



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y REGULACIÓN
TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *KIBATI*
DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Q.F.B. KARLA CONCEPCIÓN
LÓPEZ PACHECO

Tutora: Dra. MA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ



MÉXICO, D.F.

JUNIO 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.

Análisis de la expresión y regulación transcripcional del gen *KIBAT1* de la levadura *Kluyveromyces lactis*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Ma. Alicia González Manjarrez, en el laboratorio 301 del edificio oriente en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Xóchitl Pérez Martínez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jorge Luis Folch Mallol	Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Se reconoce la asesoría, invaluable ayuda y apoyo técnico de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro durante la realización de este proyecto de Maestría.

Se reconoce la invaluable ayuda y apoyo secretarial brindado por Ma. del Rocío Romualdo Martinez del departamento de Bioquímica del IFC.

Se utilizaron los servicios de síntesis de oligonucleótidos (Biól. Dolores Minerva Mora Cabrera), secuenciación de DNA (Biól. Guadalupe Codiz Huerta) y lectura de pantallas de almacenamiento de fósforo haciendo uso del *Typhon*, que provee la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, del cual es responsable la Dra. Laura Ongay Larios.

Este 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 IN204209-3 y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT, México) a través del donativo PIFUTP08-165.

Este estudio de maestría fue apoyado con una beca para estudios de posgrado de tiempo completo otorgada por CONACYT.

El jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Vocal	Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología
Secretario	Dr. Jorge Luis Folch Mallol	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Suplente	Dra. Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Suplente	Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Ser parte de su comunidad ha sido un honor, un orgullo y un privilegio.

Al Programa de Ciencias Bioquímicas y al Instituto de Fisiología Celular

Por permitirme iniciar mis estudios de posgrado.

A la doctora Alicia González Manjarrez

Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Por haberme arrastrado a este fantástico mundo, por confiar en mi y valorar mi trabajo. Por todas las enseñanzas, por todas las agradables charlas, por toda la dedicación, empeño y pasión a la ciencia. Gracias por todo.

A los miembros de mi Comité Tutoral

A la doctora Xóchitl Pérez Martínez y al doctor Jorge Luis Folch Mallol por los invaluable consejos y apoyo brindado desde el inicio, por todos los comentarios siempre constructivos.

A los miembros del Jurado

Por tomarse el tiempo de revisar mi manuscrito, por sus comentarios y valiosas aportaciones a este trabajo.

A la secretaria del departamento de Bioquímica del IFC

Por todo la asesoría y apoyo secretarial brindado durante mi estadia en el 301 oriente.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con todo mi amor e infinito agradecimiento,

*A mamá y papá
A Cynthía y Beto
A Raúl*

Caerse está permitido. ¡Levantarse es obligatorio!
Proverbio ruso

ABREVIATURAS

α -IPM: alfa isopropilmalato

α -CIC: alfa -cetoisocaproato

α -CMV: alfa-ceto- β -metilvalerato

α -CIV: alfa-cetoisovalerato

BCAAs: aminoácidos de cadena ramificada (*Branched-Chain Amino Acids*).

BCAT: transferasa de aminoácidos de cadena ramificada (*Branched-Chain Amino Transferase*).

DO: densidad óptica

GABA: ácido γ -aminobutírico

MM: medio mínimo

NCR: represión catabólica nitrogenada (*Nitrogen Catabolite Repression*).

ORF: marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*).

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*).

pKD1: origen de replicación pKD1 para el género *Kluyveromyces*.

PLP: piridoxal 5'-fosfato

PMP: piridoxamina 5'-fosfato

mRNA: RNA mensajero (*messenger RNA*).

SDS: dodecil sulfato de sodio

UTR: región no traducida

VIL: aminoácidos de cadena ramificada, valina, isoleucina y leucina

WT: tipo silvestre (*wild type*).

YPD: medio de cultivo "rico" para levadura (Yeast-extract, Peptone, Dextrose).

CONTENIDO

Resumen	Pág. 9
1. Introducción	Pág. 10
1.1. Generalidades sobre <i>Kluyveromyces lactis</i> .	
1.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> como modelo de estudio “ancestro-tipo” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
1.3. Metabolismo del nitrógeno.	
1.4. Vía de señalización TOR (<i>Target of Rapamycin</i>).	
1.5. Metabolismo del carbono.	
1.6. Regulación retrograda.	
2. Antecedentes	Pág. 21
2.1. Metabolismo de los aminoácidos VIL.	
2.2. Las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada de <i>S. cerevisiae</i> .	
2.3. La transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de <i>K. lactis</i> .	
3. Planteamiento del problema	Pág. 27
4. Objetivos	Pág. 28
5. Materiales y Métodos	Pág. 29
5.1. Mutantes construidas para este trabajo.	
5.2. Cepas utilizadas para este trabajo.	
5.3. Medios de cultivo y soluciones utilizadas.	
5.4. Metodología.	
6. Resultados y Discusión	Pág. 43
6.1. La expresión del gen <i>KIBATI</i> se reprime en presencia de los productos finales de la vía de síntesis de valina, isoleucina y leucina (VIL).	
6.2. La expresión del gen <i>KIBATI</i> se reprime con etanol como única fuente de carbono.	
6.3. El gen <i>KIBATI</i> tiene también un patrón de expresión catabólico.	
6.4. La región promotora del gen <i>KIBATI</i> contiene las secuencias consenso de unión a Gcn4 y Gln3 de <i>S. cerevisiae</i> .	
6.5. Actividad β -galactosidasa bajo el promotor de <i>KIBATI</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	
6.6. El factor transcripcional <i>KIGln3</i> ortólogo a Gln3 de <i>S. cerevisiae</i> .	
6.7. El factor transcripcional <i>KlIleu3</i> ortólogo a Leu3 de <i>S. cerevisiae</i> .	

6.8. Localización subcelular de la proteína *KIBat1*.

7. Conclusiones

Pág. 65

- 7.1. La aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis*, *KIBat1*, cataliza la biosíntesis y el catabolismo de valina, isoleucina y leucina.
- 7.2. El perfil de expresión del gen *KIBATI* corresponde al de un gen biosintético.
- 7.3. La expresión del gen *KIBATI* se encuentra reprimida durante el metabolismo respiratorio.
- 7.4. El gen *KIBATI* tiene también un perfil de expresión catabólico.
- 7.5. El promotor de *KIBATI* comparte con *BAT1* y *BAT2*, los sitios consenso de unión de los factores de transcripción codificados por *GCN4*, *GLN3* y *NRG1* de *S. cerevisiae*.
- 7.6. El uso del sistema reportero β -galactosidasa en un sistema heterólogo no fue de utilidad para *KIBATI* al encontrarse resultados contradictorios.

8. Perspectivas

Pág. 68

- 8.1. Papel de los factores codificados por *KIGCN4*, *KIGAT1*, *KINRG1* y *KIURE2* en la expresión de *KIBATI*.
- 8.2. Determinar si los factores *KIGln3* y *KIGcn4* complementan la función de sus ortólogos en *S. cerevisiae*.
- 8.3. ¿Qué tamaño tiene el promotor verdadero de *KIBATI*?
- 8.4. Analizar la importancia de la sublocalización nuclear de *KIBat1*.

9. Referencias

Pág. 69

10. Apéndices

Pág. 73

- 10.1. Alineación de secuencias.
- 10.2. Artículo.

RESUMEN

Kluyveromyces lactis es una levadura aerobia estricta de metabolismo respirofermentativo, perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae*. Por medio de diversos análisis filogenéticos se ha determinado la distancia evolutiva entre los géneros *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, sugiriéndose que el primer linaje divergió del segundo antes de la duplicación del genoma completo, por lo cual las levaduras del linaje de *Kluyveromyces* presentan una sola copia de aquellos genes que en el linaje de *Saccharomyces* están duplicados.

Al duplicarse el genoma de un organismo como el de *S. cerevisiae*, muchos de sus genes sufren una pérdida de función convirtiéndose en pseudogén. Sin embargo, algunos parálogos se conservan y pueden subfuncionalizarse o neofuncionalizarse. De acuerdo a esta premisa, se ha planteado que la conservación de algunos genes duplicados es la que le permitió la adaptación al metabolismo facultativo y probablemente la subfuncionalización de una de las copias en el par de genes duplicados.

Para abordar el estudio de la divergencia evolutiva, nos hemos enfocado en el metabolismo nitrogenado, para lo cual hemos comparado el patrón de expresión de los genes parálogos (duplicados) *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* con su correspondiente gen ortólogo de *K. lactis*.

K. lactis contiene un gen ortólogo a los parálogos *BAT1* y *BAT2*, al que hemos nombrado *KIBAT1* y que tiene una identidad aproximada del 80% en la secuencia de aminoácidos, con cada uno de ellos. Se supone que codifica para una enzima que cataliza la transaminación reversible de los aminoácidos de cadena ramificada, valina, isoleucina y leucina (VIL) a sus respectivos α -cetoácidos. Algunos datos experimentales sugieren que *KIBat1* está implicada en la biosíntesis de los aminoácidos VIL así como en su catabolismo. Así mismo, diversos análisis *in silico* sugieren que esta aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis* se encuentra en la mitocondria.

Los resultados de esta tesis mostraron que a pesar que *KIBAT1* codifica para una enzima biosintética y catabólica, su perfil de expresión corresponde al de un gen biosintético, haciéndolo más parecido a su ortólogo *BAT1*. Por otro lado, en cuanto a la regulación por los factores transcripcionales *KIGln3* y *KILeu3* (ortólogo a *Gln3* y *Leu3* de *S. cerevisiae*), estos parecen tener una respuesta transcripcional distinta a la reportada para *S. cerevisiae*.

Finalmente, respecto a la localización subcelular de la proteína *KIBat1*, ésta se encontró en el núcleo, lo que pudiera sugerir una actividad alterna a la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, que será importante analizar a detalle en estudios futuros.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre *Kluyveromyces lactis*.

Kluyveromyces lactis es una levadura perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae* de metabolismo aerobio (Breunig, *et al.*, 2000) que originalmente fue aislada de productos derivados de la leche por lo que tiene la capacidad de asimilar lactosa y convertirla en ácido láctico a diferencia de otras levaduras, habilidad que le da el nombre y la distingue de otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. El tamaño de su genoma se ha estimado en 12 Mb con un contenido G + C de 40% mientras que el cariotipo ha revelado la presencia de 6 cromosomas que varían en tamaño de 1 a 3 Mb (figura 1) (Sor y Fukuhara, 1989).

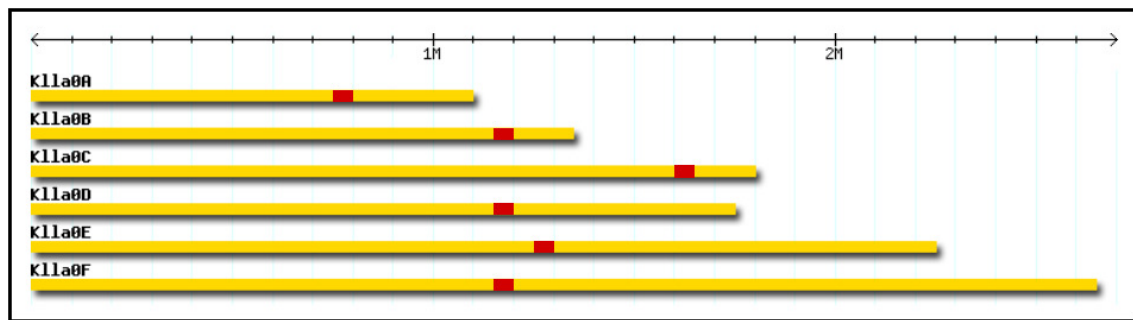


Figura 1. Mapa de los cromosomas de *Kluyveromyces lactis*. A la izquierda el nombre de cada cromosoma y en rojo la posición del centrómero.

En cuanto a su DNA mitocondrial, este es una molécula circular que mide 40 Kb. En promedio tiene 30 copias por genoma haploide, lo cual equivale al 10% del DNA genómico. La conservación del DNA mitocondrial es esencial por lo cual es clasificada como levadura “petit negativa” (Schaffrath y Breunig, *et al.*, 2000), ya que mutantes afectadas en el DNA mitocondrial (*petites*) no son viables.

La secreción de toxinas letales es una estrategia común entre los microorganismos que les confiere ventajas selectivas sobre otros organismos (Jablonowski, D. y Schaffrath, R, 2007). Algunas cepas de *K. lactis* contienen un par de plásmidos lineales, pGKL1 (8.8 Kb) y pGKL2 (13.4 Kb), que expresan un fenotipo *killer* hacia varias cepas de *S. cerevisiae*, principalmente,

induciendo un arresto en la fase G1 del ciclo celular impidiendo la duplicación (Chen, X.J., 1996).

El hábitat natural de *K. lactis* es diverso, sin embargo, la mayoría de las especies fueron originalmente aisladas de productos derivados de la leche. Adicionalmente, es una levadura de gran interés biotecnológico ya que es capaz de crecer hasta una alta densidad celular y secretar proteínas heterólogas eficientemente. Siendo un ascomiceto cercanamente relacionado a *S. cerevisiae*, *K. lactis* se ha convertido en un atractivo modelo alternativo por sus características metabólicas y fisiológicas.

Habitualmente, *K. lactis* se cultiva en medio para levadura a una temperatura de 28 °C y aunque su ciclo celular es similar al de *Saccharomyces cerevisiae*, las diploides no son estables esporulando rápidamente.

1.2. *Kluyveromyces lactis* como modelo de estudio “ancestro-tipo” de *Saccharomyces cerevisiae*.

La duplicación génica ha sido reconocida como la mayor fuente de generación de nuevos genes y funciones y puede involucrar desde genes individuales o segmentos genómicos hasta genomas completos (Hittinger C.T. y Carroll, S.B., 2007). La duplicación del genoma completo (WGD, por sus siglas en inglés) es un fenómeno fascinante aunque poco comprendido. Sin embargo, se entiende como un mecanismo evolutivo de gran importancia.

Filogenéticamente, el linaje de *Kluyveromyces* está clasificado relativamente cerca del linaje de *Saccharomyces* por medio de diversos análisis bioinformáticos a partir de alineamientos de secuencias de proteínas concatenadas codificadas por su DNA mitocondrial (Nosek, *et al.*, 2005) así como de las secuencias del RNA ribosomal 18S (figura 2).

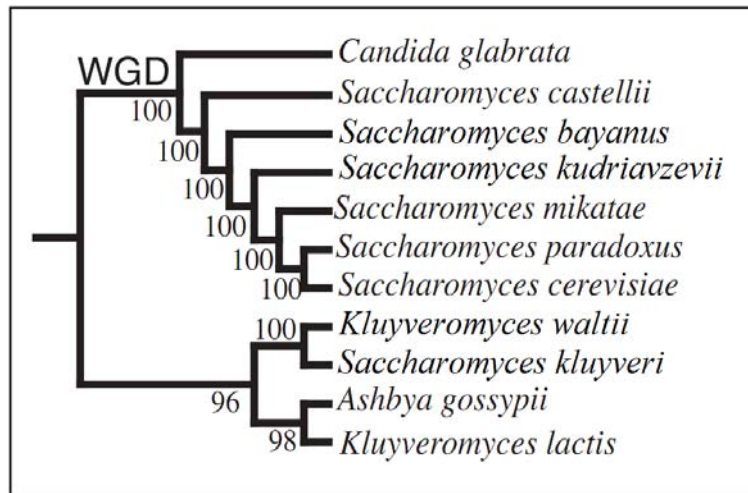


Figura 2. Arreglo filogenético de los hemiascomicetos basado en las secuencias del RNA ribosomal 18S. WGD indica el clado que contiene las especies cuyos genomas experimentaron una duplicación del genoma completo. (Modificada de Fitzpatrick, D.A., *et al.*, 2006).

Diversos análisis han sugerido que el linaje de *Kluyveromyces* divergió del linaje de *Saccharomyces* antes de la duplicación del genoma completo hace aproximadamente 100 millones de años (Sugino, *et al.*, 2005) a partir de un ancestro común, mientras que todas las especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. paradoxus* y *S. mikatae*) divergieron después de ésta y por lo tanto, comparten muchos de los genes duplicados a pesar que la mayor parte de las copias, producto de la duplicación ancestral, se han perdido (Kurtzman y Robnett, 1998).

Al comparar los genomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces waltii*, Kellis y Col. (2004) encontraron varias regiones compartidas en ambas levaduras además de varios bloques con sintenia conservada (figura 3).

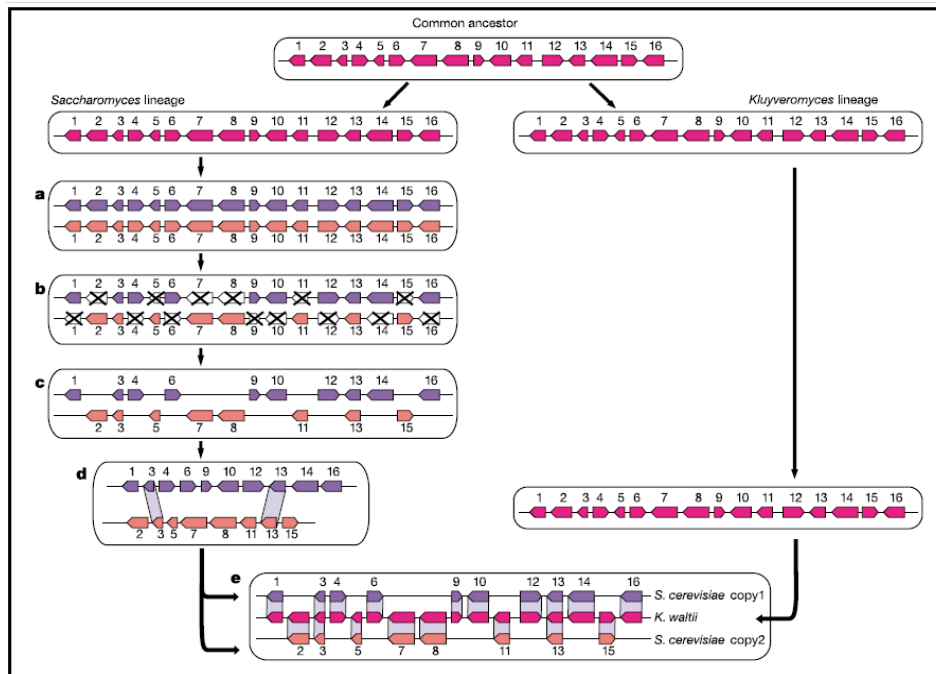


Figura 3. Modelo de duplicación del genoma completo. **a.** Después de la divergencia de *K. waltii*, el linaje de *Saccharomyces* experimentó una duplicación de su genoma, generándose una copia adicional de cada cromosoma. **b.** La gran mayoría de los genes duplicados sufrieron mutaciones y por consiguiente se perdieron. **c.** Algunos segmentos se retuvieron, conservándose dos copias para algunos de los genes duplicados; en este caso se ilustra la conservación de los genes 3 y 13. **d.** Rearreglo de los segmentos cromosómicos. **e.** Comparación de los cromosomas duplicados de *S. cerevisiae* con el de *K. waltii* donde se observa la conservación de la sintenia (Kellis *et al.*, 2004).

De acuerdo a la evidencia molecular, se han planteado diversos modelos que expliquen tanto el proceso por el cual se llevó a cabo la duplicación del genoma completo como el por qué las especies originadas después de la duplicación genómica son organismos anaerobios facultativos, al mejorar la metabolización de la glucosa y el crecimiento en condiciones anaeróbicas (Wolfe y Shields, 1997; Kuepfer, *et al.*, 2005), mientras que aquellos organismos que divergieron antes del evento de duplicación son organismos aerobios estrictos, como *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces waltii*, y *Ashbya gossypii*.

Como ya se mencionó, los genes duplicados pueden tener diferentes destinos de acuerdo a diversos modelos que se han planteado (figura 3). El primero, consiste en que una de las copias pueda ser redundante y acumular mutaciones deletéreas que eventualmente la convierten en un pseudogén (no-funcionalización). En tanto que si una de las copias mantiene la función original,

la copia adicional puede divergir aleatoriamente, adquiriendo así una nueva función (neofuncionalización).

Por el contrario, si cada gen del par duplicado se subfuncionaliza, entonces cada copia experimentará pérdidas degenerativas complementarias, de manera que ambas copias se requerirán para cumplir la función ancestral, que lleva a cabo una sola copia del gen.

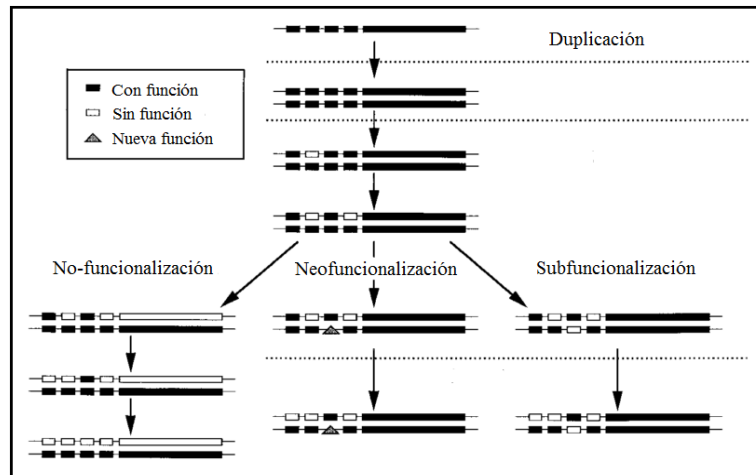


Figura 4. Tres probables destinos de los genes duplicados. Modificada de Force, A., *et al.*, 1999

La subfuncionalización es uno de los modelos más ampliamente utilizados para explicar la preservación de los genes duplicados y que también se conoce como el modelo de Duplicación-Degeneración-Complementación o DDC (figura 4) (Force, *et al.*, 1999; Lynch y Force 2000; Lynch *et al.* 2001).

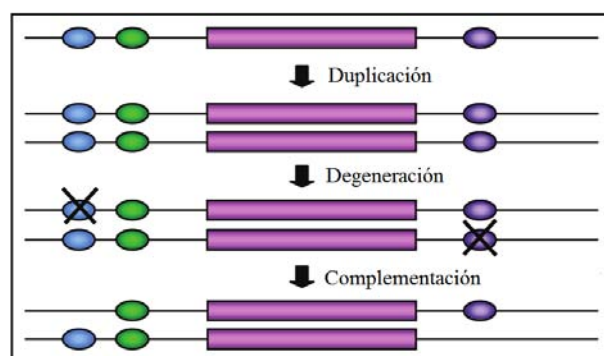


Figura 5. Modelo DDC o de subfuncionalización. Modificada de Hurley, I. *et al.* 2005

Varios estudios muestran que la frecuencia con la que divergen las regiones intergénicas y las regiones codificantes es distinta (Tirosh y Barkai, 2008a; Tirosh y Barkai 2008b). Adicionalmente, el estudio de Wapinski, *et al* (2007) sugiere que la principal limitante en la conservación de los duplicados es la dosis génica (conservación de la estequiometría de los complejos proteicos), y por lo tanto la mayoría de las copias de genes migra hacia un nuevo complejo proteico al subfuncionalizarse en la región regulatoria aunque conservando funciones similares.

Dada la conservación de algunos genes duplicados se ha sugerido que ésta sea lo que permitió la adaptación al metabolismo facultativo (Conant y Wolfe, 2007). Una característica importante respecto a la mitocondria que distingue a *K. lactis* de *S. cerevisiae*, es que *K. lactis* no puede crecer bajo condiciones anaeróbicas puesto que su fisiología está orientada al metabolismo respiratorio mientras que el de *S. cerevisiae* es esencialmente fermentativo (Zivanovic, *et al.*, 2005).

1.3. Metabolismo del nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para todas las formas de vida. Evolutivamente, la presión de selección ha favorecido a las células para ser capaces de transportar y catabolizar una amplia variedad de compuestos nitrogenados, así como la capacidad de sintetizar endógenamente todas las moléculas nitrogenadas primarias (Godard, *et al.*, 2007).

S. cerevisiae es capaz de utilizar diferentes compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, amonio, bases nitrogenadas, y derivados purínicos. Éstas moléculas entran a la célula mediante permeasas e inmediatamente después de su ingreso, son utilizadas en reacciones de biosíntesis o degradadas para la obtención de nitrógeno en forma de amonio (por desaminación), glutamato (por transaminación) o ambos (Courchesne y Magasanik, 1983). Posteriormente, mediante la condensación de glutamato y amonio, se sintetiza glutamina por la glutamino sintetasa (*GLNI*).

Glutamato y glutamina son las dos mayores fuentes donadoras de nitrógeno en las reacciones de biosíntesis. Como se observa en la figura 6, las fuentes nitrogenadas, amonio, glutamato y

glutamina están interconectadas formando el *core* del metabolismo nitrogenado (Godard, *et al.*, 2007).

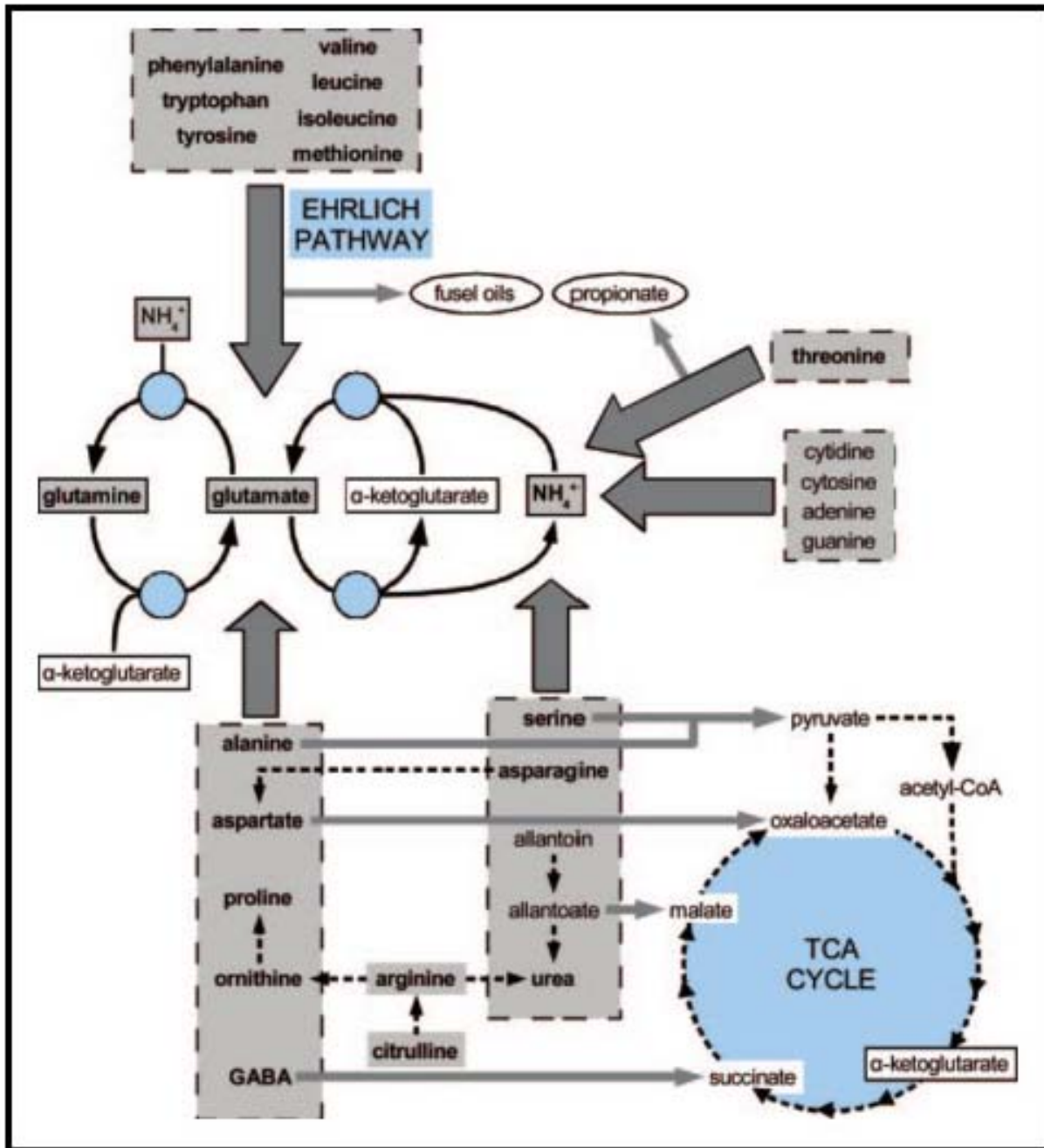


Figura 6. Algunas de las reacciones involucradas en la utilización de las fuentes nitrogenadas (recuadros grises) en la levadura *S. cerevisiae*. Tomada de (Godard, *et al.*, 2007).

Los reguladores transcripcionales de genes implicados en la biosíntesis de compuestos nitrogenados pueden ser de dos tipos: reguladores específicos que afectan la expresión de los genes en una ruta biosintética y reguladores globales, que están involucrados en el control general de la biosíntesis de aminoácidos (General Amino Acid Control, GAAC) .

En el GAAC, el factor transcripcional Gcn4 se encuentra activo en células deprivadas de aminoácidos (Godard, P., *et al.*, 2007). Bajo esta condición, la proteína cinasa Gcn2 lleva a cabo la fosforilación del factor de iniciación 2 de eucariotes (eIF2) promoviendo la traducción del mRNA de Gcn4 (Hinnebusch, 2005). De esta forma, Gcn4 es quien activa la expresión de un gran número de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Maaheimo, *et al.*, 2001); sin embargo, de no haber deficiencia de aminoácidos, un nivel basal de Gcn4 es requerido para la transcripción de varios genes tales como , *ARG4*, *ARG3* y *ARO3* (Natarajan, K, *et al.*, 2001). Posteriormente, Gcn4 promueve la transcripción de un gen, reconociendo en el promotor correspondiente, la secuencia consenso 5'-TGACTC-3', seguida de regiones ricas en timidina (Hinnebusch, 2005).

Por otra parte, el catabolismo del nitrógeno se encuentra regulado por el mecanismo conocido como Represión Catabólica Nitrogenada (NCR, por sus siglas en inglés) y por los factores transcripcionales Gln3 y Gat1 (positivos) y Dal80 y Deh1 (negativos), que forman parte de la familia de los factores GATA. Estos reguladores se unen a una secuencia consenso 5'-GAT(T/A)AG-3' en la región promotora por medio de un dedo de zinc (Hofman-Bang, 1999).

Cuando en el medio hay presente una fuente represora de nitrógeno como amonio o glutamina, la transcripción de los genes que codifican para las proteínas implicadas en el transporte y degradación de las fuentes secundarias de nitrógeno como GABA o prolina se encuentran reprimidas y estos únicamente se transcriben cuando el medio se adiciona de fuentes secundarias de nitrógeno en ausencia o de fuentes represoras (Boer, *et al.*, 2007).

Las fuentes de nitrógeno son transportadas al interior de la levadura en contra del gradiente de concentración por una permeasa general de aminoácidos (Gap1) que tiene gran capacidad y poca

afinidad. Adicionalmente, la expresión de los genes que codifican para permeasas generales de aminoácidos y de amonio, también son reguladas por estos factores transcripcionales (Magasanik, B. y Kaiser, 2002).

Una vez que los compuestos nitrogenados han ingresado a la célula son dirigidos a la vacuola para almacenamiento hasta que sean requeridos, y posteriormente pueden ser incorporados directamente a las vías de síntesis o ser degradados a amonio y glutamato ya sea por desaminación o transaminación, respectivamente. A su vez, la levadura es capaz de sintetizar algunos de los aminoácidos que requiera a partir de glutamina o glutamato y de esqueletos de carbono (Hofman-Bang, 1999).

1.4. Vía de señalización TOR (*Target of Rapamycin*).

La rapamicina es un potente antifúngico y macrólido inmunosupresor originalmente aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, que como efecto ocasiona una detención de células de levadura y de mamífero en la fase G1 del ciclo celular. En *Saccharomyces cerevisiae*, la rapamicina inhibe la función de las proteínas Tor1 y Tor2, mientras que una mutación puntual en *TOR1* y *TOR2* genera una resistencia a ella (Dennis, P.B., et al., 1999).

La vía de señalización TOR, sensible a rapamicina en *S. cerevisiae*, activa un programa de proliferación celular en respuesta a la presencia y calidad de nutrientes (nitrógeno y carbono) en el cual las cinasas Tor1 y Tor2, controlan la síntesis y degradación de proteínas citoplasmáticas (Beck y Hall, 1999).

La función del complejo TORC1 es evaluar la calidad de los nutrientes, entre ellos, la fuente de nitrógeno. Bajo condiciones de nitrógeno represoras (glutamina), TORC1 fosforila a Gln3 y como consecuencia promueve la formación del complejo Gln3-Ure2 de tal forma que Gln3 permanece en el citoplasma y no puede promover la transcripción de sus genes blanco (Cooper, 2002).

Cuando en el medio hay presente una fuente de nitrógeno no-represora (o en presencia de rapamicina), TORC1 es inhibido y el complejo TAP42-Sit4 se disocia de manera que Sit4 es capaz de defosforilar a Gln3, perdiéndose su interacción con Ure2. En estas condiciones, Gln3 es capaz de ingresar al núcleo y activar sus genes blanco (figura 7) (Zaman, *et al.*, 2008).

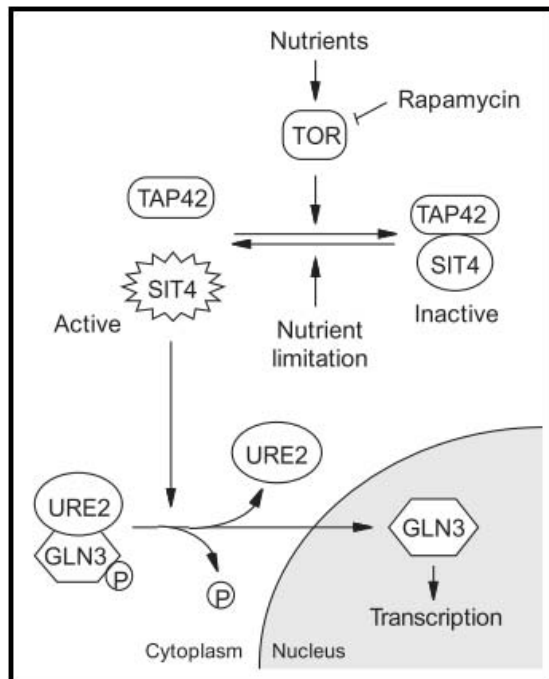


Figura 7. Mecanismo de translocación de la proteína Gln3 al núcleo por la vía de señalización TOR (Beck y Hall, 1999)

1.5. Metabolismo del carbono.

Las levaduras tienen la capacidad de obtener energía a través de la fermentación de una gran variedad de azúcares, sin embargo, glucosa y fructosa parecen ser las preferidas, aun sobre otros mono, di y trisacáridos como sacarosa, rafinosa y trehalosa que pueden ser convertidos directamente a glucosa o fructosa (Zaman, S. *et al.*, 2008). Cuando uno de estos azúcares está presente, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes de carbono alternativas son sintetizadas a baja escala o pueden no estar siendo sintetizadas, fenómeno conocido como represión catabólica por carbono (Gancedo, JM., 1998). Adicionalmente, algunos estudios han reportado la represión catabólica por carbono como regulador de permeasas de aminoácidos en *S. cerevisiae* (Peter, G.J, *et. al.*, 2006).

Así mismo, también son capaces de obtener energía de la oxidación de una gran variedad de productos de fermentación como glicerol, etanol y lactato (Zaman, S. *et al.*, 2008). Sin embargo, prefieren aquellas fuentes de carbono fermentables a cualquiera que sea metabolizada por oxidación. A pesar de esto, sustratos no-fermentables como etanol, glicerol, lactato, acetato u oleato, también pueden ser utilizados para la generación de energía y biomasa celular. Varias redes regulatorias de la represión catabólica están implicadas en la biosíntesis coordinada de las enzimas requeridas para la degradación de éstas fuentes alternas.

Cuando las levaduras se cultivan en presencia de glucosa, ésta es degradada por fermentación hasta etanol. Este compuesto se transporta al medio y durante la fase diáuxica, cuando la glucosa del medio se ha agotado por completo, el etanol excretado se utiliza como fuente de energía, reprogramándose los procesos metabólicos para consumir el etanol mediante fosforilación oxidativa. La fase diauxica de crecimiento presenta una velocidad mucho menor que la fase de crecimiento inicial en la que la glucosa es la única fuente de carbono.

2. ANTECEDENTES

2.1. Metabolismo de los aminoácidos VIL.

Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs, por sus siglas en inglés), valina, isoleucina y leucina (VIL) son los más hidrofóbicos de todos los aminoácidos y juegan un papel fundamental en la determinación de la estructura terciaria de las proteínas así como la interacción de los dominios transmembranales de las proteínas de membrana con la bicapa de fosfolípidos (Brosnan y Brosnan, 2006).

En *S. cerevisiae*, el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada BCAAs consiste en la utilización del piruvato y la treonina, a partir de los cuales sintetizan valina e isoleucina, respectivamente. Por el contrario, la leucina se sintetiza a partir de un derivado de la ruta de la valina. Los aminoácidos V, I, L, fungen como reguladores negativos de su propia biosíntesis, ya que inhiben a la enzima inicial específica para cada uno de ellos. Por ejemplo, la isoleucina inhibe a la *ILV1*, la valina inhibe a la *ILV2* y la leucina inhibe a *LEU4* y *LEU9* (Figura 8) (Kohlhaw, G.B., 2003). El último paso para la biosíntesis y el primer paso del catabolismo de los BCAAs es común para los tres y se lleva a cabo por dos aminotransferasas (BCATs, por sus siglas en inglés). Éstas transaminasas, llamadas Bat1 y Bat2, han sido identificadas: el gen *BAT1* codifica para una isoforma mitocondrial, mientras que *BAT2* codifica para una isoforma citosólica (Kispal, G., *et al.*, 1996 y Colón, M., *et al.*, 2011).

Las secuencias de aminoácidos de Bat1 (43.6 kDa, incluyendo su pre-secuencia mitocondrial) y de Bat2 (41.6 kDa) muestran 77% de identidad. Ambas proteínas comparten cerca del 50% de aminoácidos con BCATs de otras especies como las de humano (BCAT), ratón (ECA39) y *Schizosaccharomyces pombe*, entre otras y en menor proporción (24%) con IlvE, la transaminasa de *E. coli* (Prohl, C. *et al.*, 2000).

Se ha reportado que las proteínas BCAT de humano funcionan como dímeros (Davoodi, J., *et al.*, 1998) y mediante ensayos de entrecruzamiento se ha determinado que la proteína Bat1 de *S.*

cerevisiae forma homodimeros, sugiriendo que esto constituya su forma funcional (Prohl, C. *et al.*, 2000).

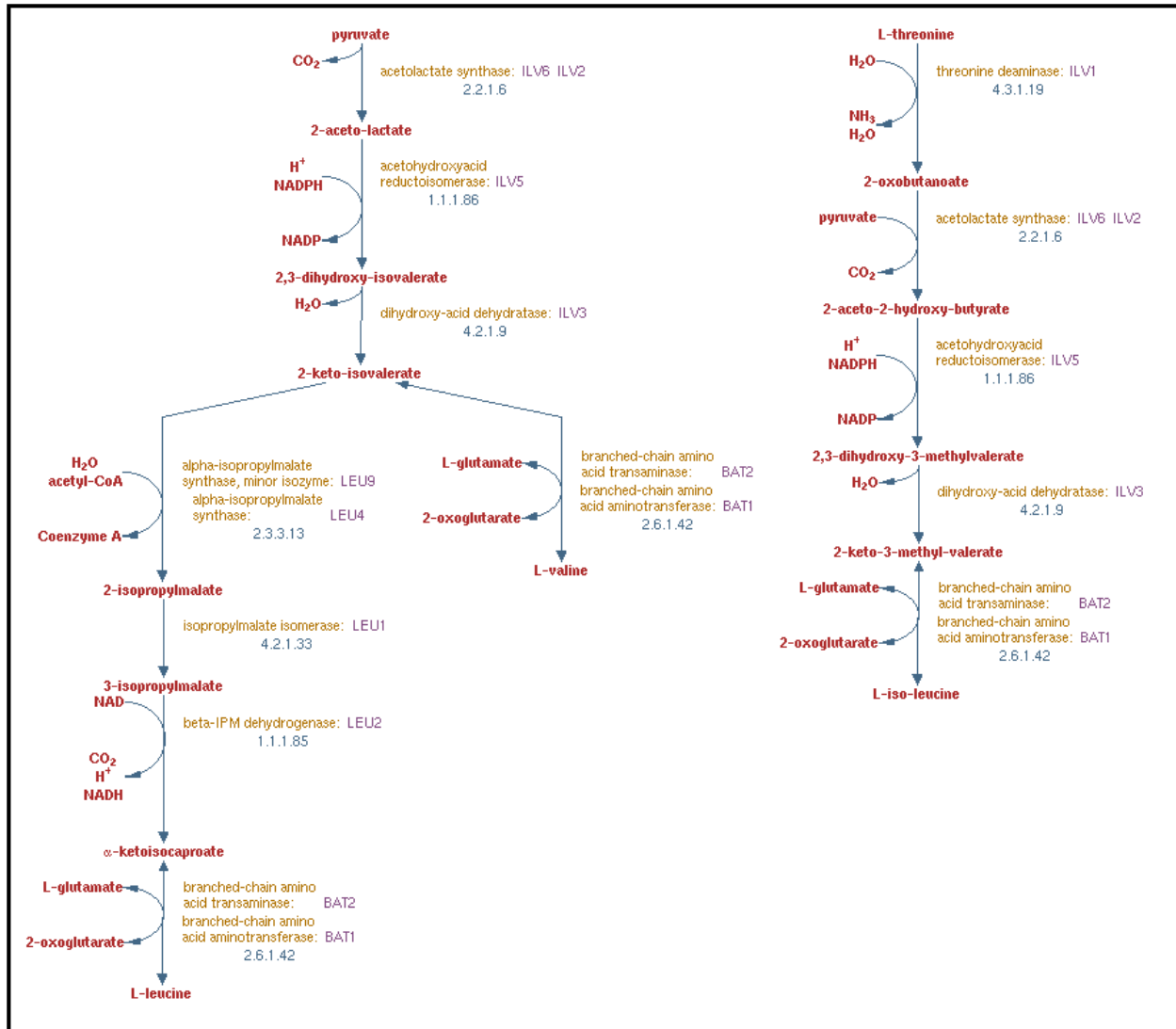


Figura 8. Ruta de síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada (valina, isoleucina y leucina). Tomada de <http://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2&detail-level=3&detail-level=4>

Las características organolépticas de la cerveza dependen de diferentes compuestos que son originados de productos de desecho que son producidos durante la fermentación. Estos compuestos organolépticos son alcoholes alifáticos y aromáticos conocidos como alcoholes *fusel* (del alemán “licor malo”) (Hazelwood, L.A., *et al.*, 2008) y que tienen gran impacto en el sabor y olor de los productos fermentados (Eden, A., *et al.*, 2001).

Los alcoholes *fusel*, son derivados del catabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina, por medio de la vía propuesta por Ehrlich (Ehrlich, 1904) (Eden, A., *et al.*, 2001). Después de la transaminación inicial, el α -cetoácido resultante no puede ser redireccionado al metabolismo central del carbono por lo que se convierte en alcoholes *fusel* por medio de la vía Ehrlich y finalmente se excretan directamente al medio (figura 9) (Dickinson J.R., 1993).

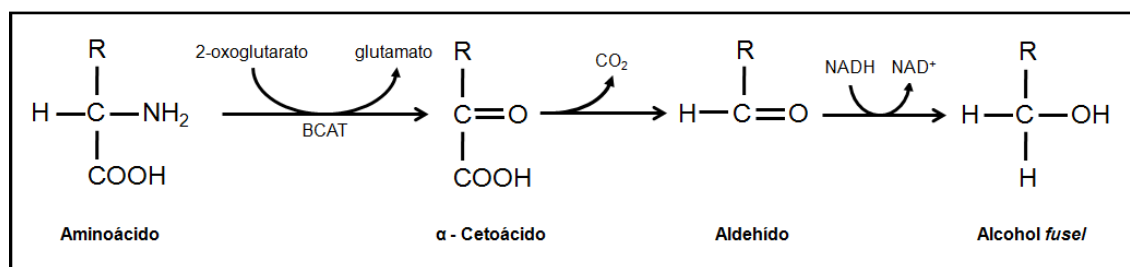


Figura 9. Después de que los α -cetoácidos son excretados al medio de crecimiento, las levaduras los convierten en alcoholes fusel a través de la vía Ehrlich. La reacción de transaminación por la cual se generan los α -cetoácidos correspondientes, es catalizada por las transferasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCATs, Bat1 y Bat2). Posteriormente, los alcoholes fusel son sintetizados a través de la descarboxilación y reducción de los α -cetoácidos generados.

2.2. Las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae*.

Las transaminasas o aminotransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino entre un aminoácido y un oxoácido en dos reacciones primarias. La primera reacción se da entre un sustrato y un producto que son específicos para cada reacción, mientras que para la segunda suelen intervenir α -cetoglutarato y L-glutamato, aunque pueden utilizarse otros compuestos. Las transaminasas utilizan piridoxal 5'-fosfato, derivado de la vitamina B6, que es

uno de los cofactores más utilizados por enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos (Mehta, P.K. *et al.*, 1993).

La reacción del catabolismo de los BCAAs, es catalizada en dos pasos principalmente. La primera reacción consiste en la desaminación reversible, catalizada por las isoenzimas aminotransferasas de cadena ramificada (*BAT1* y *BAT2*) que utilizan piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor. De esta reacción se liberan los α -cetoácidos ramificados y glutamato. El segundo paso es el proceso en el que el esqueleto de carbono puede ser catalizado por el complejo deshidrogenasa de los α -cetoácidos para producir Acil-CoAs ramificados, acetil-CoA o succinil-CoA (Mainul-Islam, *et al.*, 2007); o bien el cetoácido utilizado es descarboxilado, posteriormente es oxidado o reducido para producir ácidos *fusel* o alcoholes *fusel* respectivamente a través de la vía Ehrlich que se describió anteriormente (Hazelwood *et al.*, 2006).

Como ya se mencionó, los genes *BAT1* (mitocondrial) y *BAT2* (citosólica) de *S. cerevisiae*, codifican para dos enzimas BCAT 77% idénticas que catalizan la transaminación reversible de los aminoácidos de cadena ramificada VIL a sus respectivos α -cetoácidos: α -cetoisocaproato, α -ceto- β -metilvalerato y α -cetoisovalerato (Kispal G, *et al.*, 1996). Datos de nuestro laboratorio han mostrado que a pesar que las dos BCATs de *S. cerevisiae* pueden llevar a cabo la biosíntesis y el catabolismo de los BCAAs, la proteína Bat1 es una enzima principalmente biosintética mientras que aquella que codifica para Bat2 tiene un papel principalmente catabólico.

La divergencia de expresión de los parálogos *BAT1* y *BAT2*, refleja la divergencia fisiológica de la biosíntesis y el catabolismo ya que el primero se expresa principalmente en condiciones biosintéticas, mientras que el segundo se expresa en mayor proporción en condiciones catabólicas (figura 10) (Colón, M. *et al.*, 2010).

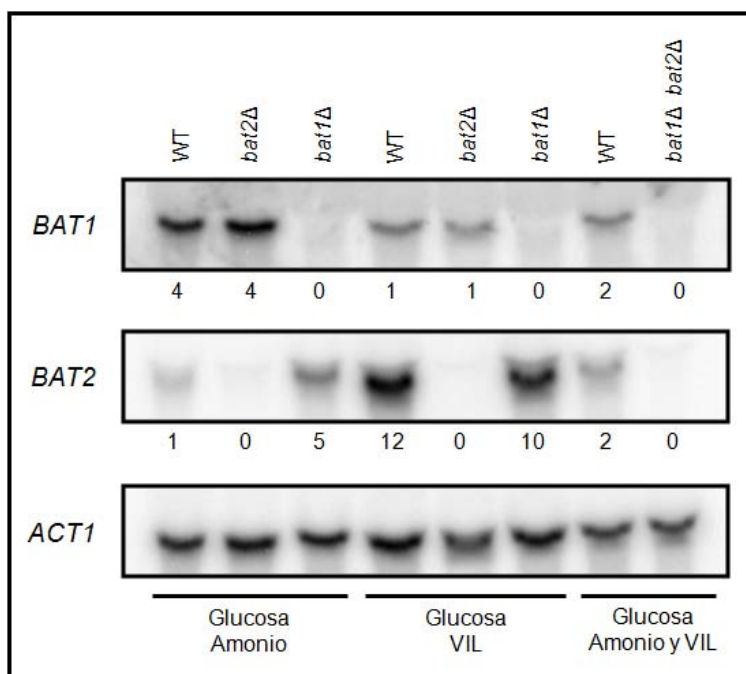


Figura 10. Northern blot de las mutantes *bat1Δ* y *bat2Δ* en las condiciones de biosíntesis (glucosa-amonio) y de catabolismo (glucosa-VIL) (Colón, M. *et al.*, 2011).

Como se observa en la figura 10, en una condición biosintética (glucosa-amonio) la expresión de *BAT1* es 4 veces mayor que la de *BAT2*, mientras que en ausencia de *BAT1* la expresión de *BAT2* compensa esta falta y aumenta 5 veces su expresión. En contraste, en una condición catabólica (glucosa-VIL), la expresión de *BAT2* es 12 veces mayor que la de *BAT1* pues bajo estas condiciones su expresión disminuye 4 veces con respecto a la condición biosintética. Los resultados anteriores sugieren que la condición biosintética induce la expresión de *BAT1* mientras que la condición catabólica induce la expresión de *BAT2*.

2.3. La transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis*.

Kluyveromyces lactis contiene un gen ortólogo al par *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* que se supone codifica para una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada. El marco de lectura abierto mide 1,224 nucleótidos y en el proyecto Genolevures se encuentra anotado como KLLA0A10307g o KLLA-ORF10127 (<http://genolevures.org/elt/KLLA/KLLA0A10307g>). Para fines prácticos, en nuestro laboratorio se ha denominado a este gen como *KIBAT1*.

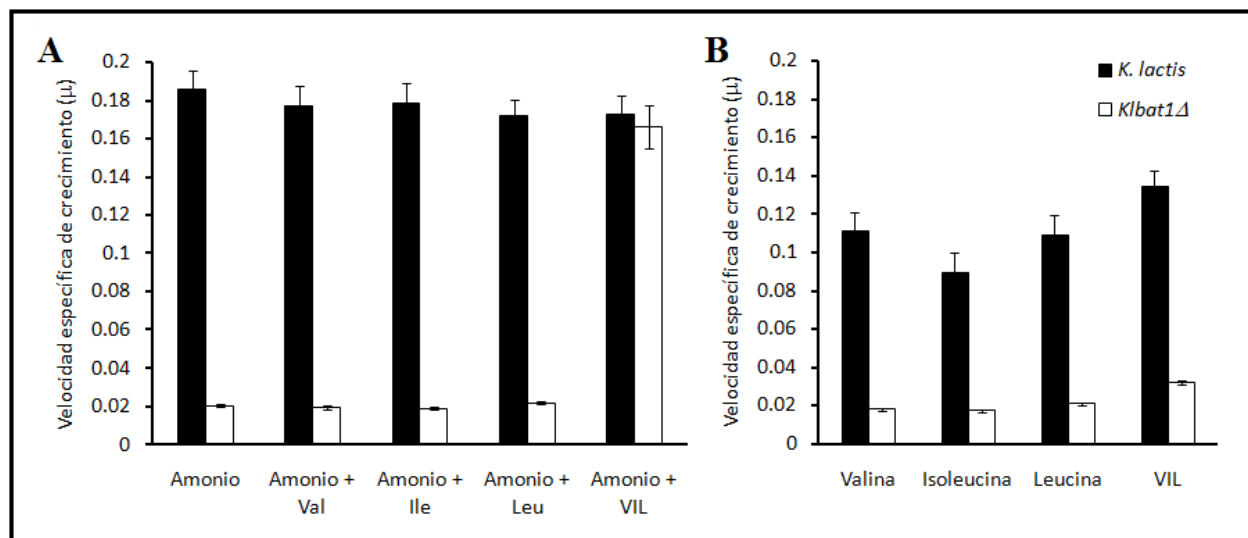


Figura 11. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas *K. lactis* y *Klbat1Δ*. A) Condición biosintética. B) Condición catabólica. (Maritrini Colón, 2011)

Cuando una mutante *Klbat1Δ* se cultiva en medio con glucosa y amonio como única fuente de nitrógeno, se observa una auxotrofia total a valina, isoleucina y leucina y el crecimiento *tipo silvestre* se alcanza sólo si los 3 aminoácidos se añaden juntos al medio de cultivo (figura 11, pánel A). Los datos anteriormente descritos, sugieren que *KlBat1* está implicada en la biosíntesis de estos aminoácidos pues la mutante *Klbat1Δ* no crece cuando los aminoácidos se añaden como única fuente de nitrógeno, indicando que ésta enzima también está involucrada en el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (figura 11, pánel B).

En glucosa-amino la mutante *Klbat1Δ* recuperó por completo la capacidad para biosintetizar los aminoácidos, en presencia de un plásmido monocopia (pKD1) que contenía clonado el ORF de *KlBAT1* junto con su región promotora sin necesidad de añadir VIL al medio. Así mismo, en glucosa-amonio-VIL la capacidad para catabolizar los aminoácidos se restauró, pudiendo crecer de forma similar a la cepa silvestre (Maritrini Colón, 2011).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el linaje del que forma parte *Kluyveromyces lactis*, divergió antes de la duplicación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, el genoma del primero no contiene los bloques duplicados que si existen en *S. cerevisiae*.

Los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* codifican para las aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada, pertenecen a un bloque duplicado. Por su parte, el gen *KIBAT1* de *K. lactis* es el único ortólogo a dichos parálogos. Mediante un análisis de tipo fisiológico se ha determinado que el producto de este gen tiene actividad tanto biosintética como catabólica (Colón, M., *et al.*, 2011). Adicionalmente, datos de nuestro laboratorio muestran que el perfil de expresión de *BAT1* corresponde al de un gen biosintético mientras que el de *BAT2* a un gen catabólico (Fabiola Hernández, 2010).

Dado que el patrón de expresión y regulación transcripcional del gen *KIBAT1* de *K. lactis* aun no han sido estudiados, el objetivo de este trabajo consiste en analizar dicho perfil de expresión para comprender de que forma esta única proteína lleva a cabo la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina mientras que en los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae*, se observa un perfil de expresión diferente entre ellos.

Por otro lado, como ya se mencionó anteriormente, Bat1 es una enzima mitocondrial mientras que Bat2 es una enzima citosólica. Es posible que dicha compartamentalización juegue un papel importante en la subfuncionalización de las isoenzimas pues se ha determinado que Bat2 no es redundante a Bat1 (Maritrini Colón, 2011). Consideramos relevante identificar la localización subcelular de *K/Bat1* para establecer un marco comparativo de la divergencia funcional de los parálogos Bat1 y Bat2 de *S. cerevisiae*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar algunos de los elementos regulatorios que determinan el perfil de expresión del gen *KIBAT1* de *Kluyveromyces lactis* y comparar con los elementos de los genes *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar la expresión del gen *KIBAT1* en diferentes fuentes de nitrógeno usando glucosa como fuente de carbono.
- ✓ Determinar la expresión del gen *KIBAT1* en diferentes fuentes de nitrógeno etanol como fuente de carbono.
- ✓ Identificar *in silico*, los principales elementos regulatorios que determinan la expresión del gen y compararlos con sus ortólogos en *S. cerevisiae* (*BAT1* y *BAT2*).
- ✓ Determinar el papel de diferentes factores de transcripción sobre la región promotora de *KIBAT1*, en un sistema heterólogo.
- ✓ Determinar el efecto de los factores transcripcionales codificados por *KIGLN3* y *KILEU3* sobre la expresión de *KIBAT1*.
- ✓ Determinar la localización subcelular de la proteína *KIBat1*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Mutantes construidas para este trabajo

El genotipo de la cepa de *Kluyveromyces lactis* que se utilizó para la realización de los experimentos es: *Kluyveromyces lactis* 155 MATa *ade2-*, *his3-*, *ura3-*. Para fines de este trabajo, esta cepa se denomina WT.

La construcción de las mutantes *Klbat1Δ*, *Klgl3Δ* y *Klleu3Δ* se llevaron a cabo mediante reemplazo por recombinación homóloga, transformando la cepa silvestre (*K. lactis* 155) con un producto de PCR de 2,473, 2,046 y 2,119 pb respectivamente, que contenían el módulo *KanMX4* (Wach, *et. al.* 1994), que confiere resistencia al antibiótico geneticina.

Para cada mutante, se amplificaron por PCR tres módulos (indicados como 1, 2 y 3 en la figura 12) que a su vez fueron unidos mediante una cuarta reacción de PCR.

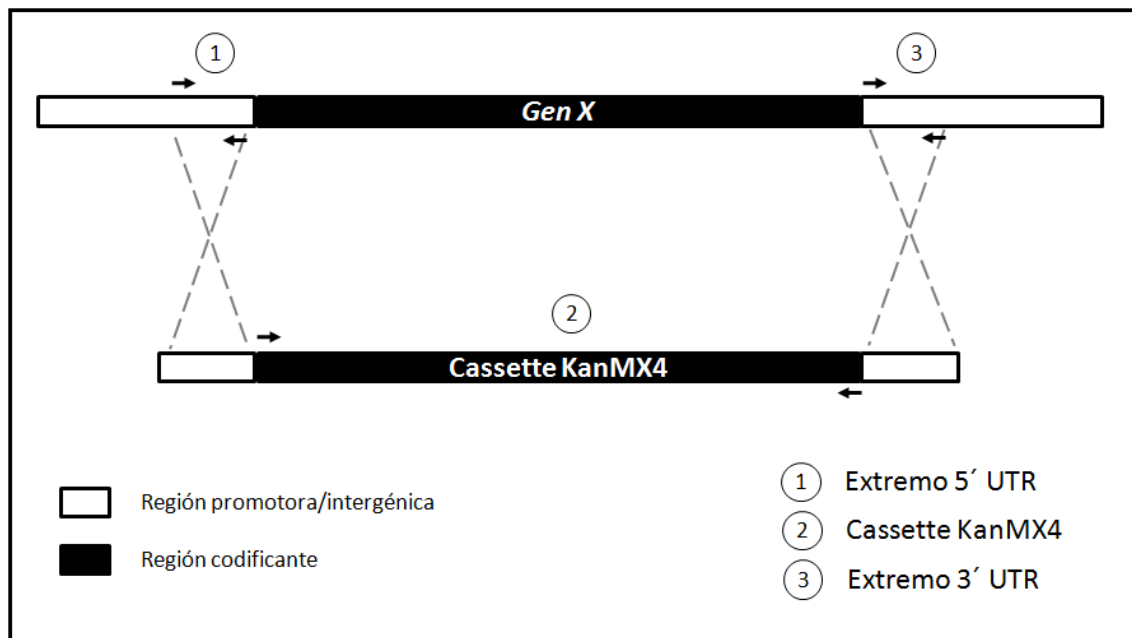


Figura 12. Esquema de la construcción de las mutantes *Klbat1Δ*, *Klgl3Δ* y *Klleu3Δ*.

Para verificar la inserción del módulo de interrupción, se amplificaron dos productos por PCR. El primero, utilizando un oligonucleótido que se alinea sobre el extremo 5' UTR y otro que se alinea sobre el módulo *KanMX4* o uno que se alinea sobre el extremo 3' UTR, para el segundo.

5.2. Cepas utilizadas para este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>Kluyveromyces lactis</i> 155	<i>MATa ade2, his3, ura3</i>	Navarro, <i>et al.</i> , 2010
Cla1	<i>MATα ura3 leu2</i>	Valenzuela, L., <i>et al.</i> , 2001
Cla1-2	<i>MATα ura3 leu2::LEU2</i>	Colón, M., <i>et al.</i> , 2010
Cla31 <i>gln3Δ</i>	<i>MATα gln3::kanMX ura3 leu2::LEU2</i>	Valenzuela, L., <i>et al.</i> , 2001
Cla32 <i>gcn4Δ</i>	<i>MATα gcn4::kanMX ura3 leu2::LEU2</i>	Hernández, H., <i>et al.</i> , 2010
Cla33 <i>leu3Δ</i>	<i>MATα leu3::kanMX ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
Cla34 <i>nrg1Δ</i>	<i>MATα nrg1::kanMX ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo
Cla35 <i>rtg3Δ</i>	<i>MATα rtg3::kanMX ura3 leu2::LEU2</i>	Este trabajo

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

5.3. Medios de cultivo y soluciones utilizadas

5.3.1. Medio YPD

Extracto de levadura	1 %
Peptona de caseína	2 %
Dextrosa anhidra	2 %
Agar (medio sólido)	2 %

Disolver en agua bidestilada, aforar y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.2. Medio Mínimo. Para preparar 1 L:

Vitaminas 1000x	1 mL
Trazas 1000x	1 mL
Sales	20 mL
Dextrosa	20 g
Sulfato de amonio	5 g
Agar (medio sólido)	25 g

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.3. Medio LB. Para preparar 1L.

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar (medio sólido)	20 g

Disolver los ingredientes y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.4. Solución A para extracción de DNA

Tritón X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100 mM
Tris-HCl, pH 8	10 mM
Na-EDTA	1 mM

5.3.5. Solución B para extracción de DNA. Se prepara al momento.

Fenol:CHCl₃:alcohol isoamílico (25:24:1).

5.3.6. Agua DEPC (agua libre de RNAsas)

Dietilpirocarbonato	0.1 %
---------------------	-------

Se agita al menos 4 horas y se esteriliza en autoclave. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.7. SOLUCIÓN TES:

Tris-HCl 10 mM, pH 7.5

EDTA 10 mM, pH 8

SDS 0.5%

Preparar a partir de las soluciones stock (en agua DEPC), aforar y esterilizar en autoclave. Conservar a temperatura ambiente indefinidamente.

5.3.8. ACETATO DE SODIO 3M, pH 5.3.

Disolver en agua DEPC. Esterilizar en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

5.3.9. MAE 10x

MOPS 0.2 M

Acetato de sodio 50 mM

EDTA 10 mM

Ajustar a pH 7 con NaOH 10N. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración protegido de la luz.

5.3.10. Tampón de muestra RNA 1.25x

Formamida desionizada 2.2 mL

Formaldehido 0.8 mL

MAE 10x 0.5 mL

Glicerol al 80% 0,4 mL

Azul de bromofenol al 2% 100 µL

Mezclar y conservar a -20 °C

5.3.11. Bromuro de etidio al 1%

Disolver en agua DEPC. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.12. SSC 20x

NaCl 175,3g

Citrato de sodio 88,2g

Aforar a 1 litro con agua bidestilada y conservar a temperatura ambiente.

5.3.13. Solución de hibridación

SDS 10% 7 mL

NH₂PO₄ 1M, pH 7.2 3 mL

EDTA 0.5 M 10 µL

5.3.14. Buffer de baja astringencia:

SSC 2X

SDS 0.1%

5.3.15. Buffer de alta astringencia

SSC 0.15X

SDS 0.1%

5.3.16. Buffer TE 10x, pH 7.5

Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 10 mL

EDTA 10 mM, pH 8.0 2 mL

Preparar a partir de las soluciones stock, aforar a 100 mL con agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

5.3.17. Solución TEL

Buffer TE 10x, pH 7.5 1 mL

Acetato de Litio 1 M, 1 mL

Agua bidestilada 8 mL

Preparar al momento, a partir de las soluciones stock ya estériles.

5.3.18. Solución TELP

Buffer TE 10x, pH 7.5 1 mL

Acetato de Litio 1 M, 1 mL

PEG 4,000 al 50% 8 mL

Preparar al momento, a partir de las soluciones stock ya estériles.

5.3.19. DTT (Ditiotreitol).

Preparar solución stock 1 M en agua. Conservar a -20 °C.

5.3.20. Solución de fosfatos 1 MFosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 174.18 gFosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 33.20 g

Ajustar pH a 7.5 con KOH, aforar a 1 L con agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

5.3.21. Amortiguador de extracción

Solución de fosfatos 1M 100 mL (100 mM)

EDTA 100 mM, pH 8 10 mL (1 mM)

Ajustar pH a 7.5 con KOH, aforar a 1 L con agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Conservar a 4 °C.

5.3.22. Buffer Z

Na₂HPO₄·12H₂O 10.752 g (60 mM)

NaH₂PO₄·H₂O 2.750 g (40 mM)

KCl 0.375 g (10 mM)

MgSO₄·7H₂O 0.123 g (1 mM)

Aforar a 500 mL con agua bidestilada y esterilizar por filtración. Conservar a 4 °C. Al momento de usar se le añade 1 µL de DTT 1 M por cada mL de Buffer Z.

5.3.23. ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactosido). Se prepara al momento

Preparar solución 4 mg/mL de buffer Z.

5.3.24. Na₂CO₃

Preparar solución 1 M. Conservar a 4 °C.

5.3.25. Solución A Lowry

NaOH 4 g

Na₂CO₃ 20 g

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Conservar a temperatura ambiente.

5.3.26. Solución B Lowry

Tartrato de sodio y potasio 2 g

** Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4 °C.*

5.3.27. Solución C Lowry

Sulfato cúprico 1 g

** Aforar a 100 mL con agua bidestilada. Almacenar a 4 °C en frasco ámbar o cubierto con aluminio.*

5.3.28. Solución ABC Lowry. Se prepara al momento de utilizarse.

19.6 mL solución A

200 µL solución B

200 µL solución C

5.3.28. BSA (albúmina sérica bovina)

Solución 1 mg/mL. Conservar a -20 °C.

5.3.29. Amortiguador de Pronase

Sorbitol, 1.4 M	7 mL de stock 2 M
Tris-HCl, 25 mM, pH 7.5	2.5 mL de stock 1 M
MgCl ₂ , 2 mM	200 μ L de stock 1 M
NaN ₃ , 20 mM	1 mL de stock 2 M

Aforar a 100 mL con agua bidestilada.

5.3.30. Buffer Thorner

Urea, 8 M	24 g
SDS, 5%	25 mL stock al 10%
Tris-HCl, 40 mM, pH 6.8	2 mL stock 1 M
EDTA, 0.1 mM	10 μ L stock 0.5 M
Azul de Bromofenol, 0.4 mg/mL	20 mg

Aforar a 50 mL con agua bidestilada.

5.4. Metodología

5.4.1. Cultivo de células.

Las células se siembran en precultivos de 10 mL de medio YPD o medio mínimo (según sea el caso) a partir de una colonia aislada de la cepa deseada y se incuba a 30 °C en agitación constante a 250 rpm durante 12 a 14 hr.

Posteriormente, las células se lavan 2 veces con agua bidestilada estéril y se determina la densidad óptica para inocular un cultivo con una densidad óptica igual a 0.05 en el medio correspondiente.

Finalmente, los cultivos se incuban a 30 °C en agitación constante a 250 rpm durante 8 horas o hasta que alcancen una densidad óptica aproximada de 0.5.

5.4.1.1. Aminoácidos

Constituyente	Concentración del stock (g/100 mL)	Volúmen del stock por litro de medio (mL)	Concentración final en el medio (mg/L)
Adenina	0.2	10	20
Histidina	1	2	20
Uracilo	0.2	10	20
Valina	3	5	150
Isoleucina	1	3	30
Leucina	1	10	100
GABA	3	33	1,000
Glutamina	3	33	1,000

Tabla 2. Aminoácidos utilizados en este trabajo.

5.4.2. Extracción de DNA genómico

- Una colonia aislada se inocula en 10 mL de medio YPD e incubar a 30 °C en agitación constante a 250 rpm durante toda la noche.
- Las células se colectan centrifugando a 3,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se desecha el sobrenadante.
- Las células son resuspendidas en 1 mL de agua bidestilada estéril y se transfieren a un tubo de 1.5mL.
- Se centrifuga a 14,000 rpm durante 10 segundos y se desecha el sobrenadante. Se adicionan 200 µL de buffer TE y 40 µL de RNAsa A y se incuba 15 minutos a 50 °C.
- Se adicionan 200 µL de la solución A, 200 µL de solución B y un volúmen de perlas de vidrio a cada muestra. Se mezcla en vórtex a velocidad máxima por 4 minutos.
- Se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos y la fase acuosa se transfiere a un tubo limpio. Se agrega 400 µL de solución B y se centrifuga nuevamente.
- La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se agrega 1mL de etanol absoluto y 10 µL de acetato de amonio 4M. El tubo se mezcla por inversión y se deja precipitando una hora a -20 °C.
- Una vez transcurrido el tiempo se centrifuga a 14,000 rpm por 15 minutos.

- El sobrenadante se elimina y el DNA se lava con etanol al 70% frío.
- El DNA se deja secar a temperatura ambiente por 5 minutos y finalmente se resuspende en 50 μ L de agua estéril. Se conserva a -20 °C.

5.4.3. Purificación de productos de PCR

- Se utiliza el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.
- Se añade el volumen de la “Solución de unión a membrana” equivalente al volumen del producto de PCR (1 mL y 40 μ g máximo por columna).
- Se coloca una columna en un tubo de recolección por cada reacción a purificar y la mezcla preparada en el paso anterior se transfiere a la columna.
- Se incuba un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 14,000 rpm durante un minuto. La columna se remueve, se descarta el fluido y se regresa la columna al tubo.
- El producto adherido a la membrana de la columna se lava añadiendo 700 μ L de la “Solución de lavado de la membrana” (previamente diluida con etanol al 95%).
- Se centrifuga 1 minuto a 14,000 rpm, se descarta el fluido y se repite el lavado con 500 μ L de la Solución para finalmente centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
- El tubo se vacía y se centrifuga la columna un minuto adicional a las condiciones antes descritas.
- La columna se transfiere a un tubo de 1.5 mL. Se añade 50 μ L de “agua libre de nucleasas”, directamente al centro de la columna sin que la punta toque la membrana. Se incuba a temperatura ambiente por un minuto.
- Se centrifuga por un minuto a 14,000 rpm y se descarta la columna. El tubo conteniendo el DNA eluido se almacena a -20 °C.

5.4.4. Extracción de RNA

- Crecer un cultivo de células en 100 mL del medio deseado.
- Colectar las células, centrifugando a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de agua DEPC fría. Transferir a dos tubos de 1.5 mL. Centrifugar 10 segundos a 4 °C y remover el sobrenadante.
- Resuspender el pellet de células con el líquido remanente en el tubo y adicionar 400 μ L de solución TES. Añadir 400 μ L de fenol ácido y agitar en vórtex vigorosamente durante 10 segundos. Incubar de 30 a 60 minutos a 65 °C con ocasional agitación en vórtex.
- Colocar en una mezcla de hielo – agua durante 5 minutos. Centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C.
- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 400 μ L de fenol ácido y agitar en vórtex vigorosamente. Repetir el paso 5.
- Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 400 μ L de cloroformo. Agitar vigorosamente en vórtex y centrifugar 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C.

- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir 40 μL de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 1 mL de etanol absoluto frío y precipitar.
- Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C. Lavar el pellet de RNA con etanol al 70% frío. Centrifugar y decantar.
- Resuspender el RNA en 50 μL de H_2O DEPC.

5.4.5. Obtención de sondas marcadas radiactivamente

- Se utilizan 50 ng del producto de PCR que deben estar en 1 a 23 μL de volumen, correspondiente previamente purificado.
- Se utiliza el kit de marcaje “Prime-It Random Primer Labeling Kit”, de Stratagene.
- Se añade 10 μL de “random oligonucleotide primers” y tanta agua como sea necesario para tener 34 μL .
- El DNA se desnaturaliza calentando en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Se agregan 10 μL de “dCTP primer buffer” 5x, 3 μL de [α - ^{32}P]dCTP y 1 μL de enzima Exo (-) Klenow (5 U/ μL) y se mezcló por pipeteo.
- La reacción se incuba a 37-40 °C por 10-15 minutos.
- Mientras tanto se prepara una columna de Sephadex G-25 para eliminar la marca libre, colocando en una jeringa para insulina fibra (para tapanla) y Sephadex G-25 hasta llenarla.
- La columna se centrifuga cuatro minutos a 1,800 rpm para eliminar el buffer.
- Una vez terminada la reacción ésta se detiene agregando 1 μL de “stop mix” y se añaden 50 μL de agua para colocarla en la columna y se centrifuga durante cuatro minutos a 1,800 rpm siendo recuperada en un tubo de 1.5 mL sin tapa.
- Para desnaturalizar la sonda, se calienta en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se coloca en hielo cinco minutos.
- Finalmente la sonda se agrega a la solución de hibridación y se pone en contacto con la membrana pre-hibridando.

5.4.6. Electroforesis de RNA

- La cámara de electroforesis se lava con SDS 1% y se enjuaga con H_2O DEPC.
- Para preparar el gel se mezcla 1 g de agarosa con 84 mL de H_2O y 10 mL de MAE 10x. Hervir 30 segundos y dejar enfriar a 55 °C para añadir 6 mL de formaldehído. Vaciar al molde y dejar que solidifique.
- Para preparar 1 L de amortiguador de corrida se mezcla 100 mL de MAE 10x y 30 mL de formaldehído y se afora con H_2O bidestilada.
- Para preparar las muestras se mezclan 30 μg de RNA con 20 μL de tampón para RNA y 0.5 μL de bromuro de etidio. Posteriormente se calientan a 65 °C durante 15 minutos. Las muestras se aplican en el gel.
- Correr el gel a 60 volts hasta que el colorante este por salir del gel.

- Revisar el gel en el transiluminador para documentar,
- Transferir el RNA a membrana de nylon (Amersham Hybond-N+ de GE Healthcare).
- Pre-hibridar la membrana a 65 °C (previamente fijada con luz UV a 12,000 μ J) durante al menos una hora en solución de hibridación. Posteriormente se hibrida toda la noche a 65 °C.
- Después de la hibridación, se realizan dos lavados de baja astringencia a 65 °C durante cinco y treinta minutos. De ser necesario, se realizan lavados de alta astringencia de la misma manera.

5.4.7. Transformación de levadura. (*Plásmidos o módulos de interrupción.*)

- Inocular 10 mL de YPD con la cepa deseada e incubar en agitación a 30 °C durante 12 horas.
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 2 mL de agua bidestilada estéril, medir la densidad óptica e inocular lo necesario para tener un cultivo de 50 mL de YPD a una DO aproximada de 0.1. Incubar a 250 rpm hasta una DO aproximada de 0.3 (4 h aproximadamente).
- Posteriormente centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de agua. Transferir a un microtubo de 1.5 mL, centrifugar durante 10 segundos y retirar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet con 1 mL de solución TEL, centrifugar por 10 segundos, retirar el sobrenadante y resuspender las células en 200 μ L de solución TEL. A partir de este concentrado de células, se usan 50 μ L por cada evento de transformación.
- Adicionar 1 μ g de DNA transformante, 10 μ L de DNA de esperma de salmón (previamente hervido 5 minutos y 5 minutos en hielo) y 300 μ L de solución TELP.
- Mezclar en vórtex e incubar en agitación a 250 rpm a 30 °C durante 30 minutos. Inmediatamente, añadir 40 μ L de DMSO, agitar en vórtex e incubar en agitación a 42 °C durante 15 minutos.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 segundos, desechar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de YPD para transferir a un tubo con 3 mL de YPD. Incubar en agitación a 30 °C durante 3 horas.
- Centrifugar 10 segundos a 14,000 rpm, desechar el sobrenadante y resuspender en 100 μ L de YPD.
- Finalmente, platear en cajas del medio deseado e incubar a 30 °C durante 2-3 días. Para purificar re-estriar 3 veces en el medio deseado, 10 colonias aisladas.

5.4.8. Obtención de extractos de proteína

- Crecer un cultivo celular a la densidad óptica deseada en el medio de cultivo de selección apropiado. Un cultivo de 50 mL es suficiente para este propósito.

- Colectar las células por centrifugación durante 5 minutos a 3,000 rpm a 4 °C. A partir de este punto las células deben mantenerse en hielo.
- Lavar el pellet de células con 10 mL de agua bidestilada fría y centrifugar en las condiciones mencionadas en el punto anterior. Repetir el lavado.
- Realizar un ultimo lavado con Amortiguador de extracción + DTT 1 mM y centrifugar durante 5 minutos a 3,000 rpm a 4 °C.
- Resuspender el pellet de células en 600 µL de Amortiguador de extracción + DTT 1 mM. Si la DO_{600nm} es menor a 0.5 puede resuspenderse en un volumen menor.
- Transferir la suspensión de células a microtubos de 1.5 mL y agregar 1/3 del volumen de perlas de vidrio frias.
- Agitar en vórtex a máxima velocidad durante un minuto y dejar en hielo un minuto. Repetir 6 veces más esta operación.
- Centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 13,000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa y transferirla a un microtubo de 1.5 mL.
- El extracto está listo para usarse.

5.4.9. Determinación de Actividad β -galactosidasa

- A una placa de mitrotitulación de 96 pozos, agregar 1.5 a 15 µL de cada muestra (tal como se muestra en la tabla) y aforar a 15 µL con Amortiguador de extracción.
- Agregar 135 µL de Buffer Z + DTT con la pipeta multicanal.
- Incubar la placa de microtitulación a 30 °C durante 5 minutos.
- Iniciar la reacción agregando 30 µL de la solución ONPG y agitar con la pipeta multicanal. Anotar el tiempo exacto en el que la adición fue hecha ya que a partir de este tiempo se contará la incubación.
- Incubar durante 1 minuto a 30 °C.
- Detener la reacción agregando 75 µL de la solución de Na_2CO_3 y anotar el tiempo exacto en el cual se detiene la reacción.
- Medir la DO a 420 nm y determinar la actividad especifica del extracto de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Actividad especifica (nmol/min/mg proteína)} = \frac{(\text{DO}_{420nm})(0.255)}{(0.0045)(\text{proteína})(\text{vol. extracto})(\text{tiempo})}$$

Donde,

DO_{420} = 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

Tiempo = Tiempo de reacción expresado en minutos.

5.4.10. Determinación de concentración de proteína por el método de Lowry.

- Preparar la curva estándar utilizando diferentes volúmenes de la solución de BSA, tal y como indica la tabla.
- Para las muestras, utilizar 10, 20, 30 y 40 μL de una dilución 1:2 y 1:5. Al final, aforar a 40 μL de volumen total con agua bidestilada.
- Agregar 200 μL de la solución ABC a cada pozo, mezclar con la micropipeta multicanal e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 20 μL de folin diluido, mezclar con la micropipeta multicanal e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la DO a 625 nm.
- Determinar la concentración de proteína.

5.4.11. Extracción de proteína total a partir de cultivos de levadura.

- Emplear 10 mL de un cultivo saturado de YPD.
- Colectar las células por centrifugación 5 minutos a 3,000 rpm y 4 °C. Decantar el sobrenadante, resuspender en agua y centrifugar nuevamente en las mismas condiciones.
- Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet en 280 μL de amortiguador de Pronase. Transferir las células a un tubo de 1.5 mL y adicionar 50 μL de una solución de TCA al 85%. Agregar 2.8 μL de PMSF 0.1 M (17.4 mg/mL).
- Agregar un volumen de perlas de vidrio, agitar en vórtex a velocidad máxima durante 1 minuto e incubar 1 minuto en hielo. Repetir el procedimiento de 7 a 10 veces.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y mantener sobre hielo.
- Lavar las perlas dos veces con 280 μL de TCA al 5% y mezclar el sobrenadante de los lavados con el lisado del paso anterior.
- Incubar los tubos en hielo durante 5 minutos y centrifugar 10 minutos a 5,000 rpm y 4 °C.
- Remover el sobrenadante, asegurándose de eliminar todo el TCA del tubo.
- Resuspender el pellet en 30 μL de buffer Thorner, el cual tornara a color amarillo. Adicionar 1/10 del volumen o lo que sea necesario de Trizma-base 1M (sin pH ajustado) para que el color del buffer torne nuevamente a color azul.
- Las muestras se almacenan a -70 °C.

5.4.12. Ensayo tipo western blot

- Bloquear la membrana de nitrocelulosa con leche al 2% en PBS 1x fresco durante 1 hora.
- Incubar con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente a la dilución establecida.
- Lavar la membrana 3 veces con leche al 2% en PBS 1x + Tween al 0.05% 5 minutos.

- Incubar la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en PBS 1x a la dilución establecida.
- Repetir los lavados con PBS 1x + Tween al 0.05%.
- Revelar la presencia del anticuerpo secundario, empleando la técnica adecuada.

5.4.13. Extracción y medición de Valina, Isoleucina y Leucina intracelular

De acuerdo al protocolo reportado por González et al. (1997), se usaron 15 mL de cultivo en fase exponencial y de fase estacionaria que fueron mezclados con 15 mL de metanol al 60% amortiguado con Hepes 70 mM, pH 7.5 y pre-enfriado a -70 °C, siendo la temperatura final de -20 °C de tal manera que las reacciones metabólicas se detuvieran y no cambiara la poza del metabolito en cuestión.

La mezcla se centrifugó y para llevar a cabo la extracción, el pellet fue mezclado con 5 mL de etanol al 75% y amortiguado con Hepes 250 mM. Posteriormente la suspensión de células se mantuvo en baño de agua hirviendo durante 4 minutos para después enfriar en hielo 5 minutos y se secó en vacío a 45 °C por 4 horas. El residuo se suspendió en 1 mL de agua y se centrifugó durante 15 minutos a 13,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se usó para la determinación de los aminoácidos.

Las muestras fueron desproteinizadas con ácido perclórico y los aminoácidos fueron medidos mediante HPLC con una columna ultrasphere ODS C18 (Beckman Coulter). Mediante fluorescencia se detectaron los derivados de los aminoácidos con OPA. La fase móvil fue 75% metanol y 25 % amortiguador de acetato de potasio 0.1 M a pH 5.5. El flujo se ajustó a 1.5 mL/min.

Los datos fueron normalizados, dividiendo entre el peso seco (mg) de las muestras de acuerdo a una curva de calibración (DO contra peso seco).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. La expresión del gen *KIBATI* se reprime en presencia de los productos finales de la vía de síntesis de valina, isoleucina y leucina (VIL).

Para determinar el patrón de expresión del gen *KIBATI* cuando la fuente de carbono es glucosa, se realizaron ensayos tipo Northern blot blot, para lo que se creció un precultivo de *K. lactis* y a partir del cual se inocularon varios cultivos de medio mínimo (MM) que diferían en la fuente de nitrógeno. Una vez que alcanzaron una densidad óptica aproximada de 0.5 a 600 nm, se extrajo RNA total de *K. lactis*.

Para evaluar el efecto que tiene la calidad de la fuente nitrogenada sobre la expresión de *KIBATI*, se utilizó una fuente de nitrógeno represora (glutamina), una medianamente represora (amonio) y una no-represora (GABA, ácido γ -aminobutírico) y los aminoácidos valina, isoleucina y leucina (VIL) juntos. Por otro lado, adicionalmente se evaluó el efecto de cada una de las fuentes de nitrógeno mencionadas anteriormente en combinación con los aminoácidos VIL.

Como se aprecia en la figura 13, la expresión del gen *KIBATI* se reprimió en presencia de los aminoácidos VIL. Esto sugiere que *KIBATI* codifica para una aminotransferasa que se inhibe por sus productos finales. Las fuentes de amonio, GABA y glutamina promueven la biosíntesis de los aminoácidos VIL. En estas condiciones se observa un nivel de expresión similar en estas fuentes, lo que indica que la expresión de *KIBATI* es independiente de la calidad de la fuente de nitrógeno. Así mismo, al no haber una represión por glutamina, sugiere que *KIBATI* no es un gen sujeto a represión catabólica nitrogenada (NCR).

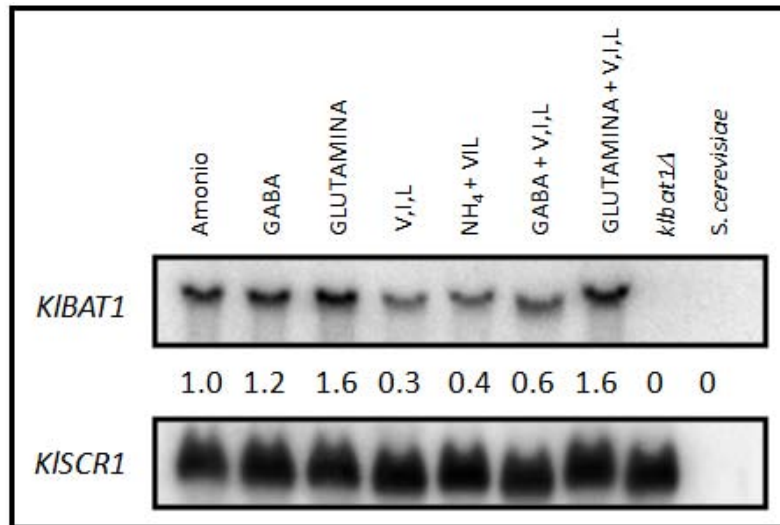


Figura 13. Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *KIBAT1* y glucosa como única fuente de carbono. *K. lactis* se cultivó en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno. Se utilizó como sonda de *KIBAT1*, un fragmento de 638 pb así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar. En los últimos dos carriles la mutante *Kibat1Δ* y *S. cerevisiae* como controles negativos (Colón, M., *et al.*, 2011).

Por otro lado, se observa que en presencia de los aminoácidos, el amonio o el GABA, sigue existiendo una regulación negativa de *KIBAT1* (tal y como se observa con solo VIL como fuente de nitrógeno). Sin embargo, la adición simultánea de glutamina y VIL no reprime la expresión respecto a la sola adición de glutamina. Esto es posible que se deba a que en presencia de glutamina la expresión de los transportadores de los aminoácidos de cadena ramificada se reprima (Godard, P. *et al.*, 2007).

Dadas las observaciones anteriores, el patrón de expresión de *KIBAT1* corresponde a un gen biosintético ya que generalmente las rutas anabólicas son controladas por sus productos finales, con la finalidad de evitar la producción innecesaria de enzima cuando ésta no es requerida (Chin *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el hecho de que la expresión de *KIBAT1* no se reprima por glutamina y por ende no esté sujeto a represión catabólica nitrogenada, sugiere que *KIBAT1* pudiera regularse por el

factor transcripcional tipo Gcn4 de *S. cerevisiae*, proteína encargada de activar varias rutas biosintéticas de aminoácidos, como ya se mencionó en el apartado de introducción.

Adicionalmente, datos no publicados de nuestro laboratorio (Hernández-Lorenzo, F., 2009) indican que el patrón de expresión de *BATI* en diferentes fuentes de nitrógeno, es similar al de *KIBATI*, sin embargo, la represión en la expresión de *BATI* por los productos finales, VIL, es mayor (aproximadamente 90%) en comparación con el 70% de represión observado en *KIBATI*. Esto probablemente se deba a que en el caso de *KIBATI*, es necesario que no se encuentre totalmente reprimido para que en la célula exista una concentración basal, considerando que únicamente hay una sola transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada.

6.2. La expresión del gen *KIBATI* se reprime con etanol como única fuente de carbono.

Las mutantes *bat1Δ*, *bat2Δ* y *bat1, bat2Δ*, se crecieron en etanol como única fuente de carbono y nitrógeno como fuente de nitrógeno. Bajo esta condición, la doble mutante fue incapaz de crecer aun cuando los aminoácidos VIL fueron añadidos. Esto indica que el catabolismo de VIL está impedido para crecer en presencia de fuentes de carbono no-fermentables (Colón, M., *et al.*, 2011). En contraste, bajo las condiciones antes mencionadas, la mutante *Klbat1Δ* si es capaz de crecer (figura 14), fenómeno completamente opuesto a lo observado en *S. cerevisiae*. A partir de este hecho, se deduce que para *K. lactis* no es necesario el catabolismo de los aminoácidos VIL durante el metabolismo respiratorio.

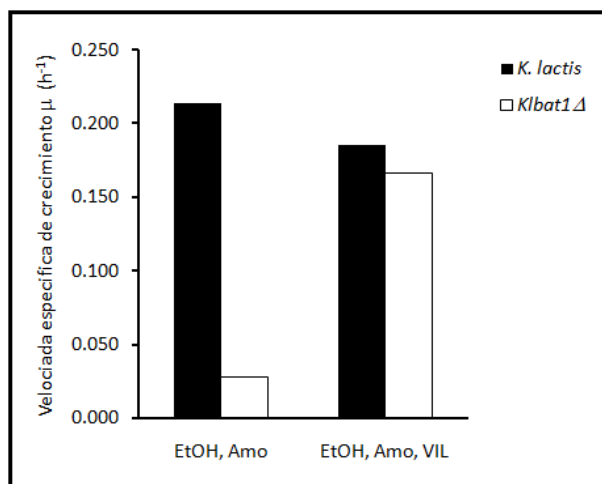


Figura 14. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas silvestre (*K. lactis*, barras de color negro) y mutante (*Klbat1Δ*, barras de color blanco) durante metabolismo respiratorio.

La represión catabólica por glucosa de genes relacionados con la función respiratoria es un fenómeno de gran importancia en *S. cerevisiae*. Aunque en menor proporción, este fenómeno también ocurre en *K. lactis* (González-Siso, *et al.*, 1999). Debido a la alta capacidad respiratoria de *K. lactis* en comparación con *S. cerevisiae*, consideramos de gran importancia evaluar si la expresión de *KIBAT1* es dependiente de este fenómeno.

Como se describió en el apartado anterior, se extrajo RNA a partir de cultivos de células crecidos en diferentes condiciones de nitrógeno (amonio, GABA, glutamina y VIL) usando etanol como única fuente de carbono.

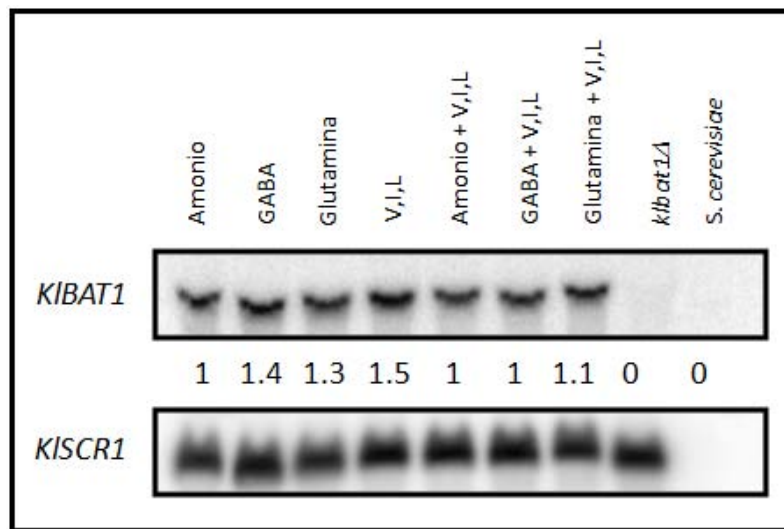
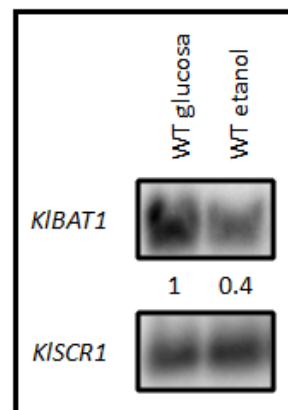


Figura 15. Efecto de la calidad de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *KIBAT1* y etanol como única fuente de carbono. *K. lactis* se cultivó en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno. Se utilizó como sonda de *KIBAT1* un fragmento de 638 pb así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar. En los últimos dos carriles la mutante *kibat1Δ* y *S. cerevisiae* como controles negativos (Colón, M., *et al.*, 2011).

Lo que se observa en la figura 15, es que el nivel de expresión de *KIBAT1* es prácticamente el mismo en cualquier condición de nitrógeno utilizada, no observándose una represión por efecto de los productos finales (VIL), a diferencia de lo que se observó en el experimento anterior (figura 12).

Con base en estos resultados, para conocer si la expresión de *KIBAT1* en ambos metabolismos (fermentativo y respiratorio) se lleva a cabo al mismo nivel, se llevó a cabo un análisis de tipo northern blot, de forma que pudieran compararse ambas condiciones simultáneamente.

Figura 16. La expresión de *KIBAT1* es reprimida bajo condiciones respiratorias. *K. lactis* se cultivó en medio mínimo, amonio (como fuente de nitrógeno) y glucosa o etanol como fuente de carbono. Se utilizó como sonda de *KIBAT1* un fragmento de 638 pb así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar (Colón, M., *et al.*, 2011).



Como se observa en la figura 16, la expresión de *KIBAT1* está reprimida bajo condiciones respiratorias. Cabe mencionar, que bajo las mismas condiciones *BAT1* y *BAT2* presentan perfiles de expresión opuestos, de manera que *BAT1* muestra un patrón similar al de *KIBAT1* mientras que *BAT2* se encuentra inducido en condiciones respiratorias (Colón, M., *et al.*, 2011).

6.3. El gen *KIBAT1* tiene también un perfil de expresión catabólico.

Tal como se observó en la figura 11, la proteína *KIBat1* posee una capacidad tanto biosintética como catabólica pues la mutante *Kibat1Δ* resultó incapaz de biosintetizar y degradar los aminoácidos VIL cuando son añadidos al medio como única fuente de nitrógeno y por consiguiente fue incapaz de recuperar el fenotipo de la cepa silvestre. Sin embargo, en ensayos de complementación de las mutantes sencillas *bat1Δ* y *bat2Δ* y la doble mutante *bat1Δ/bat2Δ*, con un plásmido monocopia que contenía la región codificante de *KIBAT1* se observó que en condiciones biosintéticas, únicamente las mutantes sencillas recuperan el fenotipo de tipo silvestre mientras que en la doble mutante, *KIBat1* substituye parcialmente la falta de *Bat1* y *Bat2*. Por otro lado, en condiciones catabólicas, ni la mutante *bat2Δ* ni la doble mutante alcanzan el fenotipo de la cepa silvestre lo que sugiere que las propiedades cinéticas de *KIBat1* no permiten complementar la falta de *Bat2* (Colón-González, M., *et al.*, 2010).

Dado que en medio mínimo, el patrón de expresión de *KIBAT1* corresponde al de un gen biosintético (figura 13) y no al de un gen cuyo producto esté implicado en el catabolismo, decidimos evaluar la expresión del gen *KIBAT1* en medio YPD, ya que al ser un medio de cultivo rico, la levadura únicamente requiere degradar los nutrientes para duplicarse; en este caso, si hubiera expresión de *KIBAT1*, se inferirá que el producto del gen, la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, es requerida para catabolizar valina, isoleucina y leucina.

Para este propósito, se cultivó a *K. lactis* y a la mutante *Kibat1Δ* en medio YPD y se extrajo RNA total de tres diferentes etapas del cultivo. Se obtuvieron muestras a las densidades ópticas de 0.3 (fase logarítmica), 3.0 (estacionaria) y 5.0 (estacionaria tardía) y se realizó un ensayo tipo northern blot (figura 17) donde se observó una determinada cantidad de mRNA, producto de la transcripción del gen *KIBAT1*. Al comparar la cantidad de mensajero entre ellas, éste se observó igualmente acumulado durante las diferentes fases de crecimiento seleccionadas.

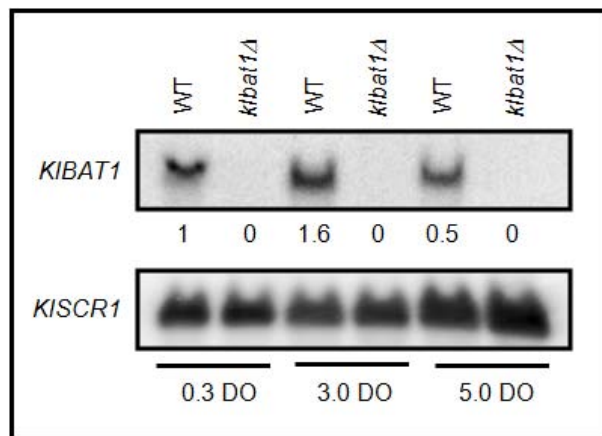


Figura 17. Nivel de la expresión de *KIBAT1* en medio rico. *K. lactis* se cultivó en medio YPD. Se utilizó como sonda de *KIBAT1* un fragmento de 638 pb así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar.

Considerando que en YPD la función más probable de una transaminasa sería la catabólica, el hecho que *KIBAT1* se exprese a lo largo de la fase exponencial hasta la estacionaria, sugiere que en efecto en esta condición *KIBat1* pudiera jugar un papel catábólico, dado que en medio rico la biosíntesis de aminoácidos se reprime.

Posteriormente, a fin de complementar el experimento anterior, se determinó la concentración intracelular de los aminoácidos VIL en las cepas silvestre y mutante *Klbat1Δ* (figura18). Los resultados mostraron que durante la fase exponencial (panel A), la concentración intracelular de los aminoácidos en la cepa silvestre, se encuentran disminuidos en comparación con la concentración en la cepa mutante *Klbat1Δ*, donde se encuentran acumulados, confirmando así, que la ausencia de la transaminasa conlleva a una acumulación de VIL, lo que indica su papel catábólico.

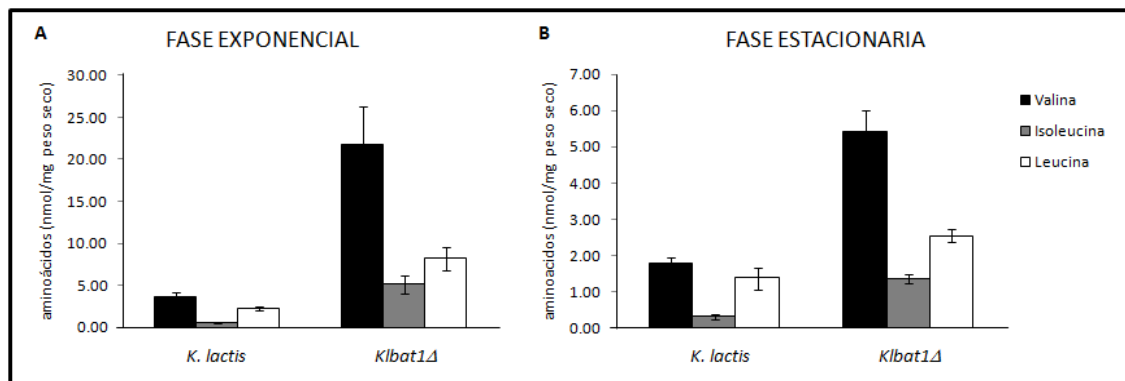


Figura 18. Concentración intracelular de los aminoácidos VIL en medio rico (YPD).

Por otro lado, durante la fase estacionaria (panel B), se observa la misma tendencia observada durante la fase exponencial (panel A), aun cuando las concentraciones de VIL en ambas cepas son más bajas que las observadas durante la fase exponencial (ver escala), se confirma el carácter catabólico de la enzima.

6.4. La región promotora del gen *KIBAT1* contiene las secuencias consenso de unión a Gcn4, Gln3 y Nrg1 de *S. cerevisiae*.

Mediante una búsqueda en la base de datos del proyecto *Genolevures*, se obtuvo la secuencia del promotor del gen *KIBAT1*. Dado que no conocemos el tamaño real del promotor, consideramos estudiar 1,000 nucleótidos río arriba del gen. No obstante, debe tomarse en consideración que el promotor “adecuado” solamente pudiera ser la región de aproximadamente 200 pb del recuadro señalado con una flecha roja en la figura 19, pues es la zona que no se sobrelapa con el *ORF* contiguo.

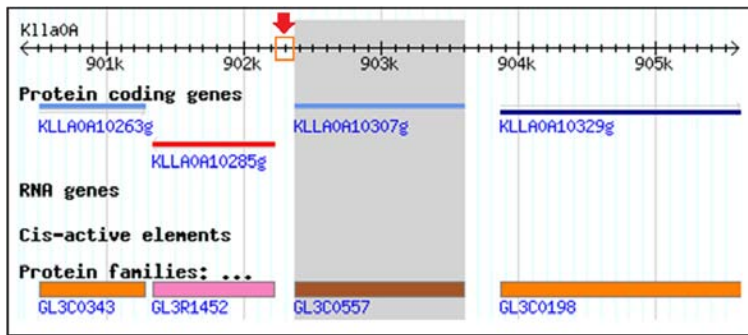


Figura 19. Mapa genómico del cromosoma KLLA0A. La zona sombreada en gris indica la región que abarca la región codificante del gen *KIBATI*. En un recuadro con una flecha roja se indica la región probable del promotor del gen en cuestión.

Posteriormente, con ayuda de la base de datos de *S. cerevisiae* en *Yeasttract*, se obtuvo una lista de los factores de transcripción y la secuencia a la que podrían unirse en el promotor de 1,000 pb de *KIBATI*. Los más sobresalientes fueron los sitios para Gcn4, Gln3 y Nrg1, pues estos sitios también se encuentran en los promotores de los genes *BAT1* y *BAT2* (figura 20). Dado lo anterior, consideramos importante evaluar su participación en la regulación del gen *KIBATI* y así poder establecer un marco comparativo con sus ortólogos *BAT1* y *BAT2*.

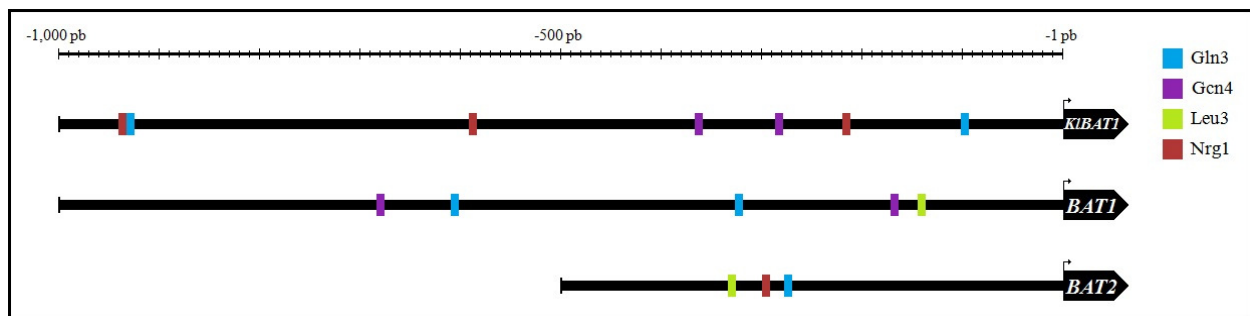


Figura 20. Análisis de los sitios de unión a factores de transcripción en la región de 1,000 pb río arriba de la región codificadora del promotor del gen *KIBATI*. Se muestra una comparación con las regiones intergénicas de los genes *BAT1* (1,000 pb) y *BAT2* (500 pb) de *S. cerevisiae*. Únicamente se muestran los sitios de unión para los factores Gln3, Gcn4, Leu3 y Nrg1.

Para estudiar funcionalmente el proceso de regulación de los factores transcripcionales, se construyó una fusión del promotor de *KIBATI* con el gen *lacZ* de *E.coli* para medir la actividad β -galactosidasa en cepas mutantes de *S. cerevisiae* que se utilizó como un modelo de estudio heterólogo.

Para llevar a cabo esta construcción, se utilizó el plásmido YEp363 (figura 21) que contiene el marcador de selección *LEU2*, que cura la auxotrofia por leucina que lleva la cepa receptora que será transformada con el plásmido portador de la fusión con *lacZ*. Esto es importante ya que además de servir como un marcador de selección al permitir a las transformantes crecer en ausencia de leucina, *LEU2* codifica para la β -isopropilmalato deshidrogenasa que cataliza el tercer paso en la biosíntesis de leucina.

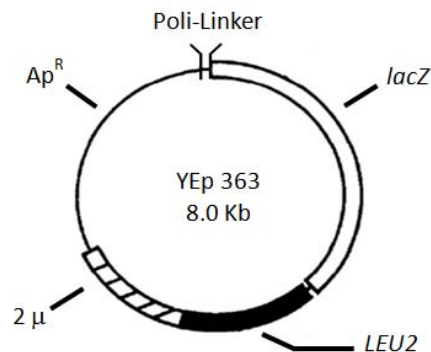


Figura 21. Mapa del plásmido YEP363. La región del Poli-Linker, es aquella donde se llevó a cabo la inserción del P_{KIBATI} ; *lacZ*, gen que codifica para la enzima β -galactosidasa; *LEU2*, marcador de selección que genera prototrofia a leucina; 2μ , origen de replicación para levadura; Ap^R , marcador de resistencia a ampicilina.

Como ya se mencionó anteriormente, el tamaño del promotor insertado en el vector, corresponde a los 1,000 pb rio arriba de *KIBATI*.

6.5. Actividad β -galactosidasa bajo el promotor de *KIBATI* en *S. cerevisiae*.

El estudio del efecto que tienen diferentes factores de transcripción sobre un promotor en un sistema heterólogo, cuando no existe al alcance otro medio para conocer de que forma se lleva a cabo la regulación transcripcional de un gen de interés, resulta de gran ayuda para hipotetizar el o los mecanismos a los cuales está sujeta su regulación.

Como puede verse en la figura 22, se determinó la actividad β -galactosidasa en 5 diferentes fondos genéticos de *S. cerevisiae*: cepa silvestre (WT), *gln3* Δ , *gcn4* Δ , *leu3* Δ y *nrg1* Δ y en dos diferentes fuentes de nitrógeno, una represora (glutamina) y una no-represora (GABA).

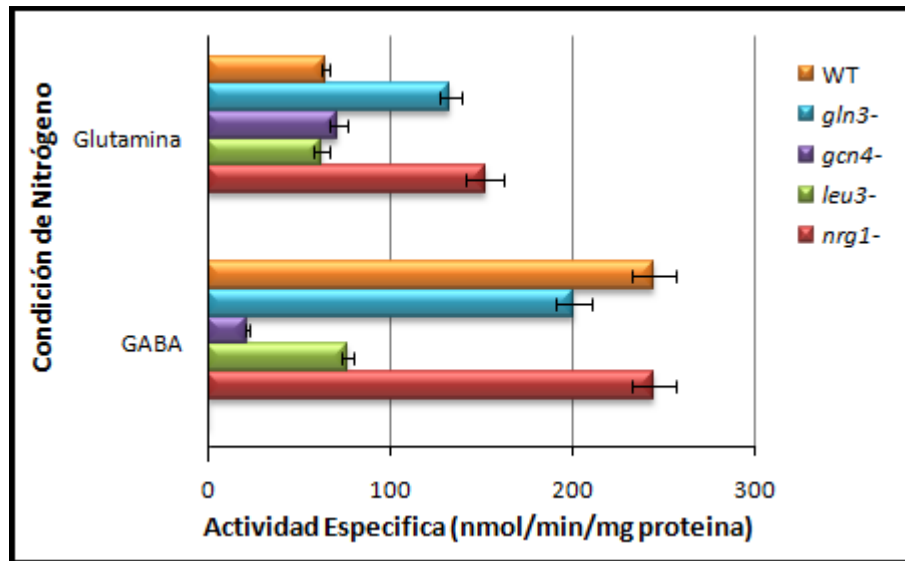


Figura 22. Actividad β -galactosidasa para determinar la expresión de *KIBATI* en diferentes fondos genéticos de *S. cerevisiae*.

Los resultados mostraron lo siguiente (figura 22):

- i. La expresión de *KIBATI* se reprimió en glutamina pero no en GABA induciendo una regulación catabólica nitrogenada.
- ii. El regulador codificado por el gen *NRG1* funciona como modulador negativo ya que en una mutante *nrg1* Δ en glutamina, se detectó una actividad de β -gal de casi el doble de la observada en la cepa *NRG1* (WT). Este efecto no se observó en GABA, condición en la que la expresión de *KIBATI* no está reprimida.
- iii. El regulador codificado por *GLN3*, muestra un ligero efecto positivo en la expresión de *KIBATI* en GABA, que podría considerarse prácticamente nulo. Por otro lado, en glutamina se observa un efecto negativo de casi el doble por la falta de Gln3, debido a que en ésta condición *KIBATI* ya se encuentra reprimido.

- iv. El regulador Gcn4 muestra un claro efecto positivo, ya que la mutante *gcn4Δ* disminuye hasta diez veces la expresión de *KIBAT1* en GABA. Tal y como se esperaría, en glutamina no se observa efecto en la mutante *gcn4Δ*, ya que la expresión del gen está reprimida.
- v. El regulador Leu3 ejerce un efecto positivo sobre la expresión de *KIBAT1*, pues las mutantes *leu3Δ* disminuyen su expresión tres veces en GABA, aunque su participación en glutamina es nula aparentemente.

Éstas observaciones permiten proponer lo siguiente:

En un sistema heterólogo, la calidad de la fuente de nitrógeno regula la expresión de *KIBAT1*, alta en GABA y baja en glutamina, regulación que se considera característica de genes cuyos productos codifican enzimas implicadas en el catabolismo de compuestos nitrogenados.

Los reguladores que podrían ser responsables de la inducción de la expresión de *KIBAT1* en GABA podrían ser: Gcn4 y Leu3. Por su parte, Gln3 no parece jugar un papel importante a diferencia de lo que se ha reportado para genes catabólicos de *S. cerevisiae* como *DAL5* (Georis, I., *et al.*, 2008). El regulador negativo de la respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno es el codificado por *DAL80* y corresponde a un regulador de la familia de factores GATA. En tanto que Nrg1 no pertenece a esta familia, aun cuando su motivo de unión al DNA es un dedo de zinc.

En resumen, la regulación de *KIBAT1* en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae*, en condiciones derepresoras, está determinada por reguladores que en *S. cerevisiae* modulan la expresión de genes biosintéticos (Gcn4 y Leu3). Es importante hacer notar que aun cuando en *S. cerevisiae* durante mucho tiempo se consideró que la respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno era exclusivamente dependiente de los factores GATA, Gln3 y Gat1, nuestro grupo ha encontrado que en algunos casos, ésta respuesta depende tanto de Gln3 como de Gcn4 (Hernández, H., *et al.*, 2011) sugiriendo un sistema de regulación más complejo. Los resultados reportados en esta tesis indican que probablemente para *K. lactis*, Gln3 juegue un papel menor, en tanto que la respuesta pueda depender de Gcn4 y Leu3. Esto abre un nuevo panorama que será importante analizar a detalle.

El uso de sistemas reporteros como β -galactosidasa han permitido medir la actividad transcripcional mediante la identificación y análisis del efecto de los elementos regulatorios sobre los genes. En nuestro laboratorio, este sistema ha permitido llevar a cabo diversos estudios, sin embargo, en el caso particular de *KIBATI*, no fue de utilidad al encontrar resultados contrastantes.

Dado que en este punto los resultados obtenidos no nos permiten tener un panorama claro acerca del efecto que los factores estudiados pudieran tener sobre la expresión de *KIBATI*, y con el fin de analizar la regulación homóloga dependiente de estos factores, se comenzó por construir mutantes de los genes ortólogos *GLN3* y *LEU3* de *K. lactis*. Posteriormente, estas mutantes fueron utilizadas para realizar análisis tipo northern blot que se describirán a continuación.

6.6. El factor transcripcional *KIGln3* ortólogo a *Gln3* de *Saccharomyces cerevisiae*.

La proteína *KIGln3* tiene una identidad de 33% con su ortólogo en *S. cerevisiae* (ver apartado 10.1.3) y en la base de datos el gen que codifica para ella se encuentra registrada como KLLA0A01342g con algunas similitudes con la proteína P18494 de *Saccharomyces cerevisiae*, activador transcripcional de genes regulados por represión catabólica nitrogenada, localización y actividad regulada por la calidad de la fuente de nitrógeno.

Para conocer si en *K. lactis*, la respuesta a la calidad de la fuente de nitrógeno (represión catabólica nitrogenada, NCR) se regula de manera similar a la reportada para *S. cerevisiae*, se analizó la expresión de *KIPUTI*, gen registrado en la base de datos como KLLA0D16962g, que codifica para una oxidasa de prolina similar a la proteína P09368 de *S. cerevisiae* (58% identidad, apéndice I), involucrada en la utilización de prolina como única fuente de nitrógeno y que además contiene una pre-secuencia de 30 aminoácidos, confiriéndole una probabilidad de 98.93% de ser dirigida a mitocondria, donde se encuentra *PUTI*.

La expresión de *PUTI* en *S. cerevisiae* es sensible a NCR, por lo que en un medio derepresor (con GABA como fuente de nitrógeno) se encuentra elevada, mientras que la delección de *GLN3*, reduce su transcripción a niveles muy bajos, contrario a lo observado en *K. lactis*, ya que bajo las

condiciones antes mencionadas, *KIPUT1* se mantiene expresado a un mismo nivel sin importar la condición de nitrógeno o la ausencia de *KIGln3* (figura 23).

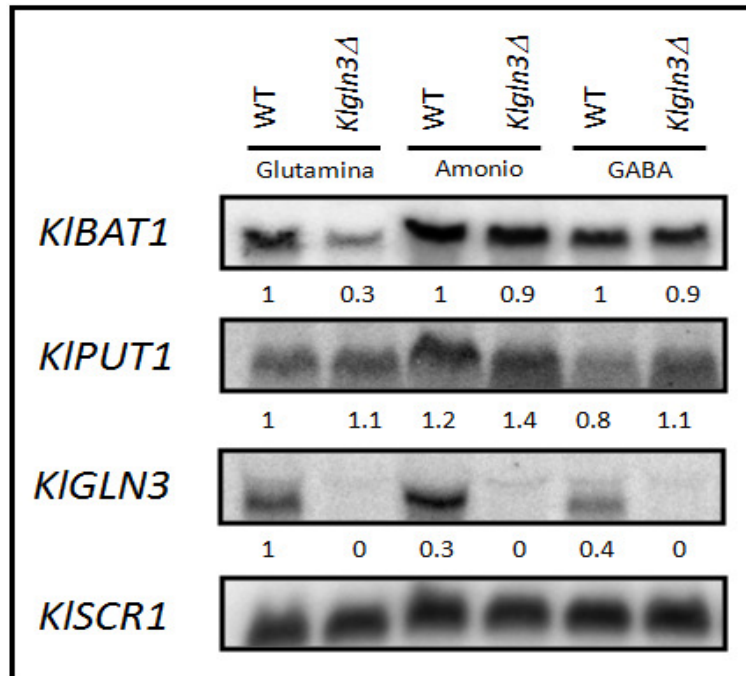


Figura 23. Efecto del factor transcripcional *KIGln3* sobre la expresión de *KIBAT1*. *K. lactis* y la mutante *Klgln3Δ* fueron cultivadas en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno. Se utilizaron como sondas de *KIBAT1* un fragmento de 638 pb, de *KIGLN3* un fragmento de 1,085 pb, de *KIPUT1* un fragmento de 1,163 pb, así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar.

Los resultados obtenidos (figura 23), indican que la expresión de *KIPUT1* no depende de la calidad de la fuente de nitrógeno ni de *KIGln3* y por lo tanto no representa un ejemplo de regulación por NCR. En virtud de que hasta ahora no se ha descrito en *K. lactis* ningún gen cuya expresión dependa de la calidad de la fuente de nitrógeno y de que el candidato *KIPUT1* no presentó una respuesta de este tipo, será necesario hacer un estudio global que permita identificar genes de *K. lactis* que respondan a NCR, con el fin de determinar si esta respuesta existe y que genes son los que están sujetos a la misma. Una vez encontrada la red de genes que se regula en *K. lactis* por NCR, será necesario estudiar el papel de *KIUre2*. El producto de *URE2* en *S. cerevisiae*, forma un complejo con Gln3 de forma que éste no puede ingresar al núcleo para activar sus genes blanco. Tomando esto en consideración, sería importante analizar como afecta

la ausencia de *KUre2* la expresión de genes sujetos a NCR de *K. lactis*. Otro factor que será necesario tomar en cuenta en este análisis es *KIGATI*, ya que en *S. cerevisiae* juega un papel similar al de Gln3 para ciertos genes catabólicos. El ortólogo de *GATI* de *K. lactis* posee una identidad de 22%, sin embargo, el dominio del dedo de zinc se encuentra altamente conservado (ver apartado 10.1.1) por lo que será necesario obtener mutantes *Klgat1Δ* y dobles mutantes *Klgl3ΔKlgat1Δ* que nos permitan examinar el papel de estos factores sobre la expresión de genes presumiblemente catabólicos de *K. lactis*.

Por otro lado, la falta de *KIGln3*, únicamente disminuyó la expresión de *KIBATI* en glutamina, pero no tuvo efecto en amonio ni en las fuentes de nitrógeno no-represoras, GABA. Por un lado estos resultados indican que en presencia de glutamina, la expresión de *KIBATI* no se reprime y por otro que *KIGln3* únicamente puede actuar en cultivos crecidos en glutamina. Resultados similares se encontraron para la expresión de *GAP2* de *Candida albicans* que codifica una permeasa similar a la permeasa general de aminoácidos codificada por *GAP1* en *S. cerevisiae*. La expresión de *GAP2* no responde a la calidad de la fuente de nitrógeno y únicamente depende de Gln3 en glutamina y no de fuentes no-represoras como prolina. Este resultado ha sido interpretado proponiendo que la respuesta Gln3-dependiente en glutamina pudiera deberse a la acción conjunta de Gln3 con el sistema sensor de aminoácidos determinado por Csy1 y Stp2 que no funciona en prolina (Liao, W., *et al.*, 2008). En el caso de *KIBATI*, se podría suponer un modelo similar. El hecho de que en los experimentos de expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, la expresión de *KIBATI* dependió muy débilmente de Gln3, indica que en condiciones heterólogas, Gln3 no es capaz de interactuar con el sensor de aminoácidos de *S. cerevisiae* codificado por *CSY1*.

Para poder analizar si la fusión contiene la región regulatoria adecuada de *KIBATI* y dado que *K. lactis* ya contiene una enzima β-galactosidasa endógena, podría construirse una nueva fusión con un reportero diferente (como GFP) en un vector para *K. lactis* y analizarse su expresión genética en la cepa silvestre y en la mutante *Klgl3Δ* para posteriormente comparar con los resultados obtenidos en el sistema heterólogo.

6.7. El factor transcripcional *Kl*leu3 ortólogo a Leu3 de *S. cerevisiae*.

El gen *LEU3* de *S. cerevisiae* fue originalmente identificado como un regulador positivo de la expresión de *LEU1* y *LEU2*, genes que codifican para la isopropilmalato isomerasa y β -isopropilmalato deshidrogenasa, respectivamente, enzimas de la vía de síntesis de leucina (Kohlhaw, G.B., 2003).

Leu3 es una proteína homodimérica de unión a DNA con 886 residuos por monómero y con un peso molecular aproximado de 100,000 Da, que reconoce la secuencia palindrómica 5'- CCGN₄CGG -3' en los promotores de *LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2* y *GDH1* y se une a ella (Boer, V.M., *et al.*, 2005).

Análisis genéticos y bioquímicos han demostrado que la expresión de al menos siete genes de *S. cerevisiae* se encuentran bajo control positivo de Leu3 de los que seis pertenecen a la vía de biosíntesis de los BCAAs (Boer, V.M., *et al.*, 2005). La actividad de Leu3 es modulada por un intermediario de la vía de los BCAAs, el α -isopropilmalato (α -IPM). A altas concentraciones de α -IPM, Leu3 actúa como activador transcripcional, mientras que a concentraciones bajas o nulas, Leu3 actúa como un represor transcripcional (Kohlhaw, G.B., 2003).

En la vía de biosíntesis de leucina participan 9 enzimas que determinan la producción de este aminoácido a partir de piruvato. Parte de la vía es compartida con la biosíntesis de valina y varias enzimas también son compartidas para la vía de la isoleucina (Sze, J., *et al.*, 1993). La biosíntesis de leucina es controlada por el activador transcripcional Leu3 en respuesta a la disponibilidad de leucina, que se encuentra activo cuando los niveles del intermediario α -isopropilmalato son altos, dado que este intermediario funge como co-activador de Leu3. En virtud que en presencia de leucina se reprime la vía, la disponibilidad de α -isopropilmalato sirve como un sensor de los niveles de leucina (Fafournoux, P., *et al.*, 2000).

El promotor del gen *KIBAT1* no tiene sitio presunto de unión para *Kl*Leu3, de acuerdo a los análisis realizados usando las bases de datos de *S. cerevisiae*, sin embargo, datos no publicados de nuestro laboratorio (Hernández-Lorenzo, F., 2009) indican que Leu3 regula positivamente a

BAT1 y negativamente a *BAT2*, por lo que consideramos importante estudiar el efecto que tiene el factor transcripcional *KlLeu3* sobre la expresión de *KIBAT1*.

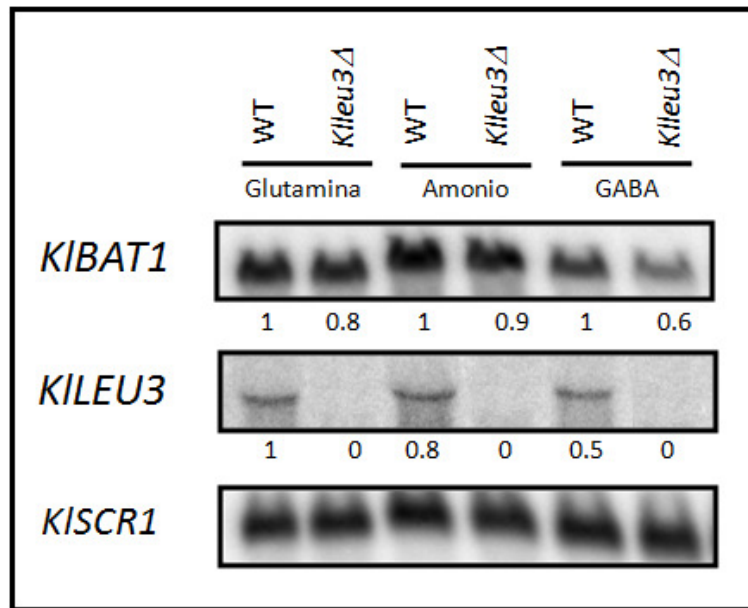


Figura 24. Efecto del factor transcripcional *KlLeu3* sobre la expresión de *KIBAT1*. *K. lactis* y la mutante *Klleu3Δ* fueron cultivadas en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno. Se utilizaron como sondas de *KIBAT1* un fragmento de 638 pb, de *KILEU3* un fragmento de 1,506 pb, así como un fragmento de 486 pb del gen *KISCR1*. Se cuantificó la señal en cada condición y se usó el valor obtenido con la sonda de *KISCR1* para normalizar.

Como se observa en la figura 24, solamente se observa un efecto de la falta de *KlLeu3* sobre la expresión de *KIBAT1* bajo condiciones derepresoras (GABA como única fuente de nitrógeno). Esto resulta distinto a lo encontrado para el caso de *BAT1* de *S. cerevisiae* (datos no publicados), ya que para este caso, *Leu3* regula positivamente la expresión tanto en glutamina como en GABA. Los resultados presentados en la figura 23 son equivalentes a los mostrados en la figura 21 cuando se utilizó el sistema heterólogo de expresión con el reportero β -gal en el sentido que *Leu3* únicamente regula en GABA, sin embargo, en el sistema heterólogo la expresión de *KIBAT1* está reprimida en glutamina y por ende los efectos de los activadores no son evidentes, por lo tanto, podemos concluir que *KlLeu3* regula positivamente la expresión de *KIBAT1*, aunque este efecto es únicamente evidente en presencia de GABA como fuente de nitrógeno, aun cuando la expresión de *KIBAT1* es equivalente tanto en GABA como en glutamina. Esto sugiere que al igual que *KlGln3*, *Klleu3* pudiera actuar en combinación con reguladores presentes en este caso

en GABA y no en glutamina. Dado que Leu3 en *S. cerevisiae* actúa como homodímero, es posible considerar que en *K. lactis*, el ortólogo de Leu3 pudiera formar heterodímeros con otros factores para poder llevar a cabo su función en lugar de homodímeros.

6.8. Localización subcelular de la proteína *K/Bat1*.

De acuerdo a los antecedentes de los parálogos *BAT1* y *BAT2*, se sabe que el producto del primero se encuentra en la mitocondria, mientras que el del segundo se localiza en el citosol (Prohl Corinna, *et al.*, 2000, Colón-González, M., 2010). En *S. cerevisiae*, el transporte de valina, isoleucina y leucina se lleva a cabo mediante la permeasa general de aminoácidos, Gap1 y las permeasas de aminoácidos de cadena ramificada, Bap2 y Bap3 (Didion, T., *et al.*, 1995).

Las reacciones para generar el intermediario en la síntesis de leucina (α -IPM) se llevan a cabo en la mitocondria para después ser transportada al citosol a través de la membrana mitocondrial (Kohlhaw, G., 2003). Por otro lado, la valina es sintetizada únicamente por Bat1 por lo que se encuentra acumulada en la mitocondria y posteriormente se exporta al citosol. En cuanto a la isoleucina, el último paso de su síntesis es catalizado por Bat1 en la mitocondria y por Bat2 en el citosol.

Considerando las premisas anteriormente mencionadas, se esperaría encontrar en la mitocondria a la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis*, por lo siguiente: i) el perfil de expresión del gen *KIBAT1* con su parálogo *BAT1*, es muy parecido y ii) si en *K. lactis* el requerimiento de valina en la mitocondria solo fuera satisfecho por la única transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, *K/Bat1*, tal como ocurre en *S. cerevisiae* por Bat1.

Con ayuda de la base de datos Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) se determinó que la proteína *K/Bat1* contiene una pre-secuencia de 34 aminoácidos que le da una probabilidad de 97% de ser transportada a la mitocondria (ver tabla 3).

Proteína	No. aa	Pre-secuencia	Probabilidad
Bat1	393	MLQRHSLKLGKFSIRTLATGAPLD	83.4 %
Bat2	376	---	4.4%
K/Bat1	407	MNYIGLRNCARAVSSRVSIPSRGIKSHILTSYRA	97.2%

Tabla 3. Porcentaje de probabilidad de la proteína de ser transportada a la mitocondria.

Dado que no ha sido reportada la localización de la BCAT de *K. lactis*, y con el propósito de identificarla, se acopló la proteína amarilla fluorescente (YFP) a la proteína *K/Bat1*, insertando el módulo yECitrine directamente en el cromosoma (figura 25).

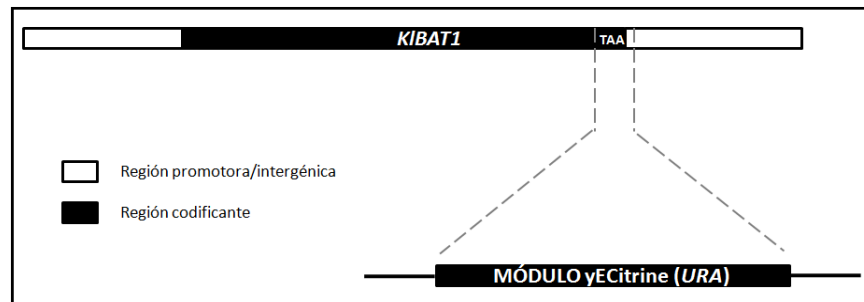


Figura 25. Mapa de la construcción de la proteína *K/Bat1*-YFP. Se insertó un módulo yECitrine con *URA3* como marcador de selección que reemplaza el codón de término de *KIBAT1*.

Se seleccionaron al azar 20 clonas a las cuales se les extrajo proteína total para hacer un ensayo tipo Western empleando un anticuerpo monoclonal α -GFP, para verificar la inserción del módulo yECitrine. Como se observa en la figura 26, el anticuerpo reveló la presencia de 2 proteínas donde la de mayor concentración concuerda con el tamaño esperado de la fusión *K/Bat1*-YFP (~72 KDa), sin embargo aunque la segunda banda pareciera ser una inespecificidad del anticuerpo, no se observa en la proteína de la cepa silvestre (WT).

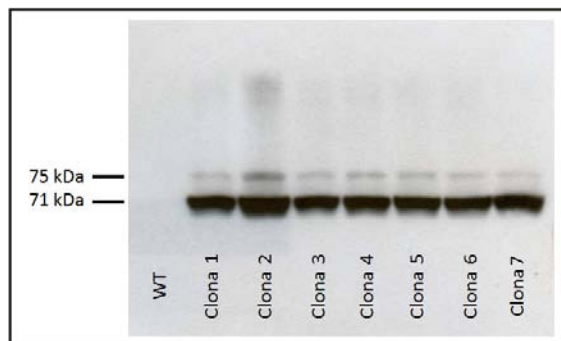


Figura 26. Ensayo tipo Western para comprobar la inserción de la proteína amarilla fluorescente.

Dadas éstas circunstancias, aunque pudiera tratarse de una modificación post-traducciona, decidimos verificar por hibridación tipo Southern que efectivamente el módulo yECitrine se haya insertado únicamente en el extremo 3' del gen *KIBAT1* y de tal forma comprobamos que en efecto, solo había una sola copia del DNA que codifica para la proteína YFP (figura 27).

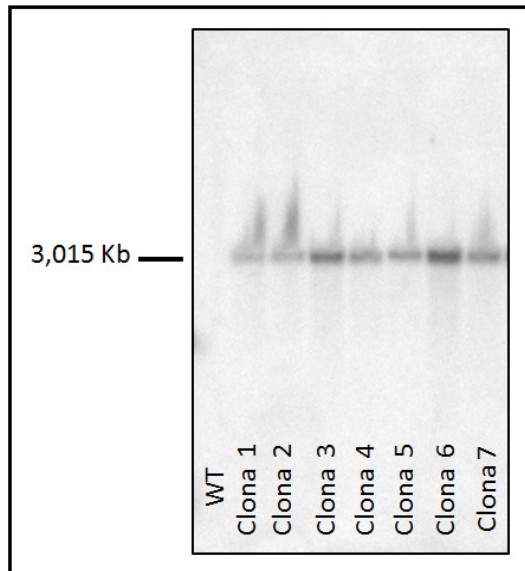


Figura 27. Ensayo tipo Southern para comprobar la inserción del módulo YFP en un solo sitio del genoma de *K. lactis*.

Una vez que se llevaron a cabo las confirmaciones antes mencionadas, se determinó la velocidad específica de crecimiento de la cepa etiquetada con la proteína fluorescente y se comparó con la cepa silvestre para conocer si dicha proteína afectaba en la fisiología de la célula. Tal como se observa en la figura 28, comprobamos que la proteína YFP acoplada a *KIBat1* no afecta la función de la proteína, ya que el fenotipo de la mutante etiquetada es equivalente al de la silvestre.

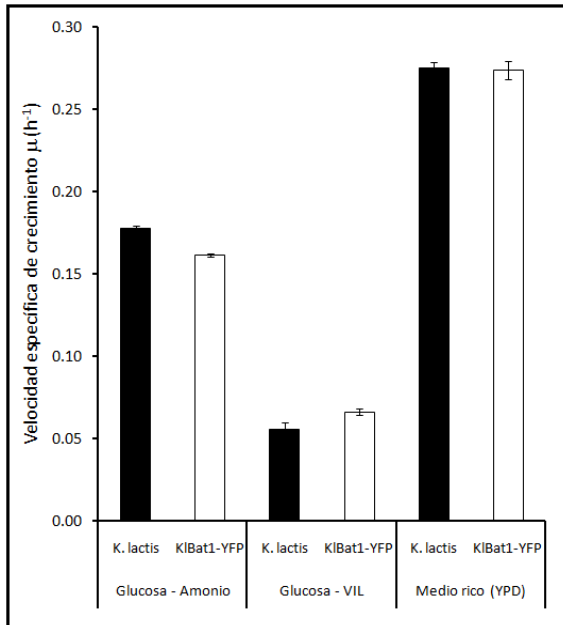


Figura 28. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas silvestre (WT, barras de color negro) y mutante *KIBAT1*-YFP (barras de color blanco) en condiciones biosintéticas (MM glucosa-amonio), catabólicas (MM glucosa-VIL) y en medio rico (YPD).

Para determinar la localización de la BCAT de *K. lactis* se prepararon muestras a partir de un cultivo crecido en MM glucosa-amonio, para observar en el microscopio óptico de fluorescencia y en el microscopio confocal de fluorescencia. En virtud que se esperaba encontrar a *KIBat1* localizada en la mitocondria, las células fueron tratadas con Mitotracker para corroborar la colocalización con dicho organelo, sin embargo, sorpresivamente se observó mayoritariamente concentrada en un punto y dispersada en toda la célula y no en la mitocondria como se esperaba a pesar de observarse una ligera fluorescencia en este organelo (figura 29).

Ha sido reportado que las mutantes *ade2-* tienden a acumular un intermediario fluorescente en la vacuola y dado que la cepa de *K. lactis* 155 usada en estos estudios presenta tal auxotrofia, se tuvo la precaución de adicionar hasta cinco veces más la cantidad necesaria de adenina a los medios de cultivo utilizados en este experimento. Sin embargo, para descartar la acumulación de la proteína fluorescente en la vacuola, las células fueron tratadas con DAPI para teñir los núcleos y finalmente se observó colocalización con el núcleo (figura 30).

Visto lo anterior y considerando la alta capacidad respiratoria de *K. lactis*, se decidió evaluar si durante el metabolismo respiratorio (etanol como única fuente de carbono), la BCAT ahora si se

localizaba en la mitocondria, sin embargo, la compartimentalización de *KlBat1* no cambió ya que se siguió localizando en núcleo (resultados no mostrados).

La presencia de *KlBat1* en el núcleo es inesperada y pudiera sugerir que en *K. lactis* ésta posee una actividad alterna, aun desconocida. Tal es el caso de la proteína codificada por *LYS20* que además de su función como homocitrato sintasa en la que cataliza la condensación de acetyl-CoA y α -cetoglutarato para formar homocitrato (primer paso en la vía de biosíntesis de lisina), lleva a cabo una función nuclear relacionada con la reparación de daño celular (Scott, P. y Pillus, L., 2010).

Resultados preliminares (no mostrados) de la doble mutante *bat1, bat2 Δ* de *S. cerevisiae*, transformada con un plásmido monocopia que contenía la fusión *KlBat1*-yECitrine bajo su propio promotor, mostraron una compartimentalización diferente a la observada en *K. lactis*, pues en este caso la fusión se encontró tanto en mitocondria como en citoplasma.

Será interesante analizar a detalle el papel de la presecuencia mitocondrial presente en *KlBat1*. Estudiar si está relacionada con la localización en el núcleo o en su caso, elucidar cual es la señal que lo determina. Aunado a estas observaciones, tendrá gran importancia proponer un modelo que explique la manera en la que desempeña la función de transaminasa desde el núcleo y además la razón por la que se encuentra en dicho compartimento.

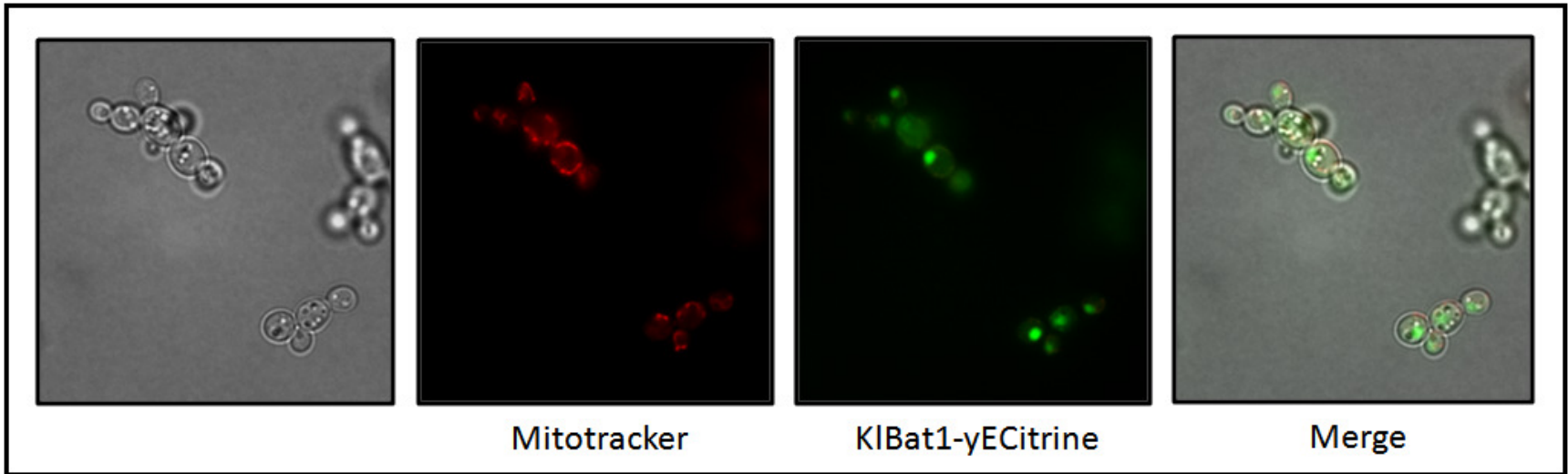


Figura 29. Imágenes de fluorescencia donde se muestra la localización subcelular de *K/Bat1*.

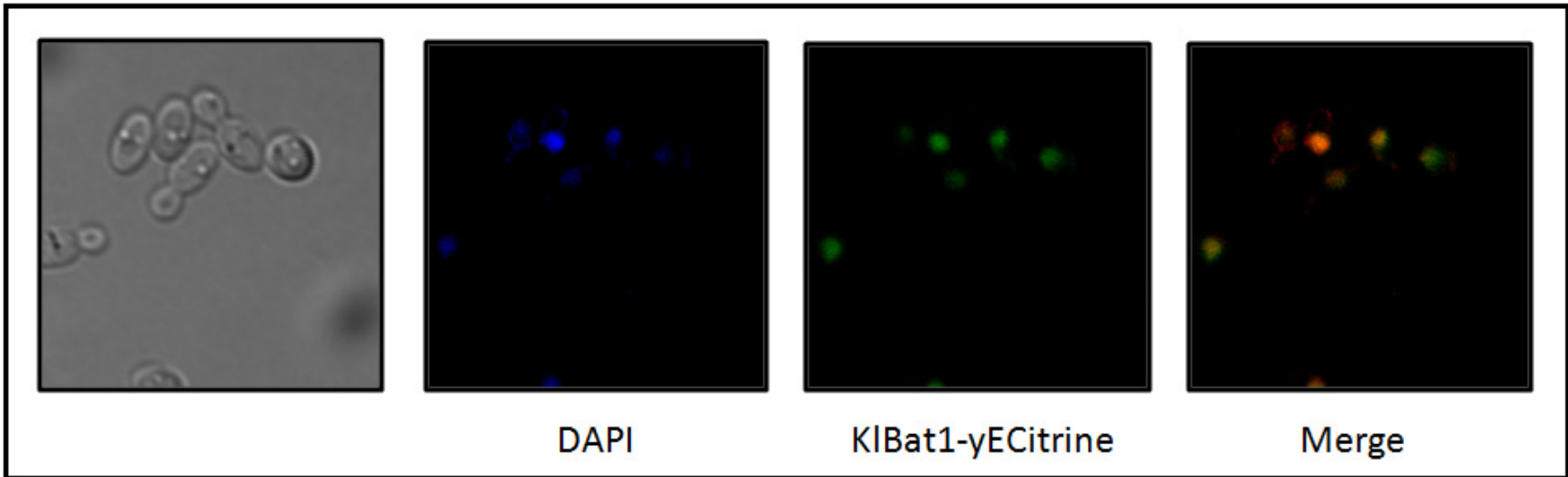


Figura 30. Imágenes de fluorescencia donde se muestra la localización subcelular de *K/Bat1*.

7. CONCLUSIONES

7.1. La aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de *K. lactis*, *KIBat1*, cataliza la biosíntesis y el catabolismo de valina, isoleucina y leucina.

Los resultados mostraron que *KIBat1* es una enzima bifuncional que cataliza la biosíntesis y el catabolismo de valina, isoleucina y leucina. En medio glucosa-amonio, la mutante *Klbat1*Δ es un auxótrofo total de los aminoácidos pues requiere la adición simultánea de los tres para mostrar un fenotipo similar al de la cepa silvestre. Mientras tanto, en medio glucosa-amonio-VIL, la mutante *Klbat1*Δ no mostró crecimiento aun en presencia de los aminoácidos de cadena ramificada.

7.2. El perfil de expresión del gen *KIBATI* corresponde al de un gen biosintético.

La expresión de *KIBATI* se reprime en presencia de los aminoácidos VIL, lo que sugiere una regulación por producto final. Además, el nivel de expresión es independiente a la calidad de la fuente de nitrógeno ya que al no haber una represión por glutamina, indica que *KIBATI* no es un gen sujeto a represión catabólica nitrogenada. El patrón de expresión encontrado se considera característica de genes cuyos productos codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos.

7.3. La expresión del gen *KIBATI* se encuentra reprimida durante el metabolismo respiratorio.

Al analizar el nivel de expresión de *KIBATI* en diferentes fuentes de nitrógeno y con etanol como única fuente de carbono, no se observa una represión por efecto de los aminoácidos VIL, a diferencia de lo observado cuando se utilizó glucosa como única fuente de carbono. Al comparar si la expresión en ambos metabolismos (fermentativo y respiratorio) se lleva a cabo al mismo nivel, se observó que durante el metabolismo respiratorio *KIBATI* se encuentra naturalmente reprimido.

7.4. El gen *KIBAT1* tiene también un perfil de expresión catabólico.

Al analizar la expresión de *KIBAT1* en tres diferentes fases de la curva de crecimiento en medio de cultivo rico, se observa que se mantiene encendido a un nivel determinado. De esta forma se sabe que está siendo expresado para degradar a los aminoácidos VIL presentes en el medio. Este carácter catabólico se confirmó determinando la concentración intracelular de VIL durante las fases exponencial y estacionaria, en las cepas silvestre y mutante *Kibat1Δ* donde los aminoácidos VIL se encuentran acumulados al no estar presente la BCAT en comparación con la cepa silvestre de *K. lactis*.

7.5. El promotor de *KIBAT1* comparte con *BAT1* y *BAT2*, los sitios consenso de unión de los factores de transcripción codificados por *GCN4*, *GLN3* y *NRG1* de *S. cerevisiae*.

Al analizar la región de 1,000 pb río arriba del ORF de *KIBAT1* para identificar probables sitios de unión a factores de transcripción usando una base de datos de *Saccharomyces cerevisiae*, se encuentra que pudiera contener sitios para Gcn4, Gln3 y Nrg1, principalmente, al igual que *BAT1* y *BAT2*.

7.6. El uso del sistema reportero β-galactosidasa en un sistema heterólogo no fue de utilidad para *KIBAT1* al encontrarse resultados contradictorios.

Tras determinarse la actividad β-galactosidasa bajo el promotor de *KIBAT1* en diferentes fondos genéticos de *S. cerevisiae*, se encontró que la calidad de la fuente de nitrógeno regula la expresión de *KIBAT1*, regulación que se considera característica de genes cuyos productos codifican enzimas implicadas en el catabolismo de compuestos nitrogenados. De manera contrastante, el regulador Gln3 no parece tener efecto a diferencia de lo que se ha reportado para genes catabólicos de *S. cerevisiae*.

7.7. Los factores transcripcionales *KlGln3* y *KlLeu3* regulan de una manera distinta a la reportada para *S. cerevisiae*.

Al determinar el perfil de expresión de *KIBAT1* en las mutantes *Klgln3Δ* y *Klleu3Δ*, se encontró que *KlGln3* regula positivamente al gen *KIBAT1* en glutamina pero no en amonio. Al analizar la expresión de *KIPUT1*, éste se mantiene expresado a un mismo nivel independientemente de la calidad de la fuente de nitrógeno contrario a lo observado para su ortólogo PUT1 de *S. cerevisiae*. Por su parte, el factor transcripcional *KlLeu3* regula de manera ligeramente positiva a *KIBAT1* únicamente en GABA como única fuente de nitrógeno.

7.8. La proteína *KlBat1* se encuentra localizada principalmente en el núcleo y en el citoplasma.

Los resultados obtenidos sugieren que la proteína *KlBat1* se encuentra compartamentalizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. La localización en el núcleo no se esperaba pues no concuerda con lo reportado para las BCATs de *S. cerevisiae*.

8. PERSPECTIVAS

8.1. Papel de los factores codificados por *KIGCN4*, *KIGAT1*, *KINRG1* y *KIURE2* en la expresión de *KIBAT1*.

Será importante analizar el papel de los genes ortólogos de *S. cerevisiae* para los que se encontró sitio putativo de unión en el promotor de *KIBAT1*. Para esto, será necesario construir las mutantes correspondientes y posteriormente determinar el perfil de expresión del gen *KIBAT1* en dichos fondos genéticos.

8.2. Determinar si los factores *KIGln3* y *KIGcn4* complementan la función de sus ortólogos en *S. cerevisiae*.

Para entender si los factores *KIGln3* y *KIGcn4* (entre otros) corresponden a los ortólogos de *S. cerevisiae*, sería interesante estudiar si éstos complementan la función de las mutantes *gln3Δ* y *gcn4Δ*.

8.3. ¿Qué tamaño tiene el promotor verdadero de *KIBAT1*?

Como se mencionó en el apartado 5.4. para los análisis llevados a cabo, se utilizó la región de 1,000 pb río arriba del ORF de *KIBAT1*. Sin embargo, la región intergénica que no sobrelapa el ORF contiguo solamente comprende 200 pb aproximadamente. Dado lo anterior, será importante determinar cual es el promotor verdadero de *KIBAT1* para estudios posteriores.

8.4. Analizar la importancia de la sublocalización nuclear de *KIBat1*.

Será interesante analizar a detalle el papel de la presecuencia mitocondrial de *KIBat1* y estudiar si está relacionada con la localización en el núcleo o en su caso, elucidar cual es la señal que lo determina.

7. REFERENCIAS

1. Beck, T y Hall, M., 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Letters to Nature* 42: 689-692.
2. Boer, V.M., *et al.*, 2007. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS* 7: 604-620.
3. Boer, V.M., *et al.*, 2005. Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen- and carbon limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research* 5: 885-897.
4. Breunig, K.D., *et al.*, *Regulation of primary carbon metabolism in Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb Technol*, 2000. **26**(9-10): p. 771-780.
5. Brosnan, J.T. y Brosnan, M.E., 2006. Branched-Chain amino acids: metabolism, physiological function and application. *136*: 207S-211S.
6. Chen, X.J., Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, 1996. **172**(1): p. 131-6.
7. Chin, C.S., *et al.*, 2008. Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biology* 6(6):e146.
8. Coffman, J.A., Rai, R. y Cooper, T.G., 1995. Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomuces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 177(23): 6910-6918.
9. 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.
10. Conant, G.C. y Wolfe K.H., 2006. Functional Partitioning of Yeast Co-Expression Networks after Genome Duplication. *PLOS Biology*. 4: e109.
11. Conant, G.C. y Wolfe K.H., 2008. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews* 9: 938-950.
12. Cooper, T.G., 2002. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting dots. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 223-238.
13. Courchesne, W.E. y Magasanik, B., 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 3(4): 672-683.
14. Crespo, J. L., *et al.* 2002. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1 and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 6784-9.
15. Davoodi, J., Drown, P.M., Bledsoe. R.K., *et al.*, 1998. Overexpression and Characterization of the Human Mitochondrial and Cytosolic Branched-chain Aminotransferases. *The journal of Biological Chemistry* 273(9): 4982-4989.
16. Dickinson J. R., 1993. Pathways of Leucine and Valine Catabolism in Yeast. *Methods in Enzymology* 324: 80-92.

17. Dickinson J. Richard. 2000. Branched-chain keto acid dehydrogenase of yeast. *Methods Enzymol.* 324: 389-398.
18. Dujon, B., 2006. Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *TRENDS in Genetics* 22(7): 375-387.
19. Dujon, B., *et al.*, 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995): 35-44.
20. Eden, A. *et. al.*, 2001. Involment of branched-chin amino acid aminotranferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 296-300.
21. Epstein, et al. 2001. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell.* 12: 297-308.
22. Force, A., *et al.* 2005. The Origin of Subfunctions and Modular Gene Regulation. *Genetics.* 170: 433-446.
23. Gancedo, J.M, 1998. Yeast carbón catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews* 62(2): 334-361.
24. Georis, I. et. al., 2008. Nitrogen catabolite repression-sensitive transcription as a readout of Tor pathway regulation: The genetic background, reporter gene and GATA factors assayed determine the outcomes. *Genetics Society of America* 181: 861-874.
25. Godard, P., Urrestarazu A., Vissers, S., *et al.*, 2007. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27(8): 3065-3086.
26. González-Siso MI, Freire-Picos MA, González-Domínguez M, Rodríguez Torres A y Cerdán ME. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme and microbial technology* 2000; 26:699-705.
27. Hazelwood, L.A., Daran J.M., van Maris, A.J.A., *et. al.*, 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2259-2266.
28. Hernández, H., Aranda, C., Riego, L. y González, A., 2011. Gln3-Gcn4 hybrid transcriptional activator determines catabolic and biosynthetic gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BBRC* 404: 859-864.
29. Hofman-Bang, J. 1999. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology* 12(2): 35-73.
30. Hurley, I., Hale, M.E. y Prince, V.E., 2005. Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evolution and Development* 7(6): 556-567.
31. Hinnebusch, A.G., 2005. Translational regulation of *GCN4* and the general aminoacid control of yeast. *Annual Review of Microbiology* 59: 407-450.
32. Hittinger, C.T. y Carroll, S.B., 2007. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449: 677-682.
33. Hurley, I., Hale, M.E. y Prince, V.E., 2005. Duplication events and the evolution of segmental identity. *Evolution and Development* 7(6): 556-567.
34. Jablonowsky D. y Schaffrath, D. 2007. Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochemical society transactions* 35(6): 1533-1537.

35. Kellis, Bruce & Lander. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 428: 617-624.
36. Keogh RS, Seoighe C y Wolfe KH. Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 1998; 14:443-457.
37. Kispal, G., *et al.*, 1996. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 271(40): 24458 – 24464.
38. Kohlhaw, G.B., 2003. Leucine Biosynthesis in Fungi: Entering Metabolism through the Back Door. *Microbiology and molecular biology review*. 67: 1-15.
39. Kuepfer, L., Sauer, U. y Blank, L.M., 2005. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research* 15: 1421-1430.
40. Kurtzman CP y Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998; 73:331-371.
41. Lachance, M.-A., *Current status of Kluyveromyces systematics*. *FEMS Yeast Research*, 2007. 7(5): p. 642-645.
42. Liao, W.L., Ramón, A.M. y Fonzi W.A., 2008. *GLN3* encodes a global regulator of nitrogen metabolism and virulence of *C. albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 45(4): 514-526.
43. Mainul-Islam, M., *et al.*, 2007. A novel branched-chain amino acid metabolon. *The Journal of Biological Chemistry* 282(16): 11893-11903.
44. Magasanik, B. y Kaiser C.A., 2002. Nitrogen Regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1-18.
45. Mehta P.K., Hale, T.I. y Christen, P., 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* 214: 549-561.
46. Merico A, Galafassi S, Piskur J y Compagno C. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 2009;1-8.
47. Natarajan, K., *et. al.*, 2001. Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* 21(13): 4347-4368.
48. Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast Nosek, J., Tomaska, L., Bolotin-Fukuhara, M. y Miyakawa, I., 2005. Mitochondrial chromosome structure: an insight from analysis of complete yeast genomes. *FEMS Yeast Research* 6: 356-370.
49. Peter, During & Ahmed. 2006. Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via the TOR signaling pathway. *Journal of biological chemistry*. 281: 5546-5552.
50. Prohl, C., Kispal, G. y Lill, R., 2000. Branched-chain-amino- acid transaminases of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* 324: 365-375.
51. Schaffrath R y Breunig KD. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology* 2000; 30:173-190.

52. Schoodermark-Stolk, *et al.* 2005. Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Reseach.* 6: 777-791.
53. Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durrens P; Génolevures Consortium. 2009. Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue): D550-4.
54. Sor, F. and H. Fukuhara, Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, 1989. 5(1): p. 1-10.
55. Sosa, E., *et al.* 2003. Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun.* 310: 1175-80.
56. Sugino & Innan. 2005. Estimating the time to the whole-genome duplication and the duration of concerted evolution via gen conversion in yeast. *Genetics.* 171: 63-69.
57. Tirosh, B. 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Research.*
58. Tirosh, I., *et al.* 2008. On the relation between promoter divergence and gene expression evolution. *Mol Syst Biol.* 4: 159.
59. Wach, A., *et. al.*, 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.
60. Wapinski I., *et al.* 2007. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature.* 449: 54-61.
61. Wolfe K.H. y Shields D.C., 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*; 387:708-713.
62. Zaman, S., *et al.* 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet.* 42: 27-81.
63. Zivanovic, Y., Wincker P., Vacherie B., Bolotin-Fukuhara, M. y Fukuhara H., 2005. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* 5(4-5): 315-322.

8.2.3. Gln3 vs *KlGln3*. Identidad 33 %

```

Gln3      MQDDPENSPLYDLLNSHLDVHGRSNEEPRQTGDSRSQSSGNTGENEEDIAFASG-----LNGGTFDSMLEALPDDL
KlGln3    MSDRGLHDPFELFASTDSGVSHEPSWNHTQFDAMLEILPENLNLDVGGGLQQDTSSPVATTLLKFESNTTTTITNASMKDD
          *.*  :. :  : .. . *  ... :  *  .  .  . *  . :  :. :.  .. *  :. : *  .*

Gln3      YFTDFVSPFTAATTSVTTKTKVDKTTPATNHMDDDIAMFDSLATTQPIDIAASNQNGEIAQLWDFNVDQFNMTSPNSSG
KlGln3    GSPDVIGEEDDEGGWKTVAEISSHNLKSRPIDIVQSVTPSTTAGQLIGNDLNLQNGEIAQLWDFNVHEFMMTPSDHSD
          .*..  .  .... :.. .  .. :  *  :  .  . :*:  :  *  *****.* *  ***:  *.

Gln3      SATISAPNSFTSDIPQYNHGLSGNSVSKSLFPYNSSTNSNINQPSINNN---SNTNAQSHHSFNIYKLNNSNSSSAM
KlGln3    SATISAPSSFNSEQFTPGTTTPGFNPASSTASITNNYNNGNNGNNNNNNNTNSNSHFQNSWNHLLHQHDNGPNSSSL
          *****.*.*:  .  :  *  . :*:  *.. .* *  *  . ***  **::  *  .  . :. : :*. . **::

Gln3      NITN-----NNNSNNSNIQHPFLKKS-----SIGLSSNTTNSVRKNSLIKPMSSSTLANFK
KlGln3    AYQHPRLFQNNSSQSTIKADEYQHKQPQLPRRSSRNLLIKNDMNEDGALPLLHTTTNLVKKNSVKNLPTTTLQYR
          :  *****.*.*:  :. :  :. :  *  :  . *** * : *** * : * : . : * : * : . :

Gln3      RAASVSSSISNMEPSGQN---KPLIQCFNCKTFKTPLWRRSPEGNTLCNACGLFQKLHGTMRPLSLKSDVIKKRISKK
KlGln3    RCSSSTNMQVMNGPPVNNGAKANKPPTQCYNCKTLKTPLWRRDPDGNTLCNACGLFQKLHGTMRPLSLKSDI IKKRNKTK
          *.* :.  *  : *  ** : *** : ***** : * : ***** : ***** : ***** : * : * :

Gln3      RAKQTD---NIAQNTPSAPATASTSVTTTNAKPIRSRKKSLQONSLSRVIPEEIIIRDNIGNTNNILNVNRGGYFNFSVP
KlGln3    RTKKDDKPAENMELQGQNDHSTNRGSQSPEKFORKLSAKHTSIQPAANIYNQSALSQNSLNNLNKKTATKRRSSTSSST
          * : *  *  * :  .  . : *  * : . : :  *  * :  *  :  .  . : . : . : *  * :  . :  . *  .

Gln3      SPVLMNSQSYNSSNANFNGASNANLNSNNLMRHNSNTVTPNFRSSRRSSTSSNTSSSSKSSRSVVPILPKPSPNSANS
KlGln3    SSKSSSRSVVPIPKPSPGSRNTLQQFQYQIQMQVSPNSAASSPRYSNSPRFYPTSPSTGLGVSIPRRKSSRTQISQ
          *  . * : *  .  . : . *  *  . :  : :.  **  ** * * . * . . : * * . . *  * * . . .

Gln3      QQFNMMNLMNTTNNVSAGNSVASSPRIISSAN---FNSNSPLQQLLSNSFQRQGMNIPRRKMSRNASYSSFMAASL
KlGln3    SSSFMAQSLQLQHQQHNSSSNHTSAGISTNGSNSQASTATSQNANNLSSSTNSSSNATISAPNSWANHSLSQPQNIASP
          .. *  .* :  :. :  .* : * . * : . . .  . : *  : ** * : . . . *  . :  * * * . . **

Gln3      QQLHEQQQVDVNSNTNTNSNRQNWSSNSVSTNSRSSNFVSQKPNFDIFNTPVDSPSVSRPSSRKSHSTLSLQQLQNSE
KlGln3    NSSRSPFELFSNPNSQPKKSHKSLLSQQLQNSNSSSSSSSFVENASSGQLSQTPPSHHSQTQQNFSSVPAASPRSSY
          :. :.  :. : * . * : . : . : . * :  . : . . ** . *  *  .  :  : * .  . : . : . . *  .  . * .

Gln3      NSFISNHKFNRLSSDSTSPIKYEADVSAAGKISEDN-STKGSSKESSAIADELWLKFGI
KlGln3    VDTLQQQRGILQYEQQVARRKTPSTRQSNPSLFESSGSSLSKPKKENVMDDLDWLKFGM
          . : . : . :  : . : . : . *  :  . : . : *  * : . . * : . . : * : * : * : * :
    
```


8.2.5. Put1 vs *Kl*Put1. Identidad: 58 %

```

Put1      MIASKSSLLVTKS-RIPSLCFPL-IKRSYVSKTPHSTANLANMVEVTPAANANGNSVMAPPNSINFLQTLPKKELFQLGF
KlPut1    MLPYGTAAVRSVGRFGRSVPMLTYRFVSTQNT---NATKSTMAPATAIHDMAASQHTVPAPDAHLRRLTSLKSELSLGM
*:. . : * . * : : ..* : . : **:* * : : . * : * . . :**.*.***.**:

Put1      IGIATLNSFFLNTIIKLFPIPIPIVVKFFVSSLYCGGENFKEVIECGKRLQKRGISNMMLSLTIENSEGKSLSTPVDQ
KlPut1    IGVCTINKPMLDLVIKLFYVPLFMVKLFISPLYCGGDTPAEVVETGKRLQNRGINNMMLSLTIEDAEGTKNVD---INY
**:.**.* . * : :*****.* : :**:*.*.***:* . **.* *****.***.******.:**.*.:. : :

Put1      IVKETISSVHNILLPNIIGQLES-KPINDIAPGYIALKPSALVDNPHEVLYNFSNPAYKAQRDQLIENCSKITKEIFELN
KlPut1    IVSETIKSVHTILKPLLVEQLESGKDINSIPPGYIALKPSALVANPAQVLLNFNNPEWKTQRDELVNNCSKITQEVYNLN
**.***.***.* * : : **** * **.*.***** ** .** **.* * : :**.*.*****.*.:.**

Put1      QSLKKYPERKAPFMVSTIDAKEYDLQENGVYELQRILFQKFNPTSSKLISCVGTWQLYLRDSDGHILHELKLAQENGYK
KlPut1    QELLAKYPERKSPFFVSTIDAKEYDLQKAGVYELQRILFSKFNPASSPLISCVGTWQLYLVDSAADLAKDYERAKKEGYK
*.* *****.*.*****.*****.* **.* ***** ** . : : : * : :**

Put1      LGLKLVRGAYIHSEKNRNIIFGDKTGTDENYDRIITQVVNDLIINGEDSYFGHLVVASHNYQSQMLVTNLLKSTQDNSY
KlPut1    LGLKLVRGAYIHSEPNRS-VVYATKEGTDANYNKVMTTAIKDLLVNGEKSYGHLVVASHNYDSQMLATKLLAD-QKNSV
***** ** . : : . * *** ** : : * . : :**.*.*****.***.*.*.***

Put1      AKSNIVLQQLGMADNVTYDLITNHGAKNI IKYVPWGPPLETKDYLLRRLQENGDAVRS DNGWPLIKAIKSIKRVGL
KlPut1    GKANVTLAQLLGMNDVTHDLITNHKVENI IKYVPWGPPLETKDYLLRRLQENGDAVRADNGIPLIKAVLKTALHL---
.*:.*.*.*****:*****.* : :*****:*** *****.* : :

```

8.3. Artículo

Los resultados mostrados en los apartados 6.1 y 6.2, fueron publicados en el siguiente artículo como parte del trabajo de Maritrini Colón Gonzalez, uno de los que constituyen el proyecto general sobre el estudio de los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

OPEN ACCESS Freely available online



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 *K/bat1Δ* 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