



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

Unidad de Genómica Avanzada

**“Análisis cuantitativo del efecto de posición telomérica
sobre la expresión genética en *Saccharomyces cerevisiae*”**

Tesis que presenta

Q.F.B. Jhonatan Alejandro Hernández Valdés

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en la Especialidad de Biología Integrativa

Director de tesis:

Dr. Alexander De Luna Fors

Este trabajo de Tesis de Maestría se realizó en el laboratorio de Sistemas Genéticos bajo supervisión del Dr. Alexander de Luna Fors, en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del programa de becas para estudios de posgrado (beca 517362).

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a toda mi familia por todo su apoyo y cariño.
Muy especialmente a mi hermano Yair, mi mamá Alejandra y a mi papá Armando por estar en las buenas y en las malas conmigo, muchas gracias.

RESUMEN

La expresión de un gen puede ser afectada por su posición en el cromosoma, con mayor susceptibilidad a inactivación genética en los telómeros de eucariontes, un fenómeno conocido como efecto de posición telomérica (TPE). Los estudios de las regiones subtelo­méricas en *Saccharomyces cerevisiae* proporcionan información relevante sobre los mecanismos de la formación de heterocromatina y el papel de la epigenética en el silenciamiento de genes, sin embargo aún no hay una descripción clara de cómo se origina el TPE en diversas regiones subtelo­méricas y los factores involucrados.

En este proyecto realizamos una caracterización cuantitativa del silenciamiento transcripcional que presentan diversas regiones subtelo­méricas a nivel de células individuales. Desarrollamos un método de microscopia y análisis de imágenes para detectar diferencias en los niveles de expresión de un gen reportero fluorescente integrado en quince regiones teloméricas distintas. Nuestros resultados muestran una amplia variación de patrones de silenciamiento en las diferentes regiones analizadas. Además, observamos efectos diferenciales del efecto de mutaciones en genes que podrían contribuir al silenciamiento subtelo­mérico, entre ellos los relacionados a modificaciones post-traduccionales de histonas. Este trabajo representa un enfoque para describir el silenciamiento subtelo­mérico de forma cuantitativa y tiene implicaciones en el entendimiento de problemas biológicos como la organización del genoma, el silenciamiento epigenético, mecanismos de supervivencia y efecto en patogenicidad.

ABSTRACT

The expression of a gene can be affected by its position on a chromosome, notoriously by the susceptibility to inactivation of genes near the eukaryotic telomeres, named the telomere position effect (TPE). Studies in subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae* have provided valuable insights into the mechanisms of heterochromatin formation and epigenetic gene silencing, but we are still lacking a general picture of the way in which different subtelomeric regions and silencing factors underlie TPE.

Here, we present a quantitative characterization at single-cell resolution of the transcriptional silencing at diverse subtelomeric regions. We developed a microscopy method and image analysis pipeline to detect the fluorescence intensity differences of a reporter integrated at fifteen subtelomeric positions. Our results show widespread variation of silencing patterns at different subtelomeric loci. Furthermore, we observed differential effect of the way in which subtelomeric silencing is affected by mutations in genes that could mediate this phenomenon. Our study provides a framework to quantitatively describe the subtelomeric silencing and sheds light on a wide range of biological problems associated to epigenetic gene silencing, including genome organization, survival mechanisms, pathogenesis, aging, and disease.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. El silenciamiento transcripcional en <i>S. cerevisiae</i>	10
1.1.1 El efecto de posición telomérica (TPE).....	11
1.2 Estudio del TPE en <i>S. cerevisiae</i>	12
1.3 El papel de las marcas epigenéticas en la represión subtelomérica	14
1.4 El TPE como un mecanismo adaptativo	15
1.5 Los modelos moleculares que explican el TPE	16
1.6 Variación estocástica y ruido en la expresión genética	17
2. OBJETIVO	19
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos particulares	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Material	20
3.1.1 Cepas	20
3.1.2 Construcciones Genéticas	20
3.2 Métodos y procedimientos experimentales	20
3.2.1 Ensayo de goteo en placa	20
3.2.2 Transformación de levadura	21
3.2.3 Extracción rápida de DNA genómico de levadura	22
3.2.4 Microscopia de fluorescencia, técnica confocal.....	23
3.2.5 Arreglo Sintético Genético (SGA)	24
3.3 Medios de cultivo	28
3.3.1 Medio YPD.....	28
3.3.2 Medio sintético completo sin uracilo (SC-URA).....	28
3.3.3 Preparación de cajas de cultivo 5-FOA	29
3.3.4 Medio de esporulación.....	30
3.3.5 Medio de germinación para SGA.....	30
3.3.6 Medio de resistencia 1 para SGA	30
3.3.7 Medio de resistencia 2 para SGA	31
3.4 Soluciones	31
3.4.1 Solución amortiguadora PBS 1X	31
3.4.2 Solución fijadora de paraformaldehído 4%.....	31
3.4.3 TAE 50X	32
3.4.4 Antibióticos	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Primera parte	33
4.1.1 Desarrollo de método de microscopía y análisis de imagen	33

4.1.1.1	Funcionalidad del gen reportero	33
4.1.1.2	Análisis de imágenes	34
4.1.1.3	Ejemplo de análisis de imágenes.....	36
4.1.2	Integración del gen reportero en diversas regiones subtelo- méricas	40
4.1.2.1	Localización del gen reportero en el genoma de <i>S. cerevisiae</i>	40
4.1.2.2	Estrategia de integración del gen reportero <i>GFP</i>	42
4.1.2.3	Análisis por microscopia confocal	48
4.2	Segunda parte	53
5.	DISCUSIÓN	59
5.1	Aspectos relevantes de este trabajo.....	59
5.2	Efectos diferenciales en los loci subtelo- méricos	61
5.3	Particularidades de silenciamiento en el locus <i>COS8</i>	63
5.4	Limitaciones del estudio	64
6.	CONCLUSIONES	65
7.	PERSPECTIVAS.....	66
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	68
9.	ANEXO.....	72
9.1	Oligonucleótidos utilizados para integraciones subtelo- méricas	72
9.2	Oligonucleótidos utilizados para comprobación de integración.....	74
9.3	Gráficas del efecto de mutantes knock-out	75
9.4	Gráficas de comparación del efecto de las mutantes por deleción entre loci.	77
9.5	Fotos de microscopia – Integraciones subtelo- méricas.....	78
9.6	Fotos de microscopia – Mutantes knock-out	83
9.7	Información adicional sobre las mutaciones estudiadas	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Expresión variegada en poblaciones celulares de levadura por efecto del TPE y localización del gen <i>ADE2</i> en cromosomas de <i>S. cerevisiae</i> (imagen modificada de Bühler M. y Susan M., 2009).	10
Figura 2. Estructura del telómero en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Rap1 (Repressor Activator Protein 1) se une a las secuencias teloméricas de doble cadena y recluta a las proteínas Sir que se propagan hacia la región subtelomérica. Además Rap1 se une a Rif1 y Rif2, proteínas que controlan la longitud del telómero (Imagen modificada de Auriche C. <i>et al</i> , 2008).	12
Figura 3. Estructura de los principales elementos subteloméricos repetidos en el genoma de <i>S. cerevisiae</i> . Cada uno de los telómeros en levadura tiene una composición específica de estos elementos.	13
Figura 4. Gen reportero dual utilizado para este proyecto, fusión traduccional de los genes <i>URA3</i> y <i>GFP</i>	20
Figura 5. Cepa de <i>S. cerevisiae</i> de la colección de mutantes para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	24
Figura 6. Cepa <i>query</i> de <i>S. cerevisiae</i> para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	25
Figura 7. Cruza de cepas para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	26
Figura 8. Cepas resultantes del apareamiento durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	26
Figura 9. Resultado del proceso de esporulación durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	26
Figura 10. Selección de cepas haploides MATa durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	27
Figura 11. Selección de cepas haploides MATa con la integración del gen reportero y mutante para el gen blanco durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	27
Figura 12. Selección de cepas finales como resultado del arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.	28
Figura 13. Funcionalidad del gen reportero GFP en tres diferentes posiciones genómicas. a) cepa parental Y8205 <i>hoΔ::mCherry</i> , b) integración del gen reportero en posición no subtelomérica, locus <i>CUP9</i> (<i>hoΔ::mCherry cup9Δ:gfp</i>), c) integración del gen reportero en posición subtelomérica, locus <i>COS8</i> (<i>hoΔ::mCherry cos8Δ:gfp</i>).	34
Figura 14. Esquema del pipeline para análisis de imágenes en el programa CellProfiler que consiste en cuatro módulos para la cuantificación de GFP en células individuales.	35
Figura 15. Primer paso en el análisis de imágenes. Conversión a escala de grises.	37
Figura 16. Identificación de células en el canal mCherry.	37
Figura 17. Creación de una capa de bordes que representan todas las células presentes en la imagen.	38
Figura 18. Identificación de objetos en la nueva imagen creada al encimar la capa de bordes en la imagen proveniente del canal GFP.	38
Figura 19. Objetos identificados en ambos canales que serán utilizados para la medición de píxeles.	38
Figura 20. Comprobación de la identificación de objetos en ambos canales. Igual numeración de objetos en ambos canales de fluorescencia.	39
Figura 21. Localización del gen reportero GFP en los 16 cromosomas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . El sentido de la flecha representa la dirección del gen, los círculos	

	negros el centrómero y los recuadros en escala de grises un tipo de repetido subtelomérico distinto. Las distancias a las que se encuentra la flecha son aproximadas y sólo reflejan su distancia relativa al telómero.....	41
Figura 22.	Amplificación del gen reportero <i>URA3-GFP</i> por PCR. Se observan las amplificaciones de todas las integraciones subteloméricas planeadas, que incluye aquellas que al final no fue posible obtener transformación positiva.....	42
Figura 23.	Representación de la recombinación homóloga para insertar el gen reportero en la posición genómica deseada. En este esquema observamos la inserción en el brazo izquierdo del cromosoma trece (XIII-L).....	42
Figura 24.	Confirmación de la integración subtelomérica por PCR río arriba y río abajo del reportero <i>GFP</i> . En este ejemplo observamos la comprobación de la integración del gen reportero en el locus <i>COS5</i> y el producto de PCR en un gel de agarosa con el peso molecular esperado.....	43
Figura 25.	El método 5-FOA se basa en la formación del compuesto 5-fluorodeoxiuridina que es tóxico para las células, este compuesto es formado con el sustrato ácido 5-fluoro orótico y acción de la enzima <i>Ura3</i>	44
Figura 26.	Análisis 5-FOA. Se observa el crecimiento en diluciones seriadas de colonias en tres condiciones: control de crecimiento en YPAD, expresión de <i>Ura3</i> en el medio SC-URA y silenciamiento en 5-FOA. LNS – Locus No Subtelomérico (<i>cup9Δ:gfp</i>), loci subteloméricos: <i>COS12</i> , <i>COS8</i> y <i>YFR057W</i>	44
Figura 27.	Análisis del nivel de represión transcripcional en diferentes integraciones subteloméricas por ensayos de crecimiento. Se observa el crecimiento de colonias en tres condiciones: control de crecimiento en medio YPAD, expresión de <i>Ura3</i> en el medio SC-URA y silenciamiento en 5-FOA. LNS – Locus No Subtelomérico (<i>cup9Δ:gfp</i>), loci subteloméricos: <i>COS7</i> , <i>COS1</i> , <i>COS10</i> , <i>gr6</i> , <i>COS2</i> , <i>COS5</i> , <i>gr7</i> , <i>gr5</i> , <i>COS4</i> , <i>gr4</i> y <i>pse2</i>	47
Figura 28.	Imágenes muestra obtenidas por microscopia confocal de cada cepa con una integración subtelomérica distinta. En el anexo de este trabajo se encuentran fotos muestra de las tomas de cada cepa en el canal rojo y verde.....	48
Figura 29.	Expresión de la mediana de expresión de los genes reporteros mCherry y GFP en una misma célula. Están representados los valores para 1000 células en la cepa con integración no subtelomérica (<i>cup9Δ:gfp</i>).....	49
Figura 30.	Boxplot del logaritmo de expresión de GFP en unidades arbitrarias (u.a.) de todas las cepas con integración del gen reportero. En cada locus se muestra el percentil 5 y 95.	51
Figura 31.	Variación de la mediana de expresión de GFP en las posiciones genómicas con integración del gen reportero. Control negativo - cepa parental Y8205 sin integración del gen <i>GFP</i> , LNS - locus no subtelomérico.	52
Figura 32.	Efecto de la mutante en el gen <i>SIR3</i> sobre el silenciamiento de las regiones subteloméricas <i>COS8</i> , <i>COS12</i> y <i>YFR057W</i> (prueba estadística Wilcoxon, para las cepas con integración en <i>COS 8</i> $P=0.02$, para las cepas con integración en <i>COS12</i> y <i>YFR057W</i> $P<0.0001$)	54
Figura 33.	Síntesis de NAD^+ por la vía de salvamento y síntesis <i>de novo</i> . La síntesis <i>de novo</i> comienza con triptofano (Trp), se procesa y <i>BNA1</i> lo convierte a semialdehído 2-amino-3-carboximucónico (2Ac), que por más reacciones químicas llega origina ácido nicotínico mononucleótido (NaMN). En la vía de salvamento, el Nam producido por <i>Sir2</i> se convierte en NaMN por <i>PNC1</i> y <i>NPT1</i> . Además <i>NPT1</i> puede utilizar ácido nicotínico (Na) que se importa a la célula, a través de la permeasa de ácido nicotínico (<i>Tna1</i> ; Imagen modificada de Sandmeier J. <i>et al</i> , 2001).....	55
Figura 34.	Factores seleccionados para evaluar su efecto en el nivel de silenciamiento subtelomérico y su agrupación de acuerdo a la categoría de participación.	55

Figura 35. Efecto de las mutantes por delección para los genes seleccionados sobre 3 fondos genéticos distintos. Observamos la mediana de la expresión de GFP en escala logarítmica <i>versus</i> el logaritmo del coeficiente de variación robusto. a) Integración en locus <i>COS12</i> considerado como silenciado, b) integración en locus <i>YFR057W</i> considerado como no silenciado y c) integración en locus <i>COS8</i> considerado como parcialmente silenciado.	58
Figura 36. Nivel de fluorescencia versus coeficiente de correlación del gen reportero GFP en las posiciones teloméricas evaluadas en este estudio..	75
Figura 37. Efecto de las mutantes por delección. Observamos la mediana de la expresión de GFP en escala logarítmica versus el logaritmo del coeficiente de variación robusto. a) Integración en locus <i>COS12</i> , b) integración en locus <i>YFR057W</i> , c) integración en locus <i>COS8</i>	76
Figura 38. Comparación sobre el efecto de las mutantes por delección. Observamos el valor de la mediana de expresión de GFP entre dos loci en cada gráfica.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fórmula de aminoácidos que componen un Dropout-URA.....	30
Tabla 2. Fórmula para preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).....	32
Tabla 3. Datos obtenidos en el modulo de medición de nuestro pipeline en el programa CellProfiler	40
Tabla 4. Comprobación de la identificación de objetos (células) en los canales mCherry y GFP para cepas con expresión de GFP (LNS) y sin expresión de GFP (control -)51	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El silenciamiento transcripcional en *S. cerevisiae*

La localización física de un gen en un cromosoma tiene un efecto sobre su expresión. Las primeras observaciones sobre este fenómeno fueron en 1984 en *Drosophila melanogaster* con el gen *White* (Gehring *et al*, 1984), cuando este gen se localiza en la región eucromática, su expresión da origen al fenotipo de ojos rojos, pero cuando se localiza en la región heterocromática por efecto de rearrreglos cromosómicos inducidos por rayos X, el fenotipo es ojos blancos con regiones de células rojas. En este organismo, el silenciamiento se denominó Variegación por Efecto de Posición (PEV por sus siglas en inglés).

Años más tarde, por serendipia Gottschling *et al* en 1990 al intentar generar telómeros marcados en *Saccharomyces cerevisiae*, insertaron el gen *URA3* en el cromosoma VII brazo izquierdo en el sitio del gen *ADH4*, observaron la naturaleza metaestable de la integración al observar que 20-60% de las células crecieron en la presencia de ácido 5-fluoroótico (5-FOA) que es una sustancia tóxica para células que expresan Ura3. Con estas observaciones se acuñó el término de Efecto de Posición Telomérica (TPE por sus siglas en inglés). Posteriormente, se observó un fenómeno similar en colonias de *S. cerevisiae* con el gen *ADE2*, gen codificante de una enzima que participa en la vía de producción de alanina. La posición de este gen en eucromatina origina colonias color blanco, pero al relocalizar este gen a la zona subtelmérica, las colonias presentan color segmentado, blanco y rojo (Figura 1).



Figura 1. Expresión variegada en poblaciones celulares de levadura por efecto del TPE y localización del gen *ADE2* en cromosomas de *S. cerevisiae* (imagen modificada de Bühler M. y Susan M., 2009).

1.1.1 El efecto de posición telomérica (TPE)

El TPE se define como el silenciamiento transcripcional que se origina en la posición subtelomérica. Actualmente sabemos que este proceso está presente en diversos organismos eucariotes, predominantemente en patógenos porque en estos, la expresión variegada de los genes de localización subtelomérica proporciona variedad antigénica a nivel poblacional debido a que dichos genes codifican para proteínas de membrana externa (Li B., 2012).

Algunos ejemplos de importancia biológica son los genes de adhesión *EPA* en *Candida glabrata*, los genes codificantes de glicoproteínas *VSG* en *Trypanosoma brucei* y los más de 100 genes *MSG* que codifican proteínas de superficie en *Pneumocystis carinii* (Tham W. *et al*, 2002; Merrick C. y Manoj T., 2006). En el caso de nuestro organismo modelo, *Saccharomyces cerevisiae*, los genes subteloméricos codifican para enzimas de aprovechamiento de fuentes alternas de carbono, resistencia a rapamicina, respuesta a estrés y para floculación por los genes *FLO*. Se dice que en general, en esta levadura los genes subteloméricos le proporcionan ventajas adaptativas y nutricionales.

La primera explicación molecular del silenciamiento subtelomérico en *S. cerevisiae* fue sobre el complejo de genes *SIR*. La heterocromatina telomérica se origina porque la proteína Rap1 reconoce la secuencia de repetidos TG_{1-3} , reclutando a las proteínas Sir2, Sir3 y Sir4 (Figura 2). La enzima Sir2 tiene la actividad de desacetilasa de histonas, por lo tanto la eliminación del grupo acetilo de la lisina 16 de la histona H3 origina compactación de la heterocromatina. Cuando este mecanismo de silenciamiento vía el complejo SIR se propaga al interior del cromosoma, son susceptibles a silenciamiento los genes más cercanos al telómero, en la región denominada subtelomérica (Grunstein M., 1997).

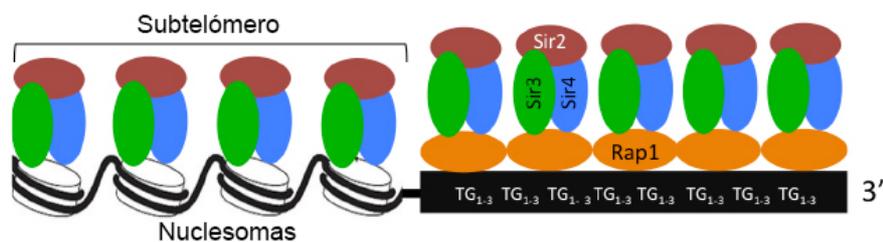


Figura 2. Estructura del telómero en *Saccharomyces cerevisiae*. Rap1 (Repressor Activator Protein 1) se une a las secuencias teloméricas de doble cadena y recluta a las proteínas Sir que se propagan hacia la región subtelomérica. Además Rap1 se une a Rif1 y Rif2, proteínas que controlan la longitud del telómero (Imagen modificada de Auriche C. *et al*, 2008).

1. 2 Estudio del TPE en *S. cerevisiae*

Los primeros estudios del TPE en levadura mostraban diferentes resultados sobre el silenciamiento porque los resultados no eran reproducibles en cromosomas distintos. Cuando se inició el estudio del TPE, también se observó este fenómeno en el telómero derecho del cromosoma V (V_{-R}; R significa brazo derecho y L brazo izquierdo) y el telómero izquierdo del cromosoma XV (XV_{-L}; Tham W. *et al*, 2002).

Si observamos el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, los 16 cromosomas son muy variables (Figura 3). Los telómeros de levadura tienen la característica de estar compuestos de repetidos heterogéneos abreviados como TG₁₋₃ de 250-400pb de largo y terminan con un fragmento corto de cadena sencilla (12 a 14 nucleótidos). Además un telómero típico de levadura tiene una longitud de 300pb, pero este número puede incrementar o disminuir espontáneamente debido a efectos opuestos de replicación y actividad de la telomerasa (Venditti S. *et al*, 2000).

En el genoma de levadura hay diferentes tipos de elementos subteloméricos repetidos: elemento X, elemento Y', secuencias repetidas subteloméricas (SRRs) y los repetidos TG₁₋₃ (Tham W. *et al*, 2002). Todos estos elementos, en número y longitud de pares de bases originan telómeros distintos en los 16

cromosomas del genoma. De forma importante, los elementos Y' y X permiten clasificar a los telómeros en tipo X y tipo X-Y', ya que todos los telómeros tienen elemento X, pero sólo algunos tienen elemento Y' (Chan y Tye, 1983). El elemento Y' contiene el repetido de anti-silenciamiento subtelo mérico (STAR) y funciona como una barrera para la propagación del mecanismo vía el complejo SIR (Fourel *et al*, 1999).

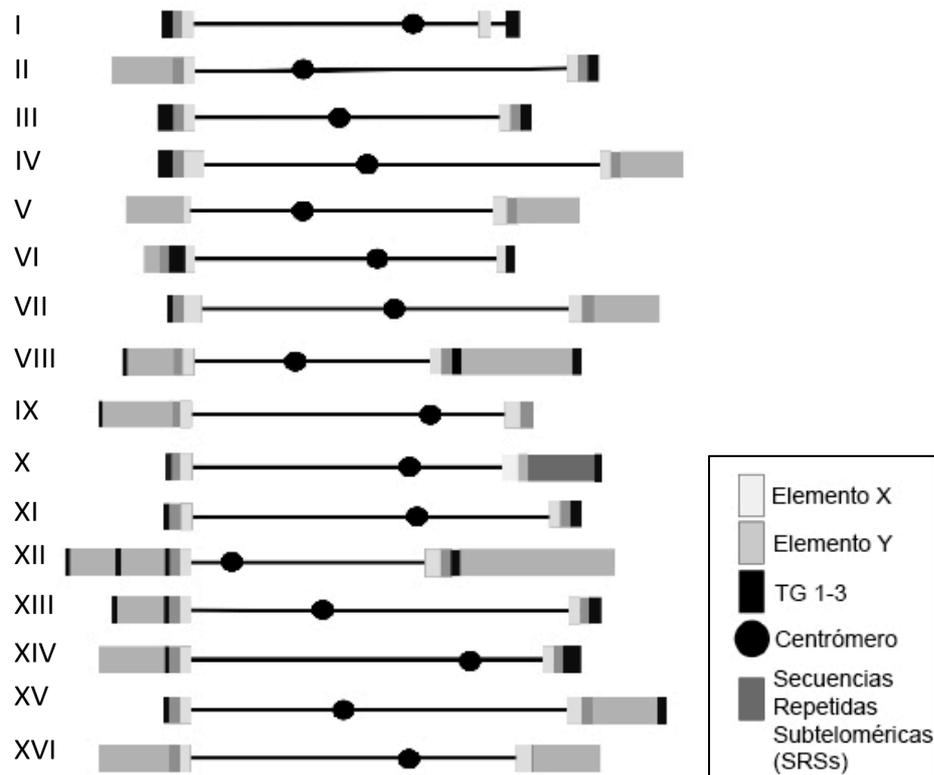


Figura 3. Estructura de los principales elementos subtelo méricos repetidos en el genoma de *S. cerevisiae*. Cada uno de los telómeros en levadura tiene una composición específica de estos elementos.

Aunque los telómeros de levadura tienen solo dos tipos de repetidos subtelo méricos X y Y', estos son bastante diversos, lo que ocasiona que cada telómero sea distinto. Por lo tanto, se postula que los 32 telómeros tienen una identidad única (Zakian y Blanton, 1988).

Otra de las características del silenciamiento transcripcional en levadura que indican que este fenómeno es diferente según el telómero en que se describa son los estudios en telómeros truncos. En estos, se describió que en una

misma cepa de fondo, el silenciamiento en el telómero V brazo derecho resultó ser diez veces más bajo (~4%) que en el telómero VII brazo izquierdo (~33%; Gottschling *et al*, 1990).

No se ha encontrado una relación directa ente la longitud del telómero y el TPE. De forma muy general, se observó que genes localizados a -4.9kpb del telómero están sujetos a efecto de posición, mientras que no se detectó silenciamiento en un locus a -20kpb (Gottschling *et al*, 1990). En teoría, los telómeros largos deberían tener un TPE mayor comparado con telómeros cortos porque Rap1 es la proteína encargada de unirse al DNA que inicia el mecanismo de silenciamiento por reclutar a las proteínas Sir (Kyriou *et al*, 1993).

1.3 El papel de las marcas epigenéticas en la represión subtelomérica

La principal característica de la cromatina telomérica y la región subtelomérica constituida por elementos subteloméricos y nucleosomas, es la carencia de acetilación y metilación de histonas, debidas a la actividad de desacetilasa dependiente de NAD⁺ de Sir2 y posiblemente por la actividad de desmetilasa de Jhd2. Este último dato es sugerido por el ligero aumento de silenciamiento subtelomérico en cepas *jhd2Δ* (Auriche C. *et al*, 2008).

Otros estudios explican las diferencias en silenciamiento subtelomérico por el tipo de marcas de histonas en los genes subteloméricos. La combinación de modificaciones químicas en las histonas determina el nivel de compactación de la cromatina y el por qué algunas regiones son más susceptibles a la desacetilación de histonas por Sir2. En un estudio sobre *SIR3*, en el brazo izquierdo del cromosoma VII se demostró que no es suficiente la unión de Sir3 en nucleosomas del telómero para explicar la regulación transcripcional en esa región genómica (Kitada T. *et al*, 2012).

En *Saccharomyces cerevisiae* se sabe que la metilación de histonas sólo afecta a la histona 3 en las lisinas: 4, 36 y 79, que son metiladas por metiltransferasas específicas (Set1, Set2 y Dot1, respectivamente).

La desmetilación en *S. cerevisiae* ocurre en la Lys4 por Jhd2, Lys36 por Jhd1 y Rph1, excepto en la Lys79 que está localizada en el core de la histona (Ottaviani A. *et al*, 2008).

Se sabe que la proteína Sir3p tiene preferencia por las regiones cromosómicas no metiladas en la lisina 79 en la histona 3 (H3K79) y no acetiladas en la lisina 16 de la histona 4 (H4K16). Incluso, algunas marcas se han caracterizado como de anti-silenciamiento, tal es el caso de la acetilación en la H4K16 y la metilación de H3K4 y H3K79, ambas modificaciones químicas impiden la propagación del silenciamiento. El cambio de histonas por la variante H2A.Z también evita la propagación del complejo de silenciamiento (Kitada T. *et al*, 2012).

En un análisis de asociación al genoma completo se observó que la falta de metilación de H3K79 afecta la unión del complejo SIR en algunos sitios teloméricos, entre ellos *COS12* y no afecta a otros sitios como el sitio del gen *YFR057w*. Además en el mismo estudio determinaron que la pérdida de la metiltransferasa Dot1 (cataliza la mono- di- y tri-metilación de H3K79) no afecta la unión de Sir2 o Sir3 en la región subtelomérica, por lo tanto se sugiere que además de la metilación en H3K79, existen más factores para regular la presencia de Sir2 y Sir3 en la región subtelomérica (Takahashi Y. *et al*, 2011).

1.4 El TPE como un mecanismo adaptativo

En el caso de la heterogeneidad de telómeros, existe la idea de que esta variabilidad no se debe a un efecto secundario de las rutas moleculares asociadas al mantenimiento del telómero, sino que los mecanismos fueron seleccionados porque proporcionan heterogeneidad (Tomaska L. y Nosek J., 2009). La idea es que la heterogeneidad representa poblaciones flexibles, por

ejemplo cuando se expresa más RNA telomerasa (TER) en *S. cerevisiae*, los telómeros son más estables, cortos y menos heterogéneos, por lo tanto disminuyen los beneficios poblacionales.

Además de la complejidad de la información que hay en las secuencias de DNA, la organización epigenética influye en las funciones del genoma, la arquitectura de la cromatina controla el ambiente nuclear para asegurar la expresión genética apropiada (Ottaviani A. *et al*, 2008). Esta idea indica que la regulación transcripcional requiere un análisis desde diferentes perspectivas más allá de los factores transcripcionales que promueven o evitan la expresión genética.

Se sabe que el silenciamiento subtelomérico es un fenómeno general en levadura para los genes que son transcritos por la RNA polimerasa II, entre ellos *HIS3*, *TRP1* y *ADE2*. Además, en estudios de asociación al genoma completo en *S. cerevisiae*, se determinó que aproximadamente 267 genes localizados a menos de 20kb del telómero muestran un nivel de expresión promedio que es apenas el 20% de la expresión promedio de genes no teloméricos (Tham W. *et al*, 2002; Ottaviani A. *et al*, 2008).

Por otra parte, el hecho de que las mutantes nulas *SIR3* o *SIR4* causen acortamiento de los repetidos en los telómeros o inestabilidad de los cromosomas (Huang Y., 2002), sugiere que las proteínas que participan en el silenciamiento contribuyen al mantenimiento e integridad de los cromosomas y que posiblemente el silenciamiento subtelomérico es un efecto secundario.

1.5 Los modelos moleculares que explican el TPE

Estudios recientes establecen dos modelos para explicar el silenciamiento transcripcional:

- Modelo clásico de represión vía el complejo *SIR* que actúa por propagación de las proteínas efectoras del silenciamiento Sir2, Sir3 y Sir4 del telómero hacia

la región subtelomérica. Este modelo toma en cuenta que la región subtelomérica es una zona de represión transcripcional con subdominios que son permisivos a la transcripción (Fourel *et al*, 1999; Prydee y Louis, 1999).

- Modelo de expresión genética basada en cambios químicos inherentes a las histonas de la región subtelomérica donde se establece que las marcas de acetilación o metilación tienen mayor importancia para regular la expresión de genes de localización subtelomérica (Mukhopadhyay S. y Sengupta A., 2013).

En el caso del primer modelo, estudios de asociación al genoma completo sugieren que el TPE regula la expresión genética vía el complejo *SIR* en los telómeros: I-R, III-L, IV-R, V-L, VI-L, VI-R, VII-L, VIII-L, IX-R, X-R, XIII-R, XIV-L, XIV-R, XV-L, y XVI-R (Wyrick *et al*, 1999), aunque no se han caracterizado todos los telómeros.

1.6 Variación estocástica y ruido en la expresión genética

La variación estocástica en la expresión genética contribuye en las diferencias fenotípicas y por lo tanto esto explica la variabilidad celular dentro de una población. El ruido en términos de expresión genética se refiere al nivel de variación en la expresión genética medible entre células dentro de una población supuestamente idéntica, como por ejemplo en una misma cepa o línea celular. El ruido puede llegar a ser suficiente para cambiar de un estado celular a otro, ya sea en los casos de diferenciación celular o por la supervivencia en ambientes fluctuantes. (Raser J. y O'Shea E., 2005).

En cuanto al ruido genético, las fuentes que lo causan son las propiedades físicas de las célula, la variación en la concentración de una proteína de una célula a otra y la probabilidad de que sucedan las reacciones químicas que fundamentan la expresión de genes (Kilfoil M. *et al*, 2009). Estos factores contribuyen al estudio del TPE porque las regiones subteloméricas contienen genes de expresión baja y mayor ruido genético comparado con genes de localización eucromática.

Experimentos realizados en 1989 por Pillus y Rine sobre la naturaleza epigenética de células *sir1* Δ demostraron que el silenciamiento es una propiedad de células y no una regla fija para un locus, por lo tanto es importante realizar estudios a nivel de células individuales para observar el silenciamiento subtelomérico.

El establecimiento del silenciamiento es estocástico y metaestable porque la represión progresa a través del ciclo celular e incluso perdura varias generaciones, además de presentar estados intermedios de expresión. Estos estados intermedios no son el resultado de diferentes estado epigenéticos, solo significan que pueden existir estados de heterocromatina parcialmente activos (Xu E. *et al*, 2006). Esta información es relevante porque la interpretación del silenciamiento puede depender del ciclo celular y no todas las células en una población actúan de forma sincronizada.

El ruido en la expresión genética es detectable cuando se analizan células individuales y dependerá de algunos factores, entre ellos el ambiente porque se ha observado que el crecimiento de levaduras en medio líquido representa un ambiente uniforme y que al compararlo con crecimiento en medio sólido, la variación es mayor en este último porque la población se deriva de una o pocas células (Anderson M. *et al*, 2014).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Estudiar cómo el silenciamiento subtelomérico es regulado genéticamente en diferentes regiones teloméricas en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Objetivos particulares

- i. Establecer el nivel de silenciamiento en diversas regiones subteloméricas en levadura.

- ii. Describir la forma en que el silenciamiento subtelomérico es afectado por la falta de elementos importantes para su regulación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Cepas

Para desarrollar este trabajo utilizamos la cepa parental Y8205 cuyo genotipo es el siguiente:

MAT α *his3* Δ 1 *leu2* Δ 0 *met15* Δ 0 *ura3* Δ 0 *can1* Δ ::*STE2pr-Sp_his5 lyp1* Δ ::*STE3pr-LEU2*

Además la cepa parental tiene una integración del gen *mCherry* en el locus *ho* (*ho* Δ ::*mCherry*) que origina expresión constitutiva con propósito de facilitar el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía.

Colección de mutantes knock-out BY4741 MATa provenientes del proyecto de delección del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.2 Construcciones Genéticas

Se utilizó un gen reportero *URA3-GFP* construido en nuestro laboratorio, el cual consiste de los genes *URA3* y *GFP* fusionados traduccionalmente, bajo el control del promotor *URA3* y con el terminador *ADH1*.



Figura 4. Gen reportero dual utilizado para este proyecto, fusión traduccional de los genes *URA3* y *GFP*.

3.2 Métodos y procedimientos experimentales

3.2.1 Ensayo de goteo en placa

- Poner pre inóculos en 5mL de YPD en tubos de ensayo de 11x15 cm.
- Incubar a 30°C durante una noche.

- Medir D.O. con 100 uL de cultivo y 900 mL de YPD en la celda para espectrofotómetro.
- Llevar todos los cultivos a D.O. = 1, ajustando con agua estéril.

Dado que la absorbancia es directamente proporcional (y lineal en el intervalo de medición) a la concentración.

$$A_1V_1=A_2V_2$$

$$V_1=(A_2V_2)/A_1$$

A_1 = D.O. medida x 100 factor de dilución

$$A_2= 1$$

$$V_2= 800 \text{ uL}$$

$$V_1= 8/D.O. \text{ medida } \text{ y } V_{H_2O}= 800-V_1$$

Realizar diluciones seriadas en una placa de 96 pozos, las filas corresponden a cada cepa y las columnas a la dilución en base 10.

3.2.2 Transformación de levadura

Soluciones utilizadas

PEG 50% (W/V): Almacenar en oscuridad, disolver por agitación y esterilizar por filtración.

Acetato de litio 1M

ssDNA 2mg/mL: Preparado en Tris 10mM o en TE.

Agua destilada: Alícuotas de 25mL para hacer lavado de células.

Procedimiento

- Inocular 5mL de YPD con la cepa de levadura a transformar en incubar toda la noche (overnight).
- Inocular 30mL de YPD con 3mL del cultivo overnight en un matraz. Esta cantidad es para 6 transformaciones.
- Incubar a 30°C con agitación por 4h.
- Transferir a tubos Falcon de 50 mL y centrifugar a 2500rpm por 5min. Desechar el medio.
- Lavar con 25 mL de agua destilada, resuspender en vortex de forma lenta. Centrifugar a 25000 rpm 5 min. Desechar agua.

- Resuspender en 1mL de acetato de litio 0.1M y transferir a tubo Eppendorf.
- centrifugar a 13000rpm 20s. Desechar el sobrenadante y resuspender en 300uL de acetato de litio 0.1M.
- Preparar el DNA para transformar. En un volumen final de 50uL de TE, por ejemplo 10uL de reacción de digestión + 40uL de TE.
- Adicionar 321uL del preparado de transformación a los tubos anteriores, este preparado contiene:

Para 6 reacciones:
 PEG 50% 1440uL
 ssDNA 2mg/mL 270uL
 Acetato de litio 1.0M 216uL

Mantener el preparado de transformación en hielo y sacarlo antes de usarlo. El tubo de ssDNA debe hervir en agua a ebullición 100°C por 5min y pasarlo rápidamente a hielo con agua. Dejarlo un par de minutos.

- Añadir 50uL de células a cada tubo con el DNA para transformar. Mezclar ligeramente en vórtex.
- Incubar a 30°C por 30min.
- Dar choque térmico a 42°C en termobloque durante 30min.
- Centrifugar a 6000rpm por 20s. Quitar el PEG residual con micropipeta.
- Resuspender en 500uL de agua.
- Inocular 200uL de las células por caja de medio. Esparcir las células con perlas de vidrio.

3.2.3 Extracción rápida de DNA genómico de levadura

- Picar una colonia de levadura y suspender las células en un tubo Eppendorf de 50 uL con 100 uL de solución de Acetato de litio 200mM – SDS 1%.
- Incubar a 70°C por 15 min.
- Transferir el contenido a un tubo de 0.6 mL y agregar 300 uL de etanol 96%, mezclar en vortex.
- Centrifugar para obtener el DNA por 3 min a 13000 rpm.

- Lavar el pellet con etanol 70% y repetir este paso una vez más.
- Disolver el DNA precipitado en 100 uL de solución amortiguadora TE.
- Centrifugar para eliminar restos celulares.
- Separar el sobrenadante (DNA en solución) y conservar en refrigeración 4°C.

3.2.4 Microscopia de fluorescencia, técnica confocal

a) Preparación de muestra

- Inocular 3mL de medio YPAD fresco con 300uL de cultivo overnight (relación 1:10) e incubar a 30°C con agitación de 200rpm, hasta crecimiento exponencial ($D.O._{600}=0.6-0.9$).
- Tomar 1.5mL del cultivo en fase exponencial y colectar en tubo Eppendorf.
- Centrifugar por 5 min a 1000 rpm.
- Desechar sobrenadante y resuspender con vortex en 1 mL de solución amortiguadora PBS 1X (*ver sección Soluciones*) (Lavado 1).
- Centrifugar por 3min a 1000rpm.
- Desechar sobrenadante y resuspender con vortex en 1 mL de solución amortiguadora PBS 1X (Lavado 2).
- Agregar 150uL de solución amortiguadora PBS 1X y resuspender con vortex.
- Agregar 150uL de solución fijadora de paraformaldehído 4% (*ver sección Soluciones*)
- Incubar a 30°C por 15min, con agitación 200rpm.
- Centrifugar por 3min a 1000rpm, desechar el sobrenadante y eliminar todos los residuos con pipeta.
- Resuspender en 300uL de solución de sorbitol (*ver sección Soluciones*).
- Almacenar muestra a 4°C.

b) Montaje de muestra.

- Derretir agarosa 1.5% (preparada con TAE1X).
- Colocar 3uL de muestra en el portaobjetos.

- Agregar 3uL de agarosa encima de la muestra e inmediatamente colocar cubreobjetos.
- Dejar secar la agarosa por 1min y sellar bordes con esmalte transparente.

c) Observación

Se utilizó el Microscopio Confocal invertido FV1000 Olympus del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los láseres utilizados para la excitación de proteínas fluorescente fueron Argón 488nm y HeNe 561nm.

Los detectores utilizados fueron:

- i) EGFP: Excitación 488nm y Emisión 507nm
- ii) Alexa Flúor 568: Excitación 579 Emisión 603nm

Se adquirieron imágenes en el canal rojo (Alexa Flúor 568) para detección de mCherry y en el canal verde (EGFP) para detección de GFP.

3.2.5 Arreglo Sintético Genético (SGA)

El procedimiento para realizar este protocolo está dividido en semanas debido a tiempos de incubación.

Semana 1

- Inocular 150uL de medio líquido YPAD+G418+Ap con las cepas blanco (colección de mutantes), crecer overnight 30°C.

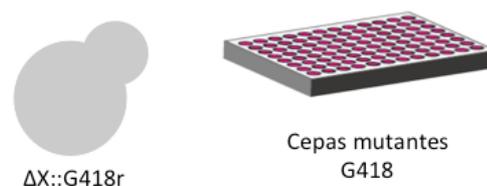


Figura 5. Cepa de *S. cerevisiae* de la colección de mutantes para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

- Inocular 10mL de medio líquido YPAD+clonNAT+Ap con las cepas query (cepa con integración del gen reportero), crecer overnight 30°C.

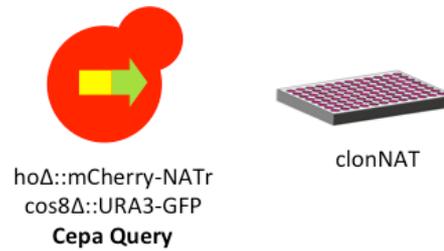


Figura 6. Cepa *query* de *S. cerevisiae* para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

- Con el medio de cultivo de la cepa query, esparcirlo en medio sólido YPAD+clonNAT+Ap en cajas OmniTray, de forma que quede uniformemente distribuido(césped de levaduras). Si quedan zonas sin cepa, allí no habrá apareamiento, crecer overnight 30°C.
- Tomar inculo de las cepas blanco con pinner de 96 piezas y depositar células sobre medio sólido YPAD+G418+Ap, crecer overnight 30°C.

Esterilización del pinner

Se necesita 1 caja con solución de hipoclorito de sodio 10%, 2 cajas con agua (la segunda con más agua que la primera y la primera con igual agua que la caja de hipoclorito de sodio) y una caja con etanol (con más nivel que la segunda caja de agua).

- Sumergir el pinner en caja con hipoclorito de sodio 10%, dejar reposar 2 minutos y pasar a la primera caja con agua.
- Pasar a la segunda caja con agua.
- Pasar a la caja con etanol.
- Pasar el pinner por la flama, cuidando que no chorree etanol.
- Dejar enfriar al menos 1 minuto.

Apareamiento

En una caja OmniTray con medio YPAD+Ap inocular con la ambas cepas, usando pinner tomar cepa blanco, esterilizar pinner y enseguida inocular con pinner la cepa query.

Dejar incubar a temperatura ambiente por 1 día.



Figura 7. Cruza de cepas para el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Selección de diploides

Con el pinner tomar células de la caja de apareamiento e inocular medio sólido YPAD+G418+clonNAT+Ap. Incubar a 30°C por 2 días.

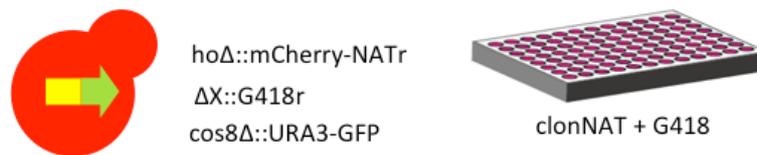


Figura 8. Cepas resultantes del apareamiento durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Semana 2

Esporulación

Preparar cajas OmniTray con medio sólido de esporulación (ver sección Medios de cultivo). Incubar 8 días a 22°C.

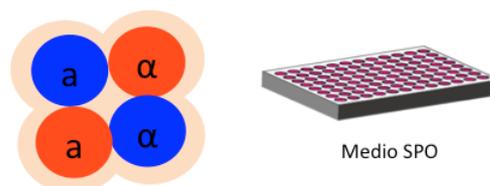


Figura 9. Resultado del proceso de esporulación durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Semana 3

Germinación – selección haploides MATa

Pasar cepas de la caja de esporulación a medio de germinación, este paso es una selección de haploides MATa con la integración del gen reportero (clonNAT resistente), sean o no G418 resistentes y morirán las diploides remanentes. Incubar a 30°C por 2 días.

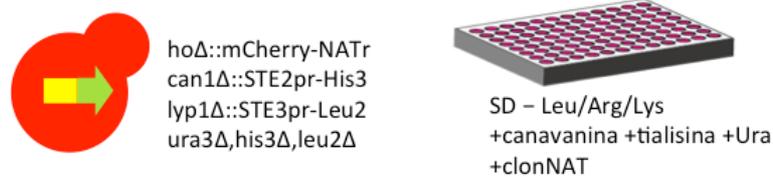


Figura 10. Selección de cepas haploides MATa durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Selección en medio de resistencia clonNAT/G418 (ver sección Medios de cultivo).

Pasar cepas de la selección anterior a caja con medio de resistencia clonNAT/G418, este paso es una selección de haploides MATa con la integración del gen reportero (clonNAT resistente) y la mutación knock-out (G418 resistentes). Incubar 2 días a 30°C.

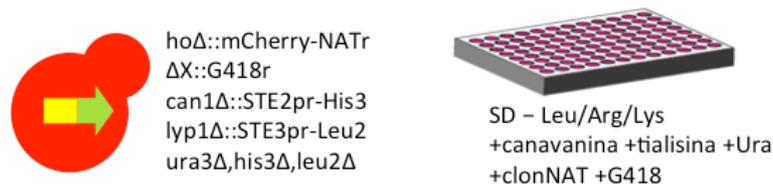


Figura 11. Selección de cepas haploides MATa con la integración del gen reportero y mutante para el gen blanco durante el arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Semana 4

Selección en medio de resistencia clonNAT/G418/URA3 (ver sección Medios de cultivo).

- Pasar cepas de la selección anterior a caja con medio de resistencia clonNAT/G418/URA3, este paso es una selección de haploides MATa con la integración del gen reportero (clonNAT resistente), la mutación knock-out (G418 resistentes) y la expresión del gen *URA3*.

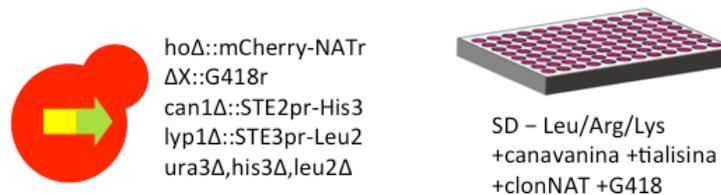


Figura 12. Selección de cepas finales como resultado del arreglo sintético genético (SGA) y su respectivo medio de crecimiento.

Inocular placa de 96 pozos (150uL de medio YPD + clonNAT+ G418 en cada pozo) con el pinner, tomando cada cepa de la selección anterior.

- Incubar con agitación a 30°C durante una noche.
- Agregar glicerol 60% y almacenar a 80°C.

3.3 Medios de cultivo

3.3.1 Medio YPD

- Peptona 20 g
- Extracto de levadura 10g
- Agua destilada aforar a 940 mL
- Glucosa 40% 50 mL

3.3.2 Medio sintético completo sin uracilo (SC-URA)

- Esterilizar en autoclave 20 g de glucosa disuelta en 50 mL.
- Esterilizar en autoclave 20 g de agar disuelto en 700 mL de agua destilada.
- Esterilizar por filtración una solución de 250 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB) 6.7 g y de Dropout-URA 1.926 g.

a) Dropout-URA

Tabla 1. Fórmula de aminoácidos que componen un Dropout-URA.

Reactivo	Cantidad (g)	Reactivo	Cantidad (g)
Adenina	0.5	Leucina	10.0
Alanina	2.0	Lisina	2.0
Arginina	2.0	Metionina	2.0
Asparagina	2.0	Ácido <i>para</i> -aminobenzóico	0.2
Ácido Aspártico	2.0	Fenilalanina	2.0
Cisteina	2.0	Prolina	2.0
Glutamina	2.0	Serina	2.0
Ácido Glutámico	2.0	Treonina	2.0
Glicina	2.0	Triptofano	2.0
Histidina	2.0	Tirosina	2.0
Inositol	2.0	Valina	2.0
Isoleucina	2.0		

3.3.3 Preparación de cajas de cultivo 5-FOA

Se preparan por separado las soluciones A y B. Indicaciones para 1L de medio.

Solución A – Esterilizar en autoclave esta solución por 20min:

- Agar 20g
- Casaminoácidos 6g
- Agua destilada 400mL

Solución B – Agitar hasta la mayor disolución posible los siguientes componentes:

- Sulfato de amonio 5g
- Uracilo 0.05g
- Agua destilada 600mL

Calentar 1min en microondas la solución B y añadir 5-FOA 0.85g, calentar 15s más y seguir disolviendo.

Añadir YNB 1.7g y 50mL de glucosa 40%. Esterilizar la solución B por filtración.

Cuando la solución A tenga una temperatura adecuada, adicionarle B lentamente. Mezclar y vaciar en cajas.

3.3.4 Medio de esporulación

Para 1 L de medio

Acetato de potasio 10g

Extracto de levadura 1g

Glucosa 0.5g

Suplemento para medio SPO 0.1g

Agar 20g

Disolver todo en 900 mL de agua destilada.

Agregar 250 uL de solución G418.

3.3.5 Medio de germinación para SGA

SD-LEU/ARG/LYS + canavalina/tialisina/clonNAT

Para preparar 1L:

YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7g

Ácido glutámico monosódico 1g

Mezcla drop-out – Leu/Arg/Lys/URA 1.6g

Agar 20g

Disolver en 800 mL de agua destilada.

Después de esterilizar en autoclave, mezclar el drop-put con agar y agregar 100mL de glucosa 20%.

Agregar 500 uL de solución canavanina, 500 uL de solución de tialisina, 1 mL de solución de clonNAT y solución de URA.

3.3.6 Medio de resistencia 1 para SGA

SD-LEU/ARG/LYS + canavalina/tialisina/clonNAT/G418.

Para preparar 1L:

YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7g

Ácido glutámico monosódico 1g

Mezcla drop-out – Leu/Arg/Lys/URA 1.6g

Agar 20g

Disolver en 700 mL de agua destilada.

Después de esterilizar en autoclave, mezclar el drop-put con agar y agregar 100mL de glucosa 20%.

Agregar 500 uL de solución canavanina, 500 uL de solución de tialisina, 1 mL de solución de clonNAT, 1mL de solución G418 y solución de URA.

3.3.7 Medio de resistencia 2 para SGA
SD-LEU/ARG/URA/LYS + canavalina/tialisina/clonNAT/G418.

Para preparar 1L:

YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio 1.7g

Ácido glutámico monosódico 1g

Mezcla drop-out – Leu/Arg/Lys/URA 1.6g

Agar 20g

Disolver en 700 mL de agua destilada.

Después de esterilizar en autoclave, mezclar el drop-put con agar y agregar 100mL de glucosa 20%.

Agregar 500 uL de solución canavanina, 500 uL de solución de tialisina, 1 mL de solución de clonNAT, 1mL de solución G418.

3.4 Soluciones

3.4.1 Solución amortiguadora PBS 1X

Tabla 2. Fórmula para preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

PBS (1X)		
Sal	Concentración (mmol/L)	Concentración (g/L)
NaCl	137	8.0
KCl	2.7	0.2
Na ₂ HPO ₄	10	1.44
KH ₂ PO ₄	1.8	0.24

3.4.2 Solución fijadora de paraformaldehído 4%

Preparación:

1. Disolver paraformaldehído al 4% (equivalente a 10% formalina) en agua destilada precalentada a 55-60°C.

2. Añadir unas gotas de NaOH 1M y agitar hasta disolver totalmente.

3. Enfriar hasta temperatura ambiente (RT). Añadir PBS hasta 1X y ajustar pH a 7.4.

4. Utilizar esta solución fresca, con no más de 1 semana a RT.

3.4.3 TAE 50X

Colocar los siguientes reactivos en un vaso de precipitados de 2L.

Tris Base 242 g (0.5 mM)

Ácido acético glacial 57.1 mL (40 mM)

Na₂EDTA(2H₂O) 37.2 g (2 mM)

H₂O destilada para 1L.

3.4.4 Antibióticos

Noursetricina (Nat): concentración final 100ug/mL, solución stock 100mg/mL

Geneticina (G418): concentración final 200ug/mL, solución stock 200mg/mL

Ampicilina (Ap): concentración final 50ug/mL, solución stock 50mg/mL

Higromicina (Hyg): concentración final 200ug/mL, solución stock 50mg/mL

4. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo están organizados en dos secciones, cada una relacionada al desarrollo de cada objetivo específico.

4.1 Primera parte: Establecer el nivel de silenciamiento en diversas regiones subteloméricas

4.1.1 Desarrollo de método de microscopía y análisis de imagen

Para resolver este objetivo la primer estrategia fue desarrollar el método de microscopía y se utilizó como gen reportero la construcción P_{URA3} -URA3-GFP- ter_{ADH1} .

4.1.1.1 Funcionalidad del gen reportero

El primer experimento fue probar su funcionalidad en tres cepas: cepa parental (control negativo), cepa con integración del reportero en un locus no subtelomérico (control positivo) y cepa con integración del reportero en un locus subtelomérico. Como control de fluorescencia, la cepa parental expresa la proteína mCherry de forma constitutiva, por lo tanto todas las cepas analizadas expresan esta proteína fluorescente.

Las siguientes imágenes muestran fotos de células de levadura en los canales verde y rojo para detección de GFP y mCherry, respectivamente (14).

Después de comprobar la funcionalidad de nuestro gen reportero de GFP, se adquirieron imágenes con microscopio de fluorescencia, técnica Confocal.

La microscopía confocal tiene algunas ventajas sobre la microscopía de epifluorescencia convencional importantes para este trabajo, con la incidencia del láser de forma localizada y en secciones, el efecto de fotoblanqueo se reduce y por lo tanto la fluorescencia no decae drásticamente con el tiempo, lo cual es de gran impacto para la cuantificación de proteínas fluorescentes y

comparación de muestras. Además el equipo que utilizamos, FV1000 Olympus permite la automatización en la toma de imagen, lo cual hace más precisa la adquisición y más homogénea entre diferentes campos dentro de una muestra.

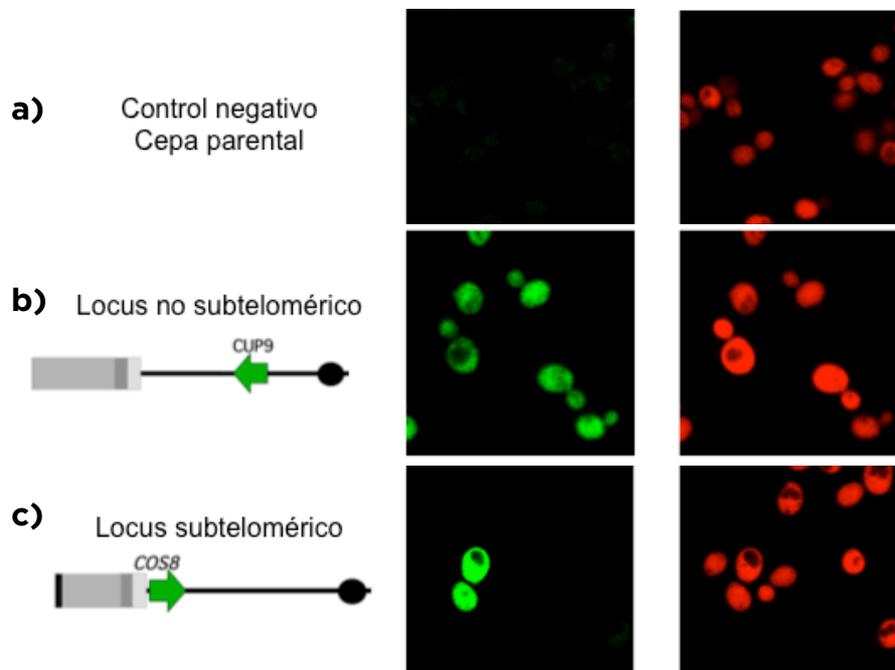


Figura 13. Funcionalidad del gen reportero GFP en tres diferentes posiciones genómicas. a) cepa parental Y8205 *hoΔ::mCherry*, b) integración del gen reportero en posición no subtelomérica, locus *CUP9* (*hoΔ::mCherry cup9Δ:gfp*), c) integración del gen reportero en posición subtelomérica, locus *COS8* (*hoΔ::mCherry cos8Δ:gfp*).

4.1.1.2 Análisis de imágenes

Utilizamos el programa CellProfiler 2.1.1, desarrollado por el Broad Institute para análisis de imágenes celulares y que permite medir fenotipos cuantitativamente en cientos de imágenes.

Para este proyecto escribimos un pipeline que permite el análisis de imágenes (ver Figura 14).

CellProfiler Pipeline

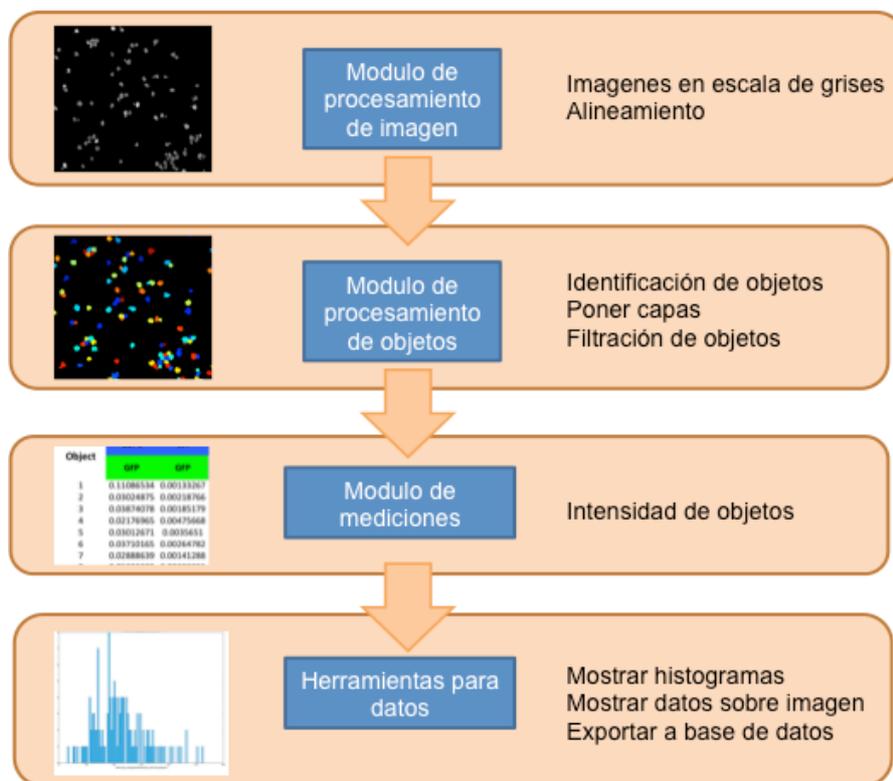


Figura 14. Esquema del pipeline para análisis de imágenes en el programa CellProfiler que consiste en cuatro módulos para la cuantificación de GFP en células individuales.

El pipeline consiste en cuatro módulos:

Módulo 1 – Procesamiento de imágenes

En este módulo el programa identifica las imágenes en formato .tiff de ambos canales rojo y verde, relaciona ambas imágenes para saber que es la misma muestra, convierte a escala de grises las imágenes y alinea ambos canales para tener concordancia entre objetos.

Módulo 2 – Procesamiento de objetos

A partir de la imagen en el canal rojo, se realiza la segmentación por el método de Otsu porque este método calcula un umbral al separar dos clases de píxeles (primer y segundo plano) y considera que los píxeles de fondo pueden variar entre cada imagen. Todos los objetos

identificados representan “células”, a partir de estos objetos se extrae una plantilla con los bordes de las células. Esta plantilla se encima sobre la imagen en canal verde como una capa, esto permite que las células que no son fluorescentes en el canal verde sean identificadas como un objeto presente en la imagen. A partir de la imagen en canal verde con la capa de bordes se identifican de nuevo los objetos. Finalmente se filtran los objetos que son identificados en ambas imágenes, es decir los objetos tanto de la imagen en canal rojo original y los objetos de la imagen en canal verde con la capa de bordes.

Módulo 3 – Mediciones

Se obtiene la media de las intensidades de todos los píxeles dentro de cada objeto en una imagen para el canal verde.

Módulo 4 – Herramientas para datos

Para asegurar que la identificación de objetos es la misma en ambos canales, se muestra el conteo de células sobre las imágenes de los dos canales. Es posible obtener histogramas de la intensidad de píxeles por célula y se exportan los datos de expresión a un archivo en formato .xls donde se muestran el número de objetos por imagen y su correspondiente media de las intensidades de píxeles en cada objeto.

Para mejorar la explicación y fundamentos del análisis de imágenes realizado con nuestro pipeline, a continuación se describe a detalle cada uno de los pasos realizados utilizando como ejemplo imágenes de una cepa con integración del gen reportero en una región subtelomérica denominada *COS8*.

4.1.1.3 Ejemplo de análisis de imágenes

1 – Se obtuvieron imágenes por microscopia confocal de la cepa con la integración del reportero de GFP en el locus *COS8*, para tener valores de expresión de GFP en un mínimo 1000 células.

A partir de las imágenes en formato .tiff en canal rojo (mCherry) y verde (GFP), el programa CellProfiler utiliza el primer módulo de nuestro pipeline para convertir las imágenes a escala de grises (Figura 15).

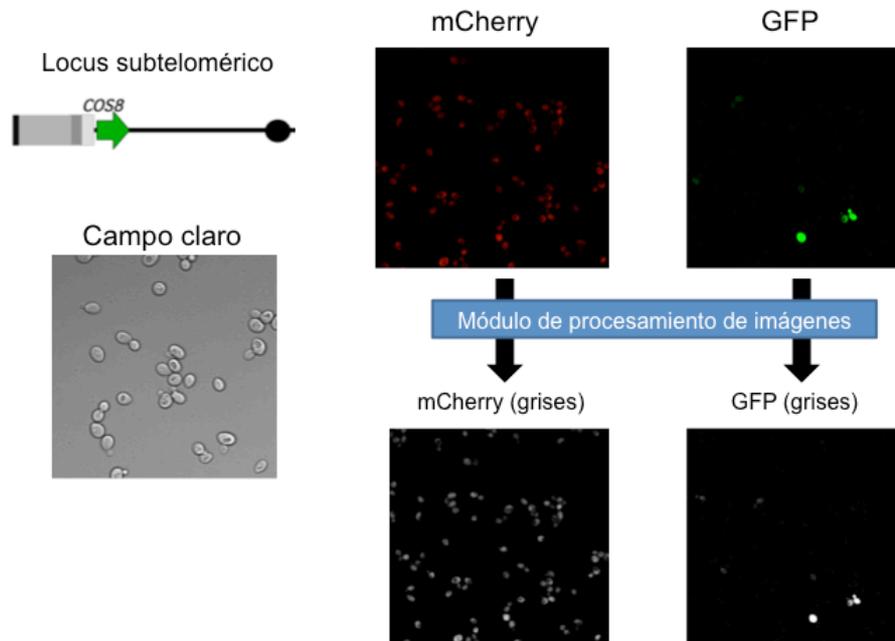


Figura 15. Primer paso en el análisis de imágenes. Conversión a escala de grises.

2- Se identifican las células de levadura, esto es en la imagen en canal rojo porque todas las células expresan mCherry constitutivamente (Figura 16).

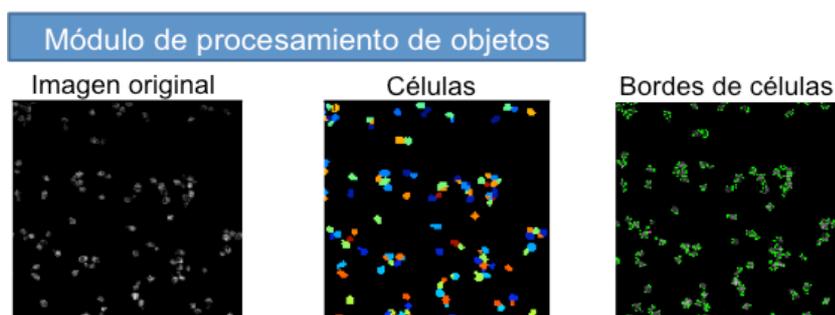


Figura 16. Identificación de células en el canal mCherry.

3 – Utilizando la imagen con los bordes de células, estos bordes se enciman en la imagen de GFP (Figura 17).

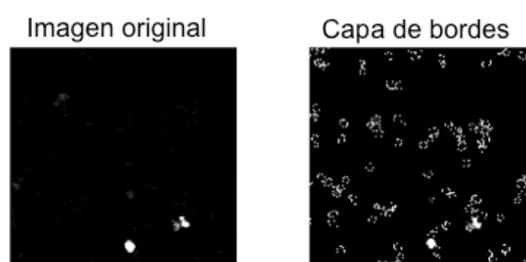


Figura 17. Creación de una capa de bordes que representan todas las células presentes en la imagen.

4 – Identificación de objetos en la imagen de GFP con los bordes (Figura 18).

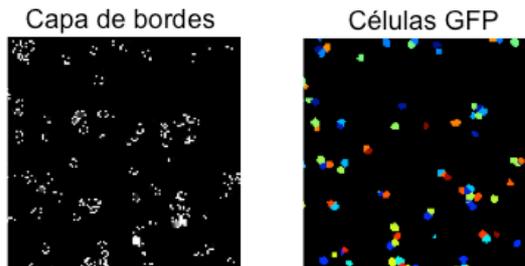


Figura 18. Identificación de objetos en la nueva imagen creada al encimar la capa de bordes en la imagen proveniente del canal GFP.

5 – Filtrar los objetos identificados en ambos canales, comparando los objetos identificados en la imagen de mCherry original denominada “Células”, con los objetos identificados en la imagen denominada “Células GFP” (Figura 19).

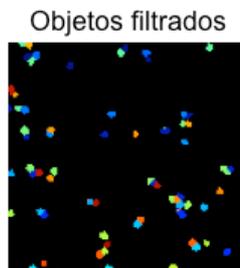


Figura 19. Objetos identificados en ambos canales que serán utilizados para la medición de píxeles.

6 – A partir de los objetos filtrados obtenemos información sobre la expresión de GFP en cada célula (Tabla 3).

De la tabla de mediciones, nos interesa analizar la mediana de la intensidad de expresión, que es medida en intensidad de los píxeles dentro de cada objeto

Tabla 3. Datos obtenidos en el modulo de medición de nuestro pipeline en el programa CellProfiler.

Módulo de medición			
Número de objeto	Intensidad integrada	Máxima intensidad	Mediana de la intensidad
1	0.2482	0.0084	0.0008
2	0.4775	0.0097	0.0015
3	1.4316	0.0188	0.0028
4	0.4451	0.0066	0.0005
5	0.5910	0.0073	0.0010
6	0.9181	0.0182	0.0014
7	1.9131	0.0219	0.0022
8	0.2593	0.0066	0.0005
9	0.1083	0.0087	0.0021
10	0.2213	0.0099	0.0007
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
1000	0.5507	0.0110	0.0010

7 – Para corroborar que los objetos identificados están presentes en el mismo orden en ambos canales, obtenemos la numeración de los objetos en ambas imágenes (Figura 20).

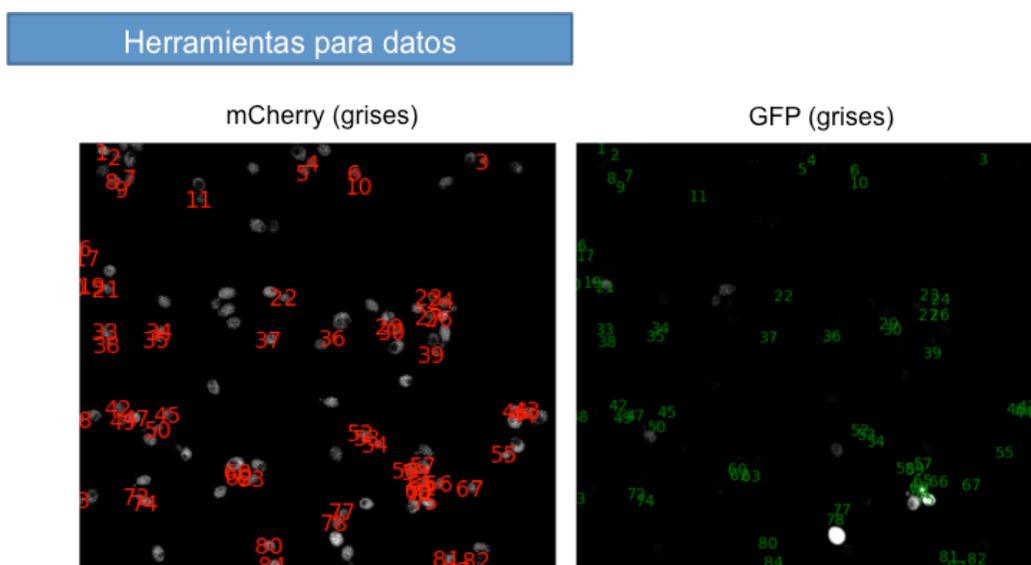


Figura 20. Comprobación de la identificación de objetos en ambos canales. Igual numeración de objetos en ambos canales de fluorescencia.

4.1.2 Integración del gen reportero en diversas regiones subteloméricas

Una vez establecido el método de microscopía y análisis de imagen, es posible determinar el nivel de silenciamiento en una cepa con integración del gen reportero en una posición genómica específica.

Realizamos la construcción de cepas con un gen reportero integrado en diferentes regiones subteloméricas para caracterizar su perfil de silenciamiento.

4.1.2.1 Localización del gen reportero en el genoma de *S. cerevisiae*

Para poder estudiar el silenciamiento subtelomérico en diversas zonas del genoma de levadura, seleccionamos la localización de una familia multigénica subtelomérica *DUP380* con 18 miembros (Despons L. *et al*, 2006) y de los seis genes de floculación *FLO* (Govender P. *et al*, 2010). Estos genes no son esenciales para la supervivencia de la levadura e incluso una cepa mutante de todos estos genes sobrevive con un fenotipo igual a la cepa silvestre.

Dentro de esta familia de genes encontramos genes relacionados a tráfico vesicular denominados *COS*, pseudogenes y reliquias génicas que es un término para nombrar un tipo de pseudogenes o remanentes de secuencias de lo que pudo ser un gen (Lafontaine I. *et al*, 2004).

Para tener una buena representación de diversas regiones subteloméricas seleccionamos 24 loci para integrar el reportero, sin embargo, debido a las características físicas de estas zonas por la compactación de la heterocromatina, la recombinación homóloga no se presenta en alto grado y no fue posible obtener todas las integraciones. Se intentaron tres transformaciones independientes para obtener cada integración, de las cuales obtuvimos con éxito 14 integraciones subteloméricas y una integración no subtelomérica (Figura 21).

Dentro de las integraciones no obtenidas, están todos los sitios de genes de floculación *FLO*, se sabe que estos genes son muy variables entre cepas e

incluso dentro de la misma población en una colonia de levadura, por lo tanto es posible que la cepa de nuestro laboratorio carece de los genes de floculación o también que las condiciones de compactación de cromatina no permitieron obtener integración en estas zonas.

En la Figura 21 podemos observar la distribución del gen reportero en los 16 cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*, en la que cada integración corresponde a una cepa distinta.

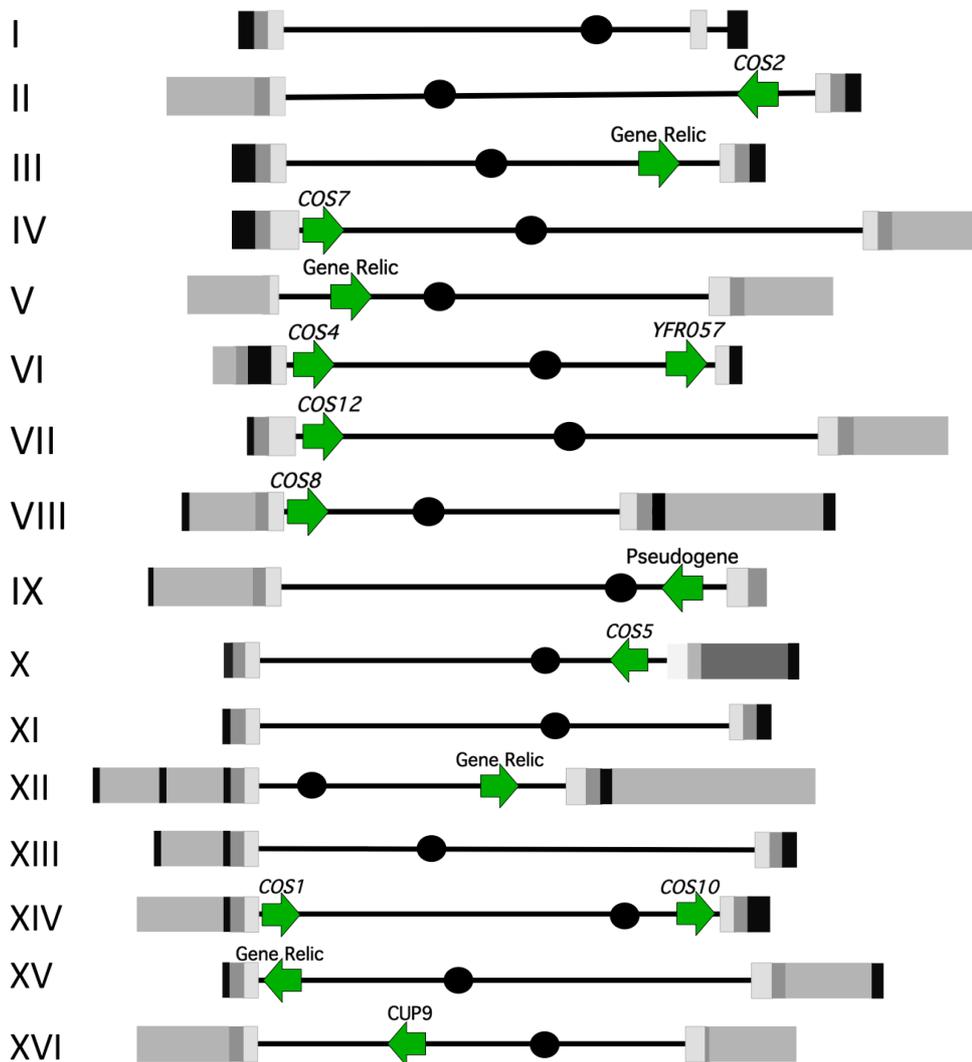


Figura 21. Localización del gen reportero GFP en los 16 cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*. El sentido de la flecha representa la dirección del gen, los círculos negros el centrómero y los recuadros en escala de grises un tipo de repetido subtelo mérico distinto. Las distancias a las que se encuentra la flecha son aproximadas y sólo reflejan su distancia relativa al telómero.

4.1.2.2 Estrategia de integración del gen reportero GFP.

El método para realizar las integraciones en todos los sitios seleccionados fue el siguiente.

- Amplificación por PCR del gen reportero (Figura 22). Se utilizó el plásmido pAJ69, que consiste de el plásmido pUC19 con la inserción de la fusión traduccional *URA3-GFP* en los sitios de corte *HindIII* y *EcoRI*.

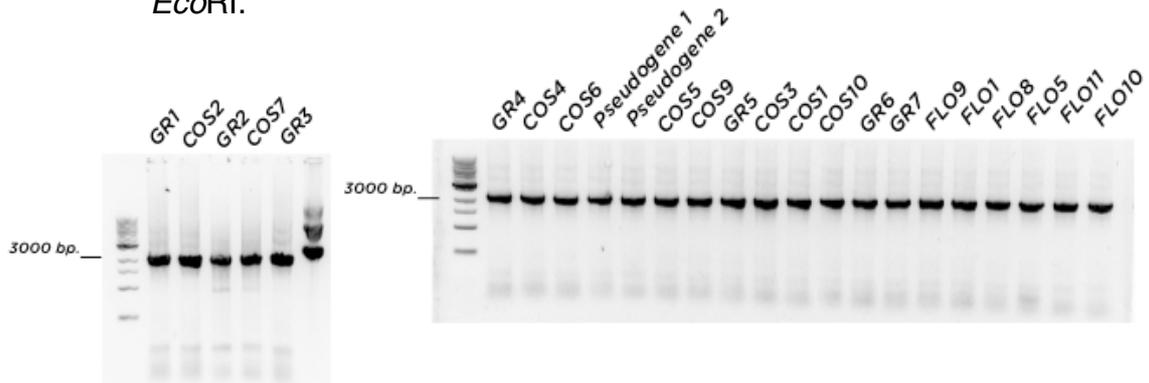


Figura 22. Amplificación del gen reportero *URA3-GFP* por PCR. Se observan las amplificaciones de todas las integraciones subtelo méricas planeadas, que incluye aquellas que al final no fue posible obtener transformación positiva.

- Con el producto de PCR que se observa en la imagen del gel de electroforesis anterior, se transformó a la cepa parental por el método de choque térmico. La integración del gen reportero se produce mediante recombinación homóloga entre secuencia homóloga del genoma con regiones idénticas diseñadas en el producto de PCR (Figura 23).

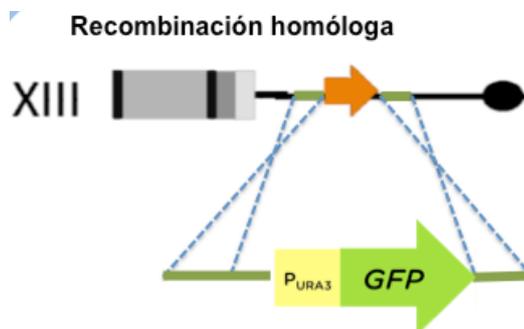


Figura 23. Representación de la recombinación homóloga para insertar el gen reportero en la posición genómica deseada. En este esquema observamos la inserción en el brazo izquierdo del cromosoma trece (XIII-L).

- Confirmamos la integración del cassette de expresión por PCR río arriba y río abajo del gen reportero. Utilizando DNA cromosomal extraído por el método de Looke *et al*, 2011. Los oligonucleótidos de confirmación fueron diseñados para que un par amplifique la región río arriba y el gen *URA3* y el otro par amplifica río abajo y el gen *GFP* (Figura 24). En esta confirmación incluimos controles negativos que consisten en todos los componente de la reacción de PCR excepto el DNA de la cepa.

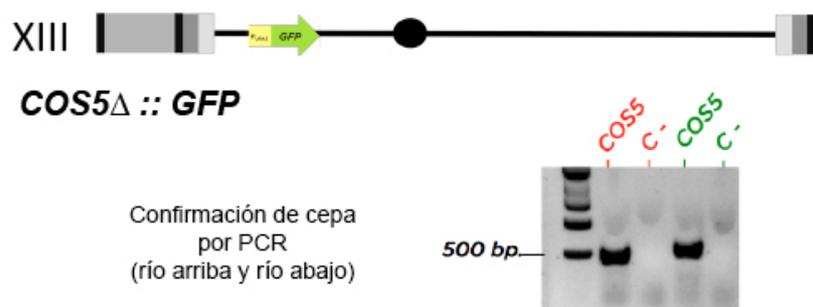


Figura 24. Confirmación de la integración subtelmérica por PCR río arriba y río abajo del reportero *GFP*. En este ejemplo observamos la comprobación de la integración del gen reportero en el locus *COS5* y el producto de PCR en un gel de agarosa con el peso molecular esperado.

Los primeros estudios realizados para reportar niveles de silenciamiento fueron basados en análisis de genética clásica como la evaluación de crecimiento en medio 5-FOA.

El ensayo 5-FOA se basa en la utilización del compuesto químico ácido 5-fluoro orótico. Una cepa silvestre con síntesis de la enzima *Ura3* transforma este compuesto químico en 5-fluorodeoxiuridina que es un compuesto tóxico para las células y causa su muerte (Figura 25). Por lo tanto, en una cepa con integración de un gen reportero *URA3* en la región subtelmérica, donde es susceptible a silenciarse, es posible evaluar si el gen *URA3* fue silenciado por el crecimiento de la cepa a nivel de colonia en medio de cultivo que contiene el compuesto químico 5-FOA (Tham W. *et al*, 2002).

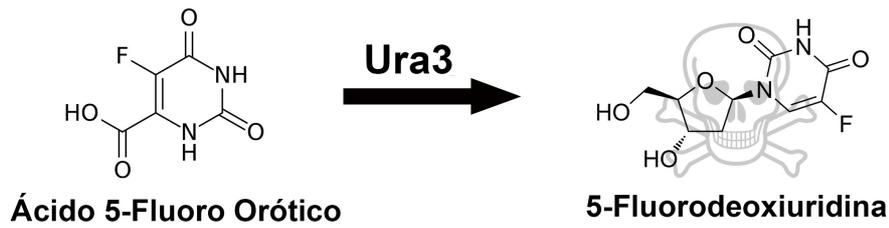


Figura 25. El método 5-FOA se basa en la formación del compuesto 5-fluorodeoxiuridina que es tóxico para las células, este compuesto es formado con el substrato ácido 5-fluoro orótico y acción de la enzima Ura3.

En las siguientes fotografías observamos los resultados del ensayo 5-FOA para cada una de las 15 cepas que tiene una integración del gen reportero *URA3-GFP* en posición genómica distinta.

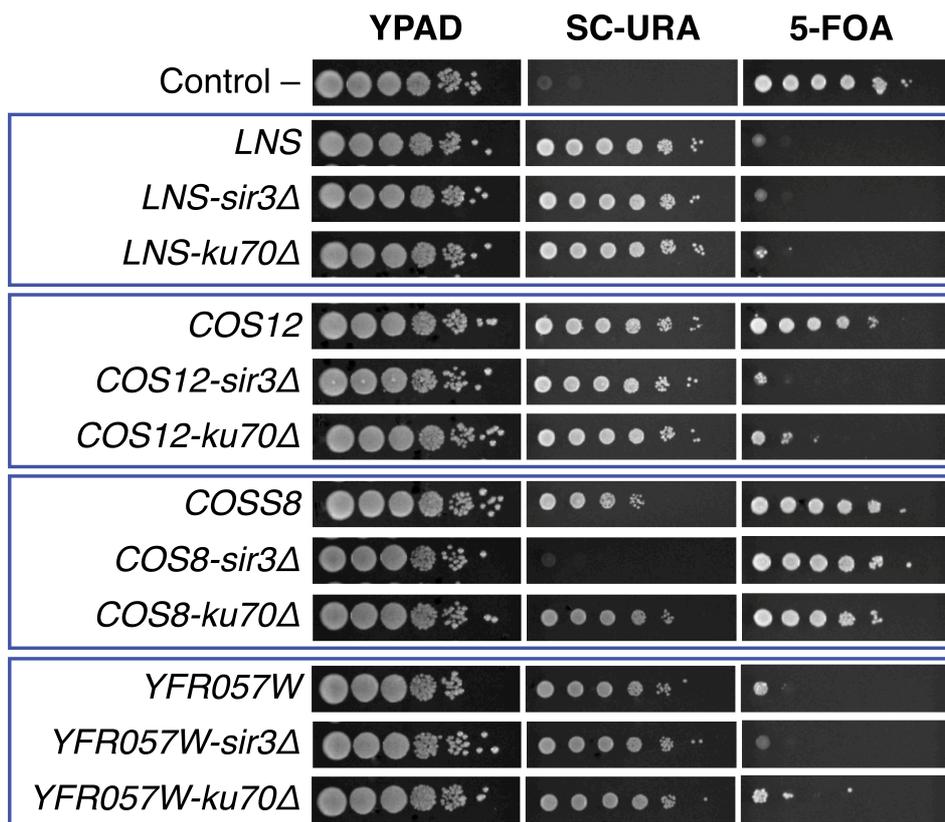


Figura 26. Análisis 5-FOA. Se observa el crecimiento en diluciones seriadas de colonias en tres condiciones: control de crecimiento en YPAD, expresión de Ura3 en el medio SC-URA y silenciamiento en 5-FOA. LNS – Locus No Subtelomérico (*cup9Δ:gfp*), loci subteloméricos: *COS12*, *COS8* y *YFR057W*.

El primer análisis fue realizado con un locus no subtelomérico (LNS) y tres loci subteloméricos denominados *COS8*, *COS12* y *YFR057W*. El control negativo es la cepa parental a partir de la que se realizaron todas las construcciones. Para poder visualizar el mayor efecto posible de no represión subtelomérica utilizamos cepas mutantes para los genes *SIR3* y *KU70*, que son dos genes teóricamente indispensables para originar la compactación de heterocromatina.

La Figura 26 es el resultado de analizar los cuatro loci: LNS, *COS12*, *COS8* y *YFR057W*, cada uno con su mutante para *SIR3* y *KU70*. Se evaluó el crecimiento de cada cepa en medio rico YPAD, sintético completo sin uracilo (SC-URA) y medio 5-FOA. El primero medio es de utilidad para evaluar que la cantidad de inóculo es homogénea entre muestras y por dilución, el segundo medio SC-URA es para observar la expresión de *URA3* que se debe a la expresión del gen reportero y el medio con 5-FOA contraselecciona la expresión de *URA3* a partir de un nivel no definido.

Observamos que el control negativo efectivamente no crece en ninguna dilución en medio SC-URA porque la cepa parental carece del gen *URA3* y que en medio 5-FOA se observa crecimiento hasta la última dilución, así que el compuesto químico no evita el crecimiento normal en la cepa parental. En el locus no subtelomérico, observamos que la cepa expresa *URA3* a un nivel que le permite crecer incluso hasta la última dilución y en 5-FOA prácticamente no hay crecimiento de la cepa en ninguna dilución.

Los loci subteloméricos muestran diferentes comportamientos. Cepas con el gen reportero integrado en el locus *COS12* tienen una expresión de *URA3* que crece en medio SC-URA de forma parecida a la cepa LNS, pero también crece en 5-FOA, esto se puede deber a que dentro de la población de levaduras, existen los dos estados, células expresando *URA3* y células que lo reprimen. Cuando vemos las mutantes *SIR3* y *KU70*, ambas muestran buen crecimiento en SC-URA, pero en 5-FOA poco crecimiento, lo cual sugiere que estos genes

son necesarios para mantener el locus reprimido, siendo mayor el efecto de *SIR3* porque la mutante evitó el silenciamiento del gen reportero.

En *COS8* observamos que el locus tiene expresión intermedia de *URA3* porque se observa crecimiento hasta la dilución media, pero en 5-FOA observamos total represión del reportero, esto puede deberse a que predominan ambos estados en la población. En las cepas mutantes, la mutante de *SIR3* origina que ninguna de las células exprese *URA3* y crezca en este medio, en cambio *KU70* sí evita la represión de la zona, el medio 5-FOA indica que ambas cepas tienen reprimido el gen reportero. Con esta información es posible que ambas mutantes estén reprimiendo el gen reportero, pero a dos niveles distintos, con *SIR3* prácticamente todas las células lo reprimen y con *KU70* permanecen algunas células sin reprimirlo.

El locus *YFR057W* muestra un fenotipo no silenciado en las colonias de medio SC-URA porque el crecimiento es parecido al silvestre, pero en 5-FOA prácticamente no hay crecimiento.

Una vez analizados los cuatro loci anteriores y la información obtenida con este ensayo, realizamos el mismo ensayo para los once loci subteloméricos restantes.

En la Figura 27 observamos el crecimiento de la cepa parental como control negativo, de nuevo la cepa LNS y la cepa LNS mutante en el gen *SIR3* y *KU70* como referencia de la no represión. En los once loci subteloméricos podemos observar que prácticamente todos tienen buen crecimiento en medio SC-URA, lo cual indica que todos expresan el gen *URA3* a un nivel suficientemente alto para mostrar crecimiento a nivel de colonia. En el medio 5-FOA vemos que la mayoría están no silenciados, a excepción de dos casos notorios, el locus *COS1* y locus *COS7* donde vemos crecimiento a una mayor dilución comparado con los loci restantes.

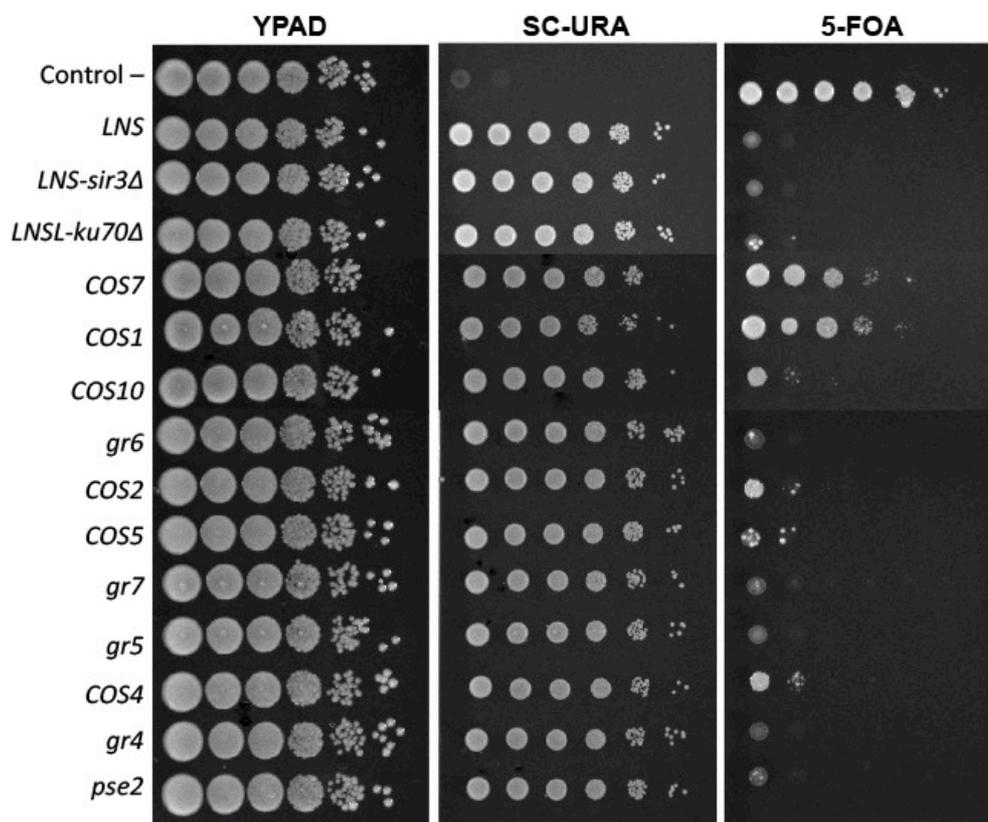


Figura 27. Análisis del nivel de represión transcripcional en diferentes integraciones subteloméricas por ensayos de crecimiento. Se observa el crecimiento de colonias en tres condiciones: control de crecimiento en medio YPAD, expresión de Ura3 en el medio SC-URA y silenciamiento en 5-FOA. LNS – Locus No Subtelomérico (*cup9Δ:gfp*), loci subteloméricos: *COS7*, *COS1*, *COS10*, *gr6*, *COS2*, *COS5*, *gr7*, *gr5*, *COS4*, *gr4* y *pse2*.

Con este ensayo podemos observar tendencias de silenciamiento de regiones subteloméricas, pero carece de la sensibilidad y precisión para establecer niveles de silenciamiento, es decir, que si dos regiones alcanzan el mínimo de expresión de *URA3* necesario para que la célula sea viable, sin importar si una tiene más expresión que otra, en ambas se observará crecimiento de colonias.

Los primeros estudios sobre el silenciamiento subtelomérico se basan en el uso de este ensayo para describir y caracterizar diversas regiones subteloméricas en levadura. Parte del fundamento de este proyecto es establecer un método

cuantitativo que permita establecer niveles de silenciamiento, lo cual no es posible con el ensayo 5-FOA.

4.1.2.3 Análisis por microscopía confocal

Evaluamos cada cepa con integración del gen reportero en una posición del genoma distinto por microscopía (Figura 28). Se tomaron las imágenes necesarias para tener un equivalente a datos de expresión de 1000 células mínimo por cepa.

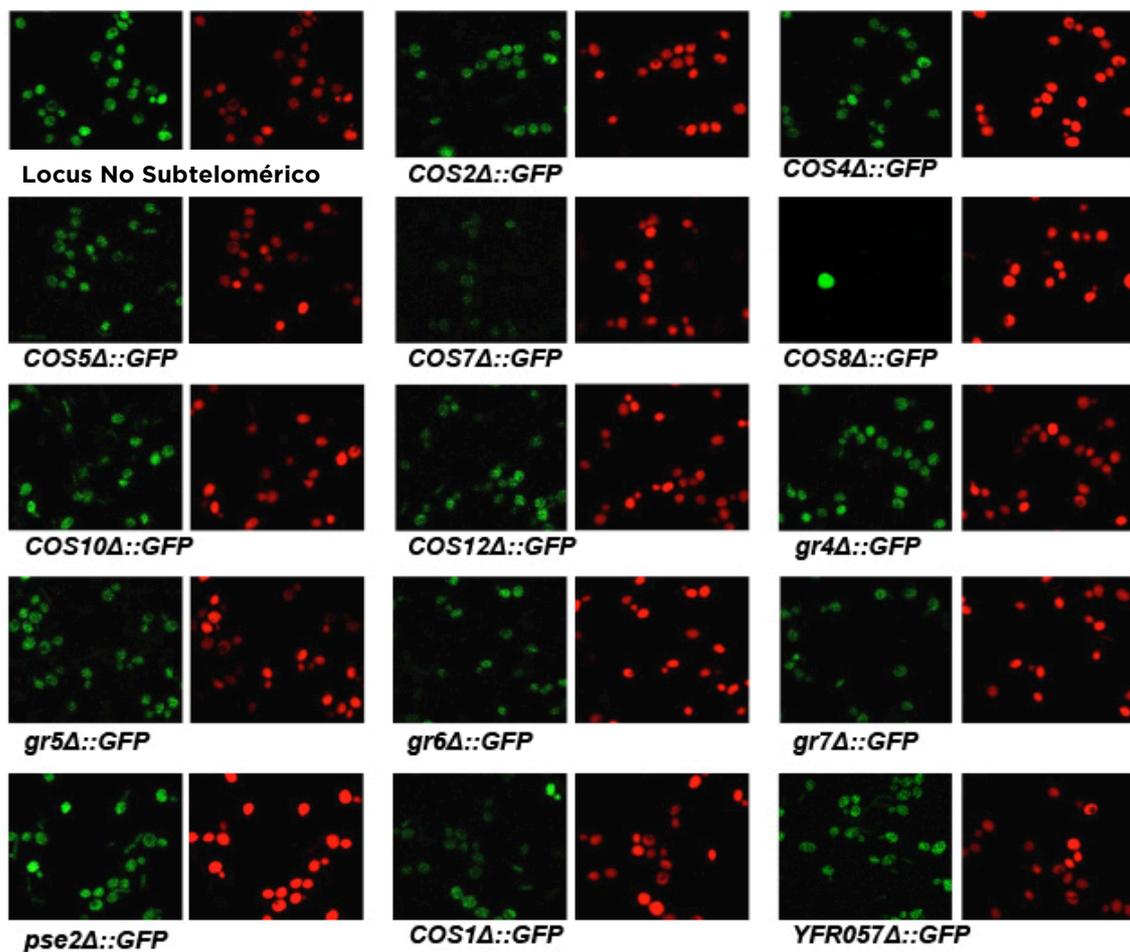


Figura 28. Imágenes muestra obtenidas por microscopía confocal de cada cepa con una integración subtelomérica distinta. En el anexo de este trabajo se encuentran fotos muestra de las tomas de cada cepa en el canal rojo y verde.

Procesamos las imágenes de la misma forma como se explica en la primera parte de este trabajo con el pipeline escrito en el programa CellProfiler y con los datos de expresión de GFP obtuvimos la siguiente información.

La expresión de GFP está representada por el logaritmo de la mediana de las intensidades de píxeles dentro de cada célula en unidades arbitrarias (u.a.). En el primer gráfico evaluamos cómo cambia la mediana de expresión de acuerdo a las diferentes posiciones genómicas.

Para comparar la expresión de GFP y mCherry en las mismas células, graficamos la expresión de ambos reporteros. Cuando hay expresión del gen, a nivel poblacional se observa ruido extrínseco derivado del tamaño celular y fluctuaciones de los componentes biosintéticos (Xu A. *et al*, 2006). Es posible observar estas variaciones en la expresión por las características de las células dentro de la población, pero al ser similar en ambos canales de fluorescencia, se sugiere que no hay variación estocástica relacionada a las construcciones por sí mismas.

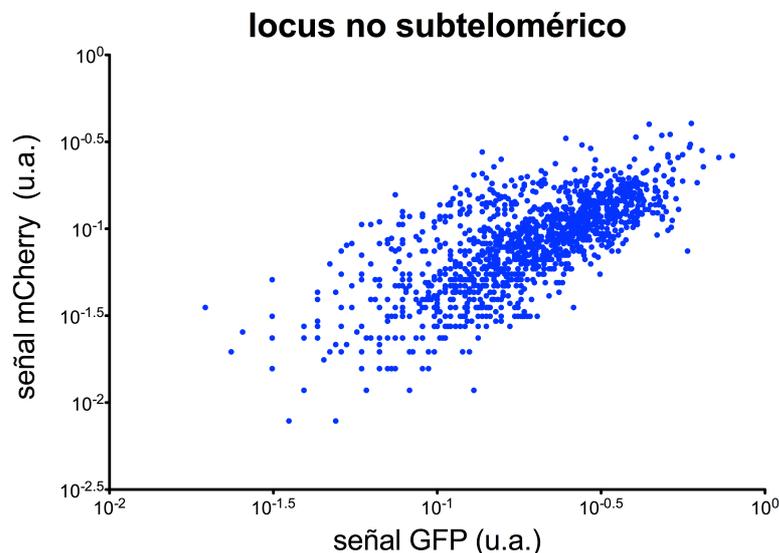


Figura 29. Expresión de la mediana de expresión de los genes reporteros mCherry y GFP en una misma célula. Están representados los valores para 1000 células en la cepa con integración no subtelo mérica (*cup9Δ:gfp*).

También analizamos el número de objetos que son detectados con el programa CellProfiler en las imágenes del canal mCherry y canal de GFP para observar el porcentaje de objetos totales en los que se miden los píxeles. En la Tabla 4 observamos los objetos que son detectados para diez imágenes de la cepa con integración no subtelmérica (LNS) y en la cepa parental sin integración del gen reportero (control negativo).

Observamos que a partir de los objetos en el canal mCherry, aproximadamente el 94% de esos objetos se conservan al detectar en el canal GFP y después de la filtración el 91% de los objetos son utilizados para cuantificación de píxeles, de forma similar en el control negativo se detectan 96.3% de objetos en el canal mCherry y al final 94.6% se conservan después de la detección en el canal de GFP. Esto indica que la detección de objetos no está relacionada a la expresión de GFP, por lo tanto nuestro pipeline detectará los objetos de forma equitativa en las diferentes cepas con niveles variables de expresión de GFP.

Tabla 4. Comprobación de la identificación de objetos (células) en los canales mCherry y GFP para cepas con expresión de GFP (LNS) y sin expresión de GFP (control -).

Número de imagen	LNS			Control -		
	Objetos en canal mCherry	Objetos en canal GFP	Objetos filtrados	Objetos en canal mCherry	Objetos en canal GFP	Objetos filtrados
1	166	154	149	145	148	140
2	166	156	150	219	218	206
3	146	137	133	119	114	109
4	219	187	187	182	181	178
5	169	145	145	159	148	153
6	206	194	193	148	136	140
7	186	185	180	174	168	160
8	206	201	196	219	196	196
9	177	178	172	184	178	176
10	212	198	181	229	225	224
Promedio	185.3	173.5	168.6	177.8	171.2	168.2
Porcentaje*		93.6	91.0		96.3	94.6

* El porcentaje es calculado con respecto al promedio de objetos en el canal mCherry.

Después de utilizar el método de microscopia con todas las cepas con integración subtelmérica, observamos que efectivamente la integración no subtelmérica (LNS) tiene la mayor mediana de expresión de GFP y que la mayoría de los loci evaluados tienen una baja expresión del gen reportero, sin embargo, es evidente que no es comparable el nivel de expresión esperado para una integración con localización subtelmérica con respecto a una posición que no lo es.

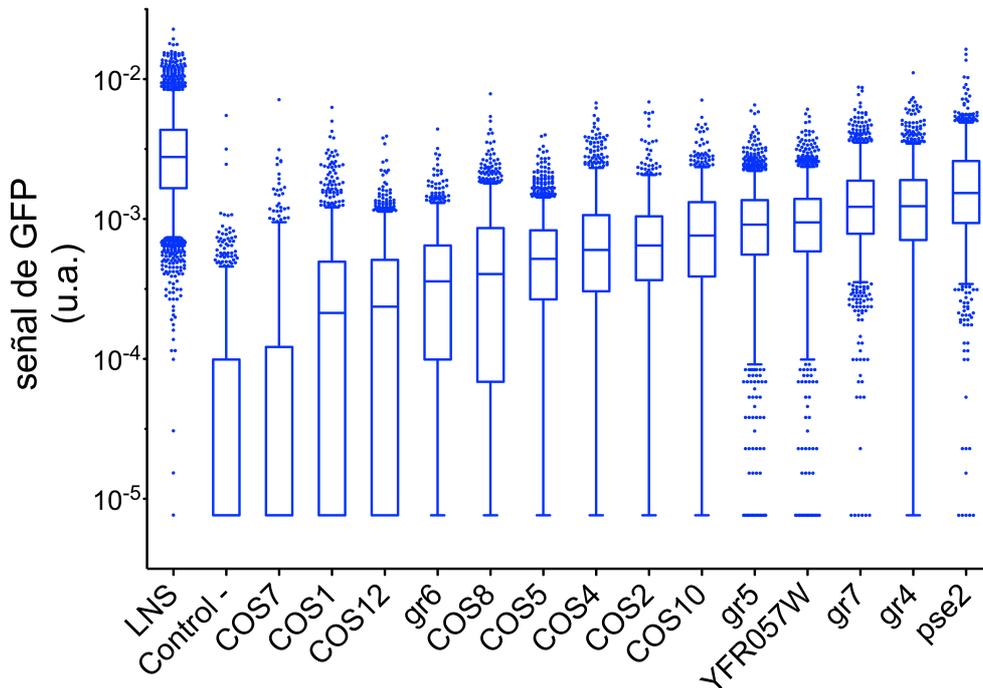


Figura 30. Boxplot del logaritmo de expresión de GFP en unidades arbitrarias (u.a.) de todas las cepas con integración del gen reportero. En cada locus se muestra el percentil 5 y 95.

Para considerar el ruido biológico de la expresión del reportero de GFP en cada muestra, consideramos el coeficiente de variación robusto (CVR), obtenido con la siguiente ecuación:

$$CVR = \frac{(75th\ percentil - 25th\ percentil)}{mediana}$$

En la Figura 31 mostramos la relación de la mediana de expresión de GFP en unidades arbitrarias *versus* su coeficiente de variación, ambos en escala logarítmica, en cada integración subteloamérica.

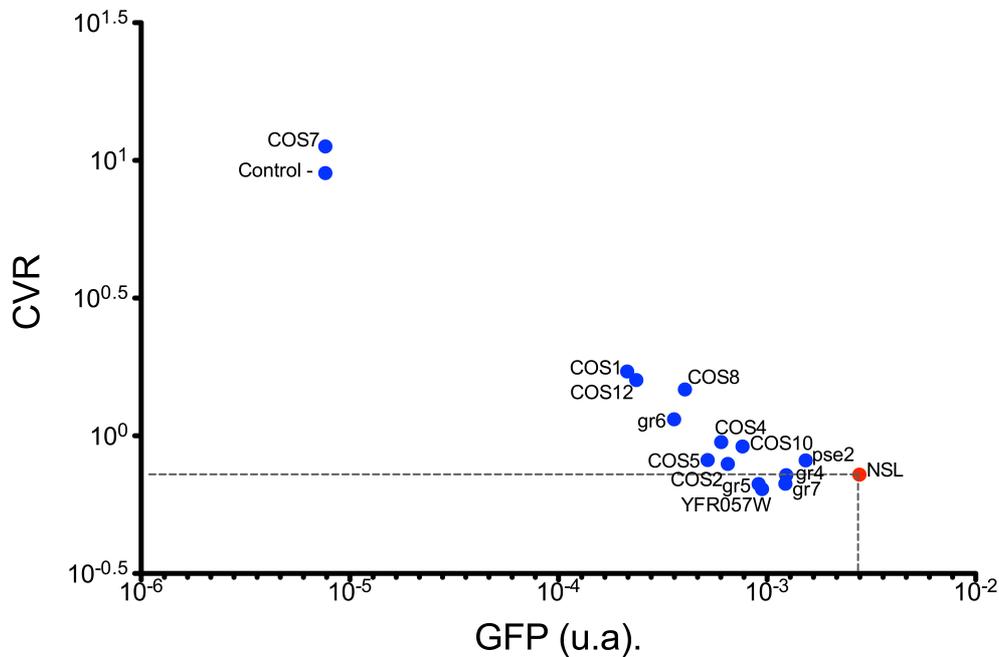


Figura 31. Variación de la mediana de expresión de GFP en las posiciones genómicas con integración del gen reportero. Control negativo - cepa parental Y8205 sin integración del gen *GFP*, LNS - locus no subteloamérica.

Observamos que la mayoría de los loci de baja expresión tienen mayor variabilidad o ruido en su expresión, a excepción del locus *COS7* que tiene expresión casi nula y similar a la cepa parental.

La posición que tiene mayor expresión de GFP es la no subteloamérica (LNS) y está dentro de las localizaciones genómicas con menor ruido en la expresión.

4.2 Segunda parte: Describir la forma en que el silenciamiento subtelomérico es afectado por mutaciones en genes relacionados a este fenómeno.

Una vez que caracterizamos las diferentes posiciones genómicas teníamos la información necesaria para desarrollar la parte central de este proyecto para observar cómo el silenciamiento subtelomérico es afectado por mutaciones en genes relacionados a este fenómeno y observar la especificidad de diversos factores *trans* por diferentes regiones subteloméricas.

Seleccionamos tres posiciones genómicas basados en los resultados de expresión de GFP mostrados en la parte anterior de esta sección de resultados (Figura 30 y 31) y porque existen algunos trabajos previos que han descrito poca información sobre estos sitios genómicos.

Consideramos las posiciones genómicas siguientes:

COS12 como una región en mayoría silenciada, *YFR057* como una región en mayoría no silenciada y *COS8* como una región de expresión intermedia entre los dos loci anteriores. *COS8* también fue seleccionado porque las células con esta integración visualmente en microscopio presentan fuerte alta intensidad de GFP.

En el caso de *YFR057W* se reportó como un ORF de función desconocida pero que es sujeto a silenciamiento telomérico. Se sabe que se desreprime en ausencia de *SIR2*, *3* y *4*. Existen varias características que lo hacen susceptible a silenciamiento, entre ellas que está a menos de 1kb del core X ARS (las proteínas Sir se propagan hasta ~3kb del extremo telomérico en el brazo derecho del cromosoma VI) y además no contiene el elemento STAR de anti-silenciamiento (Tham W. *et al*, 2002).

La primer mutante que observamos fue *SIR3* (Figura 32). La mediana de expresión en la mutante *SIR3* tiene un cambio significativo menor para el locus

COS8, pero tiende a aumentar la expresión en las mutantes en los loci *COS12* y *YFR057W*. Este resultado sugiere un efecto diferencial de este factor en las tres regiones subteloméricas estudiadas.

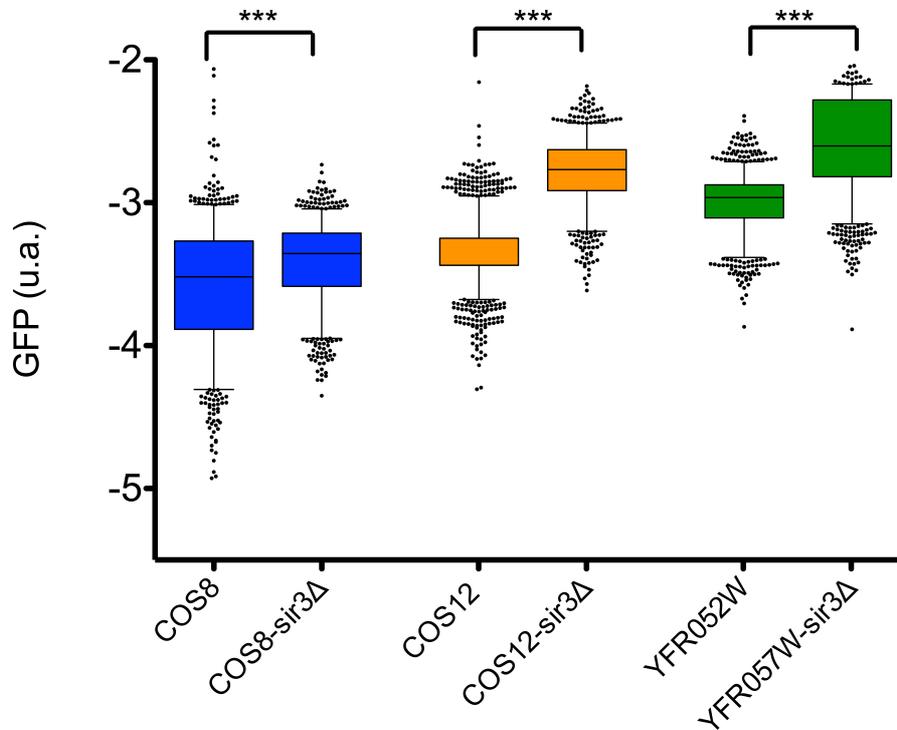


Figura 32. Efecto de la mutante en el gen *SIR3* sobre el silenciamiento de las regiones subteloméricas *COS8*, *COS12* y *YFR057W* (prueba estadística Wilcoxon, $P < 0.05$)

Para analizar con más detalle el efecto de algunos genes sobre el silenciamiento en los loci de estudio, seleccionamos un grupo de 22 genes con base en diferentes criterios (Figura 34). Nos basamos en diferentes categorías, por ejemplo elementos del mecanismo del complejo de silenciamiento en telómeros, genes que intervienen en la localización de los telómeros en la periferia nuclear, factores de la vía de síntesis de NAD^+ por ser la molécula para realizar la función de desacetilación de histonas de *SIR2* (Figura 33) y en genes relacionados a la modificación post-traducciona de histonas (metilación, acetilación y variantes de histonas).

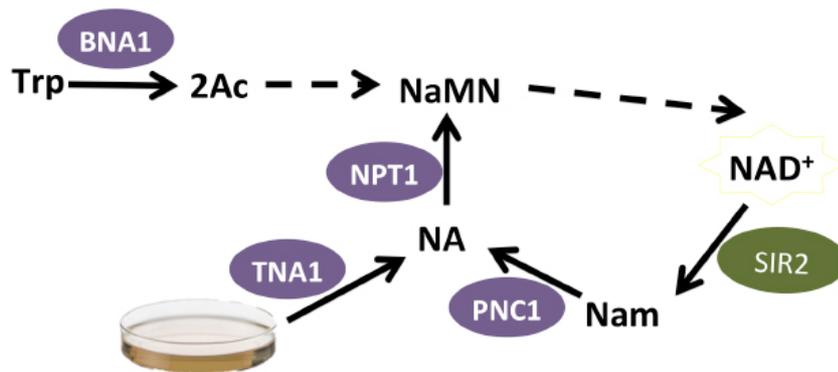


Figura 33. Síntesis de NAD⁺ por la vía de salvamento y síntesis *de novo*. La síntesis *de novo* comienza con triptófano (Trp), se procesa y *BNA1* lo convierte a semialdehído 2-amino-3-carboximucónico (2Ac), que por más reacciones químicas llega a originar ácido nicotínico mononucleótido (NaMN). En la vía de salvamento, el Nam producido por Sir2 se convierte en NaMN por *PNC1* y *NPT1*. Además *NPT1* puede utilizar ácido nicotínico (Na) que se importa a la célula, a través de la permeasa de ácido nicotínico (*Tna1*; Imagen modificada de Sandmeier J. *et al*, 2001)

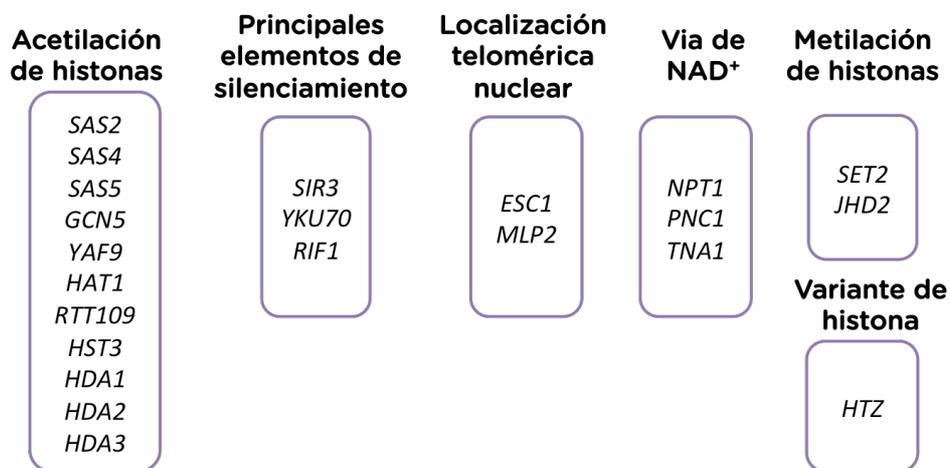


Figura 34. Factores seleccionados para evaluar su efecto en el nivel de silenciamiento subtelo mérico y su agrupación de acuerdo a la categoría de participación.

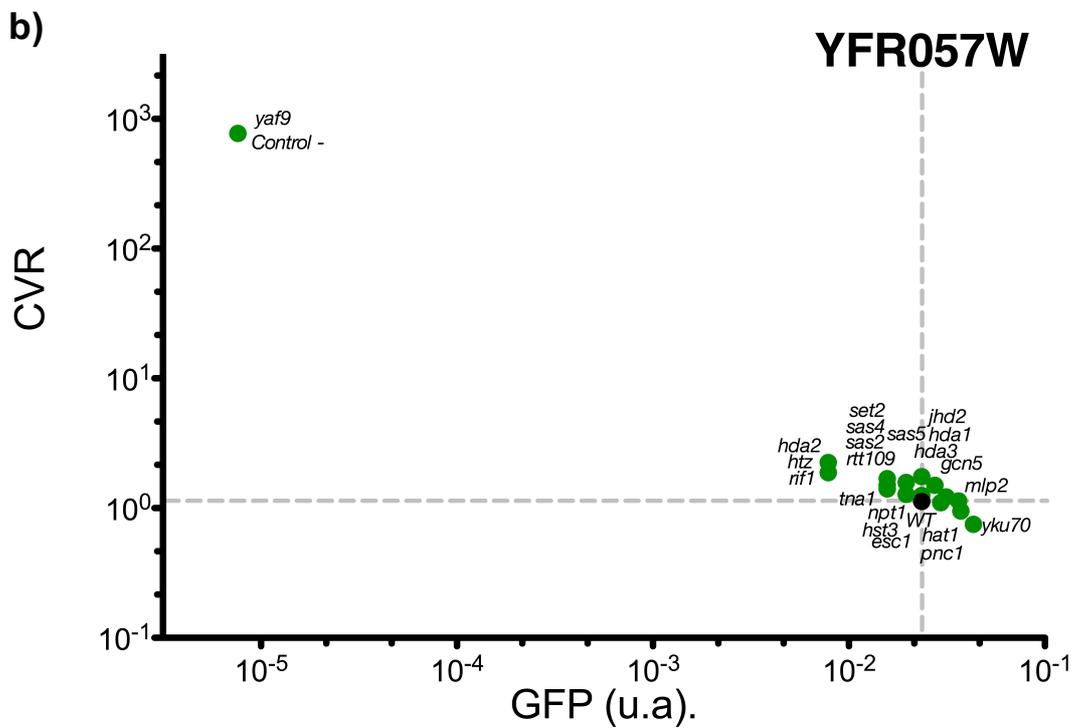
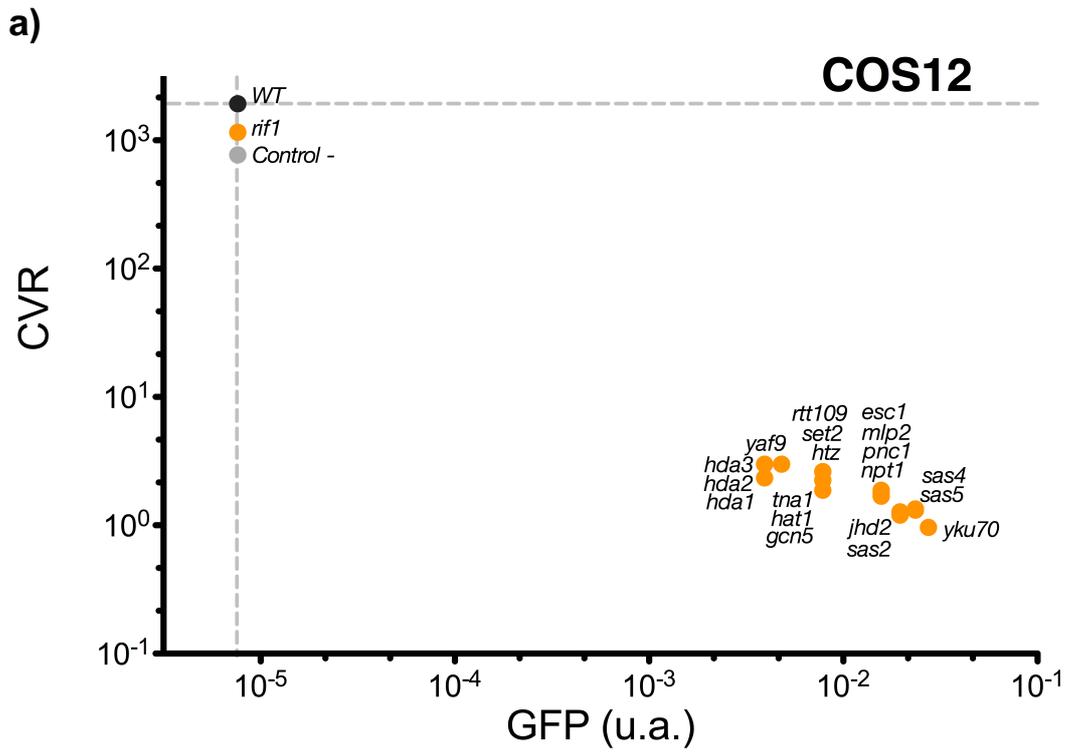
Para obtener las cepas con integración subtelo mérica GFP (en los loci *COS12*, *COS8* o *YFR057W*) y también mutante de cada uno de los genes de la lista anterior, utilizamos la metodología Synthetic Genetic Array (SGA) o arreglo sintético genético, que consiste en la cruce de las cepas de la colección de

mutantes knock-out con cada una de las cepas con la integración subtelomérica (*ver métodos SGA*).

En las siguientes tres gráficas observamos los resultados de la mediana de expresión de GFP en cada una de las tres posiciones subteloméricas y sus respectivas mutantes.

En la Figura 35 vemos la gráfica del locus *COS12*, donde observamos en la intersección de líneas color gris la expresión de GFP en la cepa con sólo la integración subtelomérica (WT) y todos los demás puntos representan las cepas mutantes. Observamos que la única mutación que no incrementa la expresión de GFP es *RIF1*, que es un factor global del mecanismo de silenciamiento. La mutante con mayor efecto de no represión es *YKU70* que sí es uno de los elementos fundamentales para la formación de heterocromatina. Podemos observar la agrupación o efectos similares en las tres acetilasas de histonas *SAS2*, *SAS4* y *SAS5*. Con menor efecto vemos agrupadas a los dos factores de posición en periferia nuclear *ESC1* y *MLP2*. Finalmente también vemos agrupación por su nivel de expresión de las desacetilasas de histonas *HDA1*, *HDA2* y *HDA3*.

En el caso del locus *YFR057W* vemos que los efectos en las mutantes son distintos, consideramos a este locus como mayoría de células en estado no silenciado por su nivel de expresión de GFP. En el gráfico siguiente observamos con líneas en color gris su expresión en la cepa con sólo la integración del reportero (WT). La mutación con mayor efecto es *YKU70* de forma similar al locus anterior. Observamos que por nivel de efecto en la no represión, continúan de forma agrupada los genes *ESC1* y *MLP2*, es decir la pérdida de estos factores impacta de forma importante el nivel de expresión en este locus. De forma relevante, no observamos agrupación del grupo de desacetilasas *HDA*, tienen el mismo efecto *HDA1*, *HDA2* y *HDA3* desreprimiendo este locus. En este locus es posible observar que la mutante *RIF1* mantiene la represión del locus.



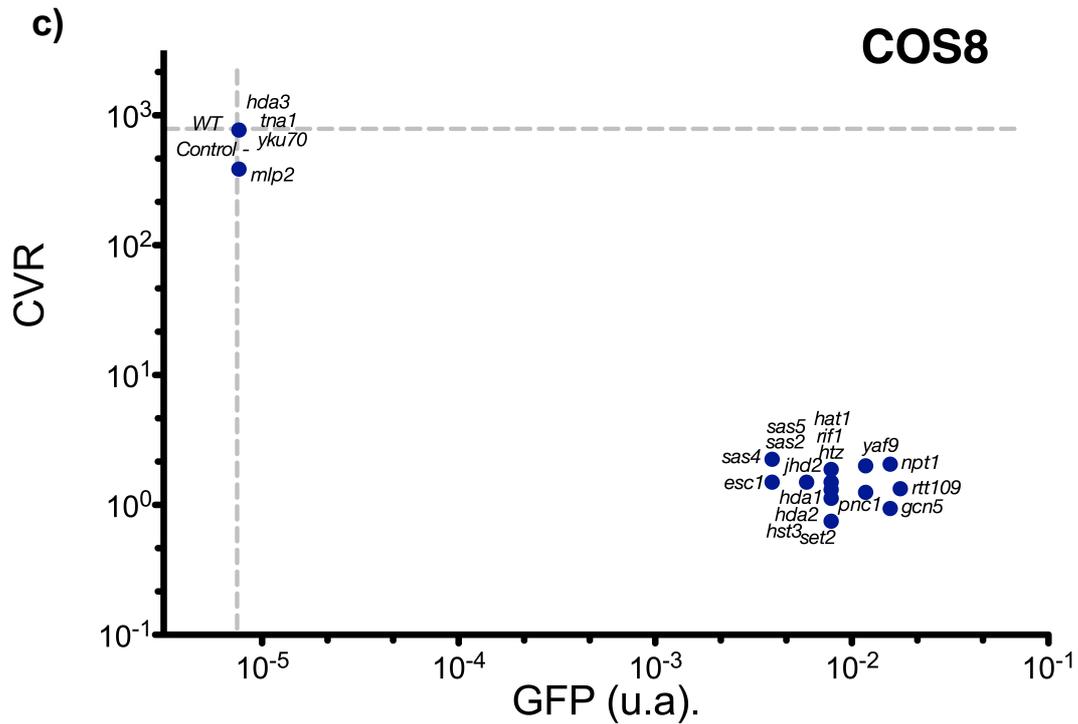


Figura 35. Efecto de las mutantes por delección para los genes seleccionados sobre 3 fondos genéticos distintos. Observamos la mediana de la expresión de GFP en escala logarítmica *versus* el logaritmo del coeficiente de variación robusto. a) Integración en locus *COS12* considerado como silenciado, b) integración en locus *YFR057W* considerado como no silenciado y c) integración en locus *COS8* considerado como parcialmente silenciado.

Para el locus *COS8* tenemos observaciones relevantes. Comparado con los loci anteriores, la mutante en *YKU70* tiene el efecto totalmente opuesto porque la ausencia de este gen no desreprime este locus, permanece silenciado al igual que con la mutación en *TNA1*, *HDA3* y *MLP2*. Globalmente, vemos que los niveles de expresión no son tan altos, pero sí se observa la tendencia de agrupación por nivel de efecto y categoría en las acetilasas de histonas *SAS2*, *SAS4* y *SAS5*.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo logramos describir el nivel de silenciamiento transcripcional en regiones subteloméricas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con un método de microscopia de fluorescencia y análisis de imagen. El método establecido permite reportar la mediana del nivel de expresión de GFP con una resolución de células individuales y proporciona información cuantitativa sobre cambios en el estado transcripcional por efecto de mutaciones en algunos genes involucrados en la regulación del efecto de posición telomérica.

El conocer cómo se regulan estas zonas teloméricas permite entender la regulación epigenética en levadura y podría tener implicaciones aplicadas en la regulación específica de genes de importancia comercial. Por ejemplo, los genes subteloméricos *FLO* son importantes para la producción de vino y cerveza porque se requieren cepas floculantes en estos procesos. Incluso por la conservación de los mecanismos de regulación transcripcional en telómeros en eucariontes patógenos, entender este silenciamiento en *S. cerevisiae* podría contribuir al entendimiento de mecanismos de patogenicidad en otros organismos.

5.1 Aspectos relevantes de este trabajo

En nuestro estudio, el análisis de imágenes involucra la cuantificación de píxeles por célula y representa una medida de expresión de GFP, por lo tanto la precisión es mayor en comparación con el ensayo convencional de resistencia a 5-FOA. En la Figura 30 ordenamos el nivel de silenciamiento en orden decreciente, considerando la mediana de expresión de GFP. Con este gráfico podemos observar que hay cambios sutiles de expresión en cada locus. Dichos datos nos permiten establecer diferencias entre los niveles de expresión en diferentes sitios teloméricos, lo cual no es posible realizar con el ensayo 5-FOA.

Con base en el ensayo 5-FOA, se concluye que los loci *COS7*, *COS1* y *COS12* están silenciados. Este ensayo ha sido utilizado para reportar porcentajes de silenciamiento; sin embargo la precisión de este método es reducida y la información debería ser considerada sólo de manera cualitativa. De hecho, en un estudio se demostró que el ensayo URA3-FOA identifica falsos positivos cuando se usa para detectar mutantes que afectan el silenciamiento y que es necesario confirmar por RT-PCR cuantitativo (Rossmann et al, 2011).

Obtuvimos los datos de la mediana de expresión de GFP y mCherry de cada cepa en un mínimo de 1000 células por muestra. Para evaluar si hay una variación estocástica relacionada a las construcciones genéticas, graficamos la señal de GFP *versus* la señal de mCherry en la misma célula y podemos ver que no hay variación relacionada a los genes reporteros (Figura 29). La variación observada puede deberse a que la mediana es afectada por la presencia de componentes celulares como la vacuola y que no tienen fluorescencia.

Para estudiar el ruido extrínseco en cada una de estas regiones subtelméricas, utilizamos el coeficiente de variación robusto (CVR), que es un parámetro utilizado por los programas de análisis de datos de citometría de flujo para poblaciones que no tienen una distribución normal. El ruido extrínseco es derivado del tamaño celular y las fluctuaciones en los componentes biosintéticos que contribuyen en la producción de las proteínas fluorescentes. En la Figura 31 observamos que, en general, los genes con menor expresión tienen un alto valor en CVR. Se sabe que los genes subtelméricos tienen un nivel de baja expresión, pero con el método utilizado podemos observar diferencias pequeñas en el ruido extrínseco de estas regiones genómicas.

En la literatura se ha reportado que los genes esenciales tienen bajos niveles de ruido, mientras que en genes relacionados a estrés se observan altos niveles de ruido (Bar-Even B. et al, 2006). Debido a que en los loci subtelméricos de *S. cerevisiae* encontramos genes que codifican para

proteínas relacionadas a funciones de ventajas nutricionales o adaptativas (Smith *et al*, 2011), es posible que el nivel de varianza alto observado se deba precisamente a que no desempeñan ninguna función esencial.

Para saber qué genes podrían tener efecto en el silenciamiento subtelomérico, nos basamos en el segundo modelo de represión transcripcional (Mukhopadhyay S. y Sengupta A., 2013). En este modelo se da un gran valor a las modificaciones post-traduccionales de las histonas y a la forma en que dichas marcas influyen en la represión transcripcional que caracteriza a los genes subteloméricos.

5.2 Efectos diferenciales en los loci subteloméricos

En el locus *COS12* (Figura 35a) observamos que la mutación de *KU70* elimina el silenciamiento, lo cual era de esperar debido a que *Yku70* está involucrada en localización del telómero en el núcleo, en el alargamiento del telómero y en el silenciamiento subtelomérico (Mondoux M., 2006). En segundo lugar, vemos agrupados a los genes *SAS* cuyo papel de acetilasas de histonas indica que la acetilación es importante, ya que su ausencia desreprime esta región subtelomérica. También se agrupan los efectos de los genes de posición telomérica en el núcleo *ESC1* y *MLP2* con efecto notorio de desrepresión, esto se explica por la importancia de la arquitectura nuclear en la regulación genética. En el otro extremo, el gen *RIF1* tiene poco efecto porque se postula que *Rap1* compite con las proteínas *Sir* por la unión con *Rap1*, entonces en *rif1Δ*, el complejo *SIR* actúa con libertad y la represión aumenta (Mondoux M., 2006). También vemos agrupación de los genes *HDA* codificantes de desacetilasas de histonas H3 y H4, al no estar presentes deberían tener un efecto antisilenciamiento, pero se ha reportado que en realidad promueven la extensión de *Sir3* (Huang Y., 2002). En resumen, este locus tiene un comportamiento fuerte de silenciamiento vía *SIR*, en el que el efecto en las mutantes de los genes analizados se explica por involucrar al complejo *SIR*.

En el locus *YFR057W* (Figura 35b) tenemos el mismo efecto en *ku70Δ* con aumento en la expresión de GFP y dicho nivel se agrupa con el de *MLP2* y *ESC1*, posiblemente porque los tres genes están involucrados en la posición del telómero en la periferia nuclear (Mondoux M., 2006). La asociación de que la periferia nuclear promueve el TPE surge del hecho de que proteínas del silenciamiento y sitios cromosomales de represión transcripcional tienen localización periférica (Tham W. *et al*, 2002), por lo que se sugiere que este locus está regulado fuertemente por la arquitectura física. Observamos que los genes *SAS* prácticamente no tienen efecto en cambios de expresión de GFP, lo cual sugiere que la falta de acetilación de la H3K4 no tiene gran impacto en esta región del genoma. En el caso opuesto, de nuevo vemos que la carencia de Rif1 promueve el silenciamiento probablemente por extensión de Sir3 en la región subtelomérica y de forma resaltante la mutante en *YAF9* reduce dramáticamente la expresión de GFP. Se sabe que el producto de este gen participa en la acetilación de H4 y su carencia podría estar promoviendo la compactación de heterocromatina (Takahashi Y., 2011). De igual forma la ausencia de la variante de histonas H2A.Z que es un elemento barrera para el silenciamiento favorece el silenciamiento (Ottaviani A. *et al*, 2008).

Como caso particular, el locus *COS8* muestra efectos totalmente distintos a lo esperado por el mecanismo vía *SIR*. Como vemos en la Figura 35c, genes relacionados a localización nuclear (*KU70*, *ESC1* y *MLP2*) no causan desrepresión, por lo tanto este locus podría estar regulado preferencialmente por otras causas como las modificaciones de histonas. El mayor efecto de desilenciamiento observado es en la mutante *RTT109*, cuya función es la acetilación de la H3K56, una marca importante para asegurar la localización nuclear durante fase S (Hiraga S. *et al*, 2008). También se observa un incremento en la expresión de GFP en la mutante en *NPT1*, que es parte de la vía de salvamento de NAD⁺, que es un sustrato usado por desacetilasas que es el gen reportado con mayor efecto en silenciamiento comparado con otros genes relacionados de la misma vía (Sandmeier J. *et al*, 2001). Además la carencia de Gcn5, enzima encargada de acetilación de H2B y H3, aumenta la expresión de GFP, por otra parte este gen se ha relacionado a efectos de

variegación porque origina células silenciadas y no silenciadas (Mano Y. *et al*, 2013). En este locus observamos efectos por mutantes en genes diferentes a los de los loci *COS12* y *YFR057W* que muestran un silenciamiento vía *SIR*, por lo tanto es probable que esta posición subtelomérica tenga regulación transcripcional independiente de *SIR*.

Los resultados mostraron que cada región telomérica puede tener una regulación transcripcional distinta, apoyando los dos mecanismos reportados en levadura, el mecanismo vía *SIR* y el mecanismo de modificaciones en histonas. Consideramos que ambos mecanismos tienen impacto en la regulación de la expresión genética y que no son mutuamente excluyentes, sin embargo para algunas regiones genómicas algunas marcas epigenéticas pueden tener mayor impacto que el observado por el mecanismo *SIR*.

5.3 Particularidades de silenciamiento en el locus *COS8*

Con el ensayo convencional de resistencia a 5-FOA observamos que el locus *COS8* tiene un comportamiento particular, ya que al evaluar el crecimiento de la cepa en el medio 5-FOA indica silenciamiento y en medio SC-URA la mutante *sir3Δ* no presenta crecimiento. Estos resultados pueden explicarse porque el nivel de expresión de *URA3* no es suficiente para su crecimiento en el medio SC-URA y si la carencia de *SIR3* no tiene el efecto esperado, su regulación posiblemente es vía independiente del complejo SIR.

Los estudios recientes indican que SIR no es el único factor que afecta la expresión de los genes subteloméricos. De hecho, los genes *FLO* son silenciados por una vía independiente de Sir, a través de homólogos de Sir2, Hst1 y Hst2 (Ottaviani A. *et al*, 2008). Asimismo, en un contexto natural, dentro de las familias de genes teloméricos, los genes *SUC* y *MAL* no son regulados por los genes *SIR* (Zakian V., 1996).

Las observaciones de *COS8* pueden interpretarse como un ensamblaje estocástico de heterocromatina en un locus formalmente eucromático. Se podría llamar heterocromatina facultativa porque tiene un comportamiento similar a genes que están silenciados en un subgrupo de células pero que pueden expresarse en algún momento (Richards y Elgin, 2002).

5.4 Limitaciones del estudio

Todas las regiones teloméricas que se generaron con éxito en este trabajo pertenecen a la familia DUP380. Obtuvimos sólo estas integraciones del gen reportero de todas las planeadas posiblemente por la dificultad de integración por recombinación homóloga en regiones con alta compactación de la heterocromatina. Además, en el caso de los genes subteloméricos *FLO*, se sabe que no todas las cepas son floculantes y puede ser que algunas cepas no contengan ningún gen *FLO*, mientras que otras codifiquen para un gran número de ellos (Govender P., 2010). La cepa que usamos, derivada de la S288C, se sabe que no es floculante porque los genes *FLO* están transcripcionalmente inactivos, a diferencia de su ancestro, la cepa EM93 que muestra gran capacidad de floculación (Smukalla *et al*, 2008), por lo tanto es posible que la heterocromatina compactada en estas regiones no permitió integrar el gen reportero. De hecho, la poca representación de mutantes en genes *FLO* en la colección sistemática de mutantes en la cepa S288C (Giaever *et al*, 2002) sugiere que éste es el caso.

A pesar de que tenemos un método de cuantificación del nivel de silenciamiento por microscopía de fluorescencia, no fue posible observar efecto de variegación en las poblaciones celulares de las cepas con integración del gen reportero en diferentes regiones subteloméricas. Visualmente observamos la variegación sólo en imágenes particulares obtenidas por microscopía confocal, tal como la que se muestra en la Figura 27, en donde observamos algunas células con expresión de GFP y otras células que no expresan. Es importante resaltar que la variegación subtelomérica, un proceso estocástico y

metaestable de la compactación de la heterocromatina, es poco frecuente y se ha descrito en levadura principalmente a nivel de colonia y técnica de microscopía “time-lapse” (Bühler M. y Susan M., 2009). En este estudio posiblemente este fenómeno no fue observado con microscopía de fluorescencia confocal posiblemente por la detección de los estados de transcripción intermedios que producen gradientes de niveles de expresión.

Además tenemos que considerar que una limitante intrínseca en el estudio de estas regiones subteloméricas es su bajo nivel de expresión y que las metodologías desarrolladas tendrán un límite de detección.

Otro factor que afecta el estudio del silenciamiento subtelomérico es la variabilidad según el telómero. Por ejemplo, en los estudios iniciales sobre el tema, la inserción del reportero *URA3* en el brazo izquierdo del cromosoma VII o en el extremo derecho del cromosoma V en la misma cepa dio un rendimiento variable, entre ~33% y ~4% de células resistentes a 5-FOA, respectivamente. (L. Sandell, K. Runge y V. Zakian, 1992).

6. CONCLUSIONES

En este proyecto logramos obtener un método de análisis cuantitativo del silenciamiento subtelomérico en levadura que se basa en la microscopía confocal y análisis de imágenes.

Caracterizamos 15 regiones genómicas de levadura respecto a su nivel de silenciamiento por un método cualitativo (ensayo 5-FOA) y nuestro método cuantitativo (microscopía confocal). Determinamos que el método desarrollado en este trabajo permite obtener datos con mayor precisión y observar cambios mínimos en la expresión de GFP debido a que las regiones subteloméricas contienen genes de baja expresión.

El análisis de mutantes en algunos genes relacionados a modificaciones epigenéticas apoya el modelo de silenciamiento independiente vía SIR en el locus *COS8*, donde observamos efectos distintos en las mutantes knock-out con respecto a sus equivalentes observados en la regulación de los loci *COS12* y *YFR057W*, que también implican un efecto diferencial de los factores *trans*.

7. PERSPECTIVAS

El estudio de la expresión genética involucra diversos factores, entre ellos resaltan los factores transcripcionales, las modificaciones epigenéticas, la arquitectura nuclear y el ambiente de crecimiento.

Consideramos que la expresión genética es el resultado del efecto de todos estos factores, por lo tanto el caracterizar una región subtelomérica requiere diversas perspectivas de estudio.

En el presente proyecto logramos caracterizar el nivel de silenciamiento subtelomérico en diversas regiones del genoma de levadura, sin embargo para corroborar el efecto de las mutaciones, se requiere analizar las modificaciones pos-traduccionales de las histonas en los loci analizados para aseverar la importancia de esas marcas epigenéticas.

Otra perspectiva es indagar en el efecto de variegación dependiente de la posición, en el locus *COS8*, que en nuestro estudio muestra efectos fuertes a nivel de células individuales en la expresión de GFP y analizar que genes posiblemente favorecen su variegación.

Agradecimientos

A toda la comunidad LANGEBIO-CINVESTAV por impulsar mi desarrollo personal y profesional.

Al Dr. Alexander De Luna Fors por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por ser una guía para mi formación académica. Gracias por permitirme proponer ideas y apoyarme en desarrollarlas.

Al Dr. Agustino Martínez Antonio porque ha confiado en mi desde hace mucho tiempo, le agradezco su apoyo personal y académico. El proyecto de iGEM no fue sólo un concurso para mí, fue un reto y cambió muchos aspectos de mi vida, gracias por darme todo lo necesario para lograr éxitos y guiarme en este camino científico que me apasiona.

Al Dr. Ceí Abreu-Goodger por sus comentarios y sugerencias en el desarrollo de este trabajo, que no sólo incrementaron la calidad de mi trabajo, sino que me dieron un buen aprendizaje.

A todos los integrantes del laboratorio de Sistemas Genéticos: Adriana, Erika G., Erika, Edith, Diana, Selene, Liz, Sergio, Jorge, Alex y Abraham por hacer un ambiente agradable de trabajo, tiempo compartido, apoyo en comentarios, sugerencias del trabajo y momentos divertidos. En especial a Alex Juárez por ser un fuerte apoyo en el desarrollo de este trabajo, sin duda recordaré nuestras charlas sobre este proyecto.

Gracias a mis amigos de generación, los queridos integrativos: Joel, Beto, Fibo, Alex, Carol y Felipe. Un placer compartir aventuras con ustedes, mucha diversión e increíbles momentos. Sin duda son pieza fundamental en mi maestría.

Jamás olvidaré agradecer la compañía de Maritere, Liss y Paty. Cada quien en distintas partes y nuevo proyectos, pero unidos por nuestra intensidad.

A toda la familia de Químicos: Alma y Pame, Manuel, Beto, Edu, Sergio, Jair, Irene, Pau y Abraham. Gracias por dejarme ser parte de este equipo y aprender de todos ustedes.

Realizar una maestría no sólo es un proyecto, implicó muchos cambios y aprendizajes como ser humano. En especial a Lily - my partner in crime y Alexis - amiba de mi corazón.

Gracias a todas mis amistades por estar presentes. Gracias a Karen Osorio por los buenos momentos que hasta el momento hemos vivido. Frank gracias por hacerme reír y ser un buen amigo. Cristóbal gracias por acompañarme en el hielo y fuera del hielo. A mis queridas amigas Ale Vieyra, Cynthia y Ale Pérez, gracias por estar conmigo. A mis amigos bachateros y salseros: Anita, Gaby, Jaz, Sergio y Arturo. A todos gracias por su compañía, amistad y cariño.

Gracias a el Yoga por encontrarme y permitirme conocerme. A todos mis maestros y sus maestros, pero especialmente a Julia, Ulises y Christy por sus fuertes enseñanzas.

A Laura Soto y su familia, gracias por hacerme sentir parte de ustedes.

Dos años de maestría fue algo rápido y escribiendo estos agradecimientos me siento afortunado por tener una enorme lista de personas a las que les agradezco su apoyo en este periodo de tiempo. Espero seguir teniendo años bonitos como los que viví en Irapuato.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Anderson M., Gerstein A., Wiggen L., Baller J. & Berman J. (2014). Silencing is noisy: population and cell level noise in telomere-adjacent genes is dependent on telomere position and Sir2. *PLOS Genetics*, 10(7): 1-17.
- Andrulis E., Zappulla D., Ansari A., Perrod S., Laiosa C., Gartenberg M. & Sternglanz R. (2002). Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning. *Molecular Cell Biol.*, 22: 8292-8301.
- Auriche C., Gino E. & Fiorentina A. (2008). Budding yeast with human telomeres: A puzzling structure. *Biochimie*, 90: 108-115.
- Bar-Even Arren, Paulsson J., Maheshri N., Carmi M., O'Shea E., Pilpel Y. & N. Barkai (2006). Noise in protein expression scales with natural protein abundance. *Nature Genetics*, 38: 636-643.
- Boulton S. & Jackson S. (1998). Componentes of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *The EMBO Journal*, 17: 1819-1828.
- Bühler M. & Susan M. (2009). Silent Chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts. *The EMBO Journal*, 28: 2149-2161.
- Chan C. & Tye B. (1983). Organization of DNA sequences and replications origins at yeast telomeres. *Cell*, 33: 563-573.
- Despons L., Wirth B., Leh V., Potier S. & Souciet J. (2006). An evolutionary scenario for one of the largest yeast gene families. *TRENDS in Genetics*, 22(1): 10-15.
- Fuorel G., Revardel E., Koering C. & Gilson E. (1999). Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO Journal.*, 18: 2522 – 2537.
- Gehring W., Klemenz R., Weber U. & Kloter U. (1984). Functional analysis of the white+ gene of *Drosophila* by P-factor-mediated transformation. *EMBO Journal*, 3: 2077-2085.
- Giaever G, *et al.* (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896):387-91.
- Gottschling D., Aparicio O., Billington B., & Zakian V. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, 63: 751-762.
- Govender P., Bester M. & Bauer F. (2010). FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:931-945.

- Grunstein M. (1997). Molecular model for heterochromatin in yeast. *Current opinion in Cell Biology*, 9:383-387.
- Hiraga S., Botsios S. & Donaldson A. (2008). Histone H3 lysine 56 acetylation by Rtt109 is crucial for chromosome positioning. *JCB*, Vol. 183, No. 4 641-651.
- Huang Y. (2002). Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, Vol. 30, No. 7 1465-1482.
- Kilfoil M., Lasko P. & Abouheif E. (2009). Stochastic variation: from single cells to superorganisms. *HFSP Journal*, 3(6): 379-385.
- Kimura A., Umehara T. & Horikoshi M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat. Genet.*, 32: 370-377.
- Koering C.E., Pollice A., Zibella M.P., Bauwens S., Puisieux A., Brunori M., Brun C., Martins L., Sabatier L., Pulitzer J.F., and Gilson E. 2002. Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep.* 3: 1055–1061.
- Kyrion G., Boakye K. & Lustig A. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 5159-5173.
- Kyrion G., Liu K., Liu C., & Lusting A. (1993). RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, 1: 1146-1159.
- Lafontaine I., Fischer G., Talla E. & Dujon B. (2004). Gene relics in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen*, 335: 1-17.
- Li B. (2012). Telomere as an important player in regulation of microbial pathogen virulence, reviews on selected topics of telomere biology, Dr. Bibo Li (Ed.), ISBN: 978-953-51-0849-8, *InTech*, DOI: 10.5772/45908.
- Looke M., Kristjuhan K., & A. Kristjuhan (2011). Extraction of genomic DNA yeast for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50: 325-328.
- Mano Y., Kobayashi T., Nakayama J., Uchida H. & Oki M. (2013). Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations. *PLOS Biology*, 11(7): 1-18.

- Merrick C. & Manoj T. (2006). Heterochromatin-mediated control of virulence gene expression. *Molecular Microbiology*, 62(3): 612-620.
- Mondoux M. & Zakian V. (2006). Telomeres. Chapter 10 Telomere Position Effect: silencing near the end. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 261-315.
- Mukhopadhyay S. & Sengupta A. (2013). The role of multiple marks in epigenetic silencing and the emergence of stable bivalent chromatin state. *PLOS Computational Biology*, 9(7): 1-15.
- Ottavani A., Gilson E. & Frederique M. (2008). Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie*, 90: 93-107.
- Pillus L. & Rine J. (1989). Epigenetic inheritance of transcription states in *S. cerevisiae*. *Cell*, 59: 637-647.
- Pryde F. & Louis E. (1999). Limitations of silencing at native yeast telomeres. *The EMBO Journal*, 18(9): 2538–2550.
- Raser J. & O’Shea E. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*, 309(5743): 2010–2013.
- Richards E. & Elgin S. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell*, 108: 489-500.
- Rossmann M., Luo W., Tsaponina O., Chabes A. & Stillman B. (2011). A common telomeric gene silencing assay is affected by nucleotide metabolism. *Molecular Cell*, 42: 127-136.
- Sandell L., V. Zakian (1992). Telomeric position effect in yeast. *Trends in Cell Biology*, 2: 10-14.
- Sandmeier J., Celic. I., Boeke J. & Jeffrey S. (2001). Telomeric and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae* are dependent on a Nuclear NAD⁺ salvage pathway. *Genetics*, 160: 877-889.
- Smith J., Miller L., Kreisberg R., Vazquez L., Wan Y. & J. Aitchson (2011). Environment-responsive transcription factors bind subtelomeric elements and regulate gene silencing. *Molecular Systems Biology*, 7:1-15.
- Smukalla S., Caldara M., Pochet N., Beauvais A., Guadagini S., Yan C., D. Vences M., Jansen A., Prevost M., Latgé J., Fink G., Foster K. & Verstrepen K. (2008). *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell*, 135: 726-737.

- Takahashi Y., Schulze J., Jackson J. & *et al.* (2011). Dot1 and histone H3K79 methylation in natural telomeric and HM silencing. *Molecular Cell*, 42(1): 118-126.
- Tasuku K., Kuryan B., Nga N., Song C., Xue Y., Carey M. & Grunstein M. (2012). Mechanism for epigenetic variegation of gene expression at yeast telomeric heterochromatin. *Genes and Development*, 26: 2443-2455.
- Tham W. & Virginia Z. (2002). Transcriptional silencing at *Saccharomyces telomeres*: implications for other organisms. *Oncogene*, 21: 512-521.
- Tomaska L. & Nosek J. (2009). Telomere heterogeneity: taking advantage of stochastic events. *FEBS Letters*, 583(7): 1067-1071.
- Venditti S., Di Stefano G. & Ernesto D. (2000). Multiple functions of yeast telomeric heterochromatin. *Food Technol. Biotechnol.*, 38(4): 305-313.
- Zakian V. (1996). Structure, function and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu Rev Genet*, 30: 141-172.
- Zhu X. & Claes G. (2009). Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast. *PLoS One*, 4(7): 1-9.
- Xu E., Zawadzki K. & Broach J. (2006). Single cell observations reveal intermediate transcriptional silencing states. *Molecular Cell*, 23: 210-229.

9. ANEXO

9.1 Oligonucleótidos utilizados para integraciones subtelméricas

Locus	Símbolo genético	Nombre	SECUENCIA
relic380.1	<i>Gene relic</i>	JHV-del1FW	TCTTCTTTCTAAGTGGGATTTTTCTTAATCCTTGGA TTCTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del1RV	CATCATAAAGTAGCTTTCCGGATCACTAGCTCATT ATCTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YBR302c	<i>COS2</i>	JHV-del2FW	TGTAATGGTAAAAAGTAGTCTCGTTTTGGTAATTC GCAGCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del2RV	AAGAGAATGAACTTAAAAATGAGAAGAGTGTAGAT GTATTCGATGAATTCGAGCTCGTT
relic380.3	<i>Gene relic</i>	JHV-del3FW	AACGAAACAAGCCATTGATTCTGCAGCATATTGC GACCAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del3RV	CATGTAGCTTCTAAGTCAAAGAAATGTCTCTATC TTTATTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YDL248w	<i>COS7</i>	JHV-del4FW	ATGTACCCGCATTAAGTTTTGTAATTCGTTATTA CGATTATTGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del4RV	TGAGCTGGTAAGATGAGGATATTGTAGAATAGCA TTTTTGCTCTTATGTCGATGAATTCGAGCTCGTT
relic380.4	<i>Gene relic</i>	JHV-del5FW	GCCTTGTGGAACCAGTTTTTTCTATCGAGAGGAA ATTCTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del5RV	TGTTAAACACTTATACCTAGTAAATATTCTGTGGC AGGGGTTCGATGAATTCGAGCTCGTT
relic380.5	<i>Gene relic</i>	JHV-del6FW	TTTTGTTGAATTACTACCCAATCATTAAATATTGAAG ATGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del6RV	GAATGAGTATTATCAGTAAATGATGAAGATGTATT TACTTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YFL062w	<i>COS4</i>	JHV-del7FW	CGAATAAAAAACCCCTCGAACTGCCATCTCATTAC CGAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del7RV	AAACTACAAAATATATAAATTGAAAAAGTTGTATTT ATCTTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YGR295c	<i>COS6</i>	JHV-del8FW	ATCGGAAATGAAATGGATGCCCTTTTCGAATAGTA AAGTTTCTGTGCCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del8RV	CTACTGATGCGTGGAGCAAGCCACGCCATGTGAT TAACCTTGCTTGTGATGAATTCGAGCTCGTT
YHL043w- YHL042w	<i>Pseudo-gene</i>	JHV-del9FW	GTAAGTCAAAAAAATGTCACCGGGACGATATCA TCACAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del9RV	GCAGAATTATTTTTCAAACCAAAGGCAAACCTCAG TAGTTTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YIR044c- YIR043c	<i>Pseudo-gene</i>	JHV-del10FW	TTAACCCACCTTTTAGGTTGAAAAAACATGTTCA CTTTTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del10RV	TGAATAAAAAACCTCGAACTGCCATCTCACTACC AAATGTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YJR161c	<i>COS5</i>	JHV-del11FW	CGCAAGAGATATAAAAAATTTATAATAAACGTACGT TATGCCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del11RV	CGCATTAAAGTTTTGTAATTCGTTATTACGATTAT CGTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YKL219w	<i>COS9</i>	JHV-del12FW	GATACGCCCGCTTGGCGGCTTTTTCTTTCCGACT ATATAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del12RV	TAAACTACACGATCTATAAATTGAAAAGGCATGCT TGTTCTCGATGAATTCGAGCTCGTT

relic380.12	<i>Gene relic</i>	JHV-del13FW	ATGAAACAAGCCATTGACTCTGCAGCATATTGCG ACCAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del13RV	ATTTTATTTTAAAAATGTTCTCTAGGAAAGGTGTAT TAATTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YML132w	<i>COS3</i>	JHV-del14FW	ATACAGAATCTCAAACAAGCGGGAGAAGTGCTA ATTACCCAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del14RV	ATTTCGATTTTCCCTATAAAGCTCTACCTGGGACTG CATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YNL336w	<i>COS1</i>	JHV-del15FW	GCTGGTGCACCTTAAATGTAAACCAACGTTACC AGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del15RV	AGTAGTCTCGTTTTGGTTATTCGCAGCTGACAAAC TACTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YNR075w	<i>COS10</i>	JHV-del16FW	TTACGTACCTCATAACATTAATGTGAAATACACTAT ATTGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del16RV	CCTTGTAGCTTCTAAGTCAAATAAATGTTTCTATC TTTATCGATGAATTCGAGCTCGTT
relic380.15	<i>Gene relic</i>	JHV-del17FW	TACTCCTTGTAGCTTCTACGTCAAAGAAATGTCT CTATCCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del17RV	TTTTTTGGTATGAAAAGGAAGTATTTTCATGGG TTTAGTCGATGAATTCGAGCTCGTT
relic380.16	<i>Gene relic</i>	JHV-del18FW	GTGGATATGTGAATACTCATGCTGACACTGAAGG ATTATTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del18RV	TAAGAGAACATCAATGAGATTTTTTTGAGAAATTG ATGAATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YAL063C	<i>FLO9</i>	JHV-del19FW	AGAAAAGATACACAGATACGTAAAAAGAACGCGA ATTTTACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del19RV	GCAATTTAAAAAGAACAATTGTACAATAAAAGCCC CAAATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YAR050W	<i>FLO1</i>	JHV-del120FW	TATTTTTAATTCTTGTCCAGTAAACAGAACATCC AAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del20RV	AGAAAAGATACACAGATACGTAAAAAGAACGCGA ATTTTATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YER109C	<i>FLO8</i>	JHV-del21FW	AAGAGTTTTTATTTTTATTATAATACTCAACACGT GACTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del21RV	TTATAGACATAAATAAAGAGGAAACGCATTCCGTG GTAGATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YHR211W	<i>FLO5</i>	JHV-del122FW	CAAATGATTTTCTTTAAATTGATTAGCACCCTAAA AAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del22RV	AGAAAAGATACACAGATACGTAAAAAGAACGCGA ATTTTATCGATGAATTCGAGCTCGTT
YIR019C	<i>FLO11</i>	JHV-del123FW	AACATCGTAATGAAGAAACGAACATGTTGGAATTG TATCACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del23RV	ATATACTTTTGTAGCCTCAAATAATCCATATACGC ACACTTCGATGAATTCGAGCTCGTT
YKR102W	<i>FLO10</i>	JHV-del24FW	TTTGTTTTAGGGTGCTTAATCAAAGAACAACAAT AAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC
		JHV-del24RV	AGACGCAGAAGTATCAATCCAAAGGATATTTCTGC ACCTATCGATGAATTCGAGCTCGTT

9.2 Oligonucleótidos utilizados para comprobación de integración

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
JHV-Diag_Fw1	GGTAATGAGACAAGTTGATA	JHV-Diag_Rv1	ATTCTTACTTGCTTCCAAAA
JHV-Diag_Fw2	CACAAACCATCGTTCAGAAT	JHV-Diag_Rv2	TATTGTTGCCCTTTTCTA
JHV-Diag_Fw3	CGTTTATTGTTCTTCTCTAC	JHV-Diag_Rv3	CAGTTCGTAGTAGCAGTATT
JHV-Diag_Fw4	CTACTAGATGTTTACACA	JHV-Diag_Rv4	ACAATACTGGAAAATCACTC
JHV-Diag_Fw5	GAAATATTAGGTACCAAAAG	JHV-Diag_Rv5	GGTTTTGTGTAATGAAACAT
JHV-Diag_Fw6	GGGACTAGACTTTTTTCACT	JHV-Diag_Rv6	GCCACACTAAATGCATCGCG
JHV-Diag_Fw7	CGAATAGTAGAGTTTCTGTG	JHV-Diag_Rv7	CGTTCAGAATATGCATGGAA
JHV-Diag_Fw8	CGGTAAAGGCTTTCATAAGC	JHV-Diag_Rv8	CCATGTGATAATGAAATTCT
JHV-Diag_Fw9	GCATTGTCCATTTTTGAGCC	JHV-Diag_Rv9	ACGTGTGTTATAAACGTAAAC
JHV-Diag_Fw10	GAATAATTATGGAGCGTGTC	JHV-Diag_Rv10	CCGGAAATGAAATGGATGCC
JHV-Diag_Fw11	GGCAAACGATCCTTCACCTA	JHV-Diag_Rv11	GTGACAGCTACGTCTATTTT
JHV-Diag_Fw12	CCGACTTGCAACTACTAAACG	JHV-Diag_Rv12	CTATTTATTGCAATTTATTC
JHV-Diag_Fw13	GTTTGATACGTTTATTGTTT	JHV-Diag_Rv13	GATGTTCAAAGTATCGTGTA
JHV-Diag_Fw14	CTGTACTCTATAGTCATA	JHV-Diag_Rv14	CCTTCGGATTAAGTGAGGCG
JHV-Diag_Fw15	CGTAGGACAGACTCTTCCTG	JHV-Diag_Rv15	CCTTGCTTGATAAAAAACACC
JHV-Diag_Fw16	CGAAACTGCTCGAAGCTGTT	JHV-Diag_Rv16	CCTTGTAGCTTCTAAGTCAA
JHV-Diag_Fw17	CTCTACACAGAGGGAAATAT	JHV-Diag_Rv17	CATATGTTTTTGGATGACGA
JHV-Diag_Fw18	CCTTGATTATTCATCTCC	JHV-Diag_Rv18	CTTTAAGATTTCCCGAGTA
JHV-Diag_Fw19	CGTTTTCTTTATGATACATA	JHV-Diag_Rv19	GCTAAAAAATTTTTCTCTT
JHV-Diag_Fw20	CGCATACTTACGCTGTAGGA	JHV-Diag_Rv20	CATGGATTTTTGTTGCCTAA
JHV-Diag_Fw21	CACAAAACAAATATCCTAAA	JHV-Diag_Rv21	GGTTTTGAGACCGGTAAGTAT
JHV-Diag_Fw22	GGTCAAATTTTCATGGGAGA	JHV-Diag_Rv22	GGATTTTTGTTGCCTAAGAC
JHV-Diag_Fw23	GTAAAAGATAATTTTTGAAG	JHV-Diag_Rv23	CTGCGCTCTCTTAGTTCA
JHV-Diag_Fw24	CGAATGATTCATGGTTAAC	JHV-Diag_Rv24	CATAGAGAAAACATAGAGAT

9.3 Gráficas del efecto de mutantes knock-out

En estas gráficas se eliminaron los datos pertenecientes a aquellas muestras con niveles de fluorescencia similares al mínimo de detección.

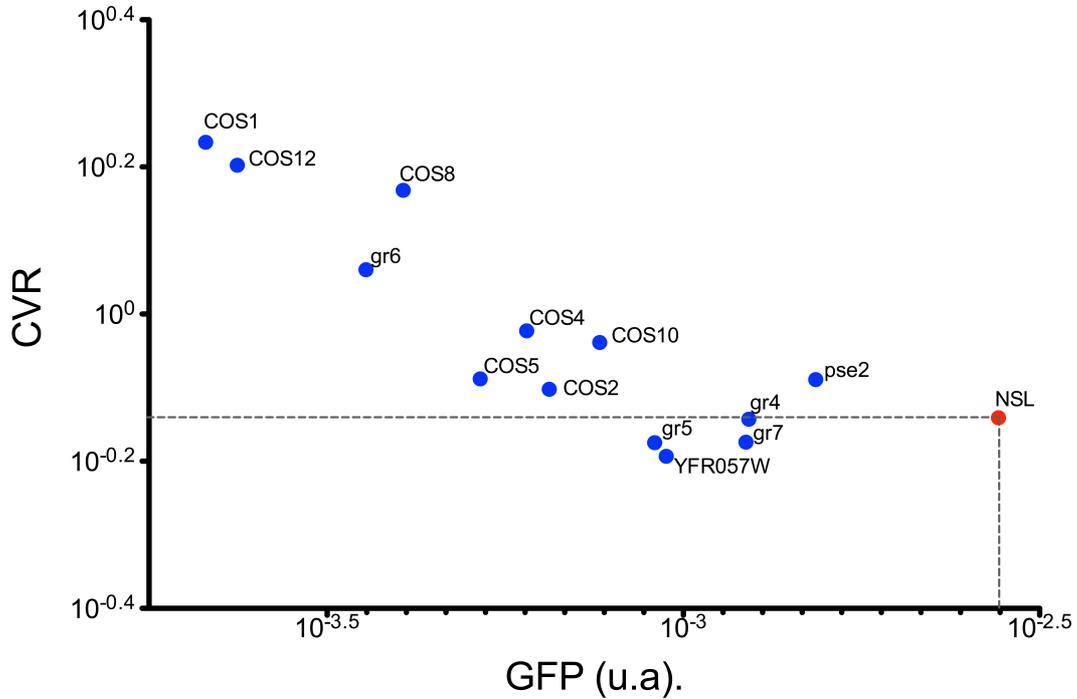
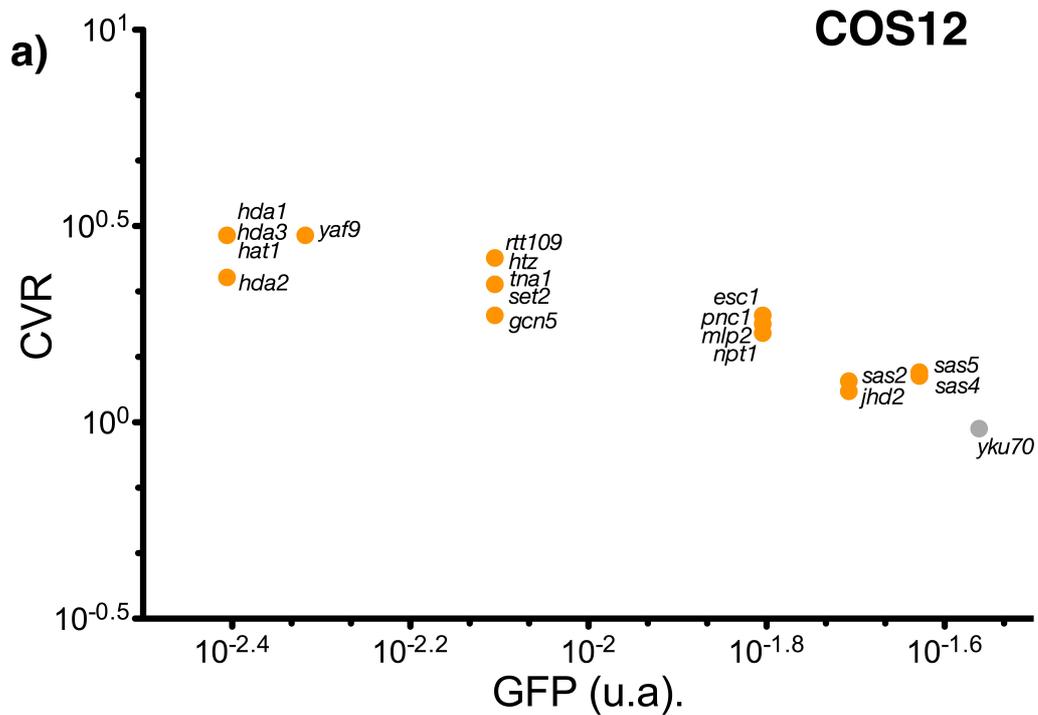


Figura 36. Nivel de fluorescencia versus coeficiente de correlación del gen reportero GFP en las posiciones teloméricas evaluadas en este estudio.



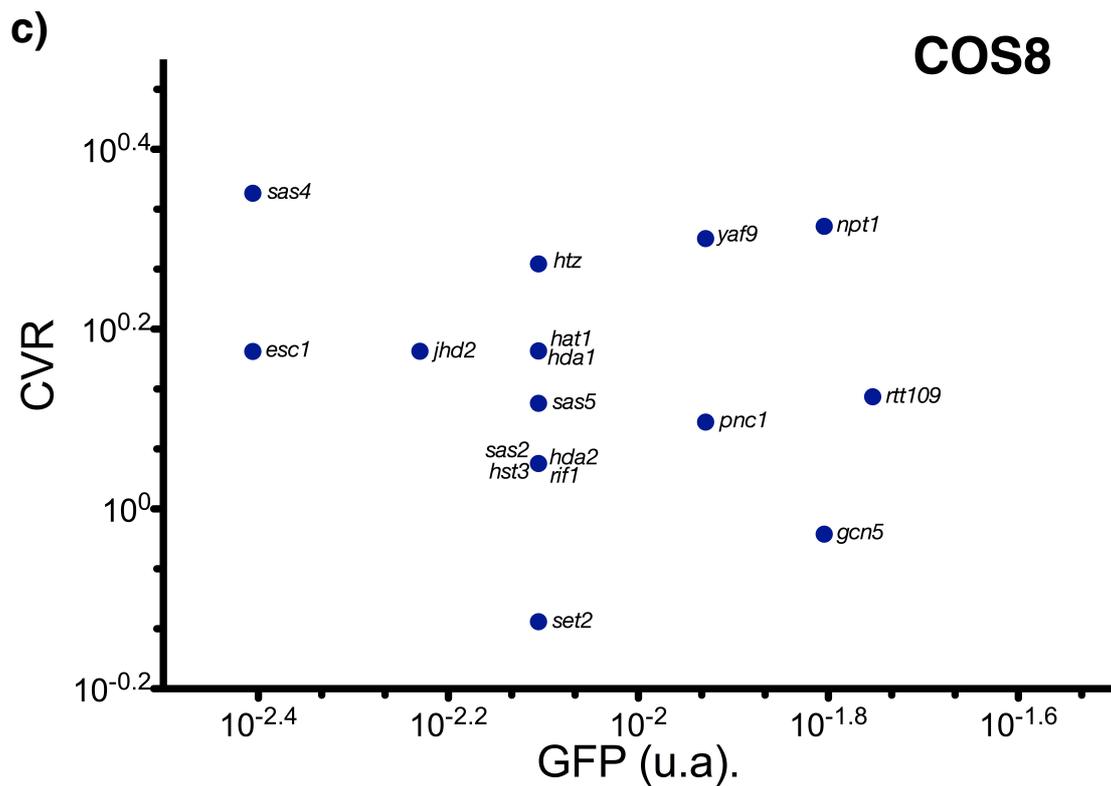
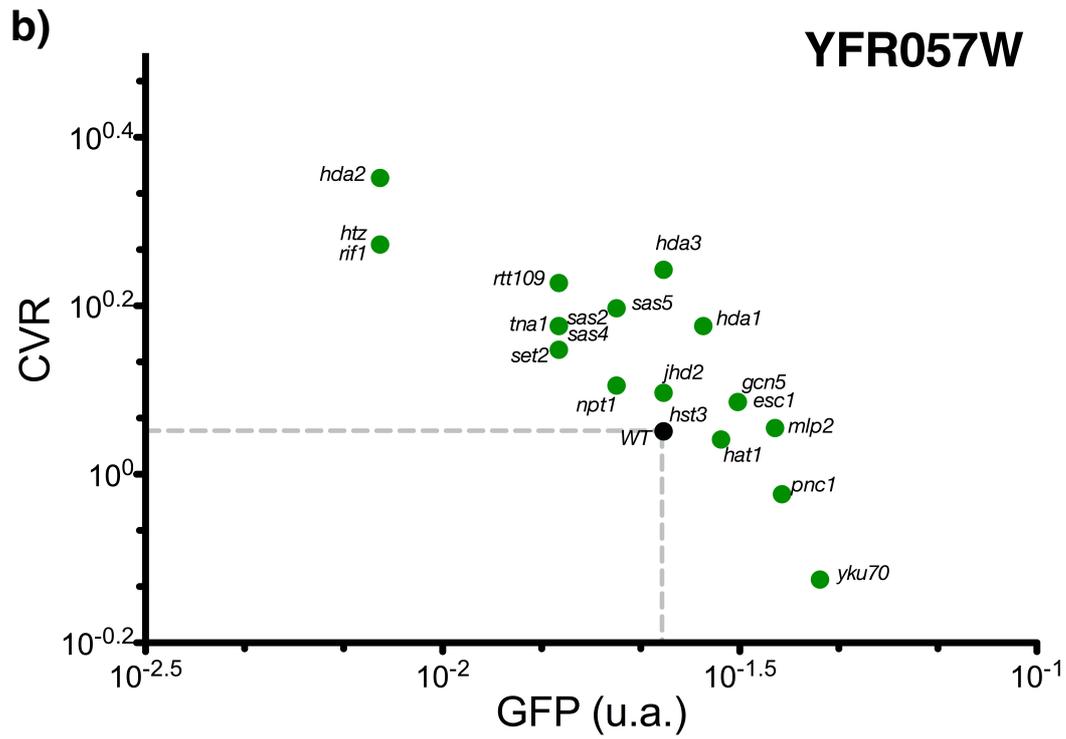
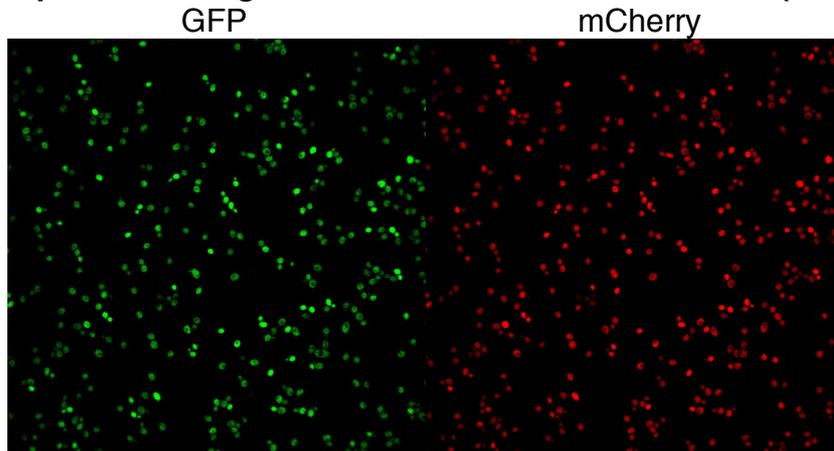


Figura 37. Efecto de las mutantes por delección. Observamos la mediana de la expresión de GFP en escala logarítmica *versus* el logaritmo del coeficiente de variación robusto. a) Integración en locus *COS12*, b) integración en locus *YFR057W*, c) integración en locus *COS8*.

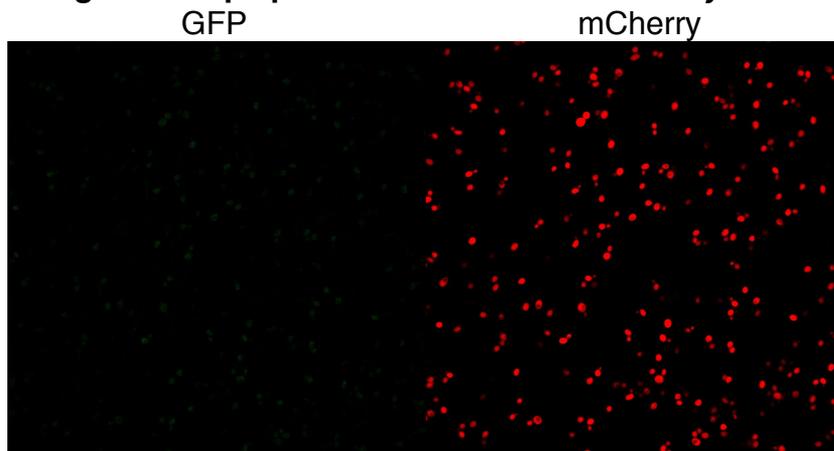
9.5 Fotos de microscopía – Integraciones subtelo méricas

Fotos de microscopía confocal de cada cepa con una integración subtelo mérica diferente. Nota: Las imágenes están ordenadas en orden creciente de expresión de GFP (u.a.).

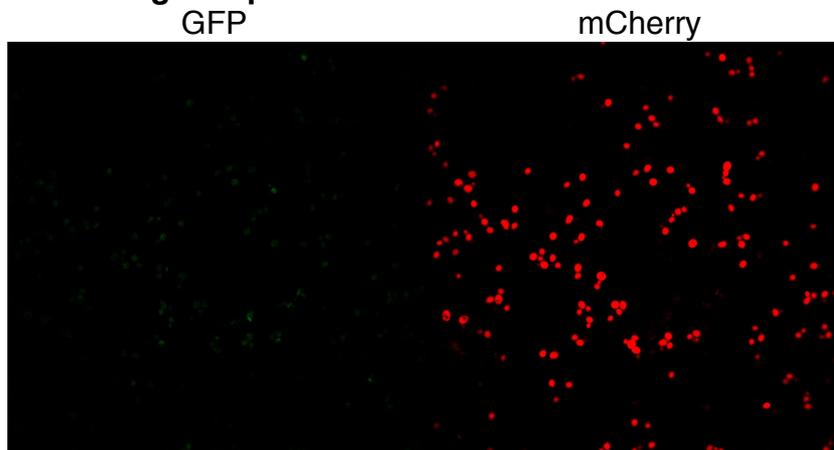
Control positivo: integración en locus no subtelo mérico (CUP9)



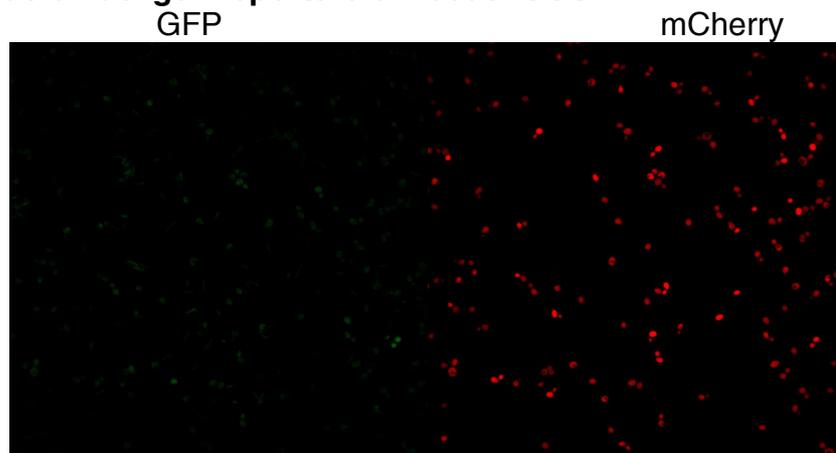
Control negativo: cepa parental Y8205 *hoΔ::mCherry*



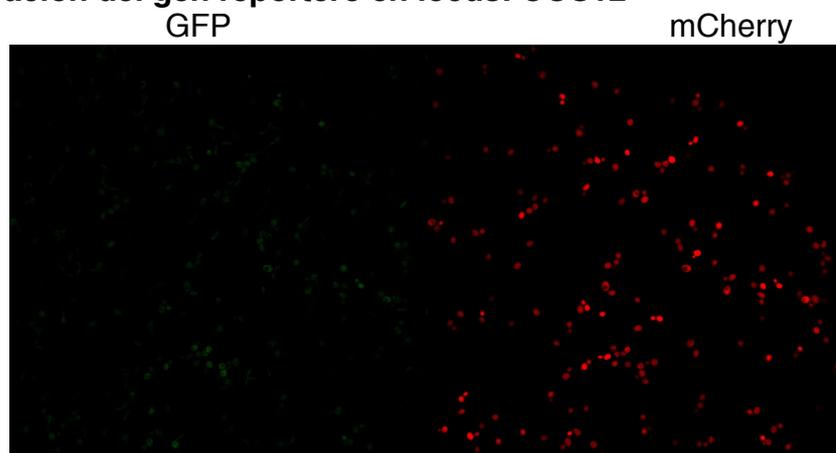
Integración del gen reportero en locus: COS7



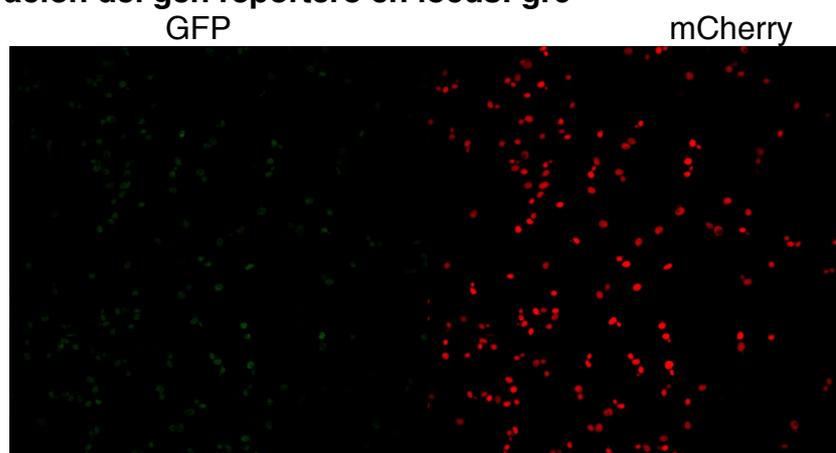
Integración del gen reportero en locus: COS1



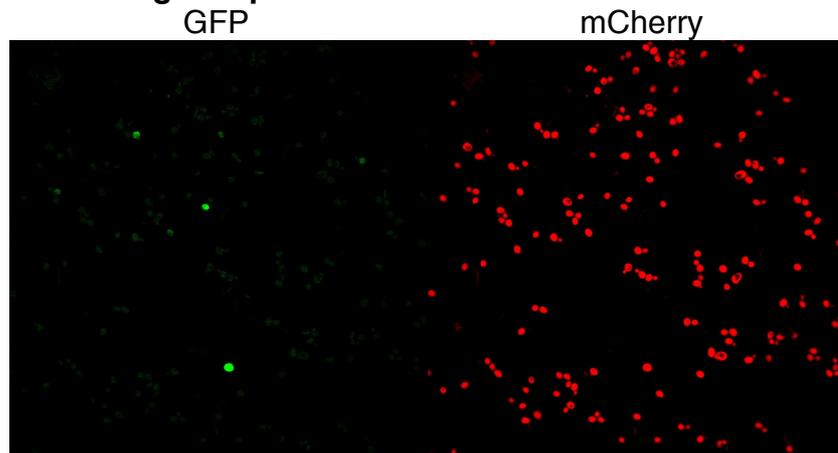
Integración del gen reportero en locus: COS12



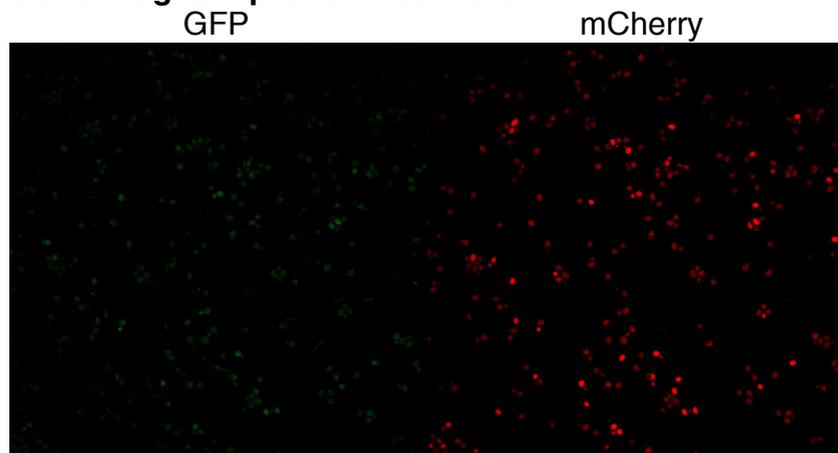
Integración del gen reportero en locus: gr6



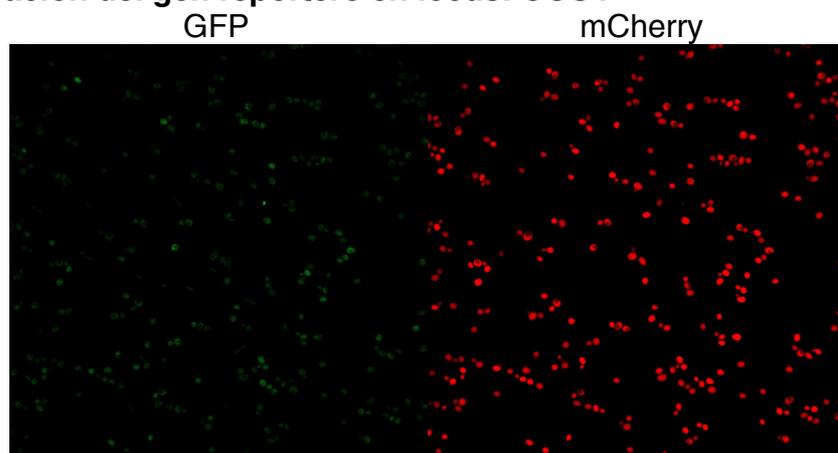
Integración del gen reportero en locus: COS8



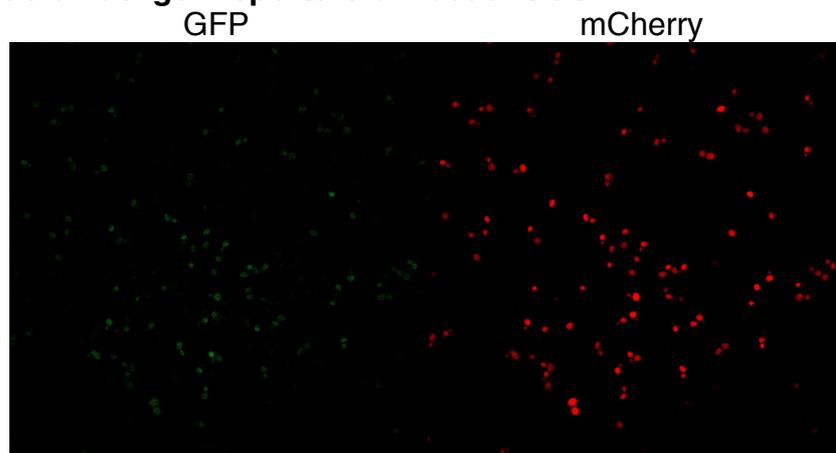
Integración del gen reportero en locus: COS5



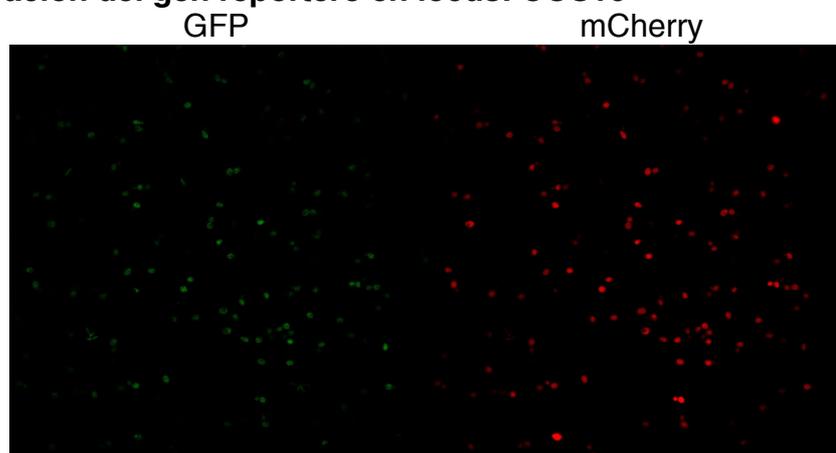
Integración del gen reportero en locus: COS4



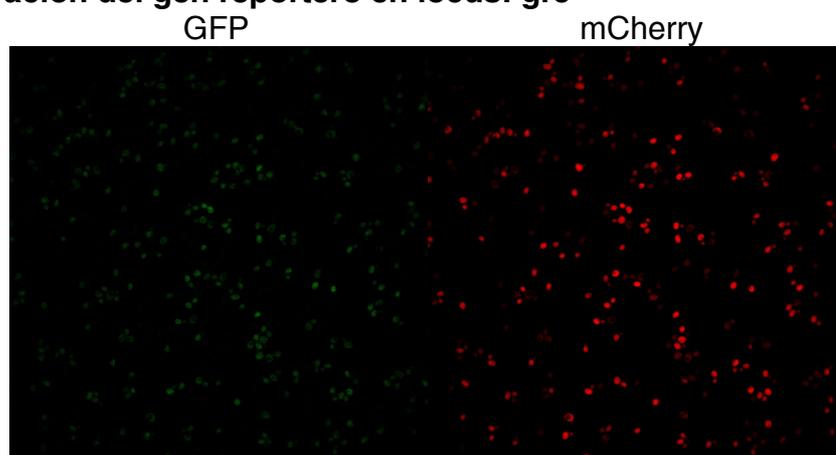
Integración del gen reportero en locus: COS2



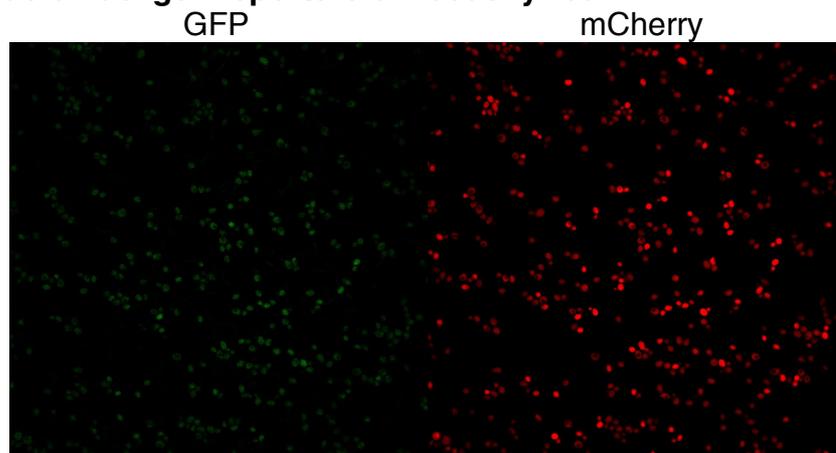
Integración del gen reportero en locus: COS10



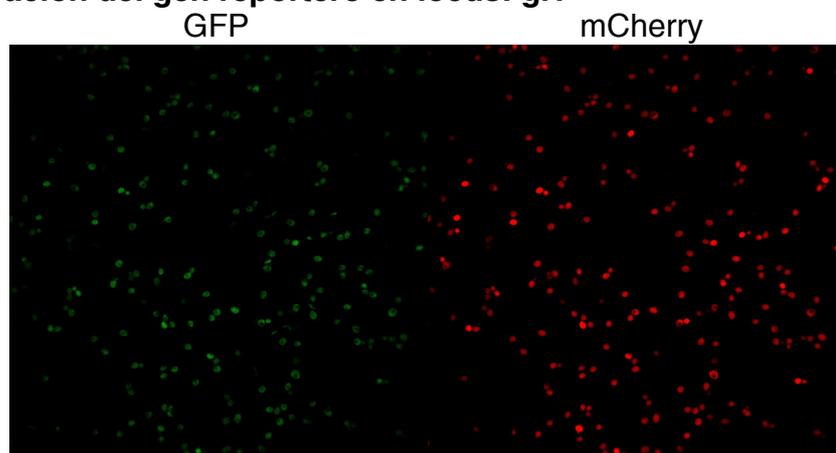
Integración del gen reportero en locus: gr5



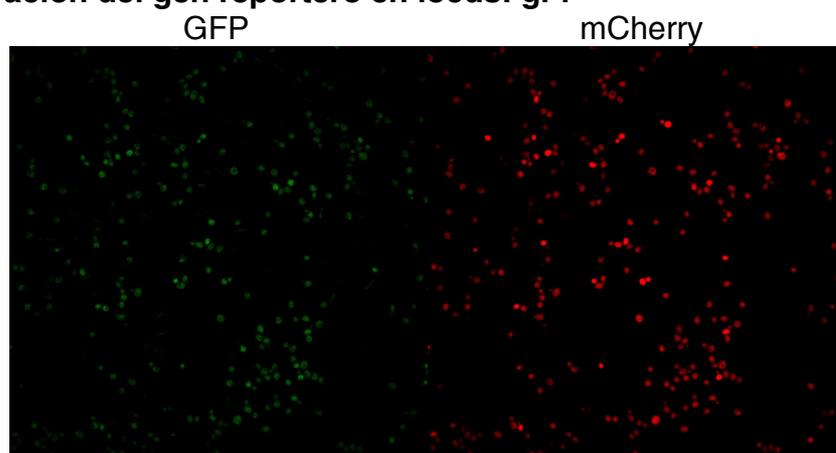
Integración del gen reportero en locus: yfr057w



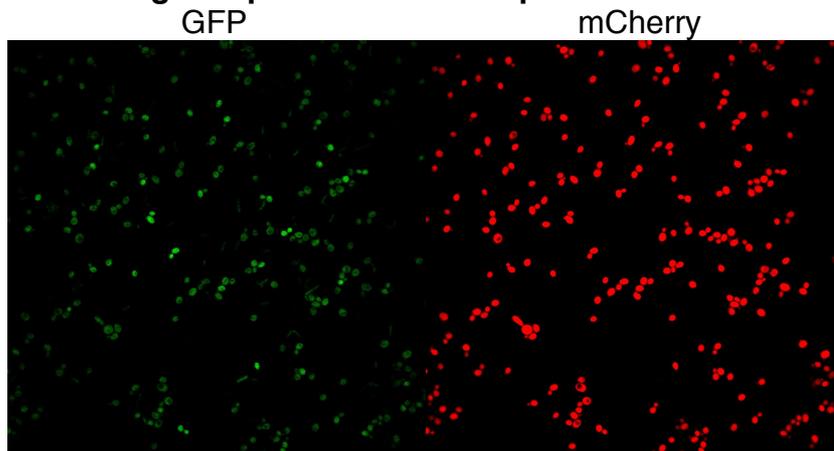
Integración del gen reportero en locus: gr7



Integración del gen reportero en locus: gr4



Integración del gen reportero en locus: *pse2*

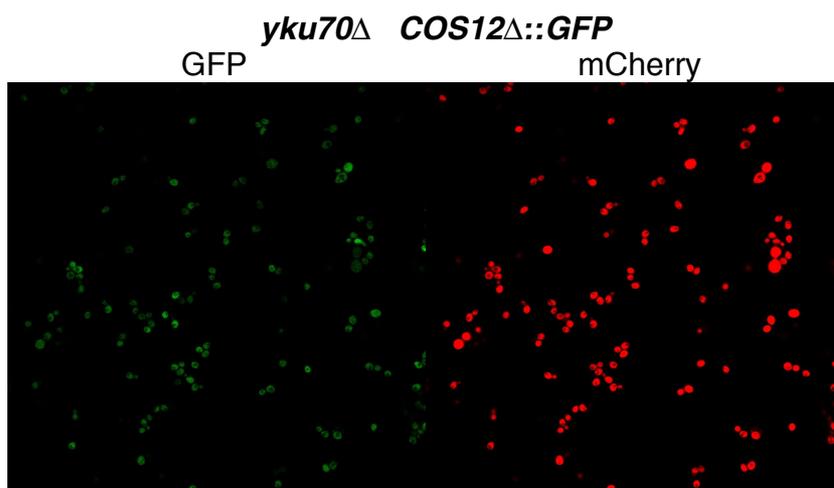


9.6 Fotos de microscopía – Mutantes knock-out

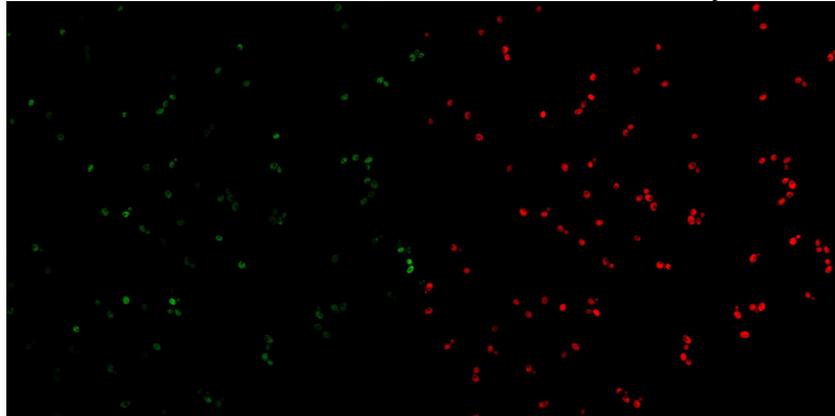
A continuación se muestran algunas de las fotos de microscopía confocal de las cepas con una de las tres integraciones subtelo méricas y al mismo tiempo mutante knock-out para genes seleccionados.

Nota: Las imágenes que se muestran fueron seleccionadas como los casos más representativos para cada locus, como los casos de expresión más baja y más alta.

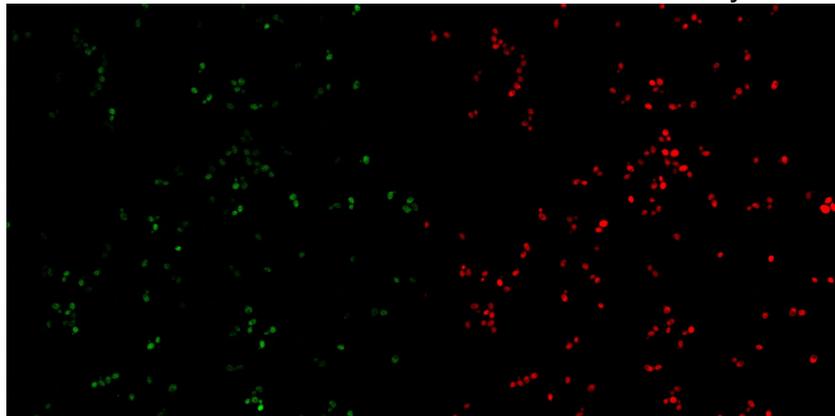
Mutantes para la cepa con integración en el locus *COS12*



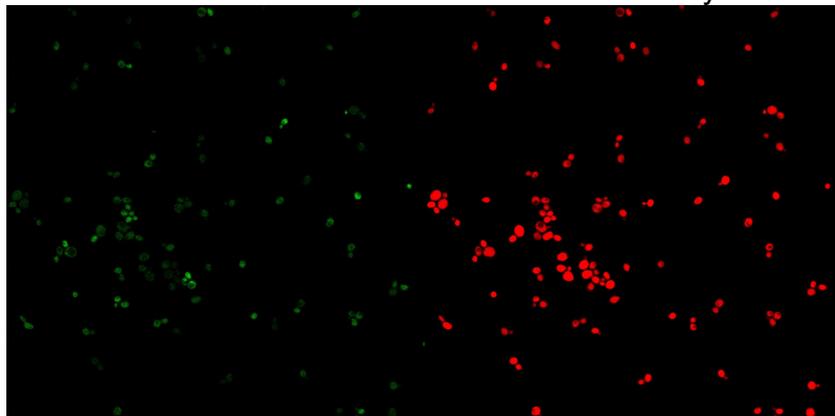
sas4 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



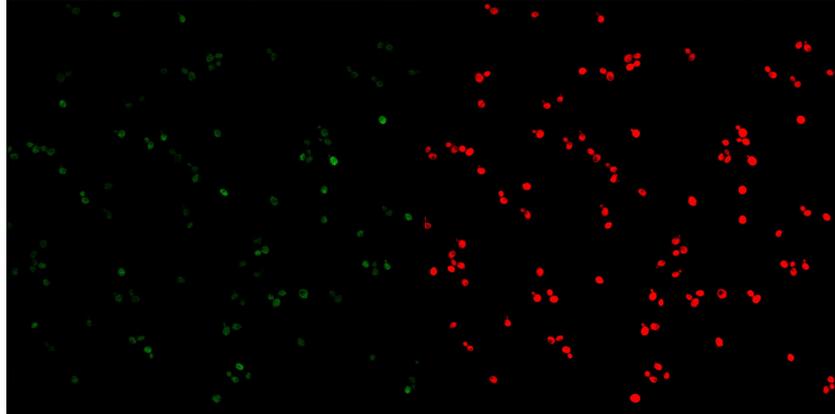
sas5 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



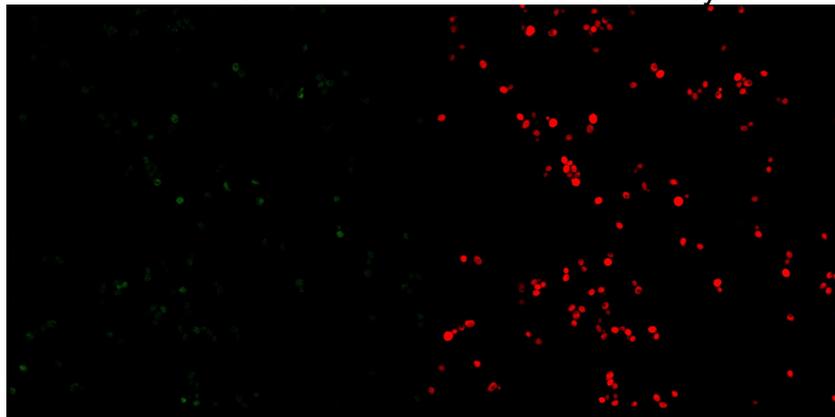
sas2 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



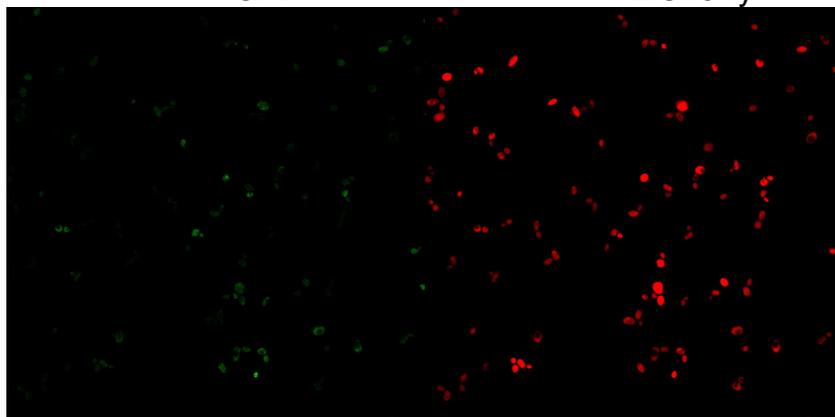
jhd2 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



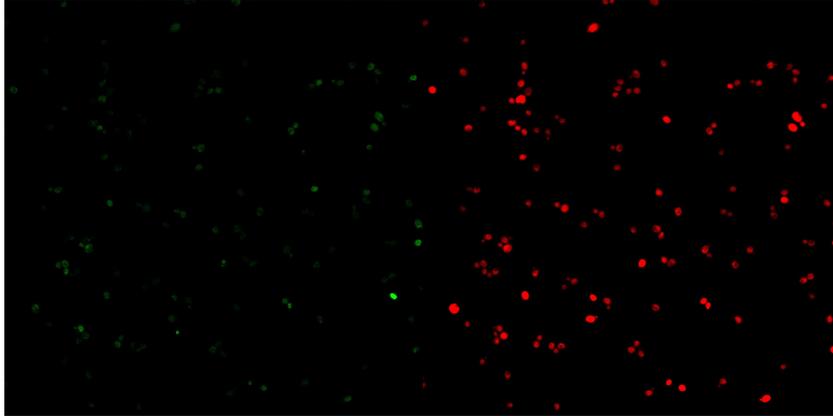
rif1 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



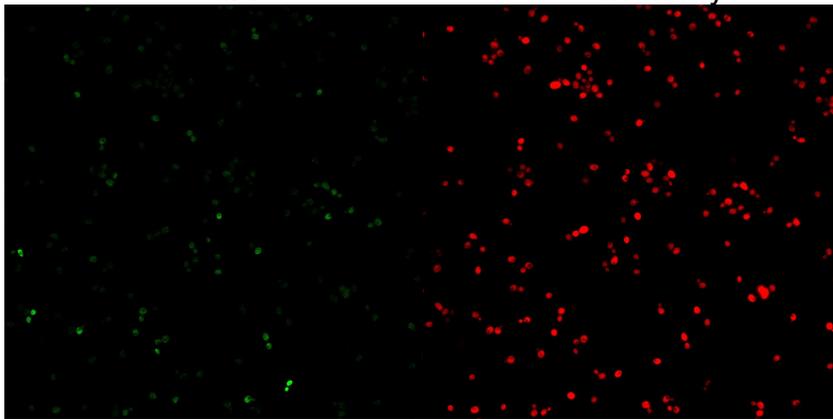
yaf9 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



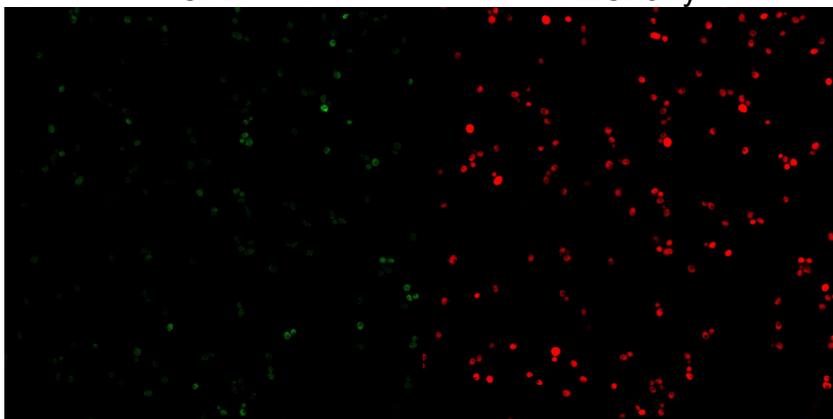
hda3 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry



hda2 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry

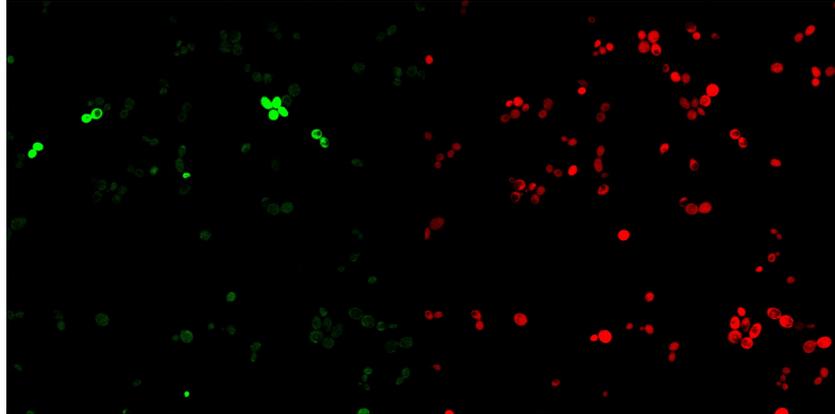


hda1 Δ *COS12* Δ ::GFP
GFP mCherry

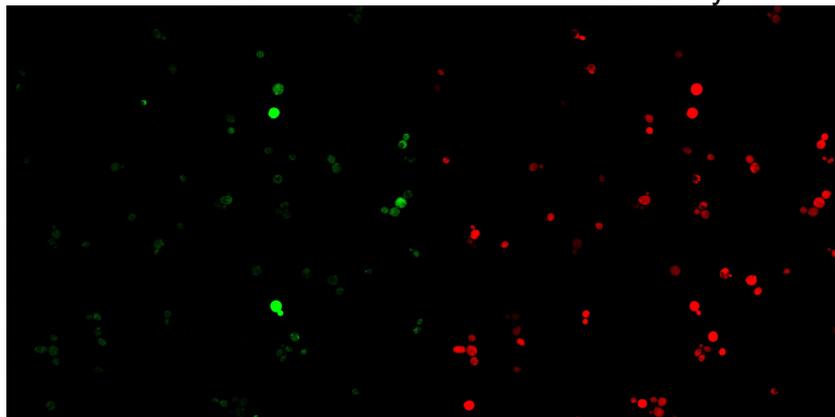


Mutantes para la cepa con integración en el locus COS8

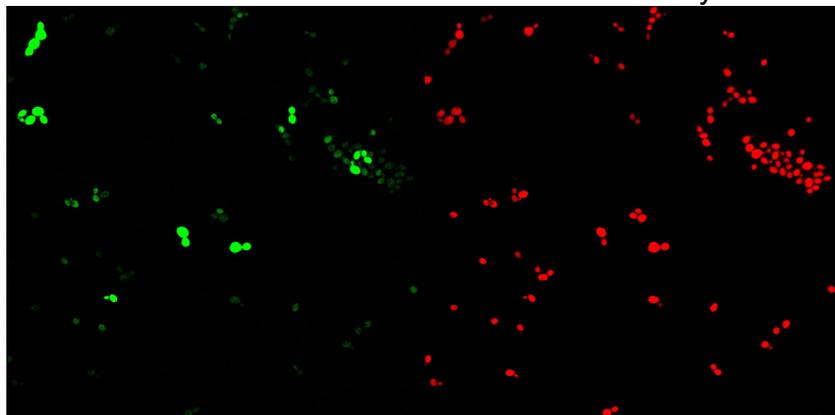
rtt109 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



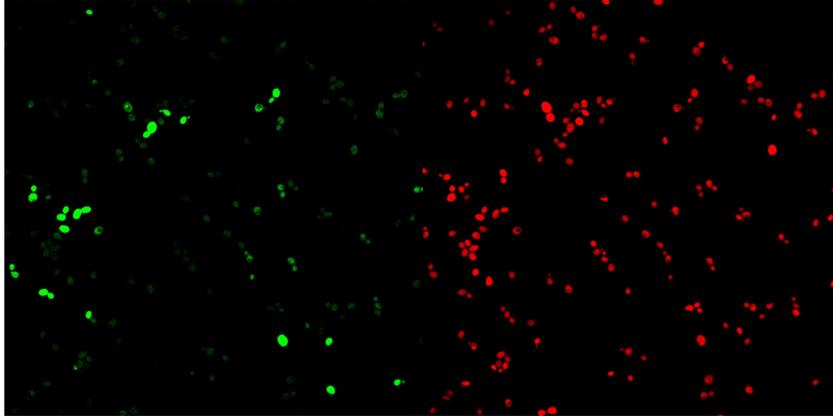
gcn5 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



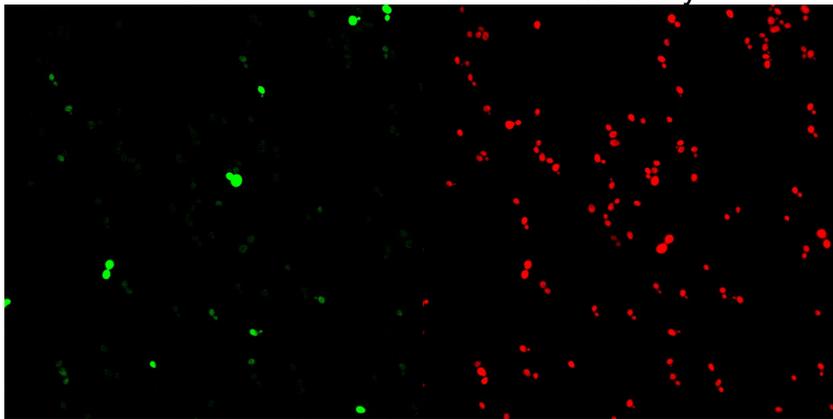
npt1 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



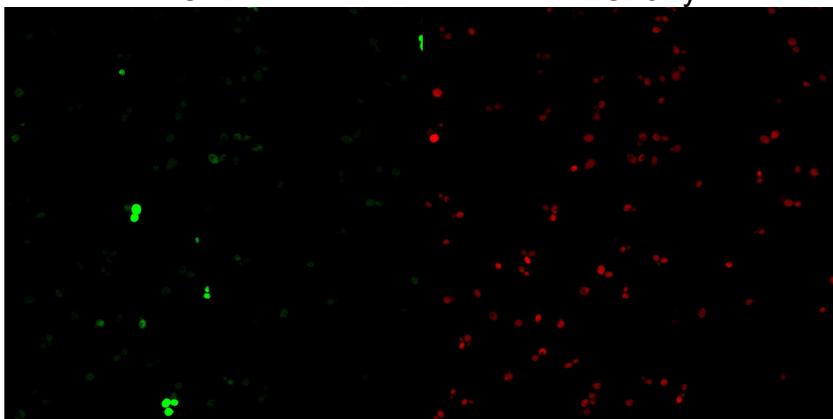
yaf9 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



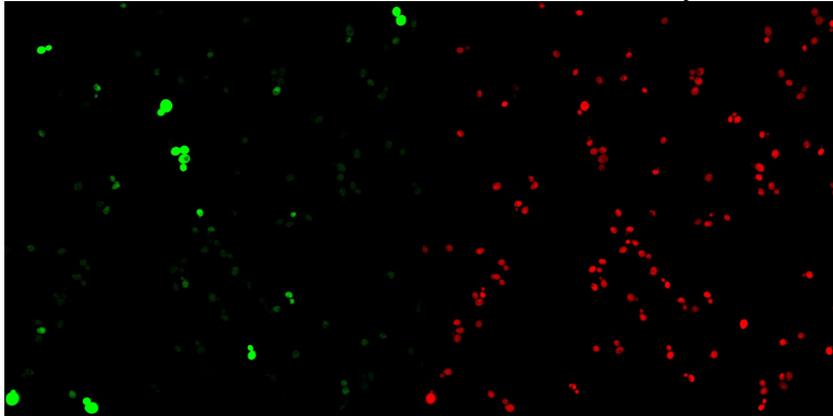
tna1 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



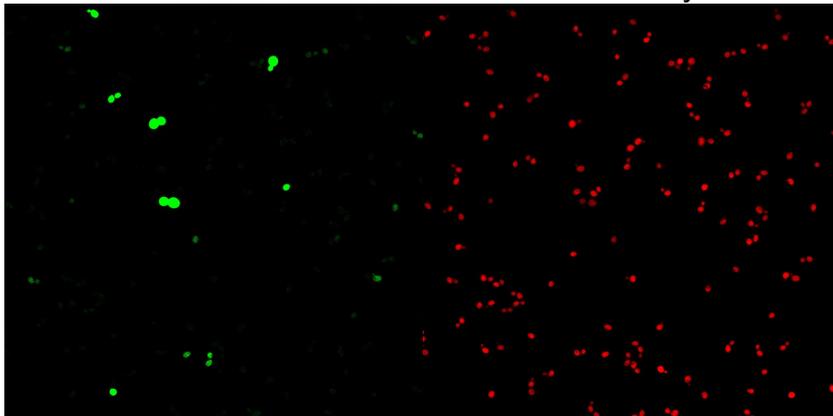
esc1 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



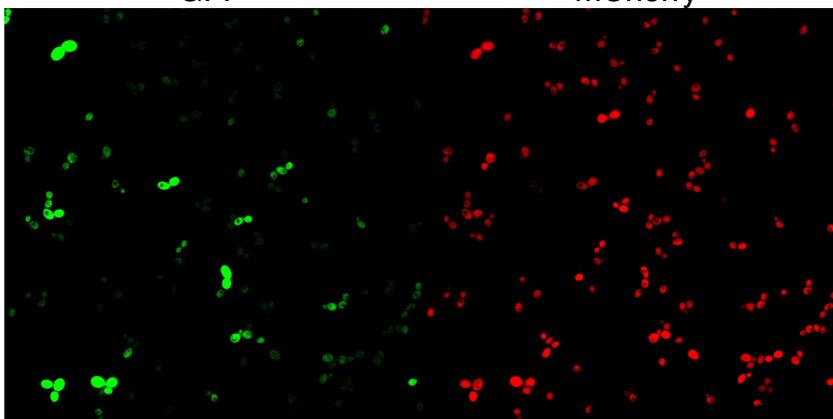
hda3 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry



mlp2 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry

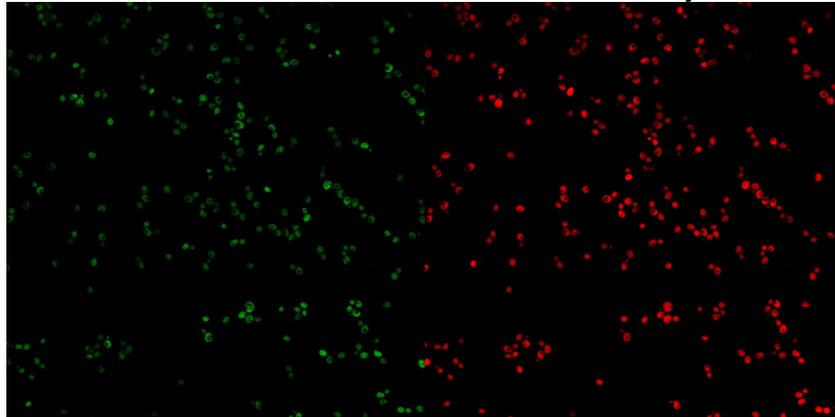


ku70 Δ *COS8* Δ ::GFP
GFP mCherry

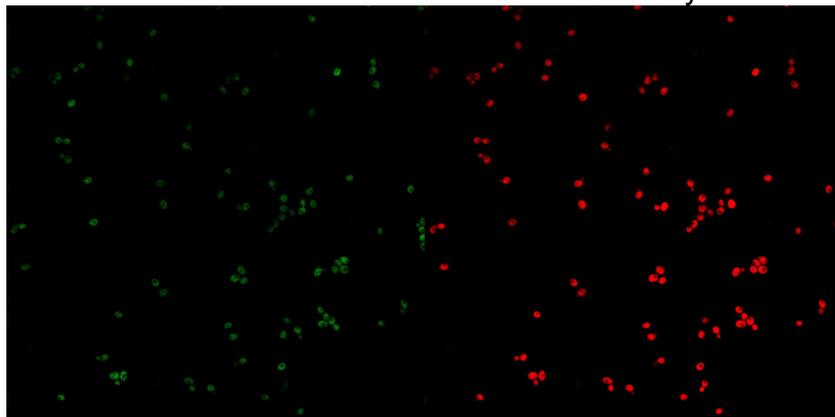


Mutantes para la cepa con integración en el locus *yfr057w*

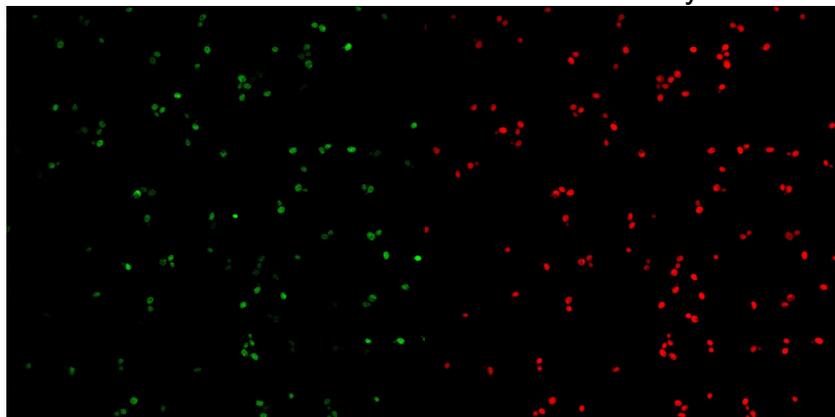
ku70 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



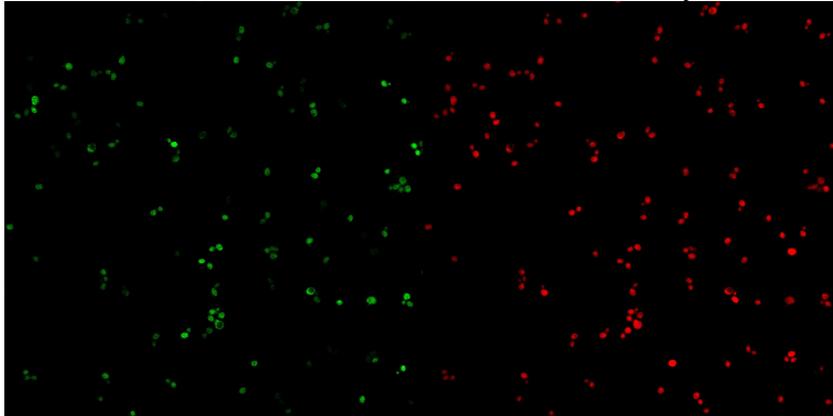
pnc1 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



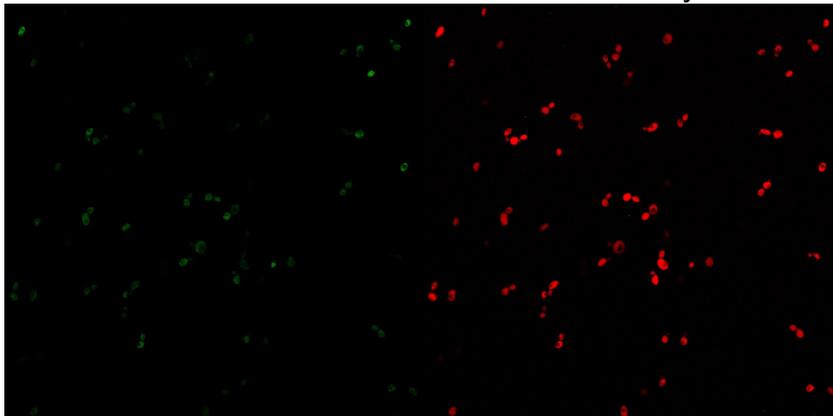
mlp2 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



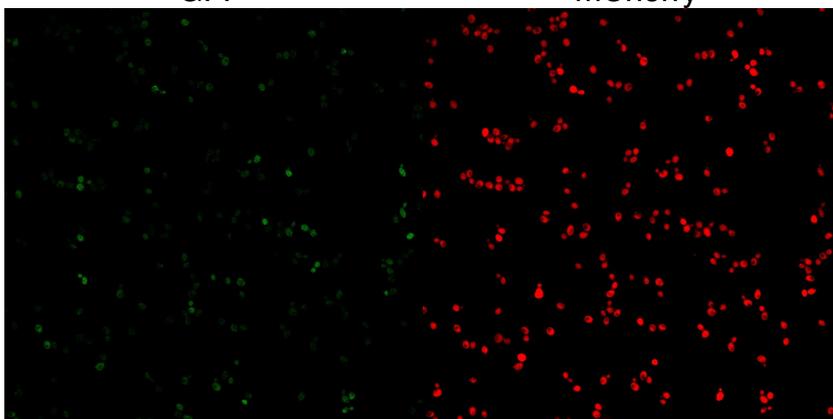
esc1 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



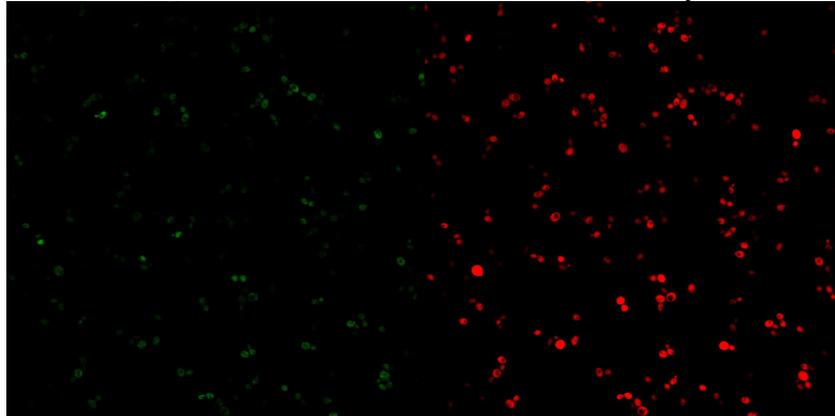
yaf9 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



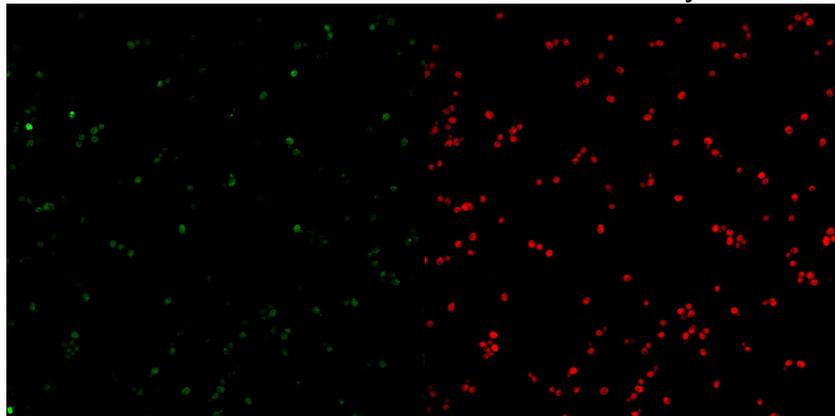
rif1 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



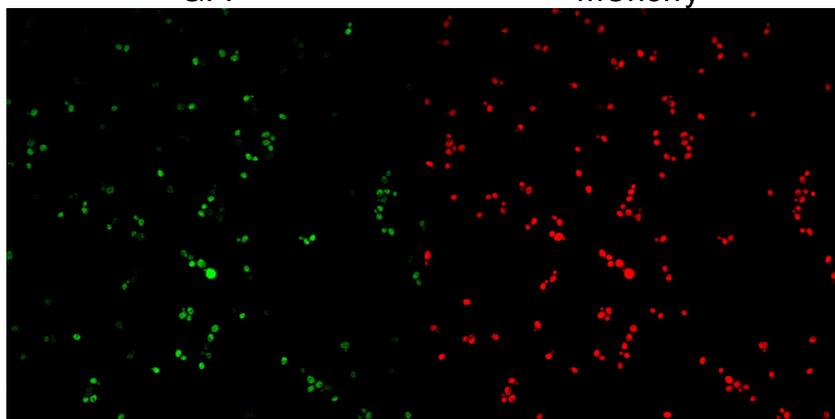
htz Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



hda2 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



hda3 Δ *yfr057w* Δ ::GFP
GFP mCherry



9.7 Información adicional sobre las mutaciones estudiadas

Para entender los resultados del efecto de las mutaciones knock-out en los genes que seleccionamos sobre la expresión en los tres loci que analizamos, a continuación proporcionamos la información de cada producto de los genes relacionados al TPE.

Sir3

- Tiene una preferencia específica por regiones no metiladas en la H3K79 y no acetiladas en H4K16. (Auriche C. et al 2008).
- Se une a elementos X, pero no a elementos Y' (Zhu Xuefeng y Claes G., 2009).
- Con varias señales de estrés como carencia de nutrientes, choque térmico o tratamiento químico, se induce hiperfosforilación de Sir3p y como resultado decrece el TPE en el brazo izquierdo del telómero truncado VII (Ottaviani A., et al. 2008).
- Se sabe que la mutación Sir3 Δ no elimina completamente el silenciamiento. Incluso en el locus HMR en cepas Y55 la mutante Sir3 Δ no desreprime este locus (E. Louis, observaciones personales).

Yku70

- Como un complejo con Yku80 promueve el alargamiento de telómeros por interacción con TLC1.
- Se requiere para localización periférica de algunos telómeros y participa en la reparación del DNA (Boulton y Jackson 1998).

Sas2

- Sas2 (Something About Silencing) es una acetiltransferasa para H4K16, por lo tanto debería aumentar la represión de la transcripción cuando se elimina, sin embargo se observó que la delección de Sas2 en realidad reduce la represión y de forma especial cuando se elimina junto con Sir1 (Ottaviani A., et al 2008).

- Mutantes de delección de Sas2 tienen un incremento en el TPE y Sir3p se propaga de 3 a 15 kb en el brazo derecho del telómero truncado en el cromosoma VI (Kimura et al. 2002).

H2A.Z

- La variante de histonas H2A.Z, codificada por HTZ1, tiene enriquecimiento en las zonas subteloméricas.
- La delección del gen HTZ1 provoca aumento del silenciamiento y propagación de Sir3p (Ottaviani A., et al. 2008).

Set2

- Es una metiltransferasa que metila la lisina 36 de la histona 3.

Jhd2

- Es una desmetilasa de histonas. La delección del gen codificante origina un aumento del silenciamiento subtelomérico, que correlaciona con el hecho de que una característica de la cromatina telomérica es la carencia de metilación de histonas (Auriche C. et al 2008).

Esc1

- Sir4p es reclutada hacia la periferia nuclear a través de la interacción con Esc1, que se localiza entre los poros nucleares. En fase S, el anclaje de yKu también depende de la presencia de Esc1p (Ottaviani., et al 2008; Andrulis et al. 2012).
- La pérdida de yKu y Esc1p elimina las propiedades de anclaje de los telómeros y por lo tanto se altera el TPE. Cuando se altera el TPE se aumenta el silenciamiento en el locus HM.

Npt1

- NPT1 participa en la vía de salvamento de NAD, cataliza la formación de NaMN a partir de Na.
- Mutaciones en este gen debilitan el silenciamiento y reducen el nivel de NAD intracelular.

Pnc1

- Pnc1p participa en la vía de salvamento de NAD, cataliza la formación de Na utilizando como sustrato Nam, éste último es producto de la reacción catalizada por Sir2p.
- Mutaciones en el gen originan un defecto menos severo en el silenciamiento y no reducen significativamente la concentración de NAD intracelular.

Tna1

- El gen codifica para el transportador de ácido nicotínico (Na) a partir del medio de crecimiento hacia el interior celular.
- Su delección causa un ligera desrepresión del silenciamiento telomérico.

Rif1

- RIF1 (RAP1-Interacting Factor) se identificó en un ensayo de doble híbrido como un factor que interactúa con RAP1. Interesantemente, RIF1 y SIR3 interactúan con la misma secuencia carboxilo terminal de RAP1. Por lo tanto, podrían competir por la misma secuencia. Además, RIF1 y las proteínas SIR tienen efectos opuestos sobre el silenciamiento por la formación de heterocromatina y sobre la regulación en la longitud del telómero (Kyrion et al. 1993).
- Aunque telómeros largos con ausencia de RAP1 disminuyen la frecuencia del silenciamiento, telómeros largos con RAP1 sin cambios en una mutante de RIF1 mejoran la frecuencia de silenciamiento comparado con la cepa silvestre (Ottavani A., et al. 2008)

-

Hda1

- De forma extraña, las mutaciones en las desacetilasas de histonas HDA1 y RPD3 que deacetilan H3 y H4, que se esperaba afectarían la extensión del silenciamiento telomérico, en realidad mejoran el silenciamiento por extensión de Sir3p (Huang Y. 2002).

Mlp2

- El efecto de las proteínas Mlp está en disputa porque un grupo reportó que la delección de *mlp1* y *mlp2* provoca una reducción de 100 veces el TPE en el brazo corto del telómero VII (Galy *et al.* 2000). Otros dos grupos encontraron niveles normales de TPE en células con las mismas delecciones al estudiar los telómeros truncados del brazo izquierdo cromosoma VII y el brazo derecho del cromosoma V, resultados que comprobaron en dos cepas de fondo y utilizando dos genes reporteros (Hediger *et al.* 2002).

Yaf9

- Es una proteína de dominio YEATS involucrada en el silenciamiento de genes asociados a telómero, se sabe que afecta a genes localizados en algunos extremos teloméricos (Takahashi Y., 2011).