



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

"Identificación de ncRNAs en *Schizosaccharomyces pombe* expresados
diferencialmente en presencia de glucosa o glicerol/acetato"

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIATURA

PRESENTA

KARLA MARIANA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA

Cuernavaca, Morelos a 11 de agosto del 2022

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi madre Isabel a pesar de las adversidades hicieron lo posible por apoyarme en cumplir con esta meta.

A mi hermana Ana Carolina quien siempre estuvo a mi lado, su motivación, su compañía y su alegría me hace ser mejor.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigas Hannia B. Yari Cortés, y Luz Rebollar por brindar su amistad durante toda la carrera, mi amigo Kevin Domínguez, mis amigas Abigail, Kenya, Itzel y Celia que me han acompañado desde hace más de 10 años de amistad.

A mi profesor de tesis Armando Hernández Mendoza, quién me acompañó y me guió con conocimientos y paciencia en mi formación académica, muchas gracias.

Índice

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	8
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES.....	10
METODOLOGÍA.....	11
RESULTADOS.....	17
DISCUSIONES.....	45
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS.....	61

RESUMEN

Los RNAs no codificantes (ncRNAs) juegan un papel muy importante en los procesos de regulación y tienen una funcionalidad significativa a nivel molecular. Debido a su gran diversidad de tamaños (largos o cortos) y sus diversos mecanismos de biogénesis y expresión, estos elementos genéticos pueden participar en diversos procesos celulares que son esenciales para el correcto funcionamiento de la célula.

La tecnología actual de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) han permitido la identificación de nuevos RNAs pequeños que solamente se ven expresados en ciertas condiciones. En este estudio se usó la técnica de RNA-seq para el análisis de RNAs no codificantes (ncRNAs) aislados del organismo modelo *Schizosaccharomyces pombe*.

Se analizaron los datos de librerías de ncRNAs obtenidos con la tecnología de Illumina Truseq, en dos condiciones de crecimiento (medio YE suplementado con glucosa o medio YE suplementado con una mezcla de Glicerol/acetato) y se alinearon sobre el genoma de *Schizosaccharomyces pombe*.

Posteriormente se determinó la expresión diferencial de los ncRNAs identificados en ambas condiciones. Con estos análisis identificaron posibles sitios de regulación para la expresión de estos ncRNAs en cada condición.

INTRODUCCIÓN

El genoma de todo organismo almacena la información biológica necesaria para que lleve a cabo las funciones características de los seres vivos, pero para ello requiere de la actividad coordinada de enzimas, proteínas estructurales y reguladoras codificadas en su genoma y que se deben expresar para participar en complejas reacciones bioquímicas para poder responder a cualquier eventualidad que se presente en su medio ambiente. El producto inicial de la expresión del genoma de un organismo es la copia o transcrito de los genes individuales en moléculas de RNA. El conjunto de genes que se expresan en RNA en un momento dado ante un estímulo determinado se llama transcriptoma. La traducción de esta colección de moléculas de RNA derivadas de los genes codificadores de proteínas cuya información biológica es requerida por la célula en un momento determinado se conoce como proteoma (Manzoni, Kia. Vandrovcova, et al,2018). Además de los genes que codifican a proteínas, existen genes que se transcriben y cuyo producto es un RNA con diferentes funciones, tal es el caso de los RNA ribosomales (rRNA), RNA de transferencia (tRNA), RNA nuclear pequeño (snRNA), entre otros. Aparte de los mencionados también se han identificado los RNAs no codificantes (ncRNA). Estos transcritos de genes de ncRNA producen moléculas de RNA funcionales en lugar de proteínas (Eddy, 2001). Los ncRNA son frecuentes y prevalecen en todos los reinos, incluyendo archeas, bacterias y eucariontes.

Los avances técnicos en los últimos años, en particular la secuenciación masiva de DNA de siguiente generación (Next Generation DNAseq), ha brindado una oportunidad sin precedentes para identificar la composición de los genomas y al

implementarse la secuenciación de RNA (RNAseq) se han identificado todos los RNAs que se transcriben en las células, incluyendo nuevos RNAs que aún no han sido caracterizados, entre ellos los ncRNAs, lo que permite investigar sus funciones y mecanismos reguladores (Cheng et al.,2014). Generalmente el término de RNAs pequeños (sRNAs) es utilizado para los transcritos bacterianos mientras que el término ncRNA es ampliamente utilizado para los sRNAs eucarióticos. Los sRNAs poseen una extensión variable y por lo general son menores a 200nt en bacterias mientras que en eucariontes generalmente son menores que 30 nt y las tres clases más conocidas son los siRNAs (del inglés small interfering RNAs), los miRNAs (microRNAs) y los piRNAs RNAs (del inglés Piwi dependent small RNA) (Mattick and Makunin 2006; Watanabe and Kanai 2011) y han sido identificados en la mayoría de los organismos modelos empleados en laboratorio y constantemente se siguen caracterizando nuevos ncRNAs. Dentro de estos, se han reportado ncRNAs largos (lncRNAs) que se caracterizan por tener más de 200 nucleótidos de longitud y muestran diversos mecanismos de regulación para responder al estímulo ambiental. En las levaduras, se ha observado la producción de múltiples lncRNAs que tienen un proceso de degradación rápido, pero que regulan la expresión génica meiótica en *Schizosaccharomyces pombe*, o tienen mecanismo de silenciamiento mediados para la entrada de diferenciación sexual en *Saccharomyces cerevisiae*, además de que juegan un papel importante en la modificación de la cromatina (A. Yamashita, et al., 2015). Aunque se ha asignado una función a muchos loci no codificantes individuales, la mayoría no están caracterizados (Leong et al., 2014). Por ejemplo, los estudios de ncRNA individuales han revelado que son una clase de moléculas bioquímicamente versátiles que participan en una diversidad de procesos (Geisler & Coller, 2013) demostrando un papel biológico significativo al estar implicados en la identidad fenotípica celular más allá de lo que se había concebido en el dogma central de la biología molecular, ya que se ha observado que son un factor determinante tanto a nivel genómico como en la transcripción (Veneziano et al.,2016).

Dentro del reino eucarionte, algunos de los organismos modelos mejor caracterizados y estudiados son las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* en donde se han identificado una amplia gama de redes reguladoras transcripcionales entrelazadas y los factores de transcripción que las controlan (Botstein & Fink, 2011). Estas levaduras han sido un sistema modelo para conocer los mecanismos de la homeostasis celular en condiciones de estrés.

Dentro de estos factores de transcripción se han identificado Zap 1, en la levadura *S. cerevisiae*, que juega un papel clave en la respuesta bajo en zinc, al controlar la expresión de los genes necesarios para la adquisición de zinc (ZRT1, ZRT2 y FET4) y la liberación de zinc de las reservas intracelulares (ZRT3), cuando hay zinc, ZAP 1 induce la expresión del gen uniéndose a los elementos sensibles al zinc (ZRE) que se encuentra dentro de los promotores de estos genes, por el contrario cuando los niveles de zinc son bajos, Zap 1 se une río arriba donde se encuentra el activador Rap 1 e induce la transcripción de los RNAs no codificantes intergénicos ZRR1 y ZRR2 (Eide; 2009) que se conducen al desplazamiento transitorio de Rap 1 del promotor reprimiendo los genes ADH1 y ADH3, estos genes codifican la alcohol deshidrogenasa 1 y 3 dependiente de zinc que se utiliza durante la fermentación (Bird, Gordon, Eide, et al; 2006).

En el caso de la levadura *S. pombe* se han identificado el factor transcripcional Loz 1, el cual en condiciones de alto zinc se une a la secuencia promotora del transportador Zrt1 para reprimir la expresión del gen, en cambio cuando hay deficiencia de zinc no es capaz de unirse al sitio específico y por lo tanto se expresa el gen transportador Zrt1 (Wilson, Liu, Cardona-Soto; 2019).

ANTECEDENTES

Desde hace una década se han identificado miles de ncRNA transcritos de forma generalizada en humanos, ratones y otras especies, lo que indica que estos ncRNA también muestran una clara conservación evolutiva (Qu & Adelson, 2012). En el caso de la levadura *S. pombe* se ha identificado una amplia gama de ncRNAs con asociaciones a múltiples vías y se ha comprobado que la eliminación de estos locus reduce los niveles de *aff1* un gen que también está presente en humanos, que codifica para un factor de transcripción río debajo de la ruta de proteína quinasa activada por mitógenos que es activada por estrés (MAPK), lo que indica que estos ncRNAs regulan respuestas de estrés específicas (Leong, H., Dawson, K., Wirth, C. et al, 2014). Estudios recientes sometieron a la levadura *S. pombe* a dos condiciones diferentes: condiciones fisiológicas y condiciones genéticas. Se analizaron en nueve condiciones fisiológicas para muestrear estados celulares clave, dos puntos de tiempo de la fase estacionaria después del agotamiento de la glucosa (100% y 50 % de viabilidad celular); dos puntos de tiempo de quiescencia / envejecimiento celular (días 1 y 7 después de la eliminación del nitrógeno); y cinco puntos de tiempo de diferenciación meiótica (0 a 8 hrs después de desencadenar la meiosis), en base a este estudio se identificaron más de 5,775 nuevos lncRNAs en la levadura *S. pombe* sumando a los 1500 lncRNAs previamente anotados en la base de datos PomBase (<https://www.pombase.org/>) con lo cual se tienen actualmente más de 7000 lncRNAs registrados. Posteriormente estos nuevos lncRNAs los clasificaron por su vía dominante de biogénesis de acuerdo a las condiciones genéticas que se encontraba, analizaron mutantes que afectan a las proteínas de vías clave de procesamiento y degradación del RNA: La proteína mutante Rrp6 es una exonucleasa 3'-5' del exosoma de ARN nuclear, Dcr1 (Dicer similar a RNAasa II de la vía de los RNAs de interferencia, y la mutante Exo2, una exonucleasa 5' citoplasmática (ortóloga de Xrn1) de manera análoga los lncRNA inestables

dirigidos por las mutantes Rrp6, Dcr1 y Exo 2 se clasificaron en transcripciones cripticas inestables (CUT) relacionados con los lncRNAs bidireccionales y traducidos de forma activa, transcritos inestables sensibles a Dicer (DUT) y transcripciones inestables sensibles a la proteína 5'-3' exoribunocleasa 1, Xrn1 (XUT), los dos últimos están presentes en los lncRNAs antisentido, también se encontraron RNAs intergénicos, pero no pertenecían a ninguna de estas clasificaciones (Atkinson et al., 2018).

Hay una gran cantidad de regiones no codificantes intercaladas entre las regiones codificantes, dado que los lncRNA se localizan y se transcriben desde diferentes ubicaciones genómicas, los transcritos desde regiones intergénicas se denominan lncRNAs intergénicos. Los lncRNAs antisentido se transcriben a partir de la hebra antisentido de los genes que codifican proteínas (Ma, Bajic, Zhang; 2013). La transcripción bidireccional de lncRNA comienza cerca de un gen codificante (a menos de 1kb del sitio de inicio de la transcripción) y continúa en la dirección opuesta a la transcripción del gen codificante (Latgé, Poulet, Bours, Josse, Jerusalem; 2018). Se sugiere que los lncRNA intergénicos y los lncRNA intrónicos probablemente estén regulados a través de diferentes mecanismos de activación de la transcripción y pueden tener diferentes modificaciones poli(A) y actividades manifiestas en diferentes ubicaciones celulares (Ma, Bajic, Zhang, 2013). La transcripción bidireccional ha sido propuesta para impulsar el origen de nuevos genes (Wu y Sharp 2013). Los ARN antisentido desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica en múltiples niveles, como la replicación, la transcripción y la traducción (Xu, Zhang, Zhang; 2018).

Previamente en nuestro laboratorio, usando RNAseq en librerías de RNA con extremos pareados (Pair End) se llevó a cabo una comparación de los RNAs totales expresados en dos organismos modelo, la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y la bacteria *E. coli* las cuales pertenecen a dos reinos diferentes, pero responde a la misma fuente de carbono. Estos organismos fueron crecidos en dos diferentes condiciones metabólicas, en Glucosa y Glicerol/acetato, y se reportó que se conserva 718 proteínas ortólogas y 262

ortólogas, también encontraron 343 grupos de genes en común, teniendo una clara conservación en su linaje, y con esta metodología se encontró que, en el caso de los ncRNAs, estos responden al estrés celular (Vichi et al., 2021).

Durante el desarrollo del proyecto experimental anteriormente descrito, también se cultivó a *S. pombe* en glucosa o en Glicerol/acetato (con dos réplicas) y se aisló el RNA total, para después hacer una selección de RNAs, los cuales se purificaron, y se llevó a cabo la síntesis de cDNA generando pequeños fragmentos con un tamaño menor a 50 pb para secuenciarlos con el kit TruSeq RNA sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), con secuenciación de un solo extremo (Single End). Estas librerías no han sido analizadas a profundidad y representan una oportunidad para poder identificar qué ncRNAs responden en forma diferencial a ambas fuentes de carbono, incluyendo los que ya han sido previamente reportados, o incluso detectar nuevos candidatos.

HIPÓTESIS

El genoma de *Schizosaccharomyces pombe* presenta genes de ncRNA anotados como otros que no han sido reportados que estarían involucrados en la regulación de genes que permite la utilización de diferentes fuentes de carbono.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar en librerías de RNA-seq de sRNAs los ncRNAs pequeños expresados diferencialmente en la levadura modelo *Schizosaccharomyces pombe* crecida en glucosa o glicerol/acetato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar y clasificar elementos de tipo ncRNAs en datos de librerías de RNA-seq basados en pequeños RNAs.
- Determinar la expresión diferencial de los ncRNAs en presencia de glucosa y glicerol/acetato.
- Buscar si existen motivos de regulación en las regiones río arriba de los ncRNAs expresados en ambas condiciones.

METODOLOGÍA

Identificación de los ncRNAs

Cómo archivos de entrada para el programa ShortStack se utilizaron las librerías de secuenciación en formato fastq obtenidas en lo reportado por Joivier y colaboradores en 2021. La última versión del genoma de la levadura de *S. pombe* reportado en NCBI en formato fasta (GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fa) y los ncRNAs reportados en la página pombase www.pombase.org y del artículo de Atkinson en formato *txt (Atkinson et al., 2018) con su ubicación genómica.

Para determinar la calidad de las secuencias, se analizaron los archivos fastq en el programa FastQC, y una vez identificado el porcentaje de secuencias de baja calidad y/o duplicadas, se utilizó el programa Cutadapt v3.4 para quitar los adaptadores de illumina y eliminar las secuencias de baja calidad.

Una vez obtenidas los archivos fastq filtrados las secuencias se alinearon posteriormente con el programa ShortStack v3.8.5 con sus softwares dependientes adicionales (RNA-fold, RNAeval, y Bowtie de Vienna RNA package y samtools). El programa ShortStack al tener incluido el software adicional Bowtie permite llevar a cabo el mapeo los RNAs pequeños en el genoma de levadura *S.*

pombe, generando tablas de conteo, los clúster de regiones expresadas. Estos archivos se cambiaron a formato *.bam binario a partir de un archivo *.sam.

Para poder identificar y cuantificar las lecturas de los ncRNAs ya identificados previamente, se elaboró un archivo con las coordenadas del genoma de ncRNAs identificados en la página oficial www.pombase.org y los del artículo de Atkinson et al (Atkinson et al., 2018), este archivo en formato *.txt y el genoma de la levadura en formato *.fa, fueron usados en el programa ShortStack, y se corrió el programa con la opción locifile generando un archivo con las regiones marcadas (abanderadas o Flag).

Un ejemplo representativo de las líneas de comandos del programa ShortStack que se ejecutaron para mapear las lecturas de RNAs de *S. pombe* ya identificados es:

```
ciencias@ciencias-desktop:~/Documentos/Karla/sequence$ ShortStack -  
outdir 17_Glu_Atk -readfile Joivier17_R1.trim2.fastq.gz --locifile  
Atkinson_report_ncRNAs.txt -genomefile  
GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fasta
```

```
ciencias@ciencias-desktop:~/Documentos/Karla/sequence$ ShortStack -  
outdir 17_Glu -readfile Joivier17_R1.trim2.fastq.gz -genome  
GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fasta
```

En donde los parámetros de entrada son los siguientes:

-outdir > Abrir un nuevo directorio

-readfile> Leer archivo

--locifile> Búsqueda del archivo

-genome ó genomefile> Archivo del Genoma

Nótese que solo cambia el uso de la opción -- locifile lo que permite generar dos tablas diferentes a partir de los mismos elementos de mapeo.

Expresión diferencial de Genes:

Se utilizó IDEAMEX Integrated Differential Expression Analysis MultiEXperiment (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>), un servidor web para realizar análisis de expresión diferencial de RNA-seq. En este programa se cargó el archivo con las tablas de conteo de los ncRNAs y sus réplicas. Este programa cuenta con cuatro paquetes de R Bioconductor: NOISeq, DESeq, Limma y EdgeR que genera el análisis estadístico respectivo para cada programa cómo archivos de salida. Dado que no hubo diferencias significativas entre los métodos, decidimos usar el análisis de la expresión de ncRNAs con el método estadístico edgeR (RNAseq) y se seleccionaron los ncRNAs diferencialmente expresados (DE) con un valor de veces de cambio (Fold Change) en log base 2 (\log_2FC) > 1.0 y con un ajuste de p-value < 0.05, el cual al comparar las dos condiciones de crecimiento para la levadura se obtuvo un estimado de dispersión, para una comparación visual y se generó un gráfico de volcano así como una tabla de resultados mostrando los valores expresados de cada uno de estos ncRNAs.

Esta tabla registró los nombres de los ncRNAs pequeños, la clase a la cuál pertenece, su localización genética su \log_2FC y los valores de expresión de las dos réplicas Glu_1, Glu_2 y Gly_1, Gly_2 de las condiciones Glicerol ó glicerol/acetato.

Con el conteo de los ncRNAs que obtuvimos de la tabla generada por el programa ShortStack estos se dividieron por su clasificación basada en su biogénesis (0 o no clasificado, CUT, DUT, XUT) y por su localización genética (antisentido, bidireccional, intergénico y sentido), lo cual nos sirve para tener un estimado de la cantidad y clase perteneciente de RNAs pequeños que se encuentran en la expresión diferencial. Una vez obtenido estos valores, se elaboró otra tabla en donde se registró el número de cromosoma y el RefSeq que

corresponde de cada cromosoma. Esta información se obtuvo del informe de anotación y ensamblaje del genoma de la levadura *S. pombe* la base de datos de NCBI:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14?genome_assembly_id=22534

Análisis de expresión de los ncRNAs y sus réplicas en condiciones de Glucosa y Glicerol:

Posteriormente sé llevo a cabo gráficos de dispersión, esto para verificar que las lecturas obtenidas de la condición de glucosa se expresan de manera similar a su réplica y la de la condición de glicerol se expresa de la misma forma a su réplica, la comparación se llevó a cabo de la siguiente forma: glucosa – glucosa, glicerol-glicerol y finalmente glucosa-glicerol.

También se analizó la distribución de estos ncRNAs en mapas de calor (Heatmap) utilizando 1,000 genes variables. Con K-means se llevó a cabo un agrupamiento de estos ncRNAs por clústers de acuerdo a su valor expresado, en este caso se compararon 2,000 genes.

El método estadístico DESeq2 con el parámetro de min fold change de 2, nos mostró la condición con una mayor expresión diferencial entre los ncRNAs de glucosa y de glicerol, el rango de número de ncRNAs que identificó fue aproximadamente de 200. Con este mismo análisis obtuvimos un mapa de calor con la expresión alta y baja de los ncRNAs en ambas condiciones.

Análisis de las características de las regiones de ncRNAs con expresión diferencial:

Una vez obtenidas las tablas con los datos de la expresión diferencial, procedimos a analizar cómo son las regiones genómicas de estos ncRNAs. Para eso usamos el programa IGV v2.10.2. En este programa se utilizó el genoma de *S. pombe*

con ID:ASM294v2, donde se ubican las coordenadas de los ncRNAs del genoma, posteriormente se cargan las lecturas de RNA en formato *.bam de las dos condiciones a comparar glucosa y glicerol obtenidas del programa ShortStack, estas se cargan en el programa de manera ordenada, para ser mapeadas. Este mapeo permitió identificar la expresión de los ncRNAs en base a las tablas generadas con la normalización log2FC. En el programa también usaremos las lecturas de RNA-seq pareadas del artículo que se publicó previamente (Vichi J. *et al*, 2021). De esta forma podremos visualizar en el cromosoma de *S. pombe* la localización de los mRNAs con las lecturas de los ncRNAs expresados en glicerol /acetato, y comparados con los de glucosa y de esa forma observaremos la biogénesis de los ncRNAs.

Búsqueda de enriquecimientos funcionales

De la tabla de conteo obtenida de la normalización estadística de EdgeR con los valores expresados tanto de los ncRNAs como sus respectivos RNAs pareados, identificamos su tasa de cambio (Fold Change) en log base 2 (log2FC), para las réplicas con fuente de carbono en glucosa se tomaron los valores > 1 de los ncRNAs por su expresión significativa, en el caso de las réplicas que crecieron en condiciones de glicerol, se tomaron los valores < -1 .

Una vez que identificamos los ncRNAs que cumplen con este valor, nos dirigimos al programa STRING <https://string-db.org/> en la sección Search elegimos la opción multiple proteins e introducimos la lista de nombres de los genes que se ubican en la misma región del ncRNA que estamos analizando, como máxima confianza se utilizó un valor de 0.900 y con un 25% de FDR (false discovery rate) stringency.

Identificación de regiones regulatorias de ncRNAs

Para identificar qué factores transcripcionales pueden estar involucrados en la expresión diferencial de los ncRNAs que se expresan en glucosa, glicerol/acetato o en las dos condiciones, se aislaron 100 pb de las regiones ubicadas río arriba de estos ncRNAs. Para llevar a cabo la identificación de estos ncRNAs, se utilizó la versión del programa python3, biopython y el programa GetSequencesV2.py, este último programa es el que nos permitirá identificar el tamaño de región que se quiere recuperar.

Como archivos de entrada se utilizaron el genoma de levadura *S. pombe* (GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic. fa), un archivo que contenía los nombres de los ncRNAs, el nombre del cromosoma al que pertenece, posición inicial y final y el sentido en que se encuentran, en formato *.txt.

El programa se ejecutó de la siguiente manera:

```
ciencias@ciencias-desktop:~/Documentos/Karla/sequence$ python
GetSequences.py -f GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fa -i Atk_Gly_AS.txt
-s 100
```

En donde los parámetros de entrada son los siguientes:

-f <fastaGenomeInputfile> El path completo y nombre del archivo del genoma en formato fasta.

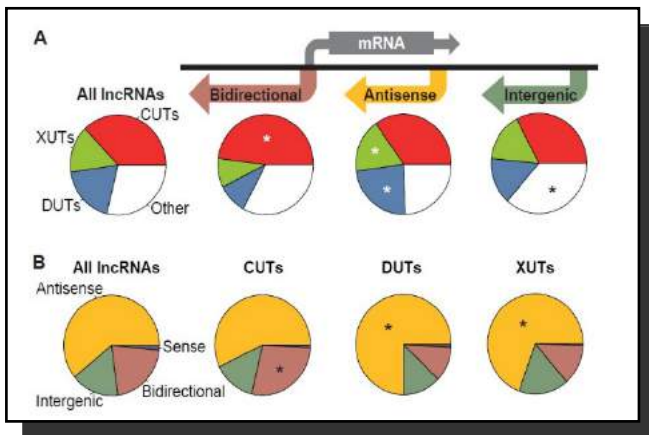
-i <interestRegion> archivo en formato bed con las regiones de interés, el nombre del cromosoma, nombre de la región, posición inicial, posición final, sentido de la cadena.

-s <Size> Tamaño de la región a recuperar

Identificación de motivos conservados:

Una vez obtenido las 100 pb de las regiones ubicadas río arriba de estos ncRNAs, este archivo en formato *.txt se carga en la opción Oligo analysis o Dyad Analysis de la sección motif discovery en la herramienta Regulatory Sequence Analysis Tools (<http://rsat.sb-roscoff.fr/>) el cual nos permite identificar motivos conservados. Una vez obtenidas las matrices de los motivos se estas se identifican con el programa Compare matrix buscando similitudes en la base de datos YEASTtract, para identificar regiones de secuencias conservadas que sirvan para la unión de factores de transcripción.

RESULTADOS



Clasificación de los lncRNAs

Imagen representativa obtenida del artículo de Atkinson, de los lncRNAs reportados previamente y muestra la clasificación de los mismos de acuerdo con su posición con respecto a su mRNA. Los lncRNAs se pueden dividir en cinco, que

Fig. 1. from rnajournal.cshlp.org, on September 1, 2019. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Atkinson, et. Al.

incluyen sentido, antisentido bidireccional, intrónico e intergénico (Ying Liu, Wei Ding, Wanpeng Yu, et. al 2021). Dentro de esta clasificación se

subclasificaron de acuerdo a su vía, en este caso se observa que de los RNAs antisentido predominan en las vías de DUTs (ncRNA de interferencia) y XUTs (exosoma nuclear) y los CUTs (exonucleasa citoplasmática) se encuentra los lncRNAs intergénicos.

Identificación de los ncRNAs



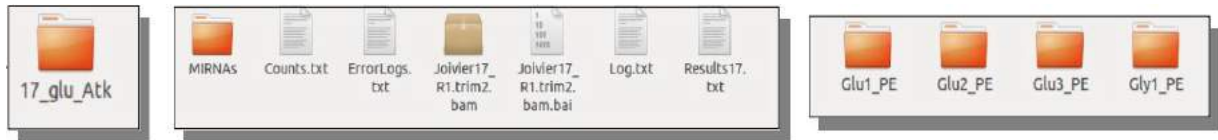
Con las librerías de RNA-seq de levadura en formato Fastq, las regiones de ncRNAs reportadas por Atkinson en formato *.txt y el genoma de *S. pombe* en formato fasta, y el programa ShortStack, se realizó la búsqueda de los ncRNAs. La primera ejecución fue la identificación de los RNAs pequeños.

```
Usage: ShortStack [options] {--readfile <r> | {--bamfile <b> |  
--cramfile <c>}} --genomefile <g>
```

<r> : readfile must be in fasta (.fasta or .fa), colorspace-fasta (.csfasta), or fastq (.fastq or .fq) format, or their gzip-compressed versions (.fasta.gz, .fa.gz, .csfasta.gz, .fastq.gz, or .fq.gz) Can also be a list (seperated by spaces) of several read files.

 : BAM formatted alignment file (.bam).

Un ejemplo representativo de las líneas de comandos del programa ShortStack que se ejecutaron para mapear las lecturas de RNAs de *S. pombe*.



Archivos de salida: nuevo directorio llamado 17_Glu_Atk de las lecturas de los ncRNAs y los directorios Glu1_PE de los RNAs pareados.

Al correr el programa ya ejecutado, nos desplegó un nuevo directorio con archivos de salida, estos archivos contenían información acerca de posibles miRNAs (ShortStack es un programa diseñado para la identificación de miRNAs en eucariontes), en este caso como la levadura *S. pombe* no tiene reportados miRNAs, no se obtuvieron resultados al respecto. También desplegó archivos de conteo en formato *.txt, un archivo con las lecturas de los ncRNAs en archivos .bam y un archivo final llamado "results.txt". Este último es el que utilizamos para identificar los ncRNAs. Al abrir este archivo obtenemos información acerca de la región en que se encuentra los ncRNAs, los nombres de los ncRNAs (cuando es un análisis *de novo*, el nombre del primer posible ncRNA en las primeras posiciones del cromosoma 1, aparece como Cluster_1 y se da una seriación del número dependiendo de su ubicación en el genoma [Cluster_2, Cluster_3...]). En caso de usar una tabla de ncRNAs identificados, entonces la lista da ese ID y su posición), su tamaño, lecturas y el sentido de cadena. Obtuvimos cuatro resultados, para Glicerol fueron las lecturas 17,18 (Gly_ 1 y Gly_ 2) y para Glucosa fueron las lecturas 19,20 (Glu_ 1 y Glu_ 2), y también obtuvimos lecturas de los RNAs pareados.

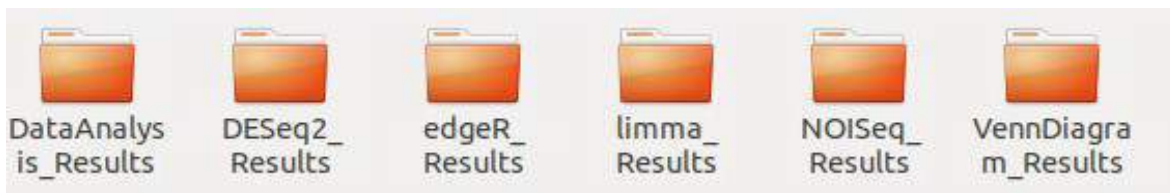
Results.txt - LibreOffice Calc

Cluster_36

#Locus	Name	Length	Reads	RPM	UniqueReads	FracTop	Stand	MajorRNA	MajorRNAReads	Complexity	DecoCal	miRNA	Phasescore	Short	Long	Q	R	S	T	U	V
NC_003424.3:122-747	Cluster 1	676	78	5565	0	851	0	AUUGGUGAGGUGAACUGACAUUUU	2	940 N	N2	-1	6	36	0	3	11	12	10		
NC_003424.3:1040-6003	Cluster 2	5066	6402	451807	12	476	0	GUUGGUAUUGGACUUGAGUGAGCUGACAGCU	47	697 N	N2	-1	127	2846	115	315	675	1254	1070		
NC_003424.3:6747-7145	Cluster 3	399	15	1059	1	467	0	CGAAAAUUGGAAUUGUAGUCAMUU	1	1000 N	N2	-1	1	3	0	1	4	4	2		
NC_003424.3:16490-16667	Cluster 4	178	20	1412	1	650	0	AAGUGGACUGUCGAGUACUCUGUUG	2	950 N	N2	-1	4	6	1	1	1	1	6		
NC_003424.3:17007-17809	Cluster 5	603	130	9175	0	546	0	UGCAGCUACUUUUGACCUUACAGC	3	923 N	N2	-1	2	53	5	5	21	17	27		
NC_003424.3:17915-18959	Cluster 6	945	1075	75874	41	597	0	UGGAAAGACAGGAUUCUGAUCCGU	15	683 N	N2	-1	20	529	16	44	109	209	154		
NC_003424.3:31386-31626	Cluster 7	241	130	9175	1	0	0	UGAUGAUGAUGAUCUCCUACCAUUAAGGG	52	200 N	N2	-1	3	120	0	0	1	2	4		
NC_003424.3:43334-43370	Cluster 8	37	13	918	8	1000 +	0	GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	6	615 N	N2	-1	0	13	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:56342-56380	Cluster 9	49	19	1341	0	1000 +	0	CUAGACAAUAAAGUCGCGAAU	2	947 N	N2	-1	5	6	1	3	0	3	1		
NC_003424.3:58944-58984	Cluster 10	41	30	2117	15	933 +	0	UAUCUACCAGAAAGCA	14	167 N	N2	-1	29	1	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:59219-59437	Cluster 11	219	20	1412	20	0	0	CACAUUUGAUUCCAGACAU	2	900 N	N2	-1	3	10	0	4	0	1	2		
NC_003424.3:69525-69630	Cluster 12	1296	144	10164	85	0	0	CUUAUACCGUUCUACACAAUUCUGGAAUU	4	917 N	N2	-1	15	97	5	2	9	9	7		
NC_003424.3:74521-74771	Cluster 13	251	8	565	8	0	0	ACUGAUUUCUAAUUAUUGCGGAGCUCUUGA	2	875 N	N2	-1	0	6	1	0	0	0	1		
NC_003424.3:74881-75091	Cluster 14	211	8	565	8	0	0	ACUAUUGCGGAGCAUUAUUUACGAG	1	1000 N	N2	-1	2	6	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:75173-75632	Cluster 15	460	19	1341	19	0	0	AGAAUUGAUAUAGGACAAUUUUUUAUUCUGA	4	789 N	N2	-1	1	16	0	0	1	1	0		
NC_003424.3:75746-75993	Cluster 16	246	9	635	9	111	0	AAAAUCGAAUUAUUGUGUAUCUUU	2	889 N	N2	-1	2	5	1	0	0	0	1		
NC_003424.3:81563-81678	Cluster 17	116	57	4023	3	1000 +	0	GGGCUUUGAUCAGA	23	70 N	N2	-1	57	0	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:101347-102589	Cluster 18	2243	1188	82438	1143	21	0	GGUGGCUUUGAUGUA	18	704 N	N2	-1	225	643	55	63	62	66	54		
NC_003424.3:107439-107739	Cluster 19	301	29	2047	26	966 +	0	GGCGUCGUUGAACCA	5	621 N	N2	-1	19	7	0	1	1	1	0		
NC_003424.3:109625-109974	Cluster 20	250	10	706	10	200	0	AUUAGUUGGACCAUUG	2	800 N	N2	-1	8	1	0	0	0	0	1		
NC_003424.3:110797-111069	Cluster 21	270	19	1341	19	105	0	AGACUGUACUUAUACAGCCAUUG	2	947 N	N2	-1	4	8	0	1	2	1	3		
NC_003424.3:111333-111472	Cluster 22	140	8	565	8	825	0	AGUUGUUGUCUAGAC	3	750 N	N2	-1	5	3	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:111811-111828	Cluster 23	18	48	3888	12	1000 +	0	GGACCUGGAAUUGA	13	208 N	N2	-1	48	0	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:114930-114251	Cluster 24	222	40	2823	40	1000 +	0	UAUUAUACUACUGUGUAUGAU	11	475 N	N2	-1	12	4	1	2	12	4	5		
NC_003424.3:115972-116026	Cluster 25	55	15	1059	15	667	0	AUUACCAGAAUUAUUAUUGGCUAG	2	933 N	N2	-1	2	8	2	0	2	1	0		
NC_003424.3:116422-116438	Cluster 26	17	12	847	12	1000 +	0	AUUUUGCGUGGGGU	9	250 N	N2	-1	12	0	0	0	0	0	0		
NC_003424.3:117528-117888	Cluster 27	383	68	4799	14	103	0	UUGUGAAUCUCCUUC	52	206 N	N2	-1	62	3	0	2	1	0	0		
NC_003424.3:119852-120385	Cluster 28	534	10	706	9	0	0	AGAUUCUGAAAUUA	1	1000 N	N2	-1	1	8	0	0	1	0	0		

Una vez obtenidos los nombres de los ncRNAs y las lecturas, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial con el programa IDEAMEX, el cual realiza cuatro análisis estadísticos.

Expresión diferencial de Genes:



Obtuvimos 4 análisis estadísticos de expresión diferencial.

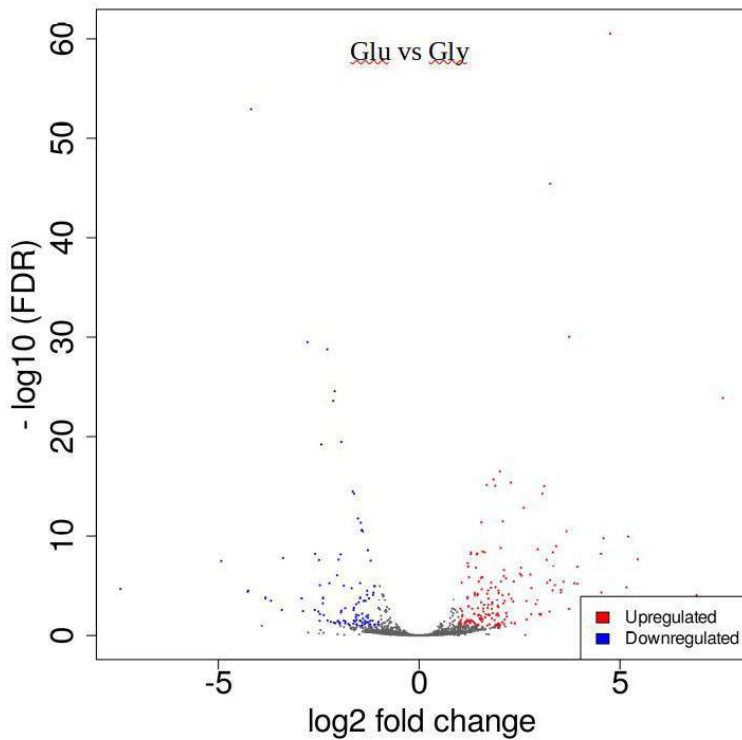


Fig. 2 Análisis de expresión diferencial en gráfico de Volcano, Glu vs Gly. Este análisis se hizo con FDR $-\log_{10}$ y un fold Change \log_2 . Se puede observar en color rojo una alta expresión de ncRNAs en la condición de glicerol en comparación con el de glucosa.

Al trabajar la secuenciación del ARN por el método de RNA-seq y al ser alineados con la herramienta Bowtie del programa ShortStack, es posible analizar su abundancia y correlacionarla con la expresión, en este caso se obtuvieron lecturas de ncRNAs que se expresan tanto en glicerol como en glucosa. Los programas de R bioconductor, limma, edgeR, DESeq2 y NOISeq son herramientas para analizar estadísticamente y normalizar la expresión diferencial de genes (DGE). Estas normalizaciones son necesarias porque las muestras difieren en el número total de lecturas secuenciadas a aquellas aliadas en el genoma, debido a los sesgos que

podrían ocurrir, como son las diferencias en la extracción de RNA de las muestras, la variación en el número de lecturas por muestra, a la variabilidad biológica entre muestras, a la diferencia de tamaños en los genes, entre otras. Los métodos de normalización permiten aminorar los sesgos provocados por estas diferencias (Stupnikov, McInerney, K.I., et al; 2021).

En nuestro análisis de expresión diferencial observamos que la expresión de los ncRNAs es mayor en condiciones de Glicerol que el de Glucosa (Fig2).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Name	#Locus	Class	Genetic location	logFC	logCPM	PValue	FDR	Glu 1	Glu 2	Gly 1	Gly 2
SPNCRNA_4578	NC_003423.3:128806-130242	xut	AS	-7.54237455	7.698252193	2.75E-55	2.02E-51	4	1	406	447
SPNCRNA_2039	NC_003424.3:83831-84199	cut	AS	-5.90795806	4.891165513	2.64E-21	1.76E-18	1	1	59	58
SPNCRNA_4603	NC_003423.3:197279-197554		0 IG	-5.41278898	5.3061325	2.64E-22	2.16E-19	2	2	65	92
SPNCRNA_2973	NC_003424.3:2175451-2175876	dut	AS	-5.21343651	5.665948112	8.48E-25	1.04E-21	4	2	106	95
SPNCRNA_1099	NC_003421.2:46987-47566		0 BD	-5.08667462	4.624285684	4.13E-17	1.45E-14	1	2	52	43
SPNCRNA_3340	NC_003424.3:2963922-2971114		0 AS	-4.82794528	9.234213827	3.79E-46	1.39E-42	33	67	1257	1144
SPNCRNA_499	NC_003424.3:2735048-2735175	cut	QL	-4.53872389	4.505451203	9.69E-14	1.92E-11	3	1	35	51
SPNCRNA_2663	NC_003424.3:1496744-1498043	cut	AS	-4.46592607	5.659259395	1.45E-21	1.06E-18	6	4	88	109
SPNCRNA_3407	NC_003424.3:3159491-3159998	xut	BD	-4.31745421	4.297646868	2.80E-13	4.60E-11	2	2	39	34
SPNCRNA_6644	NC_003423.3:4524230-4524822	xut	IG	-4.24254041	5.295447859	1.08E-18	4.96E-16	4	5	70	81
SPNCRNA_1460	NC_003423.3:1749626-1751043	xut	IG	-4.09236552	3.29596334	1.36E-06	6.69E-05	1	1	20	13
SPNCRNA_3408	NC_003424.3:3162246-3162694	cut	AS	-4.08192469	5.280793438	2.03E-17	7.45E-15	3	7	60	89
SPNCRNA_5338	NC_003423.3:1750344-1751424		0 IG	-4.00050667	3.224741357	1.66E-06	7.84E-05	1	1	17	14
SPNCRNA_6645	NC_003423.3:4524941-4525297	xut	IG	-3.99119644	5.081795467	3.44E-16	1.01E-13	6	3	60	68
SPNCRNA_4329	NC_003424.3:5158043-5159137	cut	AS	-3.9605529	4.891750067	5.52E-14	1.16E-11	5	3	67	44
SPNCRNA_3923	NC_003424.3:4290325-4290911	dut	AS	-3.88938753	4.981988719	2.82E-13	4.60E-11	5	4	76	42
SPNCRNA_1324	NC_003423.3:197369-200995		0 BD	-3.80108243	8.088009982	2.78E-30	4.09E-27	38	49	568	477
SPNCRNA_7764	NC_003421.2:2424327-2424614	xut	AS	-3.723814	3.456851391	6.41E-07	3.39E-05	2	1	20	17
SPNCRNA_3862	NC_003424.3:4176442-4176734		0 AS	-3.70813187	5.976704234	5.55E-20	3.14E-17	9	12	116	123
SPNCRNA_6762	NC_003421.2:253079-253999		0 AS	-3.68930114	4.02441537	4.92E-10	4.95E-08	1	4	26	32
SPNCRNA_7045	NC_003421.2:823540-823962		0 AS	-3.645981	5.03681425	1.23E-14	3.13E-12	6	5	56	66
SPNCRNA_1540	NC_003423.3:2659605-2660100	dut	IG	-3.60308624	4.890715967	1.57E-12	2.27E-10	8	2	58	51
SPNCRNA_6754	NC_003421.2:229133-230059		0 BD	-3.52890883	4.901684231	2.33E-13	3.99E-11	2	6	60	50
SPNCRNA_6627	NC_003423.3:4471573-4473194		0 IG	-3.51664113	2.862527836	0.000430963	0.009467144	1	1	16	6
SPNCRNA_1224	NC_003421.2:1726059-1727277	cut	IG	-3.50541537	4.111486683	1.12E-09	1.08E-07	3	3	35	26
SPNCRNA_2006	NC_003424.3:7216-8253	xut	IG	-3.5004015	5.641815538	1.21E-16	3.87E-14	7	12	81	106
SPNCRNA_2664	NC_003424.3:1498580-1499067	cut	BD	-3.4590486	5.885651024	6.30E-18	2.57E-15	11	12	106	115
SPNCRNA_4271	NC_003424.3:5051540-5051825	dut	AS	-3.37641901	3.18248953	5.43E-06	0.000237522	1	2	11	18
SPNCRNA_2217	NC_003424.3:526232-526460	cut	AS	-3.37245549	2.764726179	0.00027282	0.006660068	1	1	10	10
SPNCRNA_32	NC_003421.2:1702505-1702934		0 QL	-3.3623765	4.902604803	1.21E-12	1.86E-10	6	6	47	62
SPNCRNA_2052	NC_003424.3:108646-109365		0 AS	-3.35648996	5.27578034	1.18E-13	2.17E-11	6	10	83	59
SPNCRNA_1236	NC_003421.2:1859963-1860577	cut	AS	-3.31866358	10.17692606	3.47E-32	6.37E-29	225	279	2053	2301
SPNCRNA_6265	NC_003423.3:3747622-3749913	xut	AS	-3.25782427	5.89644201	3.92E-16	1.11E-13	7	20	115	105
SPNCRNA_1223	NC_003421.2:1721177-1722876		0 AS	-3.23637565	3.073268579	0.000269919	0.006633324	1	2	19	7
SPNCRNA_39	NC_003423.3:2804337-2804580		0 AS	-3.23108694	5.270256878	1.21E-12	1.86E-10	9	8	55	86
SPNCRNA_6868	NC_003421.2:472221-472643	cut	BD	-3.22227192	2.663471696	0.000688002	0.013737613	1	1	9	9
SPNCRNA_3110	NC_003424.3:2471366-2472908	cut	AS	-3.15898952	5.93335358	3.05E-14	7.00E-12	12	17	137	86
SPNCRNA_6104	NC_003423.3:3384355-3384631		0 AS	-3.14455494	2.611688223	0.001748288	0.028611176	1	1	11	6
SPNCRNA_6761	NC_003421.2:248211-250398	xut	AS	-3.12939387	7.194630055	1.89E-19	9.90E-17	34	37	302	237
SPNCRNA_20	NC_003423.3:3934357-3934809	cut	BD	-3.12790298	3.323250046	5.81E-06	0.000251299	2	2	13	19
SPNCRNA_906	NC_003424.3:3394883-3395271	cut	IG	-3.12424532	7.118289022	4.67E-19	2.29E-16	35	32	220	294
SPNCRNA_1260	NC_003421.2:2085862-2086765		0 BD	-3.07882728	3.259599375	0.000419027	0.009285568	1	3	26	4
SPNCRNA_103	NC_003423.3:339346-340012	cut	IG	-3.05070533	4.113454269	1.44E-07	8.89E-06	5	3	38	21
SPNCRNA_298	NC_003423.3:156254-157003		0 QL	-3.02219745	4.089159341	1.95E-08	1.49E-06	5	3	28	30
SPNCRNA_2467	NC_003424.3:1076741-1077534	dut	AS	-3.00359039	6.190666953	1.11E-15	2.90E-13	18	20	116	150
SPNCRNA_4674	NC_003423.3:339378-340150	dut	IG	-2.98557406	4.050964071	3.95E-07	2.20E-05	4	4	37	19
SPNCRNA_1670	NC_003423.3:4109027-4109600		0 IG	-2.98503833	2.901479308	0.000109276	0.003161268	1	2	11	11
SPNCRNA_5352	NC_003423.3:1779824-1780563	cut	AS	-2.97505753	4.883899957	1.16E-08	9.25E-07	8	7	30	75
SPNCRNA_1435	NC_003423.3:1461561-1463725	dut	BD	-2.93418923	5.565466928	2.74E-11	3.42E-09	8	18	107	62
SPNCRNA_79	NC_003424.3:663144-663352		0 IG	-2.91803014	2.855946131	0.000172022	0.004600822	1	2	10	11
SPNCRNA_4039	NC_003424.3:4523045-4523319		0 BD	-2.91697274	3.418692979	6.74E-06	0.00028646	2	3	16	18
SPNCRNA_4579	NC_003423.3:129802-130053		0 IG	-2.91577286	3.184209622	0.000419544	0.009285568	3	1	8	20

Tabla 3. Análisis de expresión diferencial con el método edgeR, aquí se puede observar el nombre de los ncRNAs, su región en que se encuentran, en adicional se le proporcionó su clasificación, las normalizaciones, su LogFC, al final sus lecturas, en este caso se obtuvieron dos réplicas para glucosa como para glicerol.

Análisis de expresión de los ncRNAs y sus réplicas en condiciones de Glucosa y Glicerol:

Para verificar que nuestras réplicas de cultivo se expresaran de forma similar cuando se usa la misma fuente de carbono y que esto difieren cuando se usa una fuente carbono diferente, se llevó a cabo un análisis de dispersión para compararlas entre ellas.

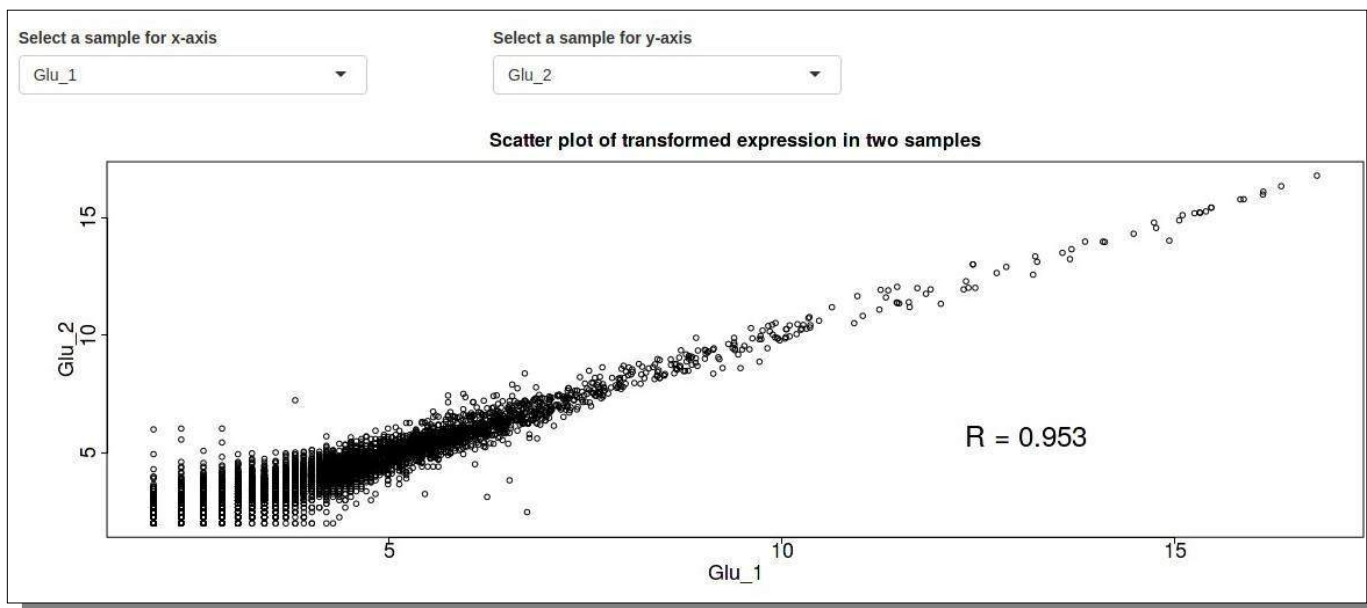


Fig. 3 Comparación de expresión diferencial de los ncRNAs de Glucosa-Glucosa.

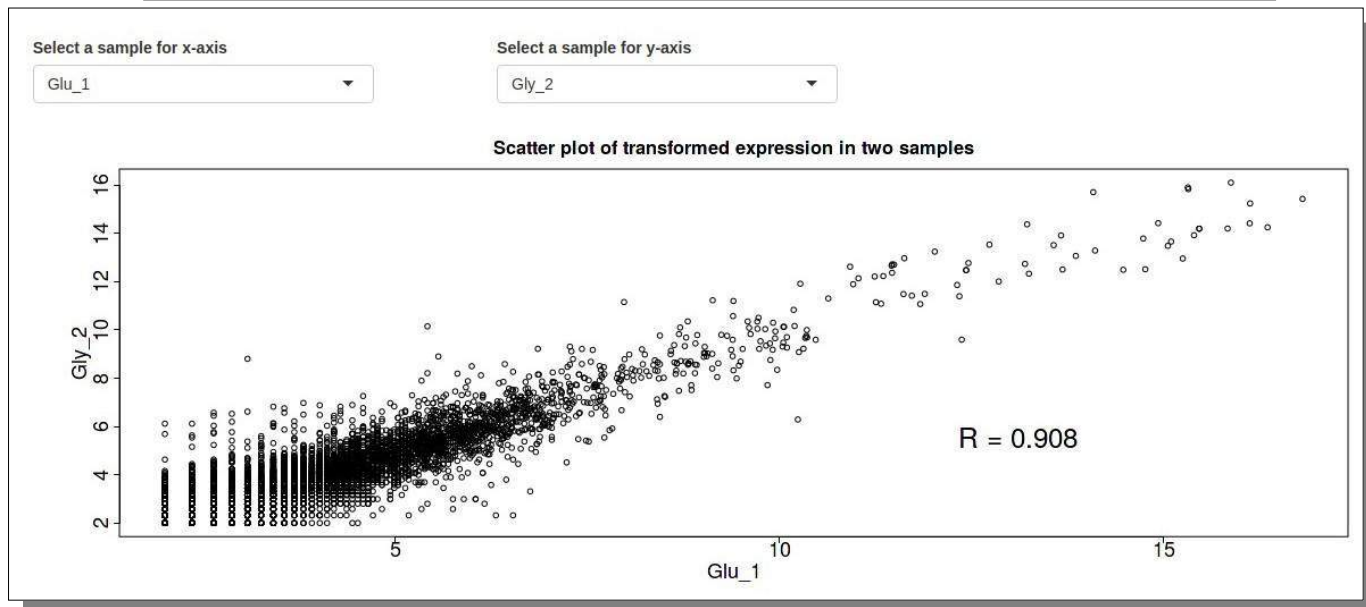


Fig. 4 Comparación de expresión diferencial de los ncRNAs de Glucosa-Glicerol.

Como se observa en los gráficos, al comparar Glucosa-Glucosa (Fig. 3), los ncRNAs se expresan de forma similar, esto quiere decir que nuestras réplicas se expresan igual en la misma condición. En cambio, cuando se comparó Glucosa-Glicerol (Fig. 4) la expresión cambio por ser diferentes, también se hizo una comparación con Glicerol-Glicerol y su expresión fue la misma, esto quiere decir que nuestras réplicas tanto de Glucosa como Glicerol tienen poca variación biológica.

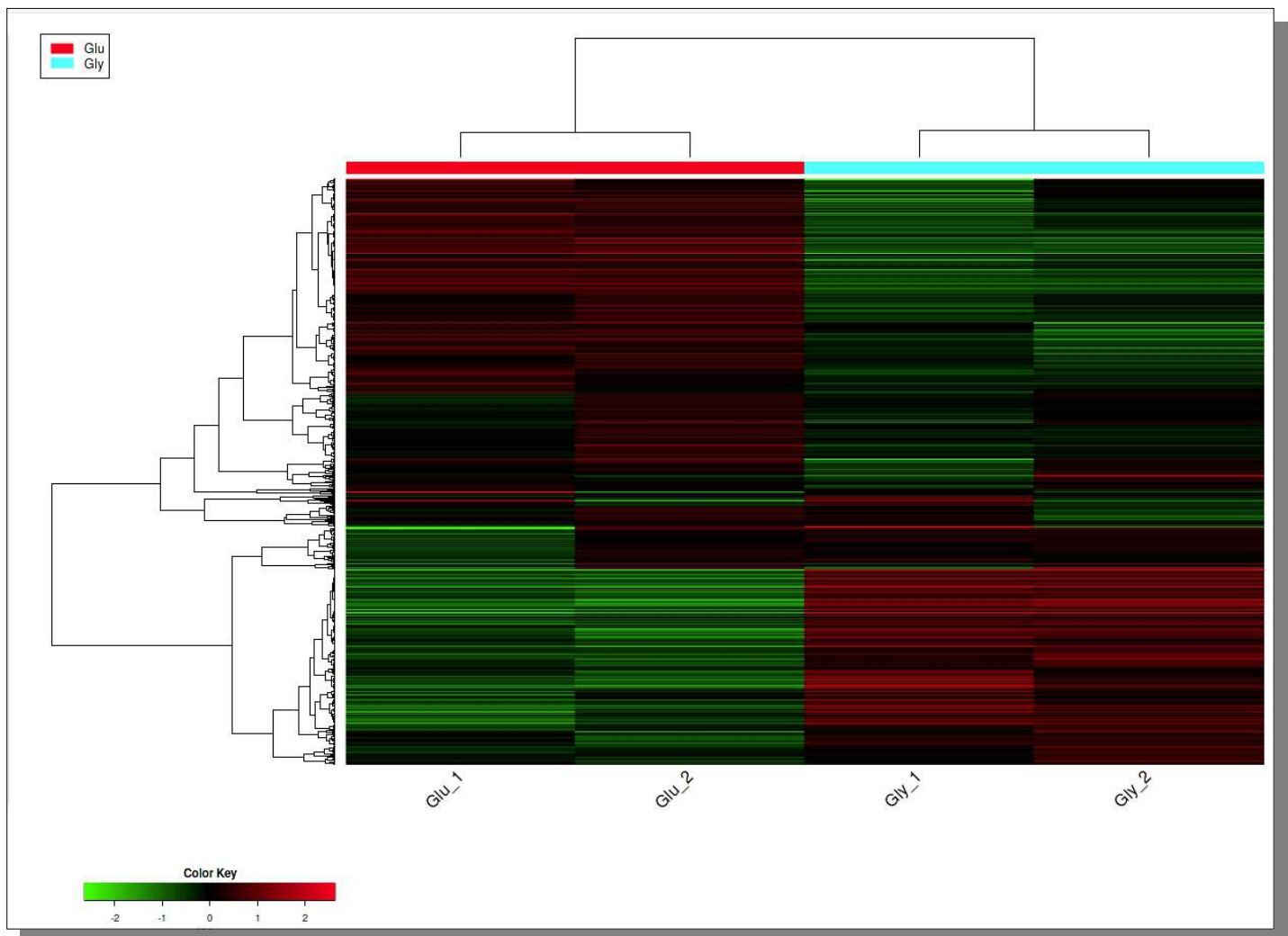


Fig.5 Heatmap
Genes variables: 1,000
Center genes (substract mean)

En la figura 5 se puede observar un mapa de calor en donde nos muestra que la distribución es similar de la condición en Glucosa con su réplica y la condición de Glicerol con su réplica de los ncRNAs. El color verde muestra la expresión en una condición y la roja en la otra.

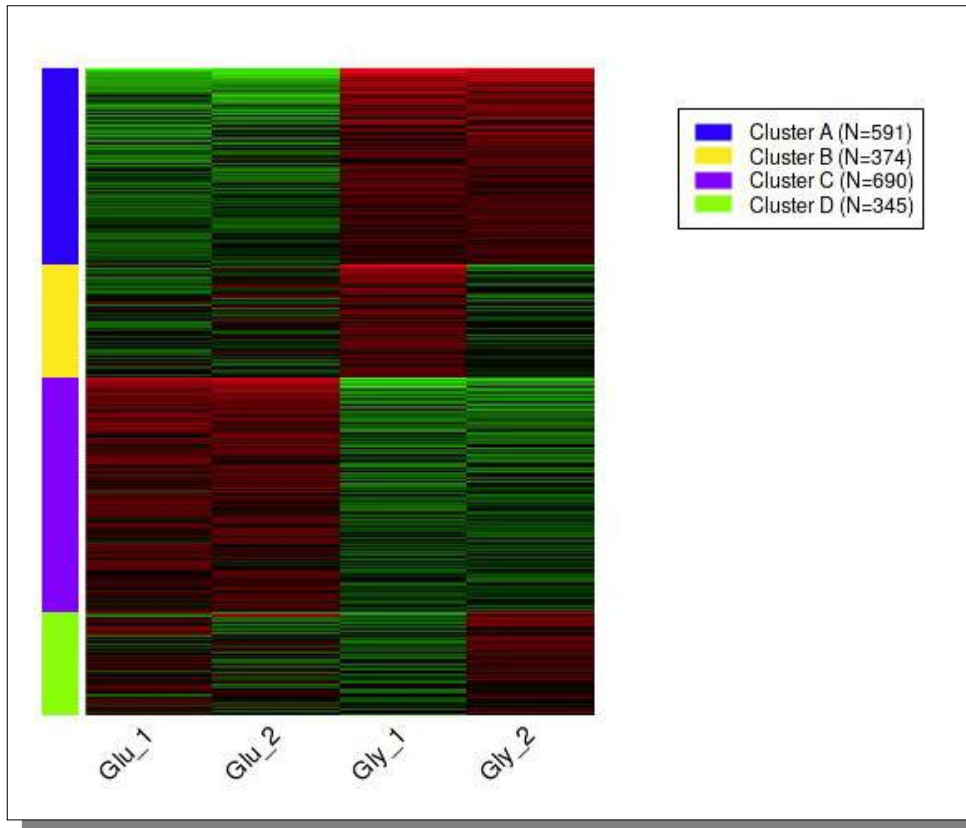


Fig. 6 K-Means
Genes variables: 2,000 Numero
de clusters: 4

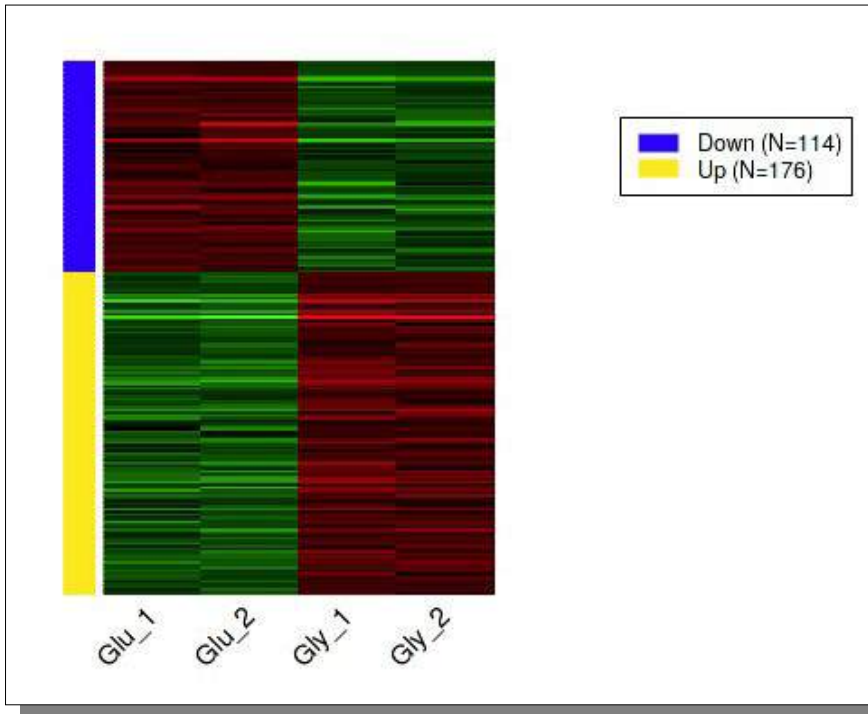
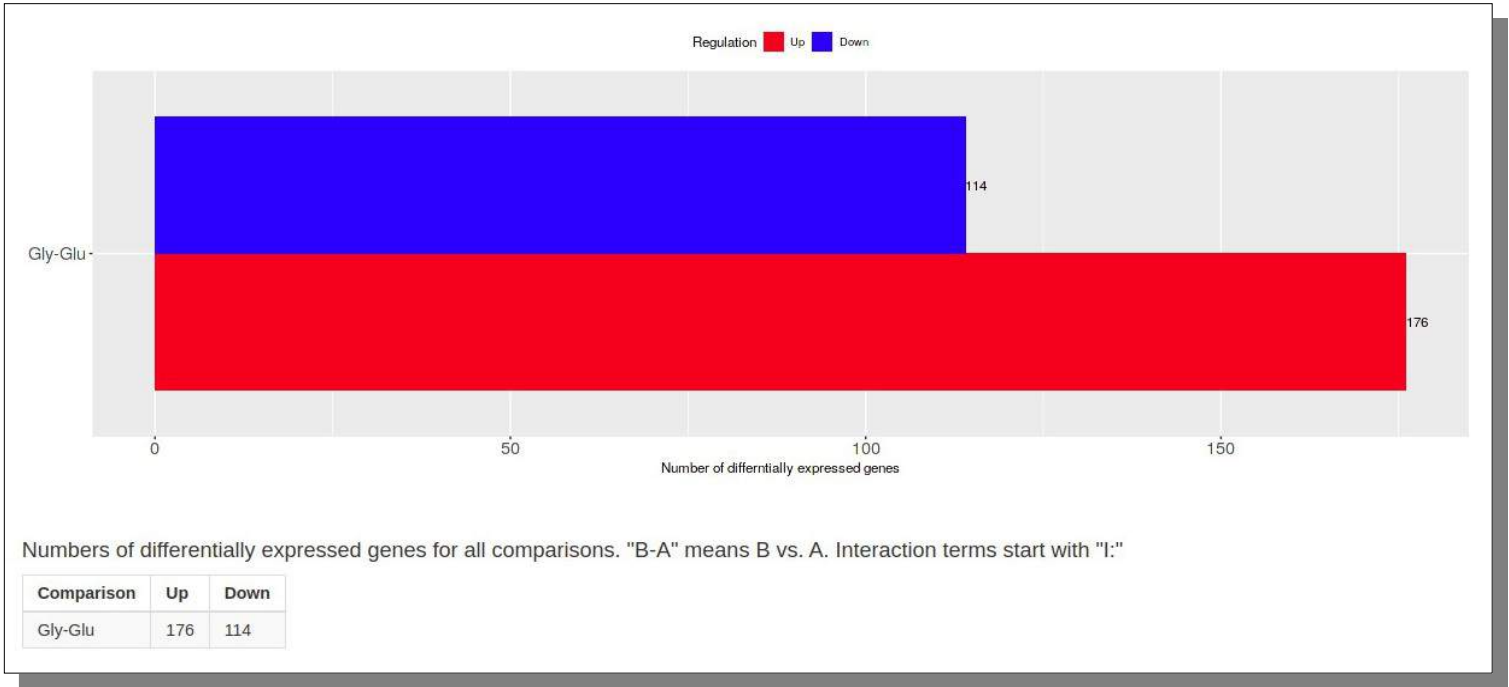


Fig. 7 (arriba) Se observa un gráfico de expresión diferencial de los ncRNAs en un rango de 0-200 genes aproximadamente. **Fig. 8 (derecha)** se observan los mismos datos ya distribuidos en un mapa de calor.

Análisis de las características de las regiones de ncRNAs con expresión diferencial:

De acuerdo con los datos que obtuvimos con la normalización EdgeR (Tabla 3), se llevó a cabo un análisis visual con el programa IGV, esto con el objetivo de identificar los ncRNAs que se expresan de forma significativa ya sea en Glucosa y/o Glicerol/Acetato y ver qué características tienen la alineación de las lecturas en el genoma

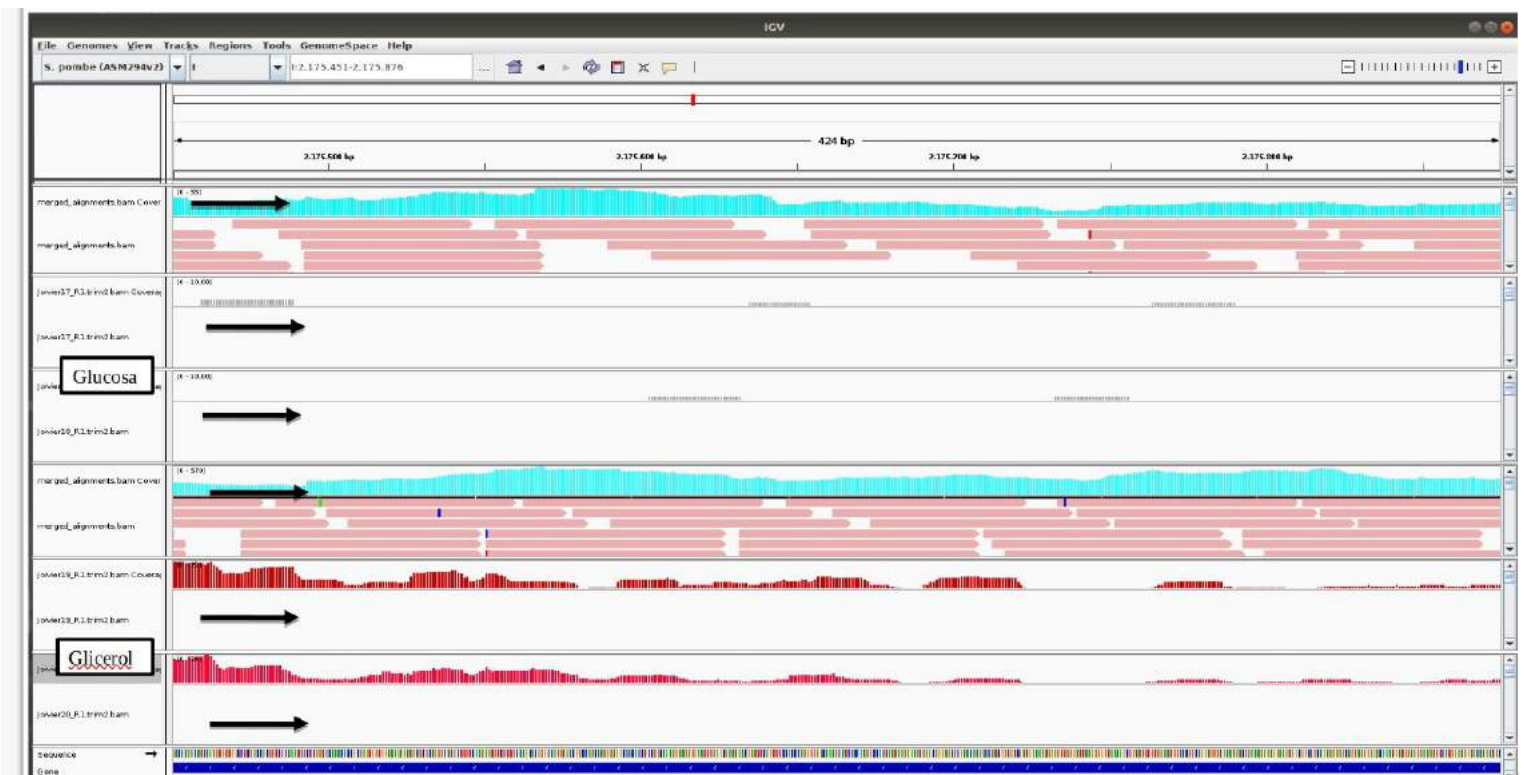
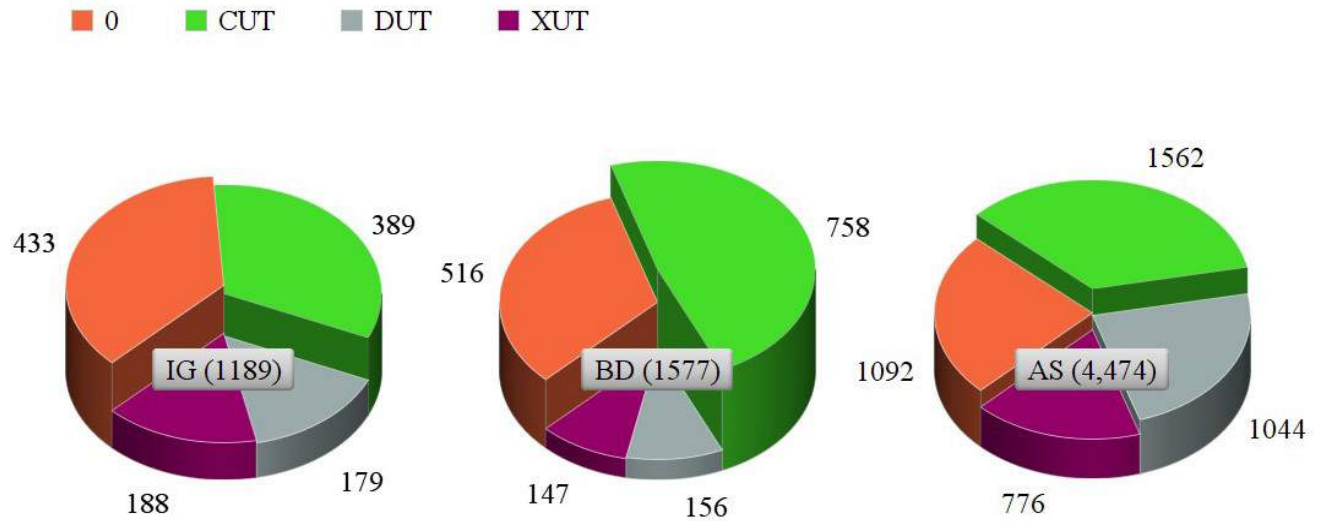


Fig. 9 Visualización de la expresión de ncRNA en presencia de glicerol, y el mRNA en ambas condiciones en el cromosoma I en *S.pombe* en la región 2,175,451-2,175,876.
Vía: DUTs, RNA antisentido.

En donde obtuvimos mayores resultados fue en los ncRNAs que pertenecían a la vía de los DUTs pertenecientes a los ncRNAs antisentido.

Resultados de todos los ncRNAs obtenidos



En la imagen 9 se puede observar las lecturas de los mRNA pareados expresado en ambas condiciones de Glucosa y Glicerol (en color azul) y el ncRNA (SPNCRNA.2973) solamente se expresa en condiciones de Glicerol, posiblemente cumpliendo funciones regulatorias específicas en esa condición (color rojo) expresandose de forma específica. Al identificar su mRNA nos indicó de que se trata del gen *gld1* (SPAC13F5.03c), un gen que codifica la proteína glicerol deshidrogenasa, la cual es capaz de asimilar el glicerol como fuente de carbono, como vía catalítica $\text{glycerol} + \text{NAD}^+ = \text{dihydroxyacetone} + \text{H} + \text{NADH}$, generando glicerol 3-fosfato y vía de la dihidroxiacetona y así poder entrar a la vía de la glucólisis (Matsuzawa, Ohashi, Hosomi, A.et al.; 2010).

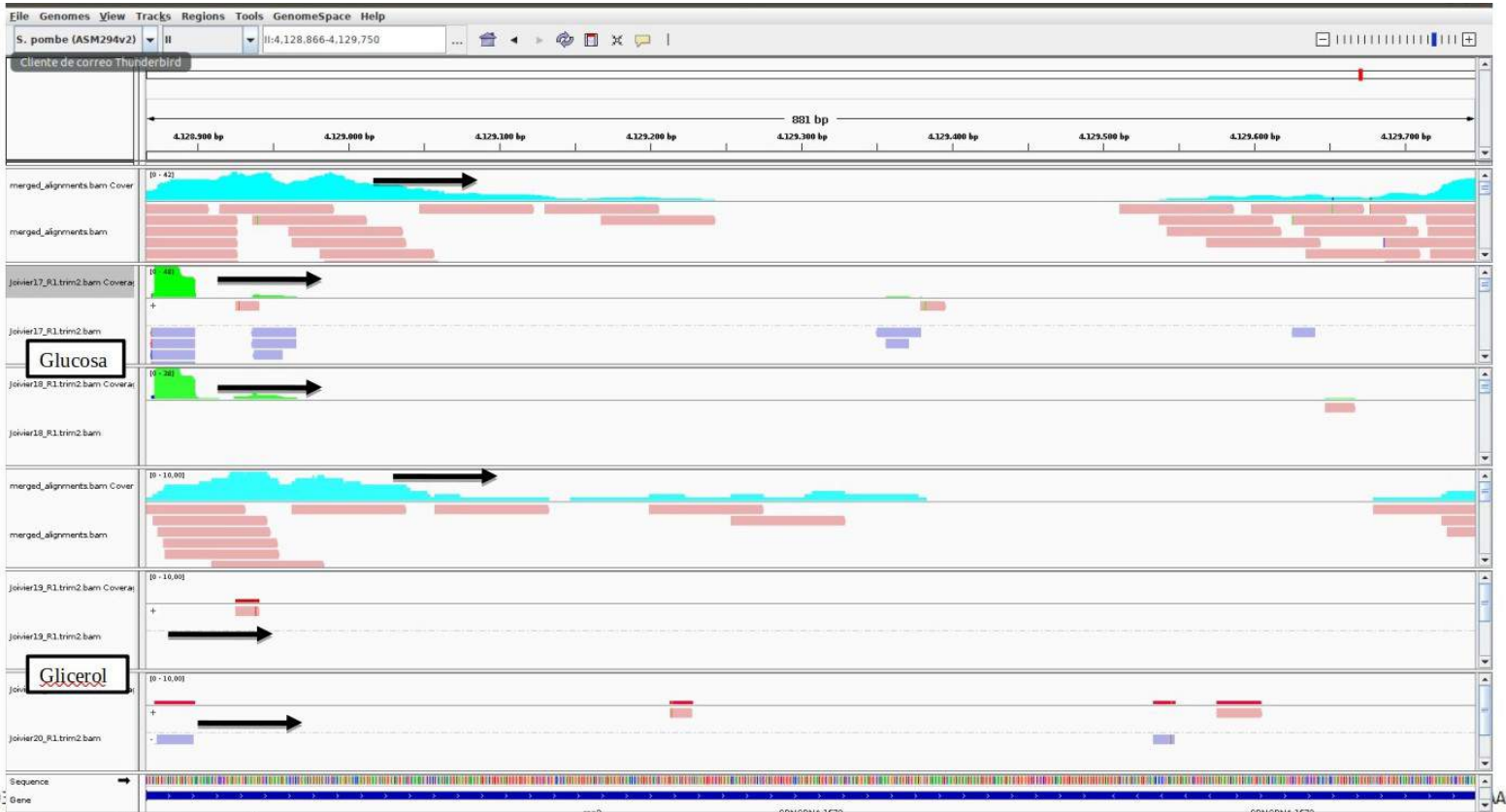


Fig. 10 Visualización de la expresión de ncRNA en presencia de glucosa, y el mRNA en ambas condiciones en el cromosoma II en *S.pombe* en la región 4,128,866-4,129,750
 Vía: DUTs, RNA antisentido.

Al contrario del resultado anterior, encontramos el ncRNA (SPNCRNA.1672) expresados en Glucosa, pero no en Glicerol, y también observamos como el mRNA se expresa en ambas condiciones, la glucosa al ser su fuente de carbono principal, indicaría que se está llevando a cabo la expresión de estos genes meióticos, el mRNA que se está expresando junto con el ncRNA corresponde al gen que codifica la proteína Cnp3 un componente del cinetocoro que forma parte de un complejo proteico que se ensambla en el ADN centrómero y los cromosomas a los microtúbulos de huso mediando la segregación cromosómica y la segregación de las cromátidas hermanas durante la meiosis y mitosis, esto ocurre en la prometafase (Tanaka, Chang, Kagami, Watanabe; 2009).

Expresión diferencial de ncRNAs en glucosa o glicerol/acetato de los ncRNAs con respecto a los mRNA:

Cómo observamos en el programa IGV, los mRNA (los RNAs pareados) se expresan en ambas condiciones en comparación con los ncRNAs. Y esto mismo se observó en los resultados de expresión diferencial en EdgeR. Usamos un valor Log2FC de los ncRNAs con una expresión significativa en Glucosa que fuera > 1 y en Glicerol < -1 , para seleccionar a los ncRNAs antisentidos expresados significativamente y a los mRNAs que están codificados en la cadena opuesta y que también se expresan significativamente. Estos datos los ordenamos y los analizamos en el programa STRING, el cual realizó una búsqueda de los identificadores sobre diferentes bases de datos para finalmente obtener una red de interacciones funcionales de las proteínas introducidas. Uno de los tipos de red más útiles, genéricos y de amplio alcance es la red de asociación proteína-proteína; abarca todos los genes que codifican proteínas en un genoma determinado y destaca sus asociaciones funcionales. Dado que las proteínas pueden interactuar de muchas maneras, una 'asociación funcional' se define normalmente de forma operativa: dos proteínas cualesquiera que contribuyen conjuntamente a un proceso celular específico se consideran funcionalmente asociadas (Damian, Annika, Katerina et. Al; 2021) esta definición incluye incluso pares de proteínas que actúan antagónicamente dentro de un mismo proceso. Con la lista de genes expresados significativamente el programa nos proporcionó una tabla con diferentes procesos biológicos (Tabla 4).

Functional enrichments in your network

[explain columns](#)

Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0061454	Release of sequestered calcium ion into cytosol by golgi	2 of 2	1.8	0.2000
GO:0015791	Polyol transport	2 of 3	1.62	0.2280
GO:0006884	Cell volume homeostasis	3 of 5	1.58	0.0795
GO:0008645	Hexose transmembrane transport	4 of 11	1.36	0.0670
GO:0098704	Carbohydrate import across plasma membrane	3 of 9	1.32	0.1422
GO:0051403	Stress-activated mapk cascade	3 of 9	1.32	0.1422
GO:0046323	Glucose import	3 of 10	1.27	0.1537
GO:0043410	Positive regulation of mapk cascade	4 of 16	1.2	0.0827
GO:0006740	NADPH regeneration	3 of 14	1.13	0.2280
GO:0006874	Cellular calcium ion homeostasis	4 of 19	1.12	0.1069
GO:0023014	Signal transduction by protein phosphorylation	6 of 30	1.1	0.0670
GO:0000165	MAPK cascade	4 of 20	1.1	0.1069
GO:0015850	Organic hydroxy compound transport	3 of 15	1.1	0.2299
GO:0098739	Import across plasma membrane	6 of 38	1.0	0.0670
GO:0098657	Import into cell	7 of 49	0.95	0.0670
GO:0030001	Metal ion transport	6 of 67	0.75	0.1537
GO:0060341	Regulation of cellular localization	6 of 73	0.71	0.2000
GO:0098660	Inorganic ion transmembrane transport	11 of 144	0.68	0.0670
GO:0098662	Inorganic cation transmembrane transport	9 of 128	0.64	0.0874
GO:0006468	Protein phosphorylation	9 of 140	0.61	0.1069
GO:0032879	Regulation of localization	7 of 108	0.61	0.2212
GO:0006812	Cation transport	10 of 172	0.56	0.1069
GO:0035556	Intracellular signal transduction	10 of 198	0.5	0.2000
GO:0006811	Ion transport	12 of 270	0.45	0.2000
GO:0016310	Phosphorylation	12 of 283	0.42	0.2206
GO:0007154	Cell communication	13 of 326	0.4	0.2280

(less ...)

Tabla 4. Enriquecimientos significativos en diferentes procesos biológicos.

En este caso encontramos enriquecimientos significativos en el transporte transmembranal de hexosas y en la homeostasis celular para los genes que se expresan más en glicerol. En la red, se puede observar en color rojo las proteínas que se seleccionaron por formar parte del transporte de hexosas, además que mostraban en sus ncRNAs una expresión diferencial significativa. Dentro de estas proteínas encontramos a *ght2* y *ght8*, *sut 1* y *gld1*.

Los genes *ght2* y *ght8* forman parte de la familia de transportadores de hexosas *ght (1-8)*, estos transportadores de hexosas son necesarios para la captación de glucosa celular, por lo tanto, juegan un papel importante en la homeostasis de la glucosa, sin embargo, *ght2* y *ght8* son transportadores que se expresan tanto en presencia

de glucosa, como en ausencia de ella (Saitoh, Mori , Uehara , Masuda; 2015) , y en este análisis las encontramos expresadas en presencia de glicerol, por lo tanto al estar en condiciones de glicerol como fuente de carbono, es captado por las transportadores Ght2 y Ght8 y así poder ingresar a la célula.

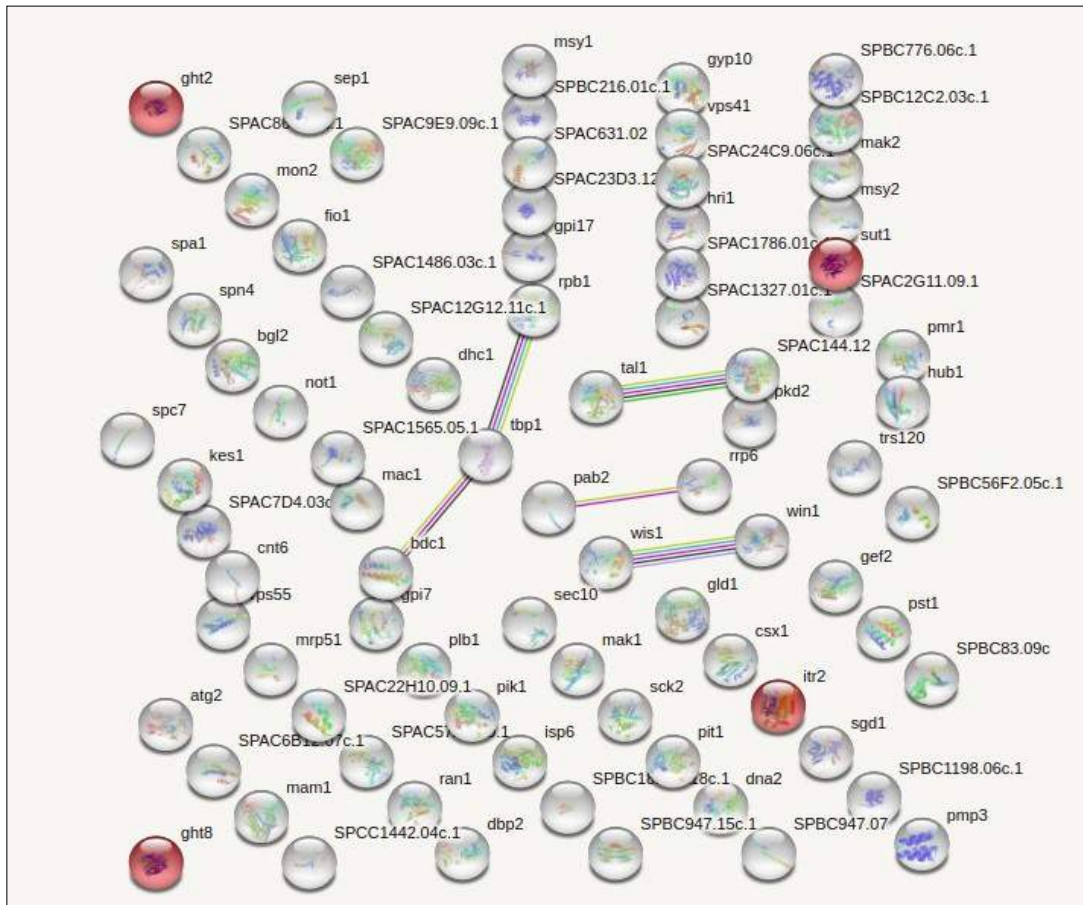


Fig 11. Red que cubre todas las proteínas involucradas obtenidas y sus interconexiones.

En el caso de Sut 1, es un gen que normalmente se encuentra reprimido en presencia de glucosa, este gen codifica a un transportador de captación de disacáridos acoplados a protones de la familia de simportadores de cationes glicósido-pentósido-hexurónico y también es capaz de transportar maltosa (Reinders, Ward; 2001).

Estos transportadores al no estar presente la glucosa, se expresarían para captar otras fuentes de carbono alternativas.

Identificación de regiones regulatorias de ncRNAs:



Para la identificación de las regiones regulatorias, se tomaron 400 pb río arriba de los ncRNAs, los archivos de entrada (el genoma de *S. pombe* en formato fasta y una tabla con los ID de los ncRNAs y su posición en el genoma) se cargaron al programa python3. Como archivos de salida, nos proporcionó dos documentos con las secuencias aisladas, una para los ncRNAs que se expresan en Glucosa y otras con las que se expresan en Glicerol/acetato.

```
ciencias@ciencias-desktop:~/Documentos/Karla/sequence/up_sequences$ python3 GetSequencesV2.py -f GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fa -l Atk_Gly_AS.txt -s 100
Genome file is GCF_000002945.1_ASM294v2_genomic.fa
Interest Region file is Atk_Gly_AS.txt
size of output region is 100
Output file is Atk_Gly_AS100.out
NC_003424.3
Seq('GATCACGTACATCACCTTGTAAGAATTTATCTGCAATAGTCCCTTCGGTATTGTA...ATC')
5579133
NC_003423.3
Seq('GATCTCGCAACTCTTAATAAAGCTAATTCCTGCTAATTCGTATACACTAAATC...TTT')
4539804
NC_003421.2
Seq('GATCAGCCAAAATGGCTGATCCAGCTATTTAGCAGTTAAGGTCTCGTTCGTTA...GGG')
2452883
NC_001326.1
Seq('AATGTGAATTTGAATCAATTTCTATCCTTTAAAAATACATCAAAGGTAC...TGT')
19431
Leyendo regiones
>NC_003424.3_SPNCRNA.2995_2226716_2226947_+ Length:100
original: TGTGCTAATAATAACACCATACAAAGGTAGAGATTTGGGTGGAAGAATAGCATTCTCGGTTCTGTCTCAACAGAAAACCTAACCAACTTCTCAAGGAGTcc
>NC_003423.3_SPNCRNA.4599_183073_183929_+ Length:100
original: CTATTGTTGTCGTTGATTGGTATCGTTAATCACAACGTTAGAAGCATATGTAAGTGTAGATCGATTGTCGGTCGAGCTAGCAAGGGTTGCTATTTTCAGG
```

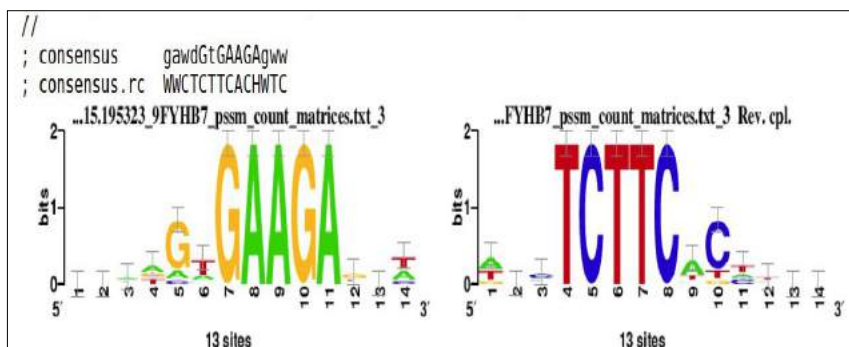
Una vez obtenidas estas secuencias aisladas, estos archivos Akt_Glu_AS100.out y Atk_Gly_AS100.out se cargaron en los programas Oligo analysis o Dyad Analysis de la sección Motif discovery en la herramienta Regulatory Sequence Analysis Tools (<http://rsat.sb-roscoff.fr/>) para la búsqueda de motivos.

Estos motivos se compararon para encontrar factores de transcripción que reconozcan a la secuencia conservada.

En la condición de glucosa encontramos tres diferentes motivos:

id1	id2	name1	name2	cor	Ncor	logoDP	NSW	NsEucl	w1	w2	w	W	Wr	wr1	wr2	strand
cluster_1	Sfl1p	cluster_1	Sfl1p	0.765	0.510	7.860	0.926	0.92750	14	21	14	21	0.6667	1.0000	0.6667	D
cluster_1	Ino4p	cluster_1	Ino4p	0.771	0.606	4.238	0.866	0.88976	14	11	11	14	0.7857	0.7857	1.0000	R
cluster_2	Swi5p	cluster_2	Swi5p	0.709	0.631	7.721	0.854	0.86483	9	8	8	9	0.8889	0.8889	1.0000	D
cluster_3	Swi5p	cluster_3	Swi5p	0.773	0.515	4.312	0.867	0.87107	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_1	Rap1p	cluster_1	Rap1p	0.802	0.428	3.897	0.948	0.91962	14	9	8	15	0.5333	0.5714	0.8889	D
cluster_2	Mig2p	cluster_2	Mig2p	0.820	0.615	0.325	0.877	0.88297	9	12	9	12	0.7500	1.0000	0.7500	R
cluster_2	Mig3p	cluster_2	Mig3p	0.820	0.615	0.325	0.877	0.88297	9	12	9	12	0.7500	1.0000	0.7500	R
cluster_2	Skn7p	cluster_2	Skn7p	0.776	0.604	9.640	0.848	0.85275	9	7	7	9	0.7778	0.7778	1.0000	D
cluster_2	Mig1p	cluster_2	Mig1p	0.820	0.615	0.325	0.877	0.88297	9	12	9	12	0.7500	1.0000	0.7500	R
cluster_3	Ace2p	cluster_3	Ace2p	0.844	0.563	1.437	0.916	0.89781	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_2	Skn7p	cluster_2	Skn7p	0.776	0.543	9.640	0.848	0.85275	9	8	7	10	0.7000	0.7778	0.8750	D
cluster_3	Ace2p	cluster_3	Ace2p	0.813	0.474	7.961	0.896	0.87796	12	7	7	12	0.5833	0.5833	1.0000	D
cluster_3	Cup2p	cluster_3	Cup2p	0.748	0.624	0.224	0.867	0.88453	12	10	10	12	0.8333	0.8333	1.0000	R
cluster_3	Hac1p	cluster_3	Hac1p	1.000	0.417	3.844	1.000	1.00000	12	5	5	12	0.4167	0.4167	1.0000	R
cluster_2	Ace2p	cluster_2	Ace2p	0.726	0.565	7.709	0.846	0.85176	9	7	7	9	0.7778	0.7778	1.0000	D
cluster_2	Tec1p	cluster_2	Tec1p	0.822	0.411	0.174	0.878	0.84388	9	6	5	10	0.5000	0.5556	0.8333	R
cluster_3	Swi5p	cluster_3	Swi5p	0.867	0.433	7.927	0.906	0.87500	12	6	6	12	0.5000	0.5000	1.0000	D
cluster_2	Ace2p	cluster_2	Ace2p	0.700	0.490	7.695	0.833	0.84565	9	8	7	10	0.7000	0.7778	0.8750	D
cluster_3	Ace2p	cluster_3	Ace2p	0.754	0.503	4.312	0.857	0.86612	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_2	Ecm22p	cluster_2	Ecm22p	0.722	0.561	7.709	0.845	0.85129	9	7	7	9	0.7778	0.7778	1.0000	D
cluster_2	Hac1p	cluster_2	Hac1p	0.733	0.407	7.687	0.800	0.80000	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D

Tabla 5. Factores de transcripción que reconocen a los motivos encontrados en condiciones de Glucosa.



El primer motivo hallado coincide con los factores de transcripción Ino4/ Sfl1 / Rap1 que corresponden al cluster 1.

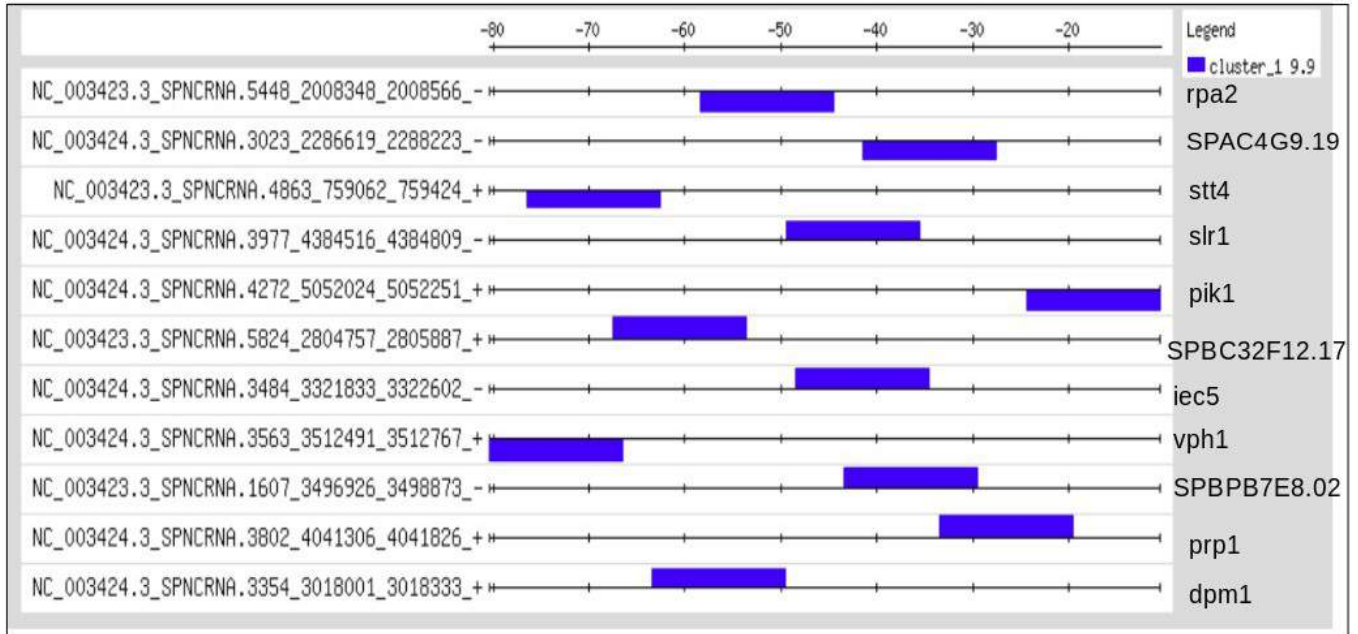
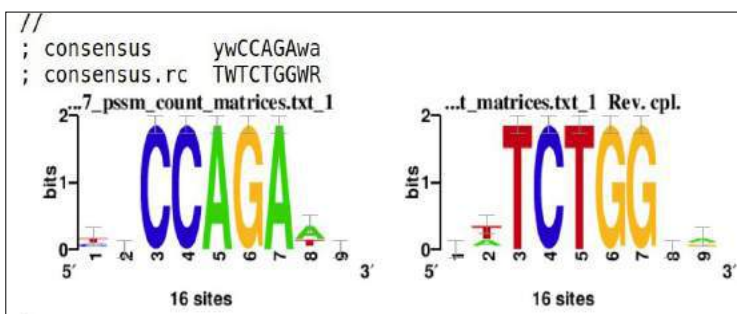


Fig12. En este mapa se muestra el cromosoma que pertenece el ncRNA, el nombre del ncRNA, la región en que se ubica y el sentido de la cadena, posteriormente de color azul muestra la región 100 pb río arriba de ncRNA en donde se encuentra el motivo y es reconocido por el factor de transcripción y en la derecha el mRNA que le corresponde.

En el segundo motivo encontramos Factores de Transcripción relevantes:



El segundo motivo hallado coincide con los factores de transcripción Swi5 / Ace / Mig1,2,3 / Skn7 / Tec1 / Ecm22 / Hac 1 que corresponden al cluster 2.

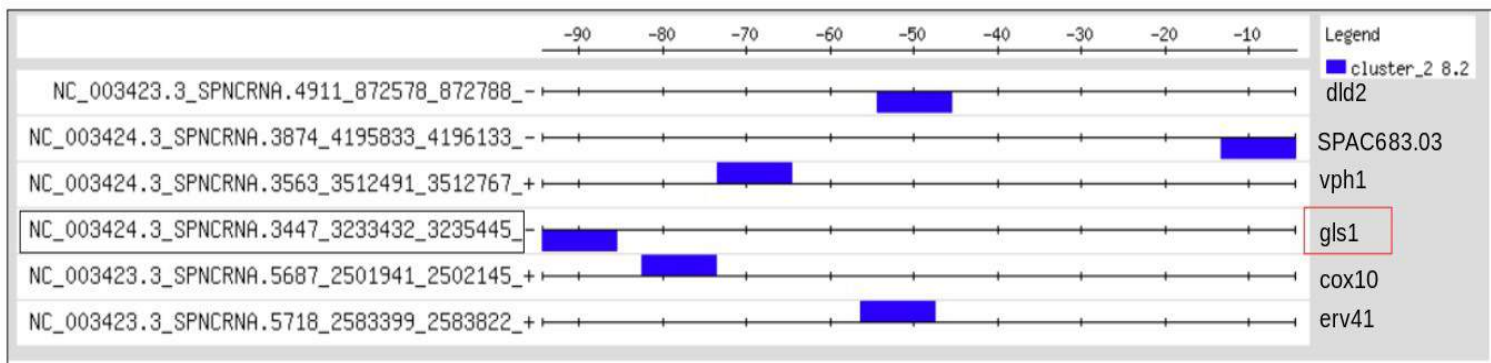
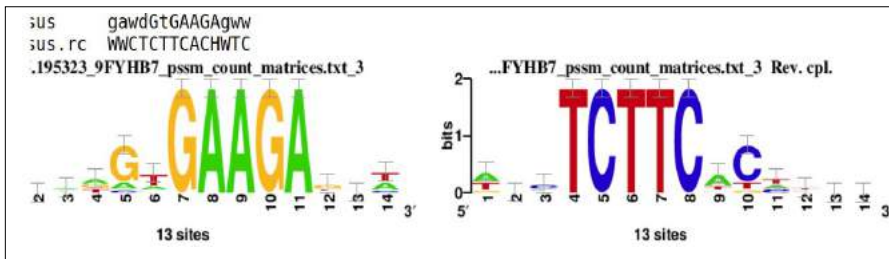


Fig.13 En este mapa se muestra el cromosoma que pertenece el ncRNA, el nombre del ncRNA, la región en que se ubica y el sentido de la cadena, posteriormente de color azul muestra la región 100 pb río arriba de ncRNA en donde se encuentra el motivo y es reconocido por el factor de transcripción y en la derecha el mRNA que le corresponde, en el recuadro rojo se encuentra un gen con expresión diferencial significativa.



El tercer motivo hallado coincide con los factores de transcripción Swi5 / Ace2 / Cup2 / Hac1 que corresponden al cluster 3.

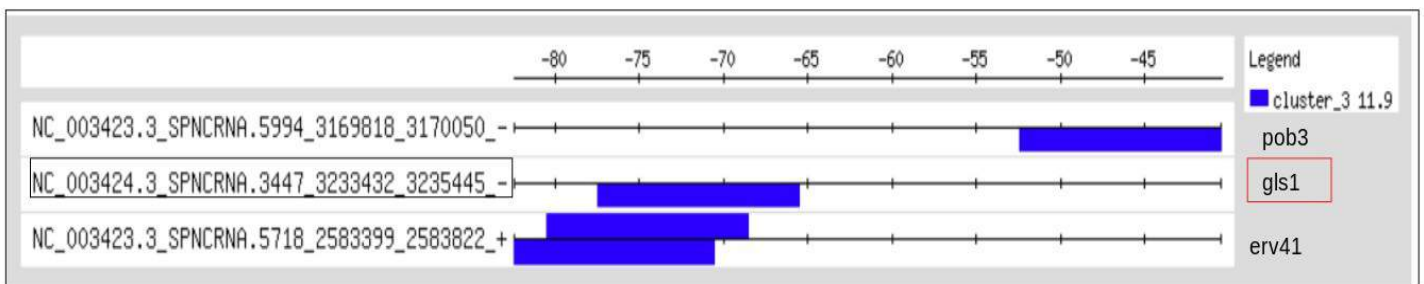


Fig.14 En este mapa se encontraron motivos parecidos al cluster 2, eso explicaría por que se encuentra expresado el mismo gen gls1.

En condiciones de glucosa, se hallaron motivos que pueden ser reconocidos por factores de transcripción relevantes que reconocen a esa misma región conservada, que fueron Mig1, Mig2 y Mig3 Swi5 y Skn7. Mig 1, Mig2 y Mig3 son represores de genes que normalmente se expresarían en ausencia de glucosa, Swi5 es una proteína que se asocia con Swi/Snf, un remodelador de cromatina y Skn7 es una proteína reguladora en respuesta a estrés.

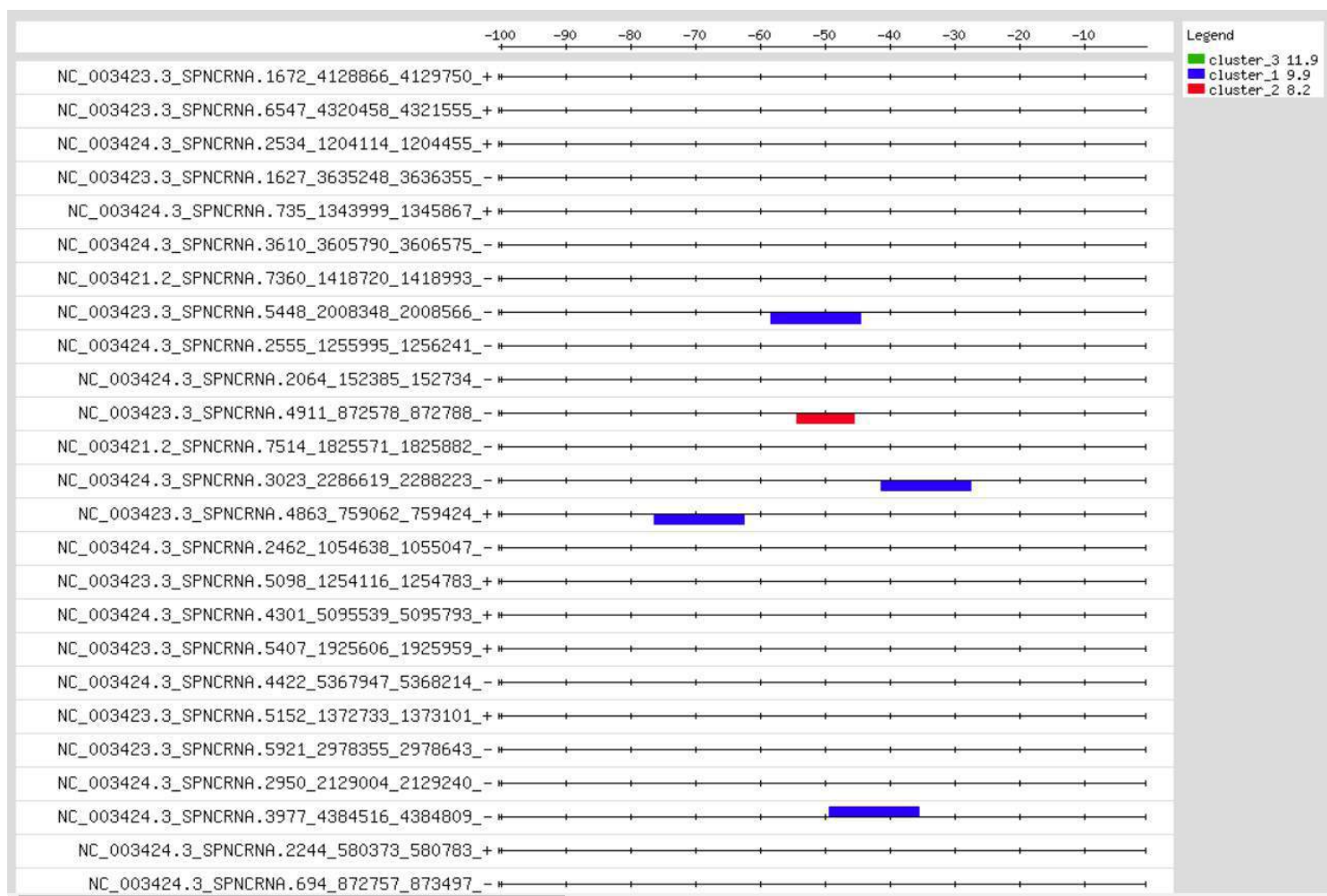
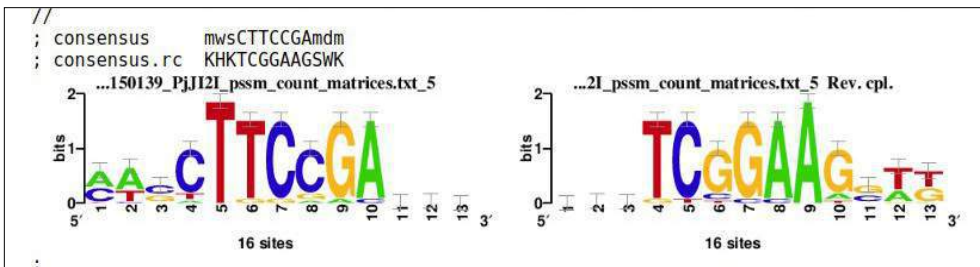


Fig.14 En este mapa muestra las regiones conservadas que se encontraron de forma general.

Dado que hay más ncRNAs expresados en condiciones de glicerol, encontramos más motivos en comparación con los de glucosa.

id1	id2	name1	name2	cor	Ncor	logoDP	NSW	NsEucl	w1	w2	w	W	Wr	wr1	wr2	strand
cluster_7	Pdr3p	cluster_7	Pdr3p	0.862	0.575	5.907	0.933	0.89452	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_7	Gsm1p	cluster_7	Gsm1p	0.929	0.516	0.185	0.966	0.91777	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	R
cluster_3	Stb4p	cluster_3	Stb4p	0.897	0.483	8.125	0.933	0.90247	13	7	7	13	0.5385	0.5385	1.0000	D
cluster_8	Rgm1p	cluster_8	Rgm1p	0.886	0.492	7.729	0.919	0.87307	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_8	Msn4p	cluster_8	Msn4p	0.886	0.492	7.729	0.919	0.87307	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_7	YLL054C	cluster_7	YLL054C	0.929	0.422	5.771	0.966	0.91777	9	7	5	11	0.4545	0.5556	0.7143	D
cluster_8	Gis1p	cluster_8	Gis1p	0.850	0.595	0.201	0.916	0.89031	9	8	7	10	0.7000	0.7778	0.8750	R
cluster_1	Hap3p	cluster_1	Hap3p	0.776	0.517	7.771	0.869	0.87210	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_1	Hap5p	cluster_1	Hap5p	0.776	0.517	7.771	0.869	0.87210	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_1	Hap4p	cluster_1	Hap4p	0.776	0.517	7.771	0.869	0.87210	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_1	Hap2p	cluster_1	Hap2p	0.776	0.517	7.771	0.869	0.87210	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_3	Cep3p	cluster_3	Cep3p	0.790	0.486	8.158	0.879	0.87710	13	8	8	13	0.6154	0.6154	1.0000	D
cluster_8	Adr1p	cluster_8	Adr1p	0.850	0.755	0.038	0.926	0.90396	9	8	8	9	0.8889	0.8889	1.0000	R
cluster_9	Xbp1p	cluster_9	Xbp1p	0.784	0.522	6.268	0.884	0.86122	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_8	YER130C	cluster_8	YER130C	0.763	0.572	2.093	0.881	0.88508	9	12	9	12	0.7500	1.0000	0.7500	R
cluster_8	Adr1p	cluster_8	Adr1p	0.902	0.702	0.060	0.947	0.91340	9	7	7	9	0.7778	0.7778	1.0000	R
cluster_1	Aft1p	cluster_1	Aft1p	0.751	0.501	7.342	0.885	0.87997	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_1	Aft2p	cluster_1	Aft2p	0.839	0.419	7.313	0.911	0.87800	12	6	6	12	0.5000	0.5000	1.0000	D
cluster_9	Swi5p	cluster_9	Swi5p	0.718	0.638	7.696	0.862	0.86855	9	8	8	9	0.8889	0.8889	1.0000	D
cluster_9	Mac1p	cluster_9	Mac1p	0.863	0.465	0.563	0.912	0.88813	9	11	7	13	0.5385	0.7778	0.6364	R
cluster_7	Hal9p	cluster_7	Hal9p	0.830	0.461	5.811	0.899	0.85785	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_7	Stb5p	cluster_7	Stb5p	0.745	0.522	5.914	0.874	0.86595	9	8	7	10	0.7000	0.7778	0.8750	D
cluster_7	Yrm1p	cluster_7	Yrm1p	0.812	0.443	5.882	0.902	0.87221	9	8	6	11	0.5455	0.6667	0.7500	D
cluster_7	Asg1p	cluster_7	Asg1p	0.941	0.523	5.772	0.972	0.92518	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_9	Ecm22p	cluster_9	Ecm22p	0.772	0.450	0.082	0.871	0.86425	9	10	7	12	0.5833	0.7778	0.7000	R
cluster_8	Rph1p	cluster_8	Rph1p	0.843	0.590	0.168	0.910	0.88650	9	8	7	10	0.7000	0.7778	0.8750	R
cluster_9	Upc2p	cluster_9	Upc2p	0.823	0.411	2.052	0.905	0.87435	9	9	6	12	0.5000	0.6667	0.6667	R
cluster_8	YGR067C	cluster_8	YGR067C	0.857	0.571	0.193	0.929	0.89152	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_8	Rei1p	cluster_8	Rei1p	0.793	0.476	2.089	0.860	0.84722	9	7	6	10	0.6000	0.6667	0.8571	R
cluster_8	Gis1p	cluster_8	Gis1p	0.886	0.492	0.014	0.919	0.87307	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	R
cluster_1	Aft1p	cluster_1	Aft1p	0.799	0.533	7.321	0.913	0.89576	12	8	8	12	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_9	Ace2p	cluster_9	Ace2p	0.727	0.565	7.696	0.849	0.85319	9	7	7	9	0.7778	0.7778	1.0000	D
cluster_8	Rds2p	cluster_8	Rds2p	0.740	0.444	6.120	0.846	0.83988	9	7	6	10	0.6000	0.6667	0.8571	D
cluster_8	Msn2p	cluster_8	Msn2p	0.827	0.459	0.037	0.903	0.86060	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	R
cluster_8	Nrg1p	cluster_8	Nrg1p	0.886	0.492	7.729	0.919	0.87307	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_8	Rph1p	cluster_8	Rph1p	0.886	0.492	7.729	0.919	0.87307	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_9	Stp1p	cluster_9	Stp1p	0.755	0.503	3.896	0.835	0.83431	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	R
cluster_3	Mot3p	cluster_3	Mot3p	0.931	0.430	7.497	0.955	0.91364	13	6	6	13	0.4615	0.4615	1.0000	D
cluster_7	Cat8p	cluster_7	Cat8p	0.709	0.405	4.993	0.871	0.87295	9	13	8	14	0.5714	0.8889	0.6154	R
cluster_8	Mig2p	cluster_8	Mig2p	0.771	0.514	7.708	0.860	0.84722	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_8	Rph1p	cluster_8	Rph1p	0.859	0.515	0.150	0.874	0.85522	9	7	6	10	0.6000	0.6667	0.8571	R
cluster_6	Nrg2p	cluster_6	Nrg2p	0.789	0.574	0.223	0.870	0.87271	11	8	8	11	0.7273	0.7273	1.0000	R
cluster_7	Stb5p	cluster_7	Stb5p	0.879	0.489	5.780	0.941	0.89170	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_7	Aro80p	cluster_7	Aro80p	0.820	0.546	5.807	0.914	0.88040	9	6	6	9	0.6667	0.6667	1.0000	D
cluster_9	Ace2p	cluster_9	Ace2p	0.713	0.633	7.697	0.859	0.86731	9	8	8	9	0.8889	0.8889	1.0000	D
cluster_6	Msn1p	cluster_6	Msn1p	0.715	0.417	2.193	0.874	0.86573	11	8	7	12	0.5833	0.6364	0.8750	R
cluster_7	Leu3p	cluster_7	Leu3p	0.803	0.446	5.900	0.867	0.83670	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_7	Ert1p	cluster_7	Ert1p	0.972	0.540	5.774	0.987	0.94815	9	5	5	9	0.5556	0.5556	1.0000	D
cluster_6	Nrg1p	cluster_6	Nrg1p	0.757	0.482	1.117	0.891	0.87503	11	7	7	11	0.6364	0.6364	1.0000	R
cluster_6	YGR067C	cluster_6	YGR067C	0.775	0.423	3.980	0.905	0.87428	11	6	6	11	0.5455	0.5455	1.0000	D

Tabla 6. Factores de transcripción que reconocen a los motivos encontrados en condiciones de Glicerol.



El primer motivo hallado coincide con los factores de transcripción Stb4/ Cep3 /Mot3 que corresponden al clúster 4.

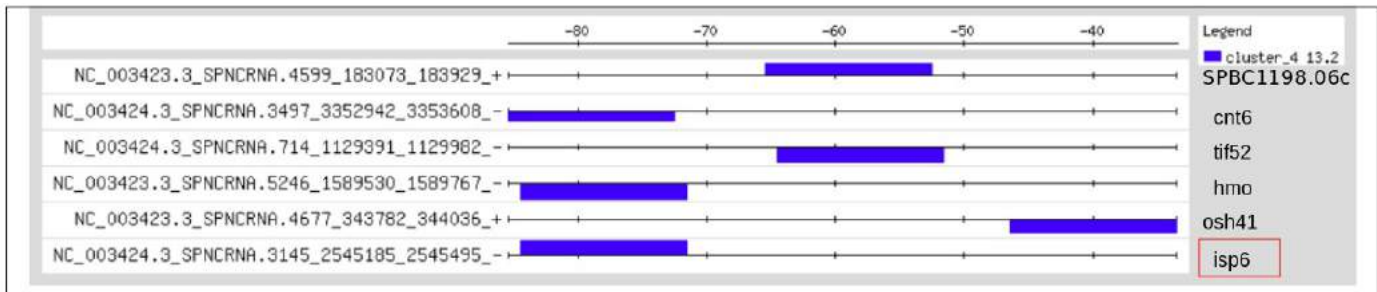
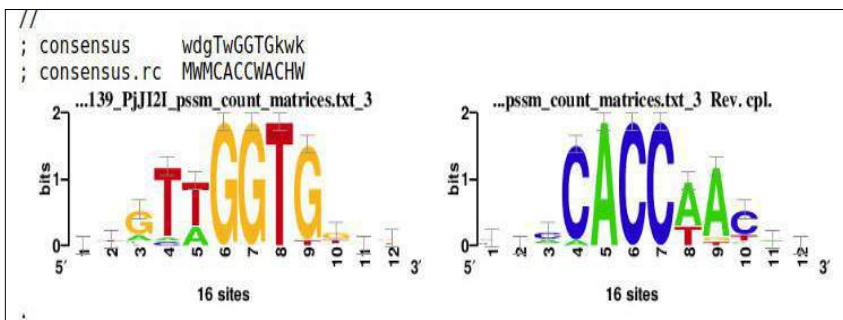


Fig15. En este mapa se muestra se encontró el gen isp6 que se expresa en Glicerol y / o Glucosa



El segundo motivo hallado coincide con los factores de transcripción Hap 2, 3, 4, 5 / Atf1 / Atf2 que corresponden al clúster 1.

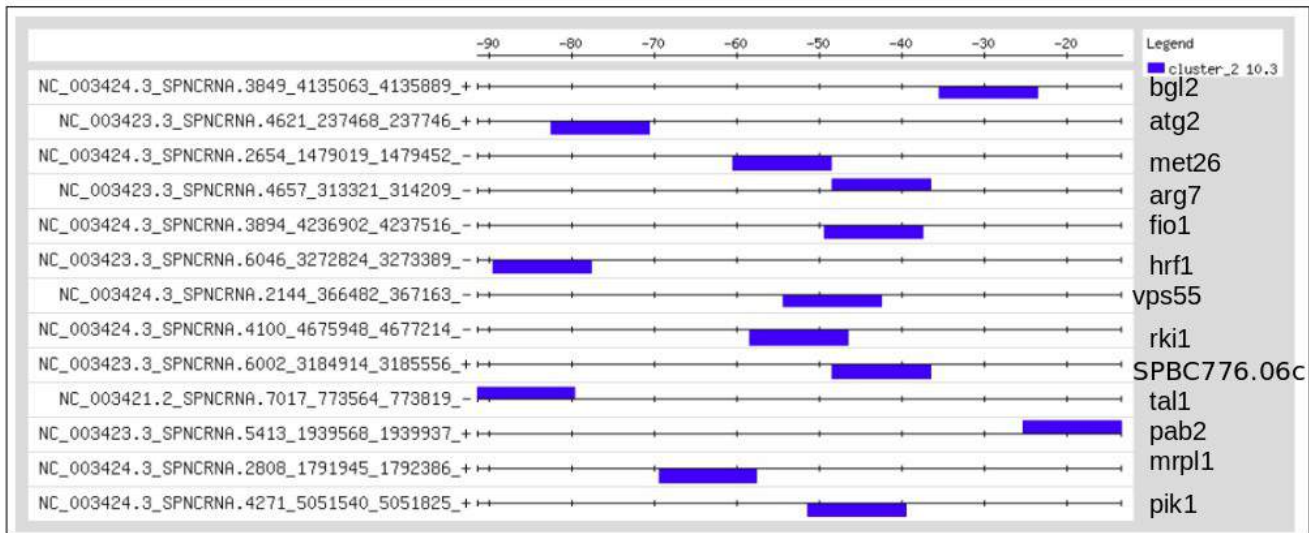
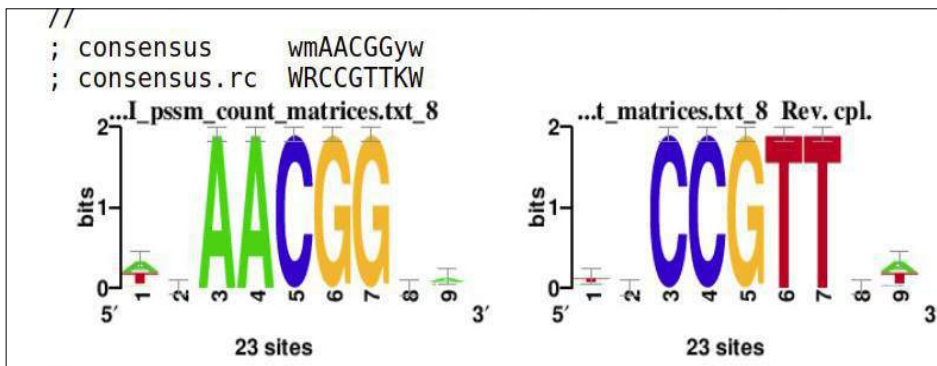


Fig.16 En este mapa no se encontraron genes con expresión diferencial.



El tercer motivo hallado coincide con los factores de transcripción Pdr3 / Gsm 1 / YLL054C / Hal9 / Stb5 / Yrm1 / Asg1 / Cat8 / Aro 80 / Leu3 que corresponden al clúster 1.

Encontramos que esos motivos pueden ser reconocidos por factores de transcripción relevantes como Cat8, Asg1 y Pdr3.

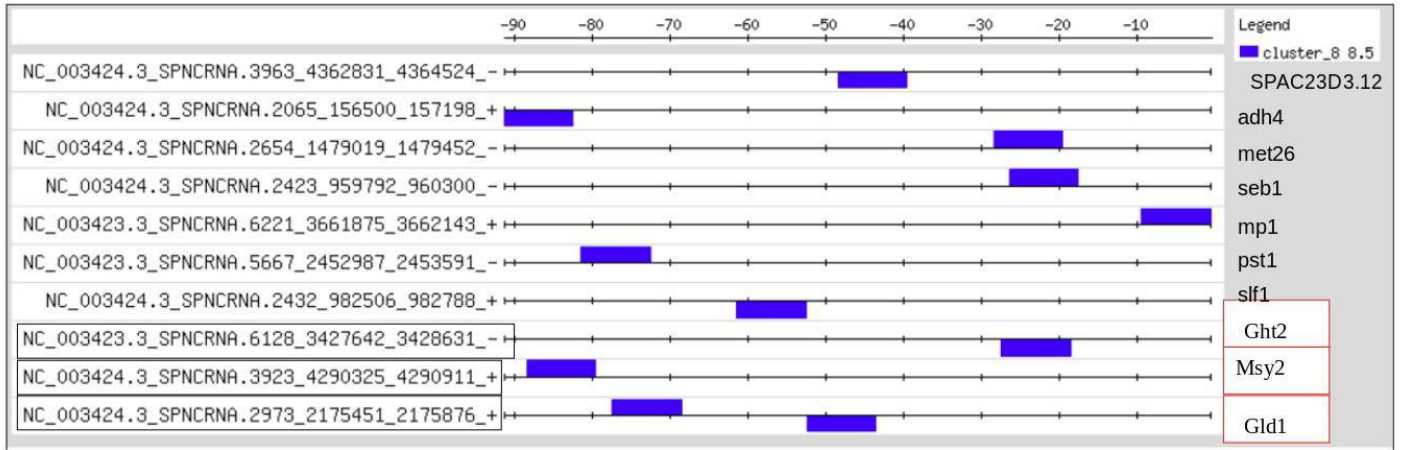
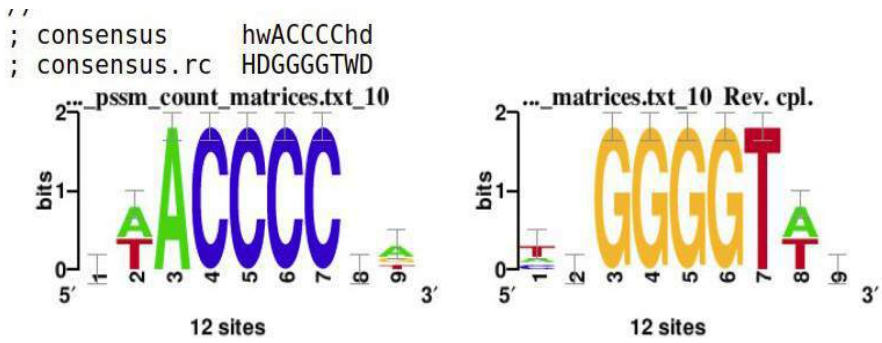
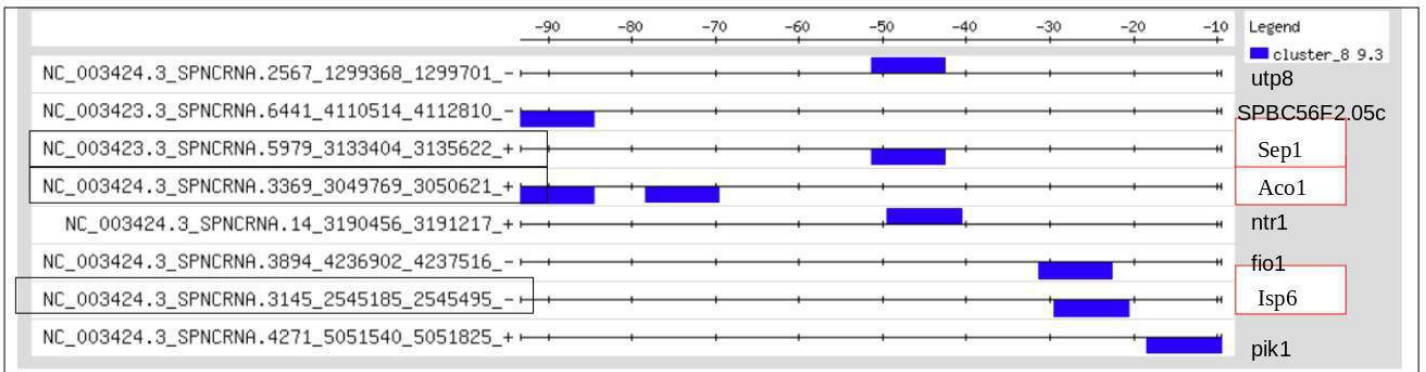
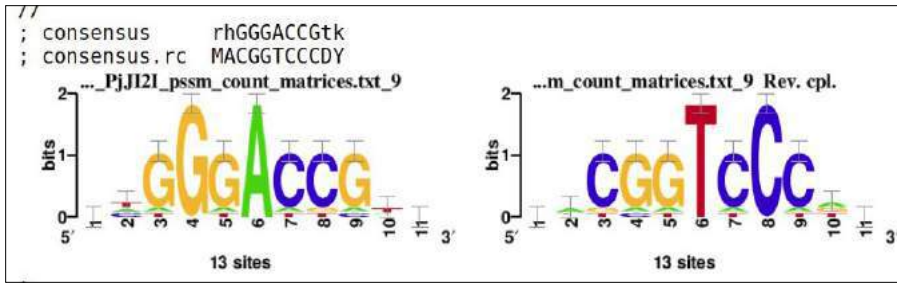


Fig17. En este mapa se encontró tres genes con expresión diferencial significativa, Ght2, msy2 y gld1.



El cuarto motivo hallado coincide con los factores de transcripción Adr1 / Rgm1 / Gis 1 / Msn4 / YER130C / Rph1 / Rei1 / YGR067C / Rds2 / Msn2 / Nrg1 / Mig2 que corresponden al clúster 8.





El quinto motivo hallado coincide con los factores de transcripción Msn1 / Nrg1, 2 / YGR067C que corresponden al clúster 6.

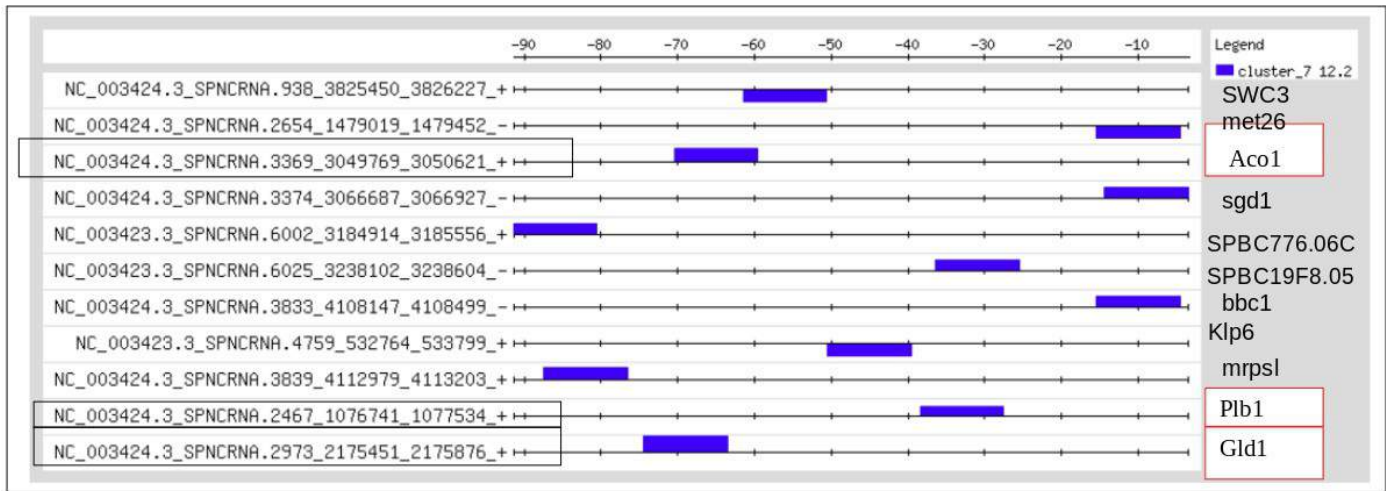
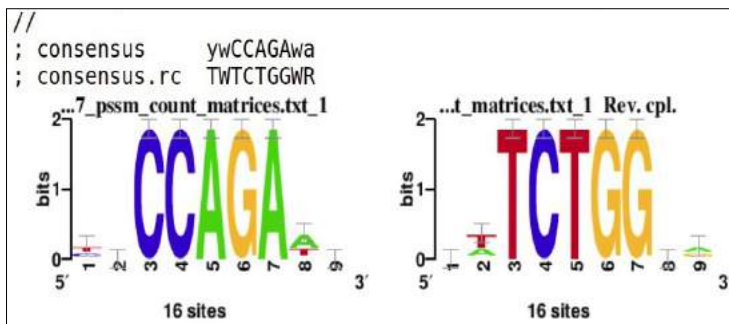


Fig18. En este mapa se muestra se encontró tres genes con expresión diferencial significativa, *Ght2*, *msy2* y *gld1*.



El sexto motivo hallado coincide con los factores de transcripción Ace2 / Stp1 / Upc2 / Mac1 / Swi5 / Xbp1 que corresponden al clúster 9.

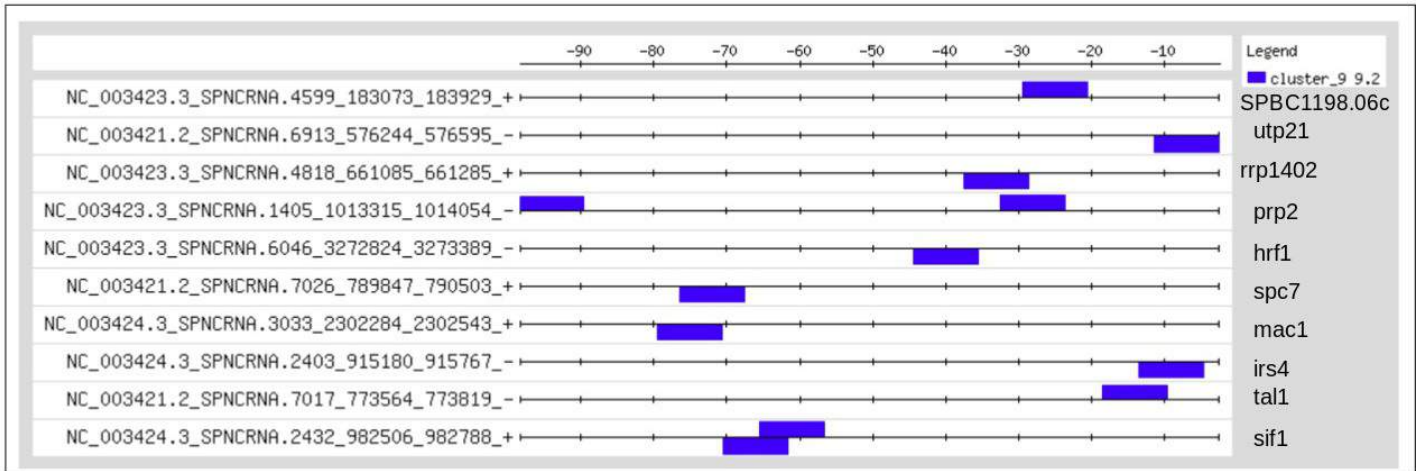


Fig.19 En este mapa muestra las regiones conservadas que se encontraron.

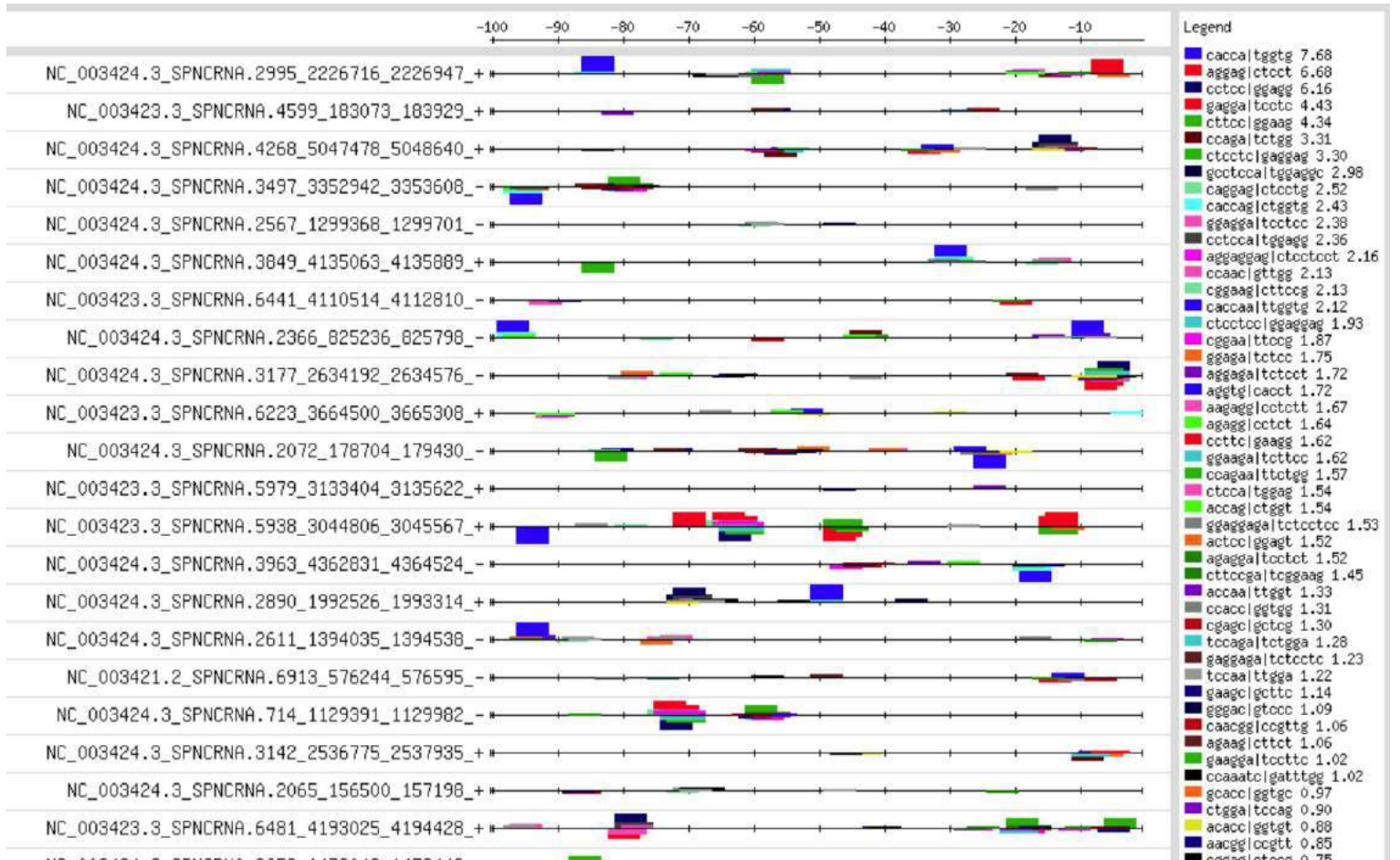


Fig.20 En este mapa muestra las regiones conservadas que se encontraron de forma general.

DISCUSIONES

En el programa IGV pudimos observar un ncRNA (SPNCRNA.1672) antisentido perteneciente a la vía DUTs expresado de forma específica en condiciones de glucosa, su transcripción complementaria, es decir el mRNA que codifica a la proteína Cnp3, es un componente que está involucrado en la fase meiótica, es decir que este ncRNA antisentido está enriquecido con un gen que juega un papel en la meiosis. Se sabe que en la levadura *S. pombe* la meiosis está controlada por lncRNAs (Till, Mach, Mach-Aigner; 2018), posiblemente este ncRNA pequeño estaría involucrado en la regulación del ciclo celular. Desafortunadamente no se identificaron motivos de regiones regulatorias a las que se unan factores de transcripción (FT) asociados a estos genes.

En presencia de glucosa, identificamos FT como Swi5, Mig 1,2,3, Skn7, Ace2, Tec1, Ecm22 y Hac1. Hac1 es una proteína homóloga a ATF/CREB1 que regula la respuesta de proteínas desplegadas, la biogénesis de la membrana y el inicio de la traducción reprimida en condiciones de estrés (Cox, Walter; 1996). Ecm22 es un elemento regulador en la expresión de genes implicados en el crecimiento filamentoso (Vik, Rine;2001). Tec1 Factor de transcripción dirigido a genes de filamentos (Chou, Lane, Liu; 2006). El factor SKn7 es un regulador de la respuesta nuclear y factor de transcripción, requerido para la inducción óptima de genes de choque térmico en respuesta al estrés oxidativo; involucrado en la osmorregulación (Raitt, Johnson, Erkine et. al;2000) también se ha visto que Skn7 sufre regulación de la localización nuclear por Swi/snf.

Ace2 y Swi5 son parálogos, Ace2 es un factor de transcripción que cumple funciones en la meiosis destruyendo el septum después de la citocinesis (Dohrmann, Voth, Stillman; 1996), Swi5 recluta a complejos mediador

Swi/Snf, también activa la transcripción de genes expresados en el límite de la fase M/G1 y la fase G1 (Bhoite, Yu, Stillman; 2001) Swi5 al reclutar a la proteína Swi/Snf un complejo de remodelación de la cromatina dependiente de ATP, necesario para la regulación positiva y negativa de la expresión génica de un gran número de genes. Cambia la estructura de la cromatina al alterar los contactos entre el ADN y las histonas dentro de un nucleosoma, lo que finalmente conduce a un cambio en la posición del nucleosoma, lo que facilita o reprime la unión de factores de transcripción específicos del gen (Monahan, Villén, Marguerat, et. al; 2008). Dado que reconoce los mismos sitios regulatorios que los represores Mig1, Mig2 y Mig3 podría estar reprimiendo genes. Mig1, 2 y 3 son proteínas represoras de unión al ADN que contienen dedos de zinc (Lutfiyya, Iyer, DeRisi, DeVit; 1998), su función es reprimir la transcripción de genes cuya expresión se interrumpe cuando hay glucosa presente, estas pueden ser enzimas que codifican para la utilización de azúcares como maltosa, sacarosa o galactosa (Lewis, Gasch; 2013). En el caso de Mig 1 y 2 se sabe que en presencia de glucosa estos se ubican en el núcleo para reprimir al gen CAT8 un factor de transcripción que desreprime genes que normalmente no se expresan en glucosa (proteína que identificamos en presencia de Glicerol), cuando hay escases de glucosa, Mig 1 y 2 son fosforiladas por el complejo quinasa Snf1 permitiendo la expresión del gen CAT8, una vez fosforilado es exportado al citoplasma por la exportina nuclear Msn5 (Carlson; 1999), e interactúa con Opy2 desencadenando la vía MAPK para regular genes en el crecimiento filamentoso y biofilm, este fenómeno sucede debido a su cambio de patrón de crecimiento debido a la limitación de nutrientes (Karunanithi, Cullen; 2012). Un gen relevante con expresión diferencial fue gls1 (ncRNA SPNCRNA.3447), una glucosidasa enzima que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos para generar glúcidos menores, forma parte de la regulación celular.

(Gallo, Valko, Aramburu, et. Al 2018).

Se mostró que el ncRNA SPNCRNA.2973 se expresa de forma específica en presencia de Glicerol, y el mRNA en la cadena opuesta que codifica para la proteína *gld1* también se expresa en esa condición y lo encontramos en los enriquecimientos de proteína en el programa STRING y también se encontró motivos que son reconocidos por los factores de transcripción Cat8, Nrg1,2 y Msn1. Cat8 es activador transcripcional del grupo de zinc; necesario para la desrepresión de una variedad de genes en condiciones de crecimiento no fermentativo, por lo que es coherente dado que Glicerol es considerada como fuente de carbono no fermentable, Cat8 se puede activar después del cambio diáuxico, es decir cuando se encuentra dos sustratos diferentes utilizados como dos fuentes de carbono para el crecimiento de levadura, se une a elementos sensibles a la fuente de carbono; la distribución relativa al núcleo aumenta con el estrés de replicación del DNA (Hedges, Proft, Entian; 1995). Nrg1, 2 son represores transcripcionales, cuando la levadura crece en glucosa estos FT se encuentran en el núcleo reprimiendo genes que se expresan en escases de glucosa, cuando hay escases de glucosa, estos FT se asocian con la proteína Snf1 para regular negativamente una variedad de procesos involucrados en el crecimiento filamentoso y biofilm (Kuchin, Vyas, Carlson; 2002).

Al igual que en el caso de glucosa, hallamos un ncRNA antisentido que se expresa a la par de su mRNA, y el mRNA codifica una proteína relacionada con la asimilación de glicerol, esto indicaría que este ncRNA estaría involucrado en la regulación metabólica de la levadura y que los factores de transcripción estarían regulando a los ncRNAs.

En el programa STRING identificamos enriquecimiento del proceso biológico de Transporte transmembranal de hexosa. En este caso 3 transportadores de Hexosas, dos de ellas *ght2* (ncRNA SPNCRNA.6127) y *Ght8* (ncRNA SPNCRNA.6753) las cuales se expresan en ausencia de glucosa y el tercer transportador *sut1* (ncRNA SPNCRNA.3760) como captador de maltosa como fuente alternativa, estos también tenían una expresión diferencial significativa de ncRNAs.

Sólo fue posible identificar motivos de unión a FT en el gen *ght2* que fueron Pdr3, Gsm1, YLL054C, Hal9, Stb5, Yrm1, Asg1, Cat8, Aro80 y Leu3. La expresión de PDR3 es un activador transcripcional que se regula en ausencia de crecimiento celular provocado por la limitación de glucosa o nitrógeno (Zampar, Kümmel, Ewald et. al; 2013), de Gsm1 se sabe poco, pero se ha propuesto que puede participar en la regulación del metabolismo energético (Deng, He, Wu, et. al; 2005). El FT YLL054C se desconoce, pero por su similitud con Pip2 podría estar involucrado en la proliferación de peroxisomas (Ahmed Khan, Zhang, Ismail T. et. al; 2000). Hal9 factor de transcripción putativo que contiene un dedo de zinc que tolera condiciones de estrés (Mendizabal, Rios, Mulet; 1998). Stb5 es un factor de transcripción involucrado en la regulación de resistencia a fármacos y la respuesta al estrés oxidativo (Larochelle, Drouin; 2006). Yrm1 es un factor de transcripción

de dedo de zinc implicado en la resistencia de fármacos (Lucau- Danila, Delaveau, Lelandais; 2003). Asg1 es una proteína clúster de zinc cuya función se piensa puede ser un regulador transcripcional involucrado en la respuesta a estrés, regular la utilización de ácidos grasos y la acumulación de lípidos (Jansuriyakul, Somboon, Rodboon et. a 2016). Leu3 es un factor de transcripción que regula genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y de leucina (Friden, Schimmel; 1998). Algunos FT tenían dedos de zinc, de los cuales los más relevantes fueron Cat8, Pdr3, Asg1 y YLL054C. Otros genes que tenían regiones regulatorias reconocidas por las proteínas antes mencionadas fueron *gld1* y *msy2* (SPNCRNA.3923) una proteína de canal de iones, involucrado en la homeostasis y se expresa en presencia de glicerol, en el crecimiento respiratorio de la célula, su ncRNA se expresa también de forma significativa (Malecki and Bähler; 2016).

Otro clúster interesante fueron los factores de transcripción Msn1, Nrg1, 2 y YGR067C. YGR067C es una proteína que se desconoce su función, pero se sabe que es muy similar a Adr1 (un activador transcripcional) (Böhm, Frishman, Mewes; 1997), Msn1 es un activador transcripcional involucrado en la regulación de la expresión de genes, esta se encuentra en el núcleo y responde al estrés osmótico, su supresor al igual que Msn2 y Msn4 es la proteína Snf1 (Tkach, Yimit, Lee, Riffle, et. al; 2012), en cambio las proteínas Nrg1 y 2 son represores transcripcionales, se sabe que en presencia de glucosa se reclutan con el complejo Cyc8p-Tup1p y reprime genes que estarían expresados en escases de glucosa (Zhou, Winston ; 2001), al igual que Msn1 comparte como supresor la proteína Snf1 (Kuchin , Vyas , Carlson; 2002). Al reconocer la misma región conservada, indicaría que, en presencia de glucosa, Nrg1 y 2 reprimen genes que están involucrados en las vías metabólicas relacionados con la respiración celular de la levadura, en cambio en presencia de Glicerol esta misma región es reconocida por

activadores como Msn1 y YGR067C que permitirían la expresión de estos genes. Al analizar el mapa de regiones regulatorias, encontramos que los genes junto con su ncRNA se expresan significativamente, los cuales fueron el gen *aco1* hidratasa de acónito (ncRNA SPNCRNA.3369), cataliza la isomerización de citrato a isocitrato vía cis-aconitato, contribuye a la tolerancia al estrés oxidativo y juega un papel importante en la respiración celular (Moeder, Del Pozo, Navarre et. Al; 2007), nuevamente encontramos el gen *gld1* y el gen *plb1* (ncRNA SPNCRNA.2467) una fosfolipasa involucrada en respuestas de estrés osmótico, lo cual podría ser provocado por la presencia de glicerol y también cataboliza procesos de glicerofosfolípidos (Yang, Du, Hoffman, Marcus; 2003).

En presencia de glicerol también encontramos un grupo factores de transcripción relevantes en el clúster 8, como Msn4, Rgm1, Gis1, Adr1, YER130C, Rph1, Rei1, YGR067C, Rds2, Msn2, Nrg1 y Mig2. Rgm1 es factor de transcripción putativo de unión al ADN con dedos de zinc; contiene dos dedos de zinc C2H2 N-terminal y un dominio rico en prolina C-terminal; la sobreproducción perjudica el crecimiento celular e induce la expresión de genes implicados en el catabolismo de monosacáridos y el metabolismo de aldehídos (Estruch; 1991). Gis1 es una histona desmetilasa y factor de transcripción; regula los genes durante la limitación de nutrientes (Pedruzzi, Bürckert, Egger, De Virgilio; 2000). YER130C es un homólogo de *C. albicans* (MNL1) juega un papel en la adaptación al estrés (De Nicola, Hazelwood, De Hulster et. AL; 2007) Rph1 es una histona desmetilasa se asocia con regiones transcritas activamente y promueve la elongación; represor de genes relacionados con la autofagia en condiciones repletas de nutrientes y también está asociado al estrés (Schroeder, Raimundo, Shadel; 2013). Rei1 involucrado en el crecimiento de brotes en la red de señalización mitótica (Iwase, Toh-e; 2004). YGR067C se desconoce su función, pero es muy similar a Adr1 (Böhm, Frishman, Mewes; 1997). Rds2 es un factor de transcripción implicado en la regulación de la gluconeogénesis; también involucrado en la regulación de los genes del ciclo del glioxilato; miembro de la familia de proteínas del clúster de zinc,

se ha visto expresada en fuentes de carbono no fermentables (Soontornngun, Larochelle, Drouin, at. Al 2007). Mig2 se identificó en motivos en condiciones de glicerol, probablemente reconoce el motivo y lo reprime en condiciones de glucosa. Como vimos anteriormente estaría ocurriendo algo similar con los FT Msn2, 4 y Nrg1, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha comprobado que los represores transcripcionales Nrg1 y Nrg2 reprimen genes involucrados a respuesta a estrés en presencia de glucosa y que estos mismos genes son objetivo de los activadores Msn2 y 4 (Vyas, Berkey , Miyao, Carlson;2005), el cual desreprimen genes relacionados a las vías de β -oxidación de ácidos grasos y peroxisomas, Msn2 y 4 aumentan en condiciones de agotamiento de glucosa, ya que como fuente de carbono utiliza los ácidos grasos y para evitar el exceso de ácidos grasos e intoxicar a las células Msn2 y 4 mantienen la homeostasis energética durante el estrés a la falta de glucosa, se ha encontrado que el FT Adr1 está involucrado en la regulación de genes peroxisomales(Rajvanshi, Arya , Rajasekharan; 2017). Adr1 también es capaz de asociarse con la proteína CAT8 (un FT que también hallamos) para desreprimir genes en condiciones de escasas de glucosa (Tachibana, Yoo, Tagne, Kacherovsky, Lee; 2005), de estos genes el que tuvo mayor expresión fue *aco1*, encontramos genes como *isp6* (ncRNA SPNCRNA.3145) y *sep1*(ncRNA SPNCRNA.5979) con una expresión relativamente media y ambos se encuentran involucrados en la respiración celular(Malecki, Bähler; 2016).

Finalmente, se realizó la búsqueda de FT que estuvieran involucrados en la transcripción de genes codificantes, en el caso de *gld1* y *ght2*, encontramos los Fs UGA3 un activador transcripcional para la inducción dependiente de GABA de genes GABA; se une a los elementos de ADN que se encuentran en los promotores de los genes diana y aumenta su expresión en presencia de GABA (André; 1990) y FKH2, factor de transcripción de la familia Forkhead; activador limitante de la velocidad de los orígenes de replicación; regulador conservado evolutivamente de la esperanza de vida; se une a múltiples elementos cromosómicos con distintas especificidades, dinámica del ciclo celular; regula positivamente el alargamiento

transcripcional; facilita la agrupación, la activación de los orígenes de replicación de activación temprana(Hollenhorst , Pietz, Fox; 2001) en *ght8* encontramos Sko1, un factor de transcripción cremallera de leucina básica de la familia ATF/CREB; forma un complejo con Tup1p y Cyc8p para activar y reprimir la transcripción; proteína citosólica y nuclear implicada en las respuestas al estrés oxidativo y osmótico(Rep, Proft M, Remize, et.Al 2001), Yap7es un represor transcripcional de la óxido nítrico oxidasa(Merhej, Delaveau, Guitard et.Al ;2015),Yox1 es un represor transcripcional Homeobox(Kaufmann E.; 1993). Pho2, factor de transcripción homeobox; los objetivos reguladores incluyen genes implicados en el metabolismo del fosfato (Liu C, Yang Z, Yang J, et al; 2000),Leu3 un factor de transcripción de nudillos de zinc, represor y activador (Baichwal , Cunningham, Gatzek; 1993) y *plb1* se encontró a Sum1 es un represor transcripcional que regula genes de esporulación media también actúa como factor general de iniciación de la replicación (Irlbacher, Franke et al; 2005)

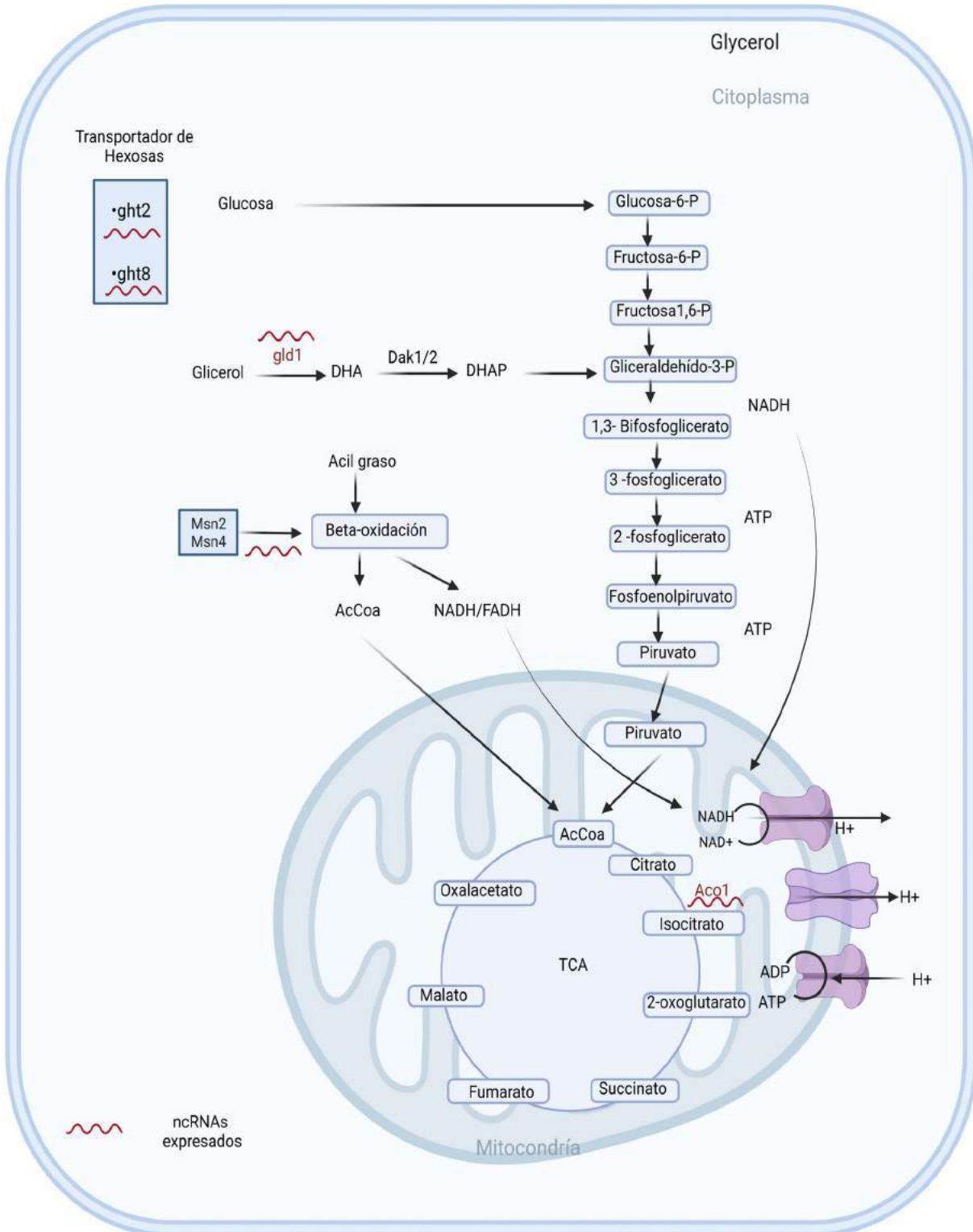
Cabe aclarar que al ser un análisis bioinformático debemos usar la información que está disponible. En este caso, las matrices se compararon con la base de datos de Factores transcripcionales de *S. cerevisiae* porque no hay una base de datos para FT de *S. pombe*. Sin embargo, se sabe que muchos de estos FT están relacionados o se comparten entre levaduras y en estudios que se han llevado a cabo, existen un cuadro comparativo de redes regulatorias para múltiples especies relacionadas por una filogenia conocida, el cual puede incorporar complejas relaciones de ortología de que surgen de la duplicación de genes, y analizaron qué FTs como Com2, Msn4, Msn2, Nrg1, Nrg2, Mig1, YGR067C,Mig2, Mig3, Mlp2, Mlp1, Rgt1, Tul1, Eds1, Hsf1, Mga1, Sfl1, Hms2, Skn7, Gis1, Rph1, Aft2, Aft1, Adr1, Bud27, Rsf2, y Tda , entre muchos otros, se conservaban en especies como *saccharomyces cerevisiae* *C. glabrata* *S. castellii* *K. lactis* *C. albicans* *S. pombe* (Koch, Konieczka, Delorey, Lyons, et al;2017) así como sus sitios de reconocimiento a DNA. Faltarían más experimentos precisos

relacionados a la asociación de la interacción de proteínas con su mRNA y su ncRNAs, también obtuvimos varios FT en una región regulatoria por ser parecidos, ya sea por pertenecer a la familia de dedos de zinc o eran parálogos, por la literatura se sabe que algunos interactúan simultáneamente.

Vía Metabólica

FIG. 21 En la siguiente imagen se muestra los ncRNAs identificados con expresión diferencial significativa, al tener como fuente de carbono el glicerol, este será transportado por ght2 y ght8, posteriormente la proteína gld1 y su ncRNAs se expresarán y catalizarán al glicerol con la ayuda de una NAD⁺ para formar una dihidroacetona, DAK 1 y DAK 2, estos genes que normalmente están reprimidos en glucosa, estas fosforilan a la dihidroacetona para poder entrar a la vía de la glucólisis, posteriormente al ciclo de Krebs y a la respiración celular, por ser una fuente de carbono no fermentable.

También se identificaron los factores de transcripción Msn2 y 4 que activan genes involucrados a la beta-oxidación de ácidos grasos y encontramos *e x p r e s i ó n* ncRNAs en esos genes, los cuales sus productos también se dirigen a la respiración celular.



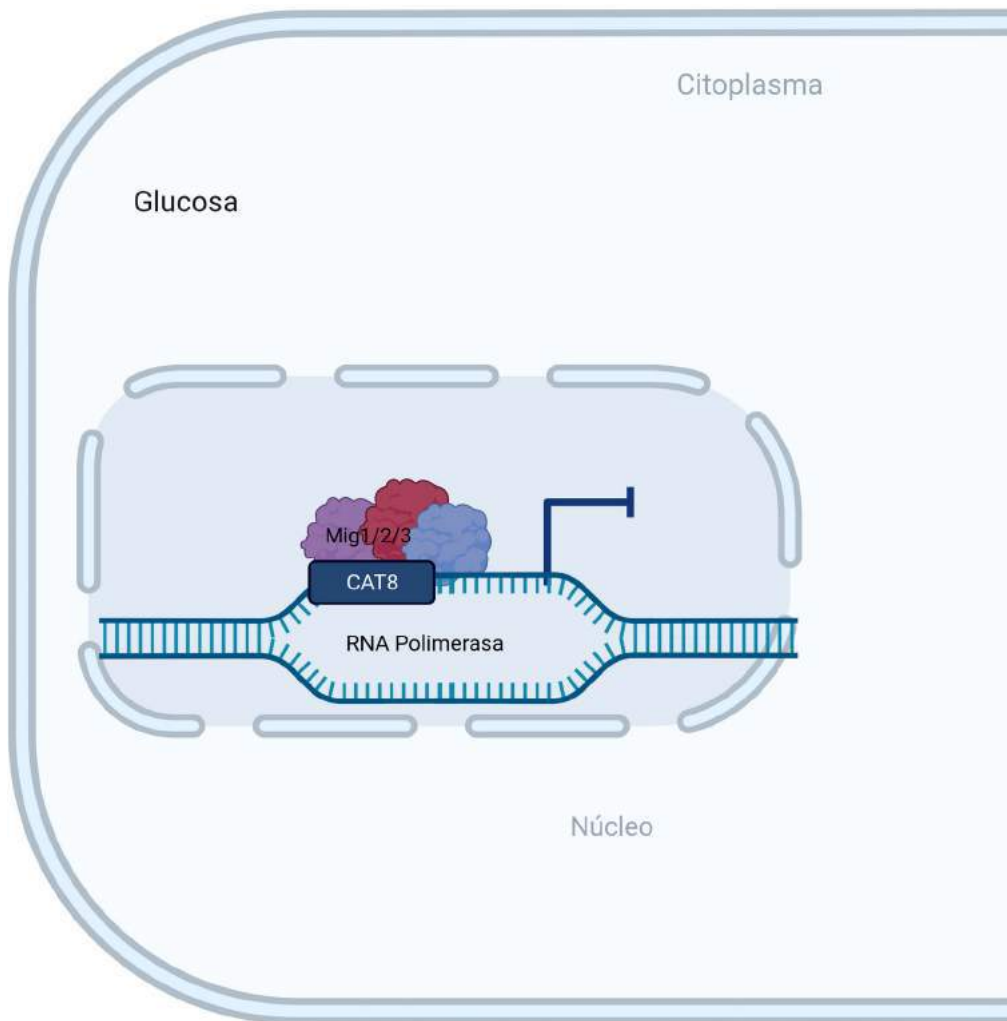


Fig. 22 En condiciones de glucosa, encontramos represores transcripcionales, como Mig 1,2,3 y otras proteínas que reconocen a la misma región, probablemente formando un complejo y reprimiendo genes que se expresarían a falta de glucosa como CAT8, un FT que también se identificó.

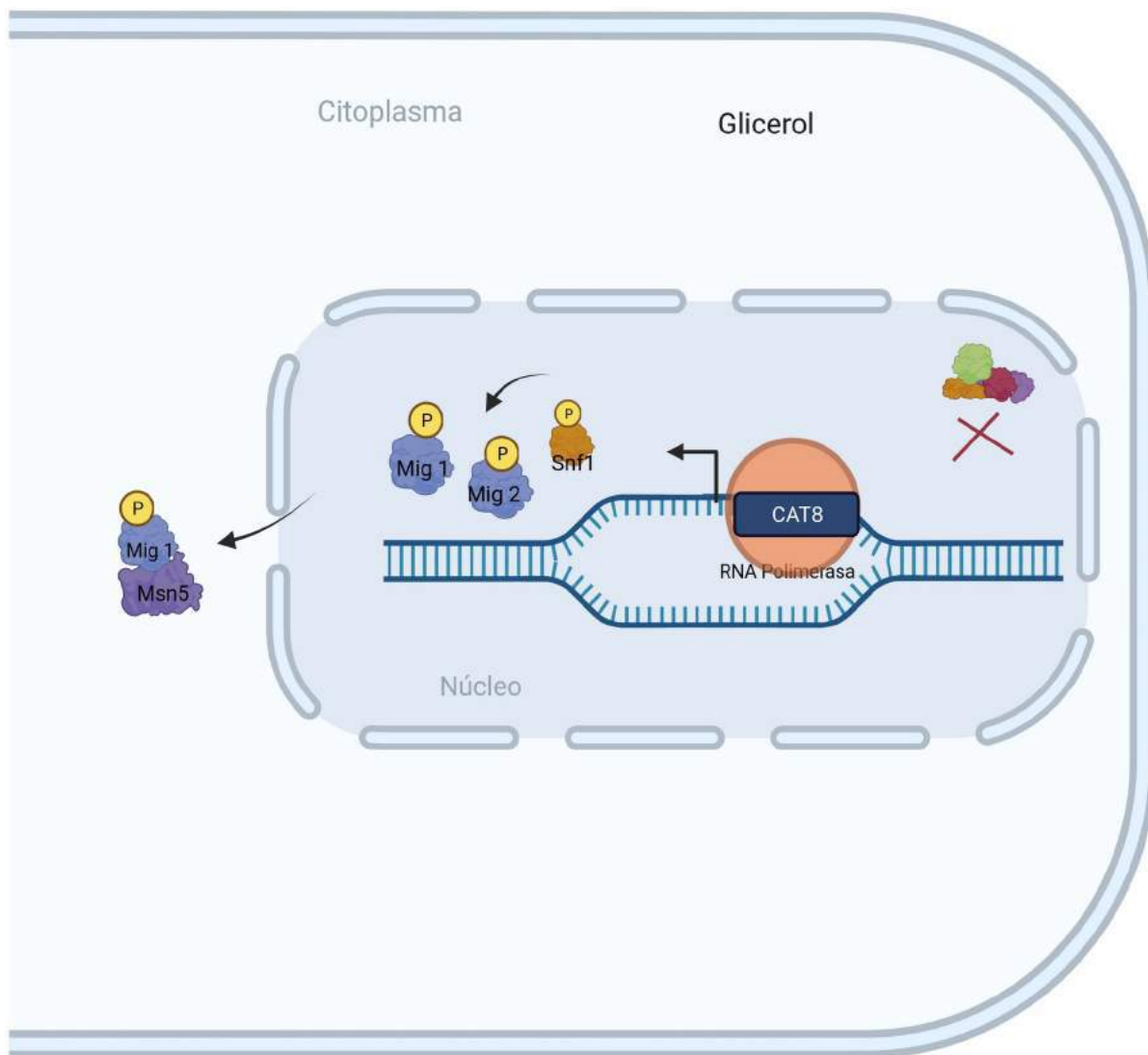


Fig. 23 En condiciones de glicerol, los represores transcripcionales, como Mig 1,2,3 se fosforilan por la proteína Snf1 y salen al citoplasma con la ayuda de la exportina Msn5, permitiendo la transcripción y expresión de CAT8.

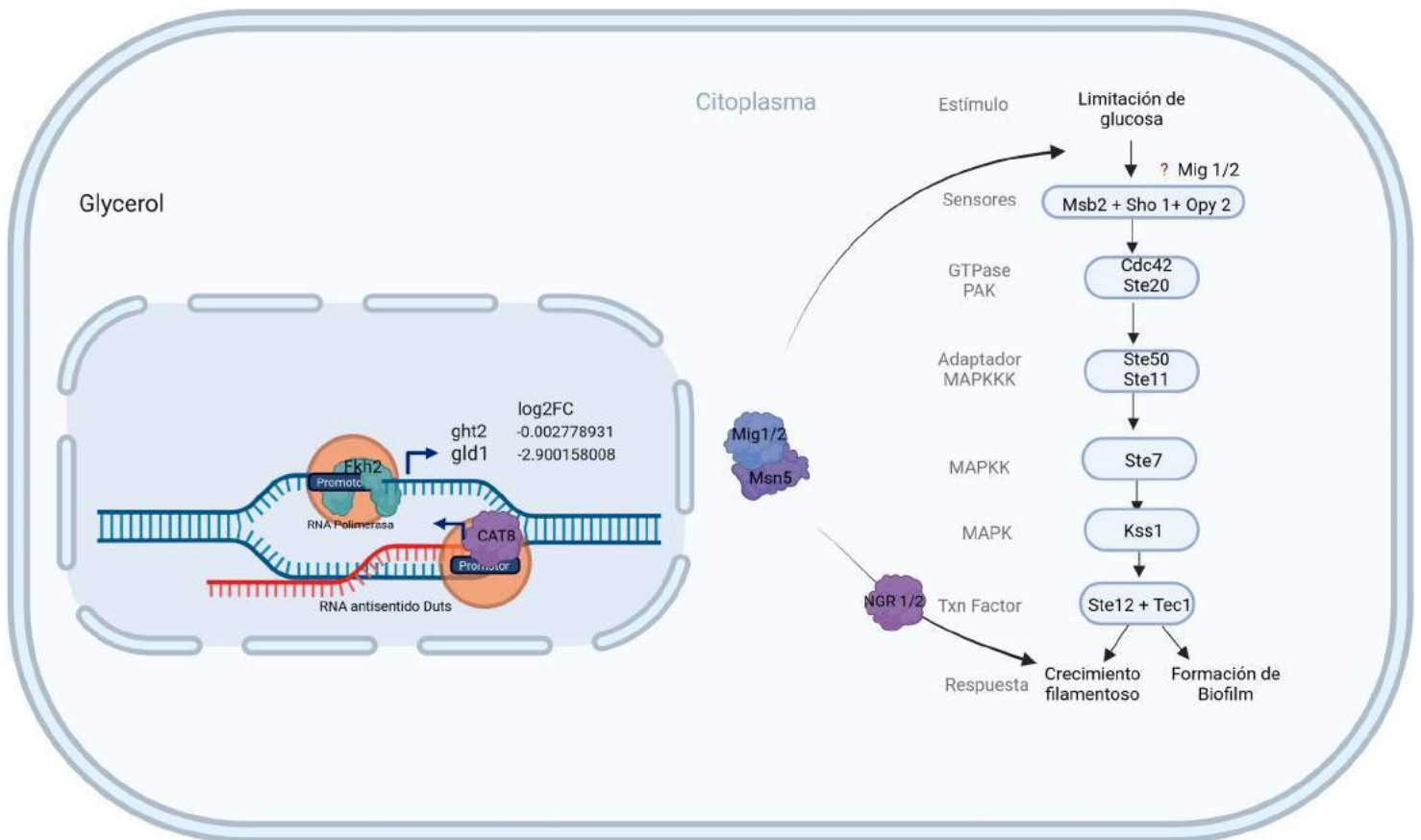


Fig. 24 Una vez traducida CAT8 es capaz de asociarse con proteínas como Adr1 y unirse a sitios de unión específicas y desreprimir genes que normalmente están reprimidos en glucosa, en este caso se identificaron ncRNAs y mRNAs que se expresan a la falta de glucosa. A la falta de glucosa, se sabe que Mig 1,2 se fosforila por Snf1 y sale al citoplasma unirse a Opy2 y desencadenar la vía de fosforilación MAPK y funcionar como un activador de los factores de transcripción Ste12+Tec1 que están involucrados en el crecimiento filamentososo y la formación de Biofilm, (ocurre algo similar con Ngr1, 2).

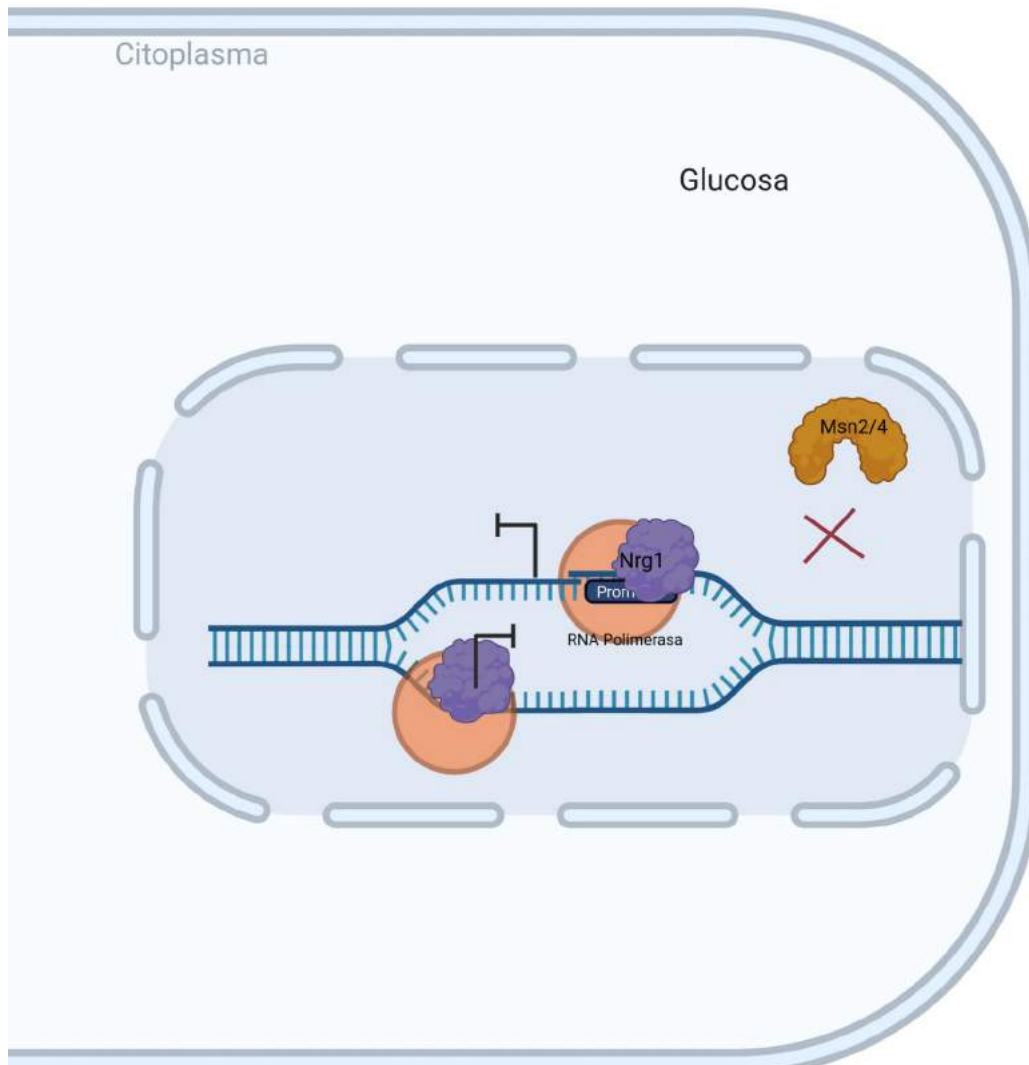


Fig. 25 Identificamos que el FT Nrg1 reconoce el mismo sitio que los FT Msn 2 y 4 , probablemente Nrg1 sirve como represor transcripcional del mRNA y ncRNA (DUTs, antisentido) en condiciones de glucosa.

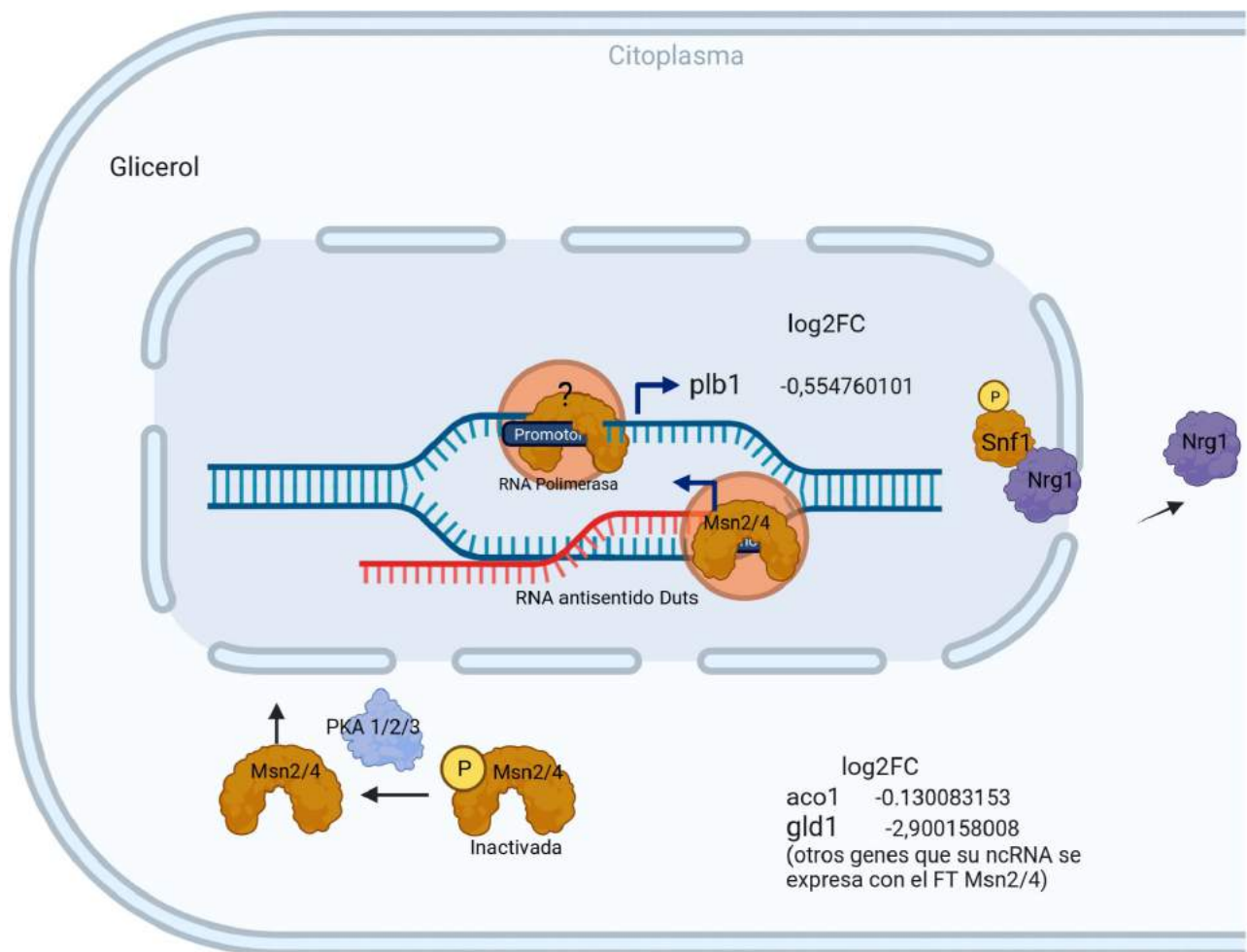


Fig. 26 Identificamos los FT Msn2 y 4 asociados a mRNAs y ncRNAs(DUTs, antisentido) relacionados con la asimilación del glicerol y la respiración celular, también se tiene reportados que Msn2 y 4 están involucrados en la expresión de genes relacionados a la beta-oxidación y peroxisomales. En nuestro trabajo también encontramos FT relacionados a la expresión de peroxisomas. Como se sabe en la literatura, Nrg1 se encontraría fosforilado y se asociaría con otros genes relacionados al crecimiento filamentoso.

CONCLUSIONES

Al utilizar el programa ShortStack encontramos las lecturas de los ncRNAs, estas lecturas se analizaron con el programa IDEAMEX para determinar su expresión diferencial, en general encontramos una mayor expresión diferencial en la condición de Glicerol/Acetato que el de Glucosa. Comprobamos que las réplicas de glucosa, como de glicerol se comportan de forma similar entre ellas, mostrando que son datos confiables para el análisis bioinformático.

Hallamos ncRNAs que sólo se expresan en glucosa o en glicerol, y en algunos casos se expresaban en ambas, realizamos la búsqueda de su mRNA y el papel que jugaba su proteína, y concluimos que los ncRNAs tienen una regulación a nivel metabólico y molecular.

Al analizar los enriquecimientos de proteína, encontramos transportadores de hexosas que asimilan como fuente de carbono el glicerol.

Realizamos la búsqueda de motivos, al obtener estas matrices, se llevó a cabo una comparación de los factores de transcripción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que reconocen la secuencia conservada, encontramos factores de transcripción con una relación directa en ambas condiciones que posiblemente estarían regulando tanto su mRNA como su ncRNA, en la base de datos encontramos en la mayoría de los FT identificados tienen como función principal ser represores y activadores de la expresión ncRNAs dependiendo de la fuente de carbono. Hallamos FT que regulan la expresión de ncRNAs en condiciones de glicerol, y en base a la literatura estos FT normalmente están reprimidas en glucosa.

Se lograron los objetivos al identificar los ncRNAs, determinar su expresión diferencial en ambas condiciones, hallar sus sitios regulatorios y los FT que estarían interactuando.

REFERENCIAS

Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., & Ferrari, R. (2018). Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in bioinformatics*, 19(2), 286–302. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw114>

Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919–929. <https://doi.org/10.1038/35103511>

Cheng, C., Moore, J., & Greene, C. (2014). Applications of bioinformatics to non-coding RNAs in the era of next-generation sequencing. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 412–416. https://doi.org/10.1142/9789814583220_0039

Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* (2006) Apr 15;15 Spec No 1:R17-29. [10https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046](https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046)

Watanabe, Y., & Kanai, A. (2011). Systems Biology Reveals MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Frontiers in genetics*, 2, 29. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00029>

Yamashita A, Shichino Y, Yamamoto M. The long non-coding RNA world in yeasts. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan;1859(1):147-54. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.08.003. Epub 2015 Aug 8. PMID: 26265144.

Leong, H. S., Dawson, K., Wirth, C., Li, Y., Connolly, Y., Smith, D. L., Wilkinson, C. R. M., & Miller, C. J. (2014). A global non-coding RNA system modulates fission yeast protein levels in response to stress. *Nature Communications*, 5(May), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms4947>

Geisler, S., & Collier, J. (2013). RNA in unexpected places: Long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(11), 699–712. <https://doi.org/10.1038/nrm3679>

Veneziano, D., Ferro, A., Croce, C. M., Bella, S. Di, Nigita, G., & Lagan, A. (2016). Noncoding RNA : Current Deep Sequencing Data Analysis. 1–57. <https://doi.org/10.1002/humu.23066>.This

Botstein, D., & Fink, G. R. (2011). Yeast: An experimental organism for 21st century biology. *Genetics*, 189(3), 695–704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>

Eide DJ. (2009). Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. Jul 10;284(28):18565-9.
doi: 10.1074/jbc.R900014200. Epub 2009 Apr 10. PMID: 19363031; PMCID: PMC2707215.

Bird AJ, Gordon M, Eide DJ, Winge DR. (2006). Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. *EMBO J*. Dec 13;25(24):5726-34. doi: 10.1038/sj.emboj.7601453. Epub 2006 Nov 30. PMID: 17139254; PMCID: PMC1698899.

Wilson S, Liu YH, Cardona-Soto C, Wadhwa V, Foster MP, Bird AJ (2019). The Loz1 transcription factor from *Schizosaccharomyces pombe* binds to Loz1 response elements and represses gene expression when zinc is in excess. *Mol Microbiol*. Dec;112(6):1701- 1717. doi: 10.1111/mmi.14384. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31515876; PMCID: PMC6904500.

Qu, Z., & Adelson, D. L. (2012). Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA. *Frontiers in Genetics*, 3(OCT), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00205>

Leong, H., Dawson, K., Wirth, C. et al. A global non-coding RNA system modulates fission yeast protein levels in response to stress. *Nat Commun* 5, 3947 (2014).
<https://doi.org/10.1038/ncomms4947>

Atkinson, S. R., Marguerat, S., Bitton, D. A., Rodríguez-López, M., Rallis, C., Lemay, J. F., Cotobal, C., Malecki, M., Smialowski, P., Mata, J., Korber, P., Bachand, F., & Bähler, J. (2018). Long noncoding RNA repertoire and targeting by nuclear exosome, cytoplasmic exonuclease, and RNAi in fission yeast. *Rna*, 24(9).

Latgé G, Poulet C, Bours V, Josse C, Jerusalem G (2018). Natural Antisense Transcripts: Molecular Mechanisms and Implications in Breast Cancers. *Int J Mol Sci*. Jan 2;19(1):123. doi: 10.3390/ijms19010123. PMID: 29301303; PMCID: PMC5796072.

Ma L, Bajic VB, Zhang Z. (2013) .On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*. Jun;10(6):925-33. doi: 10.4161/rna.24604. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23696037; PMCID: PMC4111732.

Wu X, Sharp PA. 2013. Divergent transcription: a driving force for new gene origination? *Cell* 155: 990–996.

Xu JZ, Zhang JL, Zhang WG. Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2018 Oct.;19(10):739-749. doi: 10.1631/jzus.B1700594. PMID: 30269442; PMCID: PMC6194357.

Vichi, J., Salazar, E., Jacinto, V. J., Rodriguez, L. O., Grande, R., Dantán-González, E., Morett, E., & Hernández-Mendoza, A. (2021). High-throughput transcriptome sequencing and comparative analysis of *Escherichia coli* and *Schizosaccharomyces pombe* in respiratory and fermentative growth. *PLoS ONE*, 16(3 March), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248513>

Ying Liu, Wei Ding, Wanpeng Yu, Yuan Zhang, Xiang Ao, Jianxun Wang, Long non-coding RNAs: Biogenesis, functions, and clinical significance in gastric cancer, *Molecular Therapy – Oncolytics*, Volume 23, (2021), Pages 458-476, ISSN 2372-7705, <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.11.005>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2372770521001546>)

A. Stupnikov, C.E. McInerney, K.I. Savage, S.A. McIntosh, F. Emmert-Streib, R. Kennedy, M. Salto-Tellez, K.M. Prise, D.G. McArt, Robustness of differential gene expression analysis of RNA-seq, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 19, 2021, Pages 3470-3481, ISSN 2001-0370, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.040>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S200103702100221X>)

Matsuzawa, T., Ohashi, T., Hosomi, A. *et al.* The *gld1+* gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87,715–727 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2586-3>

Tanaka K, Chang HL, Kagami A, Watanabe Y. CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell*. 2009 Sep;17(3):334-43. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.004. PMID: 19758558.

Damian Szklarczyk, Annika L Gable, Katerina C Nastou, David Lyon, Rebecca Kirsch, Sampo Pyysalo, Nadezhda T Doncheva, Marc Legeay, Tao Fang, Peer Bork, Lars J Jensen, Christian von Mering, The STRING database in 2021: customizable protein– protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets, *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue D1, 8 January 2021, Pages D605– D612, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

Saitoh S, Mori A, Uehara L, Masuda F, Soejima S, Yanagida M. Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR. *Mol Biol Cell*. 2015 Jan 15;26(2):373-86. doi: 10.1091/mbc.E14-11-1503. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25411338; PMCID: PMC4294683.

Reinders A, Ward JM. Functional characterization of the alpha-glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. *Mol Microbiol*. 2001 Jan;39(2):445-54. doi: 10.1046/j.1365- 2958.2001.02237.x. PMID: 11136464.

Till P, Mach RL, Mach-Aigner AR. A current view on long noncoding RNAs in yeast and filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018 Sep;102(17):7319-7331. doi: 10.1007/s00253-018-9187-y. Epub 2018 Jul 4. PMID: 29974182; PMCID: PMC6097775.

Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*. 2013 Jun;10(6):925-33. doi: 10.4161/rna.24604. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23696037; PMCID: PMC4111732.

Cox JS, Walter P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):391-404. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81360-4. PMID: 8898193.

Vik A, Rine J. Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2001 Oct;21(19):6395-405. doi: 10.1128/MCB.21.19.6395-6405.2001. PMID: 11533229; PMCID: PMC99787.

Chou S, Lane S, Liu H. Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2006 Jul;26(13):4794-805. doi: 10.1128/MCB.02053-05. PMID: 16782869; PMCID: PMC1489142.

Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 2000 Jul;11(7):2335-47. doi: 10.1091/mbc.11.7.2335. PMID: 10888672; PMCID: PMC14923.

Dohrmann PR, Voth WP, Stillman DJ. Role of negative regulation in promoter specificity of the homologous transcriptional activators Ace2p and Swi5p. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1746-58. doi: 10.1128/MCB.16.4.1746. PMID: 8657150; PMCID: PMC231161.

Bhoite LT, Yu Y, Stillman DJ. The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev*. 2001 Sep 15;15(18):2457-69. doi: 10.1101/gad.921601. PMID: 11562354; PMCID: PMC312787.

Monahan BJ, Villén J, Marguerat S, Bähler J, Gygi SP, Winston F. Fission yeast SWI/SNF and RSC complexes show compositional and functional differences from budding yeast. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Aug;15(8):873-80. doi: 10.1038/nsmb.1452. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18622392; PMCID: PMC2559950.

Lutfiyya LL, Iyer VR, DeRisi J, DeVit MJ, Brown PO, Johnston M. Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics. 1998 Dec;150(4):1377-91. doi: 10.1093/genetics/150.4.1377. PMID: 9832517; PMCID: PMC1460414.

Lewis JA, Gasch AP. Natural variation in the yeast glucose-signaling network reveals a new role for the Mig3p transcription factor. *G3* (Bethesda). 2012 Dec;2(12):1607-12. doi: 10.1534/g3.112.004127. Epub 2012 Dec 1. PMID: 23275883; PMCID: PMC3516482.

Carlson M. Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Apr;2(2):202-7. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80035-6. PMID: 10322167.

Karunanithi S, Cullen PJ. The filamentous growth MAPK Pathway Responds to Glucose Starvation Through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*.

Gallo GL, Valko A, Aramburu SI, Etchegaray E, Völker C, Parodi AJ, D'Alessio C. Abrogation of glucosidase I-mediated glycoprotein deglycosylation results in a sick phenotype in fission yeasts: Model for the human MOGS-CDG disorder. *J Biol Chem*. 2018 Dec 28;293(52):19957-19973. doi: 10.1074/jbc.RA118.004844. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30389790; PMCID: PMC6311512.

Hedges D, Proft M, Entian KD. CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1995 Apr;15(4):1915-22. doi: 10.1128/MCB.15.4.1915. PMID: 7891685; PMCID: PMC230417.

Kuchin S, Vyas VK, Carlson M. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):3994-4000. doi: 10.1128/MCB.22.12.3994-4000.2002. PMID: 12024013; PMCID: PMC133850.

Zampar GG, Kümmel A, Ewald J, Jol S, Niebel B, Picotti P, Aebersold R, Sauer U, Zamboni N, Heinemann M. Temporal system-level organization of the switch from

glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Mol Syst Biol.* 2013;9:651. doi: 10.1038/msb.2013.11. PMID: 23549479; PMCID: PMC3693829.

Deng Y, He T, Wu Y, Vanka P, Yang G, Huang Y, Yao H, Brown SJ. Computationally analyzing the possible biological function of YJL103C--an ORF potentially involved in the regulation of energy process in yeast. *Int J Mol Med.* 2005 Jan;15(1):123-7. PMID: 15583838.

Ahmed Khan S, Zhang N, Ismail T, El-Moghazy AN, Butt A, Wu J, Merlotti C, Hayes A, Gardner DC, Oliver SG. Functional analysis of eight open reading frames on chromosomes XII and XIV of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2000 Dec;16(16):1457-68. doi: 10.1002/1097-0061(200012)16:16<1457::AID-YEA635>3.0.CO;2-3. PMID: 11113969.

Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, de Larrinoa IF. Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* 1998 Mar 27;425(2):323-8. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00249-x. PMID: 9559673.

Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B. Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Mol Cell Biol.* 2006 Sep;26(17):6690-701. doi: 10.1128/MCB.02450-05. PMID: 16914749; PMCID: PMC1592823.

Lucau-Danila A, Delaveau T, Lelandais G, Devaux F, Jacq C. Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):52641-50. doi: 10.1074/jbc.M309580200. Epub 2003 Sep 25. PMID: 14512416.

Jansuriyakul S, Somboon P, Rodboon N, Kurylenko O, Sibirny A, Soontorngun N. The zinc cluster transcriptional regulator Asg1 transcriptionally coordinates oleate utilization and lipid accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 May;100(10):4549-60. doi: 10.1007/s00253-016-7356-4. Epub 2016 Feb 15. PMID: 26875874.

Friden P, Schimmel P. LEU3 of *Saccharomyces cerevisiae* activates multiple genes for branched-chain amino acid biosynthesis by binding to a common decanucleotide core sequence. *Mol Cell Biol*. 1988 Jul;8(7):2690-7. doi: 10.1128/mcb.8.7.2690-2697.1988. PMID: 3043190; PMCID: PMC363479.

Malecki M and Bähler J. Identifying genes required for respiratory growth of fission yeast [version 1; peer review: 4 approved]. *Wellcome Open Res* 2016, 1:12 (<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.9992.1>)

Böhm S, Frishman D, Mewes HW. Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jun 15;25(12):2464-9. doi: 10.1093/nar/25.12.2464. PMID: 9171100; PMCID: PMC146766.

Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, Hendry JA, Ou J, Moffat J, Boone C, Davis TN, Nislow C, Brown GW. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol*. 2012 Sep;14(9):966-76. doi: 10.1038/ncb2549. Epub 2012 Jul 29. PMID: 22842922; PMCID: PMC3434236.

Zhou H, Winston F. NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet*. 2001;2:5. doi: 10.1186/1471-2156-2-5. Epub 2001 Mar 19. PMID: 11281938; PMCID: PMC31344.

Kuchin S, Vyas VK, Carlson M. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol*. 2002 Jun;22(12):3994-4000. doi: 10.1128/MCB.22.12.3994-4000.2002. PMID: 12024013; PMCID: PMC133850.

Moeder W, Del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana*

benthamiana. *Plant Mol Biol.* 2007 Jan;63(2):273-87. doi: 10.1007/s11103-006-9087-x. Epub 2006 Oct 1. PMID: 17013749.

Yang P, Du H, Hoffman CS, Marcus S. The phospholipase B homolog Plb1 is a mediator of osmotic stress response and of nutrient-dependent repression of sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics.* 2003 Apr;269(1):116-25. doi: 10.1007/s00438-003-0820-8. Epub 2003 Feb 27. PMID: 12715160; PMCID: PMC4419572.

Estruch F. The yeast putative transcriptional repressor RGM1 is a proline-rich zinc finger protein. *Nucleic Acids Res.* 1991 Sep 25;19(18):4873-7. doi: 10.1093/nar/19.18.4873. PMID: 1923755; PMCID: PMC328782.

Pedruzzi I, Bürckert N, Egger P, De Virgilio C. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.* 2000 Jun 1;19(11):2569-79. doi: 10.1093/emboj/19.11.2569. PMID: 10835355; PMCID: PMC212766.

De Nicola R, Hazelwood LA, De Hulster EA, Walsh MC, Knijnenburg TA, Reinders MJ, Walker GM, Pronk JT, Daran JM, Daran-Lapujade P. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to zinc limitation in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Dec;73(23):7680-92. doi: 10.1128/AEM.01445-07. Epub 2007 Oct 12. PMID: 17933919; PMCID: PMC2168061.

Schroeder EA, Raimundo N, Shadel GS. Epigenetic silencing mediates mitochondria stress-induced longevity. *Cell Metab.* 2013 Jun 4;17(6):954-964. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.003. PMID: 23747251; PMCID: PMC3694503.

Iwase M, Toh-e A. Ybr267w is a new cytoplasmic protein belonging to the mitotic signaling network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Struct Funct.* 2004 Feb;29(1):1-15. doi: 10.1247/csf.29.1. PMID: 15107529.

Böhm S, Frishman D, Mewes HW. Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15;25(12):2464-9. doi: 10.1093/nar/25.12.2464. PMID: 9171100; PMCID: PMC146766.

Soontorngun N, Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B. Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol Cell Biol.* 2007 Nov;27(22):7895-905. doi: 10.1128/MCB.01055-07. Epub 2007 Sep 17. PMID: 17875938; PMCID: PMC2169140.

Vyas VK, Berkey CD, Miyao T, Carlson M. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2005 Nov;4(11):1882-91. doi: 10.1128/EC.4.11.1882-1891.2005. PMID: 16278455; PMCID: PMC1287862.

Rajvanshi PK, Arya M, Rajasekharan R. The stress-regulatory transcription factors Msn2 and Msn4 regulate fatty acid oxidation in budding yeast. *J Biol Chem.* 2017 Nov 10;292(45):18628-18643. doi: 10.1074/jbc.M117.801704. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28924051; PMCID: PMC5682970.

Tachibana C, Yoo JY, Tagne JB, Kacherovsky N, Lee TI, Young ET. Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol Cell Biol.* 2005 Mar;25(6):2138-46. doi: 10.1128/MCB.25.6.2138-2146.2005. PMID: 15743812; PMCID: PMC1061606.

Malecki M, Bähler J. Identifying genes required for respiratory growth of fission yeast. *Wellcome Open Res.* 2016 Nov 15;1:12. doi: 10.12688/wellcomeopenres.9992.1. PMID: 27918601; PMCID: PMC5133385.

André B. The UGA3 gene regulating the GABA catabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* codes for a putative zinc-finger protein acting on RNA amount. *Mol Gen Genet.* 1990 Jan;220(2):269-76. doi: 10.1007/BF00260493. PMID: 2109179.

Hollenhorst PC, Pietz G, Fox CA. Mechanisms controlling differential promoter-occupancy by the yeast forkhead proteins Fkh1p and Fkh2p: implications for regulating

the cell cycle and differentiation. *Genes Dev.* 2001 Sep 15;15(18):2445-56. doi: 10.1101/gad.906201. PMID: 11562353; PMCID: PMC312786.

Rep M, Proft M, Remize F, Tamás M, Serrano R, Thevelein JM, Hohmann S. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol.* 2001 Jun;40(5):1067-83. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02384.x. PMID: 11401713.

Merhej J, Delaveau T, Guitard J, Palancade B, Hennequin C, Garcia M, Lelandais G, Devaux F. Yap7 is a transcriptional repressor of nitric oxide oxidase in yeasts, which arose from neofunctionalization after whole genome duplication. *Mol Microbiol.* 2015 Jun;96(5):951-72. doi: 10.1111/mmi.12983. Epub 2015 Mar 28. PMID: 25732006.

Kaufmann E. In vitro binding to the leucine tRNA gene identifies a novel yeast homeobox gene. *Chromosoma.* 1993 Feb;102(3):174-9. doi: 10.1007/BF00387732. PMID: 8096171.

Liu C, Yang Z, Yang J, Xia Z, Ao S. Regulation of the yeast transcriptional factor PHO2 activity by phosphorylation. *J Biol Chem.* 2000 Oct 13;275(41):31972-8. doi: 10.1074/jbc.M003055200. PMID: 10884387.

Baichwal VR, Cunningham TS, Gatzek PR, Kohlhaw GB. Leucine biosynthesis in yeast : Identification of two genes (LEU4, LEU5) that affect α -Isopropylmalate synthase activity and evidence that LEU1 and LEU2 gene expression is controlled by α -Isopropylmalate and the product of a regulatory gene. *Curr Genet.* 1983 Sep;7(5):369-77. doi: 10.1007/BF00445877. PMID: 24173418.

Irlbacher H, Franke J, Manke T, Vingron M, Ehrenhofer-Murray AE. Control of replication initiation and heterochromatin formation in *Saccharomyces cerevisiae* by a regulator of meiotic gene expression. *Genes Dev.* 2005 Aug 1;19(15):1811-22. doi: 10.1101/gad.334805. PMID: 16077008; PMCID: PMC1182343.

Koch C, Konieczka J, Delorey T, Lyons A, Socha A, Davis K, Knaack SA, Thompson D, O'Shea EK, Regev A, Roy S. Inference and Evolutionary Analysis of Genome-Scale Regulatory Networks in Large Phylogenies. *Cell Syst.* 2017 May 24;4(5):543-558.e8. doi: 10.1016/j.cels.2017.04.010. PMID: 28544882; PMCID: PMC5515301.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **MARTINEZ RODRIGUEZ KARLA MARIANA** con número de matrícula **10002825** cuyo título es:

“Identificación de ncRNAs en Schizosaccharomyces pombe expresados diferencialmente en presencia de glucosa o glicerol/acetato”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR.**

Cuernavaca, Mor a 21 de febrero del 2023

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA	(Presidente)
DRA. SONIA DÁVILA RAMOS	(Secretario)
DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA	(Vocal)
DRA. ROSA MARIA GUTIERREZ RIOS	(Suplente)
MTRO. JOIVIER VICHI LOZADA	(Suplente)

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2023-02-22 11:26:31 | Firmante

mbDfidtw0UL7V7Mvxie2iJKYys1SM3yQuXe0CitnlafbbGcBGYRjZ6jETkblClaQE1txoubZF8hw257r1bqH/e6eQWqxy58Pll/FGKvM9CUusuhP4ZrheYVFE2SfDFRam3fwW0+kHMxSBEa1LGCMS7lblrvaBrFBwnYjokGcsFKpPK6lJl/OjWJrw3aeB5M+UdtOPbQHz5+tc3mEKI65XyJcttXAHBNGJyOwJJ1UEwKyDmiK1nSo7Ba7eXhXIXCoh6DtvVkQ8oRFwG6YHqC2FEKzuSZ05gCzDFXbNnraBPIXynDBgvtiARTf8jUUeslYFvEubTBs81SPz0/HWRUw==

ROSA MARÍA GUTIÉRREZ RÍOS | Fecha:2023-02-22 11:35:57 | Firmante

IxtwDCVNJ3novChCLooS4SjwcG1xyv+7gu3n+U+X1FBdb4RXw3+I+Xt/Ln+AoW3AgIsokt21ahMZrE4BwMdbEMQ6Q+Ch2KIGg+jpv26JpRiLce0iCwyw4bqHPLKQcyAtlmedbHnUsJgBNeYCugBQ2+5ByWRhtJuoAaxrwfuuzpZqdp9KJUui1R/mvKUUlh/PnG4L5Kw0YKNI3npxKysKPwACQXIUlfgDPB0Ls0RwGcNVFw60qxeTCL1mVoT4jINbZLjReLdYcoEiZG0tnlikilBuUYnMuOQBp9tDmUynE/yqWntUrEDTfVKKX007GNQtb927xFO3vbYIRTIJQ6fRBOZg==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2023-02-22 17:35:33 | Firmante

DrAsoPv+OOZQ09YxrHqPHy+naDqG4/g3Qb+Wc/7bpgHqOye0TytEp7payW1smT636UadPzC/luLOKDUxiWQssmcAxVR1c+jJIWmvMH5C2/9BhPiehnDF5lelcZgvEd5RNB25xM+QsVUZI9eU2ytfMENkFd9vxxv52jGv5FmUHQymIvGe62MPPV6c/jVVeifVONiwe71Fkr1U2s9GkU/ErNh6saq2/Mu+/dgbfby8c0821x1nR9hbNrsathqjCV1Whw+R7OzgQFFxTKEbyunetGY2TuDgl7ryOJl6sUBISW7RifLuOSG0v4VKRiNGu8PP9K+K+45UP9QLOThQ==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2023-02-23 06:01:16 | Firmante

PIQ6vqL1W1mPbO1XEwV3O3kt7ASDToqT9Lsi+lhoP71g0Dr8HomDunYvdth2B45jhnX9rDdGgwAG8r4bFGrxCd+SADa7IK0Arqrsgwlb77UqLhzYdV9zddov1A/wtLISI5Zv5SrONvwkhot0Ye773Fdpavvs8x4hdqjOofyrVloUlyrffhE7QwDR/Gx19JEwMYk3OdfcPKNqRWWd0lzoq3CdZBR62Ev6ZacjFN/g5ONQDQffh/IF8CRamiZ/t3gbHtAs6KzsYkWtUsZhwVVshtbdLktcATgmSuff9c4w889pE0cfj6nAbVdu3llkv60TflobXkaW1PNbKb+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UX3Dh6dbJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hDycZxu9CLY5yQe9ojp1oZZP21SaWzkk>