es un regulador positivo de los genes *ILV3*, *LEU4*, *BAT1* y *BAT2*.

K. Genes regulados por el factor transcripcional Leu3

Hasta el 2003 análisis genéticos y bioquímicos habían demostrado que las expresiones de siete genes de *S. cerevisiae* estaban, al menos en parte, bajo el control de Leu3. Cinco de estos genes pertenecen a la vía de la biosíntesis de BCAA; *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2*, *ILV5*. Los dos restantes son *BAP2*, que codifica para una permeasa de aa encargada del transporte de BCAA y *GDH1* que es responsable de la asimilación de amonio en *S. cerevisiae* (Kohlhaw, 2003). Estos siete genes contienen un sitio de unión para Leu3 (5'CCGGNNCCGG3') en su región 5' no traducida, a excepción de *LEU4*, que tiene una secuencia de decanucleótido imperfecta (Friden y Schimmel, 1988).

En el 2005 se realizó un análisis con microarreglos de DNA, comparando a una cepa mutante *leu3 Δ* contra una cepa isogénica de referencia de *S. cerevisiae*; en limitación de nitrógeno y limitación de carbono. Este estudio se realizó con el fin de establecer el regulón de Leu3 *in vivo* y estudiar el impacto de esta regulación transcripcional en el metabolismo de nitrógeno y en la fisiología de *S. cerevisiae*.

En limitación de carbono la ausencia de Leu3 evidenció una reducción del nivel de transcripción de 5 genes establecidos previamente como blancos de Leu3 y que participan en la biosíntesis de BCAA, los cuales son: *ILV2*, *ILV5*, *LEU4*, *LEU1* y *LEU2*. Por otro lado, se observó una expresión reducida de un nuevo gen que participa en la biosíntesis de leucina e isoleucina, *BAT1* y dos genes más, *OAC1* que codifica para un transportador mitocondrial de oxalacetato, sulfato, tiosulfato y α -IPM y *GAT1* que codifica a un activador transcripcional que participa

en la regulación de nitrógeno (Boer et al., 2005).

En limitación de amonio se encontró un total de 87 genes sobre-expresados, de los cuales 62 participan activamente en la biosíntesis de aminoácidos. Un total de 47 genes reprimidos, de los cuales 13 genes participan en el metabolismo de las reservas energéticas, 34 en señales de transducción y 22 en otras vías. Además, se evidenció que en un medio con limitación de amonio los genes que se encuentran río arriba del α -IPM en la biosíntesis de BCAA, *ILV1*, *ILV2*, *ILV6*, *ILV3*, *LEU4*, *LEU9* y *BAT2* incrementaban su expresión en la *leu3* Δ en comparación con la WT; mientras que aquellos genes que se encuentran río abajo del α -IPM, *LEU1*, *LEU2* y *BAT1* disminuyeron su expresión en la mutante. Estos resultados sugieren que en condiciones en donde hay una limitación de amonio la ausencia de Leu3 provoca una escasez de leucina a la cual responde Gcn4 enmascarando la ausencia de la transcripción dependiente de Leu3 y esto fue evidente en genes tales como *ILV2*, *ILV5* y *LEU4* que han sido establecidos como blancos de Gcn4 (Boer, 2005). Por otra parte, en el medio con limitación de amonio la ausencia de Leu3 causó un drástico descenso del contenido de carbohidratos de almacenamiento y de la expresión de los genes que están involucrados en su metabolismo, tales como: *GAC1*, *GDB1*, *GLC3*, *GLG1*, *GPH1*, *GSY2*, *PCL6* y *PCL9* (Boer, 2005).

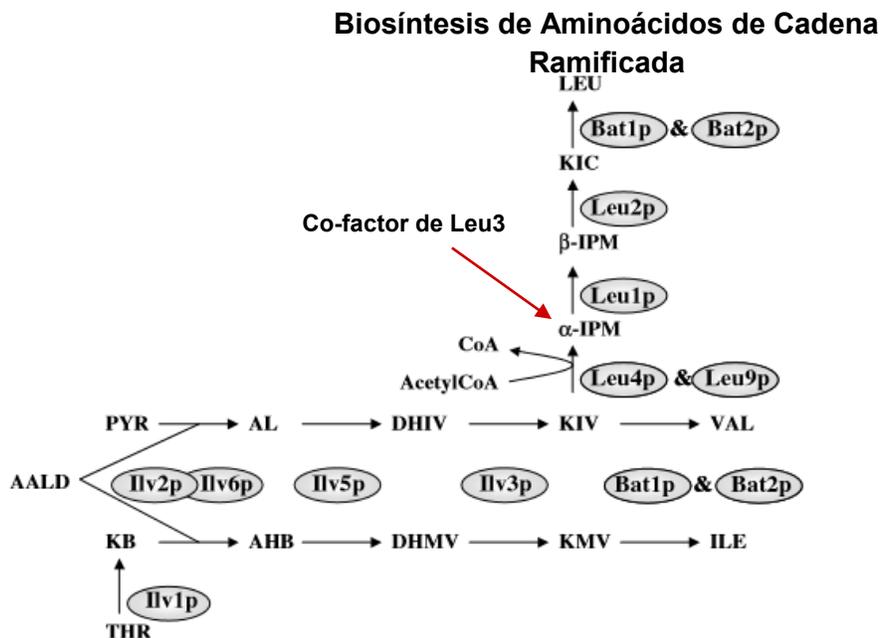


Figura 3. **Biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada.** Enzimas; Ilv1, Treonina desaminasa; Ilv2, subunidad catalítica de la acetolactato sintasa; Ilv6, subunidad regulatoria de la acetolactato sintasa; Ilv5, acetohidroxiácido reductoisomerasa; Ilv3, dihidroxiácido deshidratasa; Leu4, α -IPM sintasa I; Leu9, α -IPM sintasa II; Leu1, IPM Isomerasa; Leu2, β -IPM deshidrogenasa; Bat1, aminotransferasa de BCAA's mitocondrial; Bat2, aminotransferasa de BCAA's citosólica. Abbreviations: AALD, acetaldehído activo; PYR, piruvato; KB, α -cetobutirato; THR, treonina; AL, acetolactato; AHB, α -aceto- α -hidroxibutirato; DHIV, α,β -dihidroxi isovalerato; DHMV, α,β -dihidroxi- β -metil valerato; KIV, α -ceto isovalerato; KMV, α -ceto- β -metil valerato; α -IPM, α -isopropil malate; β -IPM, β -isopropil malato, KIC, α -ceto isocaproato; LEU, leucina; VAL, valina; ILE, isoleucina. Imagen modificada, tomada de Boer, 2005.

L. Secuenciación de nueva generación (Next-Generation Sequencing, NGS)

La secuenciación masiva de DNA nos permite analizar una amplia variedad de fenómenos biológicos mediante la colección de datos que se realiza a través de tecnologías de alto rendimiento. En los últimos tres años, paralelamente diversas plataformas de secuenciación de DNA han evolucionado rápidamente, reduciendo el costo en más de dos órdenes de magnitud. La NGS tiene el potencial de acelerar drásticamente la investigación biológica y biomédica, al permitir el análisis exhaustivo de los genomas, transcriptomas e interactomas (Shendure y Ji, 2008).

El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos de las células para una etapa de desarrollo específica o condición fisiológica. (Wang, Gerstein y Snyder, 2009). Numerosas tecnologías se han desarrollado para caracterizar el transcriptoma de una población de células incluyendo los microarreglos y el método de secuenciación de Sanger. Por otro lado, el desarrollo de los métodos basados en secuenciación de alto rendimiento ha cambiado la manera en la que se estudian los transcriptomas. La secuenciación de RNA (RNA-seq) implica la secuenciación directa de DNA complementario (cDNA) utilizando tecnologías de secuenciación de DNA de alto rendimiento seguido del mapeo de las lecturas de secuencias en el genoma (Garber et al., 2011; Nagalakshmi et al., 2010; Wang et al., 2009).

Hasta la fecha se han realizado muchos estudios comparativos de RNA-seq y microarreglos. Estudios comparativos entre las dos técnicas han sido reportadas

para *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, en tejido de ratón y en una variedad de células humanas (Nookae et al., 2012); y a pesar de que se ha demostrado que ambas plataformas tienen una alta consistencia en sus resultados de expresión diferencial, el RNA-seq ofrece varias ventajas clave sobre el resto de tecnologías. Algunas de ellas se presentan a continuación (Wang et al., 2009).

Tabla No. 1. Comparación entre técnicas para el análisis de transcriptomas

ESPECIFICACIONES TECNOLÓGICAS	MICROARREGLOS	SECUENCIACIÓN CDNA O EST	RNA-SEQ
Principio	Hibridación	Secuenciación de Sanger	Secuenciación de alto rendimiento
Resolución	De varios a 100 pb	Base simple	Base simple
Rendimiento	Alto	Bajo	Alto
Dependencia de la secuencia genómica	Sí	No	En algunos casos
Ruido de fondo	Alto	Bajo	Bajo
Simultáneamente mapea las regiones transcritas y la expresión génica	Sí	Limitado para la expresión génica	Sí
Rango dinámico de cuantificar el nivel de expresión de genes	Entre 100 y 1000	No práctico	> 8000 veces
Habilidad para distinguir diferentes isoformas	Limitado	Sí	Sí
Habilidad para distinguir la expresión alélica	Limitado	Sí	Sí
Cantidad necesaria de RNA	Alto	Alto	Bajo
Costo por transcriptomas	Alto	Alto	Relativamente baja

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios realizados en nuestro laboratorio (Tesis de Doctorado, James Enrique González) han identificado un mecanismo peculiar de la regulación del complejo Leu3p- α -IPM en la pareja de genes parálogos *BAT1* y *BAT2* de la levadura *S. cerevisiae*.

En condiciones fermentativas, con glutamina (GLN) como fuente de nitrógeno la cepa mutante *leu3* Δ de *S. cerevisiae* en comparación con la cepa WT:

1. Disminuye la expresión de *BAT1*
2. Aumenta la expresión de *BAT2*
3. En un cultivo en fase exponencial temprana la concentración de valina, leucina, alanina, glutámico, histidina y arginina es menor y la concentración de estos aminoácidos aumenta gradualmente a lo largo de la fase exponencial.

El perfil de expresión opuesto observado en *BAT1* y *BAT2*, indica que Leu3 reprime la expresión de *BAT2*. Sin embargo, resultados recientes revelaron que en una mutante *leu3* Δ /*Gcn4* Δ no se observa el aumento de expresión de *BAT2*, sugiriendo que, en GLN como fuente de nitrógeno la ausencia de Leu3 provoca una escasez de aminoácidos, dando una señal para que Gcn4 active genes biosintético, dentro de los cuales se encuentra *BAT2*.

En base a los resultados anteriores, se generaron las siguientes preguntas de:

- ¿Cuál es el regulón del complejo Leu3p- α -IPM en diferentes fuentes de nitrógeno?
- ¿Cuáles son los genes que en un fondo genético *leu3* Δ modifican su expresión por la presencia de Gcn4?
- ¿Gcn4 interviene en la regulación de genes cuando la *leu3* Δ crece en fuentes secundarias de nitrógeno?

VI. HIPÓTESIS

A. Hipótesis nula

En la levadura *S. cerevisiae*, el TF Leu3 regula el mismo grupo de genes sin importar la fuente de nitrógeno en la que crezca.

B. Hipótesis alterna

En la levadura *S. cerevisiae*, el TF Leu3 regula un grupo diferente de genes dependiendo de la fuente de nitrógeno en la que crezcan.

VII. OBJETIVOS

Identificar los genes regulados directa e indirectamente por el TF Leu3 de la levadura *S. cerevisiae* en diferentes fuentes de nitrógeno.

A. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los genes con expresión diferencial de la cepa WT y la mutante *leu3Δ* en fuentes primarias y secundarias de nitrógeno.
2. Determinar los posibles mecanismos de regulación del TF Leu3 cuando *S. cerevisiae* crece en glutamina, ácido γ -aminobutírico o Valina, Isoleucina y Leucina
3. Analizar la expresión diferencial de los genes regulados por Leu3 en una cepa que no produce α -IPM y una que acumula α -IPM.

VIII. METODOLOGÍA

A. Experimentos control: se realizaron estos experimentos con el fin de reproducir resultados obtenidos previamente en el laboratorio y confirmar las mutantes con las que se trabajó en este proyecto (ver resultados en la sección de apéndices).

1. Cepas: se utilizaron 3 mutantes construidas previamente para otros proyectos de investigación y una cepa silvestre (WT) derivada de la cepa S288c de la levadura *S. cerevisiae*

Tabla No. 2. Genotipo de las cepas utilizadas

NOMBRE O NOMENCLATURA	GENOTIPO	INDICACIONES Y CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
CLA1-2 (WT)	MAT α <i>ura3</i>	Se quitó el gen URA3 como marcador de selección. Auxótrofa de uracilo	Quezada et al., 2008
LEU3Δ	MAT α <i>ura3 leu3Δ::NAT</i>	Se quitó el gen <i>LEU3</i> y se agregó en su locus un gen de confiere resistencia al antibiótico nourseotricina. Auxótrofa de uracilo	Martínez, J. 2014 (tesis de licenciatura)
P_{ENO2}LEU4/9LEU1Δ	MAT α Pr _{ENO2} <i>LEU4</i> Pr _{ENO2} <i>LEU9</i> <i>leu1Δ::URA3</i> <i>leu^r</i>	Se quitó el gen <i>LEU1</i> y se agregó en su locus el gen <i>URA3</i> . Tiene a los genes <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> en su propio loci bajo el promotor del gen <i>ENO2</i> (sobre expresa <i>Leu4</i> y <i>Leu9</i>). Auxótrofa de leucina	González J. (tesis de doctorado)
LEU4ΔLEU9Δ	MAT α <i>leu4Δ::URA3</i> <i>leu9Δ::KanMX</i> <i>leu^r</i>	Se quitó el gen <i>LEU4</i> y se agregó a su locus el gen <i>URA3</i> . Se quitó el gen <i>LEU9</i> y se agregó en su locus a un gen que confiere resistencia al antibiótico geneticina. Auxótrofa de leucina	López et al., 2015

2. Protocolos de confirmación: las cepas mutantes fueron confirmadas mediante diferentes estrategias experimentales.

2.1. Caracterización fisiológica mediante fenotipo y curvas de crecimiento

Se preparó un pre-inóculo de cada una de las cepas en medio YPD y se dejó crecer durante 16 h. posteriormente se inocularon en 100 ml de Medio Mínimo (MM) con las fuentes de nitrógeno requeridas a una densidad óptica (DO 600nm) de 0.05 y se continuó midiendo la DO cada dos horas hasta las 12 horas (h) de crecimiento. En el caso de la WT vs *leu3Δ* se continuó midiendo a las 16 h, 25 h, 29 h y 34 h. En el caso de WT vs $P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ$ y *leu4Δleu9Δ* se midió nuevamente a las 25.5 h y 29 h.

Las curvas se graficaron en el programa software Prism versión 5.00 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/>), en donde se obtuvieron las pendientes (p) de cada curva. El tiempo de duplicación (T_d) y la velocidad específica de crecimiento (μ) se obtuvieron mediante las siguientes fórmulas:

$$T_d = \log_{10}2/p$$

$$\mu = \text{Ln}2/T_d$$

La μ se define como una medida de la capacidad de generación de biomasa que tiene la unidad de biomasa. Es decir, mide la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo.

2.2. Confirmación de la mutante *leu3Δ* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tabla No. 3. **Componentes de la PCR.**

COMPONENTES	CÁLCULO PARA 1 REACCIÓN	CÁLCULO PARA 3 REACCIONES (MIX)
5x phusion HF	5µl	15µ
10mm dNTP's	0.5µl	1.5µl
10µm oligo sentido	0.85µl	2.55µl
10µm oligo antisentido	0.85µl	2.55µl
Templado DNA (50ng/ul)	0.5µl	-
Phusion DNA polimerasa	0.12µl	0.36µl
H ₂ O miliQ	Aforar a 25µl	52.54µl

La PCR se realizó minimizando algunos componentes que sugiere el insertó de la enzima Phusion® High-Fidelity DNA polymerase.

Tabla No. 4. **Condiciones del termociclador**

TEMPERATURA	TIEMPO
94 °C	3 min
94 °C	30 seg
60 °C	30 seg
72 °C	2 min *
72 °C	5min
12°C	∞

*la polimerasa Phusion amplifica 1kb entre 15-30 segundo

Tabla No. 5. **Oligonucleótidos sentido y antisentido**

FRAGMENTO A AMPLIFICAR	SECUENCIAS
GEN <i>LEU3</i>	Fw 5' GAC TCG CTG CGT AAA ACC TC 3' Rv 5' CAA GGC TGG TTG GCG GTT TA 3'

Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar la región sobre el locus de *LEU3*, 240 pb río arriba en la región 5'UTR y 259 pb río abajo en la región 3'UTR.

2.3. Caracterización fisiológica mediante auxotrofías de crecimiento

Se hicieron los siguientes medios de cultivo sólido en placas petri con diferentes nutrientes para confirmar las auxotrofías de las cepas WT, *P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ* y *Leu4Δleu9Δ*.

Medio Mínimo + uracilo + leucina

Medio Mínimo + Leucina

Medio Mínimo + Uracilo

Se estrío una colonia de cada cepa directamente al medio sólido y se dejaron crecer durante 48 h a 30 °C.

2.4. Confirmación de la expresión mediante Northern Blot (NB)

2.4.1. Protocolo de extracción de RNA total: Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (FCI)

2.4.1.1. Cultivo celular

- a. Poner un pre-inóculo en 10 ml de YPD e incubar de 14-16 h. Sembrar los medios necesarios a una DO_{600} de 0.04 - 0.045. Cuando el cultivo llegue a una DO_{600} de 0.45-0.5 colocarlo en un tubo falcon estéril y centrifugar a 4 °C a 2800 rpm/3 min. Realizar 1 lavados con 10 ml de H₂O DEPC fría. Re-suspender las células (el pelet) en 1 ml de H₂O

DEPC fría y transferir a un Eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar a 4 °C durante 1 min y remover el líquido.

- b. Congelar con nitrógeno líquido y guardar a -70°C o extraer el RNA en el momento.

2.4.1.2. Extracción de RNA

- a. Adicionar 200 µl de buffer lisis, 200 µl de FCI y perlas de vidrio (~2/3 del volumen total).
- b. Agitar en vortex en el cuarto frío (6 °C) por 10 min (máxima velocidad). Luego centrifugar 10 min a 4°C.
- c. Tomar de sobrenadante entre 300-350 µl, transferir a un nuevo eppendorf y adicionar una cantidad igual de FCI, Centrifugar 5 min a 4 °C a máxima velocidad.
- d. Repetir el paso anterior lavando una vez más con FCI, dos con CI y una vez con C, tomar entre 25-30 µl menos de sobrenadante en cada lavado.
- e. Tomar el sobrenadante y transferir a un nuevo eppendorf que contenga 500 µl de etanol absoluto y 20 µl de NaAc 4 M. Agitar por inversión.
- f. Precipitar 3 h a -70 °C o toda la noche a -20 °C, centrifugar a 4 °C a 14,000 rpm por 10 min y remover el sobrenadante.
- g. Lavar el pelet adicionando 500 µl de etanol al 80 % y centrifugar 5 min a 14,000 rpm, descartar el sobrenadante y dejar secando el pelet a temperatura ambiente por 30 min.
- h. Re-suspender en 100 µl de H₂O DEPC y dejar disolver el pelet (alrededor de 2 h en hielo). Mezclar bien con pipeta (utilizar puntas con filtro) evitando hacer burbujas y medir la concentración en el Nanodrop.

2.4.1.3. Medir la concentración

- a. Encender el equipo y programar para la medición de RNA. Colocar como blanco H₂O DEPC (1.20 µl). Limpiar con un paño y cargar para las mediciones 1.20 µl de cada muestra. El pico de la gráfica debe estar en 260 nm (verificar pureza con las mediciones de 280/260 y 230/280).

2.4.2. Electroforesis

- a. Limpiar previamente la cámara y el tanque de electroforesis con SDS 1% y enjuagar con agua (H₂O) más DEPC
- b. Para preparar el gel (11x14 cm) mezclando 1 g de agarosa con 84 ml de H₂O y 10 ml de MAE 10X. Hervir 30 s, dejar enfriar a 55 °C aproximadamente y añadir 6 ml de formaldehído (en la campana). Vaciar en el molde para que se solidifique. Utilizar el peine de 10 pozos y 1.5 mm de grosor.
- c. Preparar en el momento el amortiguador de corrida (MAE1X y formaldehído 1.1%) y llenar el tanque con 900 ml de este.
- d. Preparar la muestra mezclando 10 µg de RNA con 22.5 µl de buffer de carga 1.25X y 1.5 µl de bromuro de etidio al 1%. Calentar las muestras a 65 °C durante 15 min, dar un pulso en la centrifuga y cargar los posos del gel de agarosa con cada muestra.
- e. Correr el gel a 60-80 volts durante 4-5 h (el colorante azul no debe salir del gel)

2.4.3. Transferencia de RNA

- a. Lavar 2 veces el gel obtenido en la electroforesis con 200ml de SCC 10X durante 20 min sobre el agitador (para quitar el exceso de formaldehído).
- b. Poner un vidrio apoyado en los bordes de un recipiente pyrex y verter en el recipiente 400 ml de SCC 10X.
- c. Encima del vidrio colocar papel filtro 3 mm de 35x14 cm, dejando cada extremo del papel filtro dentro del SCC 10X que se encuentra dentro del recipiente. Evitar dejar burbujas debajo del papel.
- d. Colocar el gel encima del papel filtro y sujetar los bordes del gel con tiras de parafilm para evitar que el SCC sea absorbido por las toallas de papel sin pasar por el gel.
- e. Humedecer una membrana de nylon cargada positivamente de 12x14 cm con H₂O destilada y luego dejar remojo en SCC 10X durante 5

min. Colocar la membrana encima del gel, es importante evitar que quede cualquier burbuja.

- f. Colocar encima de la membrana dos papeles filtro de 12x14 cm humedecidos con SCC 10X.
- g. Colocar sobre el papel filtro una pila de servitoallas y/o gacetas de 7-10 cm. Finalmente colocar algún objeto aproximadamente de 1 kg de peso. Dejar transfiriendo el RNA al menos por 12 h.
- h. Lavar la membrana con SCC 1X durante 30 s y fijar covalentemente el RNA a la membrana iluminándola con luz ultravioleta durante 5 min.

2.4.4. Hibridar, exponer y revelar la membrana.

- a. Colocar la membrana en un tubo de hibridación y pre-hibridar la membrana con 10 ml de buffer de pre-hibridación durante 1 h a 65 °C
- b. Marcar las sondas necesarias siguiendo el inserto del kit de Random Primer (Stratagene). Hervir durante 10 min en baño maría y colocar inmediatamente en hielo.
- c. Cambiar el líquido de pre-hibridación por 15 ml de buffer de pre-hibridación nuevo y agregar la sonda marcada radioactivamente. Incubar a 65 °C durante al menos 12 h.
- d. Lavar la membrana con solución de baja y alta astringencia a 65 °C durante el tiempo necesario para remover la marca radioactiva adherida a la membrana inespecíficamente.
- e. Colocar la membrana envuelta en plástico (plastipack) en un cassette de autorradiografía durante al menos 14 h. Llevar al typhon a revelar la pantalla.

B. Extracción y Secuenciación de RNA

Se enviaron muestras de RNA total a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA (UUSMD) del Instituto de Biotecnología -IBT-, UNAM; de las siguientes cepas: WT, *leu3Δ*, *P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ* (triple mutante) y *leu4Δleu9Δ* (doble mutante) en medio con glucosa como fuente de carbono y

glutamina (GLN), ácido γ -aminobutírico (GABA) o valina, isoleucina y leucina (V I L), como fuente de nitrógeno.

El RNA total (RNA_t) se extrajo con el protocolo descrito en el inciso 2.4.1.2. El RNA_t se purificó con el kit RNAeasy mini de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras obtenidas cumplieron con las siguientes características:

1. 5-10 μ g de RNA_t en 25 μ l de H₂O libre de Rnasas
2. Número de Integridad del RNA (RIN) mayor a 9
3. Relación del RNA ribosomal 25S/18S mayor a 1.6
4. Relación absorbancia 260/280 entre 1.8-2.0

Las librerías para el RNA-seq fueron preparadas a partir de RNA_t siguiendo el protocolo *High Sample (HS) Protocol* del *TrueSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit* de Illumina. Las librerías que contenían cDNA de cada muestra fueron secuenciadas con el equipo NexSeq 500 de Illumina, configurado para lecturas simples de 75 pb en el caso de la cepa WT y la mutante *leu3 Δ* , y lecturas dobles de 75 pb para la triple y doble mutante.

C. Análisis de expresión diferencial

El control de calidad de las lecturas se llevó a cabo con el software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), removiendo las lecturas con una calidad por debajo de Q30. Las lecturas crudas fueron mapeadas contra el genoma de referencia de *S. cerevisiae* S288c de *NCBI genome database* (GCF_000146045.2_R64_genomic.fna) con el software Bwa-0.7.12 (<https://www.hpc.science.unsw.edu.au/software/bwa/0712>)

El análisis de expresión diferencial de las dos replicas biológicas fue llevado a cabo mediante el lenguaje de programación R (R Development Core Team, 2011), utilizando los paquetes edgeR (Robinson, McCarthy, y Smyth, 2010), DESeq (Anders y Huber, 2010) y NOIseqBIO (Tarazona et al., 2015). Para normalizar los datos se utilizó el método de normalización propio de cada paquete

con al menos una cuenta por millón. En base a los resultados de los 3 programas se realizó un Ranking 200 para elegir el programa más adecuado y filtrar los datos. Los resultados finales se obtuvieron del análisis de expresión diferencial con el software NOIseqBIO con una probabilidad mayor o igual a 0.95 y un Log Fold Change (LogFC) mayor a 1.

Las gráficas observadas en este proyecto se realizaron en R con los paquetes ggplot2 (Ito y Murphy, 2013), GOplot (Walter, Sanchez-Cabo y Ricote, 2015) y Cytoscape (Shannon et al., 2003), según el caso, mientras que los datos de las redes de interacción y la agrupación de genes por procesos (procesos biológicos y rutas metabólicas) se obtuvo en el paquete String (Szklarczyk et al., 2017) con una restricción moderada-alta de 0.7 y gProfiler (Reimand et al., 2016) con un FDR < 0.05.

IX. RESULTADOS

A. Secuenciación masiva mediante RNA-seq.

- Control de calidad:** se realizó una electroforesis y un electroferogramas de las muestras de RNAt de las cepas WT, *leu3* Δ , *P_{ENO2}LEU4/9leu1* Δ y *leu4* $\Delta*leu9* Δ previo a su secuenciación; con el fin de evaluar su integridad.$

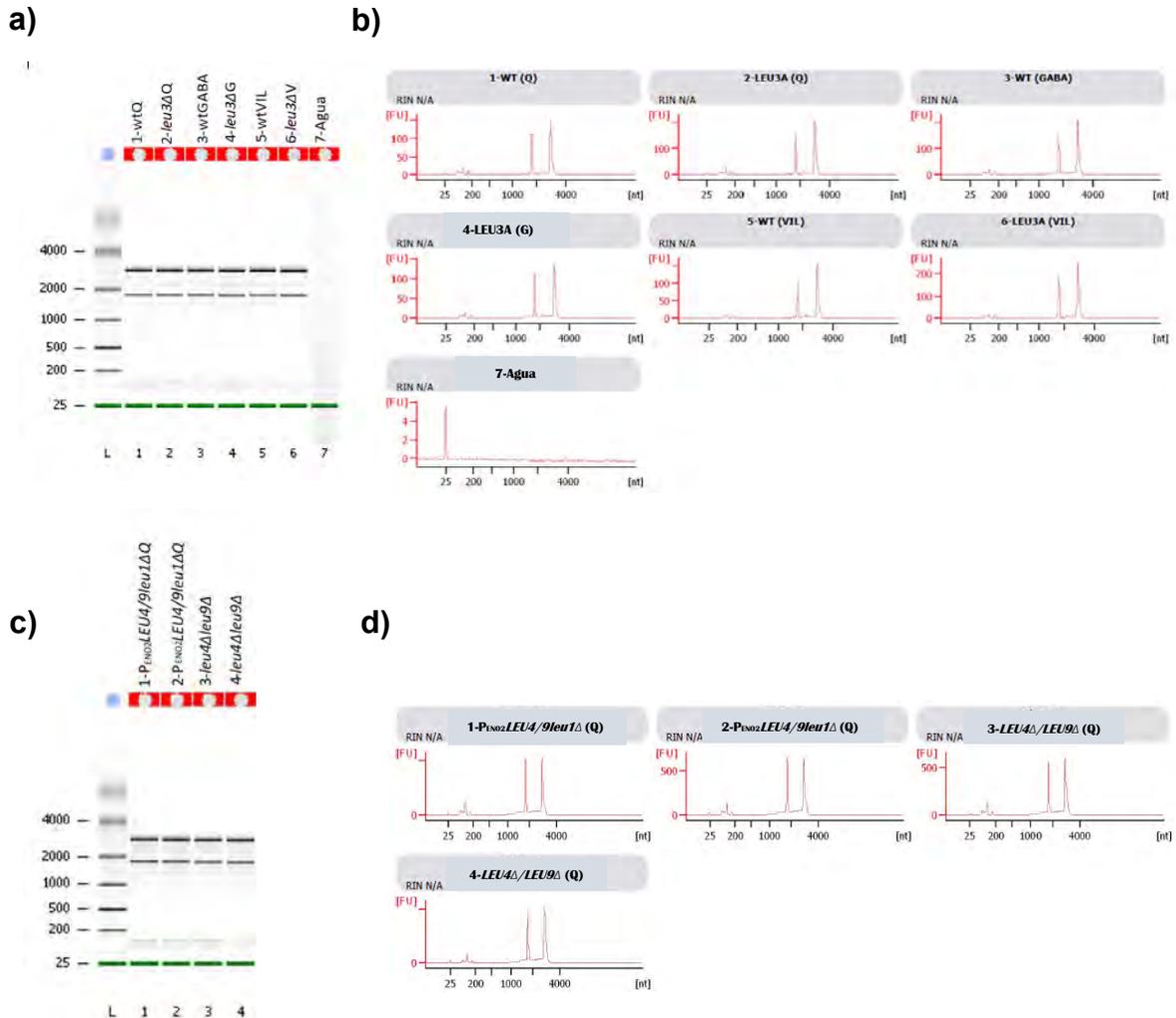


Figura 4. Control de calidad de cada una de las muestras de RNAt extraído de las cepas WT, *leu3* Δ , *P_{ENO2}LEU4/9leu1* Δ (triple mutante) y *leu4* $\Delta*leu9* Δ (doble mutante) cuando crecen en un medio con GLN, GABA o V I L. Las figuras 4a y 4c muestran los resultados de electroforesis. Los carriles L contienen el marcador de peso molecular y en el resto de carriles se encuentran las muestras de RNAt. Las figuras 3b y 3d muestran los resultados de los electroferogramas. Los ejes Y representan la fluorescencia absorbida y$

los ejes X representa el peso molecular. En las figuras 3a y 3b se observan las muestras de RNAt de la cepa WT y la *leu3Δ*, cuando crecieron en un medio con GLN (figura 4a, carril 1 y 2; figura 4b, panel 1 y 2), GABA (figura 4a, carril 3 y 4; figura 4b, panel 3 y 4) o V I L (figura 4a, carril 5 y 6; figura 4b, panel 5 y 6). Se muestran únicamente las imágenes de los resultados de la réplica biológica (RB) 1. Los resultados de la RB 2, son similares. En las figuras 4c y 4d, se observan las muestras de RNAt de la triple y la doble mutante, cuando crecieron en un medio con GLN (no se realizó secuenciación de RNA para la triple y la doble mutante cuando crecieron en GABA o V I L). La figura 4c, carril 1 y 2 y figura 4d, panel 1 y 2; muestran los resultados del control de calidad de las muestras de RNAt de las RB 1 y 2 de la triple mutante. La figura 4c, carril 3 y 4 y figura 4d panel 3 y 4; muestran los resultados de la RB 1 y 2 de la doble mutante. Las corridas se validaron utilizando agua como control negativo (figura 4b, panel 7).

Cada una de las muestras de RNAt tuvo un RIN (valor de integridad del RNA) de entre 9 y 10. Se aprecia en ambas imágenes de electroforesis (figura 4b y 4c) que las muestras no sufrieron degradación, el resultado se confirma observando en los electroferogramas (figura 4b y 4d) los picos bien definidos de las poblaciones de RNA ribosomal 16S y 25S de *S. cerevisiae*. Estos resultados indican que, las muestras de RNAt enviadas a secuenciar fueron de muy buena calidad.

2. Lecturas y porcentaje de mapeo: la secuenciación se realizó con el equipo NexSeq 500 de Illumina y las lecturas obtenidas (posterior a su análisis de calidad, ver metodología) fueron mapeadas contra el genoma de referencia de *S. cerevisiae* S288c.

Tabla 4. **Muestras de la RB 1**

	Cepa WT			Mutante <i>leu3Δ</i>		
	GLN	GABA	V I L	GLN	GABA	V I L
Secuenciación	1x75	1x75	1x75	1x75	1x75	1x75
Lecturas totales	18335155	21282715	19122749	27559925	21483862	15378198
Porcentaje de lecturas mapeadas	95.20 %	94.53 %	94.967 %	95.31 %	95.08%	95.16 %

Tabla 5. **Muestras de la RB 2**

	Cepa WT			Mutante <i>leu3Δ</i>		
	GLN	GABA	V I L	GLN	GABA	V I L
Secuenciación	1x75	1x75	1x75	1x75	1x75	1x75
Lecturas totales	18948906	9392987	15784703	16952825	16402742	18237729
Porcentaje de lecturas mapeadas	95.02 %	95.60 %	94.86 %	95.17 %	95.46 %	95.31 %

Tabla 8. **Muestras de la RB 1 y RB 2 en glutamina**

	$P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ$		<i>leu4Δleu9Δ</i>	
	RB 1	RB 2	RB 1	RB2
Secuenciación	2X75	2X75	2X75	2X75
Lecturas totales	28545878	31295842	27505362	33436390
Porcentaje de lecturas mapeadas	92.91 %	94.34 %	95.28 %	94.18 %

Las Tablas muestran el tipo de secuenciación, el número total de lecturas obtenidas después de la secuenciación y el porcentaje de lecturas que mapearon contra el genoma de referencia de la cepa WT S288c de *S. cerevisiae*. En la tabla 6 y 7 se observan los resultados de las muestras de RNA secuenciadas de la cepa WT y la mutante *leu3Δ* cuando crecieron en un medio con GLN, GABA o V I L. En la tabla 8 se observan los resultados de las muestras de mRNA (RNA mensajero) secuenciadas cuando la triple y la doble mutante crecieron en GLN como fuente de nitrógeno.

Aunque es evidente que se obtiene una cantidad mayor de lecturas con un tipo de secuenciación pareado (Tabla 8), la ventaja de contar con bases de datos de un genoma de referencia pequeño y completamente secuenciado como el de *S. cerevisiae*, evita la necesidad de utilizar este tipo de secuenciación y obtener aun así una buena cobertura (Tabla 6 y 7) con un porcentaje general de lecturas mapeadas mayor al 90% para todos los casos.

B. Análisis de expresión diferencial (ED)

1. Tabla 9. **Punto de corte y filtrado de datos:** se realizó un análisis en base a un ranking 200, con el fin de elegir el mejor paquete para filtrar los datos de ED.

RANKING 200														
edgeR					NOIseqBio					DESeq				
Genes					Genes					Genes				
control	FDR	Posición	LogFC	Posición	control	Prob	Posición	Log2FC	Posición	control	padj	Posición	Log2FC	Posición
<i>LEU2</i>	1.03E-05	9	-2.63	147	<i>LEU2</i>	1	3	-2.64	14	<i>LEU2</i>	0.004	8	-2.66	14
<i>BAT2</i>	0.001	27	2.04	NA	<i>HIS4</i>	1	4	1.28	134	<i>BAT2</i>	0.01	14	2.01	33
<i>LEU1</i>	0.095	88	-1.43	NA	<i>LEU1</i>	1	15	-1.45	90	<i>LEU1</i>	0.6	65	-1.47	80
<i>GDH1</i>	0.17	112	1.32	NA	<i>GDH1</i>	1	18	-1.34	118	<i>GDH1</i>	1	NA	1.35	110
<i>HIS4</i>	0.19	115	1.29	NA	<i>BAT1</i>	0.99	34	-1.16	188	<i>HIS4</i>	1	NA	1.27	137
<i>LEU4</i>	0.23	136	1.25	NA	<i>ILV1</i>	0.99	37	1.17	185	<i>LEU4</i>	1	NA	1.21	162
<i>ILV1</i>	0.307	166	1.18	NA	<i>LEU4</i>	0.97	54	1.23	156	<i>BAT1</i>	1	NA	-1.18	181
<i>BAT1</i>	0.34	188	-1.14	NA	<i>BAT2</i>	0.96	59	2.03	33	<i>ILV1</i>	1	NA	-1.15	190
<i>ILV2</i>	0.76	NA	0.86	NA	<i>GCN4</i>	0.95	80	0.6	NA	<i>GCN4</i>	1	NA	0.58	NA
<i>ILV6</i>	0.9	NA	0.75	NA	<i>ILV3</i>	0.94	87	0.68	NA	<i>ILV3</i>	1	NA	0.66	NA
<i>ILV3</i>	0.99	NA	0.69	NA	<i>ILV6</i>	0.94	95	0.74	NA	<i>ILV6</i>	1	NA	0.73	NA
<i>GCN4</i>	1	NA	0.61	NA	<i>ILV2</i>	0.91	120	0.84	NA	<i>ILV2</i>	1	NA	0.83	NA

En la Tabla 9 se muestra el análisis de ranking 200 para los resultados del análisis de ED cuando la cepa WT y mutante *leu3Δ* crecieron en GLN como fuente de nitrógeno. El análisis de ED se realizó con 3 paquetes del lenguaje de programación en R (R Development Core Team, 2011); edgeR (Robinson, McCarthy y Smyth, 2010), NOISeqBio (Tarazona et al., 2015) y DESeq (Anders y Huber, 2010). Los resultados obtenidos por

cada paquete se ordenaron del más al menos significativo, hasta el resultado número 200; según la confiabilidad de los datos (False Discovery Rate -FDR-, Probabilidad -Prob-, valor de p ajustado - p_{adj} -), es decir la probabilidad de obtener resultados falsos positivos y según la diferencia en la expresión con respecto a la WT (log Fold Change -logFC-). El análisis estadístico de confiabilidad en cada paquete se interpreta de manera diferente, en edgeR y DESeq se recomienda tener un FDR y un p_{adj} ; respectivamente, no mayor a 0.05, en NOIseqBIO se recomienda una Prob mayor a 0.95. El análisis de LogFC se interpreta igual en los 3 paquetes; un mayor LogFC indica una diferencia mayor de expresión en la mutante con respecto a la WT. NA significa que el valor no se encuentra dentro de los primeros mejores doscientos resultados y por lo tanto no se incluye en la tabla. La mayoría de genes control evaluados, son genes que tienen antecedentes de ser regulados por Leu3 en alguna condición en particular.

Las mejores posiciones se obtuvieron con el paquete NOIseqBIO, con una Prob > 0.95 y un LogFC > 1 (Tabla 9).

EdgeR y DESeq son de los métodos paramétricos más utilizados y confiables para medir expresión diferencial, sobre todo cuando se tienen muchas RB. EdgeR estima la expresión diferencial utilizando una estimación empírica de Bayes y un test exacto basado en un modelo binomial negativo. DESeq utiliza un modelo binomial negativo similar, pero modela la relación observada entre la media y la varianza, al estimar la dispersión, permitiendo una estimación de parámetros más general, basada en los datos (Seyednasrollah, 2013).

Se ha reportado que los métodos paramétricos tienen más poder que los enfoques no paramétricos como NOIseqBIO. Sin embargo, los métodos paramétricos pueden conducir a resultados no fiables si los supuestos distributivos no se cumplen, como suele suceder cuando se cuenta con un número reducido de réplicas biológicas como en nuestro caso. Esto aunado a que, en algunas de nuestras replicas biológicas se observó una dispersión significativa.

NOIseqBIO al ser un método no paramétrico no asume ningún tipo de distribución sino la determina según los datos observados. Además, al igual que edgeR, implementa un enfoque empírico de Bayes que mejora el manejo de variabilidad biológica específica de cada gen y que por lo tanto

es muy efectivo en el control de FDR muy altos (Tarazona, 2015), como se aprecia en la tabla anterior. Es importante hacer notar que a pesar de las diferencias en los resultados de confiabilidad de cada programa, la consistencia de los genes que se encuentran fuera del punto de corte escogido se mantiene.

- Validación de los resultados:** para validar los análisis de ED, se compararon los resultados de expresión obtenidos por la técnica de RNA-seq contra los obtenidos por NB.

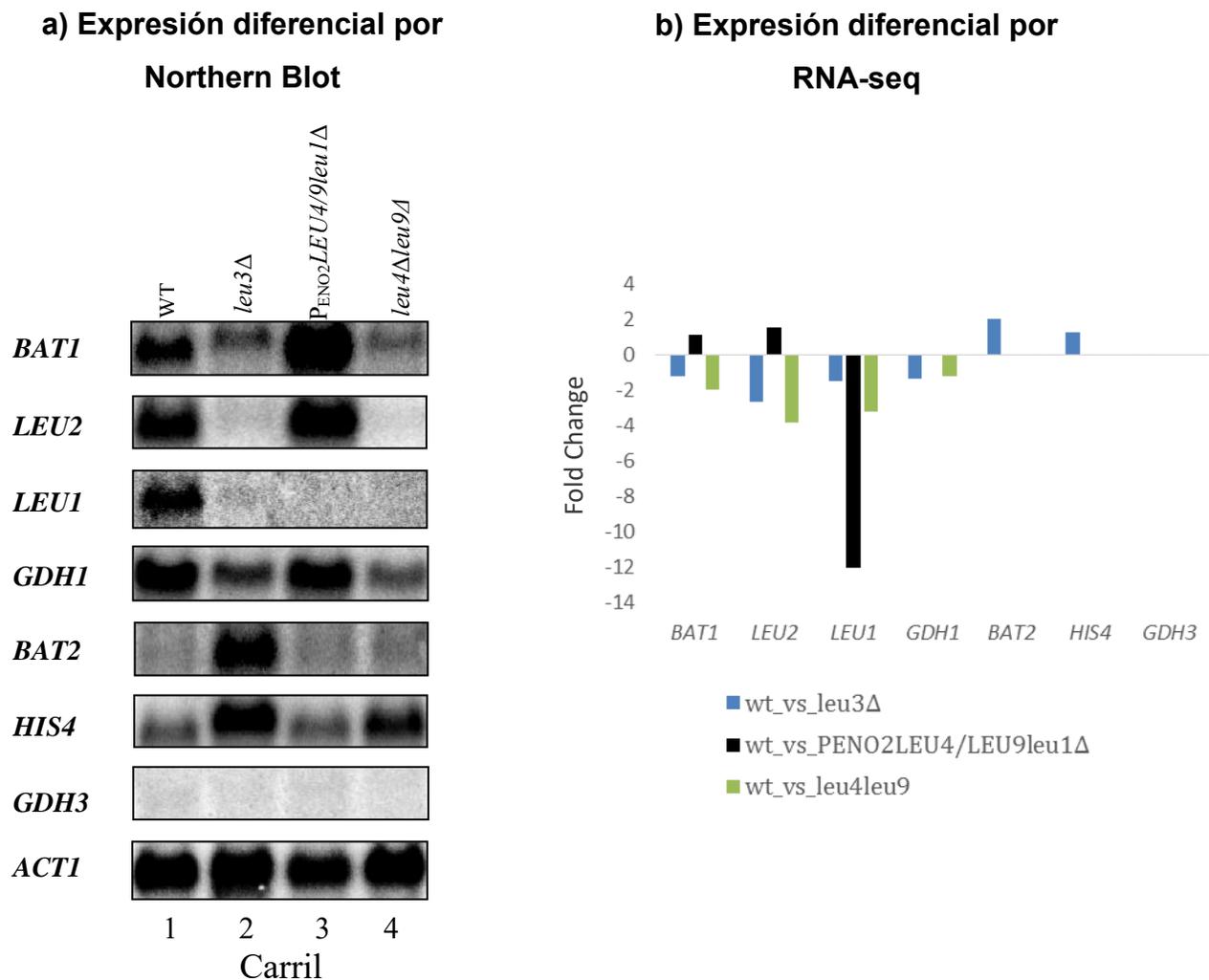


Figura 5. Validación de los resultados de expresión diferencial. El RNA se

extrajo de las cepas WT, *leu3* Δ , $P_{\text{ENO2}}LEU4/9leu1\Delta$ (triple mutante) y *leu4* Δ *leu9* Δ (doble mutante), cuando crecieron en GLN como fuente de nitrógeno. Se escogieron 4 genes regulados directamente por Leu3- α -IPM (*BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1*), 2 genes que aumentan su expresión en la mutante *leu3* Δ por la activación del mecanismo del GAAC (*BAT2* y *HIS4*) y un gen que no se expresa en glucosa como fuente de carbono (*GDH3*, control negativo). En la Figura 5a, NB; el eje Y indica el nombre de los genes control (*ACT1* es un gen constitutivo que se utilizó como control de carga de RNA). En el eje X se encuentran los carriles numerados del 1 al 4 e identificados con el nombre de la cepa de la que se extrajo el RNA. En la Figura 5b, RNA-seq; el eje Y representa el número de veces que aumenta o disminuye la expresión de los genes de cada mutante con respecto a la WT y se representa como un cambio en términos logarítmicos (LogFC). En el eje X se encuentran los nombres de los genes control. Las barras se clasifican por colores para identificar la ED de cada una de las mutantes con respecto a la cepa WT; *leu3* Δ (azul), $P_{\text{ENO2}}LEU4/9leu1\Delta$ (negro) y *leu4* Δ *leu9* Δ (verde).

Se ha descrito que los genes *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1* siguen un mecanismo de regulación canónico ejercido por Leu3- α -IPM; por lo tanto, son activados por Leu3 únicamente en presencia α -IPM. En la mutante *leu3* Δ la expresión de *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1* disminuyó con relación a la expresión de la WT (figura 5a, carril 1 y 2; figura 5b, barras azules), demostrando que Leu3 actúa como un regulador positivo para estos genes. En la doble mutante *leu4* Δ *leu9* Δ , incapaz de producir α -IPM, la expresión de *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1* disminuyó con relación a la expresión de la cepa WT (figura 5a, carril 1 y 4; figura 5b, barras verdes). Esto indica que, se necesita de Leu3 y α -IPM para activar la transcripción de *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1*, en ausencia de cualquiera de los dos, la expresión de estos genes disminuye. En la triple mutante, que acumula α -IPM, vimos un aumento de la expresión de *BAT1* y *LEU2* con respecto a la cepa WT. La expresión de *LEU1* disminuyó y la de *GDH1* no cambió (figura 5a, carriles 1 y 3; figura 5b, barras negras). La disminución de la expresión de *LEU1* en la triple mutante se debe a que, su construcción implicó generar un genotipo *leu1* Δ . En el caso de *GDH1*, los resultados obtenidos por RNA-seq mostraron un LogFC de 0.44 y una Prob de 0.98. Sin embargo, esta ED no se muestra en la figura ya que, no es mayor al punto de corte establecido LogFC > 1 para el análisis de los datos.

BAT2 y *HIS4* aumentaron su expresión en la mutante *leu3Δ* con respecto a la cepa WT (figura 5a, carril 1 y 2; figura 5b, barras azules), dando la impresión de que Leu3 actúa como represor. Sin embargo, *BAT2* y *HIS4* no han sido reportados como genes que se regulen por Leu3- α -IPM. En el trabajo de Doctorado de James Enrique González, 2017; se comprobó que este aumento de expresión se debe a la regulación positiva de Gcn4, como una forma de responder a la escasez de aminoácidos que se genera por la ausencia de Leu3. En la doble mutante la expresión de *BAT2* no cambió con relación a la expresión de la WT (figura 5a, carril 1 y 4, figura 5b, barra verde), demostrando que la ausencia de α -IPM no afecta su regulación. La expresión de *HIS4* se ve ligeramente aumentada en el NB (figura 5a, carril 1 y 4), pero no en los resultados de RNA-seq (figura 5b, barra verde). Cabe mencionar que *HIS4* obtuvo un LogFC de 0.69 y una Prob de 0.99. En la triple mutante la expresión de *BAT2* y *HIS4* no cambió con respecto a la expresión de la WT (figura 5a, carriles 1 y 3; figura 5b, barras negras), demostrando que la acumulación de α -IPM no tienen un efecto en su regulación.

El gen *GDH3*, utilizado como control negativo, no cambió su expresión en ninguna de las mutantes con respecto a la expresión de la cepa WT (figura 5a, carriles 1, 2, 3 y 4; figura 5b, barras azules, negras y verdes). Este resultado, le otorga más credibilidad a los datos.

Las diferencias en la expresión genética de *BAT1*, *LEU2*, *LEU1*, *GDH1*, *BAT2*, *HIS4* y *GDH3* obtenidos por NB (figura 5a) fueron consistentes con los resultados obtenidos por RNA-seq (figura 5b). En consecuencia, se puede garantizar que todo el proceso de secuenciación y filtrado de datos se realizó de manera adecuada.

3. Expresión diferencial de la cepa WT: se cuantificó el número de genes que aumentaron y disminuyeron su expresión cuando la cepa WT de *S. cerevisiae* creció en GLN, GABA o V I L, con el fin de evaluar el cambio de expresión genética en diferentes fuentes de nitrógeno.

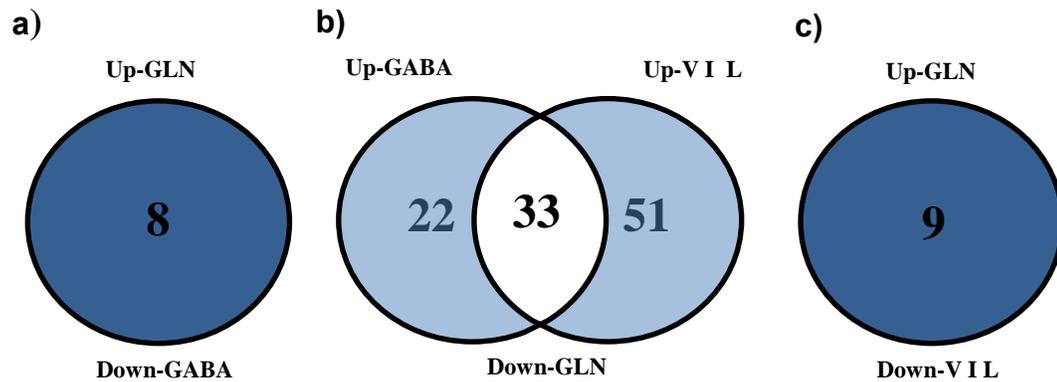


Figura 6. **Expresión diferencial de la cepa WT.** En la figura 6a y 6c se muestra el número de genes que aumentaron su expresión cuando la WT creció en un medio con GLN, pero que disminuyeron su expresión cuando creció en un medio con GABA (figura 6a) o V I L (figura 6b). En la figura 6b, se muestra el número de genes que disminuyeron su expresión cuando la WT creció en un medio con GLN, pero que aumentaron su expresión cuando la WT creció en un medio con GABA (figura 6b, lado izquierdo) o V I L (figura 6b, lado derecho). La intersección de la figura 6b muestra el número de genes en común que aumentaron su expresión en un medio tanto con GABA como con V I L, mientras que disminuyeron su expresión en un medio con GLN.

Se detectaron 17 genes que aumentaron su expresión cuando la WT creció en GLN. De estos 17 genes 8 disminuyen su expresión cuando la WT creció en GABA (*AGP1*, *BAP3*, *CIS3*, *CPR1*, *CWP2*, *GDN1*, *TPO2*, y *TSA1*) (figura 6a) y 9 disminuyeron su expresión cuando la WT creció en V I L (*BAT1*, *CWP2*, *CYC1*, *HMX1*, *ILV3*, *LEU1*, *NDE1*, *TSA1* y *URA1*) (figura 6c). Un total de 106 genes disminuyeron su expresión en GLN. 22 de éstos aumentaron su expresión cuando la WT creció en GABA, 51 aumentaron su expresión en V I L y los 33 restantes aumentan su expresión en ambas condiciones.

4. Expresión diferencial de la mutante *leu3Δ*: Se cuantificó el número de genes que aumentaron y disminuyeron su expresión cuando la mutante *leu3Δ* creció en GLN, GABA o V I L, comparándola con la cepa WT, con el fin de evaluar el cambio de expresión genética en diferentes fuentes de nitrógeno.

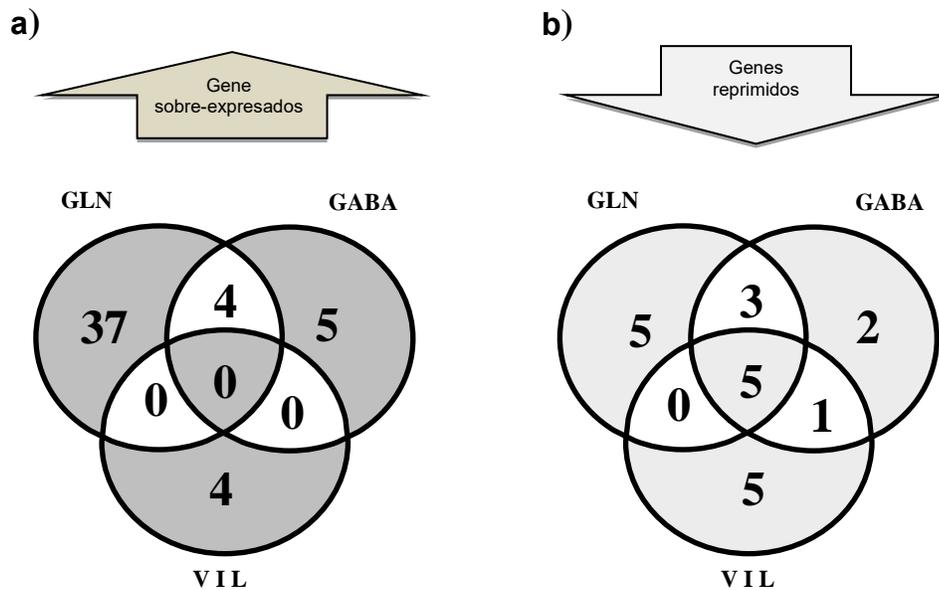


Figura 7. **Expresión diferencial de la mutante *leu3Δ*.** Número de genes que aumentaron su expresión (figura 7a) y número de genes que disminuyeron su expresión (figura 7b) en la mutante *leu3Δ* con respecto a la cepa WT, cuando crecieron en un medio con GLN, GABA o V I L, como fuente de nitrógeno.

El número de genes sobre-expresados (aumentaron su expresión con respecto a la WT) cambió cuando la *leu3Δ* creció en diferentes fuente de nitrógeno. Se observaron 41 genes sobre-expresados cuando la *leu3Δ* creció en un medio con GLN, 9 con GABA y 4 con V I L (figura 7a). El número de genes reprimidos fue similar (genes que disminuyeron su expresión con respecto a al WT) cuando la *leu3Δ* creció en las 3 fuentes de nitrógeno (figura 7b).

5. Redes de interacción Proteína-Proteína (Pi-Pi): se graficaron las redes de interacción Pi-Pi, para poder identificar las interacciones que tenían entre sí las proteínas que son codificadas por los genes que mostraron ED en la *leu3Δ*.

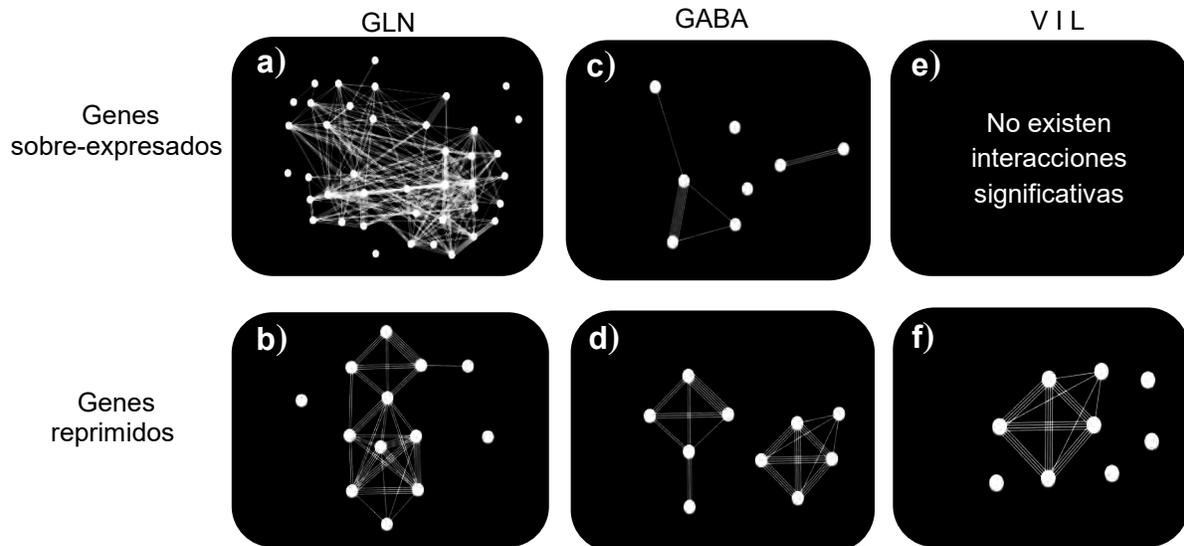


Figura 8. **Redes de interacción Pi-Pi.** Red de proteínas codificadas por los genes que fueron sobre-expresados (figura 8a, 8c, y 8e) y por los genes que fueron reprimidos (figura 8b, 8d, 8f) cuando la *leu3Δ*, creció en un medio con GLN, GABA o V I L como fuente de nitrógeno. Para graficar las redes de interacción Pi-Pi se utilizó el programa String (Szklarczyk et al., 2017) con una confianza alta-moderada de 0.7, tomando en cuenta únicamente las interacciones conocidas y predecibles.

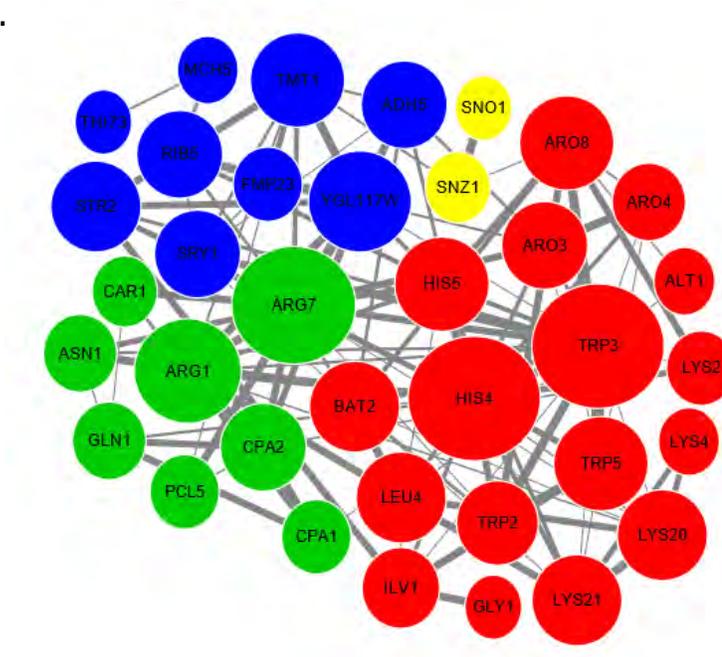
De los 41 genes que fueron sobre-expresados (figura 7a) y los 13 genes que fueron reprimidos (figura 7b) cuando la *leu3Δ* creció en un medio con GLN, 36 genes sobre-expresados y 9 genes reprimidos, codifican proteínas que interaccionan entre sí formando una red de conexión muy densa (figura 8a y 8b). Estos resultados indican que cuando la mutante *leu3Δ* crece en un medio con GLN, los genes con ED codifican proteínas con un nivel alto de asociación funcional. Las proteínas codificadas por los genes que tuvieron ED cuando la *leu3Δ* creció en un medio con GABA o V I L; no formaron redes densas, pero algunas de estas proteínas tuvieron una fuerte interacción entre sí (figura 8c, 8d, 8e y 8f).

Del grupo de genes sobre-expresados, 4 aumentaron su expresión tanto en un medio con GLN como en un medio con GABA (figura 7a). De estos 4 genes, *SNZ1* y *SNO1* son los únicos que codifican proteínas que interaccionan fuertemente entre sí (figura 8a y 8c).

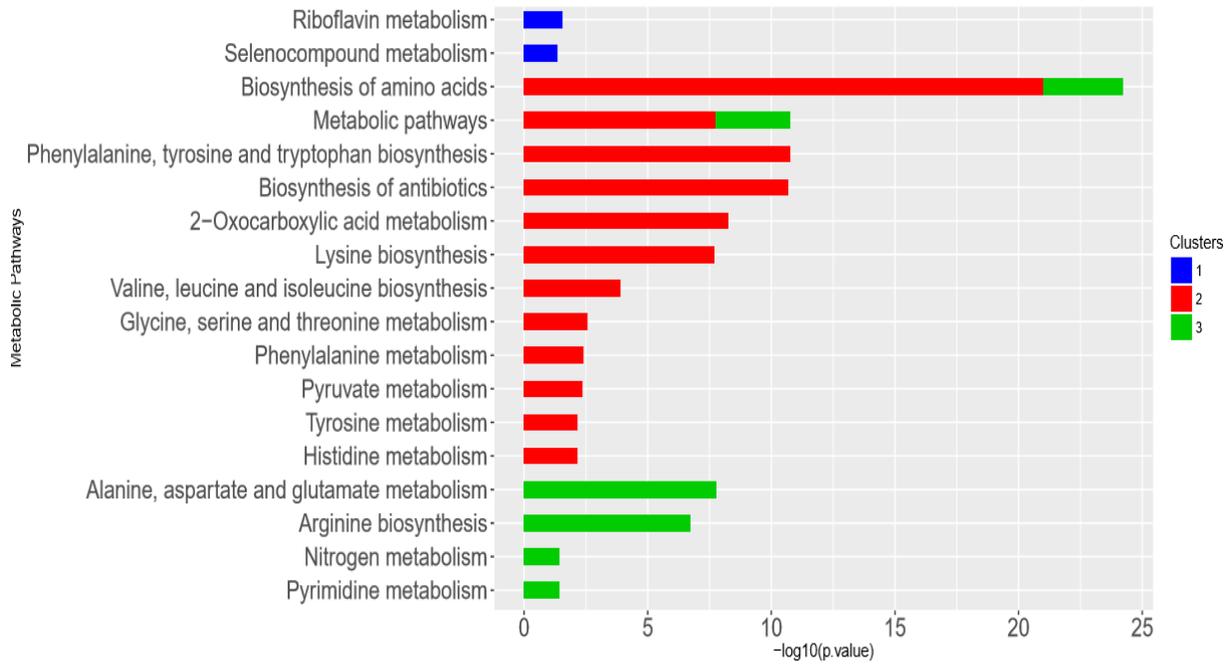
Del grupo de genes que fueron reprimidos, *BAT1*, *LEU2* y *LEU1* disminuyeron su expresión tanto en un medio con GLN como en un medio con GABA (figura 7b). Los 3 genes codifican proteínas con un nivel de interacción alta entre sí (figura 8b y 8d). Mientras que, 5 genes, *YLR161W*, *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* y *ASP3-4*; disminuyeron su expresión en un medio con cualquiera de las 3 fuentes de nitrógeno, GLN, GABA o V I L (figura 7b). De los 5 genes reprimidos, 4 (*ASP3*,1-4) codifican para proteínas con un nivel alto de interacción entre sí (figura 8d y 8e).

6. Redes de asociación funcional: con el fin de identificar las rutas metabólicas enriquecidas por las proteínas que codifican los genes con ED; se graficó una red genética de asociación funcional de los genes sobre-expresados y de los genes reprimidos cuando la *leu3Δ* creció en un medio con GLN.

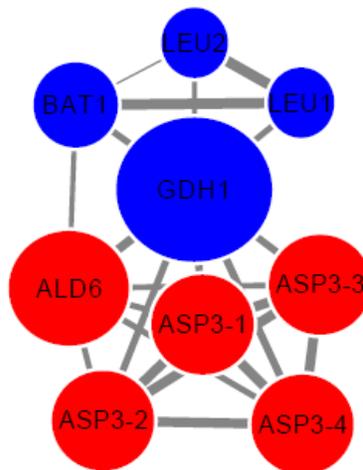
a) Red de asociación funcional de los genes que fueron sobre-expresados.



b) Rutas metabólicas enriquecidas con las proteínas codificadas por los que fueron genes sobre-expresados.



d) Red de asociación funcional de los genes que fueron reprimidos.



d) Rutas metabólicas enriquecidas con las proteínas codificadas por los genes que fueron reprimidos.

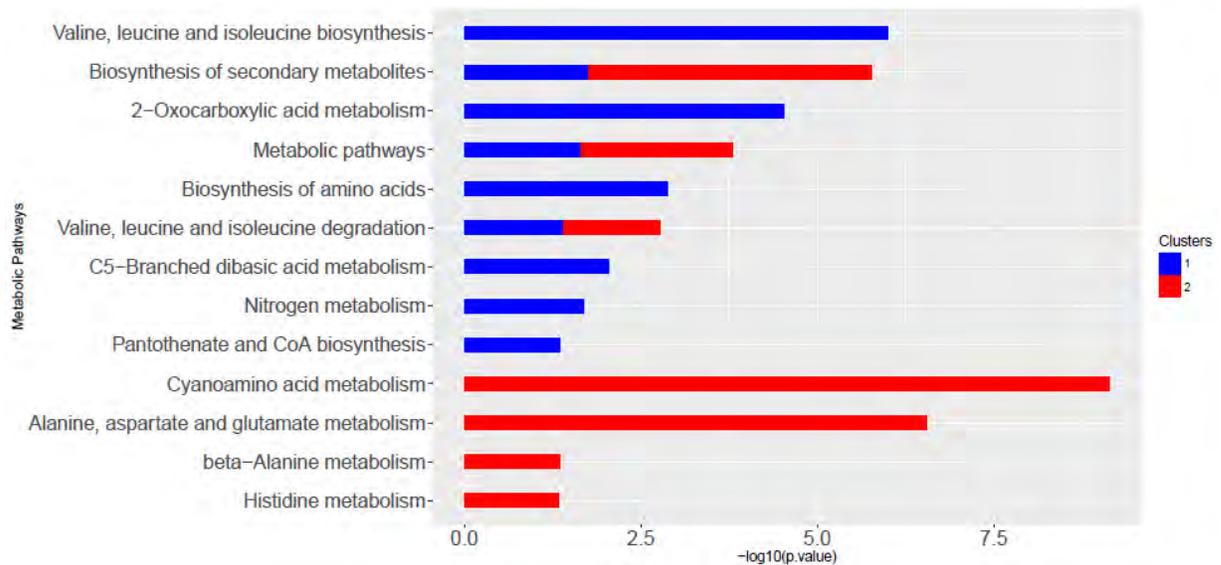


Figura 9. **Red de interacción funcional.** Genes que fueron sobre-expresados (figuras 9a) y genes que fueron reprimidos (figura 9b) en la mutante *leu3Δ*, cuando creció en GLN como fuente de nitrógeno. Se clasificó a cada gen por módulos en base a la asociación funcional de las proteínas que codifican, utilizando el algoritmo multi-nivel eigen implementado en el paquete *igraph* (<http://igraph.org/>) en R (R Development Core Team, 2011). Finalmente, las redes de asociación funcional se graficaron con el software Cytoscape (Shannon et al., 2003). El tamaño de cada nodo es proporcional a su grado de conectividad (número de interacciones que tiene el nodo dentro de la red) y el grosor del conector es proporcional a la significancia de su interacción con su gen aledaño. De cada red de interacción funcional se hizo un análisis de enriquecimiento de vías metabólicas (figuras 9b y 9d). Posteriormente, se exploraron las vías metabólicas enriquecidas con las proteínas codificadas por los genes de cada módulo, utilizando gProfiler (Reimand et al., 2016) con un FDR < 0.05. El eje Y indica el nombre de cada vía metabólica. En el eje X se muestra el valor de p de cada vía metabólica enriquecida, representado en términos logarítmicos.

De la red de asociación funcional de los genes sobre-expresados se obtuvieron 4 módulos (figura 9a), Mientras que para los genes reprimidos se obtuvieron 2 módulos (figura 9c). En la figura 9a uno de estos cuatro módulos (amarillo) contiene únicamente 2 genes. El módulo azul contiene 9 genes, de los cuales el gen *YGL117W* es el que tiene mayor grado de conectividad; esto es importante ya que se ha observado que el grado de conectividad está correlacionado positivamente con la letalidad. De los 8

genes del módulo verde, *ARG1* y *ARG7* tienen el mayor grado de conectividad mientras que de los 17 genes del módulo rojo, *HIS4* y *TRP3* tienen el mayor grado de conectividad. El análisis de enriquecimiento de vías metabólicas en la figura 9b muestra un total de 2 vías enriquecidas para el módulo azul, 12 para el módulo rojo y 6 para el módulo verde (de las cuales 2 se comparten con el módulo rojo). En la figura 9c se observa que los genes que fueron reprimidos se dividen en dos módulos (azul con 4 genes y rojo con 5 genes), siendo *GDH1* el gen con mayor grado de conectividad en el módulo azul y *ALD6* para el módulo rojo. El análisis de enriquecimiento de vías metabólicas en la figura 9d mostró un total de 9 vías enriquecidas para el módulo azul y 7 para el módulo rojo, de las cuales comparten 3 entre sí.

7. Tabla 10. Análisis de sitios de unión a DNA para TF: con el fin de identificar los mecanismos que intervienen en la regulación de los genes de la red de interacción funcional; se identificaron los sitios de unión a DNA para *Leu3*, *Gcn4* y *Gln3*.

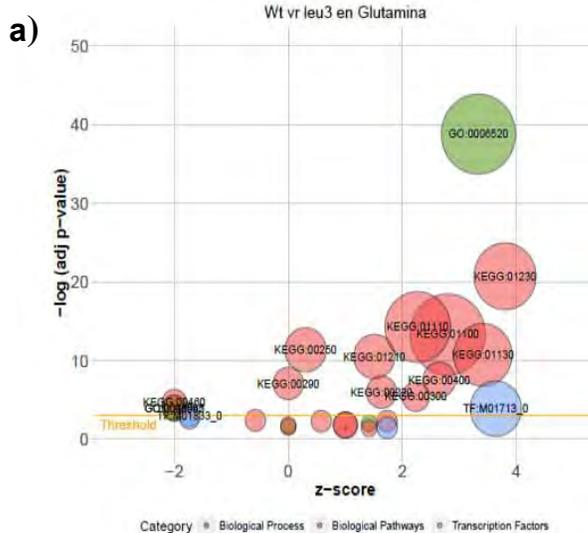
Evidencia	<i>Leu3</i>		<i>Gcn4</i>		<i>Gln3</i>	
	R.D.	R.P.	R.D.	R.P.	R.D.	R.P.
Genes S-expresados	2	0	27	29	8	20
Genes reprimidos	4	4	2	8	1	6

En la tabla 10 se observa el número de genes de la red de asociación funcional (figura 9a y 9c) que tienen sitios de unión a DNA para *Leu3*, *Gcn4*, *Gln3*. El análisis se realizó con el software *yeastract* (<http://www.yeastract.com/findregulators.php>) utilizando la opción búsqueda por asociación regulatoria y restringiendo la búsqueda únicamente a la evidencia de unión al DNA. R.D, regulación documentada (regulación directa e indirecta); R.P: regulación potencial (con cajas de unión al promotor, pero sin regulación documentada).

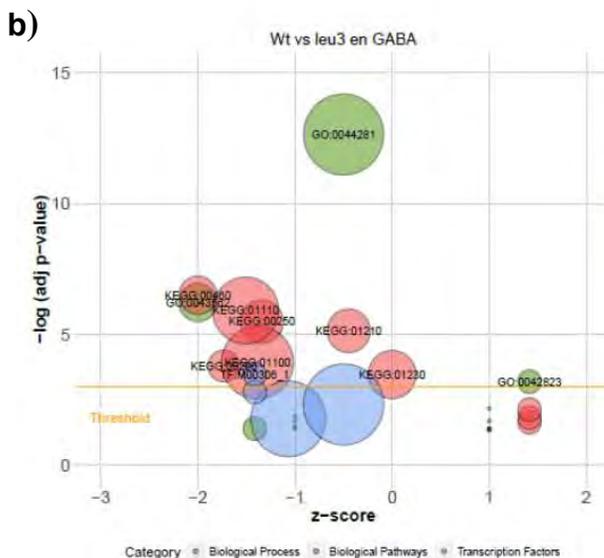
Gcn4 tiene sitios de unión para DNA en 32 de 36 promotores de los genes sobre-expresados (27 con R.D y 29 con R.P). Gln3 tiene sitios de unión a DNA en 8 promotores de los genes sobre-expresados con evidencia documentada y 15 solo son posibles blancos. La unión de Leu3 en los genes sobre-expresados fue únicamente un control negativo, debido a que estos genes están aumentando su expresión en ausencia de dicho TF; sin embargo, hay dos genes *LEU4* y *LYS21* que tienen evidencia documentada de ser regulados por Leu3.

DE los 8 promotores de los genes reprimidos, Los promotores de *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1* tienen sitios de unión a DNA para Leu3. Los otros 4 genes (*ASP3,1-4* y *ALD6*) deben ser regulados por Leu3 de manera indirecta. Solo los promotores de *LEU1* y *LEU2* tienen sitios de unión a DNA para Gcn4 (con evidencia experimental), aunque los otros 6 promotores de los genes reprimidos parecen ser blancos potenciales para este TF. Finalmente se cuenta con evidencia experimental de que el promotor de *GDH1* tiene sitios de unión a DNA para Gln3; mientras que, los promotores de *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3*, *ASP3-40* y *BAT1* parecen ser blancos potenciales.

8. **Procesos biológicos (PB) y vías metabólicas (VM):** para definir los cambios en el metabolismo en la *leu3Δ*, se obtuvo el enriquecimiento de procesos biológicos, rutas metabólicas y posibles TF (involucrados en la regulación de los genes con ED) cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN, GABA o V I L.



ID	Description
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process
GO:0006995	cellular response to nitrogen starvation
GO:0043562	cellular response to nitrogen levels
KEGG:01100	Metabolic pathways
KEGG:00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
KEGG:01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism
KEGG:00220	Arginine biosynthesis
KEGG:00300	Lysine biosynthesis
KEGG:01110	Biosynthesis of secondary metabolites
KEGG:01230	Biosynthesis of amino acids
KEGG:00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
KEGG:00460	Cyanoamino acid metabolism
KEGG:00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
KEGG:01130	Biosynthesis of antibiotics
TF:M01713_0	Factor: Gcn4p; motif: NAWGAGTCATT; match class: 0
TF:M01833_0	Factor: Leu3p; motif: CCGGRACCGGC; match class: 0



ID	Description
GO:0042823	pyridoxal phosphate biosynthetic process
GO:0043562	cellular response to nitrogen levels
GO:0044281	small molecule metabolic process
KEGG:01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism
KEGG:01230	Biosynthesis of amino acids
KEGG:00460	Cyanoamino acid metabolism
KEGG:00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
KEGG:00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism
KEGG:01100	Metabolic pathways
KEGG:01110	Biosynthesis of secondary metabolites
TF:M00306_1	Factor: Leu3p; motif: HGCCGGTACCGGYB; match class: 1

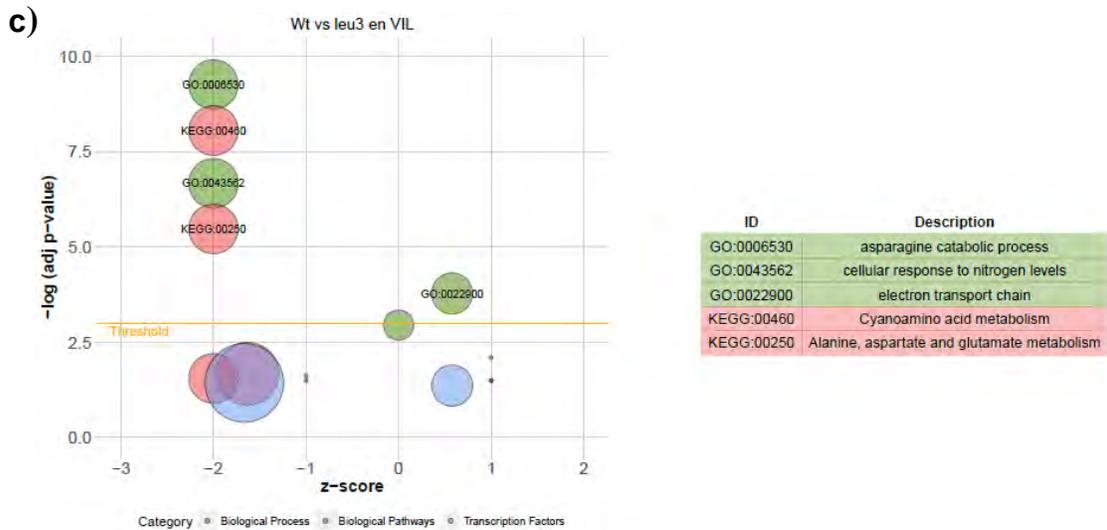


Figura 10. **Procesos biológicos y vías metabólicas.** Enriquecimiento de los PB (burbujas verde), las VM (burbujas rosa) y los TF (que tienen cajas de unión a DNA en el promotor de los genes con DE) (burbujas azules), con los genes obtenidos en el análisis de expresión diferencial entre la cepa WT y la mutante *leu3Δ* cuando crecieron en un medio con GLN (figura 10a), GABA (figura 10b) o V I L (figura 10c). Las figuras se graficaron utilizando los paquetes gProfiler (Reimand et al., 2016) y Geoplot (Walter, Sanchez-Cabo y Ricote, 2015) en R (R Development Core Team, 2011). El eje Y indica el valor de p ajustado en términos logarítmicos, que nos dice que tan significativo es el enriquecimiento. Por lo tanto, las burbujas que se encuentren por encima de la línea amarilla (punto de corte: valor de p ajustado < 0.05) son los procesos verdaderamente enriquecidos, mientras que las burbujas que se encuentran por debajo del punto de corte no son confiables. En el eje X se encuentra el valor de z-score que indica el tipo de regulación. Del 0 a la izquierda se encuentran los procesos regulados negativamente mientras que del 0 a la derecha están los procesos que son regulados positivamente. El tamaño de las burbujas es proporcional al número de genes que enriquecen el PB o VM.

Cuando *leu3Δ* creció en un medio con GLN (figura 10a), los principales PB y VM que se incrementan están relacionados con la biosíntesis de aminoácidos. Los promotores de los genes que enriquecen estos PB y VM conservan un motivo de unión a DNA para *Gcn4*, lo que sugiere que este TF está participando en su regulación. Por el contrario los promotores de los genes que enriquecieron los PB y VM que disminuyen conservan un motivo de unión a DNA para *Leu3*.

Cuando *leu3Δ* creció en un medio con GABA (figura 10b), ningún PB o VM incrementó significativamente. Por el contrario, se refleja la

disminución del metabolismo de ciertos aminoácidos y metabolitos secundarios. Al igual que en GLN, los promotores de los genes que enriquecen los PB y VM que disminuyen conservan un motivo de unión para Leu3, sin embargo no hay genes que conserven un motivo de unión para Gcn4 como sucede en GLN.

Cuando *leu3*Δ creció en un medio con V I L (figura 10c), al igual que en GABA, ningún PB o VM incrementa significativamente. Se refleja la disminución de los procesos relacionados con el catabolismo de asparagina y la respuesta celular a niveles de nitrógeno. Estos procesos son enriquecidos únicamente por la familia de genes *ASP3*.

9. **Papel del α -IPM en la ED de los genes regulados por Leu3:** para definir qué genes son regulados por Leu3- α -IPM, se graficaron los resultados de ED cuando las mutantes *leu3 Δ , *P_{ENO2}LEU4/9leu1* Δ (cepa que acumula α -IPM) y *leu4* Δ /*leu9* Δ (cepa que no produce α -IPM) crecieron en GLN como fuente de nitrógeno.*

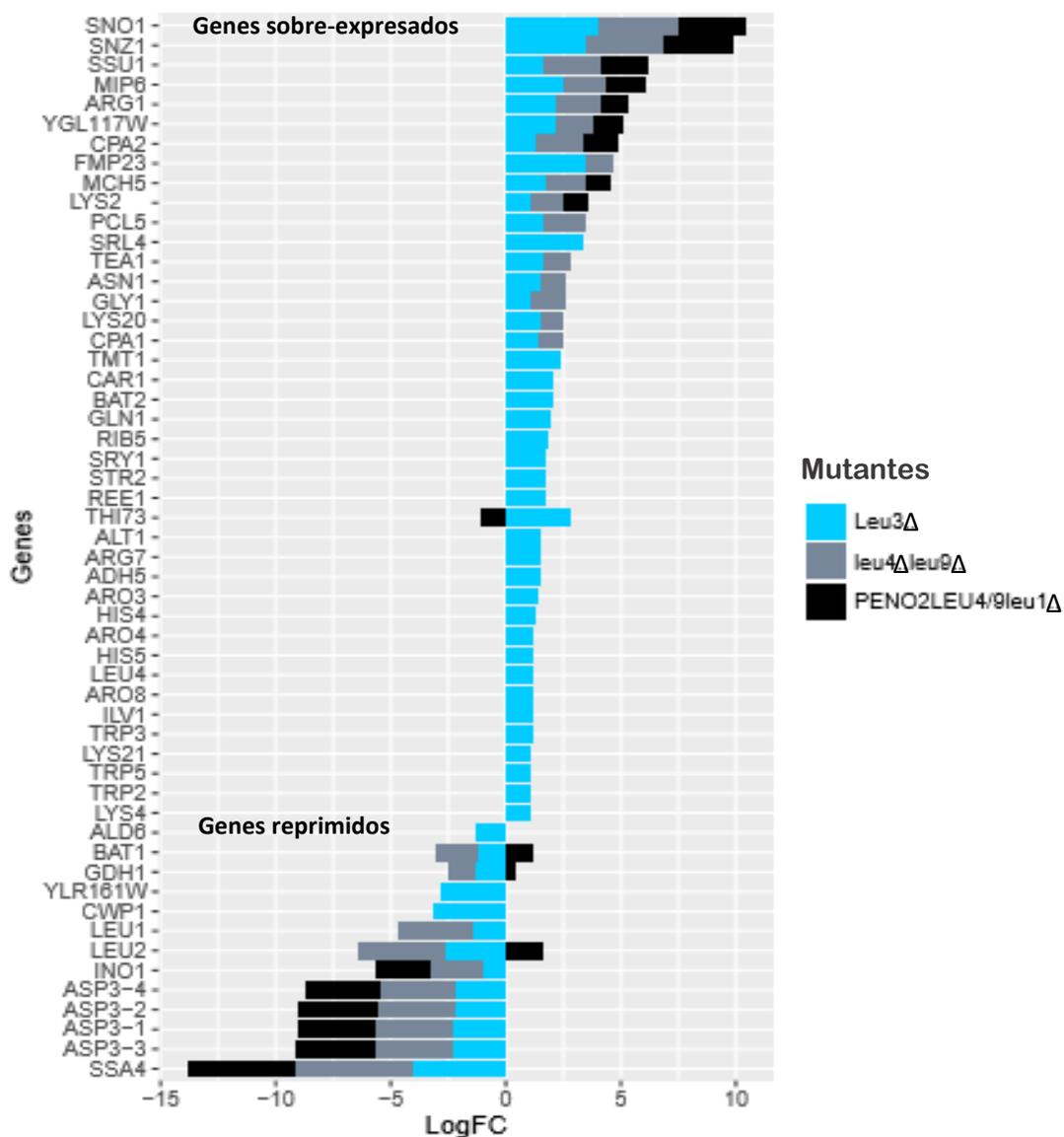


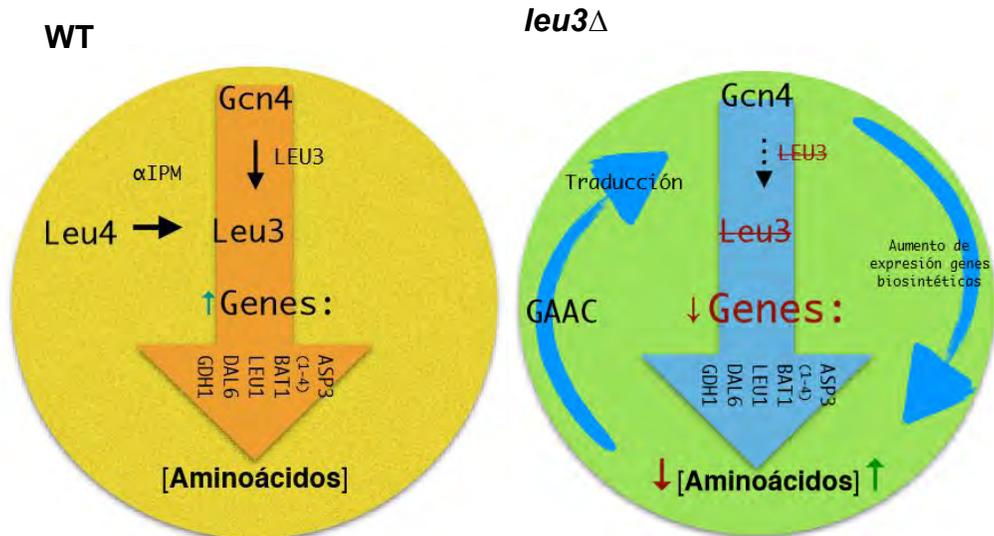
Figura 11. **Papel del α -IPM en la ED de los genes regulados por Leu3.** Genes que incrementaron su expresión (dentro del grupo de genes sobre-expresados en la *leu3* Δ) y los genes que disminuyeron su expresión (dentro del genes reprimidos en la *leu3* Δ), cuando las mutantes *PENO2LEU4/9leu1* Δ y *leu4* Δ /*leu9* Δ crecieron en GLN como fuente de nitrógeno con respecto a la WT. La figura se graficó con el paquete ggplot2 (Ito y Murphy, 2013), de R. El eje Y contiene el nombre de los genes con ED de las mutantes. El eje X

indica el cambio cuantitativo de la ED (LogFC). Los resultados de cada mutante se identificaron según el color de las barras; *leu3Δ* (barras azules), $P_{\text{ENO2}}LEU4/9leu1Δ$ (barras negras) y *leu4Δleu9Δ* (barras grises). Es importante mencionar que, para facilidad visual, los resultados de ED de las diferentes mutantes para un mismo gen (barras azules, negras y grises) se sobreponen; sin embargo el LogFC al inicio de cada color debe tomarse como 0.

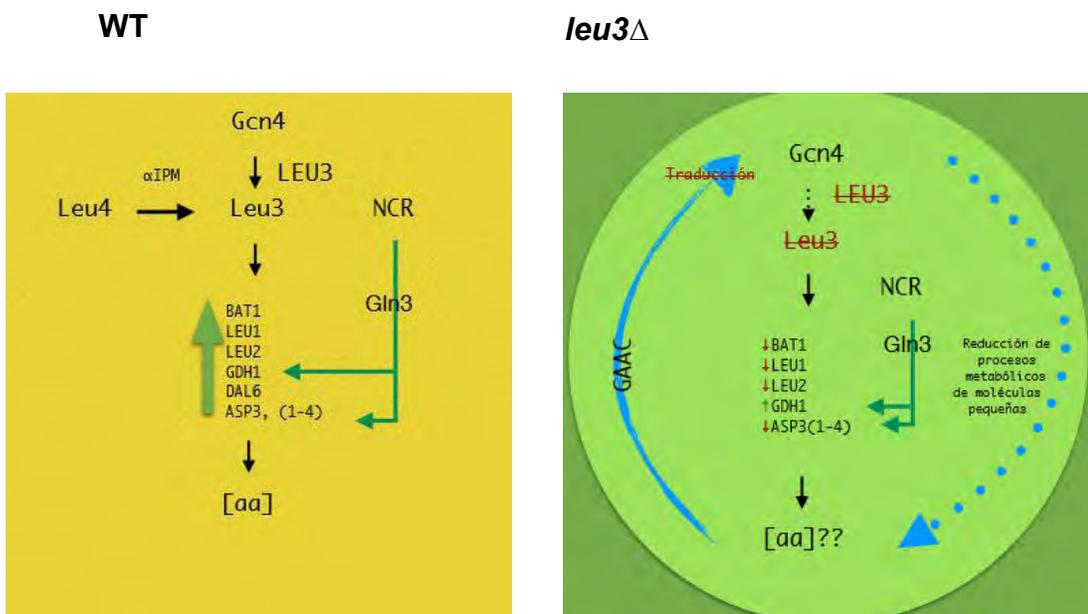
De los 54 genes con ED cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN, 41 pertenecen al grupo de genes sobre-expresados y 13 genes pertenecen al grupo de genes reprimidos (figura 11, barras azules). De los 41 genes sobre-expresados en la *leu3Δ*, 16 aumentaron su expresión en la doble mutante (*SNO1*, *SNZ1*, *SSU1*, *MIP6*, *ARG1*, *YGL117W*, *CPA2*, *FMP23*, *MCH5*, *LYS2*, *PCL5*, *TEA1*, *ASN1*, *GLY1*, *LYS2*, Y *CPA1*) (figura 11, barras grises); mientras que, 9 aumentaron su expresión en la triple mutante (*SNO1*, *SNZ1*, *SSU1*, *MIP6*, *ARG1*, *YGL117W*, *CPA2*, *MCH5* Y *LYS2*) y solo 1 disminuyó su expresión en la triple mutante (*THI73*) (figura 11, barras negras). 24 de los 41 genes sobre-expresados en *leu3Δ* no tuvieron ED en la doble mutante ni en la triple mutante (*SRL4*, *TMT1*, *CAR1*, *BAT2*, *GLN1*, *RIB5*, *SRY1*, *STR2*, *REE1*, *ALT1*, *ARG7*, *ADH5*, *ARO3*, *HIS4*, *ARO4*, *HIS5*, *LEU4*, *ARO8*, *ILV1*, *TRP3*, *LYS21*, *TRP5*, *TRP2* y *LYS4*), (figura 11, barras azules). De los 13 genes que fueron reprimidos en la *leu3Δ* (figura 11, barras azules), 10 disminuyeron su expresión en la doble mutante (*BAT1*, *GDH1*, *LEU1*, *LEU2*, *INO1*, *ASP3-4*, *ASP3-2*, *ASP3-1*, *ASP3-3* y *SSA4*) (figura 4, barras grises); mientras que, 6 disminuyeron su expresión en la triple mutante (*LEU2*, *INO1*, *ASP3-4*, *ASP3-2*, *ASP3-1*, *ASP3-3* y *SSA4*) y 3 aumentaron su expresión en la triple mutante (*BAT1*, *GDH1* Y *LEU2*) (figura 11, barras negras). 3 de los 13 genes reprimidos en la *leu3Δ* no tuvieron ED en la doble ni en la triple mutante (*DAL1*, *YLR161W* y *CWP1*), (figura 11, barras azules).

10. Modelo Gráfico: con el fin de sintetizar la información obtenida en este estudio, se graficaron los posibles mecanismos de regulación de Leu3 cuando *S. cerevisiae* creció en glutamina, ácido y-aminobutírico o Valina, Isoleucina y Leucina como fuente de nitrógeno.

a) Regulación del TF Leu3 cuando *S. cerevisiae* creció en GLN



b) Regulación del TF Leu3 cuando *S. cerevisiae* creció en GABA



c) Regulación del TF Leu3 cuando *S. cerevisiae* creció en V I L

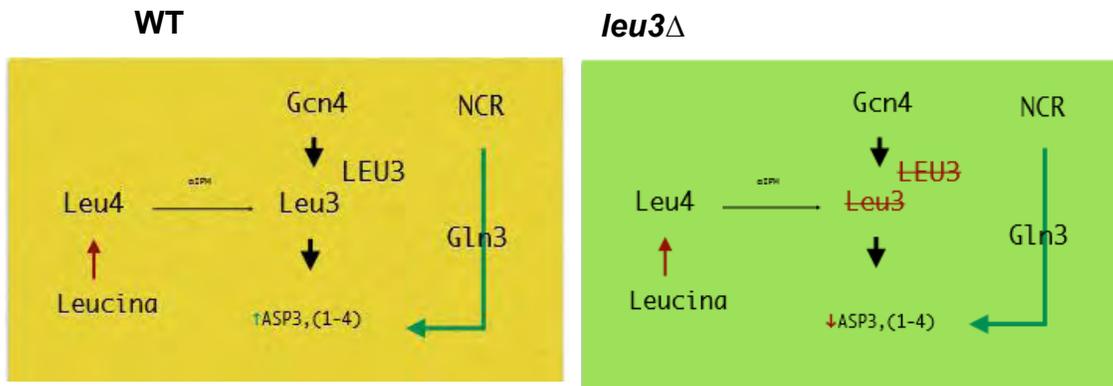


Figura 12. **Modelo gráfico de los mecanismos de regulación de Leu3.** Regulación de Leu3 cuando *S. cerevisiae* creció en GLN (figura 12a), GABA (figura 12b) o V I L (figura 12c). Regulación en la cepa WT, recuadros o círculos amarillos; Regulación en la mutante *leu3*Δ, recuadros o círculos verdes. Condición en la cual participa la activación del GAAC, círculos. Condición en la cual participa la NCR, cuadros. Aumento de concentración o expresión, flechas verdes. Disminución de concentración o expresión, flechas rojas. Mecanismo que en esa condición no se lleva a cabo, flechas punteadas. Ausencia de proteína o mecanismo, texto rojo tachado. Mecanismo del cual no se tiene certeza que suceda, ?? . Concentración aminoácidos [aa].

X. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, se utilizaron 3 fuentes de nitrógeno; GLN que es una fuente de nitrógeno represora, donadora importante de nitrógeno para las reacciones biosintéticas. GABA o V I L, que son dos fuentes no represoras y por lo tanto permiten la expresión de gene cuyos productos catabolizan fuentes de nitrógeno (Gordon, 2007). Además en V I L, la leucina puede ejercer una regulación negativa en el heterodímero Leu4-Leu9, reduciendo así la producción de α -IPM (co-activador de Leu3) (López, 2015). Es importante mencionar, que bajo las concentraciones que se utilizaron en nuestro estudio (anexo A3), la GLN es una buena fuente de nitrógeno, mientras que GABA y V I L, son malas fuentes de nitrógeno.

Como era de esperarse, cuando la cepa WT de *S. cerevisiae* creció en un medio con GLN, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue mayor que cuando creció en un medio con GABA o V I L como fuentes de nitrógeno (apéndice 1.1., fig. 13e). Además, cuando la cepa WT creció en un medio con GABA o V I L, se ejerció un mecanismo de regulación en el cual se activaron 106 genes, de los cuales podemos sugerir que 33 de ellos son dependientes de represión catabólica nitrogenada (NCR) (figura 6b).

Cuando se crecieron las cepas WT y *leu3* Δ en un medio con GLN, se observó una disminución significativa de la μ de la mutante *leu3* Δ (apéndice 1.1., fig. 13e). Adicionalmente, se mostró un aumento en la expresión de 41 genes (figura 7a). También se sabe que, la ausencia de Leu3 cuando *S. cerevisiae* crece en GLN provoca una disminución en la concentración de aminoácidos en la fase exponencial temprana de crecimiento, la cual aumenta en la fase exponencial tardía (tesis doctoral, James González 2017). Estos resultados sugieren fuertemente que la ausencia de Leu3 en estas condiciones induce la activación del control general de aminoácidos (GAAC). Por el contrario, en un medio con GABA o V I L la μ entre la mutante *leu3* Δ y la cepa WT fueron muy parecidas (apéndice 1.1., fig. 13e) y solo se observó un aumento de expresión de 9 genes con GABA y 4 genes con V I L, respectivamente (figura 6a). Es posible que esto se haya

debido al mecanismo de NCR que actúa en ambas condiciones ya que muchos de los genes regulados positivamente por Gcn4, son blancos potenciales de Gln3 (tabla 10).

Con el fin de analizar detalladamente la importancia de Leu3 en el metabolismo celular de *S. cerevisiae* cuando crece en un medio con GLN, GABA o V I L; se construyeron redes de interacción Pi-Pi (figura 8) y redes de asociación funcional (figura 9) y se identificaron los procesos biológicos (PB) y vías metabólicas (VM) enriquecidas (figura 10), de las proteínas que codifican los genes que tuvieron ED en la mutante *leu3Δ*.

Se formaron redes de interacción Pi-Pi densas cuando la mutante *leu3Δ* creció en GLN (figura 8a y 8b). De éstas se formaron 2 redes de asociación funcional; una de los genes sobre-expresados (figura 9a) y una de los genes reprimidos (figura 9c). De los 36 genes sobre-expresados que formaron la red de asociación funcional, los 17 genes del módulo rojo y los 8 genes del módulo verde (figura 9a), estuvieron involucrados en la regulación positiva de 9 y 2 VM, respectivamente; dirigidas a la biosíntesis de aa (figura 9b; figura 10a, burbujas verdes y rosas). Se confirmó que este aumento en la biosíntesis de aminoácidos fue debido a la regulación positiva de Gcn4, ya que de los 36 genes de la red de asociación funcional, 34 genes tienen cajas de unión para Gcn4 (27 con evidencia experimental) (Tabla 10). Los 2 genes sobre-expresados que no tienen cajas de unión para Gcn4 son *THI73* y *STR2*, que pertenecen al módulo azul (figura 9a) el cual presentó un enriquecimiento en el metabolismo de riboflavina y de compuestos de selenio. En la red de asociación funcional *HIS4*, *TRP3*, *ARG7* y *ARG1* fueron los genes que tuvieron un mayor número de interacciones (figura 11, modulo rojo y verde), lo cual indica que son genes clave en la activación del GAAC en estas condiciones.

Los genes sobre-expresados cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GABA, no formaron una red de asociación funcional, sin embargo; dentro de éstos se encontraron 2 genes (*SNZ1* y *SNO1*) que codifican dos proteínas que interaccionan fuertemente entre sí y que también fueron sobre-expresados cuando

la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN (figura 9a, módulo amarillo). Estas proteínas forman un complejo con actividad de glutaminasa y participan en el metabolismo de la vitamina B6 en conjunto con otras 9 proteínas (Dong, 2004). Se ha reportado que estos genes responden a la limitación de nutrientes (Padilla, 1998), lo que explica que aumentaran su expresión cuando la mutante *leu3Δ* creció en GLN o GABA.

Por otro lado, los 9 genes reprimidos cuando *leu3Δ* creció en GLN, formaron una red de asociación funcional de dos módulos (azul y rojo) (figura 9c). Los genes reprimidos cuando la mutante *leu3Δ* creció en GABA o V I L, no formaron una red de interacción Pi-Pi densas y por lo tanto no se pudo formar una red de asociación funcional; sin embargo, dentro de la red de interacción Pi-Pi se incluyeron proteínas que interaccionaron fuertemente entre sí (figura 8d y 8f). Así mismo los genes que las codifican también fueron reprimidos cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN. *BAT1*, *LEU2* y *LEU1* fueron genes reprimidos cuando la mutante *leu3Δ* creció en GLN o GABA (figuras 5b, 8d y 9c). Estos genes codifican proteínas que participan en la biosíntesis de BCAA y la disminución de su expresión fue debida a que son genes regulados positivamente por Leu3- α -IPM. En este caso, la ED cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con V I L fue un control negativo, debido a que en presencia de su producto final, Leu3 actúa como represor (Kohlhaw, 2003; López, 2015). Por otro lado, *YLR161W*, *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* y *ASP3-4* fueron genes reprimidos cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN, GABA o V I L (figura 7b); sin embargo, solo los genes *ASP3,1-4* tuvieron interacciones significativas entre sí y formaron parte de la red de asociación funcional (figura 9c). La familia de las *ASP3* (*ASP3,1-4*) son un grupo de genes idénticos situados en el cromosoma XII, que codifican para la l-asparaginasa II asociada a la pared celular (Kim, 1988). *ASP1* codifica para la l-asparaginasa I citosólica (Sinclair, 1994), pero la expresión de *ASP1* no fue afectada cuando la mutante *leu3Δ* creció en un medio con GLN, GABA o V I L. Ambas enzimas participan en el catabolismo de asparagina y se ha descrito que la expresión de *ASP3* se induce durante la escasez de nitrógeno, en apariencia regulada por Gln3/Ure2 (Oliveira, 2003). Sin embargo, la ausencia de Leu3

provocó que *ASP3* disminuyera su expresión incluso en fuentes no represoras. Además, ninguna de las *ASP3,1-4* tienen sitios de unión a DNA para Leu3, pero sí son blancos potenciales para Gln3 (tabla 10) y por lo tanto se podría decir que Leu3 actúa en conjunto con Gln3 para llevar a cabo la regulación positiva de las *ASP3,1-4*. Estos resultados indican que *Leu3* se involucra en el metabolismo central de nitrógeno a través de la regulación transcripcional de los genes *GDH1* (HU, 1995) y la familia *ASP3*.

La red de asociación funcional cuando *leu3Δ* creció en un medio con GLN, estuvo conformada por los genes *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* y *GDH1* (figura 9c, módulo azul) y *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3*, *ASP3-4* y *ALD6* (figura d, módulo rojo). En presencia de GABA o V I L, los genes que fueron reprimidos en la mutante *leu3Δ* no formaron una red de asociación funcional (figura 8d y 8f), debido a que la expresión de *GDH1* (que es el gen que conecta el módulo azul y el módulo rojo) no disminuyó. Esto se debe a que en un medio con GABA o V I L, *GDH1* es regulado positivamente por Gln3 a través de NCR (Tabla 10). La proteína codificada por *GDH1* interaccionó fuertemente con otras proteínas, formando una red que enriqueció procesos tales como: biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo de ácidos carboxílicos, metabolismo de nitrógeno y biosíntesis de CoA (figura 9d). Estos resultados podrían indicar que, la disminución en la concentración de aminoácidos cuando la *leu3Δ* creció en GLN fue debida a la disminución de *Ghd1*, a través de la disminución de procesos metabólicos que generan amonio y esqueletos de carbono para la biosíntesis de diversos aminoácidos.

El análisis de sitios de unión a DNA (tabla 10) identificó que *LEU4*, *LYS21*, *LEU1* y *LEU2* son regulados positivamente por Gcn4. Además se sabe que Gcn4 puede regular positivamente de forma directa al gen *LEU3* (Kohlhaw, 2001). En una mutante *leu3Δ*, los genes *LEU4* y *LYS21* aumentaron su expresión, mientras que *LEU1* y *LEU2* disminuyeron su expresión. Estos resultados indican que la regulación de Gcn4 en estos genes se da por diferentes mecanismos. *LEU4* y

LYS21 son regulados de forma directa, mientras que *LEU1* y *LEU2* pueden ser regulados por Gcn4, únicamente a través de Leu3.

Los análisis de ED de las cepas que crecieron en un medio con GLN, mostraron que en la cepa que no produce α -IPM (*leu4 Δ leu9 Δ*), *BAT1*, *LEU2*, *LEU1* Y *GDH1* disminuyeron su expresión y que en una cepa que acumula α -IPM ($P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$), *BAT1*, *LEU2* Y *GDH1* aumentaron su expresión, en comparación con una cepa WT. Esto se debe a que los 4 genes se regulan por el mecanismo canónico de Leu3- α IPM (tabla 10). Sin embargo, de los 9 genes restantes, 3 no mostraron una ED y 6 disminuyeron su expresión en la *leu4 Δ leu9 Δ* y en la $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$. Sorprendentemente, también existe un número de 9 genes que fueron sobre-expresados en la mutante *leu3 Δ* y que su expresión también aumentó en la mutante *leu4 Δ leu9 Δ* y en la mutante $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$ (figura 11). Esto resultados indica que, el cambio en la concentración intracelular de α -IPM no afectó la regulación de estos genes. Es importante recordar que, la doble y triple mutante necesitan leucina exógena para crecer y posiblemente la leucina esté actuando como metabolito señal, activando a TORC1 (Jewell, 2015). Este complejo multiproteico participa en la regulación de muchos procesos que ayudan a mantener el estado nutricional durante el crecimiento celular (e.j. NCR, respuesta retrógrada, respuesta a estrés, biosíntesis de ribosomas).

Finalmente la figura 11 muestra que, del grupo de genes que fue sobre-expresados cuando la *leu3 Δ* creció en GLN, 7 genes aumentaron su expresión (*FMP23*, *PCL5*, *TEA1*, *ASN1*, *GLY1*, *LYS20* y *CPA1*) únicamente en la *leu4 Δ leu9 Δ* y 1 disminuyó su expresión (*THI73*) únicamente en la $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$. Estos genes son un grupo interesante de investigar, pero su análisis no entran dentro de los objetivos de este proyecto.

En resumen se puede decir que, el hecho de que los PB fueran regulados positivamente cuando la *leu3 Δ* creció en un medio con GLN (figura 10a) y que los PB fueran regulados negativamente cuando la *leu3 Δ* creció en un medio con GABA o V I L (figura 10c y 10b), nos indica que el TF Leu3 tuvo un papel importante, aunque diferente, en las tres fuentes de nitrógeno estudiadas.

Cuando *S. cerevisiae* creció en GLN como fuente de nitrógeno, Leu3 mantuvo un nivel nutricional estable mediante la activación de genes que participan en la biosíntesis de BCAA, la activación indirecta de la familia de genes *ASP3* y la activación de *GDH1* para la asimilación de amonio. En ausencia de Leu3, se genera una escasez nutricional inducida principalmente por la disminución Gdh1 que, debido a su papel central en el metabolismo del nitrógeno, provoca la disminución de procesos metabólicos que generan amonio y esqueletos de carbono para la biosíntesis de diversos aminoácidos. La escasez de aminoácidos en estas condiciones induce una respuesta del GAAC que aumenta la expresión de 32 genes biosintéticos que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de aa, por medio de Gcn4 (figura 12a).

En fuentes de nitrógeno secundarias como GABA, la falta de Leu3 provocó la disminución de la biosíntesis de BAAC; sin embargo, La reducción significativa de procesos metabólicos de moléculas pequeñas (figura 10b), sugiere una falta de respuesta de Gcn4 en estas condiciones. Es posible que el GAAC se vea interferido por la falta de aa para la traducción de Gcn4. En este caso los resultados sugieren que, cuando *S. cerevisiae* creció en GABA, a pesar de tener una NCR activa, la participación de Gcn4 juega un papel importante en el metabolismo celular de la levadura (figura 12b).

En un medio con V I L, la leucina ejerce una regulación por retroalimentación negativa en las α -IPM sintetas y por lo tanto se disminuye la concentración de α -IPM en el medio. Esto a su vez provoca que Leu3 no funcione como un activador. A pesar de esto, cuando se creció a la *leu3* Δ en un medio con V I L, la expresión de los genes *ASP3* disminuyó significativamente. Estos resultados demuestran que Leu3 es importante en el proceso de respuesta celular a los niveles de nitrógeno por medio de las *ASP3*,(1-4) (figura 12c).

XI. CONCLUSIONES

1. El factor transcripcional Leu3 de *S. cerevisiae*, regula un conjunto de genes diferentes dependiendo de la fuente de nitrógeno en la que crezca.
2. Cuando *S. cerevisiae* crece en una fuente primaria de nitrógeno como glutamina, Leu3 actúa como un activador transcripcional para un grupo de genes importantes cuyo funcionamiento evita un estado de escasez nutricional.
3. El factor transcripcional Leu3 mantiene una respuesta a los niveles de nitrógeno por medio de la regulación de los genes *ASP3,1-4*, en fuentes primarias y secundarias de nitrógeno.
4. Los genes *BAT1*, *LEU1*, *LEU2* Y *GDH1* son regulados de manera directa por el complejo Leu3- α -IPM.

XII. PERSPECTIVAS

1. Medir la concentración de proteína Gcn4 en un fondo genético *leu3Δ* a lo largo de la fase exponencial de crecimiento en glutamina como fuente de nitrógeno, para confirmar que en ausencia de Leu3 en *S. cerevisiae* induce la activación del control general de aminoácidos.
2. Medir la concentración de aminoácidos de una cepa P_[gen-constitutivo]*GDH1leu3Δ*, para comprobar que la disminución en la concentración de aminoácidos cuando la mutante *leu3Δ* crece en un medio con glutamina, se debe a la disminución de la expresión del gen *GDH1* que es regulado positivamente por Leu3.
3. Realizar un aminograma de la cepa WT y la mutante *leu3Δ* crecidas en ácido gamma-aminobutírico como fuente de nitrógeno y medir la concentración de proteína Gcn4 a lo largo de la fase exponencial, con el fin de comprobar si existe una inducción del control general de aminoácidos en fuentes secundarias y si se lleva a cabo la traducción de Gcn4.
4. Medir la expresión de mRNA de los genes *ASP3,1-4* en las mutantes *leu3Δ*, *Gln3Δ* y *leu3ΔGln3Δ*, para definir la participación de cada factor transcripcional en la activación de estos genes.
5. Realizar un análisis de todos los genes que aumentan o disminuyen su expresión en las mutantes *leu4Δleu9Δ* y en la P_{ENO2}*LEU4/9leu1Δ*, para definir el mecanismo que regula la expresión diferencial de estos genes.
6. Realizar un análisis de los genes 7 genes que aumentaron sus expresiones (*FMP23*, *PCL5*, *TEA1*, *ASN1*, *GLY1*, *LYS20* y *CPA1*) en la *leu4Δleu9Δ* y del gen que disminuyó su expresión (*THI73*) en la P_{ENO2}*LEU4/9leu1Δ*, cuando crecen en glutamina como fuente de nitrógeno.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 11(10), R106. doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- Beck, T., & Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762), 689-692. doi:10.1038/45287
- Blanc, G., & Wolfe, K. H. (2004). Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*, 16(7), 1667-1678. doi:10.1105/tpc.021345
- Boer, V. M., Daran, J. M., Almering, M. J., de Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2005). Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res*, 5(10), 885-897. doi:10.1016/j.femsyr.2005.04.003
- Bowers, J. E., Chapman, B. A., Rong, J., & Paterson, A. H. (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, 422(6930), 433-438. doi:10.1038/nature01521
- Brisco, P. R., & Kohlhaw, G. B. (1990). Regulation of yeast LEU2. Total deletion of regulatory gene LEU3 unm{DeLuna, 2001 #43;Dietrich, 2004 #18;Dujon, 2004 #19}asks GCN4-dependent basal level expression of LEU2. *J Biol Chem*, 265(20), 11667-11675
- Coghlan, A., Eichler, E. E., Oliver, S. G., Paterson, A. H., & Stein, L. (2005). Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet*, 21(12), 673-682. doi:10.1016/j.tig.2005.09.009
- Colon, M., Hernandez, F., Lopez, K., Quezada, H., Gonzalez, J., Lopez, G., . . . Gonzalez, A. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS One*, 6(1), e16099. doi:10.1371/journal.pone.0016099
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews - Genetics*, 9, 938 - 950.
- Cooper, T. G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, p. 39–99. In J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: metabolism and gene expression*, vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., & Gonzalez, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem*, 276(47), 43775-43783. doi:10.1074/jbc.M107986200
- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., . . . Philippsen, P. (2004). The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping

- the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science*, 304(5668), 304-307. doi:10.1126/science.1095781
- Dong, Y. X., Sueda, S., Nikawa, J., & Kondo, H. (2004). Characterization of the products of the genes SNO1 and SNZ1 involved in pyridoxine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 271(4), 745-752.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., . . . Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35-44. doi:10.1038/nature02579
- Eden, A., Simchen, G., & Benvenisty, N. (1996). Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem*, 271(34), 20242-20245
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151(4), 1531-1545.
- Friden, P., Reynolds, C., & Schimmel, P. (1989). A large internal deletion converts yeast LEU3 to a constitutive transcriptional activator. *Mol Cell Biol*, 9(9), 4056-4060.
- Friden, P., & Schimmel, P. (1988). LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol Cell Biol*, 8(7), 2690-2697.
- Friedman, R., & Hughes, A. L. (2001). Gene duplication and the structure of eukaryotic genomes. *Genome Res*, 11(3), 373-381. doi:10.1101/gr.155801
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*, 8(6), 469-477. doi:10.1038/nmeth.1613
- Gerstein, A. C., & Otto, S. P. (2009). Ploidy and the causes of genomic evolution. *J Hered*, 100(5), 571-581. doi:10.1093/jhered/esp057
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., & Andre, B. (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 27(8), 3065-3086. doi:10.1128/MCB.01084-06
- Gordon, J. L., Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2011). Mechanisms of chromosome number evolution in yeast. *PLoS Genet*, 7(7), e1002190. doi:10.1371/journal.pgen.1002190
- Guo, H., & Kohlhaw, G. B. (1996). Regulation of transcription in mammalian cells by yeast Leu3p and externally supplied inducer. *FEBS Lett*, 390(2), 191-195.
- Guo, Y. C., Zhang, L., Dai, S. X., Li, W. X., Zheng, J. J., Li, G. H., & Huang, J. F. (2016). Independent Evolution of Winner Traits without Whole Genome Duplication in *Dekkera* Yeasts. *PLoS One*, 11(5), e0155140. doi:10.1371/journal.pone.0155140

- Hahn, M. W. (2009). Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates. *The journal of heredity*, 100(5), 605-617.
- Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705-736. doi:10.1534/genetics.111.127019
- Harbison, C. T., Gordon, D. B., Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Macisaac, K. D., Danford, T. W., . . . Young, R. A. (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, 431(7004), 99-104. doi:10.1038/nature02800
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 74(8), 2259-2266. doi:10.1128/AEM.02625-07
- Hinnebusch, A. G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:407–450
- Hofman-Bang, J. (1999). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol*, 12(1), 35-73. doi:10.1385/MB:12:1:35
- Hughes, A. L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci*, 256(1346), 119-124. doi:10.1098/rspb.1994.0058
- Hurles, M. (2004). Gene duplication: the genomic trade in spare parts. *PLoS Biol*, 2(7), E206. doi:10.1371/journal.pbio.0020206
- Ito, K., & Murphy, D. (2013). Application of ggplot2 to Pharmacometric Graphics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2, e79. doi:10.1038/psp.2013.56
- Jaillon, O., Aury, J.-M., & Wincker, P. (2009). "Changing by doubling", the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. *C R Biol.*, 332(2-3), 241-253.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Brunet, F., Petit, J. L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., . . . Roest Crolius, H. (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, 431(7011), 946-957. doi:10.1038/nature03025
- Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 8(6), 759-769.
- Jewell, J. L., Kim, Y. C., Russell, R. C., Yu, F. X., Park, H. W., Plouffe, S. W., . . . Guan, K. L. (2015). Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*, 347(6218), 194-198. doi:10.1126/science.1259472
- Kellis, M., Birren, B. W., & Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 428(6983), 617-624. doi:10.1038/nature02424

- Kim, K. W., Kamerud, J. Q., Livingston, D. M., & Roon, R. J. (1988). Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *J Biol Chem*, 263(24), 11948-11953.
- Kohlhaw, G. B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67(1), 1-15, table of contents.
- League, G. P., Slot, J. C., & Rokas, A. (2012). The ASP3 locus in *Saccharomyces cerevisiae* originated by horizontal gene transfer from *Wickerhamomyces*. *FEMS Yeast Res*, 12(7), 859-863. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00828.x
- Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K., . . . Young, R. A. (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 298(5594), 799-804. doi:10.1126/science.1075090
- Li, W. H., Gu, Z., Wang, H., & Nekrutenko, A. (2001). Evolutionary analyses of the human genome. *Nature*, 409(6822), 847-849. doi:10.1038/35057039
- Liu, X., & Clarke, N. D. (2002). Rationalization of gene regulation by a eukaryotic transcription factor: calculation of regulatory region occupancy from predicted binding affinities. *J Mol Biol*, 323(1), 1-8.
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494), 1151-1155.
- MacPherson, S., Larochelle, M., & Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(3), 583-604. doi:10.1128/MMBR.00015-06
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2), 1-18.
- Marcet-Houben, M., & Gabaldon, T. (2015). Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLoS Biol*, 13(8), e1002220. doi:10.1371/journal.pbio.1002220
- Mayer, V. W., & Aguilera, A. (1990). High levels of chromosome instability in polyploids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 231(2), 177-186.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., & Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J*, 274(4), 976-989. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05645.x
- Mewes, H. W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., . . . Zollner, A. (1997). Overview of the yeast genome. *Nature*, 387(6632 Suppl), 7-65. doi:10.1038/42755
- Nagalakshmi, U., Waern, K., & Snyder, M. (2010). RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 4, Unit 4 11 11-13. doi:10.1002/0471142727.mb0411s89
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtpong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlen, M., & Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-

- comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 40(20), 10084-10097. doi:10.1093/nar/gks804
- Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. Germany/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Oliveira, E. M., Martins, A. S., Carvajal, E., & Bon, E. P. (2003). The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(1), 31-37. doi:10.1002/yea.930
- Padilla, P. A., Fuge, E. K., Crawford, M. E., Errett, A., & Werner-Washburne, M. (1998). The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J Bacteriol*, 180(21), 5718-5726.
- Penalosa-Ruiz, G., Aranda, C., Ongay-Larios, L., Colon, M., Quezada, H., & Gonzalez, A. (2012). Paralogous ALT1 and ALT2 retention and diversification have generated catalytically active and inactive aminotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 7(9), e45702. doi:10.1371/journal.pone.0045702
- Piskur, J., & Langkjaer, R. B. (2004). Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Mol Microbiol*, 53(2), 381-389. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04182.x
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernandez, H., Calcagno, M. L., Marin-Hernandez, A., & Gonzalez, A. (2008). Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 154(Pt 6), 1656-1667. doi:10.1099/mic.0.2008/017103-0
- R Development Core Team (2011), R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. Available online at <http://www.R-project.org/>.
- Rastogi, S., & Liberles, D. A. (2005). Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol*, 5, 28. doi:10.1186/1471-2148-5-28
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., & Vilo, J. (2016). g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res*, 44(W1), W83-89. doi:10.1093/nar/gkw199
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., . . . Piskur, J. (2011). Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun*, 2, 302. doi:10.1038/ncomms1305

- Sankoff, D. (2001). Gene and genome duplication. *Curr Opin Genet Dev*, 11(6), 681-684.
- Schacherer, J., Tourrette, Y., Souciet, J. L., Potier, S., & De Montigny, J. (2004). Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res*, 14(7), 1291-1297. doi:10.1101/gr.2363004
- Schoondermark-Stolk, S. A., Tabernero, M., Chapman, J., Ter Schure, E. G., Verrips, C. T., Verkleij, A. J., & Boonstra, J. (2005). Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Res*, 5(8), 757-766. doi:10.1016/j.femsyr.2005.02.005
- Seoighe, C., & Wolfe, K. H. (1998). Extent of genomic rearrangement after genome duplication in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4447-4452.
- Syednasrollah, F., Laiho, A., & Elo, L. L. (2015). Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief Bioinform*, 16(1), 59-70. doi:10.1093/bib/bbt086
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., . . . Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 13(11), 2498-2504. doi:10.1101/gr.1239303
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26(10), 1135-1145. doi:10.1038/nbt1486
- Sidow, A. (1996). Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 6(6), 715-722.
- Sinclair, K., Warner, J. P., & Bonthron, D. T. (1994). The ASP1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the intracellular isozyme of L-asparaginase. *Gene*, 144(1), 37-43.
- Struhl, K. (1995). Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu Rev Genet*, 29, 651-674. doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.003251
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., . . . von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D362-D368. doi:10.1093/nar/gkw937
- Tarazona, S., Furio-Tari, P., Turra, D., Pietro, A. D., Nueda, M. J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res*, 43(21), e140. doi:10.1093/nar/gkv711
- Van de Peer, Y., Maere, S., & Axel Meyer, A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *NATURE REVIEWS, GENETICS*, 10, 725-732.

- Van Hoof, A. (2005). Conserved functions of yeast genes support the duplication, degeneration and complementation model for gene duplication. *Genetics*, 171(4), 1455-1461. doi:10.1534/genetics.105.044057
- Wade, P. A., & Jaehning, J. A. (1996). Transcriptional corepression in vitro: a Mot1p-associated form of TATA-binding protein is required for repression by Leu3p. *Mol Cell Biol*, 16(4), 1641-1648.
- Walter, W., Sanchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, 31(17), 2912-2914. doi:10.1093/bioinformatics/btv300
- Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K., & Kohlhaw, G. B. (1997). Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J Biol Chem*, 272(31), 19383-19392.
- Wang, D., Zheng, F., Holmberg, S., & Kohlhaw, G. B. (1999). Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem*, 274(27), 19017-19024.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10(1), 57-63. doi:10.1038/nrg2484
- Wolfe, K. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews - Genetics*, 2, 333-341.
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol*, 13(8), e1002221. doi:10.1371/journal.pbio.1002221
- Wolfe, K. H., & Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387(6634), 708-713. doi:10.1038/42711
- Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., Zhou, J., . . . Yang, H. (2005). The Genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol*, 3(2), e38. doi:10.1371/journal.pbio.0030038
- Zarin, T., & Moses, A. M. (2014). Insights into molecular evolution from yeast genomics. *Yeast*, 31(7), 233-241. doi:10.1002/yea.3018
- Zhang, J. Z. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology & Evolution. Elsevier Science Ltd*, 18(6), 292-298.

XIV. ANEXOS

A. Medios de cultivo

1. Concentraciones finales de los componentes del medio YPD utilizado en este estudio.

Componentes	Concentración Final (p/v)
Extracto de levadura	1%
Peptona de caseína	2%
Dextrosa anhidra	2%

2. Cantidad de componentes para preparar un litro de Medio Mínimo.

Componentes	Cantidades
Vitaminas 1000X	1ml
Trazas 1000X	1 ml
Sales	20ml
Dextrosa	20g

3. Concentración final de las diferentes fuentes de nitrógeno en el Medio Mínimo.

Fuente de Nitrógeno	Concentración final (mg/L)
Glutamina	333
GABA	333
Valina	150
Isoleucina	30
Leucina	100

B. Preparación de reactivos

Solución	Preparación
Buffer de carga 1.25X	2.2 ml de formamida desionizada, 0.8 ml de formaldehído al 37%, 0.5 ml de MAE 10X, 0.4 ml de glicerol al 80% y 100 µl de azul de bromofenol al 2%, aforar a 4ml con H ₂ O DEPC
Buffer lisis	50 mM Tris pH 7-7,4; 130mM de cloruro de sodio, 5 mM de EDTA y 5 % de SDS
FCI	25 parte de fenol, 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico
H ₂ O DEPC 1%	Disolver 9 µl de DEPC en 900 ml de H ₂ O bidestilada en un recipiente de 1 litro, agitar durante 4 h, dejar reposar toda la noche y esterilizar en la autoclave
MAE 10X	50 mM de acetato de sodio tri-hidratado y 10 mM de EDTA di sódico. Ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 10N. Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C y proteger de la luz (aforar con H ₂ O bidestilada)
SCC 20X	Disolver 175.3 g de cloruro de sodio y 88.2 g de citrato de sodio, aforar a 1 litro con H ₂ O bidestilada
SDS 10%	100 g de SDS en 1 litro de H ₂ O bidestilada

C. Genes con expresión diferencial: WT vs *leu3Δ*

1. Anexo C1. Lista de genes con expresión diferencial en un medio con glutamina

	Gene	Prob	LogFC	Regulation	Protein	Function
1	<i>ADH5</i>	0,9758	1,4835	Sobre-expresados	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V	involved in ethanol production; <i>ADH5</i> has a paralog, <i>ADH1</i> , that arose from the whole genome duplication
2	<i>ALT1</i>	0,9674	1,5646	Sobre-expresados	Alanine transaminase (glutamic pyruvic transaminase)	involved in alanine biosynthesis and catabolism; TOR1-independent role in determining chronological lifespan; expression is induced in the presence of alanine; repression is mediated by Nrg1p; <i>ALT1</i> has a paralog, <i>ALT2</i> , that arose from the whole genome duplication; Alt2p is catalytically inactive
3	<i>ARG1</i>	1	2,1436	Sobre-expresados	Arginosuccinate synthetase	catalyzes the formation of L-argininosuccinate from citrulline and L-aspartate in the arginine biosynthesis pathway; potential Cdc28p substrate
4	<i>ARG7</i>	1	1,4855	Sobre-expresados	Mitochondrial acetyltransferase	ornithine catalyzes the fifth step in arginine biosynthesis; also possesses acetylglutamate synthase activity, regenerates acetylglutamate while forming ornithine
5	<i>ARO3</i>	1	1,4474	Sobre-expresados	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase	catalyzes the first step in aromatic amino acid biosynthesis and is feedback-inhibited by phenylalanine or high concentration of tyrosine or tryptophan
6	<i>ARO4</i>	1	1,2466	Sobre-expresados	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase	catalyzes the first step in aromatic amino acid biosynthesis and is feedback-inhibited by tyrosine or high concentrations of phenylalanine or tryptophan; relative distribution to the nucleus increases upon DNA replication stress
7	<i>ARO8</i>	1	1,2113	Sobre-expresados	Aromatic aminotransferase I	expression is regulated by general control of amino acid biosynthesis

8	ASN1	0,9591	1,4915	Sobre-expresados	Asparagine synthetase; catalyzes the synthesis of L-asparagine from L-aspartate in the asparagine biosynthetic pathway	<i>ASN1</i> has a paralog, <i>ASN2</i> , that arose from the whole genome duplication
9	BAT2	0,9631	2,0277	Sobre-expresados	Cytosolic branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase	preferentially involved in BCAA catabolism; homolog of murine ECA39; highly expressed during stationary phase and repressed during logarithmic phase; <i>BAT2</i> has a paralog, <i>BAT1</i> , that arose from the whole genome duplication
10	CAR1	0,9999	2,0717	Sobre-expresados	Arginase	catabolizes arginine to ornithine and urea; expression responds to both induction by arginine and nitrogen catabolite repression; disruption decreases production of carcinogen ethyl carbamate during wine fermentation and also enhances freeze tolerance
11	CPA1	0,9999	1,4020	Sobre-expresados	Small subunit of carbamoyl phosphate synthetase; carbamoyl phosphate synthetase catalyzes a step in the synthesis of citrulline, an arginine precursor	translationally regulated by an attenuator peptide encoded by YOR302W within the <i>CPA1</i> mRNA 5'-leader
12	CPA2	0,9999	1,3232	Sobre-expresados	Large subunit of carbamoyl phosphate synthetase	carbamoyl phosphate synthetase catalyzes a step in the synthesis of citrulline, an arginine precursor
13	FMP23	0,9752	3,4360	Sobre-expresados	Putative protein of unknown function	proposed to be involved in iron or copper homeostasis; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
14	GLN1	1	1,9816	Sobre-expresados	Glutamine synthetase (GS)	synthesizes glutamine from glutamate and ammonia; with Glt1p, forms the secondary pathway for glutamate biosynthesis from ammonia; expression regulated by nitrogen source and by amino acid limitation; forms filaments of back-to-back stacks of cylindrical homo-decamers at low pH, leading to enzymatic inactivation and storage during states of advanced cellular starvation; relocalizes from nucleus to cytoplasmic foci upon

						DNA replication stress
15	GLY1	0,9676	1,0889	Sobre-expresados	Threonine aldolase	catalyzes the cleavage of L-allo-threonine and L-threonine to glycine; involved in glycine biosynthesis
16	HIS4	1	1,2828	Sobre-expresados	Multifunctional enzyme containing phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, and histidinol dehydrogenase activities; catalyzes the second, third, ninth and tenth steps in histidine biosynthesis
17	HIS5	0,9986	1,2315	Sobre-expresados	Histidinol-phosphate aminotransferase	catalyzes the seventh step in histidine biosynthesis; responsive to general control of amino acid biosynthesis; mutations cause histidine auxotrophy and sensitivity to Cu, Co, and Ni salts
18	ILV1	0,9945	1,1672	Sobre-expresados	Threonine deaminase	catalyzes first step in isoleucine biosynthesis; expression is under general amino acid control; <i>ILV1</i> locus exhibits highly positioned nucleosomes whose organization is independent of known <i>ILV1</i> regulation
19	LEU4	0,9701	1,2280	Sobre-expresados	Alpha-isopropylmalate synthase (2-isopropylmalate synthase)	the main isozyme responsible for the first step in the leucine biosynthesis pathway; <i>LEU4</i> has a paralog, <i>LEU9</i> , that arose from the whole genome duplication
20	LYS2	0,9500	1,0888	Sobre-expresados	Alpha aminoadipate reductase; catalyzes the reduction of alpha-aminoadipate to alpha-aminoadipate 6-semialdehyde, which is the fifth step in biosynthesis of lysine	activation requires posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5p
21	LYS20	0,9999	1,4822	Sobre-expresados	Homocitrate synthase isozyme and functions in DNA repair	catalyzes the condensation of acetyl-CoA and alpha-ketoglutarate to form homocitrate, which is the first step in the lysine biosynthesis pathway; <i>LYS20</i> has a paralog, <i>LYS21</i> , that arose from the whole genome duplication
22	LYS21	1	1,1376	Sobre-expresados	Homocitrate synthase isozyme; catalyzes the condensation of acetyl-CoA and alpha-ketoglutarate to form	is the first step in the lysine biosynthesis pathway; <i>LYS21</i> has a paralog, <i>LYS20</i> , that arose from the whole genome duplication

					homocitrate	
23	LYS4	0,9681	1,0323	Sobre-expresados	Homoaconitase	catalyzes the conversion of homocitrate to homoisocitrate, which is a step in the lysine biosynthesis pathway
24	MCH5	0,9999	1,7625	Sobre-expresados	Plasma membrane riboflavin transporter	facilitates the uptake of vitamin B2; required for FAD-dependent processes; sequence similarity to mammalian monocarboxylate permeases, however mutants are not deficient in monocarboxylate transport
25	MIP6	0,9507	2,5197	Sobre-expresados	Alpha amino adipate reductase	catalyzes the reduction of alpha-amino adipate to alpha-amino adipate 6-semialdehyde, which is the fifth step in biosynthesis of lysine; activation requires posttranslational phosphopantetheinylation by Lys5p
26	PCL5	0,9999	1,6167	Sobre-expresados	Cyclin	interacts with and phosphorylated by Pho85p cyclin-dependent kinase (Cdk), induced by Gcn4p at level of transcription, specifically required for Gcn4p degradation, may be sensor of cellular protein biosynthetic capacity
27	REE1	0,9895	1,6943	Sobre-expresados	Cytoplasmic protein involved in the regulation of enolase (<i>ENO1</i>)	mRNA expression is induced by calcium shortage, copper deficiency (via Mac1p) and the presence of galactose (via Gal4p); mRNA expression is also regulated by the cell cycle
28	RIB5	0,9955	1,8362	Sobre-expresados	Riboflavin synthase	catalyzes the last step of the riboflavin biosynthesis pathway
29	SNO1	0,9979	4,0569	Sobre-expresados	Protein of unconfirmed function	involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
30	SNZ1	1	3,5166	Sobre-expresados	Protein involved in vitamin B6 biosynthesis	member of a stationary phase-induced gene family; coregulated with SNO1; interacts with Sno1p and with Yhr198p, perhaps as a multiprotein complex containing other Snz and Sno proteins
31	SRL4	0,9734	3,3968	Sobre-expresados	Protein of unknown function	involved in regulation of dNTP production; null mutant suppresses the lethality of lcd1 and rad53 mutations; expression is induced by Kar4p

32	SRY1	0,9999	1,7425	Sobre-expresados	3-hydroxyaspartate dehydratase; deaminates L-threo-3-hydroxyaspartate to form oxaloacetate and ammonia; required in the presence of hydroxyaspartate	highly similar to mouse serine racemase (Srr) but has no serine racemase activity
33	SSU1	0,9618	1,6720	Sobre-expresados	Plasma membrane sulfite pump involved in sulfite metabolism	required for efficient sulfite efflux; major facilitator superfamily protein
34	STR2	0,9888	1,7346	Sobre-expresados	Cystathionine gamma-synthase, converts cysteine into cystathionine	<i>STR2</i> has a paralog, <i>YML082W</i> , that arose from the whole genome duplication
35	TEA1	0,9585	1,6527	Sobre-expresados	Ty1 enhancer activator involved in Ty enhancer-mediated transcription; required for full levels of Ty enhancer-mediated transcription	C6 zinc cluster DNA-binding protein
36	THI73	0,9588	2,7925	Sobre-expresados	Putative plasma membrane permease	proposed to be involved in carboxylic acid uptake and repressed by thiamine; substrate of Dbf2p/Mob1p kinase; transcription is altered if mitochondrial dysfunction occurs
37	TMT1	0,9843	2,4393	Sobre-expresados	Trans-aconitate methyltransferase	cytosolic enzyme that catalyzes the methyl esterification of 3-isopropylmalate, an intermediate of the leucine biosynthetic pathway, and trans-aconitate, which inhibits the citric acid cycle
38	TRP2	0,9771	1,0395	Sobre-expresados	Anthranilate synthase	catalyzes the initial step of tryptophan biosynthesis, forms multifunctional hetero-oligomeric anthranilate synthase:indole-3-glycerol phosphate synthase enzyme complex with Trp3p
39	TRP3	0,9918	1,1516	Sobre-expresados	Indole-3-glycerol-phosphate synthase	forms bifunctional hetero-oligomeric anthranilate synthase:indole-3-glycerol phosphate synthase enzyme complex with Trp2p
40	TRP5	1	1,0529	Sobre-expresados	Tryptophan synthase	catalyzes the last step of tryptophan biosynthesis; regulated by

							the general control system of amino acid biosynthesis
41	YGL117W	0,9953	2,1408	Sobre-expresados	Putative protein of unknown function		
42	ALD6	0,9536	-1,3489	reprimidos	Cytosolic aldehyde dehydrogenase		activated by Mg ²⁺ and utilizes NADP ⁺ as the preferred coenzyme; required for conversion of acetaldehyde to acetate; constitutively expressed; locates to the mitochondrial outer surface upon oxidative stress
43	ASP3-1	0,9800	-2,2516	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism		expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-1</i> has a paralog, <i>ASP3-3</i> , that arose from a segmental duplication
44	ASP3-2	0,9791	-2,1731	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation		ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-2</i> has a paralog, <i>ASP3-4</i> , that arose from a segmental duplication
45	ASP3-3	0,9692	-2,2642	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation		ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-3</i> has a paralog, <i>ASP3-1</i> , that arose from a segmental duplication
46	ASP3-4	0,9768	-2,1847	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism		expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-4</i> has a paralog, <i>ASP3-2</i> , that arose from a segmental duplication

47	BAT1	0,99	-1,1600	reprimidos	Mitochondrial branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase	homolog of murine ECA39; highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase; <i>BAT1</i> has a paralog, <i>BAT2</i> , that arose from the whole genome duplication
48	CWP1	0,999	-3,1978	reprimidos	Cell wall mannoprotein that localizes to birth scars of daughter cells	linked to a beta-1,3- and beta-1,6-glucan heteropolymer through a phosphodiester bond; required for propionic acid resistance
49	GDH1	1	-1,3363	reprimidos	NADP(+)-dependent glutamate dehydrogenase	synthesizes glutamate from ammonia and alpha-ketoglutarate; rate of alpha-ketoglutarate utilization differs from <i>Gdh3p</i> ; expression regulated by nitrogen and carbon sources; <i>GDH1</i> has a paralog, <i>GDH3</i> , that arose from the whole genome duplication
50	INO1	1	-1,0077	reprimidos	Inositol-3-phosphate synthase	involved in synthesis of inositol phosphates and inositol-containing phospholipids; transcription is coregulated with other phospholipid biosynthetic genes by <i>Ino2p</i> and <i>Ino4p</i> , which bind the UASINO DNA element
51	LEU1	1	-1,4541	reprimidos	Isopropylmalate isomerase	catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
52	LEU2	1	-2,6438	reprimidos	Beta-isopropylmalate dehydrogenase (IMDH)	catalyzes the third step in the leucine biosynthesis pathway; can additionally catalyze the conversion of beta-ethylmalate into alpha-ketovalerate
53	SSA4	0,955	-3,9933	reprimidos	Heat shock protein that is highly induced upon stress	plays a role in SRP-dependent cotranslational protein-membrane targeting and translocation; member of the HSP70 family; cytoplasmic protein that concentrates in nuclei upon starvation; <i>SSA4</i> has a paralog, <i>SSA3</i> , that arose from the whole genome duplication
54	YLR161W	0,955	-2,8245	reprimidos	Putative protein of unknown function	<i>YLR156W</i> , <i>YLR159W</i> , and <i>YLR161W</i> are three identical open reading frames in S288C encoded near the ribosomal DNA region of chromosome 12; <i>YLR161W</i> has a paralog, <i>YLR157W-D</i> , that arose from a segmental duplication

2. Anexo C2. Lista de genes con expresión diferencial en un medio con ácido γ -aminobutírico

	Gene	Prob	LogFC	Regulation	Protein	Function
1	AAT2	0,9684	1,2464	Sobre-expresados	Cytosolic aspartate aminotransferase involved in nitrogen metabolism;	localizes to peroxisomes in oleate-grown cells
2	BNA1	0,9994	1,3099	Sobre-expresados	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase	required for the de novo biosynthesis of NAD from tryptophan via kynurenine; expression regulated by Hst1p
3	CAR1	1	1,7199	Sobre-expresados	Arginase	catabolizes arginine to ornithine and urea; expression responds to both induction by arginine and nitrogen catabolite repression; disruption decreases production of carcinogen ethyl carbamate during wine fermentation and also enhances freeze tolerance
4	IDH1	0,9766	1,1294	Sobre-expresados	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase	complex catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle
5	SNO1	0,9987	2,6937	Sobre-expresados	Protein of unconfirmed function	involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
6	SNZ1	1	1,8575	Sobre-expresados	Protein involved in vitamin B6 biosynthesis	member of a stationary phase-induced gene family; coregulated with <i>SNO1</i> ; interacts with Sno1p and with Yhr198p, perhaps as a multiprotein complex

							containing other Snz and Sno proteins
7	SRL4	0,9993	3,3843	Sobre-expresados	Protein of unknown function		involved in regulation of dNTP production; null mutant suppresses the lethality of <i>lcd1</i> and <i>rad53</i> mutations; expression is induced by <i>Kar4p</i>
8	tV(UAC)B	1	4,3475	Sobre-expresados	Valine tRNA (tRNA-Val)		predicted by tRNAscan-SE analysis
9	YGL117W	0,9990	2,0062	Sobre-expresados	Putative protein of unknown function		
10	YLR161W	0,9727	-3,9561	reprimidos	Putative protein of unknown function		<i>YLR156W</i> , <i>YLR159W</i> , and <i>YLR161W</i> are three identical open reading frames in S288C encoded near the ribosomal DNA region of chromosome 12; <i>YLR161W</i> has a paralog, <i>YLR157W-D</i> , that arose from a segmental duplication
11	ASP3-1	1	-2,6303	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism		expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-1</i> has a paralog, <i>ASP3-3</i> , that arose from a segmental duplication
12	ASP3-2	1	-2,6158	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation		ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-2</i> has a paralog, <i>ASP3-4</i> , that arose from a segmental duplication

13	ASP3-3	1	-2,5915	reprimidos	Cell-wall asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation	L- ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-3</i> has a paralog, <i>ASP3-1</i> , that arose from a segmental duplication
14	ASP3-4	1	-2,6011	reprimidos	Cell-wall asparaginase II involved in asparagine catabolism	L- expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-4</i> has a paralog, <i>ASP3-2</i> , that arose from a segmental duplication
15	BAT1	0,9992	-1,5305	reprimidos	Mitochondrial branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase; preferentially involved in BCAA biosynthesis; homolog of murine ECA39	highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase; <i>BAT1</i> has a paralog, <i>BAT2</i> , that arose from the whole genome duplication
16	IMD2	0,9938	-1,2944	reprimidos	Inosine monophosphate dehydrogenase	catalyzes the rate-limiting step in GTP biosynthesis, expression is induced by mycophenolic acid resulting in resistance to the drug, expression is repressed by nutrient limitation; <i>IMD2</i> has a paralog, <i>YAR073W/YAR075W</i> , that arose from a segmental duplication

17	LEU1	1	-1,4982	reprimidos	Isopropylmalate isomerase	catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
18	LEU2	1	-1,9842	reprimidos	Beta-isopropylmalate dehydrogenase (IMDH)	catalyzes the third step in the leucine biosynthesis pathway; can additionally catalyze the conversion of beta-ethylmalate into alpha-ketovalerate
19	URA1	0,9984	-1,9950	reprimidos	Dihydroorotate dehydrogenase	catalyzes the fourth enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimidines, converting dihydroorotic acid into orotic acid
20	YLR159W	1	-3,9094	reprimidos	Putative protein of unknown function	of <i>YLR156W</i> , <i>YLR159W</i> , and <i>YLR161W</i> are three identical open reading frames in S288C encoded near the ribosomal DNA region of chromosome 12; <i>YLR159W</i> has a paralog, <i>YLR156W</i> , that arose from a segmental duplication

3. Anexo C3. Lista de genes con expresión diferencial en un medio con V I L

	Gene	Prob	LogFC	Regulation	Protein	Function
1	AAT2	0,9684	1,2464	Sobre-expresados	Cytosolic aspartate aminotransferase involved in nitrogen metabolism;	localizes to peroxisomes in oleate-grown cells
2	BNA1	0,9994	1,3099	Sobre-expresados	3-hydroxyanthranilic acid dioxygenase	required for the de novo biosynthesis of NAD from tryptophan via kynurenine; expression regulated by Hst1p

3	CAR1	1	1,7199	Sobre-expresados	Arginase	catabolizes arginine to ornithine and urea; expression responds to both induction by arginine and nitrogen catabolite repression; disruption decreases production of carcinogen ethyl carbamate during wine fermentation and also enhances freeze tolerance
4	IDH1	0,9766	1,1294	Sobre-expresados	Subunit of mitochondrial NAD(+)-dependent isocitrate dehydrogenase	complex catalyzes the oxidation of isocitrate to alpha-ketoglutarate in the TCA cycle
5	SNO1	0,9987	2,6937	Sobre-expresados	Protein of unconfirmed function	involved in pyridoxine metabolism; expression is induced during stationary phase; forms a putative glutamine amidotransferase complex with Snz1p, with Sno1p serving as the glutaminase
6	SNZ1	1	1,8575	Sobre-expresados	Protein involved in vitamin B6 biosynthesis	member of a stationary phase-induced gene family; coregulated with <i>SNO1</i> ; interacts with Sno1p and with Yhr198p, perhaps as a multiprotein complex containing other Snz and Sno proteins
7	SRL4	0,9993	3,3843	Sobre-expresados	Protein of unknown function	involved in regulation of dNTP production; null mutant suppresses the lethality of <i>lcd1</i> and <i>rad53</i> mutations; expression is induced by Kar4p
8	tV(UAC)B	1	4,3475	Sobre-expresados	Valine tRNA (tRNA-Val)	predicted by tRNAscan-SE analysis
9	YGL117W	0,9990	2,0062	Sobre-expresados	Putative protein of unknown function	
10	YLR161W	0,9727	-3,9561	reprimidos	Putative protein of unknown function	<i>YLR156W</i> , <i>YLR159W</i> , and <i>YLR161W</i> are three identical open reading frames in S288C encoded near the ribosomal DNA region of chromosome 12; <i>YLR161W</i> has a paralog, <i>YLR157W-D</i> , that arose

11	ASP3-1	1	-2,6303	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism	from a segmental duplication expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-1</i> has a paralog, <i>ASP3-3</i> , that arose from a segmental duplication
12	ASP3-2	1	-2,6158	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation	ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-2</i> has a paralog, <i>ASP3-4</i> , that arose from a segmental duplication
13	ASP3-3	1	-2,5915	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism; expression induced during nitrogen starvation	ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-3</i> has a paralog, <i>ASP3-1</i> , that arose from a segmental duplication
14	ASP3-4	1	-2,6011	reprimidos	Cell-wall L-asparaginase II involved in asparagine catabolism	expression induced during nitrogen starvation; ORF contains a short non-coding RNA that enhances expression of full-length gene; likely arose in via horizontal gene transfer from the wine yeast <i>Wickerhamomyces anomalus</i> or a close relative; reference strain S288C has four copies of <i>ASP3</i> ; <i>ASP3-4</i> has a paralog, <i>ASP3-2</i> , that arose from a

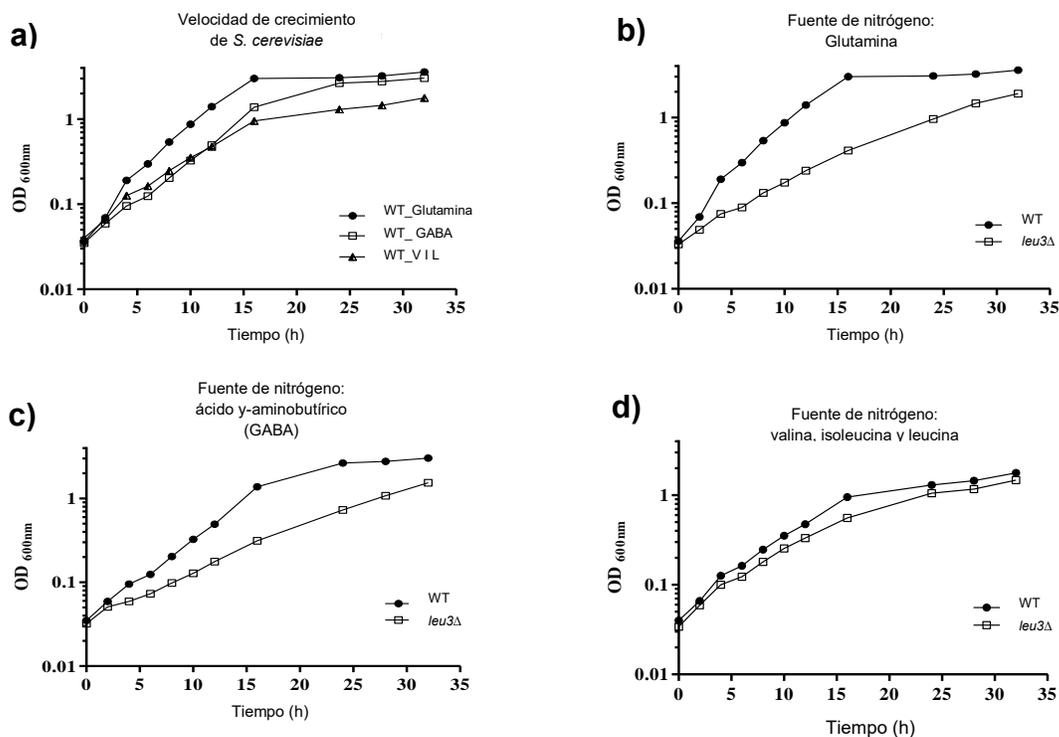
						segmental duplication
15	BAT1	0,9992	-1,5305	reprimidos	Mitochondrial branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase; preferentially involved in BCAA biosynthesis; homolog of murine ECA39	highly expressed during logarithmic phase and repressed during stationary phase; <i>BAT1</i> has a paralog, <i>BAT2</i> , that arose from the whole genome duplication
16	IMD2	0,9938	-1,2944	reprimidos	Inosine monophosphate dehydrogenase	catalyzes the rate-limiting step in GTP biosynthesis, expression is induced by mycophenolic acid resulting in resistance to the drug, expression is repressed by nutrient limitation; IMD2 has a paralog, <i>YAR073W/YAR075W</i> , that arose from a segmental duplication
17	LEU1	1	-1,4982	reprimidos	Isopropylmalate isomerase	catalyzes the second step in the leucine biosynthesis pathway
18	LEU2	1	-1,9842	reprimidos	Beta-isopropylmalate dehydrogenase (IMDH)	catalyzes the third step in the leucine biosynthesis pathway; can additionally catalyze the conversion of beta-ethylmalate into alpha-ketovalerate
19	URA1	0,9984	-1,9950	reprimidos	Dihydroorotate dehydrogenase	catalyzes the fourth enzymatic step in the de novo biosynthesis of pyrimidines, converting dihydroorotic acid into orotic acid
20	YLR159W	1	-3,9094	reprimidos	Putative protein of unknown function	<i>YLR156W</i> , <i>YLR159W</i> , and <i>YLR161W</i> are three identical open reading frames in S288C encoded near the ribosomal DNA region of chromosome 12; <i>YLR159W</i> has a paralog, <i>YLR156W</i> , that arose from a segmental duplication

XV. APENDICES

A. Resultados de los experimentos control

1. Confirmación de la mutante *leu3Δ*

1.1. **Fenotipo de crecimiento:** se graficaron las curvas de crecimiento de la cepa WT y la mutante *Leu3Δ* y se comparó su μ cuando crecieron en diferentes fuentes de nitrógeno.



e) Velocidad específica de crecimiento

Cepas	Fuente de nitrógeno		
	Glutamina	GABA	VIL
WT	0.29	0.15	0.13
<i>leu3Δ</i>	0.13	0.10	0.11

Figura 13. **Curvas de crecimiento de la cepa WT y la *leu3Δ* en un medio con GLN, GABA o VIL como fuentes de nitrógeno.** Eje Y representa, densidad óptica medida a 600nm. Eje X, tiempo en horas. Figura, comparación de la velocidad de crecimiento cuando la cepa WT creció en un medio con GLN, GABA o VIL. Figura 13b, 13c y 13d, comparación de la velocidad de crecimiento entre la cepa WT y la mutante *leu3Δ* cuando crecieron en un medio con GLN (13b), GABA (13c) o VIL (13d). Figura 13e, comparación de las μ de la cepa WT y de la mutante *leu3Δ*, cuando crecieron en las diferentes fuentes de nitrógeno.

S. cerevisiae disminuyó su velocidad de crecimiento en fuentes de nitrógeno secundarias no represoras como GABA (0.15) y V I L (0.11) comparada con fuentes represoras como GLN (0.29) (figura 13a y 13e). La mutante *leu3Δ* disminuyó su velocidad de crecimiento en presencia de GLN y GABA, en comparación con la WT (figura 13b, 13c, y 13e). Sin embargo, en un medio con V I L, *leu3Δ* tuvo una velocidad de crecimiento muy parecida a la velocidad de crecimiento de la WT (figura 13d y 13e). Esto podría indicar que la *leu3Δ*, disminuyó la velocidad de crecimiento debido a la escasez intracelular de V I L. Por otro lado, la diferencia de la velocidad específica de crecimiento entre la *leu3Δ* y la WT es más evidente en GLN que en GABA (figuras 13e). Esto le otorga a Leu3 un papel de regulación más significativo en fuentes represoras de nitrógeno. Probablemente en GABA participen otros TF que compensan la ausencia de Leu3 y evitan que la velocidad de crecimiento disminuya de gran manera.

1.2. Confirmación de genotipo por PCR: Se realizó un PCR usando como templado DNA genómico de la cepa WT y la mutante *leu3Δ*. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% y se comparó el tamaño de los fragmentos amplificados.

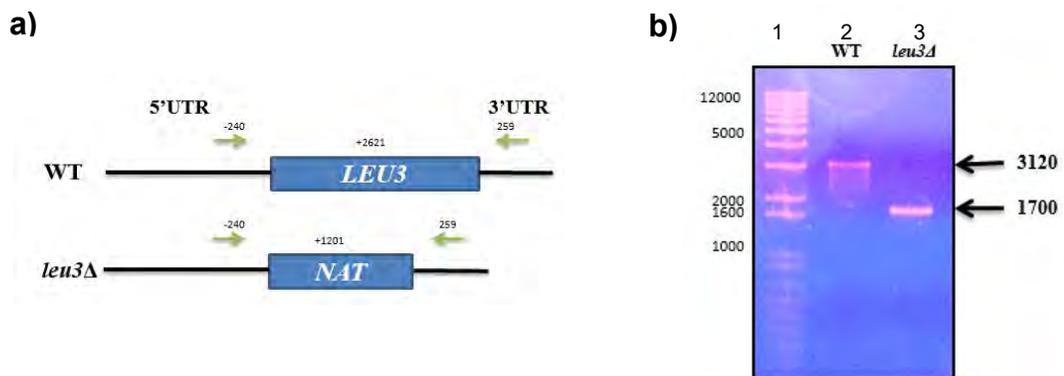


Figura 14. **Confirmación de la mutante *leu3Δ* por PCR punto final.** Figura 14a, representa el diseño experimental para amplificar el locus del gen *LEU3* en la cepa WT y en la mutante *leu3Δ*. El oligonucleótido sentido fue diseñado para amplificar 240 pb río arriba del codón de inicio, sobre la región 5'UTR; mientras que, el

oligonucleótido antisentido fue diseñado para amplificar 259 pb río abajo del codón de término, sobre la región 3'UTR. Figura 14b, gel de agarosa; carril 1, marcador de peso molecular (1Kb plus DNA lader, Thermo Fisher Scientific ®); carril 2, producto de PCR de la cepa WT; carril 3, producto de PCR de la mutante *leu3Δ*.

En la WT la región codificante del gen *LEU3* mide 2,621 pb. En la *leu3Δ*, el gen *LEU3* fue remplazado por recombinación homóloga por el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (*NAT*) que mide 1201 pb. Para confirma el genotipo de la cepa mutante se sumó al tamaño de cada gen (*LEU3* y *NAT*), el tamaño de los fragmentos de las regiones UTR que amplifican los oligonucleótidos. El fragmento amplificado en la WT debe medió alrededor de 3,120 pb, mientras que el fragmento amplificado en la *leu3Δ* midió alrededor de 1,700 pb, tal como se observó en el gel de agarosa (figura 14b).

1.3. Confirmación de expresión por Northern Blot (NB): Se realizó un NB con el fin de reproducir los resultados de expresión de RNA de los genes *BAT1* y *BAT2*, obtenidos previamente en el laboratorio (Tesis de Doctorado, James Enrique González).

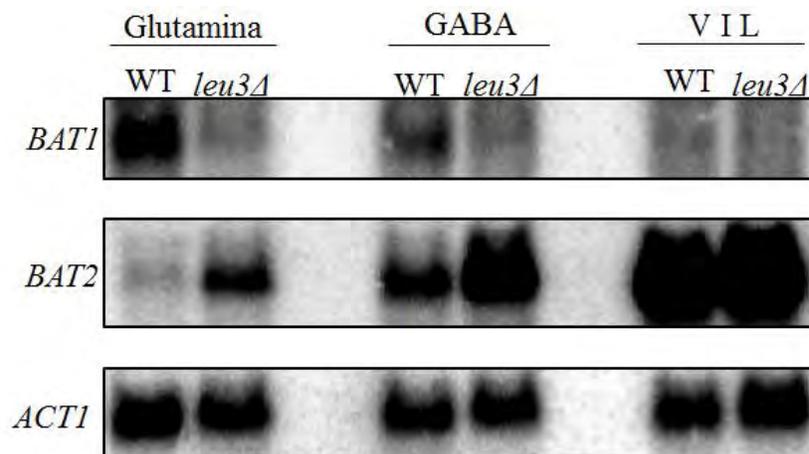


Figura 15. **Confirmación de expresión por NB.** Perfiles de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2* de la cepa WT y de la mutante *Leu3Δ* cuando crecen en GLN, GABA o VIL como fuentes de nitrógeno. *ACT1* es un gen constitutivo que se utilizó como control de carga de la concentración de RNAt.

El gen *BAT1* tuvo un perfil de expresión biosintético. Cuando la cepa WT creció en GLN, *BAT1* se expresó fuertemente debido a que es una fuente de nitrógeno primaria, en la cual la célula requiere biosintetizar aminoácidos. *BAT1* no ha sido reportado como un gen NCR-dependiente, es decir, su expresión no debería responder a la calidad de la fuente de nitrógeno; Sin embargo, se expresó en presencia de GABA de manera basal. Cuando la cepa WT creció en presencia de V I L, la leucina ejerció una regulación negativa sobre las α -IPM sintetas y por lo tanto Leu3 no activó la expresión de *BAT1*. En una mutante *leu3* Δ , la expresión de *BAT1* disminuyó cuando ésta creció en GLN y GABA siendo más evidente en GLN. Cuando *leu3* Δ creció en presencia de V I L, la expresión de *BAT1* fue igual a la expresión de la cepa WT crecida en V I L.

BAT2 es un gen NCR-dependiente; no se expresó cuando la cepa WT crece en presencia de fuentes de nitrógeno represivas tales como GLN y se expresó cuando ésta crece en fuentes de nitrógeno no represivas como GABA o V I L. Debido a que, *BAT2* tuvo un perfil de expresión catabólico, cuando se creció la cepa WT en presencia de V I L, su expresión es muy fuerte. Al contrario de *BAT1*, el gen *BAT2* aumentó su expresión cuando se creció a la mutante *leu3* Δ en presencia de GLN o GABA; sin embargo, cuando crece en presencia de V I L, su expresión es igual a la expresión del gen *BAT2* de la cepa WT crecida en V I L.

2. Confirmación de la triple mutante $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$ y la doble mutante $leu4\Delta leu9\Delta$.

2.1. Fenotipo de crecimiento: Se graficaron las curvas de crecimiento de la cepa WT, la triple y doble mutante y se comparó su μ cuando crecen en diferentes fuentes de nitrógeno.

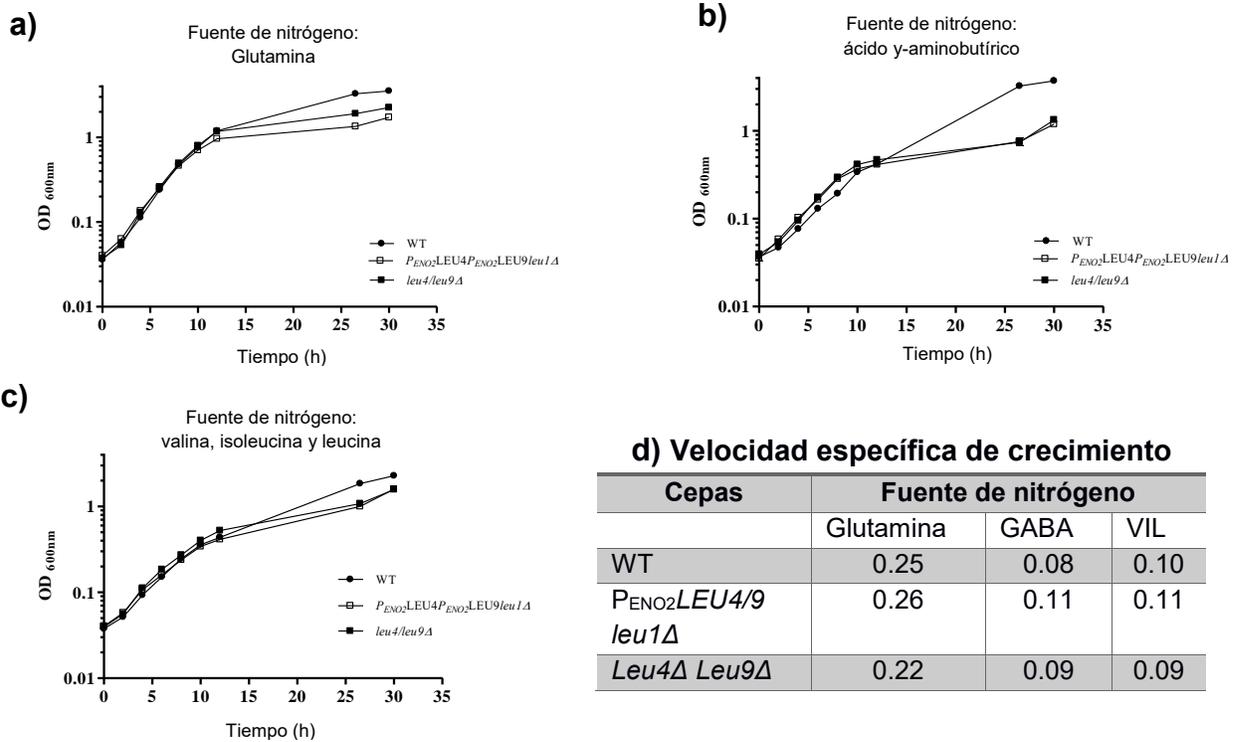


Figura 16. **Fenotipo de crecimiento.** Comparación de las velocidades de crecimiento de la cepa WT, la doble y triple mutante cuando crecieron en un medio con GLN (figura 16a), GABA (figura 16b) o V I L (figura 16c) como fuente de nitrógeno. La doble y la triple mutante eran auxótrofas de leucina; por lo que, los medios con GLN y GABA requirieron de leucina exógena para que las mutantes pudieran crecer. Eje Y, densidad óptica medida a 600nm. Eje X, tiempo en horas. Figura 16d, comparación de las μ de la cepa WT, la doble y triple mutante cuando crecieron en presencia de GLN, GABA o V I L como fuente de nitrógeno.

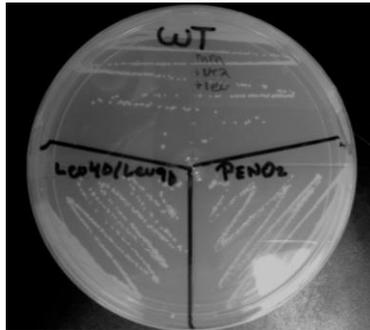
La mutante *P_{ENO2}LEU4/9leu1Δ* tiene bajo el promotor de *ENO2* a los genes que sintetizan las enzimas α -IPM sintasas (*LEU4* y *LEU9*), que participan en el primer paso de la biosíntesis de leucina. Además no tiene el gen *LEU1* que sintetiza la enzima isopropilmalato isomerasa que participa en el siguiente paso de la vía. Por lo tanto esta cepa producía y acumula grandes cantidades de α -IPM. Por el contrario la *leu4Δleu9Δ* no tiene los genes *LEU4* y *LEU9* y era incapaz de producir α -IPM.

La comparación de las velocidades de crecimiento de éstas mutantes con la cepa WT cuando crecieron en un medio que contiene GLN (figura 16a), GABA (figura 16b) o V I L (figura 16c) como fuente de

nitrógeno, indica que la concentración de α -IPM no tuvo ninguna repercusión en la velocidad de crecimiento. Ahora bien, es importante mencionar que ambas mutantes son auxótrofas de leucina y que fue necesario agregar leucina exógena al medio para que pudieran crecer. Es posible que, el impacto de la concentración intracelular de α -IPM en cada mutante, no se haya visto reflejado en la velocidad de crecimiento, debido a que la levadura tuvo todos los nutrientes que requirió. Esto no descarta la posibilidad de que la concentración intracelular de α -IPM produzca cambios en la expresión genética de las mutantes.

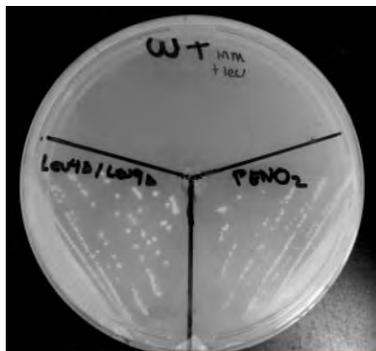
2.2. Caracterización fenotípica en placa: para confirmar el fenotipo de crecimiento de la cepa WT, la doble y triple mutante; se crecieron éstas cepas en placas de agar sólido con y sin los nutrientes necesarios para su crecimiento.

a) MM + leu + ura



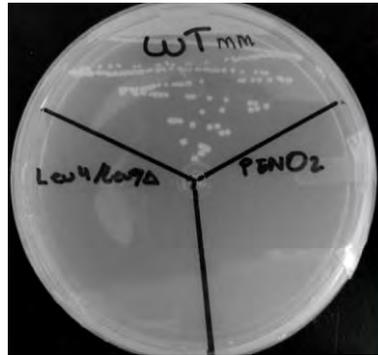
Las tres cepas WT, $P_{ENO2}LEU4/9leu1\Delta$ y $leu4\Delta leu9\Delta$ crecieron en medio mínimo con uracilo y leucina, debido a que el medio suplementa sus auxotrofías.

b) MM + leu



La cepa WT no creció en medio mínimo con leucina debido a que no tiene el gen *URA3* como marcador de selección y por lo tanto necesitaba uracilo en el medio.

c) MM + ura



Debido a que la triple y doble mutante son auxótrofas de leucina, necesitaban leucina exógena para crecer en cualquier medio.

Figura 17. **Caracterización fenotípica en placa.** Crecimiento de la cepa WT, de la triple y dobles mutantes en placas de agar sólido con diferentes nutrientes. Figura 17a, medio mínimo (MM) con leucina (leu) y uracilo (ura). Figura 17b, medio mínimo con leucina. Figura 17c, medio mínimo con uracilo.

2.3. Confirmación de expresión por NB: se realizó un ensayo de NB con el fin de reproducir los datos de expresión de RNA de los genes *BAT1* y *BAT2* de la triple y la doble mutante, cuando crecen en GLN, GABA o VIL como fuente de nitrógeno.

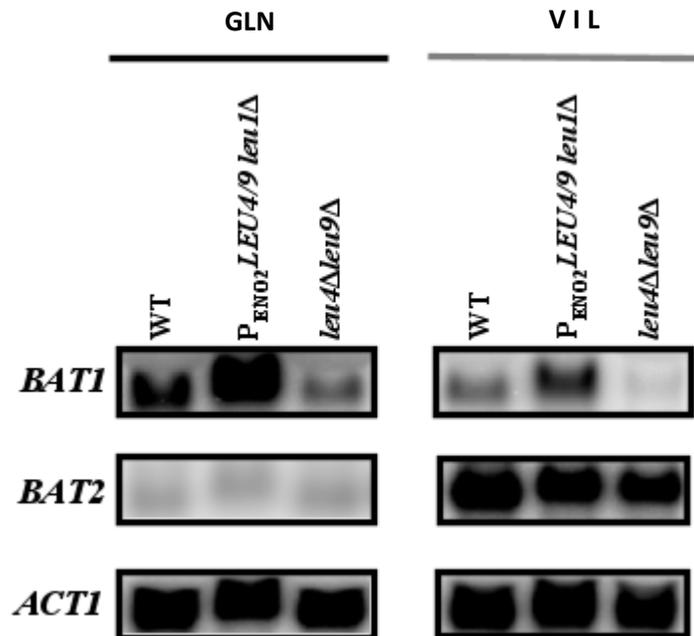


Figura 18 se observan los perfiles de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2* de la

cepa WT, la triple y doble mutante cuando crecieron en un medio con GLN o V I L como fuentes de nitrógeno. Se utilizó al gen *ACT1* como control de carga de la concentración de RNAt.

Como era de esperarse para *BAT1*, que es un gen regulado positivamente por Leu3, su expresión incrementa en la triple mutante $P_{\text{ENO2}}LEU4/9leu1\Delta$ en comparación con la expresión de la cepa WT, tanto en GLN como en V I L. Este hallazgo es una evidencia clara de que la triple mutante está acumulando α -IPM, que es el co-activador de Leu3. Este hecho es apoyado por la disminución de la expresión de *BAT1* de la doble mutante *leu4 Δ leu9 Δ* cuando crece en GLN y V I L. Por el contrario, cuando las mutantes crecen en GLN o V I L, no se observa un cambio de la expresión de *BAT2*, con relación a la WT. Esto nos indica que, el aumento de la expresión de *BAT2* en la *leu3 Δ* cuando crece en GLN (figura 3) es independiente de la concentración intracelular de α -IPM.

B. Reporte de investigación 2016: Trabajo de colaboración entre la Universidad de Roma “La Sapienza” y la Universidad Nacional Autónoma de México, apoyado por el ministerio de relaciones exteriores de México e Italia.

Prof. Michele M. Bianchi -Coordinator en Roma-
Dr. Patrizia Filetici – Investigadora asociada-
Dept. de Biología y Biotecnología Charles Darwin.
Universidad de Roma “La Sapienza”

PhD. M. Alicia González Manjarrez –Coordinadora en México-
Fulvia Stefany Argueta Zepeda –Estudiante de Maestría-
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México -UNAM-
Estancia de Investigación del 20 de Junio al 19 de Julio de 2016

Reporte de Resultados
Perfil de acetilación dependiente de Gcn5 en los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivo

Determinar y comparar el perfil de acetilación dependiente de Gcn5 de los promotores de *BAT1* y *BAT2* en la cepa silvestre (WT) de la levadura *S. cerevisiae* y su mutante sencilla *gcn5Δ* cuando crecen en Valina, isoleucina y leucina (V I L) como fuente de nitrógeno.

Primera Semana (20-26 de Junio)

El 20 de Junio tomé el vuelo de México a Roma. Arribé el 21 de Junio en la noche. El 22 de Junio me reuní con el Prof. Michele M. Bianchi y sus estudiantes de posgrado en la Universidad de Roma “SAPIENZA”. Ellos me llevaron a conocer la universidad, el departamento y los laboratorios en donde estuve trabajando el resto del mes. De igual manera me mostraron las diferentes áreas de trabajo, materiales y equipos. El siguiente día el Prof. Bianchi me presentó con la Dra. Patrizia Filetici y sus estudiantes con quienes realizaría los experimentos necesarios para desarrollar el proyecto de investigación. Tuve un seminario con ambos grupos de trabajo para discutir los objetivos del proyecto y desarrollar un plan de trabajo explícito.

Segunda semana (27-4 de Julio)

Preparé medio rico YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptone, 2% de glucose) para refrescar las cepas de *S. cerevisiae* y la mutante simple *gcn5Δ*. Las células crecieron en medio sólido YPD durante 48 h. Tomé una colonia e inoculé medio líquido YPD, en el cual crecieron durante 24 horas más. Finalmente Inoculé del medio líquido otra placa de agar sólido de YPD y seleccioné las colonias para empezar a trabajar. Durante la segunda semana también preparé medio mínimo líquido con valina (P/V, 150mg/Lt), isoleucina (P/V, 30mg/Lt) y leucina (P/V, 100mg/LT) como fuente de nitrógeno para crecer a las cepas WT y *gcn5Δ* para el experimento de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Esta combinación de fuentes de nitrógeno la llamamos V I L. También preparé los materiales y reactivos necesarios para desarrollar la técnica de ChIP.

Tercera semana (5-11 de Julio)

La técnica de ChIP la realicé siguiendo el protocolo utilizado por la Dr. Filetici. Crecí las células de ambas cepas hasta tener una densidad óptica entre 0.45 y 0.5 (OD/ml at 600nm) en medio mínimo V I L. Cuando las células alcanzaron esta densidad se realizó el crosslinking para fijar enlaces entre el DNA y las proteínas. La estrategia experimental incluyó 8 muestras: 2 cepas diferentes (WT y *gcn5Δ*) en 4 condiciones diferentes (INPUT, muestras tratadas con el anticuerpo anti-H3K14, anti-UMH3 y muestras sin tratar con ningún anticuerpo). Al final del protocolo se obtuvieron 60µl de DNA por cada muestra).

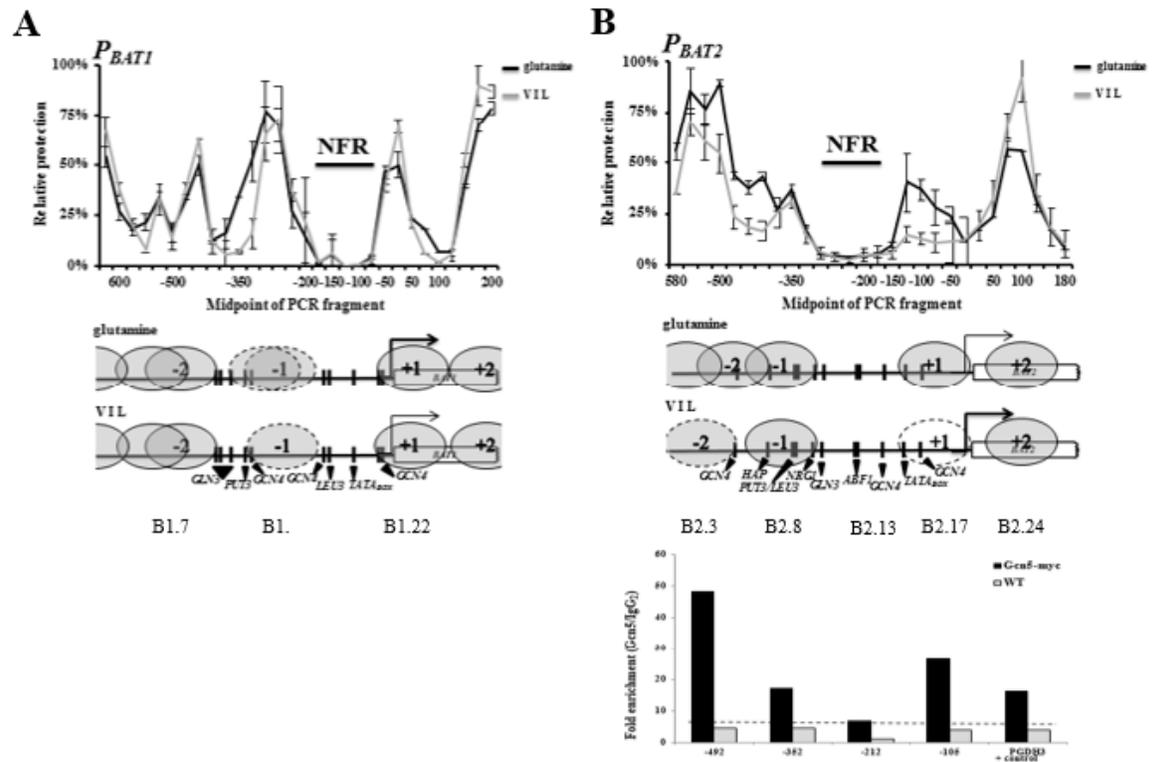
Table 1: Nombres de las muestras obtenidas al final del ChIP

Número	Nombre	Número	Nombre
1	WT Input	5	gcn5Δ Input
2	WT anti H3K14	6	gcn5Δ anti H3K14
3	WT UMH3	7	gcn5Δ UMH3
4	WT No antibody	8	gcn5Δ No antibody

Cuarta semana (12-19 de Julio)

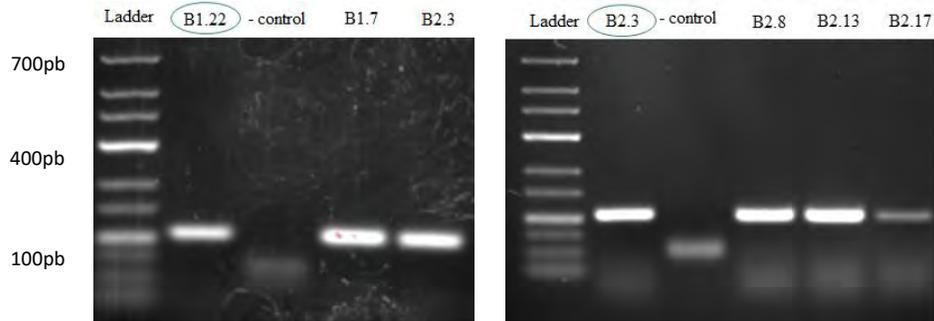
En un trabajo previo en el laboratorio de la Dra. Alicia González se obtuvieron los mapas de la posición de nucleosomas de los promotores de *BAT1* y *BAT2* utilizando la técnica de nucleosome scanning assay (NuSA) con diferentes primers que amplifican regiones de aproximadamente 100pb alrededor de ambos promotores (Imagen 1). Además se obtuvieron resultados previos que muestran las regiones enriquecidas de Gcn5-myc en el promotor de *BAT2*.

Imagen 1: selección de primers



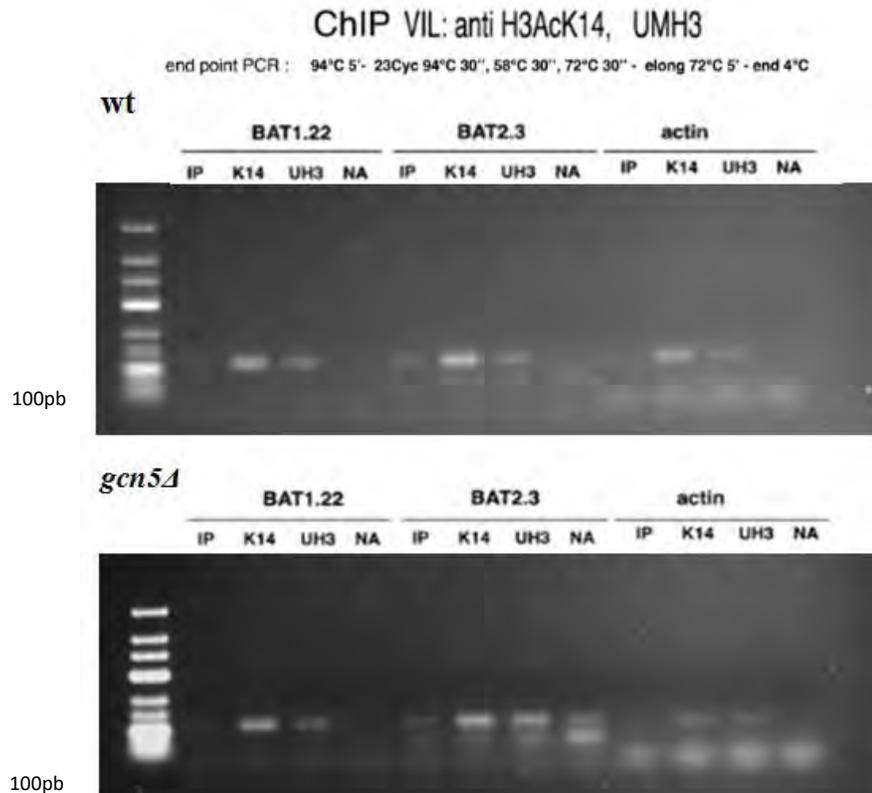
En base a experimentos se escogieron ciertos pares de primers y se probó la eficiencia de cada uno de ellos mediante PCR punto final (Imagen 2).

Imagen 2: eficiencia de primers



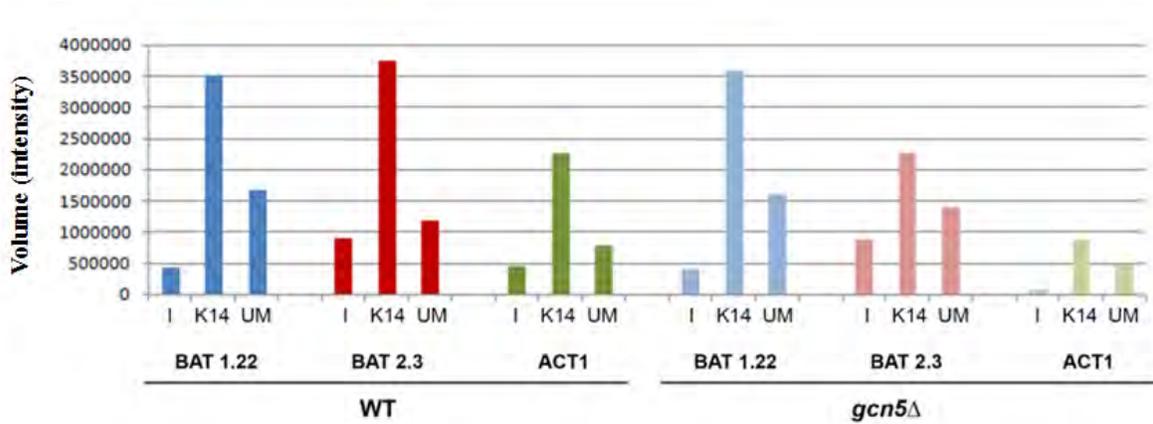
Todos los primers amplificaron bien a excepción del B2.17 el cual tuvo menos eficiencia. Finalmente se escogieron los primers B1.22 para amplificar el promotor de *BAT1* y B2.3 para amplificar el promotor de *BAT2*. Con ambos pares de primers se probaron las muestras obtenidas en la Inmunoprecipitación de cromatina mediante PCR punto final.

Imagen 3: prueba de calidad de las muestras obtenidas con el protocolo de ChIP



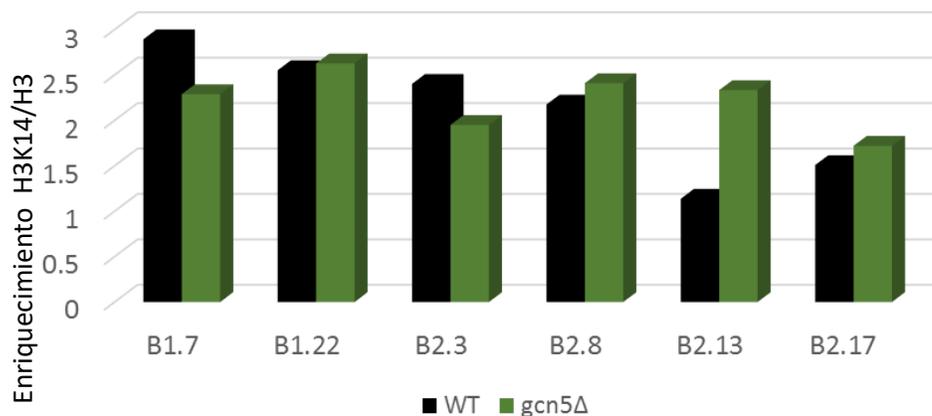
Las bandas obtenidas en la amplificación de cada muestra fue buena (Imagen 3) (también se utilizaron primer que amplifican actina como muestras control). Debido al éxito de los resultados se decidió medir cuantitativamente cada banda de la imagen mediante el software 5.2.1 de Biorad con el fin de obtener resultados preliminares del ChIP (Imagen 4).

Imagen 4: resultado preliminar de la acetilación de los promotores de *BAT1* y *BAT2* por Gcn5.



La imagen muestra que Gcn5 puede ser responsable de la acetilación del promotor *BAT2* y que podría jugar un papel importante en la regulación de éste gen en V I L como fuente de nitrógeno. A diferencia del promotor de *BAT1*, que no se ve afectado por la ausencia del gen GCN5.

Imagen 5: qPCR de las muestras obtenidas por ChIP en diferentes regiones de los promotores *BAT1* y *BAT2*.



El resultado obtenido mediante PCR punto final y qPCR se replican en las coordenadas del promotor B1.22 y B2.3, sin embargo los resultados obtenidos para las

nuevas coordenadas B1.7 B2.8, B2.13 y B2.17 son contrastantes con los antecedentes (ver imagen 1)

La región B1.7 parece estar siendo acetilada, lo que sugiere que Gcn5 también juega un papel en la regulación de *BAT1*. En el promotor de *BAT2* a diferencia de la región B.3, las regiones B.8, B.13 y B.17 parecieran estar acetiladas en la mutante *gcn5Δ* y no en la WT lo cual contrasta con los antecedentes de ChIP en *gcn5-myc* (imagen 1), en donde se muestra un enriquecimiento en el pegado de Gcn5 tanto en la región B.3 como en la región B.17.

Conclusión final

Debido a que los resultados de acetilación en la Histona 3, lisina 14 (H3K14) en diferentes regiones de los promotores *BAT1* y *BAT2* son contrastantes con los antecedentes se necesita realizar una réplica biológica para determinar si Gcn5 está jugando verdaderamente un papel importante en la regulación de *BAT1* y/o *BAT2* en V I L como fuente de nitrógeno.

Recomendaciones

1. De los antecedentes con los que se cuentan, repetir el experimento de northern blot para confirmar los resultados de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2*, cuando la cepa WT y la mutante *gcn5Δ* crecen en glutamina y V I L como fuentes de nitrógeno.
2. Realizar los NUSA de los promotores de *BAT1* y *BAT2* cuando la mutante *gcn5Δ* crece en glutamina y V I L, para verificar que el posicionamiento de los nucleosomas coincida con los resultados del ChIP.
3. Realizar los ensayos de ChIP's de la cepa WT y la mutante *gcn5Δ* cuando crecen en glutamina y V I L para tener una condición control y poder comparar los resultados.