



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Fisiología Celular
Doctorado en Ciencias Biomédicas

Las aminotransferasas Bat1 y Bat2 de *Saccharomyces cerevisiae* divergieron funcionalmente del ortólogo tipo ancestral *K/Bat1* de *Kluyveromyces lactis*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A :
L. I. B. B. MARITRINI COLÓN GONZÁLEZ

Directora de Tesis: Dra. Alicia González Manjarrez

Ciudad Universitaria

Mayo 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LAS AMINOTRANSFERASAS Bat1 Y Bat2 DE *Saccharomyces cerevisiae* DIVERGIERON FUNCIONALMENTE DEL ORTÓLOGO TIPO ANCESTRAL K/Bat1 DE *Kluyveromyces lactis*

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Alicia González Manjarrez. Esta tesis forma parte de un proyecto general sobre el estudio de los genes *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* en el cuál también participaron Fabiola Hernández Lorenzo, Karla Concepción López Pacheco y James Enrique González Flores. Durante el desarrollo del trabajo experimental se contó con la invaluable ayuda y asesoría técnica de la Q. F. B. Cristina Aranda Fraustro.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los servicios de síntesis de oligonucleótidos (Biól. Dolores Minerva Mora Cabrera), secuenciación (Biól. María Guadalupe Códiz Huerta) y lectura de membrana radiactivas que provee la Unidad de Biología Molecular (a cargo de la Dra. Laura Ongay Larios) del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce el apoyo técnico de la Unidad de Cómputo a cargo de Gerardo Coello Coutiño y la asesoría de Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega.

El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), a través del donativo 49970; la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM, México) a través del donativo IN210706-3 e IN2042093; el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT, México) a través del donativo PIFUTP08-165 y el Macroproyecto de Tecnologías de la Información y la Computación (UNAM, México).

Durante la realización del proyecto se contó con una beca para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con número de registro 181619.

El Comité Tutorial estuvo conformado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El jurado de Examen Doctoral se constituyó por:

Dr. Armando Gómez Poyou (Presidente)	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Juan Enrique Morett Sánchez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Lina Raquel Riego Ruíz	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

A mis Padres

Porque tuvieron el valor de sacrificar varios de sus sueños a cambio de cumplir los nuestros...Gracias

AGRADECIMIENTOS

No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.

Paulo Coelho

El desarrollo y culminación de este trabajo requirió de la participación de muchas personas, la contribución de cada una de ellas fue muy valiosa, algunas contribuyeron con largas horas de discusión, otras con un sabio consejo y otras más con una palmadita en la espalda justo en el momento preciso; a través de estas líneas me gustaría agradecer a todas ellas.

A Alicia, por compartir su entusiasmo por la ciencia, su pasión por aprender y sus anécdotas, por preocuparse por darnos una educación íntegra, por su gran paciencia y múltiples enseñanzas, por mostrarme y guiarme en el camino de la ciencia y en diversas ocasiones de la vida misma.

A Cristi, por los útiles e innumerables consejos y trucos para que salga el experimento, por las conversaciones y tiempo compartidos mientras trabajábamos a deshoras y por escuchar pacientemente mis quejas y frustraciones.

A todos los miembros del 301-oriente, los viejos y los nuevos. A Joao, Alan y Adriana, por las carcajadas que hacen el día más llevadero. A Geovani, por su colaboración. A Citali, Gina y Karla, por los momentos alegres, por la complicidad y por los divertidos “chismes de niñas”. A Héctor, por la colaboración, por su humildad y por ayudarme a entender ese universo de las proteínas que antes odiaba. A Lina, por sus sugerencias y por su disposición a discutir un experimento inentendible. A Alex, por mostrarme el mundo de la biología de sistemas, pero sobre todo por su paciencia y amistad. A Jorgiux, por sus conversaciones, porque con sus chascarrillos me hacía reír a carcajadas aún en los días arruinados por un experimento fallido. A Luis por escucharme, por sus interpretaciones imparciales, por su actitud ante la vida. A Hugo, por su premura y pasión por aprender. A Rocío, por aguantar que la moleste todos los días y a todas horas. A los “BATichicos” – Fabiola, Karlita, James y José Carlos- por compartir esta “BATiaventura”. A Fabiola, por mostrarme los múltiples enfoques con los que se puede interpretar un dato. A Karlita, su

perseverancia en la búsqueda de resultado perfecto. A James y José Carlos, por su enorme tolerancia, por aguantar mis regañones, por su alegría y sencillez, por encontrar siempre el lado bueno de las cosas. A todos, por las vivencias compartidas.

A los miembros de mi comité Tutorial, Dr. Roberto Coria y Dr. Luis Servín, por las recomendaciones y comentarios y por aguantarme cada semestre.

A los miembros del Jurado de Examen por sus sugerencias y observaciones.

A mis amigos Biomédicos: Luis, Cristina, Eda, Paco, Charis y Miguel, por el apoyo, por compartir los éxitos y fracasos, por las asesorías, los maratones de la sandez, algunos viernes de “chelas”, por ser mi paño de lágrimas y confidentes, simplemente por estar ahí y compartir las dichas y desdichas del camino de la ciencia.

A Bety y Alejandrillo, por la tranquilidad y paz que irradian, por escuchar mis desenfrenos y ayudarme a solucionarlos con sabios consejos, por esa amistad entrañable que hace que siempre tengamos de que hablar aún cuando dejamos de vernos por meses.

A mis amigos de toda la vida, Brenda, Karla, Wendy y Daniel, por su amistad sincera, incondicional y desinteresada, porque pese a todos los años que tenemos de conocernos - ¡casi 15 años!- seguimos riendo de anécdotas pasadas y de vivencias del presente, por las palmaditas en la espalda y los regañones oportunos.

A Uriel, por escucharme y por el enorme esfuerzo que haces para comprender lo que te digo, por alentarme a continuar, por las llamadas de atención cuando sé que estoy haciendo algo mal y no lo corrijo, por tu compañía, por compartir mis frustraciones y aligerar la carga, por no huir cuando recito monólogos sobre las mil razones por las que no salió el experimento y las cien interpretaciones que puede tener si es que no está mal.

Y finalmente, a mi amada familia. A mis hermanos Hectorín y Miriam, por su cariño, por su tolerancia, por quererme pese a mi mal carácter, por su valor y espíritu aventurero, por enseñarme que no todo en la vida tiene que seguir un protocolo ni debe estar perfectamente calculado. A mis Padres, Héctor y Trini, por apoyarme siempre y pese a todo, por ayudarme a entender que todo problema puede resolverse, por no dejarme caer, por su amor infinito, por darme todo lo que necesito para cumplir mis sueños, por ayudarme a encontrar lo que falta, por su amor verdadero, por ser el motor para mover el mundo.

A todos, mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
GENES Y OTRAS NOTACIONES	7
1. Introducción	11
1.1. Duplicación de genes y redundancia génica	11
1.2. Conservación de genes duplicados.....	12
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	12
1.4. El 30% del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> se constituye por genes duplicados.....	13
1.5. El metabolismo nitrogenado en la levadura.....	16
1.6. Los parálogos <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> y el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.....	19
1.7. Catabolismo de valina, isoleucina y leucina	21
1.8. El transporte de aminoácidos de cadena ramificada en <i>S. cerevisiae</i>	23
1.9. La expresión de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	23
1.10. Otras funciones de los ortólogos de <i>Bat1</i> y <i>Bat2</i> en otros organismos.....	24
2. Planteamiento del problema	29
3. Estrategia experimental	33
3.1. Caracterización fenotípica de las mutantes bajo diferentes condiciones metabólicas.....	33
3.2. Análisis de los patrones de expresión de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	33
3.3. Estudio de las propiedades bioquímicas de las isoenzimas <i>Bat1</i> , <i>Bat2</i> y su único ortólogo en <i>K. lactis</i> <i>KIBat1</i>	33
4. Metodología	37
4.1. Construcción de mutantes	41
4.2. Condiciones de crecimiento.....	42
4.3. Transformación de levadura con acetato de litio	43
4.4. Construcción de plásmidos monocopia y multicopia de los genes <i>BAT1</i> , <i>BAT2</i> y <i>KIBAT1</i>	44
4.5. Construcción de fusiones quiméricas de los promotores <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> al gen <i>KIBAT1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	45
4.6. Construcción de fusiones del reportero <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i> a los promotores <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	46
4.7. Determinación de actividad de β -galactosidasa	46
4.8. Determinación de la concentración de proteína	47
4.9. Inmunodetección de las proteínas de interés	48

4.10.	Preparación de extractos proteicos para actividad de transaminasa o para purificación de proteínas	49
4.11.	Medición de actividad de transaminasa	50
4.12.	Purificación de proteínas etiquetadas con TAP.....	51
4.13.	Detección de transcritos específicos.....	52
5.	Resultados y discusión.....	57
5.1.	Bat1 es una enzima principalmente biosintética.....	57
5.2.	La isoenzima Bat2 es mayoritariamente catabólica.....	60
5.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> requiere catabolizar valina, isoleucina y leucina aún en condiciones que promueven la biosíntesis de estos aminoácidos.....	62
5.4.	La aminotransferasa de tipo ancestral <i>K/Bat1</i> es una enzima bifuncional que participa en la síntesis y catabolismo de VIL.....	63
5.5.	<i>K/Bat1</i> sólo reemplaza parcialmente la ausencia simultánea de Bat1 y Bat2 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
5.6.	La retención de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> constituye una adaptación al metabolismo facultativo	67
5.7.	<i>BAT1</i> muestra un perfil de expresión biosintético, mientras que <i>BAT2</i> tiene un perfil de expresión catabólico	71
5.8.	La contribución de Bat1 y Bat2 a la reacción de transaminación correlaciona con su perfil de expresión	75
5.9.	Descifrando la dinámica del metabolismo de VIL	79
6.	Conclusiones	85
6.1.	Las isoenzimas Bat1 y Bat2 de <i>S. cerevisiae</i> divergieron funcionalmente de la enzima tipo ancestral <i>K/Bat1</i> de <i>K. lactis</i>	85
6.2.	Los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> tienen un perfil de expresión diferencial	85
6.3.	La actividad enzimática de Bat1 y Bat2 es consistente con su perfil de expresión.....	85
7.	Perspectivas.....	89
7.1.	Contribución de la localización subcelular en la subfuncionalización	89
7.2.	Análisis de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de las isoenzimas Bat1 y Bat2 y <i>K/Bat1</i>	89
7.3.	Regulación de la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	89
7.4.	Contribución de Bat1 y Bat2 al equilibrio $NAD(P)^+/NAD(P)H$	90
8.	Referencias.....	93
9.	Anexo I.....	103
9.1.	Artículo I.....	103
9.2.	Artículo II.....	119
9.3.	Artículo III.....	127
10.	Estancia de investigación.....	139
10.1.	Descripción de la estancia y contexto	139
10.2.	Antecedentes	139
10.3.	Estrategia experimental.....	140
10.4.	Primera fase: Estandarización de condiciones.....	140

10.5.	Segunda fase: Determinación de interacciones epistáticas.....	142
10.6.	Resultados.....	142
10.7.	Referencias.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Modelo de la duplicación del genoma completo seguido de una pérdida masiva de genes.....	14
Figura 2. Alineamiento de secuencias de las proteínas Bat1 y Bat2 de <i>S. cerevisiae</i> y del ortólogo <i>K/Bat1</i> en <i>K. lactis</i>	20
Figura 3. Vías de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Figura 4. Organización de los promotores de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	22
Figura 5. Bat1 juega un papel primordial en la síntesis de valina.	57
Figura 6. Bat2 tiene un papel mayoritariamente catabólico en el metabolismo de Valina e Isoleucina pero no de Leucina	61
Figura 7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> requiere catabolizar a los aminoácidos de cadena ramificada aún en condiciones biosintéticas.....	62
Figura 8. La amino transferasa <i>K/Bat1</i> es un enzima biosintética y catabólica de aminoácidos de cadena ramificada	64
Figura 9. <i>K/Bat1</i> reemplaza a Bat1 pero no a Bat2.....	66
Figura 10. Bat1 conserva su papel como enzima biosintética aún en condiciones de crecimiento respiratorio.....	67
Figura 11. En condiciones de crecimiento respiratorio la cepa silvestre CLA-1 no es capaz de usar los aminoácidos de cadena ramificada como única fuente de nitrógeno	70
Figura 12. Efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	72
Figura 13. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i>	74
Figura 14. La actividad de transaminasa de Bat1 disminuye cuando la expresión del gen <i>BAT1</i> está reprimida..	76
Figura 15. Actividad de transaminasa durante el metabolismo respiratorio.....	77
Figura 16. El metabolismo de VIL	82

Tabla I. Cepas utilizadas en este proyecto.....	37
Tabla II. Plásmidos utilizados en este proyecto.....	38
Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	40

RESUMEN

La duplicación de genes es un mecanismo clave en la evolución, las copias adicionales de genes proveen el material necesario para la generación de genes cuyos productos tengan una función modificada o adicional a la que inicialmente tenían. Se han propuesto distintos modelos para explicar las rutas que pueden seguir las copias de genes duplicados y los mecanismos que favorecerían su conservación. El modelo de especialización indica que la duplicación de un gen, cuyo producto es bifuncional, puede llevar a la subfuncionalización de cada copia mediante la separación de la función ancestral.

En este trabajo, se analiza si el posible carácter bifuncional de la única aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis* ha sido redistribuido entre los parálogos de *S. cerevisiae*, y si la conservación de ambas copias ha impactado el metabolismo de *S. cerevisiae*. Nuestros resultados muestran que la proteína ortóloga *K/Bat1* es una enzima bifuncional que participa en la síntesis y catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. Estas funciones fueron redistribuidas en las enzimas parálogas *Bat1* y *Bat2* de *S. cerevisiae*, estos datos apoyan el modelo de especialización. *BAT1* se expresa principalmente en condiciones biosintéticas, mientras que *BAT2* se expresa principalmente bajo condiciones que promueven el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. La relocalización de las isoenzimas también contribuyó a la especialización de estas proteínas, dado que los precursores de aminoácidos son producidos en la mitocondria, mientras que los sustratos catabólicos se acumulan en el citosol. Por otro lado, bajo condiciones de crecimiento respiratorio, la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* es incapaz de crecer aún en presencia de los tres aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina), lo que sugiere que el catabolismo de estos aminoácidos es crucial o que *Bat1* y *Bat2* cumplen una función adicional en el metabolismo respiratorio.

Este estudio muestra que tanto la expresión diferencial de *BAT1* y *BAT2*, como la relocalización subcelular han permitido la redistribución de la capacidad biosintética y catabólica de la enzima ancestral en dos isoenzimas. Dicha redistribución de funciones representó una adaptación al metabolismo facultativo.

ABSTRACT

Gene duplication is a key evolutionary mechanism providing material for the generation of genes with new or modified functions. The fate of duplicated gene copies has been amply discussed and several models have been put forward to account for duplicate conservation. The specialization model considers that duplication of a bifunctional ancestral gene could result in the preservation of both copies through subfunctionalization, resulting in the distribution of the two ancestral functions between the gene duplicates.

Here we investigate whether the presumed bifunctional character displayed by the single branched chain amino acid aminotransferase present in *Kluyveromyces lactis* has been distributed in the two paralogous genes present in *Saccharomyces cerevisiae*, and whether this conservation has impacted *S. cerevisiae* metabolism. Our results show that the *K/Bat1* orthologous transaminase is a bifunctional enzyme, which participates in the biosynthesis and catabolism of branched chain amino acids. This dual role has been distributed in *S. cerevisiae* Bat1 and Bat2 paralogous proteins, supporting the specialization model posed to explain the evolution of gene duplications. *BAT1* is highly expressed under biosynthetic conditions, while *BAT2* expression is highest under catabolic conditions. Bat1 and Bat2 differential relocalization has favored their physiological function, since biosynthetic precursors are generated in the mitochondria (Bat1), while catabolic substrates are accumulated in the cytosol (Bat2). Under respiratory conditions, in the presence of ammonium and branched chain amino acids the *bat1Δ bat2Δ* double mutant shows impaired growth, indicating that either VIL (valine, isoleucine and leucine) catabolism is crucial under these conditions or that Bat1 and Bat2 could have an additional role.

Our study shows that *BAT1* and *BAT2* differential expression and subcellular relocalization has resulted in the distribution of the biosynthetic and catabolic roles of the ancestral enzyme in two isozymes improving branched chain amino acid metabolism and constituting an adaptation to facultative metabolism.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Duplicación de genes y redundancia génica

Estudios comparativos han sugerido que la duplicación de grandes segmentos de DNA es un proceso continuo durante la evolución de los organismos (Friedman y Hughes, 2001), y contribuye a la plasticidad genómica al ser la principal fuente primaria de material para la innovación biológica (Ohno, 1970; Friedman y Hughes, 2001).

Se ha estimado que los genes duplicados representan alrededor del 15% en el genoma humano, 8% del genoma de la mosca *Drosophila melanogaster* y el 20% en *Caenorhabditis elegans* (Lynch y Conery, 2000; Wolfe, 2001). Se sabe también, que los eucariontes poseen mayor proporción de genes duplicados que los procariontes (He y Zhang, 2005).

El genoma de un organismo puede incrementar su número de genes a través de dos mecanismos: i) transferencia horizontal o ii) duplicación de genes preexistentes. Ohno resaltó la relevancia que la duplicación de genes tiene durante la evolución de los genomas (Ohno, 1970).

La duplicación de un gen o grupo de genes puede ocurrir por mecanismos moleculares que incluyen la repetición en tándem, la conversión génica, el deslizamiento de la DNA polimerasa durante los procesos de recombinación y replicación, el entrecruzamiento no equivalente, las retrotransposiciones o la duplicación cromosomal (Zhang, 2003). Por otro lado, la duplicación completa de un genoma puede ocurrir mediante una meiosis aberrante que genera gametos diploides, mismos que al fusionarse resultan en una progenie autoploiploide o aloploiploide (Friedman y Hughes, 2001).

Se entiende que una duplicación genómica representa el aumento abrupto en el número de genes, el cuál puede tener repercusiones en la estructura y la función genética. El aumento en el número de genes se ha relacionado con transiciones importantes entre grupos de organismos, por ejemplo entre vertebrados e invertebrados (Bird, 1995), y se ha propuesto que este incremento en el número de genes se debe a una o más duplicaciones genómicas (Ohno, 1970). Aún cuando existe controversia acerca de la contribución relativa de la duplicación genómica respecto a la duplicación de genes individuales (Sankoff, 2001), hay suficiente evidencia molecular para afirmar que la estructura actual de

algunos genomas eucariontes es el resultado de uno o más eventos de duplicación genómica, como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Wolfe y Shields, 1997; Friedman y Hughes, 2001).

1.2. Conservación de genes duplicados

En principio, los genes resultantes de un evento de duplicación tienen la misma función, su destino será la retención de la copia adicional o la pérdida de la misma. Tradicionalmente, se ha pensado que sólo son conservados aquellos genes duplicados que divergen en función (Ohno, 1970); sin embargo, se ha encontrado que algunos genes con funciones redundantes han sido conservados (Krakauer y Nowak, 1999).

Se han planteado diversas hipótesis para explicar por qué algunos genes con funciones redundantes tienden a ser conservados después de una duplicación. Algunas de estas hipótesis se explican a continuación:

- i) Las mutaciones degenerativas en un gen multifuncional provocan la separación de funciones en la copia duplicada, es decir, en una de las copias se afecta una de las funciones, mientras que en la otra copia se afecta la segunda función. Se necesita conservar ambas copias para satisfacer la función original (Lynch y Conery, 2000; Force *et al.*, 1999).
- ii) Las mutaciones degenerativas provocan que ninguna de las copias génicas genere por sí misma suficiente producto, por lo que ambas deben ser conservadas (Lynch y Force, 2000).
- iii) La duplicación permite un aumento en la dosis génica de ciertos genes, lo que favorece su conservación.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada como modelo para diversos estudios bioquímicos y genéticos desde hace muchos años. *S. cerevisiae* es un organismo unicelular no patógeno que se puede cultivar fácilmente en el laboratorio. Esta levadura tiene una alta tasa de recombinación homóloga, lo que ha facilitado la obtención de mutantes para el estudio de la función de diversos genes (Mell y Burgess, 2003).

El metabolismo de esta levadura es muy peculiar, *S. cerevisiae* es un anaerobio facultativo que puede usar como fuente de carbono diversos carbohidratos, como etanol, glucosa o glicerol. La fuente de carbono preferida es la glucosa y en presencia de ésta, se reprimen genes que participan en las vías para utilización de otras fuentes de carbono y vías de oxidación aerobia como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la fosforilación oxidativa y el ciclo del glioxilato (Fraenkel, D. G., 1982). La utilización de glucosa es independiente a la presencia de oxígeno; es decir, aún en condiciones aeróbicas de crecimiento, el ATP se produce mediante la glucólisis. En ausencia de glucosa o de otras fuentes de carbono fermentables, *S. cerevisiae* obtiene energía a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la vía del glioxilato, para lo cual requiere crecer en presencia de oxígeno (Fraenkel, D. G., 1982).

1.4. El 30% del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* se constituye por genes duplicados

La levadura haploide tiene un genoma de 13,478 kb, contenidas en 16 cromosomas de tamaños que oscilan entre 230 y 2350 kb, y en un DNA mitocondrial de 86 kb. El genoma nuclear es muy compacto, debido a que las regiones intergénicas son pequeñas y existen pocos intrones. En promedio, las regiones entre los ORFs divergentes son de 618 nt y de tan sólo 326 para los que convergen. Tres cuartas partes del DNA cromosómico corresponde a secuencias codificantes y sólo el 3.8 % de los ORFs contiene intrones.

Una característica relevante del genoma de *S. cerevisiae* es la elevada proporción de genes estructuralmente redundantes. El análisis de la secuencia del genoma completo de este organismo reveló la presencia de 55 bloques cromosómicos duplicados (Wolfe y Shields, 1997). La organización de los genes que integran estos bloques tiene características peculiares, los genes conservan cierto orden y orientación. Este arreglo peculiar es la evidencia principal de que *S. cerevisiae* es un organismo tetraploide degenerado resultado de una duplicación genómica ancestral. El evento de duplicación debió ocurrir hace aproximadamente 150 millones de años (Kellis *et al.*, 2004; Wolfe y Shields, 1997), inferido a partir de los patrones de divergencia de los genes duplicados de *Saccharomyces cerevisiae* con respecto a sus ortólogos en otras levaduras como *Kluyveromyces lactis*.

El modelo de la duplicación del genoma completo (WGD por sus siglas en inglés) propone que los linajes que dieron origen a *S. cerevisiae* y *K. waltii* divergieron a partir de un ancestro común. Posterior a la separación de linajes, el ancestro de *Saccharomyces* experimentó una duplicación del genoma completa seguida de una pérdida masiva de algunos de estos genes (Fig. 1).

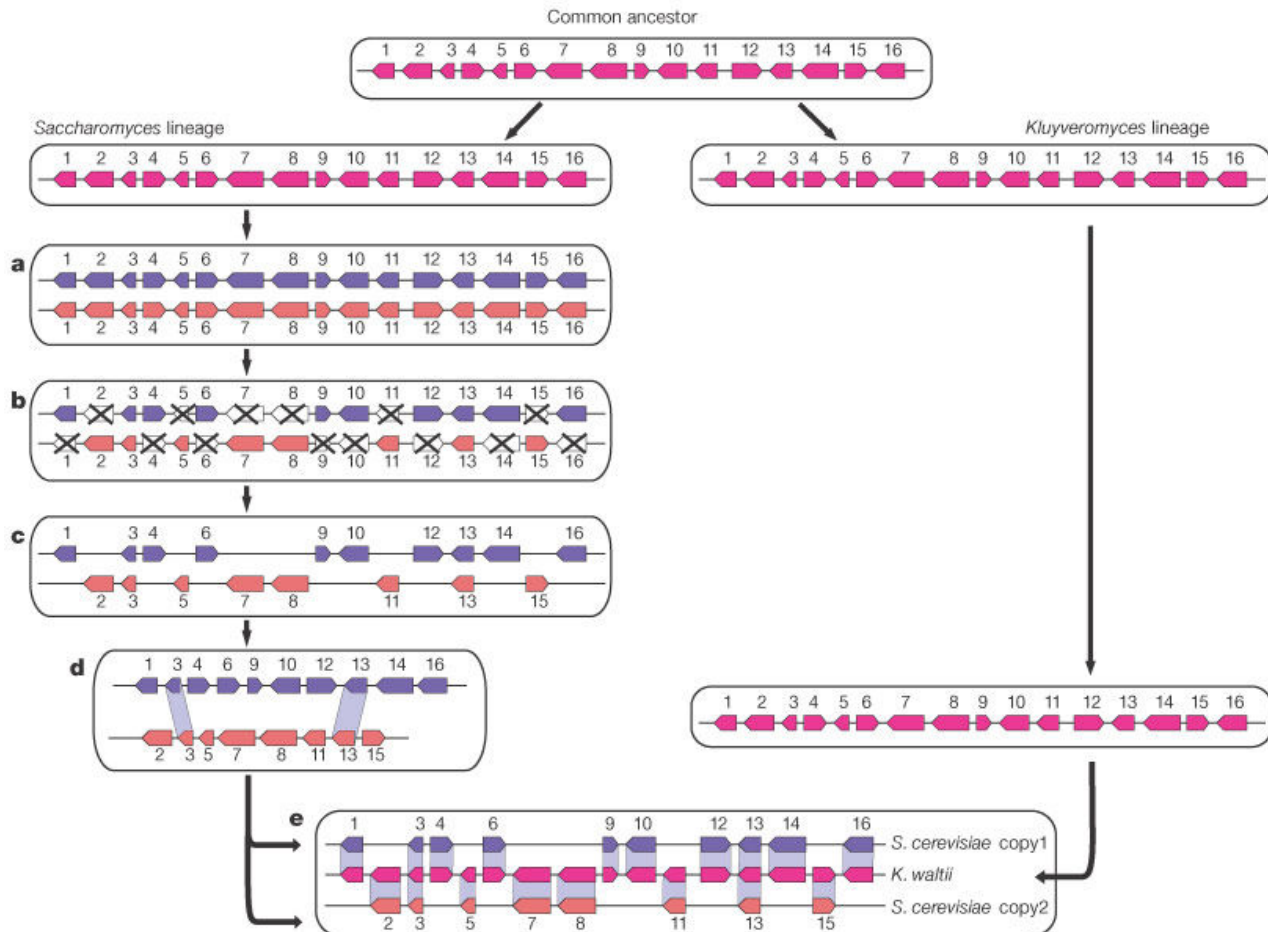


Figura 1. Modelo de la duplicación del genoma completo seguido de una pérdida masiva de genes. Los linajes que dieron origen a los ancestros de *S. cerevisiae* y *K. waltii* divergieron a partir de un ancestro común. Posterior a la separación de linajes, *S. cerevisiae* experimentó una duplicación genómica (a) seguida de una pérdida masiva de genes (b). Los cromosomas generados a partir de la duplicación retuvieron algunos genes en doble copia (c). *K. waltii* no experimentó una duplicación del genoma, como se observa en la figura, los genes presentes en un solo cromosoma en esta levadura se redistribuyeron en dos cromosomas en *S. cerevisiae* (d y e). Figura tomada de Kellis *et al.*, 2004.

Alrededor del 30% del genoma de *S. cerevisiae* está constituido por genes presentes en más de una copia o genes parálogos (Mewes *et al.*, 1997), la mitad de ellos es resultado de la duplicación genómica.

Los productos de los pares conservados presentan un alto porcentaje de identidad, que va del 65 al 98% (Seoighe y Wolfe, 1999a). A menos que la presencia de una cantidad extra de producto génico resulte ventajosa, la probabilidad de que se mantengan las dos copias de un gen de manera estable en el genoma es baja (Krakauer y Nowak, 1999).

Una vez que un gen se duplica, éste puede perderse o seguir una de cuatro posibles rutas: la pseudogenización, neofuncionalización, subfuncionalización o incluso puede conservar la función ancestral (Schacherer *et al.*, 2004; Sankoff, 2001; Rastogi y Liberles, 2005; Kellis *et al.*, 2004; Ohno, 1970; Quezada *et al.*, 2008; DeLuna *et al.*, 2001). A continuación se explica cada ruta.

1. Pérdida de función: Es un proceso que elimina como gen funcional a una de las copias duplicadas, que puede permanecer como un pseudogen o eliminarse por un rearrreglo cromosomal. La pérdida de la función puede ser un proceso neutral o selectivo, si es que el aumento en la dosis génica de un producto representa un problema para la célula.

2. Conservación de la función ancestral: Ocurre cuando la dosis adicional representa una ventaja y se mantiene por conversión génica constante o por otros mecanismos de reparación de errores. Es común en proteínas que forman complejos macromoleculares y en donde es importante mantener la estequiometría de las subunidades del complejo. Un ejemplo son las proteínas ribosomales.

3. Adquisición de una nueva función o neofuncionalización: Es un proceso adaptativo en el que después de la duplicación una copia del gen conserva la función ancestral, mientras que la otra copia muta adquiriendo una función que no estaba presente antes de la duplicación. Este mecanismo permite la retención de ambas copias.

4. Subfuncionalización: Consiste en la división de funciones del gen ancestral entre los dos duplicados. Frecuentemente, la expresión de cada uno de los miembros del par cambia, de suerte que éstos se expresan en diferentes condiciones o fases del desarrollo de un individuo. La subfuncionalización también puede ocurrir a nivel de la proteína cuando uno de los miembros de la pareja puede desempeñar una de las funciones de manera más eficiente.

Piskur propuso que la duplicación del genoma completo que experimentó *S. cerevisiae* y la conservación de algunos de estos genes permitieron su adaptación al metabolismo fermentativo (Piskur, 2001). La propuesta de Piskur se basa principalmente en dos observaciones: i) *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces waltii* divergieron a partir de un ancestro común. La duplicación del genoma de *S. cerevisiae* ocurrió después de la separación de linajes (Kellis *et al.*, 2004) y ii) *S. cerevisiae* es un anaerobio facultativo, mientras que *K. waltii* y otras levaduras *sensu stricto* (aquellas que no experimentaron una duplicación del genoma completo) son organismos aerobios estrictos (Merico *et al.*, 2007).

En *Drosophila melanogaster* la proporción de genes esenciales es la misma (alrededor de 30%) tanto para genes nuevos -originados hace 3-35 millones de años-, como para genes viejos -originados hace más de 40 millones de años- (Chen *et al.*, 2010), pero el 95% de los genes nuevos que son esenciales se originaron por duplicación (Chen *et al.*, 2010). Ding y colaboradores encontraron que los genes duplicados de origen reciente pueden integrarse a ciertas vías y regular genes esenciales pre-existentes convirtiéndose a su vez en un gen esencial (Ding *et al.*, 2010).

Por lo que podemos concluir que una vez que un gen se duplica, cualquiera de las copias (la ancestral o la reciente) puede adquirir mutaciones que lleven a la pérdida de la función o en algunos casos a la adquisición de una nueva función que además, se integre a vías esenciales.

1.5. El metabolismo nitrogenado en la levadura

Saccharomyces cerevisiae como cualquier organismo unicelular, puede percibir la calidad y la cantidad de nutrientes que se encuentran en su entorno a través de la interacción de diferentes redes de señalización, lo que le permite ajustar su metabolismo, perfil transcripcional y programa de desarrollo.

La levadura puede utilizar más de 30 compuestos nitrogenados, incluyendo aminoácidos, amonio, urea, bases nitrogenadas y derivados de purinas (Godard *et al.*, 2007). Estos compuestos entran a la célula a través de permeasas (Regenberg *et al.*, 1999) y son utilizados directamente en reacciones biosintéticas o son catabolizados para obtener nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+) a través de un proceso de desaminación del glutámico por una reacción de transaminación. El amonio es incorporado a otras moléculas por dos vías: i) la aminación reductiva del α -cetoglutarato catalizada por la

glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP y codificada por los genes *GDH1/GDH3*; y ii) a través de la síntesis de glutamina en una reacción dependiente de ATP en la que se usan como sustratos glutamato y amonio, posteriormente el grupo amido de la glutamina es transferido al α -cetoglutarato, esta reacción requieren de la acción concertada de las enzimas Glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) codificadas por los genes *GLN1* y *GLT1*, respectivamente (Cogoni *et al.*, 1995).

El transporte de nitrógeno, su biosíntesis y catabolismo son procesos altamente regulados que responden tanto a la calidad como cantidad de la fuente de nitrógeno. Dicha regulación es mediada por dos mecanismos generales:

- i) La represión catabólica nitrogenada (NCR por sus siglas en inglés), la cual opera cuando una fuente de nitrógeno represora se encuentra disponible para la célula y consiste en reprimir la expresión de genes que codifican para permeasas y enzimas que participan en el catabolismo de fuentes no represoras o secundarias de nitrógeno. La NCR está mediada por la interacción de 4 factores de transcripción, los activadores Gln3 y Gat1/Nil1 y los represores Dal80 y Gzf3/Nil2 (Magasanik y Kaiser, 2002).
- ii) El control general de la biosíntesis de aminoácidos, el cuál percibe la deficiencia o escasez de aminoácidos y promueve la expresión de genes implicados en la biosíntesis de estos aminoácidos. El control general de la biosíntesis es regulado por el factor de transcripción Gcn4 (Godard *et al.*, 2007).

Cerca del 44% de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno se encuentran por duplicado (Marland *et al.*, 2004), aunque del total de genes sólo 9 parejas tuvieron su origen en el evento ancestral de poliploidización (Seoighe y Wolfe, 1999b). Entre estos podemos destacar a *GDH1* y *GDH3* (que codifican para dos isozimas glutamato deshidrogenasas), *LEU4* y *LEU9* (codifican para dos isopropilmalato sintasas), *LYS20* y *LYS21* (codifican para dos homocitrato sintasas), *AAT1* y *ATT2* (que codifican para transaminasas de aspartato), *ALT1* y *ALT2* (que codifican para transaminasas de alanina) y *BAT1* y *BAT2* (que codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada).

Este conjunto de genes es particularmente interesante, ya que codifica para las enzimas que catalizan reacciones que utilizan intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, motivo por el cual su actividad debe estar cuidadosamente acoplada al

metabolismo central de carbono y por ello es posible que su conservación en doble copia sea una adaptación a las necesidades que impone el metabolismo facultativo.

En condiciones de crecimiento fermentativo, el ciclo de Krebs funciona de manera incompleta y básicamente, sólo provee de intermediarios necesarios para el anabolismo. Bajo estas condiciones de crecimiento, el ATP se obtiene mayoritariamente de la glicólisis, por lo que el uso de las pozas de piruvato, α -cetoglutarato y acetilCoA, no interfiere con la obtención de energía para la célula. Bajo condiciones de crecimiento respiratorio, la energía se obtiene a través del ciclo de Krebs, por lo que se requiere modular el consumo de α -cetoglutarato para mantener un abastecimiento constante. En nuestro laboratorio se han estudiado a otras parejas de genes duplicados y para el caso de los parálogos Gdh1/Gdh3 y Lys20/Lys21 se ha concluido que estos duplicados se han conservado porque proveen a la célula de un mecanismo para modular el uso de α -cetoglutarato para la síntesis de aminoácidos durante el metabolismo fermentativo o respiratorio (DeLuna *et al.*, 2001; Quezada *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó, Gdh1 y Gdh3 son dos glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP (GDH-NADP) que participan en la asimilación de amonio a través de la síntesis de glutamato, usando α -cetoglutarato, amonio y NADP^+ como sustratos. Aunque catalizan la misma reacción estas isozimas no son redundantes. Gdh1 tiene una alta capacidad para utilizar el α -cetoglutarato y producir glutamato, lo cual es importante en condiciones de crecimiento fermentativo; sin embargo, bajo condiciones de crecimiento respiratorio la actividad de Gdh1 es modulada negativamente por Gdh3, probablemente a través de interacción directa de las proteínas (DeLuna *et al.*, 2001). *GDH3* no se expresa durante el crecimiento fermentativo, su expresión se induce a medida que aumenta la función respiratoria (Avendaño *et al.*, 1997). La capacidad de la isozima Gdh3 para utilizar al α -cetoglutarato es menor que la de Gdh1, por lo que su actividad en condiciones respiratorias reduce el flujo de esqueletos de carbono a través de las GDH-NADP a favor del funcionamiento del ciclo de Krebs y la obtención de energía. Aparentemente, la retención de estos genes duplicados permite modular la síntesis de glutamato de acuerdo a las necesidades del metabolismo facultativo. El estudio de la conservación de estos parálogos arrojó datos interesantes. Por un lado, se evidenció que la diversificación en los patrones de expresión de los genes, así como en las características de las proteínas, son importantes para conferir a la célula una mayor plasticidad biológica. Por otro lado, se resaltó el potencial de los productos de genes parálogos para formar proteínas hetero-

oligoméricas con propiedades distintas al homo-oligómero (Avendaño *et al.*, 1997; DeLuna *et al.*, 2001).

El par de parálogos *LYS20* y *LYS21* representan otro ejemplo de adaptación al metabolismo facultativo. Como ya se mencionó, estos parálogos codifican para dos isoenzimas homocitrato sintasas, que catalizan el primer paso de la vía de síntesis de lisina. *Lys20* y *Lys21* usan como sustratos α -cetoglutarato y acetil CoA para generar homocitrato y CoA. Bajo condiciones de crecimiento fermentativo ambos genes mantienen niveles de expresión similares y la contribución de las proteínas *Lys20* y *Lys21* a la poza de lisina parece ser redundante, por lo que en este caso la conservación de ambas copias obedecería a una necesidad de incrementar la dosis génica. Sin embargo, las propiedades cinéticas de estas enzimas difieren; *Lys20* tiene una mayor capacidad para utilizar el α -cetoglutarato y generar lisina, mientras que *Lys21* tiene una capacidad menor y se ha especializado en la síntesis de lisina durante el metabolismo respiratorio, de tal forma que limita el uso de α -cetoglutarato (Quezada *et al.*, 2008).

1.6. Los parálogos *BAT1* y *BAT2* y el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada

Las transaminasas o aminotransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido usando como donador o receptor de amonio al glutamato o α -cetoglutarato, respectivamente. Las aminotransferasas utilizan como cofactor al piridoxal 5'-fosfato (PLP, por sus siglas en inglés), derivado de la vitamina B6, que es uno de los cofactores biológicos más utilizadas por enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Jansonius, 1998).

El problema de la evolución de las transaminasas fue abordado por primera vez por Jensen en 1976, planteando el modelo del “parche” o reclutamiento. Este modelo propone que los eventos de duplicación genética en las rutas metabólicas primitivas pudieron facilitar la especialización hacia el amplio repertorio de sustratos que encontramos hoy en día en los organismos vivos (Jensen y Gu, 1996; Jensen, 1976).

En *S. cerevisiae* la mayoría de las rutas de biosíntesis de aminoácidos han sido estudiadas. Las transaminasas juegan un papel muy importante dentro del metabolismo de nitrógeno, pues permiten la utilización de fuentes de nitrógeno diferentes a las involucradas directamente en el metabolismo central de nitrógeno.

Los parálogos *BAT1* y *BAT2* provienen de la duplicación del genoma completo (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) y codifican para dos transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada. Las isoenzimas Bat1 y Bat2 presentan un 77% de identidad (Eden *et al.*, 1996) entre ellas (Fig. 2).

```

Bat1      -----MLQRHSLKLG--KFSIRTLATGAPLDASKLKITRNPNSKPRPNEELV 46
KlBat1    MNYIGLRNCARAVSSRVSIIPSRGIKSHILTSYRAMSLDASKVKITKVVETPSKPRPNDELV 60
Bat2      -----MTLAPLDASKVKITTTQHASKPKPNSSELV 29
          .*****.*** .***:*.***

Bat1      FGQTFDTHMLTIIPWSAKEGWGTPHIKPYGNLSLDPSACVFHYAFELFEGLKAYRTPQNTI 106
KlBat1    FGQTFDTHMLTIEWTAENGWGVPEIKPYGNLSLDPSACVFHYAFELFEGLKAYRTPDNKI 120
Bat2      FGKSFTHMLTAEWTAKEGWGTPHIKPYGNLSLDPSAVVFHYAFELFEGMKAYRIVDNKI 89
          **:;***** *:*:*:*:*.*.*** *****: *****:***** :*.*

Bat1      TMFRPDKNMARMNKSAARICLPTFESEELIKLTGKLEQDKHLVPGNGYSLYIRPTMIG 166
KlBat1    SMFRADKNMERMNKSAARICLPSFNDELKIKLIGKLEQDKHLVPGQGYSLYIRPTMIG 180
Bat2      TMFRPDMNMRMNKSAORICLPTFDPEELITLIGKLEQDKKLVPEGKGYSLYIRPTLIG 149
          :***.* ** ***** *****:*.:.***.* *****:*** **:*:*****:***

Bat1      TSKGLGVGTPSEALLYVITSPVGPYYKTGFKAVRLEATDYATRAWPGGVGDKKLGANYAP 226
KlBat1    TTNGLGVGTPDRALLYVITSPVGPYYKTGFKAVRLEATDYATRAWPGGVGDKKLGANYAP 240
Bat2      TTAGLGVSTPDRALLYVICCPVGPYYKTGFKAVRLEATDYATRAWPGGCGDKKLGANYAP 209
          *: *****.*.***** .*****:*****:***** *****

Bat1      CILPQLQAARKGYQQNLWLFQPEKNITEVGTMNVFFVFLNKVIGKELVTAPLDGTILEG 286
KlBat1    CILPQLQAARGYQQNLWLFQPEKNITEVGTMNVFFVFKDSKTGKELVTAPLDGTILEG 300
Bat2      CVLPQLQAASRGYQQNLWLFQPNNITEVGTMNAFFVFKDSKTGKELVTAPLDGTILEG 269
          *:*****.*****:*****.*** :. *****

Bat1      VTRDSVLTTLARDKLDPEQNDINERYTITEVATRAKQELLEAFGSGTAAVVSPIKEIGW 346
KlBat1    VTRDSILQLARENLSDEWIVSERYTITEVEERAAGELVEAFGSGTAAVVSPIKEIGW 360
Bat2      VTRDSILNLAKERLEPSEWTISERYFTIGEVTERSNGELLEAFGSGTAAIVSPIKEIGW 329
          *****: *:*:*:*:*.*.*** :.***:*** ** *:*:*****:*****

Bat1      NNEDIHVPLLPGEQCGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTIVADLN 393
KlBat1    NGHDIQVPLLPGEQCGPLTKQVAEWIADIQYGRKEHKGWSRIVADLN 407
Bat2      KGEQINIPLLPGEQTGPLAKEVAQWINGIQYGETEHGNWSRVVTDLN 376
          :..*:*:***** *:*:*:*:*.*.***. :. :.***: *****

```

Figura 2. Alineamiento de secuencias de las proteínas Bat1 y Bat2 de *S. cerevisiae* y del ortólogo *KlBat1* en *K. lactis*. Las proteínas parálogas Bat1 y Bat2 son 77% idénticas. El único ortólogo presente en *K. lactis* (*KlBat1*) es aproximadamente 80% idéntico tanto a Bat1 como a Bat2.

Bat1 es una proteína de 393 aa y 43,596 Da, con un pI de 8.7 (Eden *et al.*, 1996). En el extremo amino terminal tiene un péptido señal de 16 aa. Kispal y colaboradores observaron que Bat1 es una proteína soluble de matriz mitocondrial (Kispal *et al.*, 1996).

Por otro lado, Bat2 es una proteína citosólica de 376 aa y masa molecular de 41,624 Da (Kispal *et al.*, 1996). Su pI es de 6.9 (Eden *et al.*, 1996), dentro del intervalo propuesto para proteínas citosólicas por Schwartz y colaboradores (Schwartz *et al.*, 2001).

Ambas enzimas participan en el metabolismo de valina, leucina e isoleucina. La biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada consiste de una vía común que a

partir de piruvato y α -cetobutirato lleva a la producción de valina e isoleucina. Por otro lado, el precursor inmediato de la valina, el α -cetoisovalerato, sirve como intermediario para la síntesis de leucina (Fig. 3).

1.7. Catabolismo de valina, isoleucina y leucina

En *Saccharomyces cerevisiae*, los aminoácidos de cadena ramificada son catabolizados a través de la vía de Ehrlich que lleva a la formación de alcoholes tipo *fusel*. El primer paso es la transaminación de valina, isoleucina y leucina para producir los cetoácidos de cadena ramificada correspondientes; dicha reacción es reversible y es catalizada por las enzimas Bat1 y Bat2. El siguiente paso consiste en la descarboxilación de los cetoácidos para generar un aldehído; esta reacción es irreversible. Por último, el aldehído es reducido al alcohol *fusel* por una alcohol deshidrogenasa (Sentheshanuganathan, 1960). Además de la alcohol deshidrogenasa, el último paso de la vía de Ehrlich puede ser catalizado por una formaldehído deshidrogenasa o por aldehído reductasas dependientes de NADPH (Hauser *et al.*, 2007; Dickinson *et al.*, 2003; Ford y Ellis, 2002).

La única forma de obtener amonio a partir de los aminoácidos de cadena ramificada es a través de la transaminación por Bat1 y Bat2. En las reacciones de transaminación la constante de equilibrio es cercana a la unidad; para favorecer la reacción en el sentido de la degradación, la célula tendría que acumular altas concentraciones de aminoácidos intracelulares. Se ha propuesto que el significado biológico de la vía de Ehrlich es mantener una baja concentración intracelular de α -cetoácidos con lo cual se empuja el flujo de la vía en el sentido de la degradación de aminoácidos (Hazelwood *et al.*, 2008).

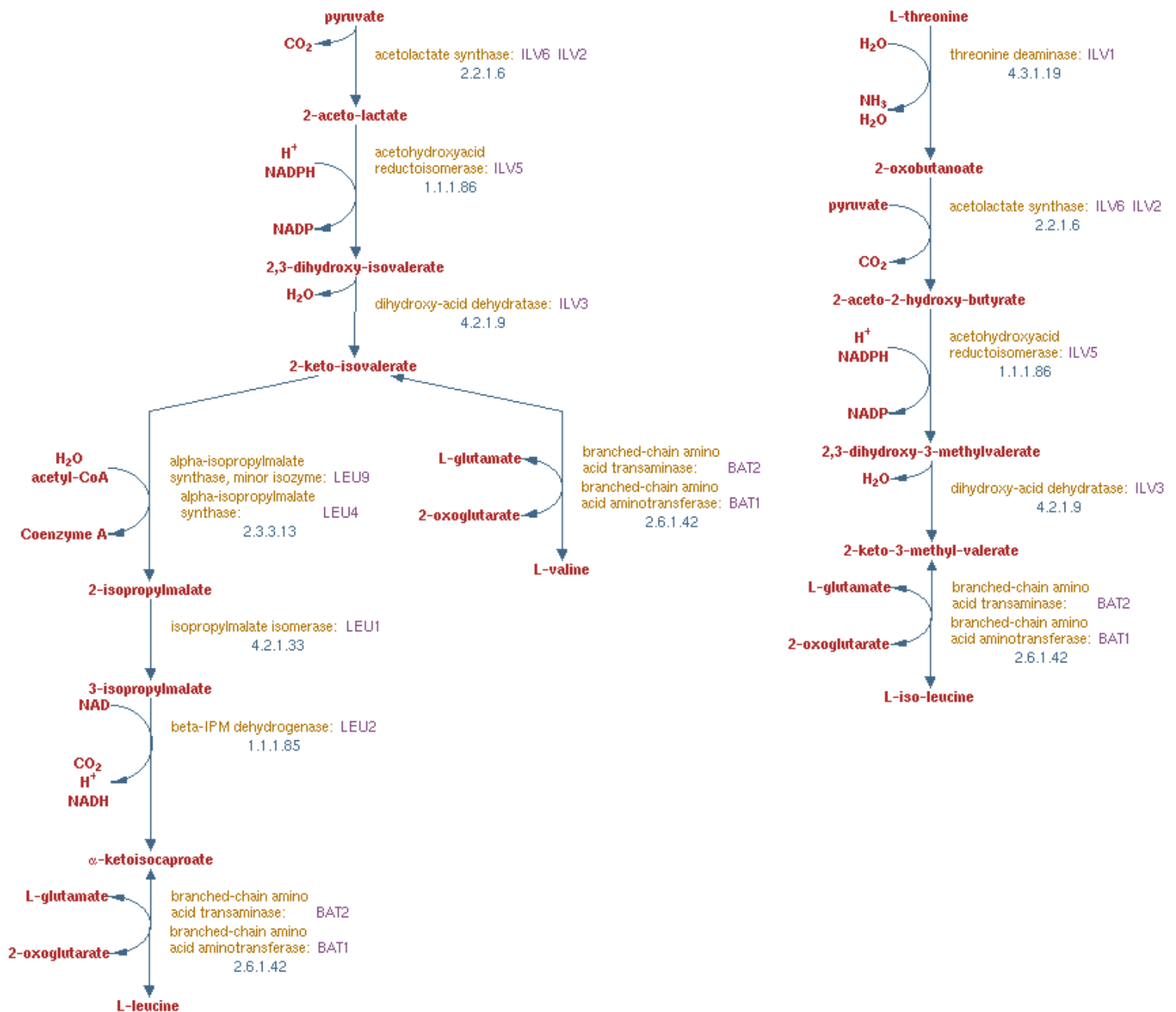


Figura 3. Vías de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada en *Saccharomyces cerevisiae*. Tomada de *Saccharomyces* Genome Database (<http://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2&detail-level=3&detail-level=2>).

1.8. El transporte de aminoácidos de cadena ramificada en *S. cerevisiae*

El transporte de valina, leucina e isoleucina se lleva a cabo a través de la permeasa general de aminoácidos Gap1 y las permeasas de aminoácidos de cadena ramificada Bap2 y Bap3 (Grauslund *et al.*, 1995). La expresión de *BAP2* y *BAP3* es inducida por leucina y otros aminoácidos (De Boer *et al.*, 1998; Didion *et al.*, 1996). Bap2 es una permeasa de membrana celular, mientras que Bap3 es una proteína mitocondrial (Grauslund *et al.*, 1995; Sickmann *et al.*, 2003).

Además del transporte de aminoácidos de cadena ramificada, las permeasas Bap2 y Bap3 participan en el transporte de triptófano, fenilalanina, tirosina, cisteína y metionina, y, en menor grado, de treonina y alanina (Regenberg *et al.*, 1999). Agp1, la permeasa de aminoácidos no cargados, también está involucrada en el transporte de valina, isoleucina y leucina y se ha reportado que Tat1 (permeasa de aminoácidos aromáticos) también puede transportar valina (Regenberg *et al.*, 1999).

Las reacciones para generar α -isopropilmalato (α -IPM, intermediario en la síntesis de leucina) se llevan a cabo en la mitocondria. El α -IPM es transportado a través de la membrana mitocondrial por el acarreador de oxaloacetato mitocondrial Oac1 (Marobbio *et al.*, 2008). Este transportador es fuertemente inhibido por la adición externa de α -IPM y α -CIC, y en menor grado por α -CMV y oxaloacetato, por otro lado el α -CIV y los tres aminoácidos de cadena ramificada no lo inhiben (Marobbio *et al.*, 2008).

1.9. La expresión de los genes *BAT1* y *BAT2*

Se ha observado que durante el crecimiento en medio YPD (extracto de levadura, peptona y glucosa), *BAT1* se expresa principalmente durante la fase logarítmica de crecimiento, mientras que *BAT2* se expresa mayoritariamente durante la fase estacionaria de crecimiento (Schuldiner *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 1996).

El promotor de *BAT1* presenta 5 cajas de unión al factor transcripcional Gcn4. La máxima expresión de *BAT1* ocurre cuando están presentes las cinco cajas, además su expresión disminuye considerablemente en un fondo genético *gcn4* Δ (Ben-Yosef *et al.*, 1996).

Un enfoque para la identificación de posibles reguladores de un gen es la búsqueda de cajas consenso de distintos factores transcripcionales sobre la región promotora de

dicho gen. Los promotores de *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* se alinearon con los promotores de los genes ortólogos en diferentes levaduras *sensu stricto*. En la figura 4 se señalan las cajas consenso de diferentes factores transcripcionales sobre los promotores de los genes de *S. cerevisiae*. Las cajas señaladas en rojo son aquellas cuya secuencia está conservada en las levaduras *sensu stricto*. Como se puede apreciar, en el caso de *BAT1* las cajas conservadas son Gcn4 y Leu3, mientras que en el caso de *BAT2*, las cajas conservadas son Gln3, Put3 y Leu3. Como ya se mencionó anteriormente Gcn4 es un regulador de genes biosintéticos, mientras que Gln3 participa en la regulación de genes cuyos productos participan en el catabolismo de algunas fuentes de de nitrógeno.

1.10. Otras funciones de los ortólogos de Bat1 y Bat2 en otros organismos

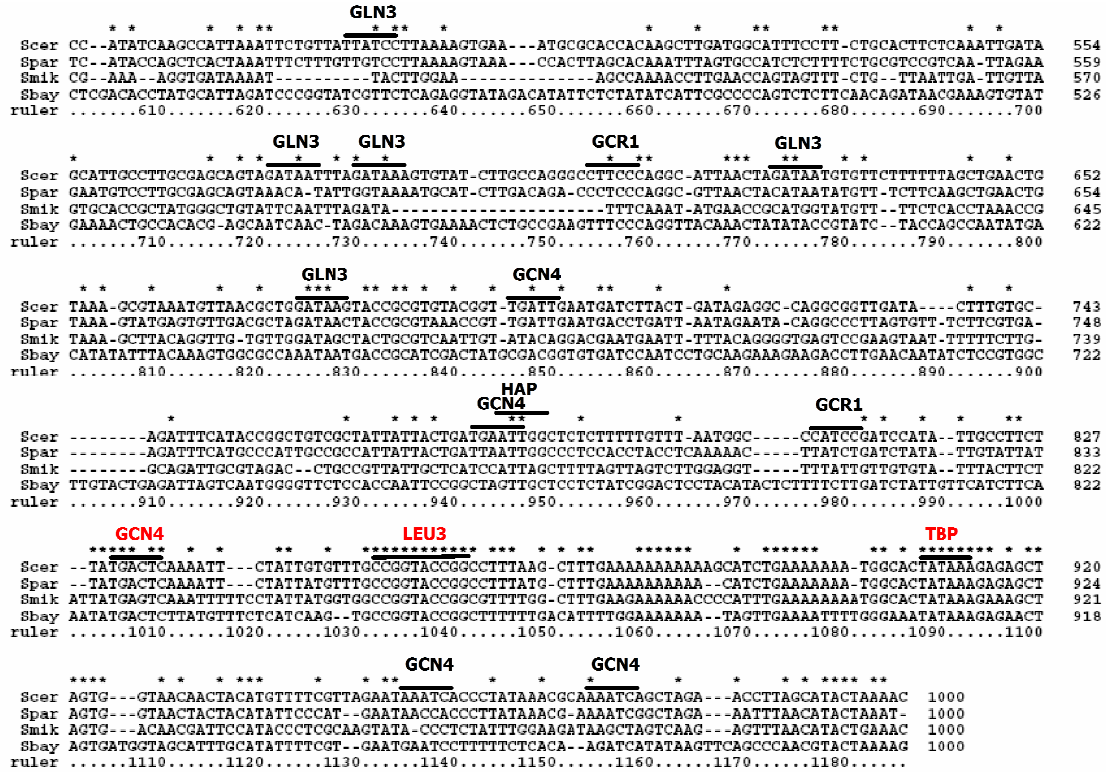
Los genes *YIBCA1* y *YIBCA2* de *Yarrowia lipolytica* son los ortólogos a *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*. Bondar y colaboradores observaron que el producto de *YIBCA1* participa en el catabolismo de L-metionina a través de una reacción de transaminación (Bondar *et al.*, 2005). A diferencia de lo observado en *Yarrowia*, el único ortólogo de *K. lactis* (*KIBAT1*) no está involucrado en la transaminación de metionina (Kagkli *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 7 ortólogos a Bat1/Bat2 con diferente localización subcelular, denominados *BCAT1* a *BCAT7* (Diebold *et al.*, 2002). *BCAT3*, además de participar en el metabolismo de valina, leucina e isoleucina, también participa en el metabolismo de glucosinolato (Schuster *et al.*, 2006).

Una función adicional también se ha descrito para la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de *Nicotiana benthamiana* (*NbBCAT*). La enzima *NbBCAT* se localiza en el cloroplasto y se expresa principalmente en flores y hojas jóvenes, cuando la expresión de este gen se reprime las hojas muestran un desarrollo anormal, además se observa una disminución en los niveles de las hormonas giberelina y ácido indolacético y un aumento en el nivel de citoquinina. Se ha sugerido que *NbBCAT* regula los niveles de estas hormonas a través de la modulación de los factores transcripcionales *KNOX* (Gao *et al.*, 2009).

Estos resultados sugieren que además de la subfuncionalización, los ortólogos de Bat1/Bat2 en otros organismos posiblemente han experimentado algún tipo de neofuncionalización

Promotor *BAT1*



Promotor *BAT2*

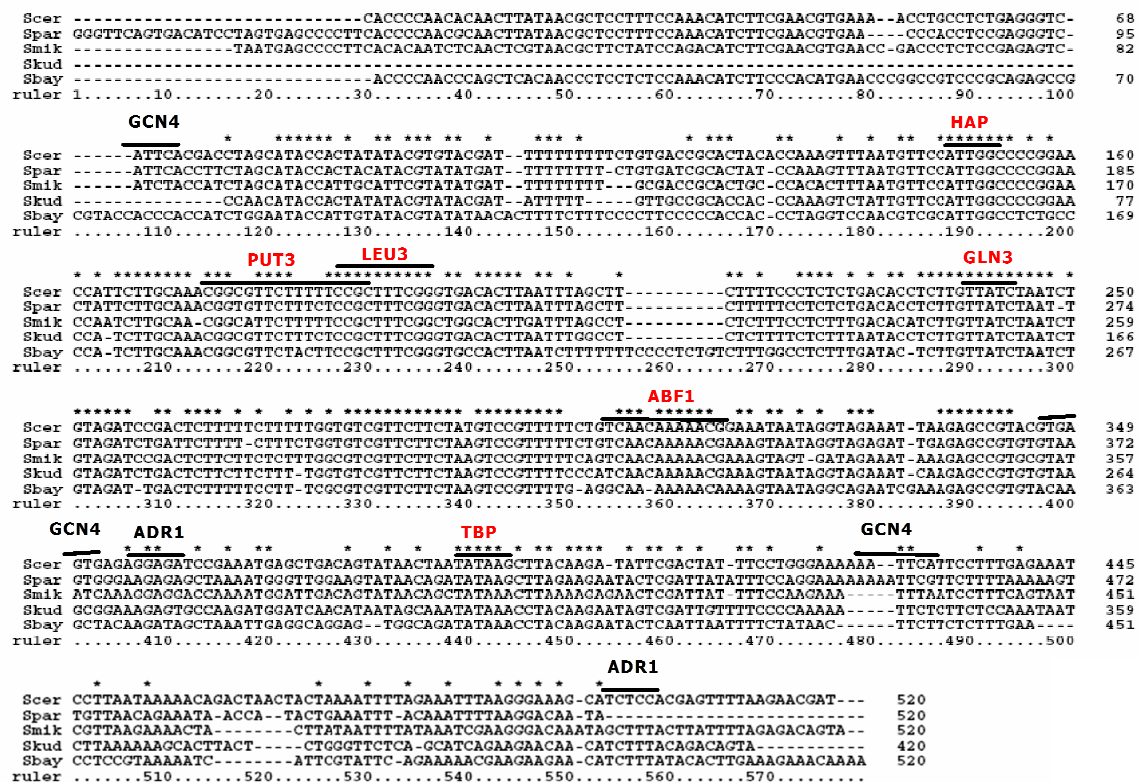


Figura 4. Organización de los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Alrededor del 30% del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* está constituido por genes presentes en más de una copia, aproximadamente la mitad de ellos deriva de un evento de duplicación genómica. Después del evento de duplicación, el ancestro de *Saccharomyces* experimentó una pérdida masiva de algunos de los genes duplicados (Kellis *et al.*, 2004; Wolfe y Shields, 1997).

La duplicación de genes provee a la célula del material necesario para la innovación evolutiva ya que una de las copias puede adquirir mutaciones que conlleven a la adquisición de una nueva función (Ohno, 1970).

Si la organización y ubicación de un grupo de genes adyacentes en un cromosoma de la levadura tipo ancestral se encuentran redistribuida en dos cromosomas en *S. cerevisiae* podemos inferir que dicho grupo de genes proviene de la duplicación del genoma completo. El análisis *in silico* del contexto de los genes *BAT1* y *BAT2* usando el programa “Yeast Gene Order Browser” (YGOB <http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) sugiere que estos genes pertenecen a un posible bloque de duplicación genómica.

Un estudio previo de nuestro laboratorio usando microarreglos, mostró que el perfil de expresión de *BAT1* y *BAT2* difiere de acuerdo a la fuente de carbono, mientras que *BAT1* muestra mayor expresión en condiciones de crecimiento fermento-respiratorio (medios con glucosa como fuente de carbono), *BAT2* tiene mayor expresión durante el crecimiento respiratorio (etanol como fuente de carbono). Además del perfil de expresión, los productos codificados por estos genes presentan una diferente distribución subcelular, Bat1 es una proteína mitocondrial y Bat2 es una enzima citosólica (Kispal *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 1996).

Kluyveromyces lactis deriva de un ancestro común a *S. cerevisiae*; sin embargo, el linaje que dio origen a *K. lactis* divergió antes de la duplicación del genoma completo de *S. cerevisiae*. El gen *KIBAT1* de *K. lactis* es el único ortólogo a los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* (<http://www.genolevures.org/elt/KLLA/KLLA0A10307g>). La expresión del gen *KIBAT1* y el papel fisiológico de su producto no han sido estudiados hasta ahora.

El objetivo de este proyecto es analizar las particularidades de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* así como del gen tipo ancestral *KIBAT1* de *K. lactis*, además, se evaluará la función de los productos codificados por dichos genes.

El contraste de estos datos permitirá entender si la conservación de los parálogos *BAT1* y *BAT2* en el genoma de *S. cerevisiae* obedece a un proceso de subfuncionalización que llevó a un perfil de expresión diferencial de los genes, un cambio en las características de las isoenzimas o ambos.

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo general de este trabajo consistió en analizar el perfil de expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y la función de sus productos, así como del gen tipo ancestral *KIBAT1* de *K. lactis*.

3.1. Caracterización fenotípica de las mutantes bajo diferentes condiciones metabólicas.

Se generaron las mutantes sencillas *bat1Δ* y *bat2Δ*, así como la doble mutante *bat1Δ*, *bat2Δ*. Además, estas cepas fueron complementadas con plásmidos monocopia o multicopia en los que se clonó al gen *BAT1* o *BAT2* de *S. cerevisiae* o el gen *KLLA0A10307g* (en este trabajo se denominó *KIBAT1*) de *K. lactis*. Por otro lado, también se construyó la mutante *Kibat1Δ* en *K. lactis*. El análisis fisiológico se realizó determinando las velocidades específicas de crecimiento en condiciones de cultivo que promueven la biosíntesis o catabolismo de valina, isoleucina y leucina.

3.2. Análisis de los patrones de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2*.

La actividad transcripcional de los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2* se determinó mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* de *Escherichia coli*. Las fusiones se clonaron en un vector monocopia que se transformó a la cepa silvestre. Adicionalmente, se realizaron ensayos tipo Northern para determinar la expresión de *BAT1* y *BAT2*.

3.3. Estudio de las propiedades bioquímicas de las isoenzimas Bat1, Bat2 y su único ortólogo en *K. lactis* *KIBat1*.

Se obtuvieron extractos proteínicos de las cepa silvestre y de las mutantes isogénicas *bat1Δ* y *bat2Δ* de *S. cerevisiae*, así como de la cepa silvestre y la mutante *Kibat1Δ* de *K. lactis*. Se determinó la actividad de transaminasa utilizando como sustratos a los tres α -

cetoácidos de cadena ramificada (α -cetoisovalerato, α -cetoisocaproato y α -cetometilvalerato).

4. METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

Tabla I. Cepas utilizadas en este proyecto.

Cepa	Genotipo	Fuente o Referencia
CLA1-2	<i>MATα BAT1 BAT2 ura3 leu2::LEU2</i>	(Quezada <i>et al.</i> , 2008)
<i>bat1Δ</i>	<i>MATα bat1Δ::kanMX4 BAT2 ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
<i>bat2Δ</i>	<i>MATα BAT1 bat2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
<i>bat1Δ bat2Δ</i>	<i>MATα bat1Δ::NAT bat2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
BAT1-TAP	S288C (<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>) <i>BAT1::TAP-HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003)
BAT2-TAP	S288C (<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>) <i>BAT2::TAP-HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003)
<i>Kluyveromyces lactis</i> 155	<i>MATα ade2 his3 ura3</i>	(Navarro-Olmos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Kibat1Δ</i>	<i>MATα ade2 his3 ura3 Kibat1:: kanMX4</i>	Este trabajo

Tabla II. Plásmidos utilizados en este proyecto.

Plásmido	Descripción	Fuente o Referencia
YEp353	Plásmido episomal que permite construir fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i> . Tiene el origen de replicación 2μ y los genes <i>URA3</i> para selección en levadura y el gen para la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> .	(Myers et al., 1986)
YEp353 P _{BAT1}	La región 5' UTR del gen <i>BAT1</i> (1080 pb rio arriba del ATG) se clonó en los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> del plásmido YEp353, en marco de lectura al gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
YEp353 P _{BAT2}	La región 5' UTR del gen <i>BAT2</i> (471 pb rio arriba del ATG) se clonó en los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> del plásmido YEp353, en marco de lectura al gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pRS416 o CEN	Plásmido centromérico de levadura, tiene el gen <i>URA3</i> , que permite la selección en <i>S. cerevisiae</i> y el gen que codifica para la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina en <i>Escherichia coli</i> .	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS416 <i>BAT1</i> o <i>BAT1</i> CEN	Es el plásmido pRS416 en el que se clonó un fragmento de 2315 pb que corresponden a 1080 pb de la región 5' UTR, 1182 pb de la región codificante y 53 pb de la región 3' UTR del gen <i>BAT1</i> . El fragmento se clonó en el sitio de restricción <i>EcoRI</i> .	Este trabajo
pRS416 <i>BAT2</i> o <i>BAT2</i> CEN	Es el plásmido pRS416 en el que se clonó un fragmento de 1681 pb que corresponden a 471 pb de la región 5' UTR, 1131 pb de la región codificante y 79 pb de la región 3' UTR del gen <i>BAT2</i> . El fragmento se clonó entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> .	Este trabajo
pRS426 o 2μ	Plásmido episomal, contiene al gen <i>URA3</i> , que permite la selección en <i>S. cerevisiae</i> y el gen que codifica para la β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> . Tiene el origen de replicación 2μ .	(Christianson et al., 1992)
pRS426 <i>BAT1</i> o <i>BAT1</i> 2μ	Es el plásmido pRS426 en el que se clonó un fragmento de 2315 pb que corresponden a 1080 pb de la región 5' UTR, 1182 pb de la región codificante y 53 pb de la región 3' UTR del gen <i>BAT1</i> . El fragmento se clonó en el sitio de restricción <i>EcoRI</i> .	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente o Referencia
pRS426 <i>BAT2</i> o <i>BAT2</i> 2 μ	Es el plásmido pRS426 en el que se clonó un fragmento de 1681 pb que corresponden a 471 pb de la región 5' UTR, 1131 pb de la región codificante y 79 pb de la región 3' UTR del gen <i>BAT2</i> . El fragmento se clonó entre los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> .	Este trabajo
pRS416 <i>KIBAT1</i> o <i>KIBAT1</i> CEN	Es el plásmido pRS416 en el que se clonó un fragmento de 1815 pb que corresponden a 500 pb de la región 5' UTR, 1291 pb de la región codificante y 24 pb (12 en el extremo 5' y 12 en el extremo 3') para insertar los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> respectivamente.	Este trabajo
pRS416 <i>P_{BAT1}-KIBAT1</i>	Es el plásmido pRS416 en el que se clonó un fragmento de 2395 pb que corresponden a 1080 pb del promotor de <i>BAT1</i> , más 1291 pb de la región codificante de <i>KIBAT1</i> , más 24 pb (12 en el extremo 5' y 29 en el extremo 3') para insertar los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este trabajo
pRS416 <i>P_{BAT2}-KIBAT1</i>	Es el plásmido pRS416 en el que se clonó un fragmento de 1786 pb que corresponden a 471 pb del promotor de <i>BAT2</i> , más 1291 pb de la región codificante de <i>KIBAT1</i> , más 24 pb (12 en el extremo 5' y 29 en el extremo 3') para insertar los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este trabajo
YEpKD352	Es un vector episomal para <i>E. coli</i> y <i>Kluyveromyces</i> , tiene el origen de replicación pKD1 de <i>K. drosophylarum</i> , el origen de replicación pBR322, el casete <i>URA3</i> para selección en levadura, el gen <i>lacZ</i> y el gen β -lactamasa para selección por resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> .	Donación Dr. Roberto Coria
YEpKD352 <i>P_{KIBAT1}-KIBAT1</i>	Es el plásmido YEpKD352 en el que se clonó un fragmento de aprox. 1800 pb que consiste de 500 pb de la región 5' UTR, la región codificante y 63 pb de la región 3' UTR del gen <i>KIBAT1</i> de <i>K. lactis</i> . El fragmento se clonó en los sitios de restricción <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> .	Este trabajo

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Código	Oligonucleótido	Secuencia
M1	<i>BAT1</i> -Fo	ATC AAT AGT AAG GCT CGC AAA CCG CCC
M2	<i>BAT1</i> -Re	CAT GTA AAG TCC AGC GAG ATA CCT TGG C
M3	<i>BAT2</i> -Fo	CAA ACA TCT TCG AAC GTG AAA ACC TGC CTC TGA GGG
M4	<i>BAT2</i> -Re-BIS	GTC CTT GAT ACC GAT AGG CCA GC
M5	<i>BAT1</i> kan-Fo	TAA ATC ACC CTA TAA ACG CAA AAT CAG CTA GAA CCT TAG CCG TAC GCT GCA GGT CGA C
M6	<i>BAT1</i> kan-Re	CGT TTT TTT TTT TTG GGG GGG GAG GGG ATG TTT ACC TTA TCG ATG AAT TCG AGC TCG
M7	<i>BAT2</i> kan-Fo	ATT CCT TTG AGA AAT CCT TAA TAA AAA CAG ACT AAC TAC TCG TAC GCT GCA GGT CGA C
M8	<i>BAT2</i> kan-Re	GTT TTA TTC TTT TTA ACT TTT AAT TAC TTT ACG TAG CAA TAT CGA TGA ATT CGA GCT CG
M9	<i>BAT1</i> promotor-Re	GCA CAA TTC CGT AGT CCA ATG TAG TTC ATG TTT TAG TAT GCT AAG GTT CTA GCT G
M10	<i>BAT2</i> promotor-Re	GCA CAA TTC CGT AGT CCA ATG TAG TTC ATA TCG TTC TTA AAA CTC GTG GAG ATG C
M11	Fusión <i>BAT1</i> -Fo	GCG CGC GAA TTC CGT TTA AGG TTC CTA TTT TGA TAG TC
M12	Fusión <i>BAT1</i> -Re	GCG CGC GCT GCA GGA ATG TCT CTG CAA CAT GTT TTA GTA T
M13	Fusión <i>BAT2</i> -Fo	GCG CGC GAA TTC AAA CCT GCC TCT GAG GGT CAT
M14	Fusión <i>BAT2</i> -Re	GCG CGC GCT GCA GGG TGC CAA GGT CAT ATC G
M15	Southern <i>BAT2</i> -Re	CCT TTC TGA AGT CTA AGT GGG ATA GGG
M16	Plásmido <i>BAT2</i> -Re	GCG CGC CTC GAG CCC CTT AAC TCA GTA GAA AAA ACG C
M17	<i>KIBAT1</i> prom-Fo	GCG CGC GAA TTC CGT TGA CAA GTG ACA ATG CAT GAC
M18	<i>KIBAT1</i> -Re	GCG CGC GGA TCC GAG CTA CCT GAT CCG TGC TAC ATA G
M19	<i>KIBAT1</i> Cod-Fo	ATG AAC TAC ATT GGA CTA CGG AAT TGT GC
M20	<i>KIBAT1</i> kan-Fo	CCA TCT GTA TCA TTT GTC CTA GCT ATT TCA TCC CTG GCA AGG CGT ACG CTG CAG GTC GAC
M21	<i>KIBAT1</i> kan-Re	GCT ACA TAG TTG CTA GTG ACA CAT AAT CAC GGT AGG TTG TAT TTA GGA TCG ATG AAT TCG AGC TCG
M22	<i>KIBAT1</i> Ver-Re	ACG GCT TTG AAC CCA GTC TTG TAA TAT GG
M23	5' <i>KIBAT1</i> -Re	CCT TGC CAG GGA TGA AAT AGC TAG G
M24	3' <i>KIBAT1</i> -Fo	CCT AAA TAC AAC CTA CCG TGA TTA TGT G
M25	3' <i>KIBAT1</i> -Re	TTG GAA ACC CTA TTA TCC TTA AAC GG
M26	Kan5'-Rev	TCG CGA GCC CAT TTA TAC CC
M27	NAT1-Re	TAA GCC GTG TCG TCA AGA GTG G
M28	Kan3'-Rev	GGC AGT TCC ATA GGA TGG CA

4.1. Construcción de mutantes

Las mutantes se construyeron mediante reemplazo por recombinación homóloga del gen de interés por los módulos *KanMX4* (Wach *et al.*, 1994) o *NAT* (Goldstein y McCusker, 1999), que confieren resistencia a los antibióticos geneticina/G418 o *NAT*/nourseotricina, respectivamente.

Para generar la mutante sencilla *bat1Δ* se amplificó el casete *KanMX4* con los oligonucleótidos M5 y M6 utilizando como molde al plásmido pFA6a. El módulo amplificado contiene al casete *KanMX4* flanqueado por 40 pb del UTR 5' y 38 pb del UTR 3' del gen *BAT1* (Tabla III, regiones en negrillas en los oligonucleótidos correspondientes). El módulo (1584 pb) se purificó mediante el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en solución "QIAQUICK™ PCR Purification Kit" de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se transformó 1 μg del módulo a la cepa silvestre CLA1-2 usando el protocolo de transformación de levadura con acetato de litio. Las transformantes se seleccionaron en YPD geneticina (200 μg/ml).

La construcción de la mutante *bat2Δ* se realizó de manera similar pero con los oligonucleótidos M7 y M8. El módulo amplificado a partir del plásmido pFA6a contiene al casete *KanMX4* flanqueado por 40 pb del UTR 5' y 40 pb del UTR 3' del gen *BAT2* (Tabla III, regiones en negrillas en los oligonucleótidos correspondientes). El módulo (1586 pb) se purificó y se transformó a la cepa silvestre CLA1-2 como se describió anteriormente.

Para generar la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* primero se sustituyó al módulo *KanMX4* de la mutante sencilla *bat1Δ* por el casete *clonNAT*. El módulo *clonNAT* se obtuvo mediante digestión del plásmido p4339 con la enzima *EcoRI*. Posteriormente sobre el fondo de esta mutante (*bat1::nat*) se transformó el módulo *KanMX4* flanqueado por regiones homólogas al gen *BAT2*, siguiendo el mismo procedimiento que la construcción de la mutante sencilla *bat2Δ*. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a geneticina y nourseotricina (YPD geneticina 200 μg/ml y *NAT* 100 μg/ml).

Para generar la mutante *Kibat1Δ* de *K. lactis* se construyó un módulo que contenía al casete *KanMX4* flanqueado por aproximadamente 500 pb de los UTR 5' y 3' del gen *KIBAT1*. Este módulo se amplificó con los oligonucleótidos M17 y M25 usando como molde tres productos de PCR: i) 505 pb del UTR 5' del gen *KIBAT1*, amplificado con los oligonucleótidos M17 y M23, ii) la región codificante del módulo *KanMX4* flanqueada por regiones homólogas a los UTR 5' y 3' del gen *KIBAT1*, amplificado con los oligonucleótidos

M20 y M21 y iii) 462 pb del UTR 3' del gen *KIBAT1* amplificado con los oligonucleótidos M24 y M25. El módulo se purificó siguiendo el protocolo “*Wizard SV Gel and PCR Cleanup System*” de PROMEGA. Una vez purificado, se transformó 1 µg del módulo a la cepa silvestre *K. lactis* 155 usando el protocolo de transformación de levadura con acetato de litio con una ligera modificación, antes del choque térmico las células fueron incubadas en presencia de DMSO (dimetil sulfóxido). Las transformantes se seleccionaron en YPD genética (200 µg/ml).

Las inserciones de los módulos *KanMX4* o *clonNAT* en el *locus* correspondiente se verificaron amplificando el módulo correspondiente con un oligonucleótido que hibrida sobre el UTR 5' del *locus* de interés y otro que hibrida sobre el módulo de interrupción. Para verificar las mutantes *bat1::kan*, *bat1::nat* y *bat2::kan* se utilizaron los oligonucleótidos M1 y M26, M1 y M27 y M3 y M26, respectivamente. Además, tanto en la cepa silvestre como en las mutantes isogénicas se amplificaron fragmentos que incluían el gen silvestre o el módulo *KanMX4* usando oligonucleótidos que hibridan sobre las regiones UTR 5' y 3' en las siguientes combinaciones: M1 y M2 para amplificar el gen silvestre o el módulo *KanMX4* en el *locus BAT1*, M3 y M4 para amplificar el gen silvestre o el módulo *KanMX4* en el *locus BAT2*. La inserción de los módulos *KanMX4* y *clonNAT* en la doble mutante *bat1::nat bat2::kan* se verificó como en las mutantes sencillas.

La inserción del casete *KanMX4* en el *locus* del gen *KIBAT1* se verificó amplificando con un oligonucleótido que hibrida sobre el UTR 5' del gen *KIBAT1* y otro que hibrida sobre el módulo *KanMX4* (M17 y M28), también se amplificó un fragmento del gen silvestre con los oligonucleótidos M17 y M22. Además se usaron los oligonucleótidos M17 y M25 para amplificar el gen silvestre o el módulo *KanMX4* desde los UTR 5' y 3' del *locus* de *KIBAT1*.

4.2. Condiciones de crecimiento

Las cepas se crecieron en medio mínimo (MM) con sales, elementos traza y vitaminas, usando como fuente de carbono glucosa 2% (peso/volumen) o etanol 2% (volumen/volumen). De acuerdo al experimento la fuente de nitrógeno usada fue sulfato de amonio (40 mM), valina (150 mg/ml), isoleucina (30 mg/ml), leucina (100 mg/ml), GABA (1 g/l) o glutamina (1 g/l). Cuando se requirió se adicionó valina, isoleucina, leucina (en las concentraciones indicadas anteriormente), uracilo (20 mg/ml), adenina (20 mg/ml),

metionina (20 mg/ml) o histidina (20 mg/ml) para complementar auxotrofías. Todos los cultivos se incubaron a 30°C.

Para determinar la velocidad específica de crecimiento, primero se calculó el valor de la pendiente en la fase exponencial de la curva de crecimiento. Posteriormente se aplicaron las fórmulas que se indican a continuación

$$td = \frac{\log 2}{m} \quad \mu = \frac{\ln 2}{td}$$

td Tiempo de duplicación (h)

m Pendiente en la fase exponencial de la curva de crecimiento

μ Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

4.3. Transformación de levadura con acetato de litio

- 1) Inocular 10 ml de medio YPD con una colonia aislada de la cepa deseada e incubar a 30°C por toda la noche.
- 2) Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a T.A. para colectar las células.
- 3) Resuspender en 5 ml de agua estéril. Diluir en 40 ml de YPD a una DO_{600nm} final de 0.2 a 0.25.
- 4) Incubar a 30°C, 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5-0.6.
- 5) Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a T.A. para colectar las células. Resuspender en 40 ml de agua estéril y centrifugar nuevamente a 3000 rpm por 5 min a T.A. para colectar las células.
- 6) Resuspender en 1 ml de agua estéril y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 7) Centrifugar a 14000 rpm por 5 seg. Eliminar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de TE/LiOAc (LiOAc 100 mM pH 7.5, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM).
- 8) Resuspender las células en 200 μ l de TE/LiOAc.
- 9) Colocar 50 μ l de células en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 10) Agregar 1 μ g del producto de PCR y 10 μ l de DNA acarreador (DNA de esperma de salmón, previamente sonificado y hervido por 5 min. Incubar en hielo por 5 min antes de usarlo).

NOTA: Incluir como control negativo células sin DNA y células sólo con DNA de esperma de salmón.

- 11) Mezclar con vortex. Adicionar 300 μ l de PGE/TE/LiOAc al 45% (PEG 45%, LiOAc 100 mM pH 7.5, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) y mezclar con vortex.
- 12) Incubar a 30°C, 250 rpm por 30 min.
- 13) Someter a choque térmico a 42°C por 15 min.
- 14) Preparar tubos Falcon de 50 ml con 3 ml de YPD.
- 15) Centrifugar las células a 14000 rpm por 30 seg. Eliminar el sobrenadante.
- 16) Resuspender el botón celular en 1 ml de YPD y transferir al tubo con 3 ml de YPD.
- 17) Incubar a 30°C , 250 rpm por 3 h.
- 18) Colectar las células por centrifugación y resuspender en 400 μ l de YPD.
- 19) Platear en medio YPD selectivo e incubar a 30°C.

4.4. Construcción de plásmidos monocopia y multicopia de los genes *BAT1*, *BAT2* y *KIBAT1*

Los genes *BAT1*, *BAT2* y *KIBAT1* con sus respectivas regiones promotoras fueron clonados en plásmidos monocopia (pRS416, CEN) o multicopia (pRS426, 2 μ).

El gen *BAT1* más 1080 pb del UTR 5' se amplificó con los oligonucleótidos M11 y M2 (2555 pb) usando como molde DNA genómico de la cepa CLA1-2. Para amplificar al gen *BAT2* más 490 pb del UTR 5' se usaron los oligonucleótidos M13 y M16 (1681 pb) y DNA genómico de la cepa CLA1-2 como molde. El gen *KIBAT1* más 500 pb del UTR 5' se amplificó con los oligonucleótidos M17 y M18 (1815 pb) usando como molde DNA genómico de la cepa silvestre *K. lactis* 155.

Los productos de PCR se purificaron siguiendo el protocolo “*Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*” de PROMEGA. Los insertos y vectores se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes. Además, los vectores se desfosforilaron con fosfatasa alcalina.

El módulo *BAT1* se clonó en el sitio de restricción *EcoRI* de pRS416 o pRS426 generando los plásmidos *BAT1* CEN y *BAT1* 2 μ , respectivamente. El módulo *BAT2* se clonó en los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* de los vectores pRS416 o pRS426, generando los plásmidos *BAT2* CEN y *BAT2* 2 μ , respectivamente. El módulo *KIBAT1* se clonó en los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* de los plásmidos pRS416 y YEpKD352 generando los plásmidos pRS416 *KIBAT1* y YEpKD352 P_{*KIBAT1*}-*KIBAT1*.

Los plásmidos *BAT1* CEN, *BAT1* 2 μ , *BAT2* CEN, *BAT2* 2 μ y pRS416 *KIBAT1* se transformaron en la cepa CLA1-2 y las mutantes isogénicas *bat1* Δ , *bat2* Δ y *bat1* Δ *bat2* Δ . El plásmido YEpKD352 P_{*KIBAT1*}-*KIBAT1* se transformó en la cepa *K. lactis* 155 y la mutante isogénica *Kibat1* Δ .

4.5. Construcción de fusiones quiméricas de los promotores *BAT1* y *BAT2* al gen *KIBAT1* de *Kluyveromyces lactis*

Para generar fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *BAT1* o *BAT2* a la región codificante del gen *KIBAT1* primero se amplificaron las regiones intergénicas de los genes *BAT1* y *BAT2* usando como molde DNA genómico de la cepa CLA1-2 y los oligonucleótidos M11 y M9 para el promotor de *BAT1* (1121 pb); y M13 y M10 para el promotor de *BAT2* (512 pb). Por otro lado se amplificó la región codificante del gen *KIBAT1* con los oligonucleótidos M19 y M18 (1303 pb) usando como molde DNA genómico de la cepa *K. lactis* 155. Al amplificar los promotores de los genes *BAT1* o *BAT2* se agregó al extremo 3' una región homóloga a la región codificante del gen *KIBAT1* (Tabla III, 29 pb, indicados en negrillas en los oligonucleótidos M9 y M10).

Para obtener la quimera P_{*BAT1*}-*KIBAT1* se usó como molde el módulo correspondiente al promotor de *BAT1* y la región codificante de *KIBAT1* en una PCR con los oligonucleótidos M11 y M18. Para obtener la quimera P_{*BAT2*}-*KIBAT1* se usó como molde el módulo del promotor de *BAT2* y la región codificante de *KIBAT1* en una PCR con los oligonucleótidos M13 y M18. Los productos de PCR se purificaron con el protocolo “*Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*” de PROMEGA y se clonaron en los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* del plásmido monocopia pRS416.

Estos plásmidos se transformaron en la cepa CLA1-2 y las mutantes isogénicas *bat1* Δ , *bat2* Δ y *bat1* Δ *bat2* Δ .

4.6. Construcción de fusiones del reportero *lacZ* de *Escherichia coli* a los promotores *BAT1* y *BAT2*

Para generar fusiones transcripcionales de los promotores de *BAT1* y *BAT2* a la región codificante del gen *lacZ* de *Escherichia coli*, la región intergénica de *BAT1* se amplificó con los oligonucleótidos M11 y M12 (Tabla III, en negrillas se indican los sitios de restricción para *EcoRI* y *PstI*), para amplificar el promotor de *BAT2* se usaron los oligonucleótidos M13 y M14 (Tabla III, en negrillas se indican los sitios de restricción para *EcoRI* y *PstI*). Los fragmentos obtenidos (1122 pb para *BAT1* y 510 pb para *BAT2*) se purificaron siguiendo el protocolo “QIAQUICK™ PCR Purification Kit” de QIAGEN. Los fragmentos purificados se clonaron en el plásmido YEp353 en los sitios de restricción *EcoRI* y *PstI* generando los plásmidos YEp353 P_{BAT1} y YEp353 P_{BAT2} que se transformaron a la cepa CLA1-2.

4.7. Determinación de actividad de β -galactosidasa

Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de extracción, posteriormente las células se lisaron con perlas de vidrio (Cogoni *et al.*, 1995).

La actividad de β -galactosidasa (β -gal) se determinó usando una modificación de los protocolos descritos por Valenzuela y colaboradores (Valenzuela *et al.*, 1998, 2001). Esta modificación permite medir la actividad de β -gal en placas de microtitulación de 96 pozos. El protocolo se describe a continuación.

- 1) Agregar a cada pozo de 1.5 a 15 μ l de muestra y aforar a 15 μ l con Amortiguador de extracción.
- 2) Agregar 135 μ l de Buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, pH 7.0) + DTT 1 mM con la pipeta multicanal.
- 3) Incubar la placa de microtitulación a 30°C por 5 min.
- 4) Iniciar la reacción agregando 30 μ l de la solución ONPG (4 mg/ml en Buffer Z), agitar con la pipeta multicanal. Incubar por 1 min.
- 5) Detener la reacción agregando 75 μ l de Na_2CO_3 1 M. Anotar el tiempo exacto en el cuál se detiene la reacción.
- 6) Medir a $\text{DO}_{420\text{nm}}$.

- 7) Determinar la actividad específica del extracto de acuerdo a la siguiente fórmula. La actividad específica se expresa en nmoles de o-nitrofenol producido por minuto por miligramo de proteína ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$).

$$\frac{\text{DO}_{420\text{nm}} \times 0.255}{0.0045 \times [\text{proteína}] \times V_{\text{ext}} \times t}$$

$\text{DO}_{420\text{nm}}$	DO del producto o-nitrofenol a 420 nm
0.255	Factor para corregir por el volumen de reacción
0.0045	DO de una solución de o-nitrofenol a una concentración de 1 nmol/ml
[proteína]	Concentración de proteína expresada en mg/ml
V_{ext}	Volumen de muestra analizado en ml
t	Tiempo de reacción expresado en minutos

4.8. Determinación de la concentración de proteína

Se siguió un protocolo modificado a partir del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) que permite realizar el ensayo en placas de microtitulación de 96 pozos.

- 1) Preparar la solución ABC (Sol. A 19.6 ml + Sol. B 0.2 ml + Sol. C 0.2 ml).
- 2) Preparar la solución de Folin diluyendo 1:1 con H_2O bidestilada (preparar justo antes de usar).
- 3) En la fila A de la placa de microtitulación preparar la curva estándar utilizando diferentes volúmenes de una solución de BSA (1 mg/ml), aforar a 40 μl con H_2O bd (usar 1.5, 3, 4.5, 6, 8, 10, 15 y 20 μl de BSA para cada pozo).
- 4) En las siguientes filas, preparar las muestras, utilizar 10, 20, 30 y 40 μl , se pueden analizar 2 diluciones (10^0 y 10^{-1}). Aforar a 40 μl con H_2O bd.
- 5) Agregar 200 μl de la Sol. ABC a cada pozo. Mezclar con micropipeta multicanal e incubar 10 min.
- 6) Agregar 20 μl de Folin diluido. Mezclar con micropipeta multicanal e incubar 30 min.
- 7) Registrar $\text{DO}_{625 \text{ nm}}$.

Solución A: NaOH 0.4%, Na_2CO_3 2%.

Solución B: Tartrato de Sodio y Potasio 2 %. Almacenar a 4°C.

Solución C: Sulfato cúprico 1%. Almacenar a 4°C en oscuridad.

4.9. Inmunodetección de las proteínas de interés

Se determinó la cantidad de antígeno Bat1-TAP o Bat2-TAP en diferentes condiciones de cultivo y fases de crecimiento. Los extractos se obtuvieron a partir de cultivos en fase exponencial (DO_{600nm} 0.4 a 0.7) en medios con glucosa como única fuente de carbono y glutamina, amonio ó GABA más VIL como única fuente de nitrógeno. También se obtuvieron extractos de cultivos en fase exponencial y estacionaria en YPD. Para la obtención de extractos se usó el siguiente protocolo:

- 1) Colectar las células por centrifugación 5 min a 3000 rpm y 4°C. Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet en agua y colectar las células por centrifugación.
- 2) Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet en 280 μ l de Amortiguador de Pronasa. Transferir las células a un tubo eppendorf y adicionar 50 μ l de una solución de TCA al 85% (ácido tricloroacético, el TCA precipita proteínas y ácidos nucleicos). Agregar 2.8 μ l de PMSF 0.1 M (17.4 mg/ml).
- 3) Agregar un volumen de perlas de vidrio previamente lavadas con ácido nítrico y esterilizadas con autoclave.
- 4) Agitar con vórtex a máxima velocidad durante 1 min, incubar 1 min en hielo, repetir el procedimiento de 7 a 10 veces.
- 5) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, mantener sobre hielo.
- 6) Lavar las perlas dos veces con 280 μ l de TCA al 5%. Combinar el sobrenadante de los lavados con el sobrenadante del inciso anterior.
- 7) Incubar los tubos en hielo durante 5 minutos. Centrifugar 10 min a 5000 rpm y 4°C.
- 8) Remover todo el sobrenadante, asegurarse de eliminar todo el TCA del tubo. Centrifugar de nuevo y remover el TCA remanente.
- 9) Resuspender el pellet en 30 μ l de Buffer Thorner, éste tornará a amarillo. Adicionar 1/10 del volumen o lo que sea necesario de Tris-base 1 M (sin pH ajustado) para que el color del buffer torne nuevamente a azul.
- 10) Almacenar las muestras a -70°C.
- 11) Cuantificar la proteína obtenida usando un espectrofotómetro.

Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La detección de Bat1-TAP y Bat2-TAP se realizó mediante hibridación con el anticuerpo primario anti-TAP (anticuerpo policlonal de conejo, CAB1001, OPEN Biosystems) en dilución 1:5000; como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa en una dilución 1:10000. Como control de carga se detectó antígeno actina y homocitrato sintasa, usando como anticuerpo primario anti-actina obtenido de conejo (A2668, SIGMA) en una dilución 1:100 o anti-homocitrato sintasa obtenido de ratón (31F5, EnCor Biotechnology Inc.) en dilución 1:5000. Como anticuerpo secundario se usaron anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa.

4.10. Preparación de extractos proteicos para actividad de transaminasa o para purificación de proteínas

Los extractos se obtuvieron usando un protocolo basado en el publicado por el NCRR *Yeast Resource Center* (http://depts.washington.edu/yeastrc/pages/tap_prot.pdf) y por Rigaut y colaboradores (Rigaut *et al.*, 1999).

- 1) Colectar las células por centrifugación a 4000 rpm por 20 min a 4°C.
- 2) Resuspender el pellet en 500 ml de agua fría empleando el vórtex. Centrifugar a 4000 rpm por 20 min a 4°C.
- 3) Resuspender el pellet en 50 ml de agua fría. Transferir las células a un tubo Falcon de 50 ml y centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante. En este punto las células se pueden almacenar a -70°C y emplear al día siguiente.
- 4) Resuspender el pellet en 40 ml de buffer NP-40 (Na₂HPO₄ 15 mM, NaH₂PO₄-H₂O 10 mM, NP-40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 80 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, DTT 1 mM, BSA 0.1%, PMSF 1mM, pH 7.2).
- 5) Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de buffer NP-40, agregar 1 volumen de perlas de vidrio.
- 6) Agitar con vórtex a máxima velocidad por 1 min, incubar en hielo el siguiente min. Repetir este procedimiento de 5-7 veces.
- 7) Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C.
- 8) Tomar el sobrenadante con mucho cuidado y transferirlo a un tubo Falcon nuevo o hacer alícuotas en 1 ml.

4.11. Medición de actividad de transaminasa

Se desarrolló un protocolo para determinar la actividad de transaminasa de Bat1 y Bat2 acoplando el ensayo al complejo enzimático de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -CGDH).

Las enzimas Bat1 y Bat2 usan α -cetoácidos de cadena ramificada (α -CACR) y ácido glutámico como sustratos para producir aminoácidos de cadena ramificada (AACR) y α -cetoglutarato (α -CG), usando piridoxal 5'-fosfato (PP) como cofactor. Al acoplar la reacción al complejo de la α -CGDH, el α -CG es usado como sustrato junto con Coenzima A (CoA) y NAD^+ para producir succinil-CoA, CO_2 y NADH en presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y tiamina pirofosfato (TPP). La reducción del NAD^+ a NADH es monitoreada midiendo absorbancia a 340 nm a lo largo del tiempo.

El buffer de reacción consiste en MOPS 50 mM pH 7.1 (M3183, SIGMA), DTT 1 mM, CaCl_2 0.1 mM (1332, JT Baker), MgCl_2 0.47 mM (20441-43B, MERCK), TPP 1 mM (C8754, SIGMA), CoA 0.25 mM (C4780, SIGMA), piridoxal 5'-fosfato 0.25 mM (P9255, SIGMA), α -CGDH 0.25 U (K1502, SIGMA), NAD^+ 1 mM (N7004, SIGMA), buffer de fosfato de potasio 5 mM pH 7.0, α -CACR 1 mM y ácido glutámico 40 mM (G1501, SIGMA) en un volumen final de 1 ml. Los α -CACR usados en este ensayo fueron: α -cetoisocaproato sal de sodio (α -CIC; K0629, SIGMA), DL- α -ceto- β -metilvalerato sal de sodio (α -CMV; K7125, SIGMA) y ácido α -cetoisovalérico sal de sodio (α -CIV; 151395, ICN).

El buffer de reacción se incubaba a 30°C en un espectrofotómetro Cary 50 Bio (VARIAN). Se monitorea la absorbancia a 340 nm de 5 a 10 min. La reacción se inicia con la adición del extracto crudo, la absorbancia se monitorea por 30 min más. Una vez terminado el ensayo se calcula la pendiente de la fase exponencial de la curva de la muestra y de los controles (sin extracto). Se sustrae el valor del control del valor de la pendiente muestra. La actividad de transaminasa se calculó con la fórmula que se indica en la siguiente página.

$$\text{Actividad específica} = \left(\frac{m \times Vol_{ensayo}}{\varepsilon \times \ell \times C_{extracto} \times Vol_{extracto}} \right) \div 1000$$

m = Pendiente

Vol_{ensayo} = Volumen del ensayo en ml (1 ml)

ε = Coeficiente de extinción del NADH a 340nm, $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

ℓ = Paso de luz, 1 cm

$C_{extracto}$ = Concentración del extracto en mg/ml

$Vol_{extracto}$ = Volumen del extracto en ml

4.12. Purificación de proteínas etiquetadas con TAP

Preparación de las perlas

- 1) Tomar 400 μl de una suspensión de perlas de IgG agarosa (SIGMA A2909) y lavarlas con 5 ml de Buffer IPP150 en una columna de cromatografía Poly-Prep (BIO-RAD 731-1550).
- 2) Tomar 400 μl de la suspensión de perlas de calmodulina (STRATAGENE 214303) y lavarlas con 5 ml de buffer IPP50 de unión a Calmodulina en una columna de cromatografía Poly-Prep (BIO-RAD 731-1550).

Purificación de la proteína

- 1) A 10 ml de extracto (que corresponde a 2 l de cultivo) agregar 50 μl de una solución 2 M de Tris-HCl pH 8.0, 200 μl de una solución 5 M de NaCl y 100 μl de NP40 al 10%. Tomar 50 μl para análisis por SDS-PAGE. Muestra 1.
- 2) Colocar la tapa inferior a la columna. Añadir la mezcla anterior a la columna con las perlas de IgG agarosa. Tapar el extremo superior. Incubar por 5.5 h a 4°C en agitación (usando el Speci-Mix, THERMOLYNE).
- 3) Remover la tapa superior de la columna y después la tapa inferior y permitir que la columna se drene por gravedad. Tomar 50 μl para análisis por SDS-PAGE. Muestra 2.
- 4) Lavar con 30 ml de IPP150. Tomar 1 ml para análisis por SDS-PAGE. Muestra 3.

- 5) Lavar con 10 ml de Buffer TEV (agregar DTT al momento de usar, agregar 1 μ l de una solución DTT 1M por cada ml de Buffer TEV). Tomar 1 ml para análisis por SDS-PAGE. Muestra 4.
- 6) Tapar la parte inferior de la columna y agregar 2 ml de Buffer TEV y aproximadamente 450 unidades de enzima TEV (AcTEV, INVITROGEN, 10 U/ μ l). Tapar la parte superior de la columna e incubar 14.5 h a 4°C agitando en el Speci-Mix.
- 7) Remover ambas tapas de la columna y recuperar el eluato (permitir que drene por gravedad). La solución remanente de la columna se puede eluir agregando 200 μ l de Buffer TEV (agregar DTT). Tomar 50 μ l para análisis por SDS-PAGE. Muestra 5.
- 8) Agregar 3 volúmenes de Buffer de unión a calmodulina (al momento de usar agregar 7 μ l de β -mercaptoetanol por cada 10 ml de buffer) al eluato y 3 μ l de CaCl₂ 1M por cada ml de eluato para titular el EDTA contenido en el buffer TEV.
- 9) Transferir la mezcla anterior a la columna con perlas de calmodulina.
- 10) Tapar ambos extremos de la columna e incubar por 4 h a 4°C en el Speci-Mix.
- 11) Permitir que la columna se drene por gravedad. Tomar 1 ml para análisis por SDS-PAGE. Muestra 6.
- 12) Lavar con 30 ml de Buffer IPP150 de unión de calmodulina (al momento de usar agregar 7 μ l de β -mercaptoetanol por cada 10 ml de buffer). Tomar 1 ml para análisis por SDS-PAGE. Muestra 7.
- 13) Eluir 5 fracciones de 200 μ l con Buffer IPP150 de elución de calmodulina (agregar β -mercaptoetanol al momento de usar). Tomar 10 μ l para análisis por SDS-PAGE. Muestra 8.
- 14) Para analizar las proteínas en un gel, precipitar los eluatos finales y algunos controles con TCA.
- 15) Para estudios funcionales dializar con el buffer apropiado y mantener a -80°C.

4.13. Detección de transcritos específicos

Se siguió el protocolo descrito por Valenzuela y colaboradores (Valenzuela *et al.*, 2001). El RNA se extrajo por el método de fenol ácido descrito por Struhl y Davis (Struhl y Davis, 1981) a partir de cultivos de 100 ml en fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} 0.4 a 0.6). Para hibridar los transcritos de *BAT1* y *BAT2* se usaron sondas que incluían toda la región codificante flanqueada por aproximadamente 500 pb de la región UTR 5' y 250 pb

de la región UTR 3'. Las sondas se amplificaron usando los oligonucleótidos M1 y M2 (2044pb), y M3 y M4 (1847 pb). Como control de cargado se usó un fragmento del gen *ACT1* de aprox. 1200 pb. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Bat1 es una enzima principalmente biosintética

Las aminotransferasas son enzimas que catalizan reacciones reversibles, que participan tanto en la síntesis como en el catabolismo de aminoácidos. Las aminotransferasas Bat1 y Bat2 participan en el metabolismo de valina, isoleucina y leucina (VIL). Para analizar el papel fisiológico de estas isoenzimas, se determinó la velocidad específica de crecimiento de las mutantes sencillas *bat1Δ*, *bat2Δ* o en la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* en medios que promueven la síntesis o el catabolismo de VIL.

Como se observa en la Figura 5, en glucosa amonio la velocidad específica de crecimiento (μ) de la mutante *bat1Δ* fue un 30% menor al de la cepa silvestre (WT); la mutante *bat2Δ* mostró un fenotipo silvestre y la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* no creció.

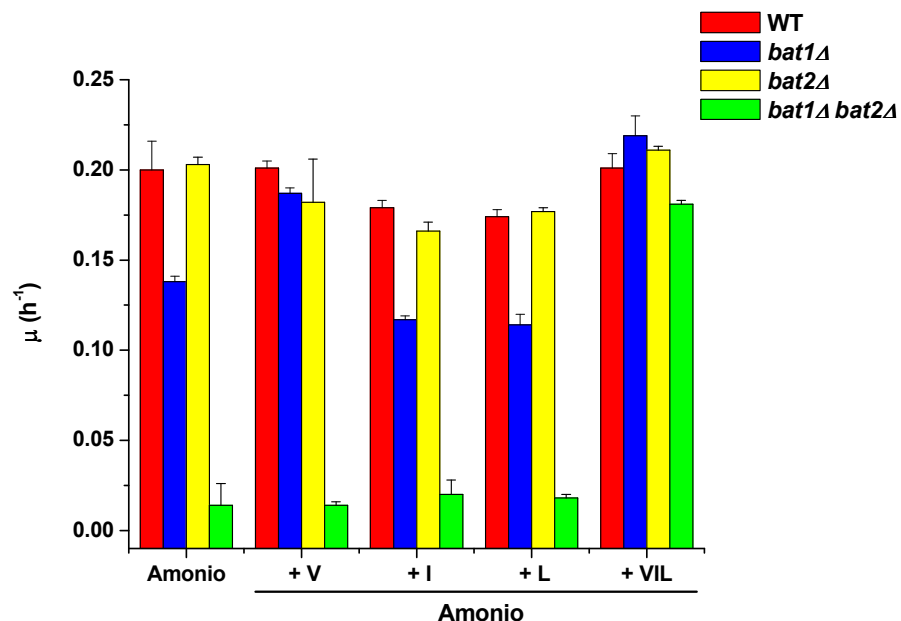


Figura 5. Bat1 juega un papel primordial en la síntesis de valina. La cepa CLA1-2, las mutantes isogénicas *bat1Δ*, *bat2Δ* y la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* se cultivaron en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, en presencia de valina (+V), isoleucina (+I), leucina (+L) o los tres aminoácidos (+VIL) y se incubaron en el lector de placas Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ). Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones.

La deficiencia en crecimiento que muestra la mutante *bat1Δ* se debe a que esta cepa es un auxótrofo parcial de valina, la adición exógena de este aminoácido restaura el fenotipo silvestre (Fig. 5, +V). Por otro lado, la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* es un auxótrofo de valina, isoleucina y leucina que requiere la adición simultánea de los tres aminoácidos para mostrar un crecimiento similar a la cepa silvestre (Fig. 5, +VIL).

Los resultados anteriores sugieren que Bat1 tiene un papel principalmente biosintético, en particular sobre la síntesis de valina. Como ya se mencionó anteriormente las aminotransferasas catalizan reacciones reversibles, los resultados obtenidos hasta este punto no descartan la posibilidad de que Bat1 también participe en el catabolismo de estos aminoácidos. Es necesario resaltar que aunque en glucosa amonio la mutante *bat2Δ* se comportó como la cepa silvestre, la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* es un auxótrofo de VIL, lo cual indica que Bat2 también tiene un papel biosintético que sólo se aprecia en ausencia de Bat1. Es posible que en la mutante *bat1Δ* la síntesis de valina por Bat2 sea deficiente o nula, pero al parecer Bat2 es capaz de sintetizar la leucina e isoleucina que la célula requiere; por ello, la doble mutante requiere la adición de los tres aminoácidos (Fig. 5).

Posiblemente la compartimentalización de la vía de síntesis de valina y la acumulación de α -CIV en la mitocondria, estimula el carácter biosintético de Bat1

Bat1 es una enzima mitocondrial mientras que Bat2 es una enzima citosólica, en una mutante *bat1Δ* sólo se detecta actividad de transaminasa en la fracción citosólica, mientras que en una mutante *bat2Δ* la actividad de transaminasa sólo se detecta en la fracción mitocondrial, por lo que podemos inferir que Bat1 únicamente está presente en la mitocondria y al menos bajo las condiciones analizadas no hay una poza de Bat1 citosólica (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996; Colón *et al.*, 2011). Estudios previos han propuesto que la relocalización subcelular de productos de genes parálogos contribuye a la diversificación funcional de los mismos (Marques *et al.*, 2008).

La síntesis de leucina comparte las primeras reacciones con la vía de síntesis de valina, estas reacciones iniciales tienen lugar en la mitocondria (Ryan y Kohlhaw, 1974). La última reacción común a las vías de síntesis de valina y leucina es la producción de α -cetoisovalerato (α -CIV). El α -CIV producido puede ser usado como sustrato de Bat1 y/o Bat2 para sintetizar valina mediante una reacción de transaminación, o puede continuar hacia la producción de leucina, para lo cual es convertido a α -isopropil malato (α -IPM) en

una reacción catalizada por Leu4/Leu9. Posteriormente, el α -IPM es exportado de la mitocondria y convertido a leucina mediante 3 reacciones catalizadas por las enzimas Leu1, Leu2 y Bat2 (Kohlhaw, 2003).

Dado que Bat2 es la transaminasa citosólica, sería lógico pensar que la síntesis de leucina es catalizada únicamente por Bat2; sin embargo, una mutante *bat2 Δ* no es auxótrofa de leucina. Es posible que en esta mutante: i) la conversión de α -CIC a leucina sea catalizada por otra transaminasa citosólica o ii) que el α -CIC sea transportado a la mitocondria en donde Bat1 cataliza su transaminación. Al parecer no hay otra vía involucrada en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, ya que la doble mutante *bat1 Δ bat2 Δ* es auxótrofa de VIL; por lo tanto es plausible que el α -CIC sea transportado de alguna forma a la mitocondria en donde Bat1 sintetizaría leucina. La aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial de rata (BCAT_m) funciona como un transportador de α -cetoácidos de cadena ramificada cuando se incorpora a vesículas de fosfolípidos (Hutson y Hall, 1993), posiblemente en *S. cerevisiae* Bat1 esté involucrada en el transporte de α -CIC.

Como ya se mencionó, en la síntesis de leucina se requiere que el α -IPM sea exportado de la mitocondria. Se ha reportado que el acarreador de oxaloacetato Oac1 es el transportador de α -IPM. En una mutante *oac1 Δ* no hay transporte de α -IPM; sin embargo, estas mutantes son bradítrofas (y no auxótrofas) de leucina. También se ha propuesto que el α -CIV podría ser transportado a citosol (por un transportador no descrito) y convertido a α -IPM por acción de Leu4 en el citosol (Marobbio et al., 2008).

Entonces, si el α -IPM está disponible en el citoplasma, ¿por qué la mutante *oac1 Δ* es bradítrofa de leucina?, posiblemente i) el transporte de α -CIV no es eficiente, la cantidad de α -CIV que llega a citosol es baja y en consecuencia, la cantidad de leucina producida es menor a la que se requiere en condiciones normales, o ii) la capacidad biosintética de Bat2 para producir leucina es reducida. La segunda alternativa queda descartada porque la mutante *bat1 Δ* no es auxótrofa de leucina. Por lo tanto podemos concluir que la cantidad de α -CIV que se exporta de la mitocondria es baja.

Por otro lado, si el α -CIV puede salir de la mitocondria, entonces el sustrato estaría disponible en el citosol y Bat2 podría catalizar la transaminación de α -CIV a valina. El que la mutante *bat1 Δ* se comporte como un bradítrofo de valina, sugiere que i) la capacidad biosintética de Bat2 para valina es limitada, ii) que la poza de valina producida por Bat2 no entra a la mitocondria o iii) la cantidad de α -CIV que se exporta de la mitocondria es baja y

en consecuencia la cantidad de valina producida es menor a los requerimientos de la célula. El análisis de la capacidad de Bat1 y Bat2 para usar cada cetoácido de cadena ramificada como sustrato es un punto clave para entender la dinámica del metabolismo de VIL.

En síntesis, aunque es probable que tanto el α -CIV, como el α -IPM sean transportados al exterior de la mitocondria y que la síntesis de valina y leucina puedan ocurrir en el citoplasma, Bat2 no es redundante a Bat1, posiblemente las propiedades cinéticas de estas enzimas sean diferentes. Podemos inferir que la capacidad biosintética de Bat2 es menor a la mostrada por Bat1, pero además, es posible que la compartimentalización de la vía juegue un papel importante en la subfuncionalización de estas isoenzimas. En este sentido, la acumulación de α -CIV mitocondrial favorecería el carácter biosintético de Bat1.

5.2. La isoenzima Bat2 es mayoritariamente catabólica

Cuando las células crecen en presencia de aminoácidos como única fuente de nitrógeno, la asimilación de amonio sólo se lleva a cabo a través del catabolismo de dichos aminoácidos. El primer paso en el catabolismo de VIL es catalizado por Bat1 y Bat2. Para analizar la contribución de cada isoenzima en el catabolismo de los AACR, se determinó la velocidad específica de crecimiento en presencia de VIL como única fuente de nitrógeno.

En glucosa VIL, la cepa silvestre (WT) mostró menor crecimiento que en glucosa amonio (0.20 vs 0.14, Fig. 5 vs Fig. 6), debido a la calidad de la fuente de nitrógeno (amonio vs VIL). A diferencia de lo observado en amonio, en VIL como única fuente de nitrógeno, la mutante *bat1* Δ presentó un fenotipo silvestre, mientras que en la mutante *bat2* Δ el crecimiento se redujo un 30% con respecto a la cepa silvestre. La doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ no mostró un crecimiento significativo bajo estas condiciones (Fig. 6, Glucosa VIL).

Estos datos sugieren que Bat2 tiene un papel mayoritariamente catabólico y que en la mutante *bat2* Δ , Bat1 cumple con esta función parcialmente. Los mismos fenotipos se observaron cuando la única fuente de nitrógeno fue valina o isoleucina (Fig. 6, V, I). Por otro lado, en leucina (L) como única fuente de nitrógeno la mutante *bat2* Δ mostró un fenotipo silvestre, mientras que el crecimiento de la mutante *bat1* Δ decreció un 20% en comparación con la cepa silvestre.

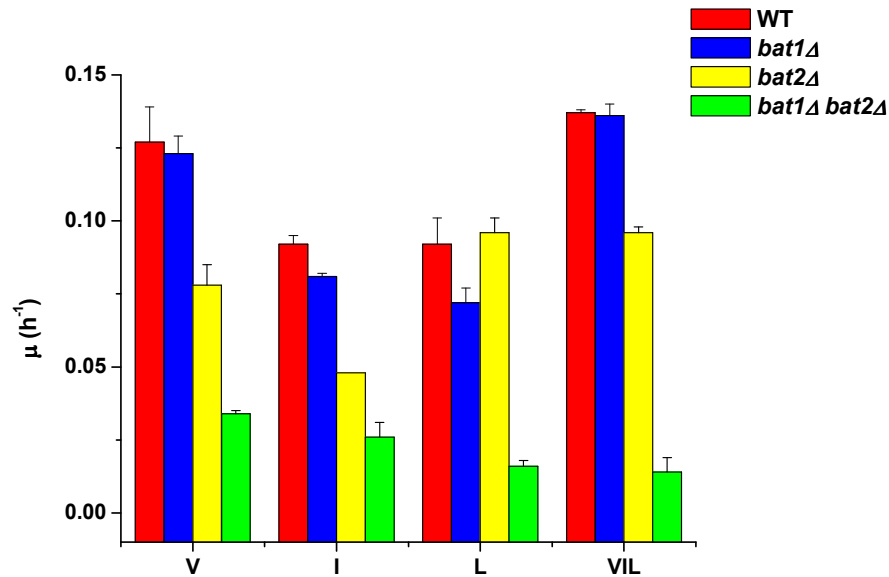


Figura 6. Bat2 tiene un papel mayoritariamente catabólico en el metabolismo de Valina e Isoleucina pero no de Leucina. La cepa CLA1-2, las mutantes isogénicas *bat1Δ*, *bat2Δ* y la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* se cultivaron en glucosa como fuente de carbono y valina (V), isoleucina (I), leucina (L) o los tres aminoácidos (VIL) como fuente de nitrógeno y se incubaron en el lector de placas Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, usando 300 μl de cultivo por cada muestra. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ). Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones.

La capacidad catabólica de Bat2 podría estimularse por la acumulación de aminoácidos en el citosol

En el inciso de resultados 5.1, se propone que la acumulación de α-CIV en la mitocondria estimula el carácter biosintético de Bat1. Para que la reacción catalizada por Bat1 proceda principalmente hacia la biosíntesis, la valina producida en mitocondria tendría que ser transportada constantemente al citoplasma.

Bap3 es un transportador de aminoácidos de cadena ramificada. Sickmann y colaboradores determinaron el proteoma mitocondrial de *S. cerevisiae*, Bap3 es una de las 750 proteínas identificadas (Sickmann et al., 2003). Es probable que Bap3 esté involucrado en el transporte de aminoácidos de cadena ramificada de la mitocondria al citoplasma; la acumulación de valina e isoleucina en citosol favorecería el carácter catabólico de Bat2.

5.3. *Saccharomyces cerevisiae* requiere catabolizar valina, isoleucina y leucina aún en condiciones que promueven la biosíntesis de estos aminoácidos

La región codificante de los genes *BAT1* o *BAT2* bajo la acción de su respectivo promotor (1080 pb del UTR 5' para *BAT1* y 490 pb del UTR 5' para *BAT2*) se clonó en plásmidos monocopia y multicopia, generando los plásmidos *BAT1* CEN, *BAT2* CEN, *BAT1* 2 μ y *BAT2* 2 μ , respectivamente. Los plásmidos se transformaron en la cepa silvestre CLA1-2 y las mutantes *bat1* Δ y *bat2* Δ . La doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ únicamente se transformó con la versión monocopia (CEN) del plásmido.

En glucosa amonio (Fig. 7, A) la mutante *bat1* Δ sólo recuperó el crecimiento silvestre cuando fue transformada con un plásmido que contenía al gen *BAT1* (*BAT1* CEN o *BAT1* 2 μ). *BAT2* no fue capaz de reemplazar a *BAT1* ni siquiera cuando fue clonado en un plásmido multicopia (*BAT2* 2 μ).

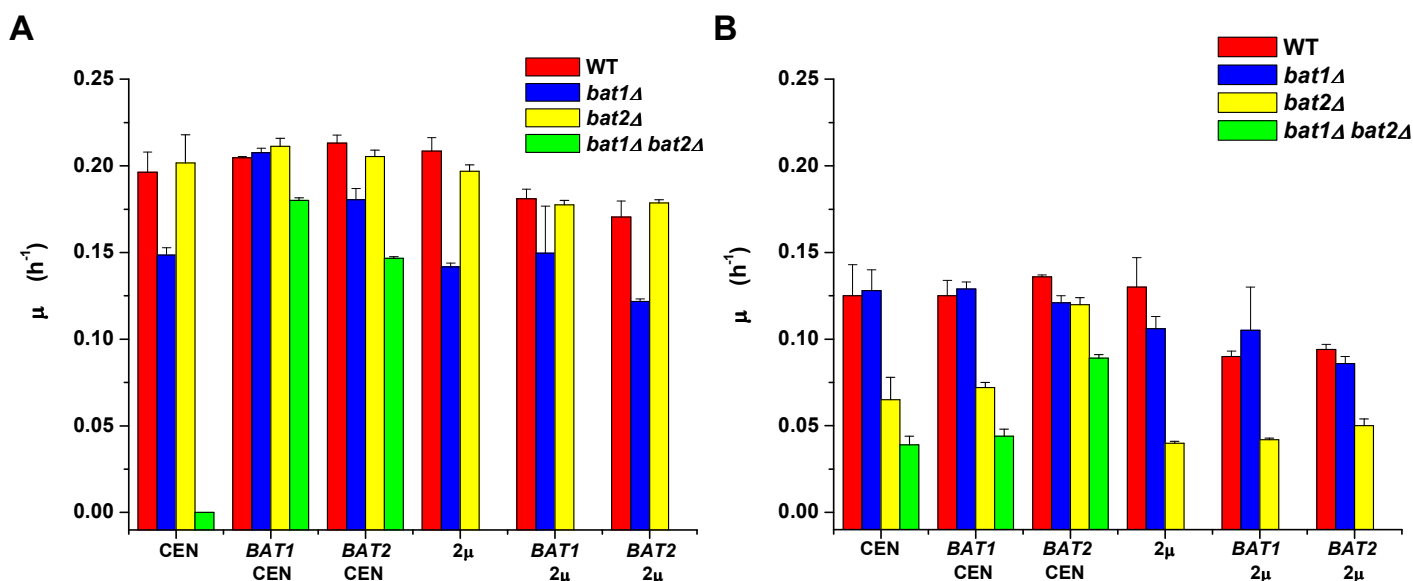


Figura 7. *Saccharomyces cerevisiae* requiere catabolizar a los aminoácidos de cadena ramificada aún en condiciones biosintéticas. Las cepas CLA1-2 y las mutantes isogénicas *bat1* Δ y *bat2* Δ se transformaron con plásmidos monocopia (*BAT1* CEN y *BAT2* CEN) o multicopia (*BAT1* 2 μ y *BAT2* 2 μ) en los que se clonó el gen *BAT1* o *BAT2* con su propio promotor. La doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ sólo se transformó con la versión monocopia (*BAT1* CEN, *BAT2* CEN). (A) Las células se cultivaron en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, o (B) glucosa como fuente de carbono y valina, isoleucina y leucina (VIL) como única fuente de nitrógeno. El ensayo se realizó en el lector de placas Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones.

Por otro lado, cuando la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* se transformó con el plásmido *BAT1* CEN, ésta sólo alcanzó el 90% del crecimiento de la cepa silvestre, mientras que en presencia del plásmido *BAT2* CEN sólo creció en un 75% con respecto a la cepa silvestre (Fig. 7, A). Estos datos sugieren que incluso en éstas condiciones (glucosa amonio) en las que aparentemente sólo se requiere sintetizar AACR, el catabolismo de valina, isoleucina y leucina juega un papel importante, de no ser así, la doble mutante se comportaría como una cepa silvestre al ser complementada con *BAT1* en un plásmido tal y como ocurre en la mutante *bat1Δ*.

En glucosa VIL (Fig. 7, B), el crecimiento de la mutante *bat2Δ* fue comparable al de la cepa silvestre únicamente cuando se transformó con el plásmido *BAT2* CEN. Cuando este mismo plásmido se transformó en la doble mutante *bat1Δ bat2Δ*, ésta no recuperó el crecimiento de la cepa silvestre. Podemos concluir que en presencia de VIL como única fuente de nitrógeno es importante catabolizar a estos aminoácidos, pero además, se requiere que Bat1 ejecute una función adicional.

En conjunto, los resultados anteriores apuntan a que las isoenzimas amino transferasas de aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae* están en un proceso de especialización de funciones o subfuncionalización, ya que una de ellas (Bat1) tiene un papel primordial sobre la síntesis de valina, mientras que las otra enzima (Bat2) participa principalmente en el catabolismo de valina e isoleucina.

5.4. La aminotransferasa de tipo ancestral *K/Bat1* es una enzima bifuncional que participa en la síntesis y catabolismo de VIL

Los linajes que dieron origen a *S. cerevisiae* y *K. lactis* tuvieron un ancestro en común. Posterior a la separación de linajes, el ancestro de *Saccharomyces* tuvo un evento de duplicación del genoma completo (Wolfe y Shields, 1997). *K. lactis* no experimentó duplicaciones masivas a lo largo de su evolución, por lo que el análisis comparativo de genes ortólogos en estas levaduras permite hacer inferencias respecto a la evolución de los genes duplicados.

El gen *KIBAT1* de *K. lactis* es el único ortólogo a los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*. Con el fin de analizar el papel fisiológico de esta amino transferasa “tipo ancestral” se construyó la mutante *Kibat1Δ* en *K. lactis* y se determinó la velocidad

específica de crecimiento en condiciones de crecimiento que promueven la biosíntesis (glucosa amonio) o el catabolismo de VIL (glucosa VIL).

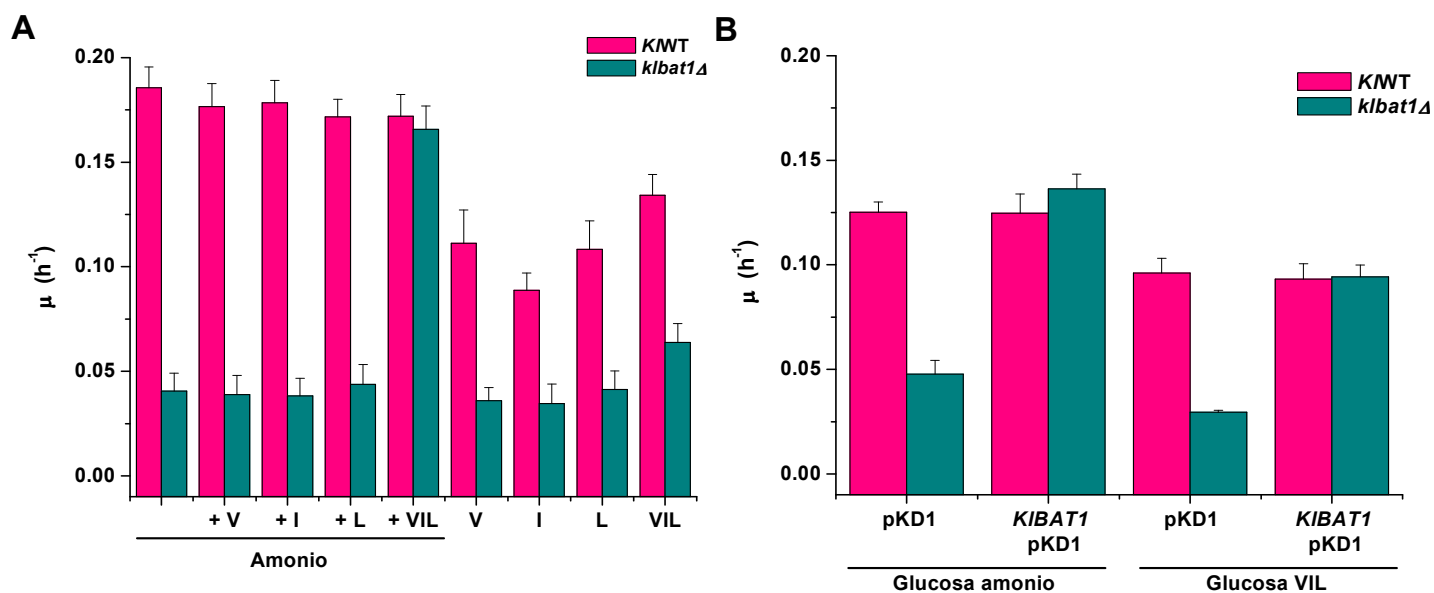


Figura 8. La amino transferasa *KIBat1* es un enzima biosintética y catabólica de aminoácidos de cadena ramificada. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa silvestre (*KWT*) de *Kluyveromyces lactis* y la mutante isogénica *Kibat1* Δ . A) Las células se cultivaron en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno en presencia de valina (+V), isoleucina (+I), leucina (+L) o los tres aminoácidos (+VIL) ó usando estos aminoácidos como única fuente de nitrógeno. B) La cepa silvestre y la mutante *Kibat1* Δ se transformaron con el plásmido YEpkD352 (pKD1) vacío o con el gen *KIBAT1* con su propio promotor (*KIBAT1* pKD1). Las células se crecieron en glucosa como fuente de carbono y amonio o VIL como fuente de nitrógeno. El ensayo se llevó a cabo en el lector de placas Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. Los resultados se muestran como el promedio de quince (A) o siete (B) repeticiones.

La mutante *Kibat1* Δ es un auxótrofo total de valina, isoleucina y leucina que requiere la adición simultánea de los tres aminoácidos (VIL) para recuperar el fenotipo silvestre (Fig. 8, A), o la presencia de un plásmido monocopia (pKD1) que contiene clonado al gen *KIBAT1* más su región promotora (Fig. 8, B). El catabolismo de VIL también resultó afectado en la mutante *Kibat1* Δ , ya que no mostró crecimiento significativo en presencia de valina (V), isoleucina (I) y/o leucina (L) como única fuente de nitrógeno (Fig. 8, A). Como se observa en la gráfica, en glucosa VIL tanto la cepa silvestre como la mutante *Kibat1* Δ muestran un ligero incremento en la velocidad específica de crecimiento con respecto a glucosa valina, glucosa leucina o glucosa isoleucina; posiblemente debido a

una mayor disponibilidad de la fuente de nitrógeno generada por la adición simultánea de los tres aminoácidos. La capacidad para catabolizar VIL se restauró en presencia del plásmido monocopia *KIBAT1* pKD1 (Fig. 8, B).

Los resultados indican que en *K. lactis*, la proteína *KIBat1* es una enzima bifuncional que participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de VIL. Posiblemente, la enzima ancestral (antes de separación de los linajes de *S. cerevisiae* y *K. lactis*) era también una enzima bifuncional cuyo carácter biosintético o catabólico se regía únicamente por la disponibilidad de sustratos. Tal vez, la duplicación y subfuncionalización de *Bat1* y *Bat2*, facilitó la adquisición de un nivel de regulación adicional. Dicha regulación podría implicar cambios en los perfiles de expresión de los genes, en las características cinéticas de las proteínas o ambas.

5.5. *KIBat1* sólo reemplaza parcialmente la ausencia simultánea de *Bat1* y *Bat2* en *Saccharomyces cerevisiae*

Para analizar la capacidad de la enzima *KIBat1* de *K. lactis* para sustituir a *Bat1* o *Bat2* de *S. cerevisiae*, la región codificante del gen *KIBAT1* se clonó en un plásmido monocopia bajo la acción de su propio promotor (*KIBAT1* CEN) o de los promotores de los genes *BAT1* (P_{BAT1} -*KIBAT1* CEN) o *BAT2* (P_{BAT2} -*KIBAT1* CEN). Los plásmidos se transformaron en la cepa CLA1-2 de *S. cerevisiae* y en las mutantes *bat1* Δ , *bat2* Δ y *bat1* Δ *bat2* Δ .

En glucosa amonio, la mutante *bat1* Δ mostró un fenotipo silvestre al ser complementada con *KIBAT1* sin importar el contexto de la región promotora (Fig. 9, A). Sin embargo, la doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ sólo recuperó el 70% del crecimiento con respecto a la cepa silvestre, lo cual indica que *KIBat1* sustituye por completo a *Bat1* pero sólo reemplaza parcialmente la ausencia simultánea de *BAT1* y *BAT2* (Fig. 9, A).

En glucosa VIL, tanto la mutante sencilla *bat2* Δ , como la doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ mostraron un crecimiento entre un 30 y 50% menor a la cepa silvestre, aún en presencia del gen *KIBAT1* (Fig. 9, B). Cabe mencionar que cuando la doble mutante fue complementada con *KIBAT1* con su propio promotor o con el promotor *BAT2* la velocidad específica de crecimiento fue mayor que con el promotor del gen *BAT1*; posiblemente el promotor de *BAT2* permite una mayor expresión del gen bajo estas condiciones.

Aunque en *K. lactis*, la enzima *KIBat1* tiene un carácter bifuncional (Fig. 8), al ser expresada heterológicamente en *S. cerevisiae* cumple principalmente un papel biosintético.

Posiblemente, la capacidad de *K/Bat1* de catabolizar VIL sea mucho menor a la de *Bat2*, por lo que no cumple con el 100% del requerimiento en *S. cerevisiae*.

Existe también la posibilidad de que la localización subcelular de *K/Bat1* difiera de la localización de *Bat2* y por tanto la disponibilidad de los AACR para ser usados como sustratos sea limitada.

Se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína *K/Bat1* con los programas TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997) y Mitoprot (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros y Vincens, 1996) para determinar su posible localización subcelular. La probabilidad de que *K/Bat1* sea una proteína mitocondrial es del 91.4% según lo predicho por TargetP y del 97.2% con Mitoprot. Sin embargo, datos preliminares de nuestro laboratorio (López, 2011) sugieren que *K/Bat1* es una proteína de localización nuclear, aunque no se ha descartado la posibilidad de que también se localice en mitocondria.

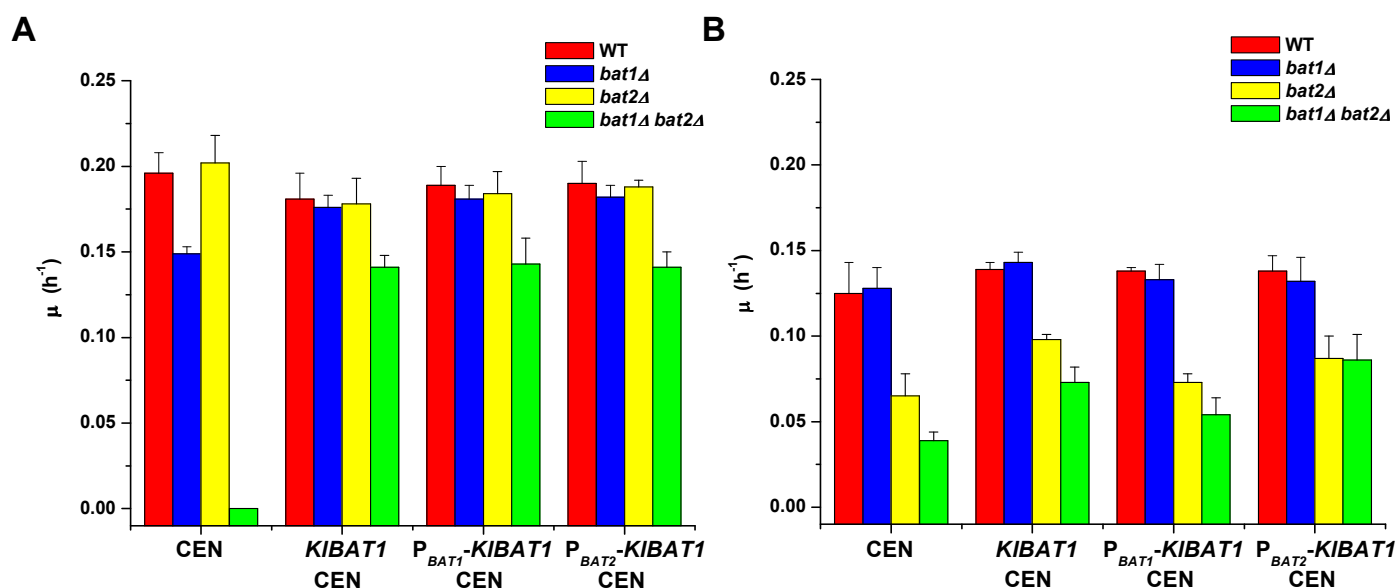


Figura 9. *K/Bat1* reemplaza a *Bat1* pero no a *Bat2*. El gen *KIBAT1* de *K. lactis* con su propio promotor (*KIBAT1*), o con los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* (P_{BAT1} -*KIBAT1* y P_{BAT2} -*KIBAT1*) se clonó en el plásmido monocopia pRS416 (CEN). Los plásmidos se transformaron en la cepa CLA1-2 de *S. cerevisiae* y en las mutantes isogénicas *bat1* Δ , *bat2* Δ y *bat1* Δ *bat2* Δ . Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) en (A) glucosa amonio y en (B) glucosa VIL. El ensayo se llevó a cabo en el lector de placas Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. Los resultados se muestran como el promedio de al menos 4 repeticiones.

5.6. La retención de *BAT1* y *BAT2* constituye una adaptación al metabolismo facultativo

Saccharomyces cerevisiae es un anaerobio facultativo. Para determinar si Bat1 o Bat2 tienen un papel diferencial durante el metabolismo respiratorio, se analizaron los fenotipos de la cepa silvestre (CLA1-2, WT) y las mutantes isogénicas *bat1* Δ y *bat2* Δ bajo condiciones de crecimiento respiratorio, es decir, usando etanol como única fuente de carbono.

En etanol amonio, la mutante *bat1* Δ exhibió un decremento en el crecimiento de alrededor del 13% en comparación con la cepa silvestre. Contrario a lo que ocurre durante el crecimiento fermentativo, la mutante *bat1* Δ requirió la adición simultánea de los tres aminoácidos para recuperar el fenotipo silvestre. Por otro lado, la doble mutante no mostró crecimiento significativo bajo ninguna condición analizada (Fig. 10).

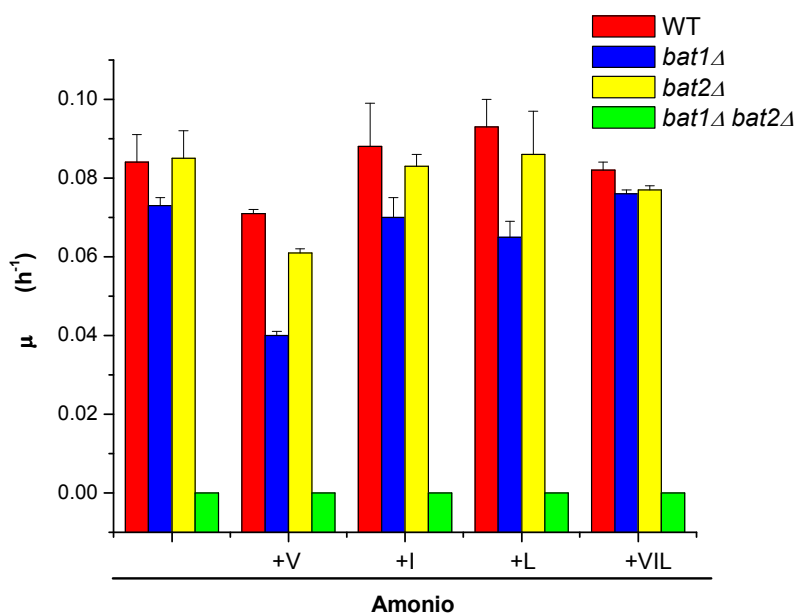


Figura 10. Bat1 conserva su papel como enzima biosintética aún en condiciones de crecimiento respiratorio. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) en cultivos de las cepas CLA1-2, *bat1* Δ , *bat2* Δ y *bat1* Δ *bat2* Δ en medios con etanol como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, en presencia de valina (+V), isoleucina (+I) y/o leucina (+L). El ensayo se realizó en un volumen de 50 ml de cultivo en matraces de 125 ml. Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones.

Como ya se mencionó anteriormente, el transportador de oxaloacetato Oac1 participa también en el transporte de α -IPM. La concentración de Oac1 en etanol es un 50% menor que en glucosa (Marobbio *et al.*, 2008). Al haber menos transportador, seguramente el transporte de α -IPM al citoplasma disminuye y en consecuencia hay una disminución en la cantidad de leucina sintetizada. Este fenómeno explica que en etanol amonio, la mutante *bat1* Δ requiera la adición simultánea de los tres aminoácidos para recuperar el fenotipo silvestre.

Dado que la doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ no crece ni siquiera en presencia de VIL, se puede inferir que durante el metabolismo respiratorio el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada es crucial y requiere la participación conjunta de las isoenzimas Bat1 y Bat2, alternativamente puede ser que bajo estas condiciones Bat1 y Bat2 cumplan una función adicional. A continuación se analizan dos posibles panoramas.

Bat1 y Bat2 garantizan el abastecimiento de sustratos (α -cetoácidos de cadena ramificada) a la vía de Ehrlich para generar NADH o NADPH

El primer paso en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada es la transaminación mediada por Bat1 y Bat2, esta reacción es reversible. Posteriormente, el α -cetoácido ramificado producido es descarboxilado para generar aldehídos *fusel*. El tercer y último paso es catalizado por una deshidrogenasa que reduce u oxida los aldehídos *fusel* para generar ácidos *fusel* o alcoholes *fusel*, respectivamente. La reducción de los aldehídos *fusel* permite regenerar el NAD^+ , mientras que a través de la oxidación se genera poder reductor NADH , H^+ (Hazelwood *et al.*, 2008).

Durante el crecimiento oxidativo, la vía de las pentosas abastece la demanda total de NADPH. Dado que no se ha descrito un sistema de transporte de NADPH a través de los compartimentos celulares, se ha propuesto que algunas enzimas mitocondriales también contribuyen en el abastecimiento de NADPH (Frick y Wittmann, 2005).

Dado que el último paso en la vía de Ehrlich es catalizado por una deshidrogenasa, es probable que la producción de alcoholes tipo *fusel* sea un mecanismo alternativo para la producción de NADH. En este sentido podemos hipotetizar que Bat1 y Bat2 contribuyeron a la adaptación al metabolismo facultativo porque, bajo condiciones de crecimiento

respiratorio, se encargan de proveer sustratos (α -cetoácidos de cadena ramificada) a la vía de Ehrlich para generar NADH y mantener el balance NAD^+/NADH .

Bat1 y Bat2 permiten que la vía de reciclaje de metionina continúe durante el metabolismo respiratorio

En *S. cerevisiae* Bat1 y Bat2 y las aminotransferasas de aminoácidos aromáticos, Aro8 y Aro9, participan en la vía de reciclaje de metionina, que permite regenerar la metionina a partir de 5'-metiltioadenosina (un subproducto de reacciones que usan SAM) (Pirkov *et al.*, 2008). Bat1/Bat2 y Aro8/Aro9 catalizan la transaminación del 4-metiltio-2-oxobutirato a L-metionina, usando como donadores del grupo amino a los aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada. Bat2 también puede utilizar lisina y glutamato como donadores del grupo amino (Pirkov *et al.*, 2008). Una mutante *aro8Δ aro9Δ* no tiene ningún fenotipo en cuanto a la vía de reciclaje de metionina, lo que indica que Bat1/Bat2 son redundantes a Aro8/Aro9 en esta función (Pirkov *et al.*, 2008).

Dado que todas las enzimas de esta vía son citosólicas y que la reacción de transaminación para regenerar metionina usa como sustratos a los aminoácidos de cadena ramificada, se esperaría que Bat2 fuera el principal actor en esta reacción.

Se ha reportado que la expresión de *ARO9* es inducida en presencia de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina), en ausencia de éstos su nivel de expresión es muy bajo (Iraqi *et al.*, 1998). En concordancia con este punto, se ha demostrado que la inducción de *ARO9* es limitada en una doble mutante *gap1Δ wap1Δ* (Gap1 es la permeasa general de aminoácidos y Wap1 es la permeasa de aminoácidos aromáticos) (Iraqi *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha observado que la expresión de *ARO8* se reprime durante la transición del crecimiento fermentativo al respiratorio y durante el shift diáuxico (*ARO8/YGL202W Expression Connection*; DeRisi *et al.*, 1997; Roberts y Hudson, 2006), por lo tanto, es posible que *ARO8* también esté reprimido en etanol.

Tomando en cuenta los datos anteriores podemos inferir que en etanol amonio la expresión de *ARO8* está reprimida (por efecto del etanol), el gen *ARO9* no está dereprimido (porque no hay inductores) y por lo tanto, la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* se comportará como una mutante cuádruple *bat1Δ bat2Δ aro8Δ aro9Δ* en la que la vía de regeneración de metionina posiblemente esté afectada. Bajo este panorama, Bat1 y Bat2

funcionaría como un respaldo de Aro8 y Aro9 en condiciones donde la expresión de los genes *ARO8* y *ARO9* está reprimida. ¿Cómo probar esta hipótesis?, si es cierto que en etanol amonio la vía de reciclaje de metionina está afectada, entonces la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* deberá crecer en etanol amonio con la simple adición de metionina. Este experimento está en curso.

El papel de las enzimas Bat1 o Bat2 en etanol como única fuente de carbono y VIL como única fuente de nitrógeno, no pudo ser analizado debido a que bajo estas condiciones no se registró crecimiento ni en la cepa silvestre, aún cuando se usaron diferentes concentraciones de aminoácidos (Fig. 11).

La incapacidad de la cepa silvestre de crecer en etanol VIL también puede estar relacionada a la incapacidad de la célula para catabolizar VIL bajo estas condiciones o a que la célula no puede obtener los esqueletos de carbono suficientes cuando hay una mala fuente de nitrógeno.

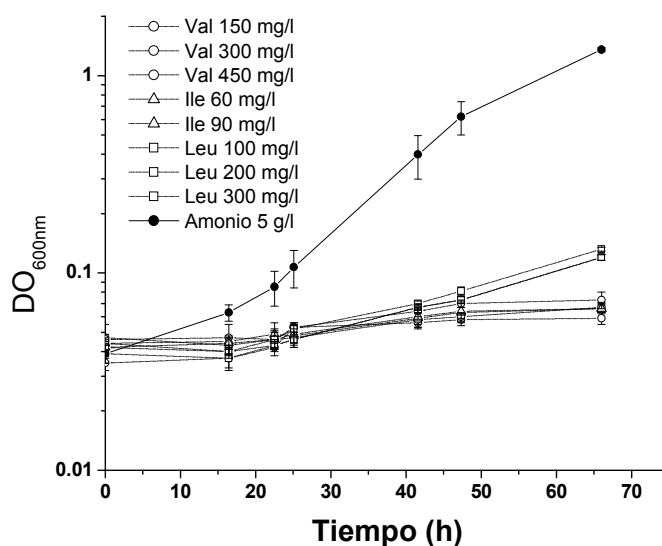


Figura 11. En condiciones de crecimiento respiratorio la cepa silvestre CLA-1 no es capaz de usar los aminoácidos de cadena ramificada como única fuente de nitrógeno. Se determinó la curva de crecimiento de la cepa silvestre CLA1-2 en medios con etanol como única fuente de carbono y valina (Val), isoleucina (Ile) o leucina (Leu) como única fuente de nitrógeno. Los aminoácidos se usaron en las concentraciones indicadas en la gráfica. El ensayo se realizó en un volumen de 50 ml de cultivo en matraces de 125 ml. Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones.

5.7. *BAT1* muestra un perfil de expresión biosintético, mientras que *BAT2* tiene un perfil de expresión catabólico

Los datos anteriores indican que la proteína Bat1 tiene un papel principalmente biosintético, mientras que Bat2 muestra un papel mayoritariamente catabólico en el metabolismo de valina, leucina e isoleucina. Como ya se mencionó anteriormente, la subfuncionalización de un par de genes duplicados puede llevar a diferentes patrones de expresión, divergencia funcional de los productos o ambos. Para determinar si la divergencia funcional mostrada por Bat1 y Bat2 está correlacionada a su perfil de expresión, se determinó el nivel de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2* bajo condiciones de crecimiento que promueven la biosíntesis o el catabolismo de los AACR.

Se construyeron fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2* al reportero *lacZ* de *Escherichia coli* ($P_{BAT1-lacZ}$ y $P_{BAT2-lacZ}$). Se consideró como promotor la región intergénica completa, 1046 pb para *BAT1* y 471 pb para *BAT2*. Los detalles de la construcción se describen en Metodología. Los plásmidos con las fusiones (YEp353 P_{BAT1} y YEp353 P_{BAT2}) se transformaron en la cepa silvestre CLA1-2 y se midió la actividad de β -galactosidasa en diferentes puntos a lo largo de la curva de crecimiento.

En glucosa amonio, el nivel más alto de expresión de *BAT1* se observó en la fase de crecimiento exponencial y su expresión disminuyó a lo largo de la curva de crecimiento. Por el contrario, la expresión de *BAT2* fue mayor en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial de crecimiento (Fig. 12, Glucosa amonio).

Por otro lado en etanol amonio, la expresión de *BAT2* se mantuvo constante a lo largo de la curva de crecimiento y representa el doble de la expresión que *BAT1* alcanzó en las mismas condiciones, es importante resaltar que a diferencia de glucosa amonio, la expresión de *BAT1* en etanol no disminuye en la fase diáuxica ni estacionaria de crecimiento (Fig. 12, Etanol amonio).

En glucosa VIL, *BAT2* se expresó de 2 a 10 veces más que *BAT1*, alcanzando su mayor nivel de expresión en la fase de crecimiento diáuxica (Fig. 12, glucosa VIL).

Como ya se mencionó anteriormente, en glucosa amonio se promueve la biosíntesis de VIL, dado que las células están proliferando y requieren de aminoácidos para la síntesis de proteínas, sobre todo en la fase de crecimiento exponencial. Y es justo en estas condiciones cuando *BAT1* presentó el mayor nivel de expresión, lo que correlaciona perfectamente con su carácter principal biosintético.

En glucosa-VIL se promueve el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, ya que la transaminación de VIL es la única forma de obtener amonio bajo esas condiciones de crecimiento. Como se observa en la Figura 12, *BAT2* muestra su mayor nivel de expresión en estas condiciones.

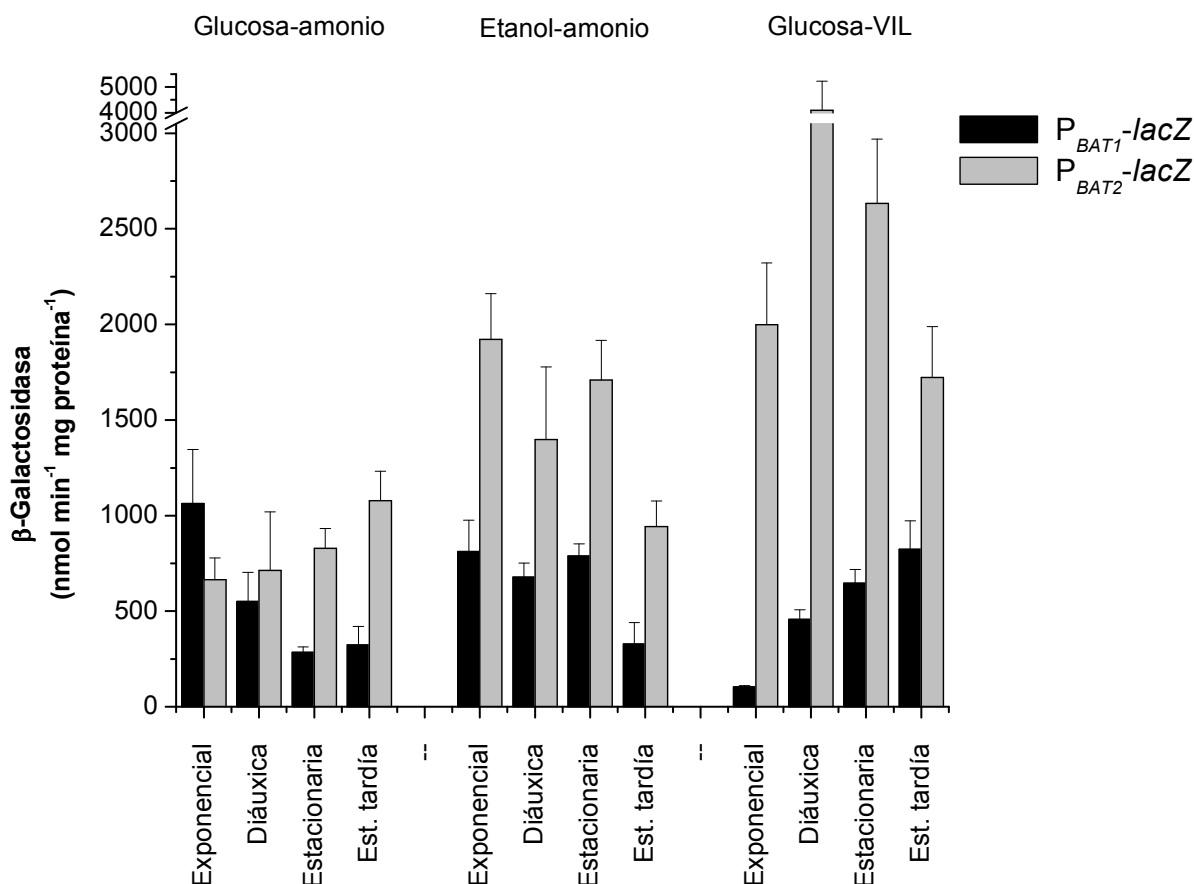


Figura 12. Efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre la expresión de *BAT1* y *BAT2*.

Se obtuvieron extractos de la cepa silvestre CLA1-2 crecida en glucosa o etanol como fuente de carbono y amonio o VIL como fuente de nitrógeno. Las células se colectaron en la fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} 0.3 a 0.6), diáuxica (DO_{600nm} 0.9 a 1.5), estacionaria (DO_{600nm} 2.5 a 3.4 en amonio y DO_{600nm} 1.5 a 2 en VIL) y estacionaria tardía (3 días en glucosa y 5 días en etanol). Se determinó la actividad de β -galactosidasa en las fusiones transcripcionales P_{BAT1} -lacZ y P_{BAT2} -lacZ. La actividad de β -galactosidasa se expresa en nmoles de o-nitrofenol producido por minuto por miligramo de proteína ($nmol\ min^{-1}\ mg\ proteína^{-1}$) y está reportada como el promedio de tres experimentos independientes, cada uno con tres repeticiones.

En el apartado anterior se describió la importancia del catabolismo de VIL en etanol amonio. La expresión de *BAT2* en estas condiciones es de dos a tres veces mayor que en glucosa amonio incluso desde la fase inicial de crecimiento; es decir, aún en la condición

donde la proliferación celular es máxima (fase de crecimiento exponencial) y en la que se esperaría que sólo el abastecimiento de bloques para construcción de macromoléculas fuesen necesarios, el catabolismo de VIL es crucial. Por otro lado, la expresión de *BAT1* no disminuye en la fase de crecimiento estacionaria, aunque *Bat1* es una enzima principalmente biosintética, tal vez durante el metabolismo respiratorio se acentúa el carácter catabólico de *Bat1*, de tal forma que pueda actuar conjuntamente con *Bat2* para catabolizar los aminoácidos de cadena ramificada.

En resumen, en condiciones de crecimiento fermentativo (glucosa) *BAT1* se expresa principalmente cuando se requiere biosíntesis de VIL, mientras que *BAT2* lo hace cuando se requiere catabolizar a estos aminoácidos, es decir, *BAT1* muestra un perfil de expresión de genes biosintéticos mientras que *BAT2* tiene un perfil de expresión de genes catabólicos. Bajo condiciones de crecimiento respiratorio la expresión de *BAT2* se induce y la de *BAT1* se mantiene constante a lo largo de la curva de crecimiento.

El nivel de expresión de *BAT1* y *BAT2* también se analizó mediante un ensayo tipo Northern. Para ello se construyeron sondas que contenían toda la región codificante de cada gen (los detalles se indican en Metodología). El RNA se extrajo a partir de cultivos en fase exponencial de células crecidas en glucosa como única fuente de carbono y amonio o VIL como fuente de nitrógeno.

Como se observa en la Figura 13, pese a que *BAT1* y *BAT2* son 72 % idénticos y que se utilizaron como sondas fragmentos que contienen toda la región codificante de cada gen, la hibridación fue específica, no se detectó hibridación de la sonda *BAT1* en la mutante *bat1Δ*, así como tampoco se detectó hibridación de la sonda *BAT2* en la mutante *bat2Δ*.

La mayor expresión de *BAT1* se observó en amonio con respecto a VIL. En presencia de los tres aminoácidos (VIL) como fuente de nitrógeno, la expresión de *BAT1* fue reprimida 4 veces en comparación con amonio (Figura 13). Lo mismo ocurrió en amonio VIL.

Por el contrario, en presencia de VIL como única fuente de nitrógeno la expresión de *BAT2* se indujo 12 veces. Cabe mencionar que en ausencia de *BAT1* (*bat1Δ*) la expresión de *BAT2* aumentó 5 veces respecto a la cepa silvestre (WT) al crecer en glucosa amonio.

Posiblemente, el incremento en la expresión de *BAT2* permita compensar parcialmente la pérdida de *BAT1*. En presencia de VIL, *BAT2* no aumentó su expresión en

un fondo *bat1Δ*, posiblemente se debe a que en VIL, *BAT2* alcanza el más alto nivel de expresión y el fondo genético deja de ser relevante (Figura 13).

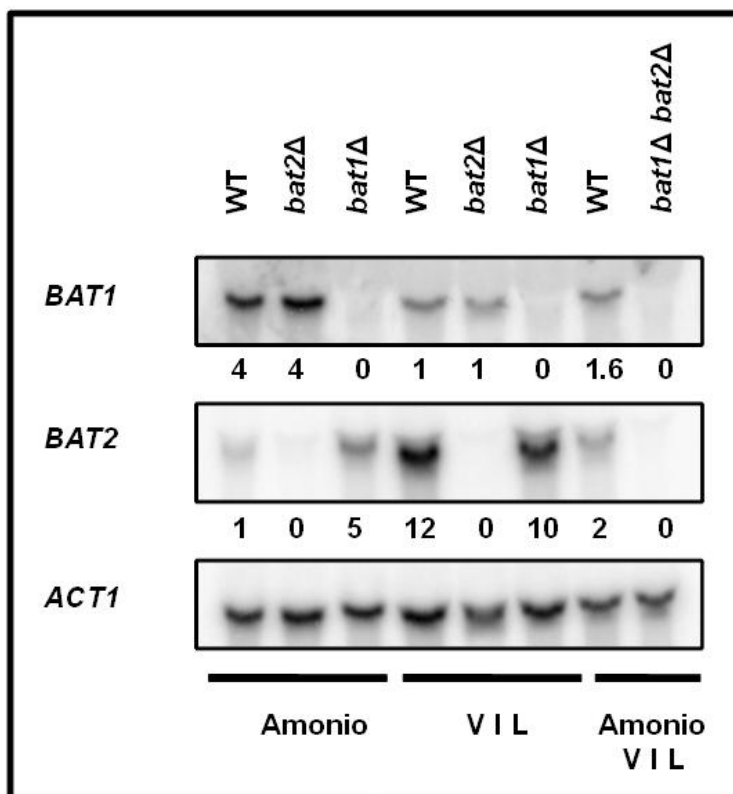


Figura 13. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *BAT1* y *BAT2*. Se obtuvieron extractos de la cepa silvestre CLA1-2 (WT) crecida en glucosa como fuente de carbono y amonio, VIL o ambas como fuente de nitrógeno. Las células se colectaron en la fase de crecimiento exponencial (DO_{600nm} 0.3 a 0.6). Como control de carga, la membrana se hibridó con una sonda homóloga al gen *ACT1* (actina). Los números indican el nivel de expresión respecto a la cepa silvestre crecida en glucosa VIL (carril 4) para *BAT1* o crecida en glucosa amonio (carril 1) para *BAT2*.

En conclusión, la expresión de *BAT1* es reprimida en presencia de VIL, posiblemente sea un caso de represión o inhibición por producto final como ocurre con muchos genes biosintéticos. Por el contrario, la expresión de *BAT2* se induce en presencia de los tres aminoácidos (condiciones catabólicas), probablemente por un efecto de inducción por sustrato.

5.8. La contribución de Bat1 y Bat2 a la reacción de transaminación correlaciona con su perfil de expresión

Con el fin de determinar las propiedades cinéticas de las enzimas Bat1 y Bat2, se llevó a cabo un intento por purificarlas. Para ello se usaron extractos celulares de cepas en las cuales los genes *BAT1* o *BAT2* están fusionados en el carboxilo terminal al módulo TAP. Éste módulo se constituye por: i) un péptido de unión a calmodulina, ii) un sitio de corte para la proteasa TEV del virus Etch de tabaco y iii) la proteína A (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

A grandes rasgos, el proceso de purificación se divide en tres pasos: i) El extracto celular se pasa por una columna que contiene IgG y que une a la proteína marcada a través de la proteína A presente en el módulo TAP, ii) la proteína de interés se eluye de la columna mediante el corte con la proteasa TEV, y iii) el eluato obtenido se pasa por una segunda columna que contiene calmodulina, la proteínas de interés se unirá a la columna a través del péptido de unión a calmodulina. La proteína se eluye en presencia de un quelante de calcio. Con éste último paso se elimina la proteasa y otras proteínas que pudieron haberse unido inespecíficamente a la primer columna (Puig *et al.*, 2001; Rigaut *et al.*, 1999).

Empleando esta metodología se logró purificar a las proteínas Bat1-TAP y Bat2-TAP; sin embargo, las proteínas purificadas no mostraron actividad de transaminasa. Se realizaron varias modificaciones al protocolo de purificación pero el resultado fue el mismo, motivo por el cual decidimos determinar la actividad de transaminasa en extractos proteicos de las cepas CLA1-2 (WT), *bat1Δ* y *bat2Δ* de *S. cerevisiae*. La obtención de extractos y el ensayo se describen en la Metodología.

En glucosa amonio, la actividad de transaminasa mostrada por la cepa silvestre y la mutante *bat2Δ* fue la misma y sólo se abatió en la mutante *bat1Δ* al usar cualquiera de los tres cetoácidos de cadena ramificada como sustrato (Fig. 14, Glucosa amonio). Cabe mencionar que la actividad de transaminasa de Bat1 no fue la misma para cada CACR, lo que sugiere que la enzima posee diferentes propiedades cinéticas. Es interesante que aunque la transaminación de α -CIC fue de 3 a 4 veces mayor que para α -CIV o α -CMV, una mutante *bat1Δ* no es auxótrofa de leucina.

En glucosa VIL amonio, la actividad de transaminasa en una mutante *bat1Δ* es de menos del 10% de la exhibida por la cepa silvestre, lo que apunta nuevamente, a un papel

preferencial de Bat1 en la biosíntesis. Sin embargo, en estas condiciones Bat2 también contribuye a la actividad de transaminasa, ya que la reacción de transaminación es un 50% menor en la mutante *bat2Δ* respecto a la cepa silvestre (Fig. 14, Glucosa VIL amonio).

Como se observa en la Figura 13 (amonio vs amonio VIL), la expresión de *BAT1* se reprime en presencia de VIL aún en presencia de amonio (4 a 1.6), mientras que la expresión de *BAT2* se induce ligeramente (1 a 2).

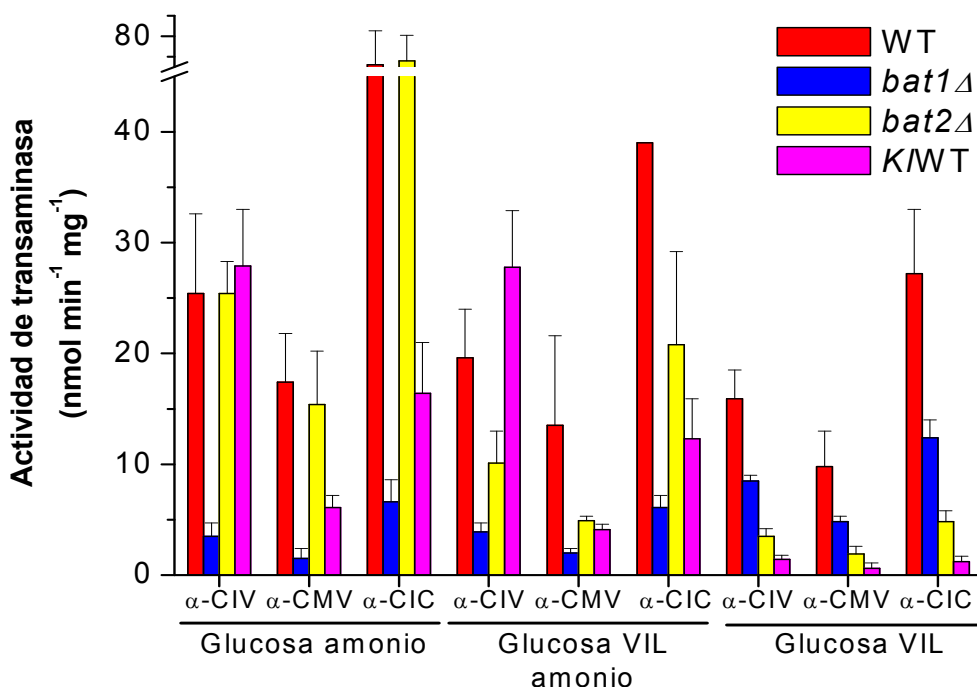


Figura 14. La actividad de transaminasa de Bat1 disminuye cuando la expresión del gen *BAT1* está reprimida. Las cepas silvestre (WT), *bat1Δ* y *bat2Δ* de *S. cerevisiae* y la cepa silvestre (KWT) de *K. lactis* se cultivaron en glucosa como fuente de carbono y amonio, amonio VIL o VIL como fuente de nitrógeno. Los extractos proteicos se obtuvieron como se indica en Metodología. Se determinó la actividad de amino transferasa usando α-cetoisovalerato (α-CIV), α-cetometilvalerato (α-CMV) o α-cetoisocaproato (α-CIC) como sustratos. En la gráfica se muestra el promedio de al menos 3 mediciones.

La represión de *BAT1* en glucosa VIL amonio, explica que la actividad de transaminasa incluso en la cepa silvestre sea ligeramente menor que en glucosa amonio. Por otro lado, puede ser que bajo estas condiciones Bat2 sí contribuya a la actividad de

transaminasa porque aunque su capacidad biosintética es ineficiente, hay una compensación debido un posible incremento en la cantidad de enzima.

En glucosa VII, se observa el menor nivel de expresión de *BAT1* y el mayor nivel de expresión de *BAT2* (Fig. 13), en consecuencia, la actividad de transaminasa en una mutante *bat1Δ* sólo disminuye en un 50% en comparación a la cepa silvestre, mientras que en una mutante *bat2Δ* se abate (Fig. 14).

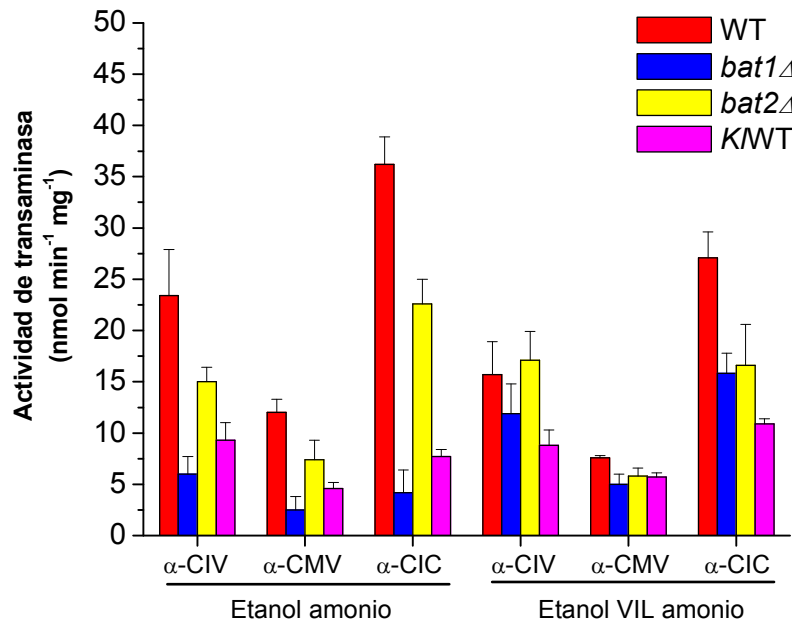


Figura 15. Actividad de transaminasa durante el metabolismo respiratorio. Las cepas silvestre (WT), *bat1Δ* y *bat2Δ* de *S. cerevisiae* y la cepa silvestre (KWT) de *K. lactis* se cultivaron en etanol como fuente de carbono y amonio o VII amonio como fuente de nitrógeno. Los extractos proteínicos se obtuvieron como se indica en Metodología. Se determinó la actividad de amino transferasa usando α-cetoisovalerato (α-CIV), α-cetometilvalerato (α-CMV) o α-cetoisocaproato (α-CIC) como sustratos. En la gráfica se muestra el promedio de al menos 3 mediciones.

Por otro lado, la actividad de transaminasa mediada por *K/Bat1* se determinó en extractos proteicos de la cepa silvestre de *K. lactis* (KWT). En glucosa amonio, la actividad enzimática de *K/Bat1* al usar como sustrato α-cetoisovalerato (α-CIV) fue de 28 nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹; 8 nmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹ para el α-cetometilvalerato (α-

CMV) y $16 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ para el α -cetoisocaproato (α -CIC), lo que sugiere que la enzima *K/Bat1* tiene diferentes propiedades cinéticas para cada sustrato. La actividad enzimática se redujo en un 90% sólo en glucosa VIL (Fig. 14) en concordancia a una disminución de la expresión de *KIBAT1* bajo estas condiciones (Colón *et al.*, 2011).

En extractos celulares provenientes de cultivos en etanol como única fuente de carbono, también se aprecia un uso diferente de sustratos, al igual que en glucosa, la mayor actividad se detecta con α -CIC (Fig.15). En etanol amonio la actividad enzimática en una mediada por Bat1 (mutante *bat2* Δ) disminuyó con respecto a la actividad en glucosa. Este decremento en la actividad no está relacionada a cambios en el perfil de expresión de *BAT1*, ya que el nivel de expresión del gen es similar tanto en glucosa amonio como en etanol amonio (Fig. 12). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en glucosa, Bat2 contribuye alrededor de un 30% en la actividad enzimática, como se puede apreciar en una mutante *bat2* Δ (Fig. 15). Lo que sugiere que bajo estas condiciones la participación de Bat2 es favorecida, posiblemente para catabolizar VIL.

En etanol VIL amonio, la actividad enzimática de Bat2 (mutante *bat1* Δ) se duplica con respecto a etanol amonio (Fig. 15). Sin embargo, la contribución de Bat1 y Bat2 es equivalente. En la figura 10 se muestra que la doble mutante *bat1* Δ *bat2* Δ no crece aún presencia de VIL y que el crecimiento de las mutantes sencillas *bat1* Δ y *bat2* Δ es el mismo. En conjunto, estos datos sugieren que el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada es indispensable en estas condiciones y requiere la participación conjunta de Bat1 y Bat2.

La actividad enzimática de *K/Bat1* disminuyó alrededor de 3 veces en etanol en comparación con glucosa (Fig. 15, Etanol amonio). Dado que *K/Bat1* es la única transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada en *K. lactis*, es posible que en etanol, el catabolismo de los aminoácidos esté favorecido, por ello la actividad enzimática al usar a los cetoácidos de cadena ramificada disminuye. También existe la posibilidad de que en etanol la expresión de *KIBAT1* sea menor que en glucosa lo que deriva en una menor cantidad de enzima y por ende una menor actividad de transaminasa. El mismo fenómeno se observa en presencia de VIL (Fig. 15, Etanol VIL amonio).

5.9. Descifrando la dinámica del metabolismo de VIL

Con base en los resultados obtenidos y tomando en cuenta los datos de la literatura se plantean los siguientes modelos para explicar la dinámica del metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en cada condición (Fig. 16).

- A) En glucosa amonio se requiere principalmente síntesis de aminoácidos. Bajo estas condiciones *BAT1* tiene mayor expresión que su parólogo por lo que posiblemente haya mayor cantidad de proteína Bat1. La valina se sintetiza exclusivamente por Bat1, se acumula en mitocondria y posteriormente es exportada a citosol mediante el transportador de aminoácidos de cadena ramificada Bap3. El último paso en la síntesis de isoleucina es catalizado tanto por Bat1 en la mitocondria, como por Bat2 en el citosol, ya que aparentemente el α -CMV es capaz de salir de la mitocondria al citosol a través de un transportador. Al parecer, Bat1 y Bat2 contribuyen equitativamente a la síntesis de isoleucina. La catálisis mediada por Bat2 sólo estaría limitada por el transporte del cetoácido de isoleucina (α -CMV) y por la concentración de la isoenzima Bat2. Aunque no se ha reportado un transportador para α -CMV, es posible que exista dado que una mutante *bat1* Δ no es auxótrofa de isoleucina. Bat2 también contribuiría a la síntesis de leucina, ya que los últimos pasos de la vía toman lugar en el citoplasma; sin embargo, dado que la mutante *bat1* Δ no es auxótrofa de leucina, puede ser que el α -CIC sea transportado a mitocondria en donde Bat1 catalizaría la conversión a leucina.
- B) Cuando las células crecen en glucosa VIL, la acumulación de estos aminoácidos en el citosol estimula el carácter catabólico de Bat2. El catabolismo de estos aminoácidos se ve incrementado porque la expresión de *BAT2* se induce bajo estas condiciones y posiblemente la cantidad de proteína también aumente. Bat1 reemplaza parcialmente a Bat2 porque los aminoácidos son internalizados hacia la mitocondria por Bap3, en donde su acumulación estimula la capacidad catabólica de Bat1.
- C) Finalmente, en etanol amonio, la síntesis de los tres aminoácidos es catalizada principalmente por Bat1. A diferencia de glucosa amonio, la contribución de Bat2 en la síntesis de leucina es menor porque la cantidad del transportador de α -IPM (Oac1) es un 50% menor que en glucosa, lo que seguramente ocasiona el α -IPM

citoplasmática disminuya y en consecuencia la cantidad de sustratos para Bat2 también disminuya. Dado que suponemos que la afinidad de Bat2 por los cetoácidos es baja, una disminución en la concentración de α -CIC terminaría el flujo e la vía hacia biosíntesis. Es posible que el α -CIC sea transportado de alguna forma a la mitocondria en donde Bat1 catalice su conversión a leucina. Los aminoácidos sintetizados en mitocondria por Bat1 podrían ser transportados al citoplasma por acción de Bap3. Bajo estas condiciones de crecimiento además de la síntesis de aminoácidos se requiere catabolismo de los mismos para generar NAD a través de la vía de Ehrlich. A través de la síntesis de valina e isoleucina se consume un NADPH; la síntesis de leucina consume además del NADPH un NAD. El catabolismo de valina, isoleucina o leucina produce un NAD. Al final de proceso de biosíntesis y catabolismo de leucina el saldo neto será un NADPH consumido, mientras que para valina e isoleucina el saldo neto de poder reductor será igual a cero, aunque hay que tener en cuenta que no regenera la misma molécula (se consume NADPH y se produce NAD).

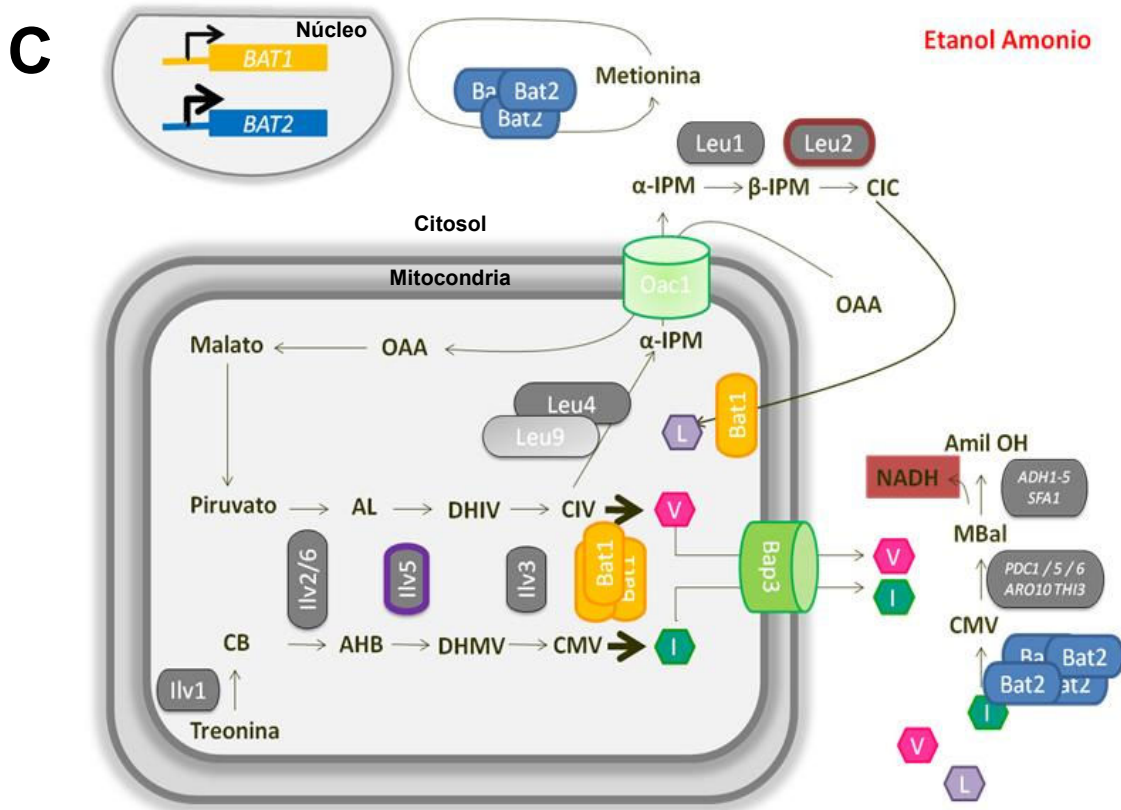


Figura 16. El metabolismo de VIL. De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo se proponen los siguientes modelos de la dinámica en el metabolismo de VIL en (A) glucosa amonio, (B) glucosa VIL y (C) etanol amonio. CB, cetobutanoato; AHB, 2-aceto-2-hidroxi-butirato; DHMV, 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato; CMV, 2-ceto-3-metilvalerato; AL, 2-acetolactato; DHIV, 2,3-dihidroxiisovalerato; CIV, 2-cetoisovalerato; α-IPM, α-isopropilmalato; β-IPM, β-isopropilmalato; CIC, α-cetoisocaproato; OAA, oxalacetato; V, valina; I, isoleucina; L, leucina; Mbal, metilbutanal; Amil OH, alcohol amílico.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. Las isoenzimas Bat1 y Bat2 de *S. cerevisiae* divergieron funcionalmente de la enzima tipo ancestral *K/Bat1* de *K. lactis*

El único ortólogo a los genes *BAT1* y *BAT2* en *K. lactis* es el gen *KIBAT1* que codifica para una enzima bifuncional, que participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. La enzima *K/Bat1* es 82% idéntica a *Bat1* y 80% idéntica a *Bat2*. En *S. cerevisiae* la función biosintética y catabólica se redistribuyeron en las enzimas *Bat1* y *Bat2*, respectivamente, a través de un proceso de subfuncionalización. *Bat1* juega un papel mayoritario en la síntesis de valina, mientras que *Bat2* tiene un papel primordial en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Posiblemente, la redistribución de la localización subcelular favoreció la subfuncionalización.

6.2. Los genes *BAT1* y *BAT2* tienen un perfil de expresión diferencial

La expresión de *BAT1* se induce en condiciones que promueven la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, además su expresión disminuye en presencia del producto final (VIL). La expresión de *BAT2* aumenta en condiciones que requieren catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (etanol amonio) y además se induce por sustrato (glucosa VIL).

6.3. La actividad enzimática de *Bat1* y *Bat2* es consistente con su perfil de expresión

En glucosa amonio la actividad enzimática de *Bat1* es mayor que la de *Bat2*, consistente con el papel biosintético de *Bat1*, mientras que en glucosa VIL, la actividad de transaminasa de *Bat2* aumenta, lo que correlaciona con el carácter catabólico de la enzima. En glucosa amonio la actividad enzimática de *K/Bat1* es diez veces mayor que en glucosa VIL, lo que indica que aunque *K/Bat1* es una enzima bifuncional, su capacidad biosintética está acentuada.

7. PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

7.1. Contribución de la localización subcelular en la subfuncionalización

Nuestros resultados sugieren que Bat1 y Bat2 se subfuncionalizaron a partir de una enzima ancestral que posee capacidades biosintéticas y catabólicas. Se ha propuesto que la localización subcelular puede ser un mecanismo para la especialización de genes duplicados. Bat1 es una enzima mitocondrial, mientras que Bat2 es una enzima citosólica. Resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que *K/Bat1* es una enzima de localización nuclear y posiblemente mitocondrial, que pese a ser una enzima bifuncional presenta un acentuado carácter biosintético. Sería interesante analizar el comportamiento de cada una de estas enzimas al ser relocalizadas en un diferente compartimento celular, es decir, si Bat1 se dirige artificialmente al citoplasma ¿se comportará como una enzima catabólica?, de igual forma, si Bat2 se relocaliza en la mitocondria ¿se potenciará su carácter biosintético?.

7.2. Análisis de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de las isoenzimas Bat1 y Bat2 y *K/Bat1*

Si la capacidad catabólica o biosintética de estas enzimas no está relacionada a su distribución subcelular y en consecuencia a la diferente disponibilidad de sustratos, entonces, sería interesante realizar un análisis más detallado de las características cinéticas de estas proteínas para determinar si muestran diferente afinidad por la unión a aminoácidos o cetoácidos, para lo cual se determinaría la velocidad máxima (V_{max}) y afinidad por sustratos (K_m) en la enzima pura. Para establecer la relevancia fisiológica de las constantes de afinidad por aminoácidos o α -cetoácidos de cadena ramificada, sería necesario medir la concentración intracelular de estos metabolitos.

7.3. Regulación de la expresión de *BAT1* y *BAT2*

En este trabajo sólo se analizó el cambio en el perfil de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2* en condiciones que promueven la biosíntesis o el catabolismo de VIL. Como parte

de la Tesis de Maestría de otros compañeros del laboratorio, se ha explorado el papel de algunos reguladores transcripcionales sobre la expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2* (datos incluidos en el artículo I del anexo). Sin embargo, se requiere un estudio más detallado para establecer el modelo de regulación de estos genes. Asimismo, el estudio de la regulación del gen *KIBAT1* (Proyecto de Maestría de Karla López) facilitará el análisis comparativo entre el único gen de *K. lactis* y los ortólogos en *S. cerevisiae* y permitirá entender mejor la retención de los duplicados *BAT1* y *BAT2*.

7.4. Contribución de Bat1 y Bat2 al equilibrio NAD(P)⁺/NAD(P)H

Sería interesante evaluar si bajo condiciones de crecimiento respiratorio el flujo a través de la vía de Ehrlich aumenta y si bajo estas condiciones la generación de NAD(P)H asociada a la producción de alcoholes tipo *fusel* contribuye notoriamente en el equilibrio NAD(P)⁺/NAD(P)H.

Actualmente estamos llevando a cabo un análisis para analizar la contribución de Bat1 y Bat2 a la vía de rescate de metionina bajo condiciones de crecimiento respiratorio.

8. REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

ARO8/YGL202W Expression Connection Available at: http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/expression/expressionConnection.pl?dbid=S000003170&type=summary#glucose_glyc erol_transition.

Avendaño, A., Deluna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., y González, A. (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179, 5594-7.

Ben-Yosef, T., Yanuka, O. y Benvenisty, N. (1996). *ECA39* is regulated by c-Myc in human and by a Jun/Fos homolog, *Gcn4*, in yeast. *Oncogene* 13, 1859-66.

Bird, A. P. (1995). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 11, 94-100.

Bondar, D. C., Beckerich, J.-M. y Bonnarne, P. (2005). Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol* 71, 4585-4591.

Chen, S., Zhang, Y. E. y Long, M. (2010). New Genes in *Drosophila* Quickly Become Essential. *Science* 330, 1682 -1685.

Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. y Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119-22.

Claros, M. G. y Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem* 241, 779-786.

Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. y González, A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* 177, 792-8.

Colón, M., Hernández, F., López, K., Quezada, H., González, J., López, G., Aranda, C. y González, A. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* *Bat1* and *Bat2* Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. *PLoS ONE* 6, e16099.

De Boer, M., Bebelman, J. P., Gonçalves, P. M., Maat, J., Van Heerikhuizen, H. y Planta, R. J. (1998). Regulation of expression of the amino acid transporter gene *BAP3* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol* 30, 603-613.

DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L. y González, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276, 43775-83.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R. y Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.

- Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J. y Hewlins, M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 278, 8028-8034.
- Didion, T., Grausland, M., Kielland-Brandt, C. y Andersen, H. A. (1996). Amino acids induce expression of *BAP2*, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178, 2025-2029.
- Diebold, R., Schuster, J., Däschner, K. y Binder, S. (2002). The Branched-Chain Amino Acid Transaminase Gene Family in *Arabidopsis* Encodes Plastid and Mitochondrial Proteins. *Plant Physiol* 129, 540-550.
- Ding, Y., Zhao, L., Yang, S., Jiang, Y., Chen, Y., Zhao, R., Zhang, Y., Zhang, G., Dong, Y., Yu, H., *et al.* (2010). A young *Drosophila* duplicate gene plays essential roles in spermatogenesis by regulating several Y-linked male fertility genes. *PLoS Genetics* 6, e1001255.
- Eden, A., Simchen, G. y Benvenisty, N. (1996). Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem* 271, 20242-5.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. y von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol* 300, 1005-1016.
- Ford, G. y Ellis, E. M. (2002). Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast* 19, 1087-1096.
- Fraenkel, D. G. (1982). Carbohydrate Metabolism. En *The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression* (CSHL). Editado por Jeffrey N. Strathern, Elizabeth W. Jones y Jamer R. Broach.
- Frick, O. y Wittmann, C. (2005). Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb. Cell Fact* 4, 30.
- Friedman, R., y Hughes, A. L. (2001). Gene duplication and the structure of eukaryotic genomes. *Genome Res* 11, 373-81.
- Gao, F., Wang, C., Wei, C. y Li, Y. (2009). A branched-chain aminotransferase may regulate hormone levels by affecting *KNOX* genes in plants. *Planta* 230, 611-623.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. y Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-41.
- Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., y André, B. (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 27, 3065-3086.

- Goldstein, A. L. y McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.
- Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M. C. y Andersen, H. A. (1995). *BAP2*, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1269, 275-280.
- Hauser, M., Horn, P., Tournu, H., Hauser, N. C., Hoheisel, J. D., Brown, A. J. y Dickinson, J. R. (2007). A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res* 7, 84-92.
- Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T. y Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74, 2259-66.
- He, X., y Zhang, J. (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics* 169, 1157-1164.
- Hutson, S. M. y Hall, T. R. (1993). Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain alpha-keto acid transport protein. *J. Biol. Chem* 268, 3084-3091.
- Iraqi, I., Vissers, S., André, B. y Urrestarazu, A. (1999). Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol* 19, 3360-3371.
- Iraqi, I., Vissers, S., Cartiaux, M. y Urrestarazu, A. (1998). Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol. Gen. Genet* 257, 238-248.
- Jansonius, J. N. (1998). Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol* 8, 759-769.
- Jensen, R. A. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol* 30, 409-425.
- Jensen, R. A., y Gu, W. (1996). Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of Family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J. Bacteriol* 178, 2161-2171.
- Kagkli, D.-M., Bonnarme, P., Neuvéglise, C., Cogan, T. M. y Casaregola, S. (2006). L-methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Appl. Environ. Microbiol* 72, 3330-3335.
- Kellis, M., Birren, B. W. y Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617-24.
- Kispal, G., Steiner, H., Court, D. A., Rolinski, B. y Lill, R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc

oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* 271, 24458-64.

Kohlhaw, G. B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67, 1-15.

Krakauer, D. C. y Nowak, M. A. (1999). Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Semin Cell Dev Biol* 10, 555-9.

López, K. (2011). Tesis de Maestría.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.

Lynch, M., y Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151-5.

Lynch, M., y Force, A. (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-73.

Magasanik, B., y Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290, 1-18.

Marland, E., Prachumwat, A., Maltsev, N., Gu, Z., y Li, W.-H. (2004). Higher gene duplicabilities for metabolic proteins than for nonmetabolic proteins in yeast and *E. coli*. *J. Mol. Evol* 59, 806-814.

Marobbio, C. M. T., Giannuzzi, G., Paradies, E., Pierri, C. L. y Palmieri, F. (2008). alpha-Isopropylmalate, a leucine biosynthesis intermediate in yeast, is transported by the mitochondrial oxalacetate carrier. *J. Biol. Chem* 283, 28445-28453.

Marques, A. C., Vinckenbosch, N., Brawand, D. y Kaessmann, H. (2008). Functional diversification of duplicate genes through subcellular adaptation of encoded proteins. *Genome Biol* 9, R54.

Mell, J. C., y Burgess, S. M. (2003). Yeast as a Model Genetic Organism. En *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd).

Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. y Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* 274, 976-989.

Mewes, H. W., Albermann, K., Bahr, M., Frishman, D., Gleissner, A., Hani, J., Heumann, K., Kleine, K., Maierl, A., Oliver, S. G., *et al.* (1997). Overview of the yeast genome. *Nature* 387, 7-65.

Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. y Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* 45, 299-310.

Navarro-Olmos, R., Kawasaki, L., Dominguez-Ramirez, L., Ongay-Larios, L., Perez-Molina,

- R. y Coria, R. (2010). The beta subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces lactis* pheromone response pathway in the absence of the gamma subunit. *Mol Biol Cell* 21, 489-98.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10, 1-6.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication (Springer-Verlag).
- Pirkov, I., Norbeck, J., Gustafsson, L. y Albers, E. (2008). A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J* 275, 4111-4120.
- Piskur, J. (2001). Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends in Genetics: TIG* 17, 302-303.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., y Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-29.
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernández, H., Calcagno, M. L., Marín-Hernández, A. y González, A. (2008). Specialization of the parologue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154, 1656-1667.
- Rastogi, S. y Liberles, D. A. (2005). Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol* 5, 28.
- Regenberg, B., Düring-Olsen, L., Kielland-Brandt, M. C. y Holmberg, S. (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 36, 317-328.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. y Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-2.
- Roberts, G. G. y Hudson, A. P. (2006). Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. *Mol. Genet. Genomics* 276, 170-186.
- Ryan, E. D. y Kohlhaw, G. B. (1974). Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzymes in yeast. *J Bacteriol* 120, 631-7.
- Sankoff, D. (2001). Gene and genome duplication. *Curr Opin Genet Dev* 11, 681-4.
- Schacherer, J., Tourrette, Y., Souciet, J. L., Potier, S. y De Montigny, J. (2004). Recovery of a function involving gene duplication by retroposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 14, 1291-7.
- Schuldiner, O., Eden, A., Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Simchen, G. y Benvenisty, N. (1996).

- ECA39, a conserved gene regulated by c-Myc in mice, is involved in G1/S cell cycle regulation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7143-8.
- Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J. y Binder, S. (2006). Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2664-79.
- Schwartz, R., Ting, C. S., y King, J. (2001). Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res* 11, 703-709.
- Sentheshanuganathan, S. (1960). The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical Journal* 74, 568-576.
- Seoighe, C., y Wolfe, K. H. (1999a). Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* 238, 253-261.
- Seoighe, C., y Wolfe, K. H. (1999b). Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr. Opin. Microbiol* 2, 548-554.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H. E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 13207-13212.
- Sikorski, R. S. y Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Struhl, K. y Davis, R. W. (1981). Transcription of the his3 gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152, 535-52.
- Valenzuela, L., Aranda, C. y González, A. (2001). TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* 183, 2331-4.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P. y Gonzalez, A. (1998). Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180, 3533-40.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. y Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-808.
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat Rev Genet* 2, 333-41.
- Wolfe, K. H. y Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-13.

Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol* 18, 292-298.

9. ANEXO I

9. ANEXO I

9.1. Artículo I

El 80% de este artículo se conforma con el trabajo de la presente Tesis de Doctorado e incluye datos sobre la regulación de los genes *BAT1* y *BAT2*, así como *KIBAT1* obtenidos de los proyectos de Maestría de los alumnos Fabiola Hernández, Karla López y James González.

Saccharomyces cerevisiae Bat1 and Bat2 Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme

Maritrini Colón¹, Fabiola Hernández¹, Karla López¹, Héctor Quezada², James González¹, Geovani López¹, Cristina Aranda¹, Alicia González^{1*}

1 Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, **2** Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México City, México

Abstract

Background: Gene duplication is a key evolutionary mechanism providing material for the generation of genes with new or modified functions. The fate of duplicated gene copies has been amply discussed and several models have been put forward to account for duplicate conservation. The specialization model considers that duplication of a bifunctional ancestral gene could result in the preservation of both copies through subfunctionalization, resulting in the distribution of the two ancestral functions between the gene duplicates. Here we investigate whether the presumed bifunctional character displayed by the single branched chain amino acid aminotransferase present in *K. lactis* has been distributed in the two paralogous genes present in *S. cerevisiae*, and whether this conservation has impacted *S. cerevisiae* metabolism.

Principal Findings: Our results show that the *K*Bat1 orthologous BCAT is a bifunctional enzyme, which participates in the biosynthesis and catabolism of branched chain aminoacids (BCAAs). This dual role has been distributed in *S. cerevisiae* Bat1 and Bat2 paralogous proteins, supporting the specialization model posed to explain the evolution of gene duplications. *BAT1* is highly expressed under biosynthetic conditions, while *BAT2* expression is highest under catabolic conditions. Bat1 and Bat2 differential relocalization has favored their physiological function, since biosynthetic precursors are generated in the mitochondria (Bat1), while catabolic substrates are accumulated in the cytosol (Bat2). Under respiratory conditions, in the presence of ammonium and BCAAs the *bat1Δ bat2Δ* double mutant shows impaired growth, indicating that Bat1 and Bat2 could play redundant roles. In *K. lactis* wild type growth is independent of BCAA degradation, since a *Kibat1Δ* mutant grows under this condition.

Conclusions: Our study shows that *BAT1* and *BAT2* differential expression and subcellular relocalization has resulted in the distribution of the biosynthetic and catabolic roles of the ancestral BCAT in two isozymes improving BCAAs metabolism and constituting an adaptation to facultative metabolism.

Citation: Colón M, Hernández F, López K, Quezada H, González J, et al. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 Aminotransferases Have Functionally Diverged from the Ancestral-Like *Kluyveromyces lactis* Orthologous Enzyme. PLoS ONE 6(1): e16099. doi:10.1371/journal.pone.0016099

Editor: Geraldine Butler, University College Dublin, Ireland

Received: October 20, 2010; **Accepted:** December 6, 2010; **Published:** January 18, 2011

Copyright: © 2011 Colón et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, grant IN210706-3 and N2042093 (<http://dgapa.unam.mx>); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), grant 49970 (<http://www.conacyt.gob.mx/Paginas/default.aspx>); Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, México, grant PIFUTP08-1654 (<http://www.icyt.df.gob.mx>) and Macroproyecto de Tecnologías de la Información y La Computación, UNAM (<http://www.mtuic.unam.mx>). MC was recipient of a PhD Fellowship from CONACYT. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: amanjarr@ifc.unam.mx

Introduction

It is accepted that *Saccharomyces cerevisiae* genome arose from complete duplication of eight ancestral chromosomes; functionally normal ploidy was recovered due to the massive loss of 90% of duplicated genes. Analysis of the complete yeast genome sequence identified several interchromosomal duplicated regions [1,2] which constitute the molecular evidence of an ancient duplication of the entire yeast genome [3]. Gene duplication and the subsequent divergence of paralogous pairs play an important role in the evolution of novel gene functions. Several models have been proposed to account for the emergence, maintenance and evolution of gene copies. It has been shown that diversification of paralogous genes whose products are strictly involved in amino

acid biosynthesis has led to functional diversification such that retention of both copies is needed to fulfill the function carried out by the original gene [4–6], thus supporting the duplication-degeneration-complementation model proposed by Force *et al.* [7]. The specialization or escape from adaptive conflict posed by Hughes [8] considers that if the original gene was performing two functions, that could not be independently improved, after duplication each gene copy could be driven by positive selection to improve one of the two functions. Aminotransferases constitute an interesting model to study diversification of paralogous genes carrying out two functions, both of which are needed to warrant metabolite provision, and which cannot be differentially improved, since aminotransferases constitute biosynthetic and catabolic pathways whose opposed action relies on a single catalytic site.

Furthermore, metabolite provision through the action of aminotransferases, is necessary when yeast is grown in either fermentable or non-fermentable carbon sources and thus, functional diversification of aminotransferase-encoding paralogous genes could play a fundamental role in the adaptation to facultative metabolism.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the last step in the biosynthesis and the first step in the catabolism of branched chain amino acids (BCAAs), is achieved through the action of the branched chain aminotransferases (BCATs) encoded by the paralogous pair *BAT1* and *BAT2*, which form part of a duplicated chromosomal block generated from the Whole Genome Duplication (WGD) event [2,3] (<http://www.gen.tcd.ie/~khwolfe/yeast/nova/index.html>). An additional inspection using the Yeast Gene Order Browser (<http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) also suggests that *BAT1/BAT2* could be in a duplicated block. This evidence points to the origin of the *BAT1-BAT2* duplicated gene pair as part of the WGD duplication event rather than to an isolated gene duplication phenomenon. These enzymes catalyze the transfer of amino groups between the amino acids valine, leucine and isoleucine and their corresponding α -ketoacids, the biosynthetic precursors of fusel alcohols, which influence the aroma and flavor of yeast derived fermentation products such as beer and bread [9,10], and which have been recently found to regulate translation initiation by inhibiting eIF2B [11].

The lineage which gave rise to *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) diverged before the WGD event, therefore, *K. lactis* genome does not harbor the duplication blocks present in *S. cerevisiae* [3]. In *K. lactis* the gene *KIBAT1* constitutes, the unique orthologue of the *S. cerevisiae* *BAT1* and *BAT2* paralogous gene pair encoding a branched chain aminotransferase (*KlBat1*). We have undertaken the study of the functional role played by *KlBat1*, *Bat1* and *Bat2*, in order to understand whether the role played by the ancestral-type enzyme has been conserved in *Bat1* and *Bat2* resulting in redundant function or whether it has been distributed between these two enzymes resulting in diversification.

KlBat1 encoded protein is constituted by 407 amino acid residues and as well as *Bat1* it bears an amino terminal signal peptide which could direct its mitochondrial localization. It shares 82% amino acid identity with *Bat1* and 79% with *Bat2*. *BAT1* encodes a 393 amino acid residues mitochondrial protein, while the cytosolic *Bat2* is composed of 376 residues; these two enzymes show 81% identity. Previous results from other laboratories have shown that on glucose-containing media, *BAT1* single deletion impaired neither cell growth nor fusel alcohol production; however, drastic effects in fusel alcohol production were observed in a *bat2Δ* deletion mutant. Deletion of both genes resulted in branched chain amino acid auxotrophy, severe growth retardation and diminished fusel alcohol production [12]. The fact that the enzymes involved in the biosynthesis of the BCAAs are mitochondrially located has led to the notion that in *S. cerevisiae*, the biosynthetic process is mainly carried out in the mitochondria. However, the fact that *Bat1* and *Bat2* are located in both compartments indicates that the last step in BCAAs biosynthesis can be carried out in either the mitochondria or the cytoplasm. Furthermore, for the leucine biosynthetic pathway, *Leu1* and *Leu2* have been only found in cytosol [13,14] indicating that the conversion of α -ketoisovalerate to α -isocaproate the immediate precursor of leucine is carried out in the cytoplasm and further transported to the mitochondria so that the last step in leucine biosynthesis can be carried out in either the mitochondria or the cytoplasm, through the action of either *Bat1* or *Bat2*. No analysis has been undertaken to determine the compartment in which BCAAs catabolism is carried out and the physiological role of differential *Bat1* and *Bat2* localization has not been analyzed.

Results presented in this paper support the specialization model posed by Hughes [8], showing that i) *K. lactis KlBat1* codifies a presumed mitochondrial localized BCAT, which participates in both, the biosynthesis and catabolism of BCAAs, which is unable to complement *S. cerevisiae bat2Δ* mutants, and that ii) in *S. cerevisiae* biosynthetic and catabolic roles have been distributed in two paralogous genes. *Bat1* is preferentially involved in BCAAs biosynthesis, while *Bat2* function is determinant for BCAAs catabolism, indicating functional diversification. The specialization has been afforded through differential subcellular localization of the encoded products and divergent gene expression patterns, which is reflected in enzyme activity under various physiological conditions.

Results

The ancestor-like branched chain aminotransferase *KlBat1* is a bifunctional biosynthetic and catabolic enzyme

A *Klbat1Δ* mutant incubated on glucose and ammonium, displayed valine, isoleucine and leucine (VIL) auxotrophy (Table 1). Wild type growth was only attained when the three BCAAs were simultaneously added to the growth medium. The *Klbat1Δ* mutant did not grow when branched chain amino acids were supplemented as sole nitrogen sources (Table 1), showing that this enzyme is also involved in BCAAs catabolism. These results indicate that no redundant pathways are involved in VIL biosynthesis and catabolism. As expected, *Klbat1Δ* transformants carrying the *KIBAT1* gene on a centromeric plasmid displayed wild type phenotype when grown on either ammonium-glucose or VIL-glucose (Table 1), indicating that *KlBat1* is a bifunctional enzyme, which participates in VIL biosynthesis and catabolism.

In *S. cerevisiae*, biosynthetic and catabolic roles of the branched chain aminotransferases have been differentially distributed in the *BAT1* and *BAT2*-encoded isozymes

Single and double *bat1Δ* and *bat2Δ* mutants were constructed. As Table 2 and Figure 1A, CEN show, a double *bat1Δ bat2Δ* mutant displayed VIL auxotrophy when incubated on glucose and

Table 1. *Klbat1Δ* mutants are impaired in VIL biosynthesis and catabolism.

Strain	Relative growth ^a (%)		
	Glucose		
	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ VIL ^b	VIL
<i>KlWT</i>	100	100	100
<i>CLA34 (Klbat1Δ)</i>	0	96	0
<i>KlWT (pKD1)</i>	100	100	100
<i>KlWT (pKD1 KIBAT1)</i>	100	100	100
<i>CLA34 (pKD1)</i>	0	N. D. ^c	0
<i>CLA34 (pKD1 KIBAT1)</i>	100	N. D.	100

^aValues are shown relative to growth rate of the wild type strain (0.12 h⁻¹ and 0.13 h⁻¹ on NH₄⁺ and amino acids, respectively); and represent the means from three independent experiments (variation was always $\leq 10\%$).

^bAmino acids were supplemented at a concentration of 150 mg/l, 100 mg/l or 30 mg/l of valine (V), leucine (L) or isoleucine (I) respectively.

^cN. D. not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0016099.t001

ammonium; wild type growth was attained when this strain was grown in the presence of the three BCAAs (Table 2). *BAT1* and *BAT2* were independently cloned on centromeric plasmids and used to transform the *bat1Δ bat2Δ* mutant. Transformants carrying *BAT1* recovered VIL prototrophy (Figure 1A, CEN *BAT1*), while those carrying *BAT2* showed a bradytrophic phenotype (Figure 1A, CEN *BAT2*), indicating that Bat1 had a more efficient biosynthetic role than that exerted by Bat2. When cultured on ammonium-glucose, the single *bat1Δ* mutant showed a significantly decreased growth rate (69%), as compared to the wild type strain however, it attained wild type growth rates by the sole addition of valine to the growth medium (94%) (Table 2), or when complemented with a centromeric plasmid harboring *BAT1* (Figure 1A, CEN vs. CEN *BAT1*). *BAT2* did not complement *bat1Δ* growth deficiency (Figure 1A, CEN *BAT2*). These results indicate that Bat1 activity is indispensable to fulfill valine requirement and that Bat2 is unable to fully replace Bat1, suggesting functional diversification. Accordingly, the single *bat2Δ* mutant grew as well as the wild type on ammonium-glucose, with or without amino acids (Table 2), confirming that Bat1 completely fulfilled biosynthetic needs. Since it has been proposed that Bat2 is cytosolic, while Bat1 is mitochondrially located [9] it could be considered that the valine pool generated through Bat2 might not be efficiently transported to the mitochondria. In order to confirm *in vivo* enzyme localization, Bat1-yECitrine and Bat2-yECitrine tagged strains were constructed as described in Materials and Methods and subcellular localization was analyzed by confocal microscopy. As Figure 2 shows, Bat1 was found to be localized in mitochondria, while Bat2 was cytosolic, confirming previous observations [9]. It could thus be proposed that as mentioned above, the valine pool synthesized through Bat2 is not efficiently transported to the mitochondria or that valine synthesis through Bat2 is scarce leading to the observed valine bradytrophic of a *bat1Δ* mutant.

To analyze the role of Bat1 and Bat2 on VIL catabolism, *bat1Δ bat2Δ* double mutant and single mutants were grown on glucose in the presence of the three BCAAs as sole nitrogen source. Under these conditions, the wild type strain and the *bat1Δ* mutant showed higher growth rates than those observed in the double and *bat2Δ* mutants indicating a catabolic role for Bat2 (Table 2 and Figure 1B, CEN). On VIL-glucose *bat2Δ* mutant was only able to achieve 70% of the growth rate displayed by the wild type strain, suggesting that Bat2-dependent VIL catabolism was required for wild type growth, and that Bat1 was unable to compensate lack of Bat2 (Table 2; Figure 1B, CEN). Accordingly, single *bat2Δ* and double mutants recovered wild type growth when transformed with a centromeric plasmid harboring *BAT2*,

complementation failed with plasmids carrying *BAT1* (Figure 1B, CEN vs. CEN *BAT1* and CEN *BAT2*). Since on glucose-ammonium-VIL the double and single *bat2Δ* mutants showed growth rates which were equivalent to those displayed by the wild type strain, it can be concluded that in glucose VIL catabolism fulfills nitrogen requirements.

These results indicate that Bat2 has a prominent role in VIL catabolism, while Bat1 catabolic role is only evidenced in a *bat2Δ* genetic background. The fact that as Figure 2 shows, Bat1 mitochondrial localization is conserved in the presence of VIL as sole nitrogen source indicates that Bat1 catabolic character is exerted in this compartment. It could be proposed that under these conditions VIL accumulation in the mitochondria, would enhance Bat1 catabolic character.

Above presented results indicate that in a wild type strain Bat1 displays a biosynthetic character while Bat2 has a prominent catabolic role.

KIBAT1 does not complement *bat2Δ* mutant strains

To analyze whether the *KIBAT1* enzyme was able to replace Bat1 or Bat2 in *S. cerevisiae*, a monocopy plasmid harboring the *KIBAT1* gene was independently transformed in both single mutants *bat1Δ* and *bat2Δ* and in the double mutant *bat1Δ bat2Δ*. Constructions were prepared in order to promote *KIBAT1* expression from either its own promoter or by the heterologous *BAT1* or *BAT2* promoters. When grown on ammonium-glucose the *bat1Δ* mutant harboring *KIBAT1* on a monocopy plasmid attained wild type growth regardless of the promoter used to drive its expression (Figure 1A). In the case of the *bat1Δ bat2Δ* double mutant, the presence of *KIBAT1* only restored 72% of wild type growth (Figure 1A); indicating that *KIBAT1* could only partially substitute simultaneous lack of Bat1 and Bat2. When growing on VIL-glucose neither the *bat2Δ* nor the double mutant attained wild type growth when *KIBAT1* expression was driven from the *BAT1*, *BAT2* or *KIBAT1* promoters (Figure 1B), although higher growth rates were attained with *P_{BAT2}-KIBAT1* or *P_{KIBAT1}-KIBAT1*, suggesting that a promoter-dependent effect could enhance *KIBAT1* capacity to complement lack of Bat2. It could be possible that either the *KIBAT1* heterologous enzyme has peculiar kinetic properties that do not allow full *bat2Δ* complementation, or that the differential subcellular localization of *KIBAT1* and Bat2, could hamper *bat2Δ* complementation, since as mentioned earlier, Bat2 is a cytosolic enzyme and although localization of *KIBAT1* has not been experimentally determined, an *in silico* analysis using Mitoprot and SignalP databases suggests that *KIBAT1* is located in the mitochondria.

Table 2. In *S. cerevisiae* *bat1Δ* mutant is impaired in VIL biosynthesis, while a *bat2Δ* mutant is mainly impaired in VIL catabolism.

Strain	Relative growth* (%)								
	Glucose								
	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ V ^b	NH ₄ ⁺ I	NH ₄ ⁺ L	NH ₄ ⁺ VIL	V	I	L	VIL
CLA1-2 (WT)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CLA31 (<i>bat1Δ</i>)	69	94	65	65	100	97	88	78	100
CLA32 (<i>bat2Δ</i>)	100	95	93	100	100	61	52	78	70
CLA33 (<i>bat1Δ bat2Δ</i>)	0	0	0	0	91	0	0	0	0

*Values are shown relative to growth rate of the wild type strain (0.20 h⁻¹ and 0.11 h⁻¹ on NH₄⁺ and amino acids, respectively); and represent the means from three independent experiments (variation was always ≤10%).

^bAmino acids were supplemented at a concentration of 150 mg/l, 100 mg/l or 30 mg/l of valine (V), leucine (L) or isoleucine (I) respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0016099.t002

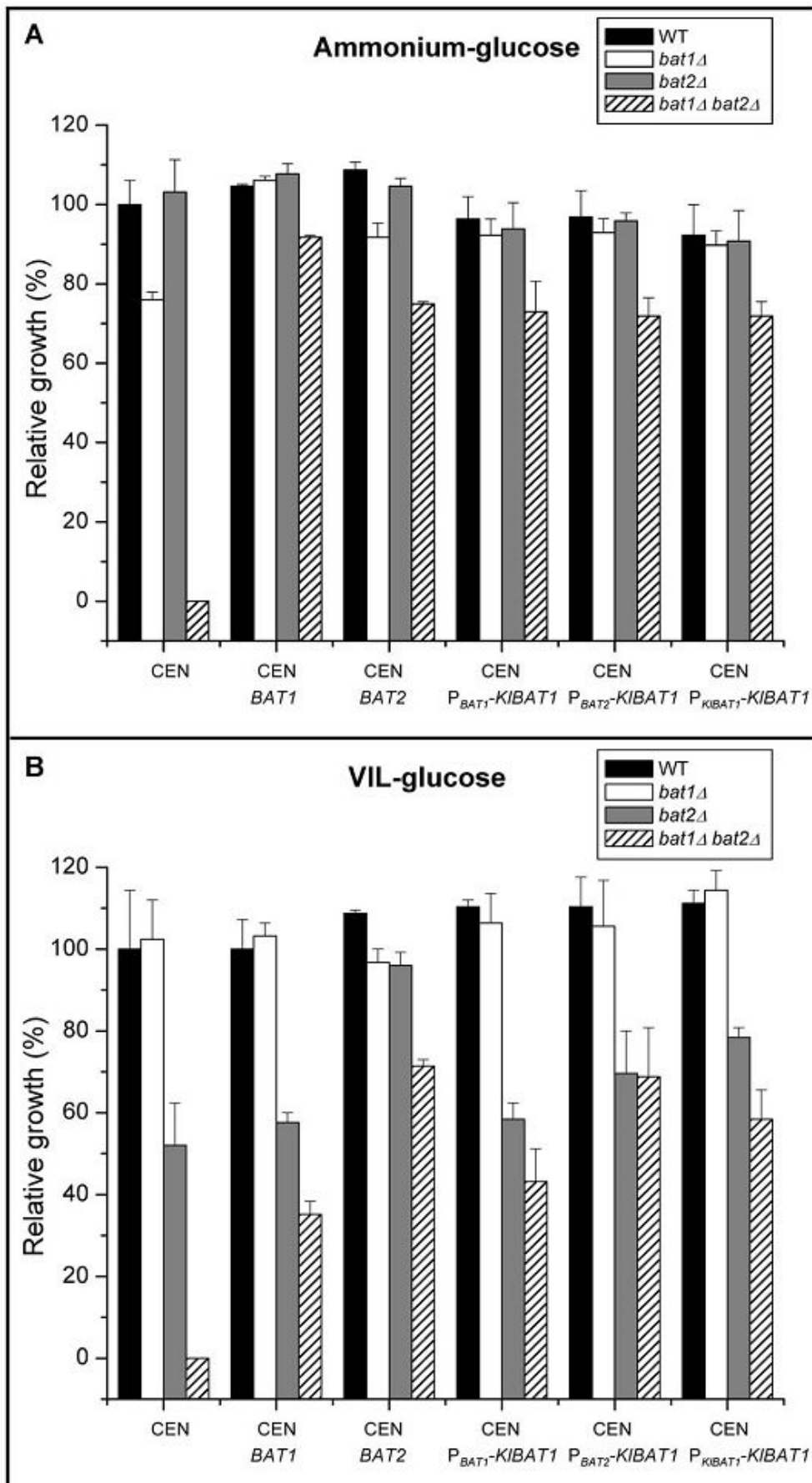


Figure 1. Growth phenotype of single and double mutants complemented with plasmids harboring *BAT1*, *BAT2* or *KIBAT1*. Wild type, *bat1Δ*, *bat2Δ* and *bat1Δ bat2Δ* strains were grown on ammonium-glucose (A) or VIL-glucose (B). Values are shown relative to growth rate of the wild type strain (0.20 h⁻¹ and 0.13 h⁻¹ on ammonium-glucose and VIL glucose respectively) and represent the mean of three independent experiments ± S. D. Cells were complemented with a centromeric plasmid (CEN) harboring *BAT1* (CEN *BAT1*), *BAT2* (CEN *BAT2*) or the *K. lactis* orthologous gene *KIBAT1* whose expression was driven by its own promoter (CEN *P_{KIBAT1}-KIBAT1*) or by *BAT1* (CEN *P_{BAT1}-KIBAT1*) or *BAT2* (CEN *P_{BAT2}-KIBAT1*) promoters. doi:10.1371/journal.pone.0016099.g001

KIBAT1 has a biosynthetic-like expression profile

Total RNA was prepared from *K. lactis* wild type strain grown on glucose as carbon source with various nitrogen sources. It was found that *KIBAT1* expression profile was that expected for a biosynthetic enzyme. Steady state mRNA levels were similar in total RNA samples obtained from cultures grown on either repressive (glutamine) or non-repressive nitrogen sources (GABA),

indicating that the quality of the nitrogen source had no effect on *KIBAT1* expression (Figure 3A). However, expression was repressed in total RNA samples obtained from cultures grown in the presence of VIL as sole nitrogen source, or when combined with additional nitrogen sources such as ammonium or GABA, as compared to that found in the absence of VIL (Figure 3A). Worth of mention is the fact that VIL repression was not observed in

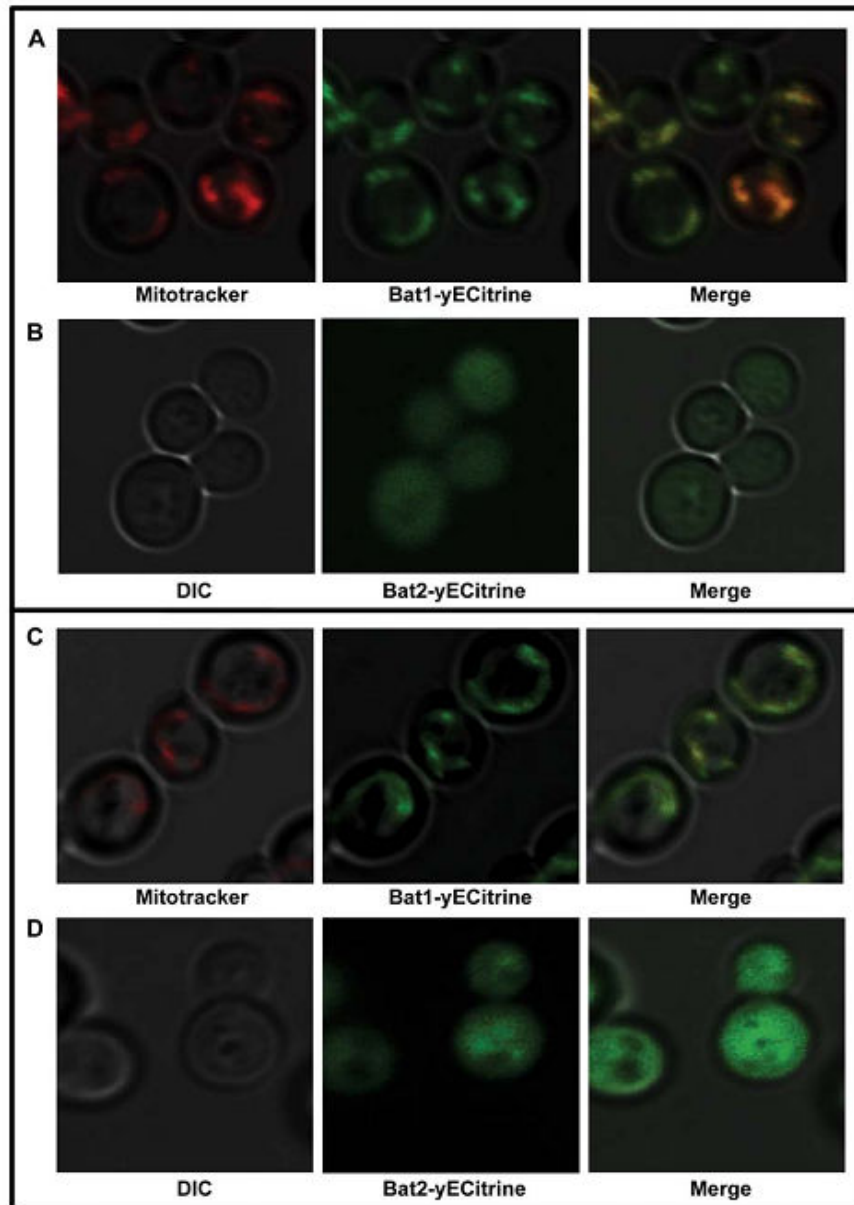


Figure 2. Bat1 is mitochondrially located, while Bat2 is cytoplasmic. Fluorescence images showing the subcellular localization of the paralogous proteins Bat1 and Bat2. Samples were taken from exponentially grown cultures of tagged mutants grown on glucose-ammonium (A, B) or on glucose-VIL (C, D). Mitochondrial localization of Bat1, the signal of the Bat1-yECitrine fusion co-localizes with mitotracker signal (A, C). Cytoplasmic localization of the Bat2-yECitrine fusion (B, D). doi:10.1371/journal.pone.0016099.g002

glutamine, suggesting that this amino acid could hinder VII. transport, thus resulting in a low intracellular accumulation of these amino acids.

BAT1 and BAT2 show divergent expression profiles

To analyze whether the apparent divergence in Bat1 and Bat2 metabolic roles, was correlated with the expression profile of their encoding genes, Northern analysis was carried out. It was found that as well as *KlBAT1*, *BAT1* was mainly expressed on ammonium-glucose exponential cultures (biosynthetic conditions), and repressed in the presence of VII. *BAT1* expression was not influenced by the quality of the nitrogen source, and VII. repression was observed on either repressive or non-repressive nitrogen sources (Figure 3B and 3C). Conversely, *BAT2* showed a classic catabolic expression profile; responding to the quality of the nitrogen source; down-regulated in the presence of repressive nitrogen sources (glutamine) and derepressed in secondary non-repressive nitrogen sources such as GABA (Figure 3B and 3C). *BAT2* expression was twelve-fold increased when total RNA was obtained from cultures in which VII. was provided as sole nitrogen source (catabolic conditions), as compared to that found when RNA was prepared from on ammonium-glucose cultures (Figure 4). *BAT2* expression was also induced in a *bat1Δ* genetic background. Under derepressed conditions (GABA), the addition of the three branched chain amino acids, had a positive effect further inducing *BAT2* expression (Figure 3B).

KlBat1 enzymatic activity displays a biosynthetic character

KlBat1 activity was determined in extracts obtained from cultures grown under biosynthetic and catabolic conditions (Figure 5A). Activity was similar in extracts obtained from ammonium-glucose with or without VII. (Figure 1A), indicating that the observed repression of *KlBAT1* expression on VII.-ammonium did not result in decreased enzymatic activity. When α -ketoisovalerate (α -KIV) was used as substrate, activity was nearly two-fold higher to that found with α -ketoisocaproate (α -KIC), indicating differential kinetic properties for these substrates. Lowest activity was detected on α -ketomethylvalerate (α -KMV). In extracts obtained from VII.-glucose (catabolic conditions), KlBat1 activity was at least ten-fold lower than that observed on ammonium-glucose (biosynthetic conditions), confirming *KlBAT1* expression profile (Figure 5A) and indicating that KlBat1 has a pronounced biosynthetic character.

Bat1 and Bat2 enzymatic activity is consistent with BAT1 and BAT2 expression profile

BCAT enzymatic activity was determined in extracts obtained from the wild type and the single *bat1Δ* and *bat2Δ* mutants. As Figure 5A shows, activity determined on ammonium-glucose (biosynthetic conditions) was higher in the *bat2Δ* (*BAT1*) mutant, as compared to that found in the *bat1Δ* (*BAT2*) mutant strain, although in the presence of VII.-ammonium Bat1 activity decreased, it was however higher than that observed for Bat2. Conversely, in the presence of VII. as sole nitrogen source (catabolic conditions) Bat2 activity was higher than that observed for Bat1. These results are in agreement with expression profile observed for either *BAT1* or *BAT2*, which indicate that *BAT1* expression is VII. repressed while that of *BAT2* is induced in VII. as sole nitrogen source (Figure 4). These results support the proposition that BCAT biosynthetic and catabolic roles have been distributed between the two paralogous enzymes. Bat1 and Bat2 have diverged acquiring a biosynthetic or catabolic character,

respectively. However, since only the double *bat1Δ bat2Δ* is a full VII. auxotroph unable to utilize VII. as sole nitrogen source, it can be concluded that the biosynthetic and catabolic roles of these enzymes is partially redundant. Highest activities were detected when α -KIC (leucine) was provided as substrate, as compared to that for α -KIV (valine) or α -KMV (isoleucine), indicating differential kinetic properties for the various substrates that could reflect differential substrate affinity.

BAT1 and BAT2 show differential expression profiles and enzymatic activity under respiratory conditions

The collection of single and double *bat1Δ* and *bat2Δ* mutants was grown on ethanol as carbon source and ammonium as nitrogen source. Under this condition, growth of the double *bat1Δ bat2Δ* mutant was completely impaired, even in the presence of the three amino acids, indicating that VII. catabolism is compelling for growth in the presence of non-fermentable carbon sources, even on ammonium as nitrogen source (Table 3). Conversely, *Klbat1Δ* mutant was able to sustain growth in media supplemented with VII.-ammonium-ethanol, indicating that as opposed to that observed in *S. cerevisiae*, VII. catabolism is not necessary to achieve growth in the presence of ethanol as sole carbon source and ammonium as nitrogen source, underscoring the fact that *K. lactis* has a more efficient ethanol catabolism [15]. Accordingly, the *K. lactis* wild type strain achieved a higher growth rate than that attained by the *S. cerevisiae* wild type CIA1-2 strain when grown on ethanol as sole carbon source (0.21 vs. 0.12 h⁻¹). On ammonium-ethanol, the *bat2Δ* mutant and the wild type strain, showed equivalent growth rates, while *bat1Δ* showed a slightly decreased growth rate as compared to the wild type strain, which was alleviated in the presence of the three amino acids, thus confirming Bat1 biosynthetic role. As expected, single mutants and wild type strain showed equivalent growth rates in the presence of the three amino acids. When ethanol was provided as the sole carbon source and the branched amino acids as sole nitrogen source neither the *S. cerevisiae* wild type strain nor the single or double mutants grew, indicating that these amino acids are poorly catabolized and thus unable to allow growth under these conditions (Table 3). Conversely, on VII.-ethanol, *K. lactis* wild type and the *Klbat1Δ* mutant complemented with the centromeric plasmid harboring the *KlBAT1* gene with its native promoter sequence, were able to sustain growth, confirming KlBat1 catabolic character (Table 3).

Northern analysis performed with extracts obtained from ammonium-ethanol grown cultures, showed that *BAT1* and *BAT2* displayed opposed expression profiles; *BAT1* expression was five-fold repressed, while that of *BAT2* was two-fold increased on ethanol as compared to those found on glucose. *KlBAT1* showed a similar expression pattern to that of *BAT1*, since its expression was decreased on ethanol as compared to glucose (Figure 6A and 6B).

In extracts prepared from ammonium-ethanol, Bat1 activity (*bat2Δ*) decreased when either one of the three α -ketoacids were used as substrates, as compared to that found on glucose ammonium, while that of Bat2 (*bat1Δ*) was nearly two-fold increased as compared to that found on glucose (Figure 5A and 5B). These results suggest that under respiratory conditions, Bat1-dependent α -ketoacid utilization would be diminished; avoiding increased carbon flux being channeled to VII. biosynthesis, while enhanced Bat2 activity would increase VII. utilization, favoring *S. cerevisiae* capacity to grow under respiratory conditions. On ammonium ethanol VII., Bat1 activity was equivalent to that found without VII., and Bat2 activity was two or three-fold increased as compared to ammonium ethanol (Figure 5B), thus under VII.-ammonium-ethanol, Bat1 and Bat2 showed equivalent

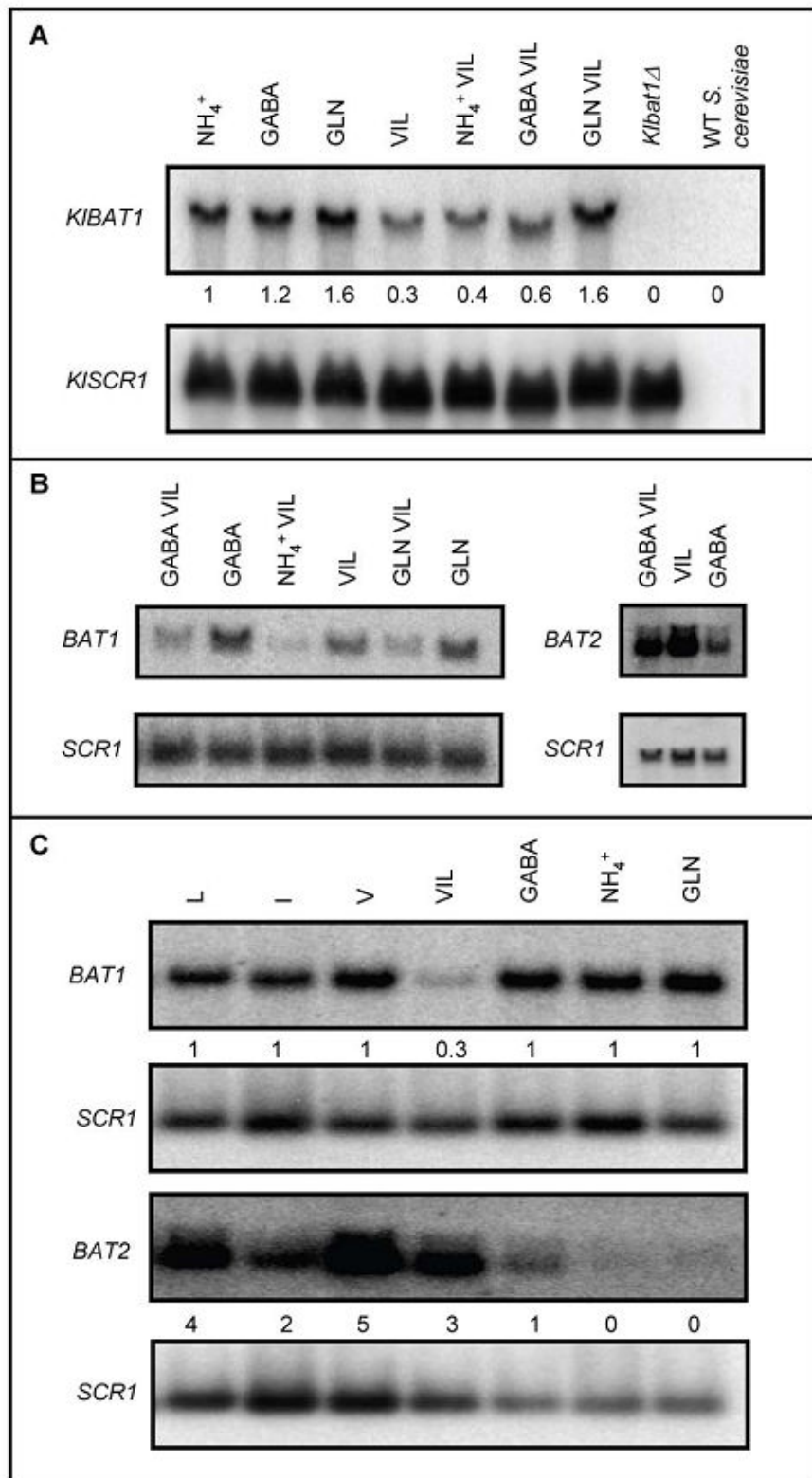


Figure 3. *Saccharomyces cerevisiae* BAT1 and KIBAT1 expression is repressed by VIL. Northern analysis was carried out on total RNA obtained from *K. lactis* 155 (wild type) and CLA34 (*Kibat1Δ*) strains (A), and *S. cerevisiae* strain CLA1-2 (wild type B, C). Strains were grown on 2% glucose with either valine (V) (150 mg/l), leucine (L) (100 mg/l), isoleucine (I) (30 mg/l), γ -aminobutyric acid (GABA 7 mM), γ -aminobutyric acid+VIL (GABA VIL), VIL (valine+isoleucine+leucine), NH₄ (40 mM NH₄ SO₂), NH₄ VIL (40mM NH₄ SO₂+VIL), glutamine (GLN 7mM), glutamine+VIL (GLN VIL), as nitrogen sources. Filters were sequentially probed with the *BAT1*, *BAT2*, *KIBAT1*- specific PCR products described in experimental procedures and a *Bam*H1-*Hind*III 1500 bp *ACT1* DNA or an SCR 400bp PCR fragment as loading controls. Numbers indicate relative expression as compared to WT grown on ammonium-glucose. Four biological replicates were carried out, representative results are shown. doi:10.1371/journal.pone.0016099.g003

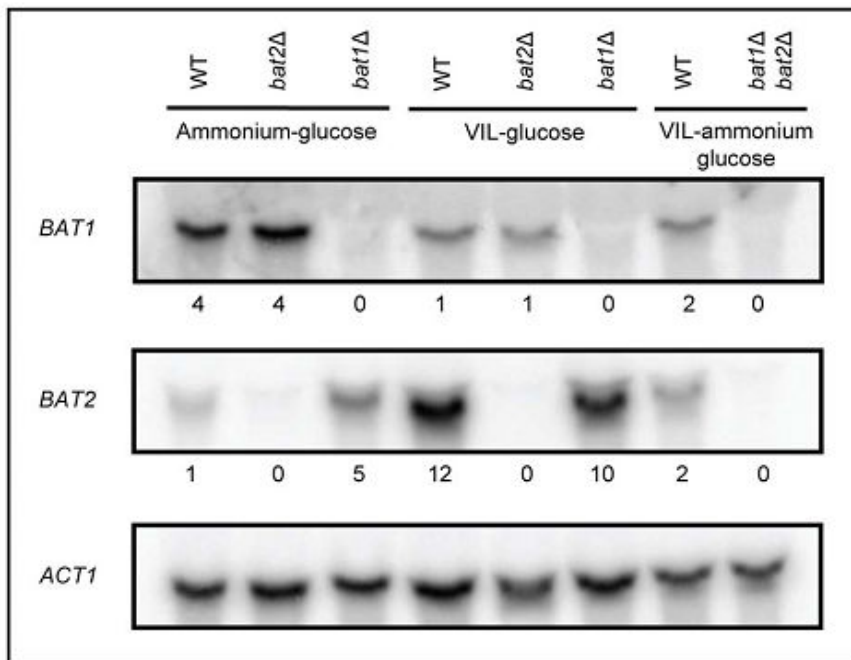


Figure 4. *S. cerevisiae* BAT1 and BAT2 display divergent expression profile. Northern analysis was carried out on total RNA obtained from *S. cerevisiae* strains CLA1-2 (wild type), CLA31 (*bat1Δ* BAT2) and CLA32 (BAT1 *bat2Δ*). Strains were grown on 2% glucose with either 40mM NH₄ SO₂, VIL (150 mg/l, 100 mg/l or 30 mg/l of valine (V), leucine (L) or isoleucine (I) respectively or NH₄ SO₂+VIL as nitrogen sources. Filters were sequentially probed with a 1500 bp BAT1 fragment, a 1450 bp BAT2 and a BamH1-HindIII 1500 bp ACT1 DNA fragment as loading control. Numbers indicate relative expression as compared to: Lane 1 the WT grown on glucose VIL, Lane 2 WT grown on glucose NH₄. Four biological replicates were performed, and representative results are shown. doi:10.1371/journal.pone.0016099.g004

enzymatic activities, indicating that both enzymes could equally contribute to VIL catabolism, in fact as Table 3 shows, growth rate of either *bat1Δ* or *bat2Δ* is similar, and growth is only impaired in the double mutant. It can be concluded that under respiratory conditions, Bat1 and Bat2 play partially biosynthetic redundant roles, and redundant catabolic roles.

As well as for Bat1, *KiBat1* activity was three-fold decreased in extracts prepared from ammonium-ethanol grown cultures, as compared to those found on ammonium-glucose (Figure 5A and 5B) in agreement with the expression profile, and as well as for Bat1, addition of VIL to ammonium-ethanol growth medium did not affect activity, suggesting that under respiratory conditions, biosynthesis is decreased and catabolism is triggered, thus favoring an equilibrated consumption and synthesis of α -ketoacids.

Discussion

This study addresses the question of whether the biosynthetic and catabolic roles played by the ancestral-like *KiBAT1* encoded aminotransferase present in *K. lactis*, have been distributed in the paralogous BAT1 and BAT2 orthologous genes present in *S. cerevisiae* and whether this subfunctionalization has improved branched chain amino acid metabolism constituting an adaptation to facultative metabolism.

BAT1 and BAT2 divergent expression profiles and differential subcellular localization contribute to Bat1 and Bat2 functional diversification

Presented results show that the *KiBAT1* orthologue codifies a bifunctional enzyme able to carry out BCAAs biosynthesis and catabolism and that this capacity has been distributed in the BAT1 and BAT2 *S. cerevisiae* paralogous pair.

Under respiro-fermentative conditions BAT1 and BAT2 divergent expression has contributed to emphasize the biosynthetic function of Bat1 and the catabolic function of Bat2. The observation that BAT1 expression is four-fold higher than that of BAT2 when cells are grown on glucose ammonia, and that BAT2 expression is twelve-fold increased in the presence of a non-repressive nitrogen source and further enhanced when VIL is present as sole nitrogen source as compared to that found on ammonium, supports this proposition. Expression differences impact BCAT activity, in the presence of ammonium-glucose Bat1 activity is higher than that of Bat2 improving Bat1 biosynthetic capacity. Conversely, in the presence of glucose as carbon source and VIL as sole nitrogen source, Bat2 activity is enhanced, thus favoring its catabolic role. Bat1 has a limited catabolic character, which is most evident in the double *bat1Δ bat2Δ* mutant, which is completely unable to utilize VIL as nitrogen source. The fact that *bat1Δ* is a valine braditroph indicates that Bat2 valine biosynthetic capacity is limited or that the cytosolic valine pool is unable to enter the mitochondria, and thus Bat1 constitutes a committed step to synthesize the valine mitochondrial pool. These observations underscore the role of differential localization in Bat2 and Bat1 divergence and put forward the possibility that restricted biosynthesis or transport of the cytosolic generated valine pool to the mitochondria could act as positive selection determining BAT1 retention and Bat1 mitochondrial localization.

BAT1 and BAT2 retention constitutes an adaptation to facultative metabolism

BAT1 expression is higher under fermento-respiratory conditions as compared to that detected under respiratory metabolism, while BAT2 expression is increased under respiratory conditions.

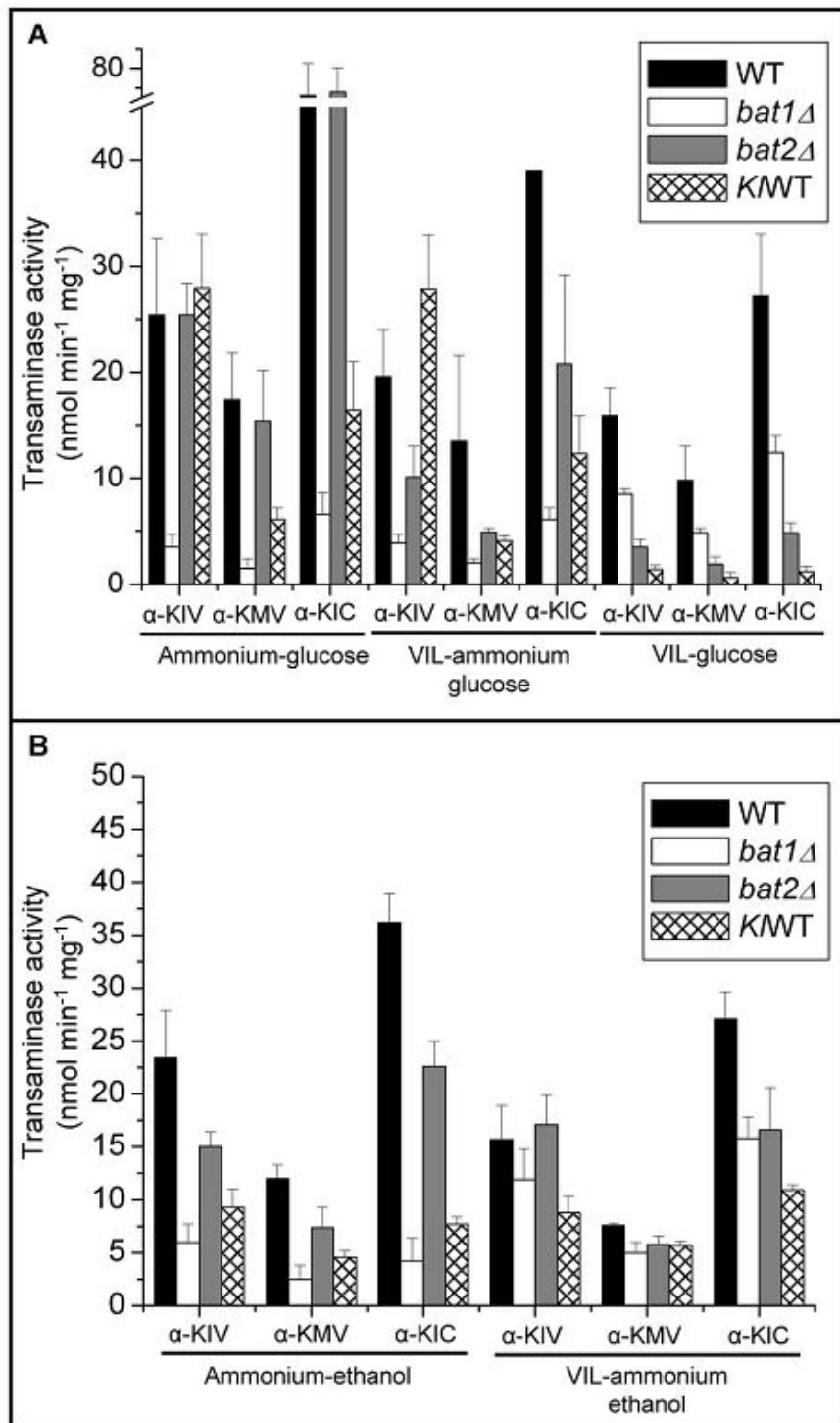


Figure 5. Branched chain aminotransferase activity. *S. cerevisiae* wild type, *bat1*Δ, *bat2*Δ and *K. lactis* wt (KWT) strains were grown on glucose (A) or ethanol (B) as carbon source and ammonium or VIL as nitrogen sources. Aminotransferase activity was determined in cell free extracts as indicated in Materials and methods using α-ketoisovalerate (α-KIV), α-ketoisocaproate (α-KIC) or α-ketomethylvalerate (α-KMV) as substrates. Transaminase activity is reported as nmol mg/l min⁻¹. Values are presented as mean from at least three measurements ± S. D.
doi:10.1371/journal.pone.0016099.g005

Reduced *BAT1* expression under respiratory conditions could contribute to decreased metabolite flow to amino acid biosynthesis favoring energy yielding pathways. Conversely, increased *Bat1* activity under fermento-respiratory conditions, would not hinder energy provision, since under these conditions decreased interme-

diolate flow through the tricarboxylic cycle does not hamper energy provision, constituting an adaptation to facultative metabolism.

Under fermentative or respiratory conditions, *Klbat1*Δ mutant is able to grow in the presence of the three BCAAs, indicating that catabolism is not required for growth, however the *bat1*Δ *bat2*Δ

Table 3. Growth phenotypes of single and double *bat1Δ* and *bat2Δ* mutants.

Strain	Relative growth* (%)		
	Ethanol		
	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺ VIL	VIL
CLA1-2 (WT)	100	100	0
CLA31 (<i>bat1Δ</i>)	87	93	0
CLA32 (<i>bat2Δ</i>)	100	94	0
CLA33 (<i>bat1Δ bat2Δ</i>)	0	0	0
KIWT	100	100	71
CLA34 (<i>Kibat1Δ</i>)	0	64	0
CLA34 (CEN <i>KIBAT1</i>)	90	100	85

*Values are shown relative to growth rate of the wild type strain (0.20 h⁻¹ and 0.11 h⁻¹ on NH₄⁺ and amino acids, respectively); and represent the means from three independent experiments (variation was always \leq 10%).

[†]Amino acids were supplemented at a concentration of 150 mg/l, 100 mg/l or 30 mg/l of valine (V), leucine (L) or isoleucine (I) respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0016099.t003

mutant of *S. cerevisiae* is unable to grow under these conditions suggesting that BCAAs catabolism is compelling. It could be considered that retention of the two paralogues in *S. cerevisiae* has led to efficient VIL degradation. In this regard it has been found that BCAA catabolism through Bat1 and Bat2 plays a major role in the production of higher alcohols such as isobutanol, active

amyl alcohol and isoamyl alcohol, which have a great impact on beer smell and taste in either fermento-respiratory or respiratory conditions [12,16]. Although incapacity to produce higher alcohols should not affect growth rate, the fact that either one of the two single mutants are unable to grow on ethanol-VIL, suggests that catabolism of these compounds in addition to the production of fusel alcohols could provide intermediates indispensable for growth under respiratory conditions. Since fusel alcohols are not further metabolized it could be considered that the main product contributed by BCAA catabolism could be oxidized NAD⁺ produced when fusel aldehydes are reduced to fusel alcohols through the Ehrlich pathway, however this possible role of the Ehrlich pathway remains to be analyzed [17]. Thus retention of *BAT1* and *BAT2* ensure BCAAs catabolism and growth under respiratory conditions in *S. cerevisiae*. This could have acted as a positive selection leading to *BAT1* and *BAT2* retention.

Concluding remarks

Genetic redundancy is a major feature of virtually all species; duplication of functional genes constitutes a source of new or specialized functions of the encoded proteins. Duplicate genes that are retained either provide an increased dosage of the same product or go through a process of subfunctionalization, during which both copies of the gene lose a subset of their ancestral functions, while acquiring new properties [7,8,18].

BAT1 and *BAT2* retention and acquisition of divergent expression profiles, warrants amino acid and α -ketoacid provision under fermento-respiratory and respiratory conditions. In addition, distribution of the biosynthetic and catabolic character of the BCAT in two isozymes could contribute to the avoidance of futile cycles since the independent regulation of each gene determines the presence of the pertinent isozymes under either biosynthetic or catabolic physiological conditions. The divergent physiological role played by Bat1 and Bat2 is further enhanced through differential localization; each enzyme is located in the compartment in which the pertinent substrates are produced. The fact that *KIBAT1* is mainly biosynthetic and its catabolic role is only exerted when VIL is added to the medium excludes the operation of futile cycles.

It has been proposed that the specialization of the *GDH1*- and *GDH3*-encoded NADP-dependent glutamate dehydrogenases and the *LYS20-LYS21*-encoded homocitrate synthases could result in the formation of hetero-oligomeric structures showing biochemical properties distinct from those displayed by the homo-oligomers, and which could play an important role under certain environmental conditions [4,6]. Building up of Gdh1-Gdh3 or Lys20-Lys21 hetero-oligomeric isoforms is possible since both enzymes are located in the same subcellular compartment. For Bat1 and Bat2, constitution of hetero-oligomeric isoforms would be hindered by differential localization. Since in many cases oligomerization domains are conserved in paralogous proteins, differential subcellular localization would avoid hetero-oligomerization, preventing the formation of hybrid isozymes whose biological activity could be hindered. The fact that the bifunctional role played by the ancestral-like *KIBAT1* has been distributed in Bat1 and Bat2, which could be presumed to be oligomeric enzymes [19–21] suggests that for this case, formation of hetero-oligomeric forms could hinder their biological activity, underscoring the role of enzyme relocalization on the functional diversification of duplicate genes.

This study provides an example indicating that the improvement of the functions carried out by a bifunctional gene product can be achieved through gene duplication and further subfunctionalization as has been shown to be the case for the genetic switch

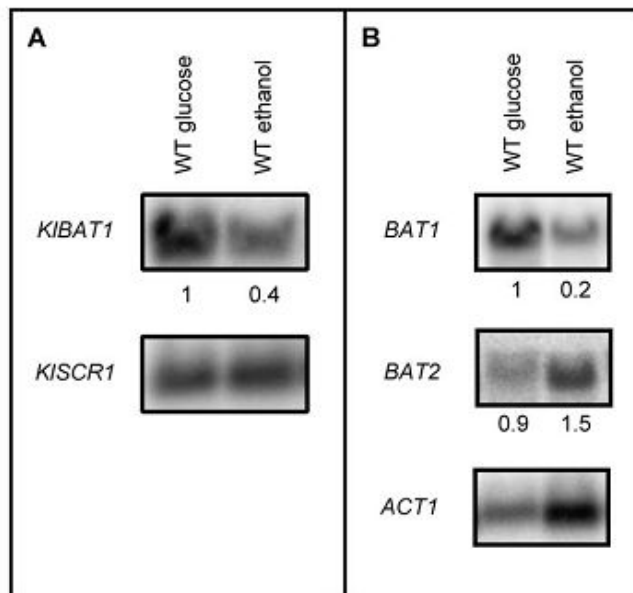


Figure 6. *BAT1* and *KIBAT1* expression is repressed under respiratory conditions. Northern analysis was carried out with total RNA samples obtained from *S. cerevisiae* WT, *bat1Δ* *BAT2* and *BAT1 bat2Δ* and *K. lactis* WT cultures grown on ammonium-glucose or ammonium-ethanol to mid exponential growth phase. Filters were sequentially probed with the *BAT1*, *BAT2*, *KIBAT1*- specific PCR products described in experimental procedures and a *Bam*H1-*Hind*III 1500 bp *ACT1* DNA or an *SCR1* 400bp PCR fragment as loading controls. Numbers indicate relative expression as compared to the WT strains grown on ammonium-glucose. Four biological replicates were performed, and representative results are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0016099.g006

controlling the yeast galactose utilization pathway. In *S. cerevisiae*, two paralogous genes encode the Gal3 co-inducer and the *GALI*-encoded galactokinase, which in *K. lactis* are contained in a single bifunctional ancestral-like gene [22].

Finally and worth mentioning is the existence in *S. cerevisiae* genome of three pairs of duplicated genes respectively encoding piruvate, aspartate and aromatic aminotransferases (*ALT1-ALT2*, *AAT1-AAT2* and *ARO8-ARO9*). *ALT1-ALT2* belong to the duplicated blocks acquired after the WGD event, while *AAT1-AAT2* and *ARO8-ARO9* correspond to independent duplication events. Thus, the described duplication and further diversification of *BAT1-BAT2* may be representative of a general mechanism through which *S. cerevisiae* has improved amino acid metabolism.

Materials and Methods

Strains

Table 4 describes the characteristics of the strains used in the present work. Independent *bat1Δ* and *bat2Δ* derivatives of the CIA1-2 (*ura3 leu2::LEU2*) [4] were obtained using the PCR-based gene replacement protocol described by Wach *et al.* [23], with *kanMX4* as a marker. Four deoxyoligonucleotides were designed respectively based on the *BAT1* (M1 and M2) or *BAT2* (M3 and M4) nucleotide sequences and that of the multiple cloning site present in the pFA6a vector [23] (oligonucleotides used for this study are described in Table S1). QIAGEN purified pFA6a DNA was used as template for PCR amplification in a Stratagene Robocycler 40 using standard amplification protocols. The obtained 1584-bp and 1586-bp PCR products respectively harboring *BAT1* or *BAT2* sequences were gel-purified and used to transform strain CIA1-2, generating strains CIA31 (*bat1Δ::kanMX4 BAT2 ura3 leu2::LEU2*) and CIA32 (*BAT1 bat2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2*).

A CIA1-2 *bat1Δ bat2Δ* derivative (CIA33) was isolated from a nourseothricin resistant derivative of the CIA31 *bat1Δ* single mutant obtained by transforming this strain with p4339 *EcoRI* digested plasmid, which bears a copy of clonNAT gene [23], that replaces the *kanMX4* module by homologous recombination, generating strain CIA31-a (*bat1Δ::natMX4 BAT2 ura3 leu2::LEU2*). A *bat2Δ* derivative was generated from CIA31-a, as described above.

To obtain a *Kibat1Δ* mutant, from the *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) orthologous *BAT1/BAT2* gene (KLLA0A10307g; *KIBAT1* in this study) *KIBAT1* was replaced by homologous recombination using a module containing the *kanMX4* cassette flanked by 95 bp of 5' UTR (−105 to −10) and 101 bp of 3' UTR (+1228 to +1329) sequences of *KIBAT1* gene. The module was amplified from pFA6a plasmid by using deoxyoligonucleotides

M5 and M6 (Table S1). The PCR product was purified by using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) and used as template for a second PCR in order to extend the homologous recombination regions. Second PCR was amplified with oligonucleotides M7 and M8 (Table S1). Yeasts were transformed by the method described by Ito *et al.* [24]. Transformants were selected for either G418 resistance (200 mg/l; Life Technologies, Inc.), or nourseothricin resistance (100 mg/l; Werner BioAgents) or both, on yeast extract-peptone-dextrose (YPD)-rich medium.

Growth conditions

Strains were routinely grown on MM containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Glucose (2%, w/v) or ethanol (2%, w/v) was used as a carbon source, and 40 mM ammonium sulfate was used as a nitrogen source. Valine (150 mg/l), leucine (100 mg/l), isoleucine (30 mg/l), adenine (20 mg/l), histidine (20 mg/l) or uracil (20 mg/l) were added at the indicated final concentrations when required. 7 mM glutamine or GABA were supplemented when needed. Cells were incubated at 30°C with shaking (250 rpm).

Construction of low copy number plasmids bearing *BAT1*, *BAT2* or *KIBAT1* genes

All standard molecular biology techniques were followed as described by Sambrook *et al.* [25]. *BAT1* or *BAT2* were PCR-amplified together with their 5' promoter sequence and cloned into the pRS416 (*CEN6 ARSH4 URA3*) low-copy-number plasmid [26,27]. For *BAT1*, a 2315 bp region between −1080 from the start codon and +293 from the stop codon was amplified with deoxyoligonucleotides M9 and M10 (Table S1) generating plasmids pRS416-*BAT1* and pRS426-*BAT1*. For *BAT2*, a 1681 bp region between −471 from the start codon and +79 from the stop codon was amplified with deoxyoligonucleotides M11 and M12 generating plasmids pRS416-*BAT2* and pRS426-*BAT2*. For *KIBAT1* a 1791 bp region between −500 from the start codon and +67 from the stop codon was amplified with deoxyoligonucleotides M13 and M14 (Table S1) The PCR fragment was then cloned into YEpKD352 (pKD1 ori *URA3*) plasmid (kindly provided by Dr. Roberto Coria) or pRS416 (*CEN6 ARSH4 URA3*) plasmid generating YEpKD352-*KIBAT1* and pRS416-*KIBAT1* respectively. DNA sequencing was carried out, using the T3/T7 priming sites of pRS316 and pRS426, at the Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Plasmids were subsequently transformed into CIA1-2 and isogenic *bat1Δ* and *bat2Δ* single mutants and *bat1Δ bat2Δ* double mutant or *K. lactis* wild type strain and *Kibat1Δ* mutant.

Construction of *BAT1* and *BAT2* chimerical fusion plasmids

Fusions containing either the *BAT1* promoter and the *KIBAT1* coding sequence or the *BAT2* promoter and the *KIBAT1* coding sequence were generated by overlapping PCR amplification. For this purpose, primers M9 and M15 were used to obtain a 1092 bp product corresponding to the *BAT1* promoter sequence and the first 29 bp of the *KIBAT1* coding sequence; this was overlapped with the 1303 bp product of primers M16 and M14, which included the complete *KIBAT1* coding sequence. Similarly, primers M11 and M17 were used to obtain a 483 bp product corresponding to the *BAT2* promoter sequence, together with the first 29 bp of the *KIBAT1* coding sequence, and overlapped with the 1303-bp product of primers M16 and M14, which included

Table 4. Strains used in this work.

Strain	Relevant phenotype	Source
CIA1-2	<i>MATx BAT1 BAT2 ura3 leu2::LEU2</i>	[4]
CIA31	<i>MATx bat1Δ::kanMX4 BAT2 ura3 leu2::LEU2</i>	This study
CIA32	<i>MATx BAT1 bat2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	This study
CIA33	<i>MATx bat1Δ::NAT bat2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	This study
<i>Kluyveromyces lactis</i> 155	<i>MATx ade2 his3 ura3</i>	[37]
CIA34	<i>K. lactis</i> 155 <i>Kibat1Δ::kanMX4</i>	This study

doi:10.1371/journal.pone.0016099.t004

the complete *KIBAT1* coding sequence. The modules obtained were cloned into the pRS416 plasmid, thus generating pRS416 *P_{BAT1}-KIBAT1* and pRS416 *P_{BAT2}-KIBAT1* plasmids. These plasmids were subsequently transformed into the CIA1-2 and isogenic *bat1Δ* and *bat2Δ* single mutants and *bat1Δ bat2Δ* double mutant.

Construction of *BAT1* and *BAT2* β-galactosidase fusion plasmids

Transcriptional fusions of *BAT1* or *BAT2* promoters to the coding region of *lacZ* gene of *Escherichia coli* were generated by cloning the promoter regions into the YEp353 (2μ ori *URA3*) plasmid [28]. M9 and M18 deoxyoligonucleotides were used to amplify a 1122 bp sequence corresponding to the *BAT1* promoter and M11 and M19 deoxyoligonucleotides were used to amplify a 510 bp region corresponding to the *BAT2* promoter. Plasmids generated were YEp353 *P_{BAT1}* and YEp353 *P_{BAT2}*. These plasmids were transformed in CIA1-2 wild type strain.

Construction of *BAT1* and *BAT2* yECitrine tagged mutants

BAT1-yCE and *BAT2*-yCE were prepared as described by Longtine *et al.* [29]. Two pairs of oligonucleotides were designed, based on either the *BAT1* (M20-M21) or *BAT2* (M22-M23) coding sequence and that of pKT175 deoxyoligonucleotides were used to amplify four PCR fragments, plasmids generated were transformed into the BY4741 yeast strain (Table 4). yECitrine-fusion constructs on the carboxy-end of either *BAT1* or *BAT2* was carried out as previously described [29], and PCR confirmed.

Fluorescent microscopy

Bat1-yECitrine and *Bat2*-yECitrine tagged strains were used to assess these proteins subcellular localization through confocal microscopy. To confirm mitochondrial localization the strain *Bat1*-yECitrine was stained with Mito-Tracker Red CMXRos (Molecular Probes) according to manufacturers specifications. Colocalization between the Mito-Tracker and yECitrine was determined through sequential imaging. Confocal images were obtained using a FluoView FV1000 laser confocal system (Olympus) attached/interfaced to an Olympus IX81 inverted light microscope with a 60× oil-immersion objective (UPLSAPO 60× O NA:1.35), zoom ×20.0 and 3.5 μm of confocal aperture. The excitation and emission settings were as follows: yECitrine excitation at 488 nm; emission 520 nm BF 500 nm range 30 nm; Mito-Tracker excitation 543 nm; emission 598 nm, BF 555 nm range 100 nm. The images were collected in a sequential mode z-stack (5μm/slice) using a Kalman integration mode. The subsequent image processing was carried with Olympus FluoView FV1000 (version 1.7) software.

Cell extract preparation

Cell extracts were prepared using a modified protocol from Rigaut *et al.* [30] and the NCRR Yeast Resource Center. Briefly, a 2 l yeast culture was grown to exponential phase in YPD, cells were collected by centrifugation at 4°C, pellets were washed with bi-distilled cold water and then with cold NP-40 buffer (Na₂HPO₄ 15 mM, NaH₂PO₄-H₂O 10 mM, NP-40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 80 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, DTT 1 mM, BSA 0.1%, PMSF 1mM, pH 7.2). Cells are collected by centrifugation, suspended in 15–20 ml of NP-40 buffer and transferred to the 50 ml chamber of a bead beater. The same volume of glass beads was added to the suspended cells. Cells were then lysed in an iced bath with 7 cycles of 1 min on/1 min off, with a 5 min off period half-way through. Lysate was transferred to 50 ml Falcon tubes

and clarified at 3,000 rpm for 10 min in a refrigerated centrifuge. The supernatant was collected and enzymatic activity was determined immediately.

Branch chain aminotransferase enzymatic assay and protein determination

A previously described assay [31], coupled branch chain aminotransferase activity to NAD(P)H oxidation catalyzed by NAD(P)H Glutamate Dehydrogenase (GDH). However, under our experimental conditions NADP-GDH was able to use the branched-chain α-ketoacids as substrates, thus uncoupling the NAD(P)H oxidation from the branched-amino acid transaminase activity. An alternative method to measure branched-amino acid transaminase activity using the multienzyme α-ketoglutarate dehydrogenase complex from porcine heart (α-KGDH), was developed. *Bat1* and *Bat2* enzymes use the branched-chain α-ketoacids (BCKA) and glutamic acid as substrates to produce branched chain amino acids (BCAA) and α-ketoglutarate (α-KG), using pyridoxal 5'-phosphate (PP) as cofactor. Then, the (α-KG) produced can be used as substrate, along with Coenzyme A (CoA) and NAD⁺ by α-KGDH producing succinyl-CoA and CO₂ thus reducing the NAD⁺ to NADH. NAD⁺ reduction was monitored measuring Absorbance at 340 nm along the time. The final volume of the assay was 1 ml containing 50 mM MOPS pH 7.1, 1 mM DTT, 0.1 mM CaCl₂, 0.47 MgCl₂, 1 mM thiamine pyrophosphate (C8754, SIGMA), 0.25 mM CoA (C4780, SIGMA), 0.25 mM pyridoxal 5'-phosphate (P9255, SIGMA), 0.25 U α-KGDH (K1502, SIGMA), 1 mM NAD⁺ (N7004, SIGMA), 5 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and variable concentrations of BCKA and glutamic acid (G1501, SIGMA). The reaction was started with the addition of crude cell extracts. All assays were carried out at 30°C in a Varian Cary 400 spectrophotometer with a 1 cm path length. BCKA used in this assay were: α-Ketoisocaproic acid sodium salt (α-KIC; K0629, SIGMA), DL-α-Keto-β-methylvaleric acid sodium salt (α-KMV; K7125, SIGMA) and Sodium methyl valerate (α-KIV; 151395, ICN).

β-galactosidase activity determination

Soluble extracts were prepared by resuspending whole cells in the corresponding extraction buffer [32], cells were lysed with glass beads. β-galactosidase (β-Gal) activities were determined as previously described [33,34]. Specific activity was expressed as nmoles of *o*-nitrophenol produced per minute per milligram of protein. Protein was measured by the method of Lowry [35] using bovine serum albumin as a standard.

Northern blot analysis

Northern analysis was carried out as described previously [34]. Total yeast RNA was prepared as described by Struhl & Davis [36] from exponentially grown cells (OD₆₀₀ 0.4–0.6) or stationary grown cells (3–5 days) in 100 ml cultures. *BAT1*, *BAT2* and *KIBAT1* probes were amplified using M24 and M10, M25 and M26, and M16 and M27 deoxyoligonucleotides. *BAT1*, *BAT2* and *KIBAT1*. Probes include the whole coding region and promoter of each gene. Blots were scanned using the program ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics). Either a 473 bp *AISCR1* fragment amplified on *K. lactis* genomic DNA preparation, using deoxyoligonucleotides M28 and M29 or a 1200 bp *ACT1* fragment were used as loading controls.

Supporting Information

Table S1 Deoxyoligonucleotides used in this study. (DOC)

Acknowledgments

Authors are grateful to L. Ongay, G. Códiz and M. Cabrera (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for oligonucleotide synthesis. Authors acknowledge Armando Gómez-Puyou for helpful discussions and critical review of the manuscript. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of MC at the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, et al. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature* 387: 7–65.
- Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708–713.
- Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–624.
- DeLuna A, Avendaño A, Riego I, Gonzalez A (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276: 43775–43783.
- Avendaño A, Riego I, DeLuna A, Aranda C, Romero G, et al. (2005) Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodeling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 57: 291–305.
- Quezada H, Aranda C, DeLuna A, Hernandez H, Calcagno ML, et al. (2008) Specialization of the paralogous *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154: 1656–1667.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, et al. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531–1545.
- Hughes AL (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci* 256: 119–124.
- Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* 271: 24458–24464.
- Lilly M, Bauer FF, Styger G, Lambrechts MG, Pretorius IS (2006) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res* 6: 726–743.
- Taylor EJ, Campbell SG, Griffiths CD, Reid PJ, Slaven JW, et al. Fusel alcohols regulate translation initiation by inhibiting eIF2B to reduce ternary complex in a mechanism that may involve altering the integrity and dynamics of the eIF2B body. *Mol Biol Cell* 21: 2202–2216.
- Schoondermark-Stolk SA, Taberner M, Chapman J, Ter Schure EG, Verrips CT, et al. (2005) Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Res* 5: 757–766.
- Ryan ED, Tracy JW, Kohlhaw GB (1973) Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J Bacteriol* 116: 222–225.
- Beltzer JP, Morris SR, Kohlhaw GB (1988) Yeast *LEU4* encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase. *J Biol Chem* 263: 368–374.
- Breunig KD, Bolotin-Fukuhara M, Bianchi MM, Bourgaire D, Falcone C, et al. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb Technol* 26: 771–780.
- Eden A, Van Nederveelde L, Drukker M, Benvenisty N, Dehoug A (2001) Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 296–300.
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74: 2259–2266.
- Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459–473.
- Lee-Peng FC, Hermodson MA, Kohlhaw GB (1979) Transaminase B from *Escherichia coli*: quaternary structure, amino-terminal sequence, substrate specificity, and absence of a separate valine-alpha-ketoglutarate activity. *J Bacteriol* 139: 339–345.
- Okada K, Hirotsu K, Hayashi H, Kagamiyama H (2001) Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: induced fit and substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry* 40: 7453–7463.
- Yennawar N, Dunbar J, Conway M, Hutson S, Farber G (2001) The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 506–515.
- Hittinger CT, Carroll SB (2007) Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449: 677–681.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793–1808.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163–168.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119–122.
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27.
- Myers AM, Tzagoloff A, Kinney DM, Lusty CJ (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* 45: 299–310.
- Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, et al. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030–1032.
- Prohl C, Kispal G, Lill R (2000) Branched-chain-amino-acid transaminases of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 324: 365–375.
- Cogoni C, Valenzuela I, Gonzalez-Halphen D, Olivera H, Macino G, et al. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* 177: 792–798.
- Valenzuela I, Ballario P, Aranda C, Filetici P, Gonzalez A (1998) Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180: 3533–3540.
- Valenzuela I, Aranda C, Gonzalez A (2001) TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* 183: 2331–2334.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
- Struhl K, Davis RW (1981) Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152: 535–552.
- Navarro-Olmos R, Kawasaki I, Dominguez-Ramirez L, Ongay-Larios L, Perez-Molina R, et al. (2010) The beta subunit of the heterotrimeric G protein triggers the *Kluyveromyces fragilis* pheromone response pathway in the absence of the gamma subunit. *Mol Biol Cell* 21: 489–498.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC HQ AG. Performed the experiments: MC FH KI JG GI CA. Analyzed the data: MC HQ AG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AG. Wrote the manuscript: AG MC.

9.2. Artículo II

Algunos de los resultados publicados en el siguiente artículo, se obtuvieron durante una estancia de investigación en el *Bauer Center for Genomics Research* de la Universidad de Harvard en el laboratorio del Dr. Roy Kishony, durante el periodo de Julio a Noviembre del 2005. Los resultados obtenidos durante esta estancia se describen en el Anexo II.

Exposing the fitness contribution of duplicated genes

Alexander DeLuna¹, Kalin Vetsigian¹, Noam Shores¹, Matthew Hegreness¹, Maritri Colón-González¹, Sharon Chao¹ & Roy Kishony^{1,2}

Duplicate genes from the whole-genome duplication (WGD) in yeast are often dispensable—removing one copy has little or no phenotypic consequence^{1,2}. It is unknown, however, whether such dispensability reflects insignificance of the ancestral function or compensation from paralogs^{3–7}. Here, using precise competition-based measurements of the fitness cost of single and double deletions, we estimate the exposed fitness contribution of WGD duplicate genes in metabolism and bound the importance of their ancestral pre-duplication function. We find that the functional overlap between paralogs sufficiently explains the apparent dispensability of individual WGD genes. Furthermore, the lower bound on the fitness value of the ancestral function, which is estimated by the degree of synergistic epistasis, is at least as large as the average fitness cost of deleting single non-WGD genes. These results suggest that most metabolic functions encoded by WGD genes are important today and were also important at the time of duplication.

Although several inferences of the extent and mechanisms of paralogous compensation have been suggested^{1,3–7}, direct measurements through double deletions of duplicate genes have not been done. The functional overlap between members of duplicate pairs manifests as deviations of the fitness cost of double deletions from the additive expectation based on the effects of single deletions^{8–11} (Fig. 1). Measuring such synergistic epistasis between paralogs could therefore be used to estimate the fitness contribution of the overlapping function. Because this overlapping functionality masks the fitness consequence of deleting a single gene, we define the ‘exposed’ fitness contribution of a gene as the fitness effect of its deletion in the absence of its paralog. Further, by considering processes of functional gain and loss, the present-day synergy and the estimate of deleting both pair members can be used to estimate lower and upper bounds on the importance of the ancestral duplicated function.

To examine the phenotypic consequence of single and double deletions systematically, we developed a sensitive parallel technique for determining the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion strains (Fig. 2). The method is based on a competition assay between strains labeled with two different variants of the green fluorescent protein—YFP (yellow fluorescent protein) and CFP (cyan fluorescent

protein)—and provides precise measurements of relative fitness. Mutant and wild-type strains are grown in mixed cultures for ~50 generations through daily serial transfers, and the rate of change in genotype frequencies is estimated by bulk measurements of YFP and CFP fluorescence¹². This rate of change gives the selection coefficient s , and so the fitness of the particular deletion strain, W , relative to the wild-type fitness, W_ϕ , is given by $W/W_\phi = 1 - s$ (see **Supplementary Methods** online). Tag-swap experiments are done to control for variation in competition assays and in the construction of strains (**Supplementary Fig. 1** online). The sensitivity of our measurement allowed us to identify fitness effects of ~1%, which are too small to be detected by conventional measurements, but which are nonetheless evolutionary significant (large in comparison to the reciprocal of yeast effective population sizes)¹³.

We concentrated our experimental analysis on genes related to metabolism, which provide a comprehensive model system for

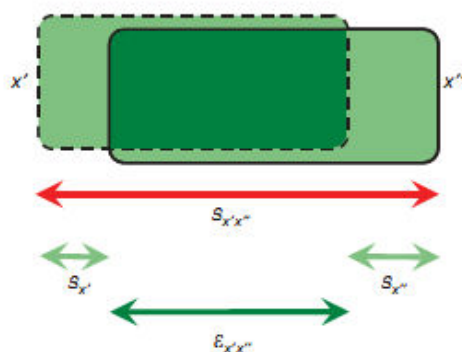


Figure 1 Measuring the extent of paralogous compensation. The rectangles symbolize the functions of two paralogous genes x' and x'' . The fitness cost of a deletion is represented by the area of the corresponding function. When a member of the gene pair is deleted, the part of its function that is shared by the paralog is not lost, and the fitness cost ($s_{x'}$ or $s_{x''}$) reflects only the contribution of the non-overlapping part. When both genes are deleted, the functional loss is represented by the union of the rectangles, and the corresponding fitness cost, $s_{x'x''}$, is indicated. The overlapping area (dark green) is the source of synergistic epistasis ($E_{x'x''}$) between the genes. The relation $E_{x'x''} = s_{x'x''} - s_{x'} - s_{x''}$, implied by the figure, holds when the fitness effects are small.

¹Department of Systems Biology, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115, USA. ²School of Engineering and Applied Sciences, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA. Correspondence should be addressed to R.K. (roy_kishony@hms.harvard.edu).

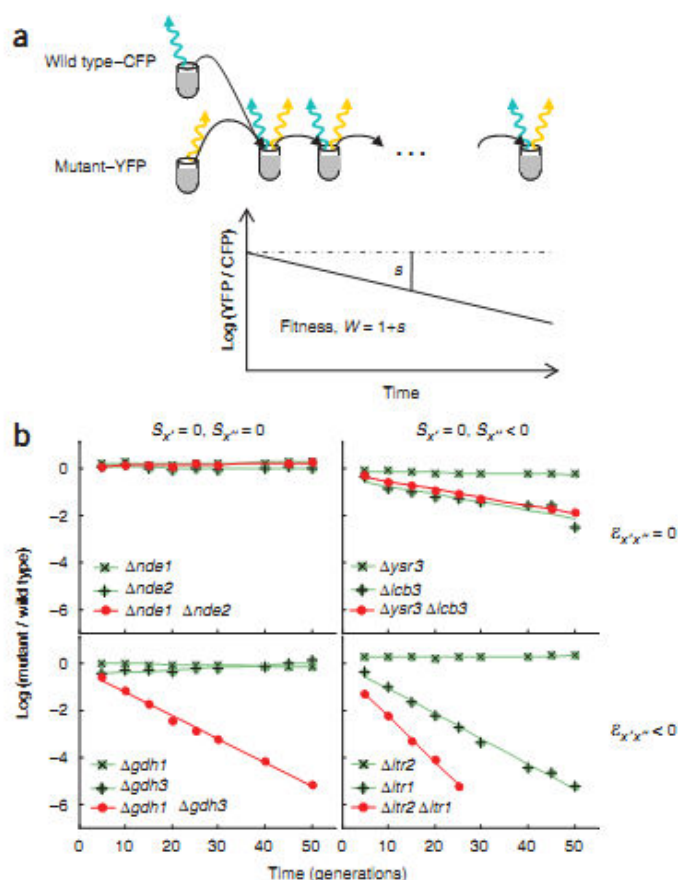


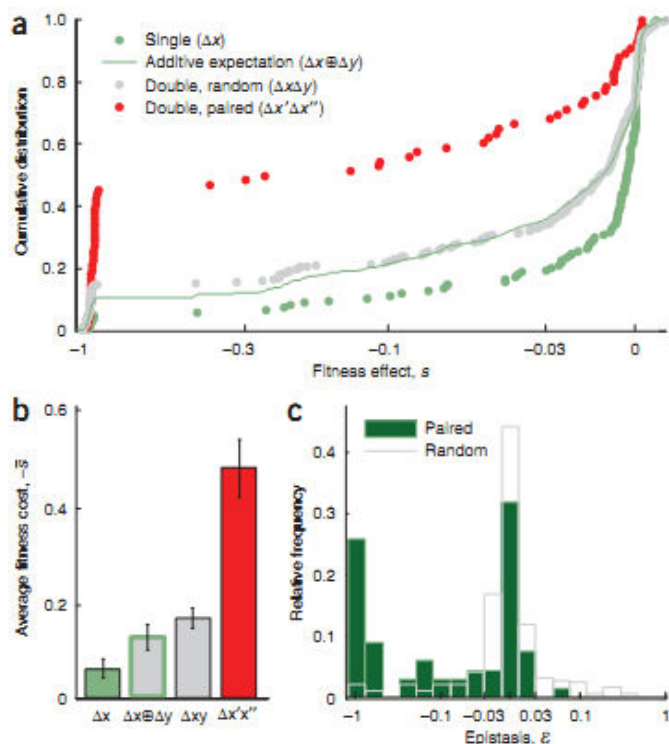
Figure 2 Competition-based high-resolution fitness profiling of single and double deletions. (a) Sensitive detection of the selection coefficient s of a given mutant relative to a neutral reference (wild type) is achieved by monitoring the rate of change of the population ratio of the two strains. Differential tagging of the two competing populations with CFP and YFP allows automated detection of the population ratio over several cycles of serial dilution. (b) Representative measurements of four WGD gene pairs, showing the ratios between the reference strain and each of the two single deletions ($\Delta x'$ and $\Delta x''$, green circles with cross and plus signs, respectively) as well as the double deletion ($\Delta x' \Delta x''$, red circles). Also shown is the linear least-squares fit of the log ratio of mutant to reference for each competition. The selection coefficient s is defined by the slopes of these fits. Synergistic epistasis whereby the double deletion has a higher fitness cost (more negative selection coefficient) than expected from the independent effects of the single deletions ($\varepsilon < 0$ in bottom panels) is indicative of paralogous compensation and functional overlap.

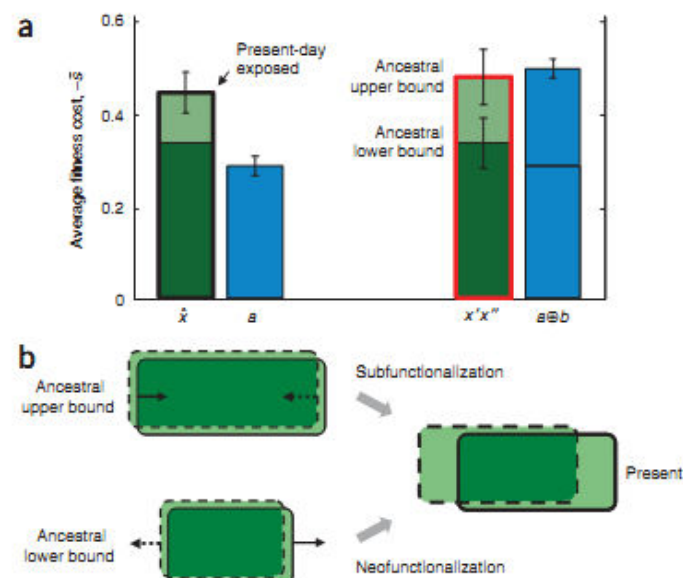
of the single deletions or the cost of deleting two unrelated WGD genes (Fig. 3a,b). The difference between the fitness of the double-deletion strain and the additive expectation yields the degree of epistasis, $\varepsilon_{x'x''} = W_{x'x''} - W_x W_{x''}$ (refs. 9–11; see also Methods). The data showed a notably high occurrence of synergistic epistasis ($\varepsilon < 0$) between WGD genes and their paralogs: 55% of the pairs showed synergistic epistasis, which is much above the level suggested by genome-wide measurements of genetic interactions^{8,9}, or even that among genes with closely related functions^{10,11}. In contrast, the data from our control set of randomly paired double deletions showed zero average epistasis (Fig. 3c), and their combined effect was fully predictable by adding their individual effects (agreement between the additive expectation and the measured random pairs in Figure 3a). These results confirm that the synergistic interactions that we found are not generic among the set of WGD metabolic genes; rather, the synergy is specific to paralogous pairing (Fig. 3c). Such synergy shows that the small fitness cost of deleting a WGD gene is only the tip of the iceberg: when a gene is deleted, most of the function

estimating the contribution of paralogs to mutational robustness^{4,6,14,15}. We determined the fitness of most single deletions (557) out of the set of all metabolic genes (624). Included in this collection were deletions of 132 out of 144 genes that have duplicates originating from the WGD in yeast^{16,17}. Combining deletions of these genes, we constructed and phenotyped 66 double deletions of paralogous pairs, as well as 298 strains in which the deleted WGD genes were paired at random. To increase the chance of revealing the phenotypic consequence of deletion of metabolic genes, we grew and assayed all strains in a nutrient-poor medium (see Methods). Our definition of fitness was restricted to this laboratory environment.

Although the fitness cost of deleting single WGD genes is typically small (in agreement with previous observations^{1,2}), we found that the effect of deleting a paralogous pair is much larger than the added costs

Figure 3 Dispensability of WGD genes is explained by paralogous compensation. (a,b) Cumulative distributions of fitness effects (a) and average fitness cost and standard error (b) of single deletions of WGD genes ('Single', $n = 132$); the combined additive effects of two random (nonparalogous) single deletions of WGD genes $s_{x\&y} \equiv (1+s_x)(1+s_y) - 1$ (green line, 'Additive expectation'); double deletions of randomly paired WGD genes (gray circles, 'Double, random', $n = 277$); and double deletions of paralogous pairs of WGD genes (red circles, 'Double, paired', $n = 66$). The distribution of fitness effects of the paired double deletions is significantly different from that of the additive expectation ($P < 10^{-6}$, Kolmogorov-Smirnov test). Data points at $s = -1$ have been slightly offset to distinguish between the overlaid curves. For better illustration of both strong and mild effects, the horizontal axis is shown on a log scale for $s < -0.03$. (c) Distribution of epistasis effects (ε) for paralogous pairs ($\Delta x' \Delta x''$, dark green line) and random pairs ($\Delta x \Delta y$, gray bars) of WGD genes.





it encodes is maintained by its paralog, and thus the large fitness cost of losing that function is hidden by paralogous compensation.

To isolate the fitness cost of losing the function encoded by a gene from the masking effects of paralogous compensation, we defined the exposed fitness of a gene as the fitness effect of its deletion in the absence of its paralog: $\hat{W}_x \equiv W_{xx'}/W_{x'}$. For small fitness effects, the exposed fitness of a gene approximately equals the sum of the cost of its deletion and the synergy with its paralog ($\hat{s}_x = \hat{W}_x - 1 \cong s_x + e_{xx'}$). We found that the average exposed fitness contribution of single WGD genes is larger than that of non-WGD genes in metabolism (Fig. 4a, *t*-test, $P < 10^{-3}$; see Supplementary Fig. 2 for cumulative distributions and statistical tests).

The starting point for every WGD gene pair is its ancestral form. Since the yeast whole-genome duplication, the fitness contribution of each gene has shifted as a result of neo- and subfunctionalization^{18–20}. In neofunctionalization, new functions are acquired by either one of the pair members, increasing their combined fitness contribution. In subfunctionalization, on the other hand, partial loss of function by either one of the genes causes the fitness importance of the shared functions to shrink. It follows that the fitness contribution of the ancestral function is bounded from below by the inferred present-day fitness cost of deleting the shared functionality (as given by the epistasis) and from above by the cost of deleting both genes (Fig. 4b). These bounds, which provide an approximation of the fitness contribution of the ancestral function, depend on the implicit assumption that no functionality was jointly lost or jointly gained by the members of a paralogous pair. The lower and upper bounds that the data place on the fitness contribution of the pre-duplication genes are shown in Figure 4a. If neofunctionalization is the dominant process of functional divergence, then the ancestral function would be set at the lower bound, which we found to be roughly equal to the average fitness contribution of existing non-WGD metabolic genes. In contrast, if the main process is subfunctionalization, the ancestral function, approximated by the combined effect of the double deletion, would have a fitness contribution similar to the average additive effect of two random non-WGD genes (Fig. 4a, bar labeled $a \oplus b$). In either case, our bounds show that the ancestral metabolic function is at least as important as the function of a typical single non-WGD metabolic gene.

Figure 4 Exposed fitness of duplicated genes and bounds on fitness contribution of ancestral function. **(a)** Left: the average exposed fitness contribution of single WGD genes (\hat{x} , light and dark green bar, with the dark green area denoting only the contribution of the functional overlap, a) is larger than the fitness cost of deleting an average non-WGD gene (a , blue bar). *t*-test: $P = 0.004$. Kolmogorov-Smirnov test for identical distributions: $P < 10^{-4}$; \hat{x} is calculated as calculated as the average of $\hat{s}_x = \frac{1+s_{xx'}}{1+s_x} - 1$. Right: the average cost of deleting a pair of WGD paralogs sets the upper bound on the ancestral function (total height of bar labeled $x'x''$), whereas the epistasis (dark green) sets the lower bound. The upper bound is close to the additive effect of two random non-WGD genes (blue bar, $a \oplus b$). Error bars, s.e.m. **(b)** The non-overlapping functionality of paralogous pairs is generated by two processes: subfunctionalization and neofunctionalization. If only the former takes place, each of the genes loses some of its original function, and the importance of the full original function can be seen by the effect of the double deletion ('Ancestral upper bound'). On the other hand, if new functions are the source of the differences between the pair members, the fitness contribution of the original function is equal to the functional overlap ('Ancestral lower bound').

This conceptual framework can be used to contrast different functional categories and shed light on the factors determining the evolutionary fate of duplicated genes. We found that duplicate genes in the pathways for carbohydrate or amino acid metabolism participate in more crucial roles than their non-WGD counterparts, while WGD genes in lipid or nucleotide metabolism are as important as non-duplicate genes in the same categories (Supplementary Fig. 3 online). Indeed, it has been suggested that genes with important glycolytic functions were preferentially retained after the WGD in yeast^{21,22}. In addition, we compared the exposed fitness contribution of WGD genes that have other paralogs originating in smaller-scale duplication (SSD)²³ to those that have no duplicate besides their WGD paralog. SSD paralogs seem to have a much larger relative contribution to compensation of phenotypes for functions not encoded by WGD genes (Supplementary Fig. 3). The preferential enrichment for

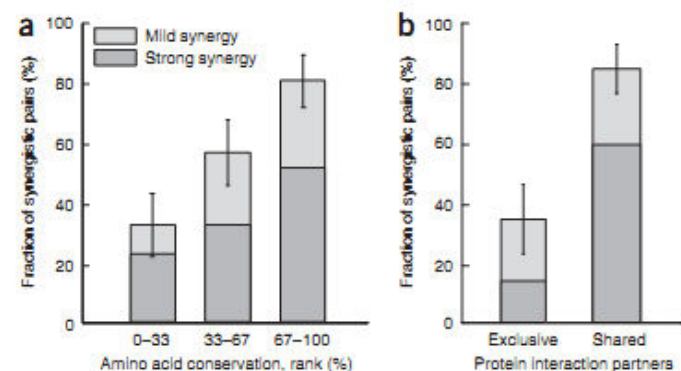


Figure 5 Synergistic epistasis between WGD pairs correlates with conservation of amino acid sequence and protein interaction partners. **(a,b)** Fraction of synergistic WGD pairs as a function of their amino acid conservation **(a)**, rank of $1/K_A$ and divergence in their protein interaction pattern **(b)**, 'exclusive', $n = 17$, no shared interaction partners; and 'shared', $n = 20$, with at least one shared interaction partner). K_A data are from the Yeast Gene Order Browser (see URLs section in Methods). Analysis in **b** is restricted to pairs that interact with four or more proteins. Data are from the Database of Interacting Proteins (see URLs section in Methods). The analysis was repeated using the literature-curated protein interaction data (see URLs section in Methods); the correlation between synergy and protein interaction divergence is also significant in this database ($P = 0.041$, Probit regression). Synergistic pairs are separated based on the strength of the epistatic interaction (mild synergy, light gray bars, $-0.5 \leq \alpha < -0.03$; strong synergy, dark gray bars, $\alpha < -0.5$). Error bars, s.e.m.

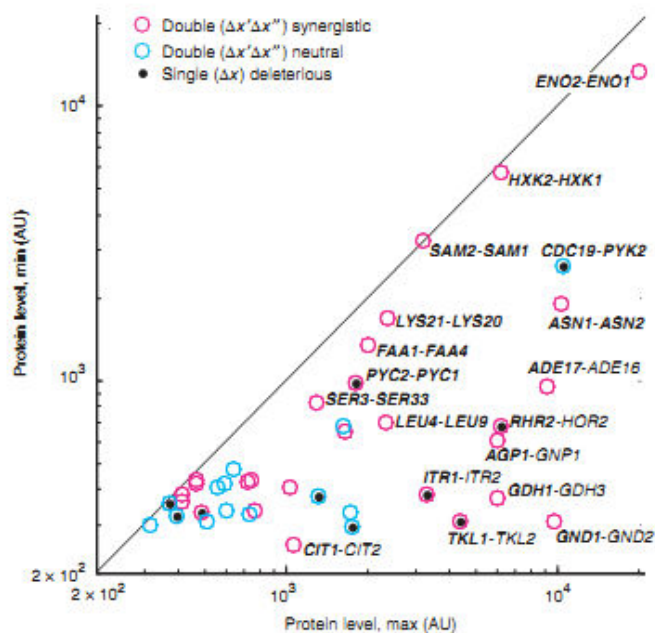


Figure 6 High occurrence of synergy between WGD gene pairs with at least one highly expressed member. Each circle represents the protein abundance of a duplicate pair measured as average fluorescence signal of GFP fusion to the individual pair members. For each pair, the higher signal is shown on the x axis. Phenotypic deletion data are noted for gene pairs with an indispensable member (black dot, single deleterious, $s < -0.03$), and for level of epistasis (synergy, magenta circles, $s < -0.03$; and no epistasis, cyan circles, $s \geq -0.03$). Gene names are shown for gene pairs with at least one highly expressed member (signal $> 10^3$); boldface for both genes indicates correlation in high expression, whereas boldface-plain font indicates differential expression.

magenta-labeled pairs). High expression of the two members of a duplicate pair could suggest dosage amplification as the factor determining their retention^{2,4,21,22}. Indeed, several pairs of duplicates showed high expression in our study and are strongly deleterious when doubly deleted (Fig. 6, bold-bold labels). Note, however, that only one gene (*PYC1*) among these highly expressed pairs has a significant fitness effect when singly deleted. In addition, we observed synergistic epistasis within gene pairs with strong differential expression (Fig. 6, bold-unbold labels). For example, gene pairs like *GDH1-GDH3* interact synergistically (Fig. 2b), despite their different regulation and the unique biochemical properties of the glutamate dehydrogenase isoenzymes they encode³⁰.

The indispensability of functions encoded by duplicate genes in metabolism is obscured by the functional compensation that has persisted between WGD paralogs through 100 million years of evolution. Despite the small fitness cost associated with the deletion of individual WGD genes, their exposed fitness contribution is, on average, larger than (or, in certain gene subsets, at least equal to) the effect of single deletion of non-WGD metabolic genes. In addition, we have provided a novel method for inferring the fitness contribution of the ancestral, pre-duplication function by using the intersection and union of present-day functions of pair members as lower and upper bounds. These measurements address the question of whether less important genes are more likely to retain their duplicates, demonstrating that, at least as far as WGD gene pairs in metabolism are concerned, the average fitness contribution of an ancestral gene is no less than that of a non-WGD gene. Our method could also be applied to directly estimate the ancestral importance of other sets of paralogs⁷; in particular, different results could be expected for paralogs retained after smaller-scale duplication events²³. Although the concepts presented here do not presume to capture the full complexity of biological function, regulatory feedback mechanisms or selection in a changing environment, we have shown that they can lead to useful insights. The exposed fitness and the ancestral bounds were obtained separately for each pair and can be used for elucidating the importance and evolutionary history of individual genes as well as for comparing and contrasting duplicates in different classes of genes. Using this approach, we find substantial differences in the functional fate of paralog pairs among different metabolic pathways. These methods are general and could be applied to additional gene sets, environments and species. The ability to estimate the exposed fitness and bound the importance of the ancestral function of duplicated genes may be a key to understanding the evolutionary fate and adaptive role of genetic redundancy.

METHODS

Strains, plasmids and media. We transformed yeast strain Y7092 (*MAT α can1 Δ ::STE2pr-SP_his5 lyp1 Δ his3 Δ 1 leu2 Δ 0 ura3 Δ 0 met15 Δ 0*) by PCR-based gene replacement of the neutral *HO* locus with the YFP (yVenus) or CFP

neutrality in non-WGD genes with SSD paralogs, but not in WGD pairs with SSD paralogs, seems to explain much of the difference between the exposed fitness value of WGD genes in metabolism and the fitness contribution of their non-WGD counterparts.

To explore the basis of paralogous compensation, we considered the relation among synergy, sequence and function. If synergistic epistasis between paralogs reflects direct genetic compensation through shared biochemical functions, then it should be correlated with amino acid divergence¹ as well as with functional attributes such as protein-protein interactions²⁴. Indeed, we found a significant correlation between the frequency of synergistic WGD pairs and the conservation of their amino acid sequences (Fig. 5a; $P < 10^{-3}$, Probit regression). Similarly, we observed an enrichment of synergy between WGD gene pairs sharing protein-protein interaction partners (Fig. 5b; $P = 0.002$, Probit regression). We note that the correlations of synergy with amino acid and protein interaction divergence are not strictly independent, as both these attributes are themselves correlated²⁵; nevertheless, the correlation between epistasis and protein interaction divergence remained significant after subtraction of the effects of amino acid divergence ($P = 0.009$, partial correlation). Many of the duplicate genes we addressed encode isoenzymes catalyzing the same enzymatic reaction²⁶; the synergy we measured merely reflects the lack of alternative genetic compensation for these reactions⁶. Nevertheless, paralogous compensation is maintained even among several WGD genes encoding enzymes that have significantly diverged in amino acid sequence (Fig. 5a) or that are not known to share common protein interactions (Fig. 5b). These phenotypic observations are consistent with the notion that duplicate genes may be only partially redundant and yet maintain the ability to compensate for each other's loss^{27,28}.

To relate the strength of synergy between paralogs to their activity in our growth environment, we measured expression for 99 WGD genes (see Methods). Using a library of yeast strains with proteins fused to the green fluorescent protein (GFP)²⁹, we measured the protein abundances of WGD genes in wild-type cells growing in our competition media (Fig. 6 and Supplementary Fig. 4 online). We observed strong correlation between expression and synergy ($P = 0.002$, Fisher's exact test)—virtually all gene pairs for which at least one of the proteins was present at high levels were synergistic (Fig. 6,

(yECerulean) *natMX4* modules conferring resistance to nourseothricin; constitutive expression of fluorescent proteins is driven by the *TDH3* promoter. We used the resulting strains, Y7092-YFP and Y7092-CFP, for large-scale tagging of deletion strains. Competition medium was minimal low-fluorescence synthetic medium with 2% glucose, 2% proline as a nitrogen source, and methionine (25 mg/l), leucine (120 mg/l) and uracil (20 mg/l) supplements.

Large-scale tagging of single-deletion strains. Starter strains Y7092-YFP and Y7092-CFP were mated to 521 strains from the BY4741 yeast deletion collection (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 xxxΔ::kanR*) using synthetic genetic array (SGA) technology⁸ (200 μg/ml geneticin, 100 μg/ml nourseothricin; colony arrays were transferred manually with a 384-head pin tool, V&P Scientific). We successfully tagged 454 (87%) of the strains. The average tagging efficiencies of single deletions of WGD and nonduplicate genes were the same, despite the lower average fitness of the former; suggesting that the strains missing in our single-deletion collection were not significantly biased to slow-growing strains. The collection of single deletions is described in **Supplementary Table 1** online.

Construction of double-deletion strains and synthetic lethal screen. We used starter Y7092-YFP and Y7092-CFP strains to construct two sets (YFP and CFP) of WGD-deletion starter strains by direct PCR-based replacement, using the *CaURA3-MX4* cassette, of one gene of each of the 72 WGD pairs. In addition, 72 target WGD-deletion strains, paralogs of the deletion starter strains, were generated *de novo* by direct transformation of BY4741 with the *kanMX4* cassette (pairs of WGD taken from a previous study¹⁷). The deletion starter array was mated to the target array using SGA⁸; double deletions were selected in synthetic complete medium minus uracil plus geneticin and nourseothricin. We constructed isogenic single-deletion references by mating the starter and the target arrays to neutral *his3Δ::kanR* and *his3Δ::URA3* deletion strains. To allow for generation of a nonconstrained set of random double knockouts, we expanded the target array to include the whole set of 144 WGD deletions. Each YFP-tagged starter strain was then mated with four to six random strains (obtained by random permutation in Matlab) from the expanded target array. The two collections of double mutants (paralogous and randomly paired) are described in **Supplementary Table 1**.

We scored the synthetic lethal pairs of deletions, taking advantage of the fluorescence-labeled strains (**Supplementary Fig. 5** online). A synthetic lethal interaction was scored for each double mutant failing to grow in at least six out of eight crosses per double-deletion strain (four YFP and four CFP replicates).

For quality control, we verified all parental deletion strains by PCR using marker and upstream primers. Further, a self cross was carried out as positive synthetic lethal control for the complete set of query genes. Genes that failed these tests were discarded from further analysis, leaving a total of 66 gene pairs.

Fitness measurements by automated competition experiments. YFP- or CFP-tagged mutants were competed against common reference strains: Y7092-CFP *his3Δ::kanR* or Y7092-YFP *his3Δ::kanR*, respectively. CFP and YFP swap experiments were done in parallel to account for variation due to strain-tagging procedures and measurement errors (**Supplementary Fig. 1**). Overnight cultures of mutant and reference strains were mixed 1:1 and inoculated into 150 μl of competition medium in 96-well microtiter plates (Costar). We diluted the competition cultures 32-fold into sterile fresh medium every 36 h; doubling time of the reference strain was 3.5 h. Cultures were propagated in parallel for approximately 50 generations (15 d) in a fully automated robotic system (Staccato Sciclone Cell Station, Caliper LifeSciences) consisting of a microplate shaker (Liconic), a liquid handler (Sciclone) and a plate reader (Victor3). We monitored bulk fluorescence signal and absorbance at 600 nm (OD₆₀₀) every ~2.5 h (Chroma filters HQ500/20x and HQ535/30m for YFP; D430/20x and D486/30m for CFP). The equipment was maintained in an environmental room at constant temperature (30 °C) and relative humidity (70%). The system was controlled by a Matlab code to determine and keep track of reading and dilution times, reading output, dilution volumes and plate identities. We carried out a total of 1,540 competition cultures, consisting of replicate experiments of deletions of 454 single genes, 66 pairs of WGD genes, 132 WGD single genes combined with a neutral insertion, and single experiments for 277 randomly paired deletions (**Supplementary Fig. 6** online).

Synthetic-lethal double deletions in our screen, auxotroph strains that failed to grow in competition medium and mutants whose frequency dropped below the detection limit after one competition cycle were defined to have a fitness cost $s = -1$. For all other strains, the YFP, CFP and OD measurements were used to determine the selective coefficient (s) and epistasis level ($\epsilon = W_{x'x''} - W_x W_{x''}$); see detailed data analysis in **Supplementary Methods**. Average selection coefficients and standard errors for single- and double-deletion mutants are provided in **Supplementary Table 1**.

Flow cytometry. To estimate the protein abundances of WGD genes during exponential growth in the competition medium, we used a library of GFP(S65T)-His3MX-tagged strains²⁹. A collection of 99 wild-type strains with different GFP fusions on WGD genes were grown to OD 0.4–0.45 and delivered to an analytical cytometer using an autosampler device (LSR-II, BD). Reported GFP signals are the average fluorescence of each strain. Raw measurements are shown in **Supplementary Figure 4**.

URLs. Yeast Gene Order Browser, <http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>; Database of Interacting Proteins, <http://dip.doe-mbi.ucla.edu/>; literature-curated protein interaction data, <http://www.thebiogrid.org/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Angelino, N.Q. Balaban, N. Barkai, R. Chait, M. Elowitz, M. Ernebjerg, R. Kafri, E. Mancera, R. Milo, M. Vibranovski, D.R. Wagner, I. Wapinski, R. Ward and P. Yeh for helpful discussions and critical reading of the manuscript, M. Springer for help with flow cytometry, and C. Boone (University of Toronto) and J.S. Weissman (University of California San Francisco) for their gifts of strains and plasmids. This work was supported by a grant from the Human Frontiers Science Program to R.K.; A.D. is a Fellow of the Pew Program in the Biomedical Sciences.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

- Gu, Z.L. *et al.* Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* **421**, 63–66 (2003).
- Seoighe, C. & Wolfe, K.H. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 548–554 (1999).
- Wagner, A. Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nat. Genet.* **24**, 355–361 (2000).
- Papp, B., Pál, C. & Hurst, L.D. Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature* **429**, 661–664 (2004).
- Kafri, R., Bar-Even, A. & Pilpel, Y. Transcription control reprogramming in genetic backup circuits. *Nat. Genet.* **37**, 295–299 (2005).
- Kuepfer, L., Sauer, U. & Blank, L.M. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* **15**, 1421–1430 (2005).
- He, X.L. & Zhang, J.Z. Higher duplicability of less important genes in yeast genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 144–151 (2006).
- Tong, A.H.Y. *et al.* Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808–813 (2004).
- Segre, D., DeLuna, A., Church, G.M. & Kishony, R. Modular epistasis in yeast metabolism. *Nat. Genet.* **37**, 77–83 (2005).
- Schuldiner, M. *et al.* Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**, 507–519 (2005).
- St Onge, R.P. *et al.* Systematic pathway analysis using high-resolution fitness profiling of combinatorial gene deletions. *Nat. Genet.* **39**, 199–206 (2007).
- Hegreness, M., Shores, N., Hartl, D. & Kishony, R. An equivalence principle for the incorporation of favorable mutations in asexual populations. *Science* **311**, 1615–1617 (2006).
- Thatcher, J.W., Shaw, J.M. & Dickinson, W.J. Marginal fitness contributions of nonessential genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 253–257 (1998).
- Deutscher, D., Meilijon, I., Kupiec, M. & Ruppin, E. Multiple knockout analysis of genetic robustness in the yeast metabolic network. *Nat. Genet.* **38**, 993–998 (2006).
- Harrison, R., Papp, B., Pál, C., Oliver, S.G. & Delneri, D. Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2307–2312 (2007).
- Wolfe, K.H. & Shields, D.C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708–713 (1997).
- Kellis, M., Birren, B.W. & Lander, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617–624 (2004).
- Lynch, M. & Force, A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**, 459–473 (2000).

19. He, X. & Zhang, J. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics* **169**, 1157–1164 (2005).
20. Tirosh, I. & Barkai, N. Comparative analysis indicates regulatory neofunctionalization of yeast duplicates. *Genome Biol.* **8**, R50 (2007).
21. Vitkup, D., Kharchenko, P. & Wagner, A. Influence of metabolic network structure and function on enzyme evolution. *Genome Biol.* **7**, R39 (2006).
22. Conant, G.C. & Wolfe, K.H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Systems Biol.* **3**, 129 (2007).
23. Guan, Y., Dunham, M.J. & Troyanskaya, O.G. Functional analysis of gene duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 933–943 (2007).
24. Presser, A., Elowitz, M.B., Kellis, M. & Kishony, R. The evolutionary dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* protein interaction network after duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 950–954 (2008).
25. Makino, T., Suzuki, Y. & Gojobori, T. Differential evolutionary rates of duplicated genes in protein interaction network. *Gene* **385**, 57–63 (2006).
26. Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. & Regev, A. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* **449**, 54–61 (2007).
27. Kafri, R., Levy, M. & Pilpel, Y. The regulatory utilization of genetic redundancy through responsive backup circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11653–11658 (2006).
28. Ihmeis, J., Collins, S.R., Schuldiner, M., Krogan, N.J. & Weissman, J.S. Backup without redundancy: genetic interactions reveal the cost of duplicate gene loss. *Molecular Systems Biology* **3**, 86 (2007).
29. Huh, W.-K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686–691 (2003).
30. DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L. & Gonzalez, A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*—purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* **276**, 43775–43783 (2001).

9.3. Artículo III



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications 348 (2006) 989–996

BBRC

www.elsevier.com/locate/ybbrc

Gcn5p contributes to the bidirectional character of the *UGA3–GLT1* yeast promoter

Cristina Aranda ^a, Maritrini Colón ^a, Cecilia Ishida ^a, Lina Riego ^b, Alexander DeLuna ^a, Lourdes Valenzuela ^a, Jorge Herrera ^a, Alicia González ^{a,*}

^a *Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México D.F., Mexico*

^b *División de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José No 2055 Lomas, Cuarta Sección 78216, San Luis Potosí, Mexico*

Received 20 July 2006

Available online 1 August 2006

Abstract

Analysis of the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter has indicated that its transcriptional activation is determined by the combined action of Gcn4p and Gln3p, and that its bidirectional character is influenced by chromatin organization, through the action of an Abf1p binding site and a polydAdT_{tract}. Results presented in this paper show that lack of Gcn5p impairs histone acetylation and nucleosomal organization of the *UGA3–GLT1* promoter, resulting in an asymmetrical transcriptional activation response of *UGA3* and *GLT1*. The phenotype displayed by a double mutant impaired in *GCN5* and in the Abf1p binding site indicates that the combined action of these two elements determines the bidirectional capacity of the *UGA3–GLT1* intergenic region.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Bidirectional promoters; Chromatin organization; *GCN5*; *UGA3*; *GLT1*

Gcn5p is a yeast transcriptional coactivator, component of the SAGA or ADA complexes [1], which possesses histone acetyltransferase (HAT) enzymatic activity [2] that can acetylate histones in repressive chromatin structure and thus contribute to increased gene expression. It has been shown that SAGA interacts with both TATA-binding protein and acidic transcriptional activators such as the yeast Gcn4p [3]. This fact indicated that the complex had a crucial role as an adaptor, in the transcriptional activation response of some promoters, which was confirmed through global analysis approaches that allowed determining that Gcn5p affects expression of 5% of the genes present in the *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) genome [4].

Although an important number of presumed bidirectional promoters have been proposed to be controlled through Gcn5p action [4,5], the role of this coactivator

in chromatin organization of bidirectional promoters and its possible function in determining their capacity to bidirectionally foster gene expression has not been addressed. In fact, the role of chromatin organization in the expression of bidirectional promoters has only been thoroughly studied for the *GALI–GAL10* promoter of *S. cerevisiae* [6], and the *prnD–prnB* and *niiA–niiD* of *Aspergillus nidulans* [7,8]. The parallel activation of the *GALI* and *GAL10* genes is induced by galactose, while there is little transcription in non-inducing carbon sources. Full repression requires the correct positioning of a nucleosome, which is lost upon induction [6]. Induced expression of both *prnD–prnB* and *niiA–niiD* requires chromatin remodeling through the removal of the nucleosomes that are positioned along the intergenic region under repressive conditions [7,8]. Thus, nucleosomal phasing can repress expression of two divergent genes, and induction can be achieved after chromatin remodeling. The analysis of the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter of *S. cerevisiae* has recently shown that expression from

* Corresponding author. Fax: +55 55 56225630.

E-mail address: amanjarr@ifc.unam.mx (A. González).

this promoter is asymmetrically dependent upon chromatin remodeling through the combined action of an Abf1p binding site (*abf1_{box}*) and a polydAdT_{tract} which, when impaired, exclusively hinder *GLT1* expression [9]. These results suggest that wild type chromatin organization facilitates the bidirectional action of the pertinent *cis*- and *trans*-acting elements on *GLT1* expression [9].

Considering the fact that chromatin organization could be one of the main instances determining the bidirectional nature of intergenic regions [9], the importance of *GCN5* in gene expression and nucleosome organization [3], and the fact that it has been predicted that Gcn5p could affect expression of various presumed bidirectional promoters, we decided to analyze whether Gcn5p played a role in the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter fostered gene expression. Our results indicate that: (i) *GCN5* determines *GLT1* basal and 3-AT-induced expression, while that of *UGA3* is *GCN5* independent, (ii) the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter is acetylated in a Gcn5p-dependent manner, and (iii) the simultaneous impairment of the Abf1p binding site and *GCN5* determines a nucleosomal organization which affects *GLT1* basal and 3-AT-induced expression, while that of *UGA3* is only barely affected. These results indicate that Gcn5p and the Abf1 binding site coordinately determine the bidirectional capacity of the *UGA3–GLT1* promoter.

Materials and methods

Strains and plasmids. A CLA1 (*MAT α ura3 leu2*) isogenic *gen5 Δ ::kanMX* (CLA-100 *gen5 Δ*) derivative was prepared using the deoxyoligonucleotide 1388 (5'-GAA GAG GAT CAC TTG GAT GGA GCT ACG ACG GAT CCC GAA GCG TAC GCT GCA GGT CGA C-3'), which comprised 40 bp from the 5'-end of *GCN5* sequence (bold) and 18 bp of the multiple-cloning site present in the plasmid pFA6a [10], and the deoxyoligonucleotide 1389 (5'-CCT ATT AGC ATA CTT GTA ATA CGA CGT ATT CTC GCC ATT GAT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3') containing 40 bp from the 3'-end of the *GCN5* sequence (bold) and 19 bp from the pFA6a multiple-cloning site. Qiagen purified pFA6a DNA was used as a template for PCR amplification. A 1500 bp PCR product was obtained, gel purified, and used to generate a *gen5 Δ* mutant in the CLA1 background (CLA-100 *gen5 Δ*). Correct insertion was monitored by PCR amplification on genomic DNA using a pair of deoxyoligonucleotides, 2000 (5'-GCG CGA TCG ATC CTT TTC AAT ACT CG-3') and 2001 (5'-GCG CGG TCG ACG AGA AAG AAG CTG C-3'), designed to amplify the *GCN5* promoter and coding sequences. A collection of plasmids derived from pGLT1-1 (*GLT1-lacZ* 2 μ *LEU2*) or pUGA3-1

(*UGA3-lacZ* 2 μ *LEU2*) bearing various mutations affecting *cis*-acting elements [9] were independently introduced in the wild type strain CLA1 and its isogenic derivative CLA-100 *gen5 Δ* .

Growth conditions. Strains were grown on minimal medium (MM) containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter-sterilized glucose (2% w/v) was used as the carbon source and 0.2% (w/v) (NH₄)₂SO₄ was used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01% (w/v). Cells were incubated at 30 °C with shaking (250 rpm). For amino acid deprivation experiments, CLA1 and CLA100 strains, transformed with the pertinent plasmids, were treated as previously described [12].

Determination of β -Gal activities. Soluble extracts were prepared by suspending whole cells in the corresponding extraction buffer [13] and grinding them with glass beads. β -galactosidase (β -Gal) activities were determined as previously described [12]. Specific activity was expressed as nmoles of *o*-nitrophenol produced per minute per milligram of protein. Protein was measured by the method of Lowry et al. [11], with bovine serum albumin as a standard.

Yeast transformation. Pertinent *S. cerevisiae* strains were transformed with the *lacZ* fusion plasmids by the method described by Ito et al. [14]. Transformants were selected for leucine prototrophy on MM supplemented with auxotrophic requirements as needed.

Micrococcal nuclease (MNase) treatment. Cell cultures grown on minimal medium with 0.2% (NH₄)₂SO₄ (200 ml at OD₆₀₀ of 0.4) were pelleted and suspended in 10 ml of buffer I (1 M sorbitol, 50 mM Tris-HCl, and 10 mM β -mercaptoethanol) and MNase treatment was performed as previously described [9].

Indirect end-labeling. Spheroplasts prepared from CLA1 strain carrying the pertinent multicopy (2 μ) plasmids were permeabilized with nystatin and treated with MNase as previously described [9].

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Formaldehyde-crosslinking and immunoprecipitations were carried out by the procedure described by Hecht et al. [15]. Yeast cells (200 ml of OD₆₀₀ of 0.4) were cross-linked with 1% formaldehyde for 60 min at room temperature. After addition of 125 mM glycine and incubation for 5 min, cells were harvested and washed with saline Tris-buffer, suspended in spheroplast buffer (1 M sorbitol, 50 mM Tris-Cl, and 25 mM Hepes) with 600 U/ml of lyticase, and incubated at 30 °C for 30 minutes. Spheroplasts were harvested, washed, and suspended in RIPA buffer (50 mM Hepes, 137 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% Na deoxycholate, 0.5% Triton X-100, and 0.1% SDS) with protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). Spheroplasts were sonicated to produce chromatin fragments of 200 to 1000 bp, with average size of ~500 bp. Chromatin immunoprecipitation was conducted with antibodies against: non-acetylated histone H4 (Serotec), histone H4 acetylated in lysine residues 5, 8, 12, and 16, non-acetylated histone H3, histone H3 acetylated in lysine residues 9 and 14, and histone H3 acetylated in lysine residue 14 (Upstate Biotechnology). Chromatin solution was combined with 5 μ l of each anti-serum. The primer sets used for PCR analysis are listed in Table 1. PCR products were resolved on a 1.5% (region I) and a 2% (region II) agarose gel stained with ethidium bromide. Gels were scanned and quantified using the program Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

Table 1
Oligonucleotides used in ChIP analysis

Oligonucleotide	Sequence	Region
1227	5'-GCGCGCGTCCGCCATAATTC-3'	I
1508	5'-GCGCGCGGATCCATCAGTTCGTCGT-3'	
836	5'-CGCGCGGGATCCGCCCGCAAAACGTA AAAA-3'	II
846	5'-GCGCGCGGATCCAAATTCCTATCTTCTA-3'	
1510	5'-GCGCGCGGATCCATACAGA AACTGGCG-3'	<i>lacZ</i>
1511	5'-GCGCGCGGATCCAGGCGTTTCGTCAG-3'	

Results and discussion

Amino-acid deprivation-dependent transcriptional activation of the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter is unidirectionally determined by *Gcn5p*

Since it has been shown that *Gcn5p* functions as a coactivator of *Gcn4p*, and considering that *UGA3–GLT1* basal expression is *Gcn4p*-dependent [9], we decided to analyze whether expression driven by this promoter was *Gcn5p*-dependent. β -Gal activity was determined in the wild type strain and its isogenic *gcn5 Δ* derivative transformed with either pUGA3-1 or pGLT1-1 carrying the full *UGA3–GLT1* intergenic region fused to the *Escherichia coli* β -galactosidase (β -Gal) coding region, oriented to either *UGA3* or *GLT1* (pUGA3-1 and pGLT1-1, respectively). As Fig. 1 shows, lack of *Gcn5p* resulted in half-fold decreased *GLT1* expression, while that of *UGA3* was only slightly diminished, indicating an asymmetric role of *Gcn5p* on basal transcriptional activation fostered by the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter.

Since it had been previously shown that maximal transcriptional activation of *GLT1* and *UGA3* was attained after amino acid deprivation [9], we decided to determine whether 3-AT-induced expression was influenced by *GCN5*. We thus measured β -Gal activity in the pertinent strains transformed with pGLT1-1 and pUGA3-1 (Fig. 1). Our results confirmed that as had been previously shown, in the presence of 3-AT, both *GLT1* and *UGA3* expression was almost twofold increased [9]. As expected, *GLT1* transcriptional response to 3-AT was abolished in a *gcn5 Δ* genetic background; however, *UGA3* 3-AT-dependent response was maintained in a *gcn5 Δ* mutant. These results show that *Gcn5p* plays a determinant role in the bidirectional capacity of the *UGA3–GLT1* promoter (Fig. 1).

It has been previously shown that the *UGA3–GLT1* transcriptional activation is dependent upon the action of three *cis*-acting elements (*gcn4_{box}*, *pal_{box}*, and *gata_{box}*) and two *trans*-acting elements (*Gcn4p* and *Gln3p*), which bind the *UGA3–GLT1* intergenic region [9]. The role of the three *cis*-acting elements on 3-AT-induced *UGA3* and *GLT1* expression was addressed by measuring β -Gal

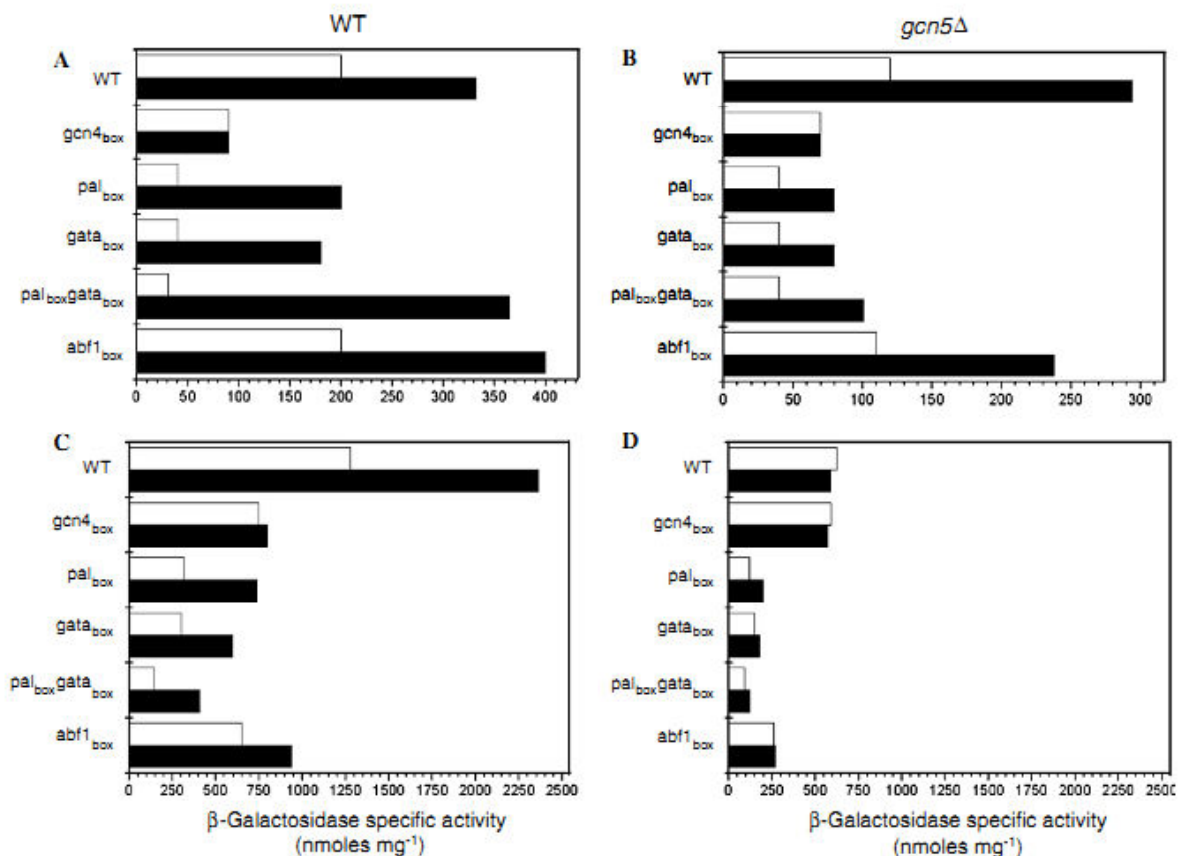


Fig. 1. Mutation analysis of relevant *cis*-acting elements present in the *UGA3–GLT1* promoter on basal and 3-AT-induced expression in a wild type or *gcn5 Δ* genetic background. β -Gal activity was determined in extracts obtained from yeast cells harvested during exponential growth on either MM or after 3-aminotriazole (3-AT) treatment, as described in Materials and methods. Parental strain CLA1 and its isogenic *gcn5 Δ* derivative CLA100 were independently transformed with wild type *lacZ* fusion construct and the collection of *lacZ* fusion plasmids independently mutated in the indicated *cis*-acting elements in the context of the full length intergenic region oriented to either pGLT1-1 or pUGA3-1. (A,B) *lacZ* fusion constructs oriented to *UGA3*; (C,D) *lacZ* fusion constructs oriented to *GLT1*. Empty bars MM, full bars MM-3AT.

activities in extracts obtained from the wild type CLA1 and its isogenic derivative CLA100 *gcn5Δ* mutant strain alternatively harboring each one of the members of a plasmid collection bearing mutations in the different *cis*-acting elements oriented to either *UGA3* or *GLT1* [9]. Mutations of the *gcn4_{box}* completely abolished 3-AT response of either *UGA3* or *GLT1*, while impairment of the *pal_{box}* or *gata_{box}* elements did not affect this response (Fig. 1). These data show that consistent to what has been previously reported. Gcn4p binding elements determine amino acid-dependent response [16]. It is worth mentioning that for *UGA3*, 3-AT-induced expression was increased when the *pal_{box}* or *gata_{box}* elements were impaired as compared to that found in strains harboring the wild type plasmid (Fig. 1A). Particularly notable was the effect of a double mutant simultaneously impaired in the *gata_{box}* and *pal_{box}* elements in which transcriptional activation was 11-fold higher than that found without 3-AT. These results suggest that impairment of the *pal_{box}* and *gata_{box}* *cis*-acting elements could result in a more effective binding of Gcn4p to its cognate site, thus increasing *UGA3* transcriptional activation. However, for *GLT1* expression, impairment of the above-mentioned elements did not augment the amino acid deprivation response as compared to that found for strains carrying the wild type plasmid (Fig. 1C), indicating that *GLT1*-3AT response might not only be determined by the capacity of Gcn4p to bind its cognate sequence, and thus vacancy of the neighboring *cis*-acting elements would not have a positive effect on transcriptional activity.

When *UGA3* and *GLT1* 3-AT-induced expression was determined in cultures of the *gcn5Δ* mutant strain, it was found that *GLT1*-induced expression was completely abolished in strains alternatively harboring plasmids impaired in each one of the *cis*-acting elements. However, *UGA3*-induced expression was maintained in a *gcn5Δ* genetic background, and was only abolished in strains carrying plasmids impaired in the *gcn4_{box}*. However, as opposed to what was observed in the wild type strain, expression in strains carrying plasmid constructions impaired in the *gata_{box}* and *pal_{box}* elements was not increased as compared to that found in the strain harboring the wild type plasmid, suggesting that induced expression after amino-acid deprivation could involve Gcn5p-dependent mechanisms in addition to those promoted by Gcn4p binding to the *gcn4_{box}*.

Abf1_{box} *cis*-acting element and Gcn5p synergistically determine *GLT1* expression

Earlier studies have shown that the *abf1_{box}* *cis*-element present in the *UGA3–GLT1* promoter determines the bidirectional action of this regulatory region [9]. Accordingly, Fig. 1 shows that, as previously reported, the disruption of the *abf1_{box}* affects basal *GLT1* expression, while it has no effect on *UGA3* expression. In regard to the transcriptional response observed after amino acid deprivation, it was found that impairment of the *abf1_{box}* allowed full

response of *UGA3* while it impaired *GLT1* 3-AT response. A similar phenotype was displayed by the *gcn5Δ* mutant, indicating that as well as the *abf1_{box}*, Gcn5p could play a role in the bidirectional capacity of *UGA3–GLT1* promoter. As expected, in a *gcn5Δ* background, disruption of the *abf1_{box}* had a stronger effect on *GLT1* expression, as compared to that found in a wild type strain, impairing basal and 3-AT-induced expression, while *UGA3* expression was barely affected. These results suggested a synergistic action between Gcn5p and the Abf1 binding element.

The *UGA3–GLT1* is acetylated in a Gcn5p-dependent manner

To determine the acetylation profile of the *UGA3–GLT1* bidirectional promoter, the intergenic sequence was divided in two regions and deoxyoligonucleotides were designed in order to independently amplify each one (Table 1). The probe which was used to amplify the *lacZ* coding sequence was obtained using deoxyoligonucleotides which were designed from sequences that were 167 bp away from the *GLT1* translation initiation site, in order to avoid coimmunoprecipitation of the *UGA3–GLT1* intergenic region (Fig. 2). As expected, H3 and H4 unacetylated antibodies showed a similar quantitative immunoprecipitation from extracts of either the wild type or the *gcn5Δ* mutant for both regions. Antibodies directed to either Lys 9 and 14 or Lys 14 gave a higher immunoprecipitation yield in the wild type strain than in the *gcn5Δ* mutant from regions I and II, while the H4 acetylated antibody immunoprecipitated the same amount in either the wild type and the *gcn5Δ* mutant, indicating that for this promoter H4 acetylation was not *Gcn5*-dependent, showing that there is a *Gcn5*-independent basal acetylation as has been shown for the *HIS3* promoter [17].

Nucleosomal organization of the *UGA3–GLT1* promoter is Gcn5p-dependent

Chromatin was prepared from the wild type and *gcn5Δ* mutant strain. As can be seen in Fig. 3, in the *gcn5Δ* mutant, nucleosomes A, B, and C were more loosely located than in the wild type strain, as can be concluded from the fact that the MNase-sensitive sites observed in the wild type strain between the positioned nucleosomes were more evident in the *gcn5Δ* mutant. Additionally, in the *gcn5Δ* mutant, the preferential positioning of a fourth nucleosome (D) was observed in the region containing the relevant *cis*-acting elements. Thus, the diminished *UGA3* and *GLT1* expression observed in the *gcn5Δ* mutant could be attributed to a partial inaccessibility of the promoter to the *trans*-acting elements. However, this would not explain the differential effect of the *gcn5Δ* mutation on *UGA3* and *GLT1* expression, since inaccessibility of activators should equally affect expression of both genes. It could be considered that positioning of nucleosome D could affect the flexibility or curvature that has been proposed to be needed in order

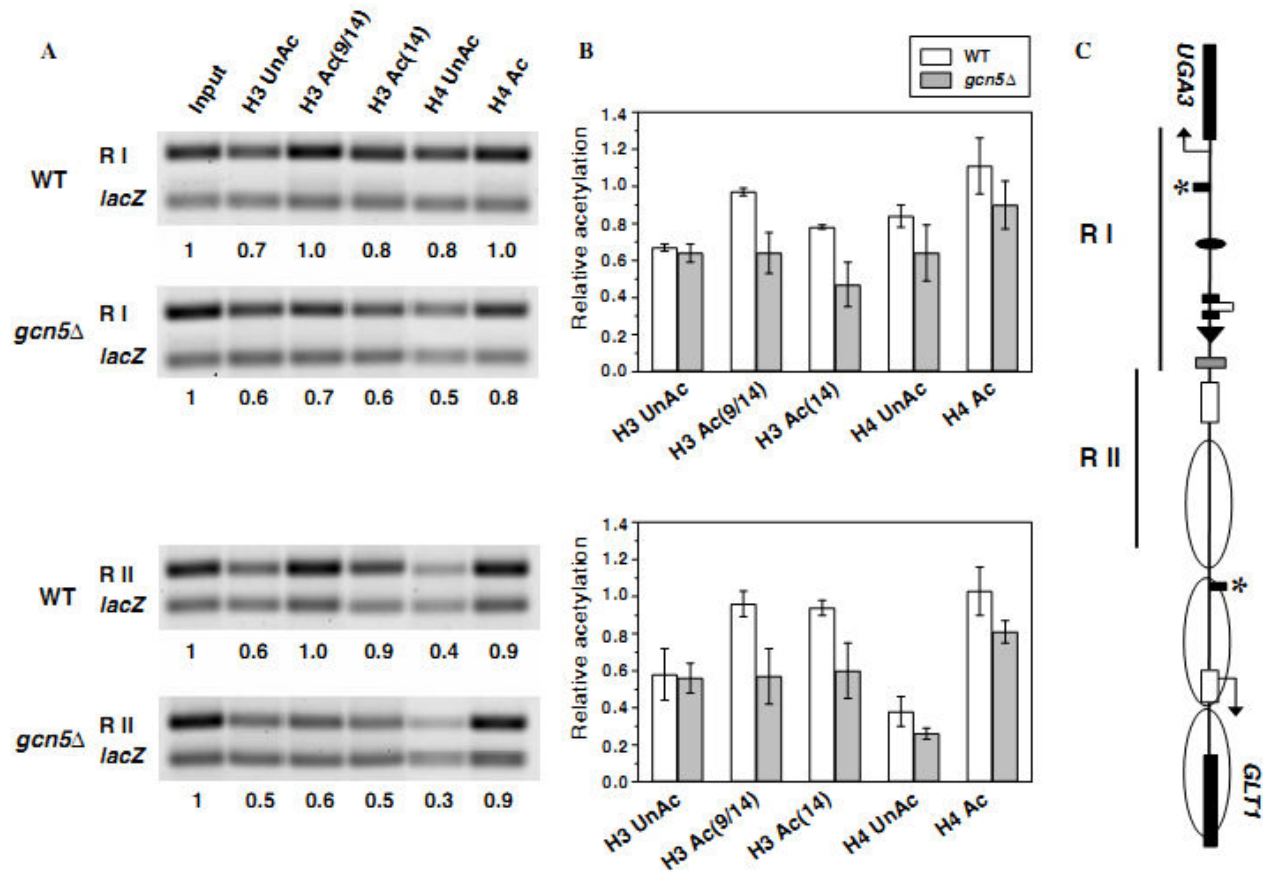


Fig. 2. The *UGA3-GLT1* intergenic region is acetylated in a Gcn5p-dependent manner. Cross-linked and fragmented chromatin preparations from wild type and *gcn5Δ* mutant strains were immunoprecipitated with antibodies directed to non-acetylated histone H4, histone H4 acetylated in lysine residues 5, 8, 12, and 16, non-acetylated histone H3, histone H3 acetylated in lysine residues 9 and 14 and histone H3 acetylated in lysine residue 14, and the recovered DNA was analyzed by PCR. For each determination, the reaction mixture contained primers both for the *GLT1-UGA3* promoter and for the internal control region corresponding to the *lacZ* structural gene. Because individual PCRs are internally controlled, the relative level of histone acetylation in the indicated region is defined with respect to the level of histone acetylation within the *lacZ* region. (A) shows a representative experiment, (B) presents the quantitative results which were obtained by averaging three experiments, and (C) shows a diagrammatic representation of the *UGA3-GLT1* bidirectional promoter. R I and R II represent the two regions in that the promoter was divided for PCR analysis. Nucleosomes are depicted as ovals.

to allow interaction between the *tata_{box}* and the pertinent *cis*-acting elements [18].

Considering that it has been shown that the *abf1_{box}* present in the *UGA3-GLT1* intergenic region could constitute an insulator element influencing the flexibility needed to promote *GLT1* transcription [9], we decided to analyze the chromatin organization and transcriptional phenotype of a *gcn5Δ* mutant carrying a plasmid harboring the *UGA3-GLT1* promoter impaired in the *abf1_{box}*.

Gcn5p and *abf1_{box}* *cis*-acting element synergistically determine bidirectional action of the *UGA3-GLT1* region

Earlier studies had shown that the *abf1_{box}* site present in the *UGA3-GLT1* promoter determined the bidirectional action of this regulatory region. As previously shown [9], disruption of the *abf1_{box}* affects basal *GLT1* expression while it has no effect on *UGA3* expression (Fig. 1). After amino acid deprivation, it was found that impairment of the *abf1_{box}* allowed full response of *UGA3* while it impaired *GLT1* 3-AT response (Fig. 1). The *gcn5Δ* mutant

displayed a similar phenotype, indicating that as well as the *abf1_{box}*, Gcn5p could play a role in the bidirectional capacity of *UGA3-GLT1* promoter. As expected, in a *gcn5Δ* background, disruption of the *abf1_{box}* had a stronger effect on *GLT1* expression, as compared to that found in a wild type strain, impairing basal and 3-AT-induced expression, while *UGA3* expression was barely affected. These results indicate a synergistic action between Gcn5p and the *abf1_{box}*.

As has been previously reported in a wild type strain harboring a plasmid impaired in the *abf1_{box}*, a shift in the position of nucleosome C was observed (Fig. 4) [9]. As expected the combined effect of the *abf1_{box}* mutation and lack of Gcn5p was observed in the double mutant (Fig. 4). The asymmetric synergistic negative effect on *UGA3* and *GLT1* transcriptional activation observed in the double mutant could be explained by assuming an additive effect which results in the shifting of nucleosome C and the positioning of nucleosome D, thus hindering the contact between the *GLT1* *tata_{box}* and the relevant *cis*-acting elements.

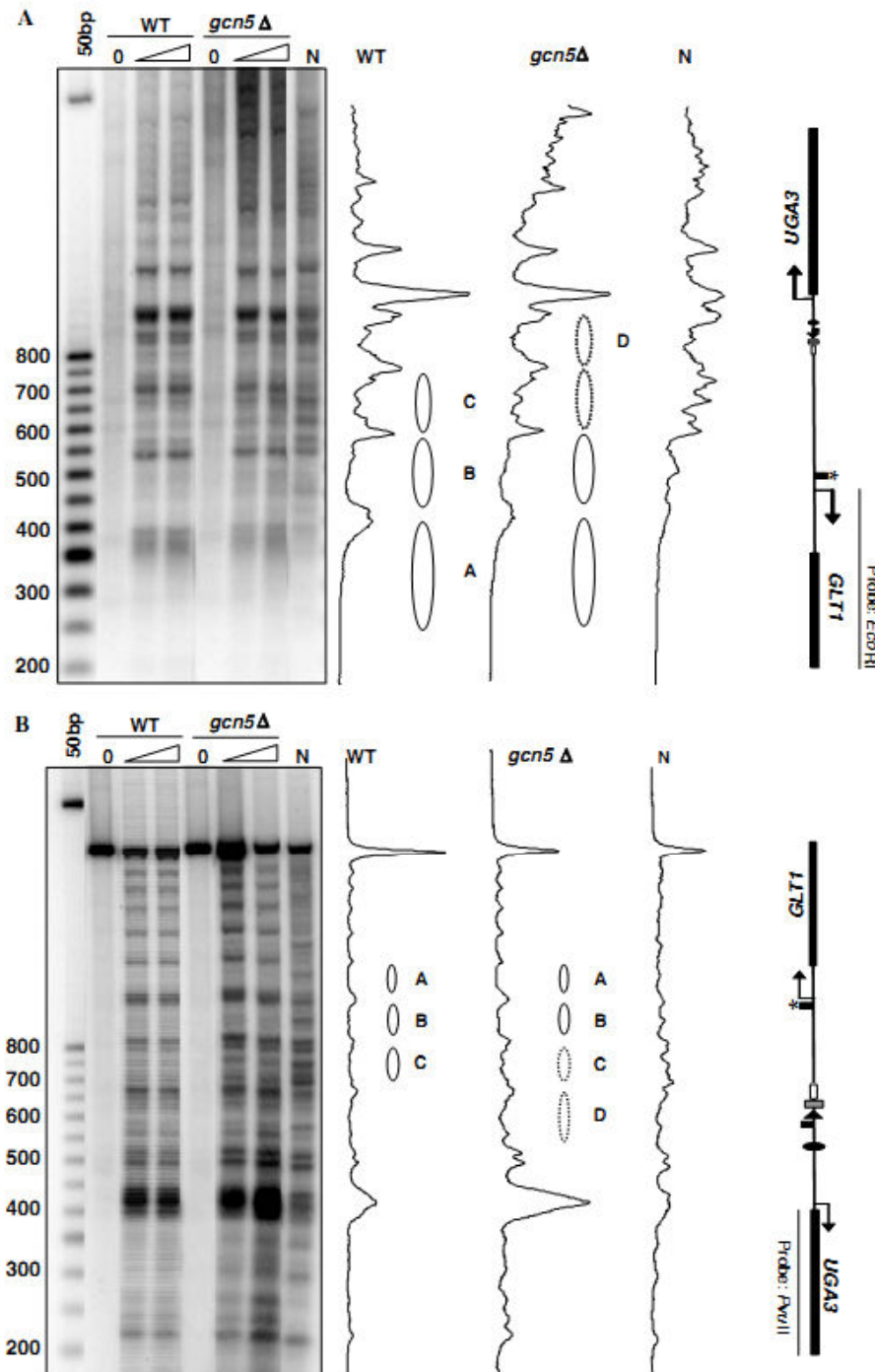


Fig. 3. Gcn5p-dependent nucleosomal organization of the *UGA3-GLT1* bidirectional promoter. Chromatin samples were prepared from the wild type strain CLA1 grown to mid-exponential phase on MM. Samples were taken and chromatin was prepared as stated in Materials and methods. Nystatin-treated spheroplasts were digested with increasing concentrations of MNase and with *EcoRI* (panel A) and *PvuII* (panel B). Samples were electrophoresed through 1.5% agarose-TBE 1× gels and transferred to a nitrocellulose membrane, and assayed with the 5′ (A) or 3′ (B) probe. The densitometric scan of the digestion profile and the region covering the *UGA3-GLT1* intergenic region are shown to the right. Binding sites are depicted as follows: *gcn4*_{box} (□), *pal*_{box} (■), *gata*_{box} (●), *abf1*_{box} (○), and polyAdT_{tract} (▬). Nucleosomes are depicted as ovals labeled from (A–D). Arrows indicate the transcription initiation site.

Concluding remarks

Previous studies have shown that the bidirectional nature of the *UGA3-GLT1* intergenic region is determined

by chromatin organization [9]. Results presented in this paper indicate that lack of Gcn5p-mediated acetylation results in a modified nucleosomal organization, which partially occludes the relevant *cis*-acting regulatory sites. The

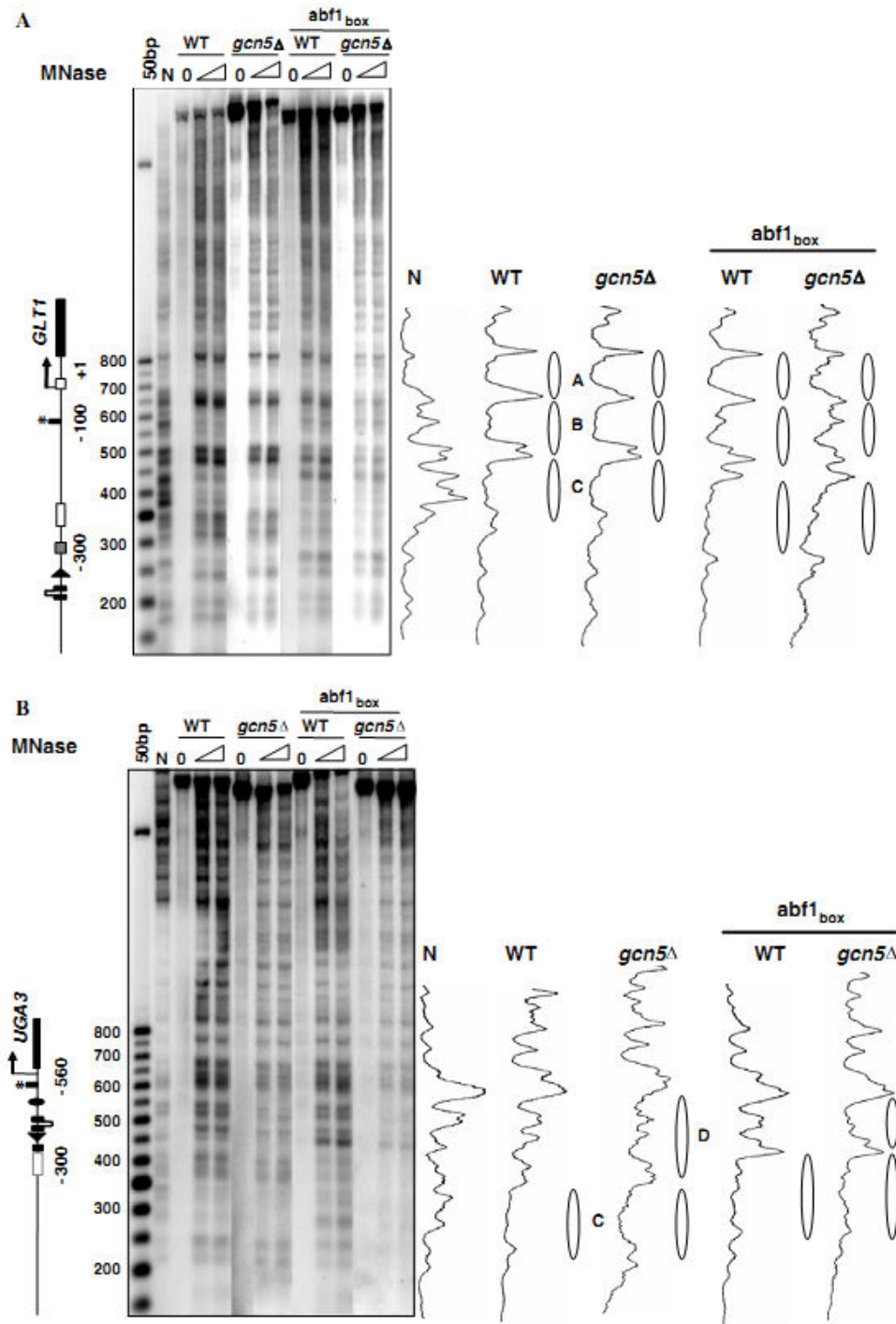


Fig. 4. Chromatin organization of the *UGA3-GLT1* intergenic region in a double mutant *gcn5Δ abf1_{box}*. Chromatin samples were prepared from the wild type strain CLA1 or the *gcn5Δ* mutant CLA100 harboring plasmid pGLT1-1 (WT), or the pGLT1-6 (*abf1_{box}*), growth conditions, chromatin preparation, and treatment of samples being equal to those described for Fig. 3. (A) was assayed with the 5' probe, and (B) with the 3' probe. The densitometric scan of the digestion profile and the region covering the *UGA3-GLT1* intergenic region are shown to the right. Binding sites and the positioning of nucleosomes are depicted as in Fig. 3.

fact that the occlusion of these sites unidirectionally affected *GLT1* expression indicated that in the *gcn5Δ* mutant the intrinsic architecture of the region could have been affected, resulting in loss of flexibility that would exclusively influence its ability to promote interactions between the *GLT1*

tata_{box} and the pertinent *trans*-acting factors, since the *UGA3 tata_{box}* is located in the vicinity of the *cis*-acting elements. Although the role of Gcn5p as coactivator of transcriptional activation has been thoroughly studied, its role as a determinant factor in the operation of bidirectional

promoters had not been addressed, thus it will be interesting to further address this matter as more bidirectional promoters are experimentally analyzed.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN221103-2), and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (49970). We acknowledge J. M. Cantú for useful discussions and critical review of the manuscript. We also acknowledge L. Ongay, G. Codiz, and M. Mora (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for synthesis of deoxyoligonucleotides. C.I. received a Grant (No 119309) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

References

- [1] P.A. Grant, L. Duggan, J. Cote, S.M. Roberts, J.E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C.D. Allis, F. Winston, S.L. Berger, J.L. Workman, Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex, *Genes Dev.* 11 (1997) 1640–1650.
- [2] J.E. Brownell, J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D.G. Edmondson, S.Y. Roth, C.D. Allis, Tetrahymena histone acetyltransferase A: homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation, *Cell* 84 (1996) 843–851.
- [3] P.A. Grant, D.E. Sterner, L.J. Duggan, J.L. Workman, S.L. Berger, The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes, *Trends Cell Biol.* 8 (1998) 193–197.
- [4] F.C. Holstege, E.G. Jennings, J.J. Wyrick, T.I. Lee, C.J. Hengartner, M.R. Green, T.R. Golub, E.S. Lander, R.A. Young, Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome, *Cell* 95 (1998) 717–728.
- [5] F. Robert, D.K. Pokholok, N.M. Hannett, N.J. Rinaldi, M. Chandy, A. Rolfe, J.L. Workman, D.K. Gifford, R.A. Young, Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome, *Mol. Cell* 16 (2004) 199–209.
- [6] R. Bash, D. Lohr, Yeast chromatin structure and regulation of *GAL* gene expression, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 65 (2001) 197–259.
- [7] I. García, R. Gonzalez, D. Gomez, C. Scazzocchio, Chromatin rearrangements in the *prnD-prnB* bidirectional promoter: dependence on transcription factors, *Eukaryot. Cell* 3 (2004) 144–156.
- [8] M.I. Muro-Pastor, R. Gonzalez, J. Strauss, F. Narendja, C. Scazzocchio, The GATA factor AreA is essential for chromatin remodeling in a eukaryotic bidirectional promoter, *EMBO J.* 18 (1999) 1584–1597.
- [9] C. Ishida, C. Aranda, L. Valenzuela, L. Riego, A. DeLuna, F. Recillas-Targa, P. Filetici, R. López-Revilla, A. González, The *UGA3-GLT1* intergenic region constitutes a promoter whose bidirectional nature is determined by chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Mic.* (2006) 1790–1806.
- [10] M.S. Longtine, A. McKenzie 3rd, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, J.R. Pringle, Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 14 (1998) 953–961.
- [11] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [12] L. Valenzuela, P. Ballario, C. Aranda, P. Filetici, A. González, Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3533–3540.
- [13] C. Cogoni, L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballario, A. González, *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high molecular-weight polypeptide, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 792–798.
- [14] H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 163–168.
- [15] A. Hecht, T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S.M. Gasser, M. Grunstein, Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast, *Cell* 80 (1995) 583–592.
- [16] A.G. Hinnebusch, The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21 (1986) 277–317.
- [17] M. Grunstein, Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature* 389 (1997) 349–352.
- [18] J.D. Parvin, R.J. McCormick, P.A. Sharp, D.E. Fisher, Pre-bending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor, *Nature* 373 (1995) 724–727.

10. ANEXO II

10. ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

10.1. Descripción de la estancia y contexto

La estancia de investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Roy Kishony, en el “Bauer Center for Genomics Research” de la Universidad Harvard. La duración de la estancia fue de aprox. 6 meses, del 15 de junio al 30 de noviembre del 2005.

Para la realización de la estancia se obtuvo financiamiento por parte de: 1) Programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas a través del PAEP, 2) DGAPA, 3) Bauer Center for Genomics Research.

10.2. Antecedentes

El análisis global de interacciones genéticas es crucial para entender la organización de sistemas biológicos complejos en donde los genes suelen influenciar la actividad de otros genes. Las interacciones genéticas, o epistáticas, se pueden identificar mediante el análisis de mutantes dobles, y ocurren cuando la consecuencia fenotípica de una mutación depende de la presencia o ausencia de otra mutación. Éstas pueden ser sinérgicas – cuando el efecto de una mutación se intensifica ante la presencia de una segunda— o antagónicas –cuando la presencia de una segunda mutación disminuye o anula por completo el efecto de la primera.

En una primera fase de este trabajo se simuló la organización de las interacciones predichas para todas las parejas posibles de mutaciones en el metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se empleó un modelo computacional de análisis de flujos metabólicos, por medio del cual se calculó el flujo hacia biomasa a partir de redes metabólicas intactas o perturbadas en una o dos reacciones. Los resultados sugieren que las interacciones genéticas exhiben una peculiar distribución trimodal, lo cual permite la separación de parejas de mutaciones claramente sinérgicas, antagónicas o neutrales. Además, se observó que la red resultante puede ser organizada de manera jerárquica en módulos enriquecidos con genes que forman parte de la misma ruta metabólica y que interactúan con otros módulos mediante uniones exclusivamente sinérgicas o antagónicas. Con el fin de verificar estas predicciones teóricas, se desarrolló un método experimental

para medir la adecuación de mutantes sencillas y dobles mediante la competencia directa de mutantes marcadas con variantes amarillo y cian de la proteína verde fluorescente. El objetivo de la estancia de investigación fue participar en la construcción de dichas mutantes y en el análisis fenotípico de las mismas.

10.3. Estrategia experimental

1. Construcción de mutantes sencillas y dobles en genes seleccionados del metabolismo central y marcaje de las células con variantes amarillo y cian de la proteína verde fluorescente.
2. Medición de la adecuación de mutantes sencillas y dobles mediante la competencia directa de las mutantes marcadas con proteínas fluorescentes.

10.4. Primera fase: Estandarización de condiciones

Marcaje de cepas con proteínas fluorescentes

El primer paso consistió en marcar las cepas utilizadas con una proteína fluorescente, para ello, se emplearon módulos que contenían la versión amarilla o cian de la proteína verde fluorescente fusionados al promotor del gen *TDH3*. Este promotor permite que la proteína se exprese a altos niveles. El módulo se insertó en el locus *HO* mediante reemplazo por recombinación homóloga.

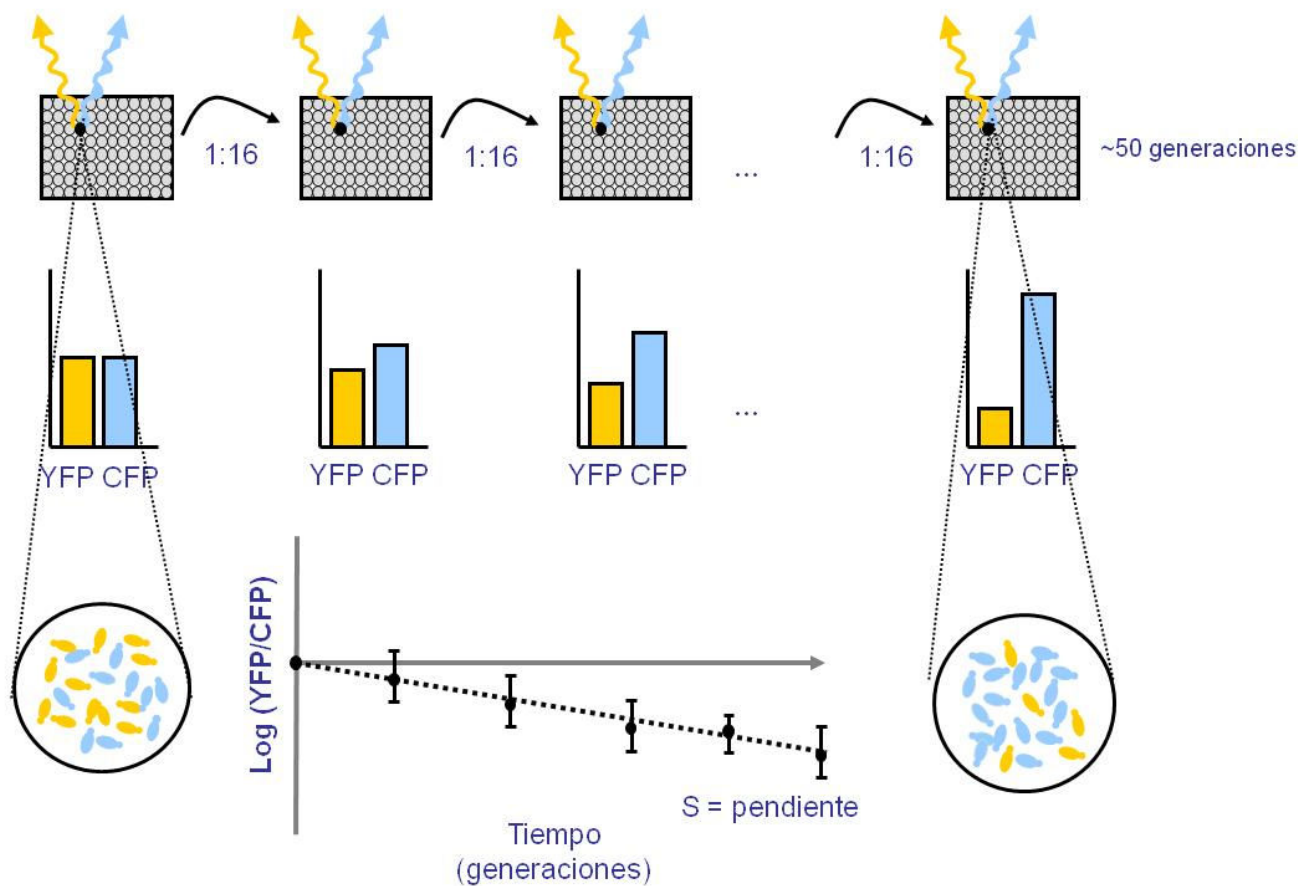
Construcción de mutantes

Se seleccionaron 96 mutantes en genes que codifican para enzimas del metabolismo central o factores transcripcionales de *S. cerevisiae* y se obtuvieron a partir de una colección comercial de mutantes.

La versión haploide de estas mutantes se cruzó con las cepas marcadas con CFP o YFP, siguiendo el método descrito por Tong y colaboradores. Como resultado de estas cruces se obtuvieron mutantes en cada uno de los genes seleccionados que además estaban marcadas con la proteína fluorescente.

Ensayos de competencias

Se determinó la adecuación de cada una de las mutantes sencillas con respecto a la cepa silvestre mediante un análisis de competencias, el cuál consiste en crecer simultáneamente dos cepas marcadas diferencialmente con proteínas fluorescentes. Cada cierto tiempo se toma una alícuota del cultivo y se diluye en medio fresco. A lo largo de la curva de crecimiento se determina la cantidad relativa de células basándose en la intensidad de fluorescencia de cada una de las proteínas usadas. En esta primera fase las competencias fueron de cultivos simultáneos de la cepa silvestre vs las mutantes sencillas. En principio, si la tasa de crecimiento de la mutante es igual a la cepa silvestre, la fluorescencia relativa de YFP y CFP será la misma. Pero, si una de las dos cepas crece mejor que la otra, habrá un cambio en la proporción relativa de fluorescencia, que se acentuará en cada dilución del cultivo.



10.5. Segunda fase: Determinación de interacciones epistáticas

Construcción de mutantes

La construcción de dobles mutantes se llevó a cabo por cruzas de la colección de 96 mutantes consigo misma, con lo que se generaron 96x96 dobles mutantes. Se determinó la adecuación relativa de estas dobles mutantes en relación a las mutantes sencillas construidas en la fase 1.

10.6. Resultados

1. Se construyeron aprox. 7000 dobles mutantes en diferentes enzimas y reguladores transcripcionales del metabolismo de *S. cerevisiae*.
2. Se estandarizaron las condiciones del ensayo automatizado.
3. Se obtuvieron datos preliminares que posteriormente sirvieron para construir una red global de interacciones genéticas para la levadura. Cabe destacar que, además de identificar parejas de mutantes sinérgicas, la naturaleza cuantitativa del método permitió también la identificación de parejas de mutantes que interactúan de manera antagónica.

10.7. Referencias

Segrè D, DeLuna A, Church GM, Kishony R. Modular epistasis in yeast metabolism. *Nature Genetics* 37, 77-83 (2005).

Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H, Xin X, Young J, Berriz GF, Brost RL, Chang M, *et al.* Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303, 808–813 (2004).

ABREVIATURAS

α -CACR	α -Cetoácidos de cadena ramificada
α -CG	α -Cetoglutarato
α -CIC	α -Cetoisocaproato
α -CIV	α -Cetoisovalerato
α -CMV	α -Ceto- β -metilvalerato
aa	Aminoácido(s)
AACR	Aminoácidos de cadena ramificada
AcCoA	Acetil CoA
β -gal	β -galactosidasa
BSA	Albúmina de suero bovino
CoA	Coenzima A
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad Óptica
G418	Geneticina
Ile / I	Isoleucina
Leu / L	Leucina
MM	Medio mínimo compuesto por sulfato de amonio, glucosa, vitaminas, sales y elementos traza
NAT	Nourseotricina
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranósido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pl	Punto isoeléctrico
PP	Piridoxal 5'-fosfato
rpm	Revoluciones por minuto
T. A.	Temperatura ambiente
Thr	Treonina
TPP	Tiamina pirofosfato
UTR	<i>Untranslated Region</i> , región no traducida
Val / V	Valina
VIL	Valina, isoleucina y leucina

YPD

Medio rico para levadura compuesto por extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa

GENES Y OTRAS NOTACIONES

2 μ	Secuencia de replicación autónoma
<i>ade2</i>	Delección del gen <i>ADE2</i>
Bat1	Transaminasa mitocondrial de aminoácidos de cadena ramificada
<i>BAT1</i>	Gen que codifica para la transaminasa mitocondrial de aminoácidos de cadena ramificada Bat1
<i>BAT1-TAP</i>	Fusión del módulo TAP al extremo carboxilo terminal del gen <i>BAT1</i>
<i>bat1Δ</i>	Delección del gen <i>BAT1</i>
Bat2	Transaminasa citoplásmica de aminoácidos de cadena ramificada
<i>BAT2</i>	Gen que codifica para la transaminasa citoplásmica de aminoácidos de cadena ramificada Bat2
<i>BAT2-TAP</i>	Fusión del módulo TAP al extremo carboxilo terminal del gen <i>BAT2</i>
<i>bat2Δ</i>	Delección del gen <i>BAT2</i>
CEN	Origen de replicación centromérico
Gcn4	Activador transcripcional de genes de la biosíntesis de aminoácidos en respuesta a limitación de aminoácidos
<i>GCN4</i>	Gen que codifica para el regulador transcripcional Gcn4
<i>gcn4Δ</i>	Delección del gen <i>GCN4</i>
<i>HIS3MX6</i>	Módulo que usa como marcador de selección al gen <i>HIS3</i>
<i>his3Δ1</i>	Delección del gen <i>HIS3</i>
<i>ILV1</i>	Gen que codifica para la treonina deaminasa
<i>ILV2</i>	Gen que codifica para la acetolactato sintasa
<i>ILV3</i>	Gen que codifica para la dihidroxiácido deshidratasa
<i>ILV5</i>	Gen que codifica para la acetohidroxiácido reductoisomerasa
<i>KanMX4</i>	Módulo que confiere resistencia al antibiótico geneticina
<i>KIBAT1</i>	Gen <i>KLLA0A10307g</i> de <i>K. lactis</i> que codifica para la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada <i>KIBat1</i>
<i>Kibat1Δ</i>	Delección del gen <i>KIBAT1</i>
<i>lacZ</i>	Gen que codifica para la enzima β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>
<i>LEU1</i>	Gen que codifica para la isopropilmalato isomerasa
<i>leu2</i>	Alelo inactivo del gen <i>LEU2</i>
<i>LEU2</i>	Gen que codifica para la β -isopropilmalato deshidrogenasa

<i>leu2Δ0</i>	Delección del gen <i>LEU2</i>
<i>LEU4</i>	Gen que codifica para la α-isopropilmalato sintasa I
<i>LEU5</i>	Gen que codifica para un transportador mitocondrial involucrado en la acumulación de CoA en la matriz mitocondrial
<i>LEU9</i>	Gen que codifica para la α-isopropilmalato sintasa II
MATα	<i>Mating type</i> alfa
<i>met15Δ0</i>	Delección del gen <i>MET15</i>
NAT	Módulo que confiere resistencia al antibiótico nourseotricina
P_{BAT1} - <i>KIBAT1</i>	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>BAT1</i> a la región codificante del gen <i>KIBAT1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>
P_{BAT1} - <i>lacZ</i>	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>BAT1</i> a la región codificante del gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i>
P_{BAT2} - <i>KIBAT1</i>	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>BAT2</i> a la región codificante del gen <i>KIBAT1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>
P_{BAT2} - <i>lacZ</i>	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>BAT2</i> a la región codificante del gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i>
pKD1	Origen de replicación pKD1 que sirve para el género <i>Kluyveromyces</i>
TAP	<i>Tandem Affinity Purification tag</i> , está formado por un péptido de unión calmodulina, un sitio de corte a la proteasa TEV y dos dominios de unión a IgG de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> ; así como el marcador de selección <i>HIS3MX6</i>
<i>ura3</i>	Alelo inactivo del gen <i>URA3</i>
<i>URA3</i>	Gen que codifica para la orotidina-5'-fosfato (OMP) descarboxilasa
<i>ura3Δ0</i>	Delección del gen <i>URA3</i>