



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DIVERSIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS
GENES PARÁLOGOS *ALT1* Y *ALT2* DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
GEORGINA PEÑALOSA RUIZ



Tutor: DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

MÉXICO, D. F. 10 ENERO 2012



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.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	3
II.	RESUMEN.....	4
III.	INTRODUCCIÓN.....	5
	a. Generalidades del metabolismo del carbono y de nitrógeno en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
	b. Robustez genética, duplicaciones y evolución.....	7
	c. El origen de los genes duplicados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
	d. La preservación de dos copias de un mismo gen.....	10
	e. Los genes duplicados ALT1 y ALT2.....	11
	f. Las alanino aminotransferasas.....	13
	g. Función de las alanino aminotransferasas en plantas y animales.....	14
	h. Metabolismo de la alanina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
IV.	ANTECEDENTES.....	19
	a. El estudio de los genes parálogos del metabolismo de nitrógeno.....	19
	b. Los parálogos ALT1 y ALT2.....	20
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
VI.	HIPÓTESIS.....	24
VII.	OBJETIVO.....	24
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
IX.	RESULTADOS.....	32
	a. ALT1 constituye la vía principal de síntesis de alanina.....	32
	b. ALT1 y ALT2 se regulan por el mismo represor Nrg1.....	33
	c. La regulación negativa de Nrg1 se debe a la interacción directa con los promotores.....	34
	d. Evaluación del papel fisiológico de ALT2.....	36
	e. Las proteínas Alt1 y Alt2 en diferentes etapas de crecimiento.....	38
	f. Sobreexpresión de ALT2.....	40
	g. Determinación de actividad enzimática.....	43
	h. Secuenciación de la cepa tetO7-ALT2alt1Δ.....	44
X.	DISCUSIÓN.....	46
	a. La síntesis de alanina en condiciones fermentativas está mediada principalmente por Alt1.....	46
	b. La regulación transcripcional de ALT1 y ALT2.....	46
	c. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos como una herramienta para entender el mecanismo de regulación de ALT1 y de ALT2.....	47
	d. ALT2 no participa en el metabolismo de la alanina.....	49
	e. Alt2 podría realizar una función diferente a la que se predice por homología.....	50
XI.	CONCLUSIONES.....	54
XII.	PERSPECTIVAS.....	55
XIII.	REFERENCIAS.....	56

I. ABREVIATURAS

NCR (Nitrogen Catabolite Repression)-Represión catabólica de nitrógeno

WGD (Wide Genome Duplication)-Duplicación de genoma completo

DDC (Duplication Degeneration Complementation)-Modelo de duplicación degeneración complementación

EAC (Escape from Adaptive Conflict)-Modelo de escape del conflicto adaptativo

PLP- Piridoxal-5-fosfato

ALT-Alanino aminotransferasa

AlaAT-Alanino aminotransferasa

LDH-Lactato deshhidrogenasa

VIL-Valina Isoleucina Leucina

MM-Medio mínimo

ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)- Inmunoprecipitación de la cromatina

yEC (Yecitrine)- Variante de la proteína amarilla fluorescente YFP

II. RESUMEN

El genoma de la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae* está compuesto por cerca de 5500 genes, de los cuales 1102 forman 551 pares duplicados. Esta última cifra representa un alto porcentaje del genoma, por lo que se ha propuesto que la duplicación ha jugado un papel importante en la evolución de dicha levadura. En el presente trabajo se estudió el par de genes duplicados *ALT1* y *ALT2*; en un trabajo previo a éste se demostró que el gen *ALT1* participa en el metabolismo de la alanina, un aminoácido muy abundante en la célula. Siendo *ALT1* y *ALT2* genes muy parecidos (67% idénticos) se predijo que realizarían la misma función de alanino aminotransferasas. El objetivo de este trabajo fue contestar si tal predicción era correcta. Para ello se realizaron pruebas fisiológicas con mutantes para ambos genes, así como estudios de la regulación de la expresión genética; también se analizó la presencia de las proteínas correspondientes Alt1 y Alt2 y su actividad enzimática. Se concluyó que *ALT1* y *ALT2* tienen un perfil de expresión opuesto en las condiciones estudiadas; que *ALT2* es un gen que se traduce en una proteína, aunque ha perdido por completo la función original de alanino aminotransferasa, así que sólo *ALT1* realiza tal función en la levadura. La conservación de *ALT2* en el genoma pudiera obedecer a que desempeña otra función no relacionada al metabolismo de la alanina.

III. INTRODUCCIÓN

*a. Generalidades del metabolismo de carbono y de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de detectar cambios ambientales con alta sensibilidad; está provista de una maquinaria celular muy especializada que le permite adaptarse rápidamente a estos cambios. Este organismo es capaz de evaluar la disponibilidad y la calidad de los nutrientes, optimizando su crecimiento y metabolismo a través de respuestas transcripcionales específicas. Las cepas silvestres pueden ser aisladas de ambientes diversos, como suelos desérticos, robles, viñedos y flores³, lo que refleja una gran plasticidad metabólica.

S.cerevisiae puede utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono. Si bien los monosacáridos como glucosa y fructosa, que son fácilmente fermentables por la vía glicolítica son las fuentes preferidas, también utiliza otros azúcares como galactosa, trealosa, maltosa y sacarosa, aunque para ello requiere de otras enzimas que le permiten metabolizarlos. Como producto de la fermentación se producen etanol y glicerol, fuentes de carbono no fermentables que también pueden ser utilizadas para obtener energía. Existe una compleja jerarquía regulatoria que controla los genes necesarios para metabolizar múltiples fuentes de carbono^{4,5}.

Crece en presencia de glucosa representa una oportunidad para la rápida acumulación de biomasa, así como para sintetizar precursores metabólicos. Más del 40% de los genes de la levadura alteran su expresión en cuestión de minutos después de la adición de glucosa. La expresión de los genes de biogénesis ribosomal aumenta, mientras que se reprimen los genes implicados en la fosforilación oxidativa, así como otros genes mitocondriales; también se silencian genes necesarios para utilizar fuentes alternativas de carbono. Los represores transcripcionales Nrg1 y Nrg2, de los que se habla más adelante, participan en esta respuesta, y son responsables de la represión de los genes que tienen que ver con funciones mitocondriales, utilización de fuentes de carbono secundarias, transporte de nutrientes, genes de respuesta a estrés, etc⁶⁻⁸.

Este patrón de expresión génica cambia cuando se agota la glucosa en el medio y se empieza a consumir el etanol, utilizando la fosforilación oxidativa⁵. Se induce la entrada de factores transcripcionales al núcleo, que promueven la expresión de genes del ciclo de Krebs, gluconeogénesis, fosforilación oxidativa y de respuesta a estrés, entre otros. En presencia de glucosa, algunos de estos factores transcripcionales se encuentran secuestrados en el citosol⁹.

Por otro lado, la levadura también tiene la capacidad de discriminar la calidad y la cantidad de la fuente de nitrógeno en el medio⁵; puede utilizar casi 30 diferentes fuentes de nitrógeno, entre las que se encuentran aminoácidos, urea, amonio, bases nitrogenadas y derivados de purinas. Estos compuestos entran a la célula vía permeasas y son utilizados para procesos anabólicos, o bien se pueden catabolizar para liberar nitrógeno en forma de amonio o glutamato¹⁰. Todos los compuestos nitrogenados de la célula se sintetizan a partir del grupo amino del glutamato o de la glutamina¹¹.

El amonio, el glutamato y la glutamina se interrelacionan por medio de sistemas enzimáticos específicos y constituyen el núcleo del metabolismo de nitrógeno. El grupo amino del glutamato sirve como fuente para el 85% del nitrógeno celular; la glutamina es el otro 15%¹¹. La síntesis de glutamina dependiente de ATP, a partir de glutamato y amonio, es catalizada por la glutamino sintetasa, codificada por el gen *GLN1*. La glutamato sintasa (GOGAT), codificada por el gen *GLT1*, forma dos moléculas de glutamato a partir de glutamina y de 2-oxoglutarato. El glutamato también se puede sintetizar a partir de 2-oxoglutarato y amonio, por medio de glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP (Gdh1/Gdh3); se cataboliza por medio de la Gdh catabólica (Gdh2), que produce amonio y 2-oxoglutarato¹⁰.

El metabolismo de los aminoácidos está regulado por varios mecanismos. Uno de ellos es el control general de la biosíntesis de aminoácidos (GAAC por sus siglas en inglés), mediado por el factor transcripcional Gcn4¹². Éste induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis, sobre todo en condiciones de privación de aminoácidos, pero también es necesario para la expresión de algunos genes en condiciones basales. Aun cuando algunos genes cuyos productos están implicados en la biosíntesis de aminoácidos, se regulan por represión: (arginina, lisina,

metionina, cisteína y los aminoácidos de cadena ramificada), no se conocen mecanismos globales de regulación por represión transcripcional específicos para genes anabólicos¹⁰.

Por lo que respecta al catabolismo de aminoácidos, se conoce un sistema de regulación global y mecanismos específicos. La presencia en el medio de fuentes de nitrógeno secundarias como arginina, prolina, serina, treonina, alantoína, urea, GABA, o los aminoácidos aromáticos, induce la expresión de genes cuyos productos determinan el catabolismo de cada uno de ellos. Por otro lado, cuando al medio se adiciona una fuente de nitrógeno primaria, se activa la represión catabólica de nitrógeno (NCR, Nitrogen Catabolite Repression), un mecanismo global que evita o disminuye la expresión de una gran cantidad de genes asociados a la utilización de fuentes de nitrógeno secundarias: permeasas y enzimas catabólicas. El NCR actúa impidiendo que los factores transcripcionales GATA, Gln3 y Gat1, ingresen al núcleo¹³.

S.cerevisiae es un organismo cuyo metabolismo responde y se adapta rápidamente a la cantidad y a la calidad de los nutrientes. Esta plasticidad es producto de su robustez genética.

b. Robustez genética, duplicaciones y evolución

La robustez genética implica la dispensabilidad de una gran cantidad de genes. En *S. cerevisiae* se pueden eliminar la mayoría de los genes sin ninguna consecuencia aparente, en condiciones de laboratorio sólo el 19% son indispensables¹⁴. Diferentes autores han propuesto explicaciones para esta dispensabilidad. (1) Redundancia. La función de un gen se puede amortiguar o sustituir por la de un gen parálogo, o bien, por la existencia de otro gen con el que haya un traslape funcional o molecular^{15,16}. (2) Complementación funcional. La función de un gen puede ser sustituida por una vía metabólica alternativa¹⁷. (3) Un gen puede ser requerido sólo en condiciones ambientales particulares que no se han probado¹⁸.

La robustez facilita la aparición de variación y de novedades evolutivas. En un organismo robusto, pocas mutaciones producen un efecto adverso. Esto favorece el surgimiento de múltiples genotipos en la población, los cuales eventualmente facilitan la emergencia de nuevos fenotipos¹⁹. Las duplicaciones génicas contribuyen con la robustez y facilitan la aparición de novedades evolutivas²⁰.

La robustez de *S. cerevisiae* puede atribuirse a que el 60% de los genes del metabolismo central de carbono y el 40% de los genes del metabolismo de nitrógeno se encuentran por duplicado²¹. Casi la mitad de ellos proviene de una duplicación ancestral de genoma completo (WGD, Wide Genome Duplication)²². Se ha sugerido que la evolución del metabolismo facultativo en algunos hemiascomicetos es consecuencia de tal evento²²⁻²⁵. Las especies del complejo *Saccharomyces* que divergieron después de la duplicación del genoma completo (Figura 1) tienen tres características, que no tienen la mayoría de las especies que divergieron antes: La capacidad (1) de degradar glucosa o fructosa a etanol, aun en presencia de oxígeno (Efecto Crabtree), (2) de crecer en ausencia de oxígeno y (3) de generar espontáneamente mutantes mitocondriales *petit*, deficientes en respiración. Al final del período Cretácico, hubo una apertura masiva de nuevos nichos ecológicos, generados por la diversificación de las plantas con flores; muchos de ellos fueron conquistados por las levaduras favorecidas con estas tres características metabólicas²⁶.

c. El origen de los genes duplicados en Saccharomyces cerevisiae

Después de un evento de duplicación, en la mayoría de los casos, alguno de los genes parálogos se pierde aleatoriamente, por mutaciones o deleciones locales. Pero cuando la presencia de dos o más copias de un gen representa una ventaja adaptativa, aun en condiciones muy particulares, se favorece su preservación².

El genoma de *S.cerevisiae* está formado por cerca de 5700 genes, de los cuales 1102 forman 551 pares duplicados, lo cual sugiere que la duplicación ha jugado un papel importante en la evolución²⁷. Se pueden distinguir tres tipos de duplicaciones en el genoma de la levadura. (1) Duplicaciones de regiones amplias del genoma, bloques de genes que conservan sintenia, es decir, la misma orientación y el mismo orden con respecto a los ancestros de *S.cerevisiae*. (2) Duplicaciones de segmentos, que corresponden a miembros de familias multigénicas, que tienen varias copias distribuidas en el genoma. (3) Duplicaciones subteloméricas²⁸.

El descubrimiento de los grandes bloques de genes duplicados, sinténicos (1), dio origen a la propuesta de un evento de poliploidización en el linaje de *Saccharomyces*^{2,22} (Figura 2). Las evidencias señalan que la arquitectura actual del genoma de *S.cerevisiae* es un reflejo de aquel

suceso, acompañado de una pérdida masiva genes. La diploidía se recuperó tras la eliminación gradual de cerca del 90% de los genes duplicados, preservándose por lo menos una copia de cada gen del conjunto ancestral^{2,29}. La huella residual de dos regiones que surgieron por duplicación genómica es la presencia de genes parálogos en el mismo orden y orientación (sintenia), inmersos entre otros genes no relacionados.

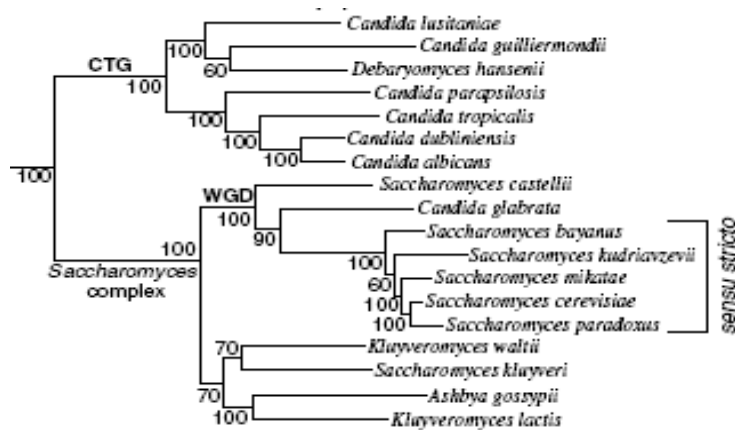


Figura 1. Relaciones filogenéticas del complejo *Saccharomyces*. El clado de levaduras que divergieron después del evento de duplicación está indicado con las siglas WGD. También se indica qué especies pertenecen al grupo de *Saccharomyces sensu stricto*. Figura tomada de Scanell, et.al. 2007²⁹.

Se ha calculado que el evento de WGD ocurrió en el linaje de *Saccharomyces* hace aproximadamente 100 millones de años, después de la divergencia entre el linaje de *Kluyveromyces* y el de *Saccharomyces*. *Kluyveromyces waltii* desciende de un ancestro común a ambos linajes, pero divergió antes del evento de poliploidización. *Saccharomyces cerevisiae* surgió después de dicho evento (Figura 2). La comparación del genoma de *K. waltii* y *S. cerevisiae* arroja pruebas claras acerca de la duplicación genómica ancestral, pues (1) los bloques de genes duplicados en *S. cerevisiae* conservan sintenia con respecto a los genes de *K. waltii* (2) el mapeo de la mayoría de las regiones de *K. waltii* está en una relación 1:2 con respecto a *S. cerevisiae* (3) por cada centrómero en *K. waltii*, hay dos en *S. cerevisiae*². (Figura 2)

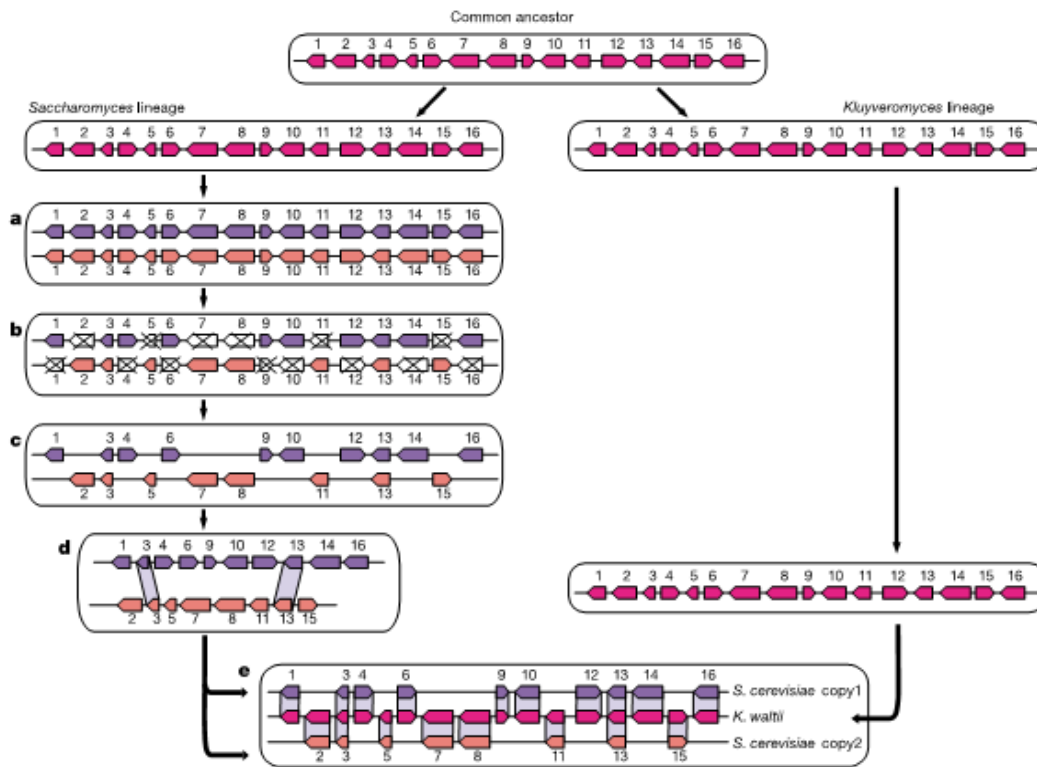


Figura 2. Esquematización del evento de duplicación de genoma completo (WGD). **a** Después de la divergencia de *K. waltii*, el linaje de *Saccharomyces* sufrió un evento de duplicación de genoma completo, creando dos copias de cada gen y de cada cromosoma. **b** Posteriormente la gran mayoría de los genes duplicados sufrieron mutaciones o se perdieron. **c** Los segmentos hermanos retuvieron diferentes subconjuntos de genes del conjunto original, manteniendo dos copias sólo de una pequeña minoría. **d** Dentro de *S.cerevisiae* la única evidencia de este proceso es la conservación del orden de los genes duplicados a lo largo de los segmentos cromosómicos. **e** La comparación con *K.waltii* revela la naturaleza del genoma de *S.cerevisiae*, los genes duplicados se encuentran intercalados entre los segmentos hermanos, siguiendo el orden del genoma ancestral.

Los bloques de genes duplicados en *S.cerevisiae* conservan sintenia y guardan una relación 2:1 con respecto a los genes de *Kluyveromyces waltii*. Figura tomada y modificada de Kellis, et.al.²

d. La preservación de dos copias de un mismo gen

Un evento de duplicación ocurre en un solo individuo y posteriormente puede o no fijarse en la población. El destino más frecuente de los genes duplicados es la desaparición de una de las copias, aunque la preservación puede verse favorecida ya sea por deriva génica o por selección purificadora³⁰. Se han propuesto algunos modelos que explican los procesos que pueden sufrir los genes duplicados para ser conservados en la población. Se considera que un alelo se fija en la población cuando está presente en el 100% de los individuos.

Neofuncionalización. Este modelo propone que después de la duplicación puede aparecer una nueva función en el gen duplicado, la cual favorece su preservación por selección purificadora. La duplicación puede fijarse antes o después de la aparición de la nueva función³⁰⁻³².

Subfuncionalización. Propone que las funciones de un gen multifuncional se han repartido neutralmente entre los dos genes parálogos. Existen dos modelos, el de Duplicación Degeneración Complementación (DDC) y el de Escape del Conflicto Adaptativo (EAC). En el primero, el gen bifuncional se duplica. Posteriormente ocurren mutaciones en ambos genes, que van en detrimento de una de las funciones. El efecto de las mutaciones se neutraliza porque el otro gen complementa la función afectada. La deriva génica es responsable de la fijación de la duplicación y de la división de las funciones ancestrales^{30,33}. En el modelo EAC la fijación de la duplicación depende de mutaciones adaptativas, no de mutaciones neutrales como en el DDC. El EAC ocurre cuando una mutación en una de las copias optimiza una función, pero en detrimento de la otra. De este modo, cada una de las copias puede especializarse en una de las funciones ancestrales³⁴. Aun después de estos procesos evolutivos, la aparición de una nueva función (neofuncionalización) en cualquiera de las copias no se puede descartar.

Dosis génica. Desde el nacimiento de un duplicado el aumento en la dosis génica puede representar una ventaja adaptativa, por lo que se preserva por selección positiva y no por deriva génica³⁵. Un cambio en el ambiente puede volver ventajosa la aparición de una copia de un gen.

Después de la fijación los genes duplicados siguen evolucionando, y siempre es posible que surja una nueva función. Se han descrito estos modelos y algunas variaciones de ellos, aunque es muy difícil reconstruir la historia evolutiva tratando de ajustarse a uno solo de ellos.

e. Los genes duplicados ALT1 y ALT2

ALT1 y *ALT2* (YLR089c y YLR111c respectivamente) pertenecen al bloque de genes duplicados que provienen de la duplicación de genoma completo, descritos por Wolfe y Shields²². Se sabe que *ALT1* codifica para una alanina aminotransferasa¹; comparte una identidad de 67% en secuencia de aminoácidos con *ALT2*, por lo cual se predice que ambos genes realizan la misma función. Ambas proteínas conservan los 11 residuos invariables para las aminotransferasas tipo I

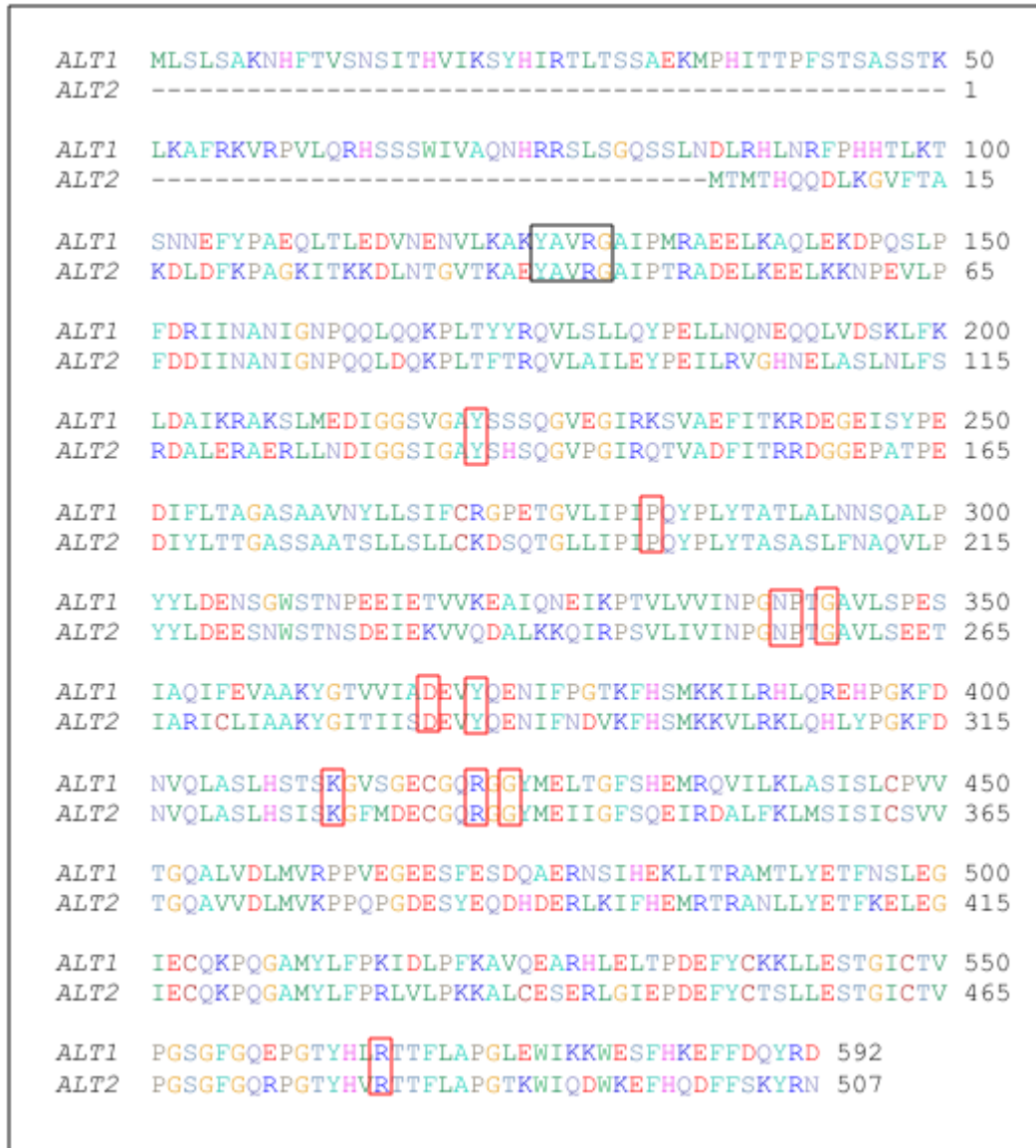


Figura 3. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de *ALT1* y *ALT2*. Estos genes tienen una identidad del 67%. En rojo están encerrados los 11 aminoácidos invariables en las aminotransferasas tipo I. Estos residuos están involucrados en la unión del PLP y de los sustratos.

³⁶, entre las que se encuentran las de alanina, las de aspartato y las de aminoácidos aromáticos³⁷ (Figura 3). Entre esos 11 residuos se encuentran tanto los de unión del sustrato, como los que forman el enlace covalente con la coenzima, piridoxal-5-fosfato (PLP)³⁶. *ALT1* tiene en el N-terminal una secuencia de 80 aminoácidos que no tiene *ALT2*, que el programa Mitoprot³⁸ predice como una presecuencia mitocondrial. Aunque no se sabe si los 80 aminoácidos

participan en la importación, se ha reportado la presencia de Alt1 en mitocondrias altamente purificadas³⁹.

El gen *ALT1* tiene alrededor de 2749pb, se encuentra en el cromosoma XII y su producto es de 592 aminoácidos. *ALT2* se localiza en el cromosoma IV, tiene alrededor de 1524pb y codifica para una proteína de 507 aminoácidos.

Los genes ortólogos en los hemiascomicetos que divergieron antes de la duplicación genómica ancestral tienen más parecido a *ALT1* que a *ALT2*⁴⁰. Esto podría indicar que *ALT1* es más parecido al gen ancestral y que *ALT2* pudo haber divergido en función. *ALT2* en cambio, sólo tiene homólogos dentro del grupo de *Saccharomyces sensu stricto* (Figura 1); con algunos guarda un porcentaje alto de identidad, como con *S. paradoxus* el 94%; 85% con *S. bayanus* y 88% con *S. mikatae*.

f. Las alanino aminotransferasas

Las aminotransferasas realizan la transferencia de un grupo amino de un aminoácido a un 2-oxoácido. La reacción catalizada por las aminotransferasas es libremente reversible, teniendo una constante de equilibrio de 1.0 ($\Delta G'^{\circ} \approx 0 \text{ KJ mol}^{-1}$). Todas las aminotransferasas tienen el mismo grupo prostético, que es PLP, un derivado de la vitamina B6. Este compuesto funciona como un acarreador intermediario de grupos amino en el sitio activo de las aminotransferasas. El PLP está unido covalentemente a la enzima a través de una aldimina (base de Schiff) que forma con el ϵ -amino de un residuo de Lys en el sitio activo. Las aminotransferasas son un ejemplo clásico del mecanismo catalítico conocido como Bi-bi Ping-pong, en el que el primer sustrato reacciona y el producto debe abandonar el sitio activo antes de que se una el segundo sustrato. En este caso el aminoácido se une al sitio activo, dona el grupo amino al PLP y parte en forma de cetoácido. Posteriormente entra al sitio activo el cetoácido aceptor, que recibe el grupo amino de la piridoxamina fosfato y sale en forma de aminoácido⁴¹.

Las alanino aminotransferasas (ALTs) o transaminasas de glutamato-piruvato (GPT) (KEGG, EC 2.6.1.2) son enzimas ampliamente distribuidas en los dominios de la vida, se han descrito en bacterias, arqueas³⁷, protistas⁴², hongos⁴³, plantas⁴⁴, aves, mamíferos⁴⁵, peces⁴⁶. Las ALTs

catalizan la reacción reversible que involucra la transferencia del grupo amino del L-glutamato al piruvato, para formar L-alanina y 2-oxoglutarato (Figura 4).

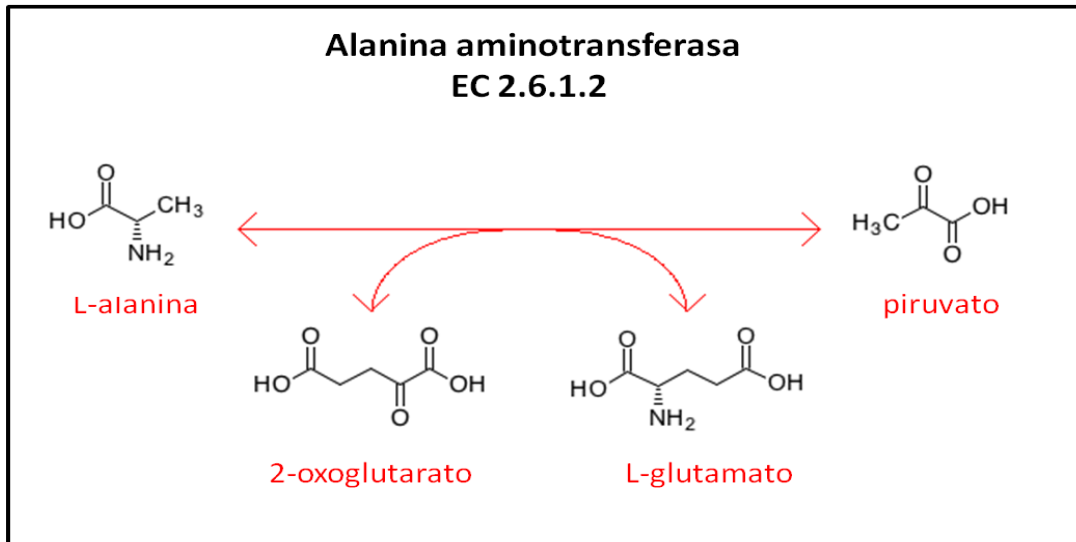


Figura 4. Reacción catalizada por alanino aminotransferasas.

g. Función de las alanino aminotransferasas en plantas y animales

Mamíferos. Se ha estudiado bien el papel de estas enzimas en los mamíferos. Las ALT tienen un papel importante en el metabolismo de los aminoácidos y en la gluconeogénesis. Cuando se agota la glucosa y algunos tejidos degradan los aminoácidos para obtener energía, los grupos amino son colectados en forma de glutamato por la ALT, que transfiere el grupo amino del glutamato al piruvato para formar alanina, que se libera al torrente sanguíneo durante el ayuno. La alanina entra al tejido hepático para, luego de transaminar, generar glucosa a partir de piruvato por la ALT, que realiza la reacción inversa (catabólica). A este ciclo se le conoce como el de alanina-glucosa. Es muy importante durante la fase anaeróbica del ejercicio, ya que en el tejido muscular hay degradación de aminoácidos para obtener energía cuando no hay otras fuentes disponibles⁴⁷. En muchos mamíferos como rata, ratón, cerdo, perro, humano, bovinos, se ha detectado la presencia de dos isoenzimas, que se expresan de manera diferencial en los tejidos y se localizan en la mitocondria o el citosol.

En humano, rata y ratón la expresión de ambas isoformas es similar⁴⁸. *ALT1* es más abundante y hay una mayor expresión en hígado, músculo, tracto digestivo, tejido adiposo y corazón, mientras que *ALT2* se encuentra en cerebro, músculo, hígado y tejido adiposo⁴⁸⁻⁵⁰. Esta distribución, además de la diferente localización subcelular, obedece a que las isoenzimas cumplen con distintos papeles fisiológicos. En los tejidos glucogénicos, como el músculo cardíaco o esquelético, la ALT es citosólica y tiene una Km por piruvato muy baja (0.9mM), mientras que las concentraciones de alanina son de 30 a 100 veces menores que la Km (34mM). Esto indica que *in vivo* su función principalmente está dirigida hacia la formación de alanina. En cambio, en los tejidos gluconeogénicos como hígado y riñón, en donde la ALT es mitocondrial, la Km para la alanina es un orden de magnitud menor que para la ALT citosólica, 2mM. Esto sugiere que su papel es catabolizar alanina para obtener piruvato^{45,51}. La alanina es sintetizada por la ALT citosólica en los tejidos glucogénicos y es transportada al hígado, donde la ALT mitocondrial la convierte en piruvato, éste entra a la vía gluconeogénica y la glucosa es enviada a los tejidos que la demandan.

Plantas. En las plantas también existen isoenzimas de las alanino aminotransferasas (AlaAT), éstas constituyen una parte importante de la respuesta a estrés por hipoxia/anoxia. En tales condiciones hay un gran flujo hacia el metabolismo fermentativo, que compensa el bajo rendimiento en la producción de ATP, debido a la inactivación de la fosforilación oxidativa. Como consecuencia se acumulan productos de la fermentación como lactato, etanol y acetato. Si bien éstos permiten la regeneración de NAD^+ , para que la glucólisis permanezca activa, la acumulación excesiva puede resultar desfavorable. El papel de las AlaAT es competir por el piruvato con la piruvato descarboxilasa y lactato deshidrogenasa (LDH) para contener con este efecto nocivo. Al competir con la fermentación etanólica se almacenan esqueletos de C3 en forma de alanina y se limita la acumulación de acetaldehído, que es tóxico. Por otro lado, la acumulación excesiva de lactato produce acidificación de los tejidos; la competencia de la AlaAT con la LDH por la utilización del piruvato puede evitar este efecto adverso⁴⁴. El aumento en la concentración de alanina en condiciones de estrés por hipoxia se ha reportado en varias especies, como arroz, cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), *Panicum miliaceum* y la

leguminosa *Medicago truncatula*⁵²⁻⁵⁵. También se sabe de la presencia de AlaAT en las raíces, hojas⁵³, así como en los tejidos embrionarios. En éstos las AlaAT son especialmente importantes, pues cuando su actividad se ve afectada no se puede desarrollar el embrión ni las plántulas en condiciones anóxicas/hipóxicas⁴⁴.

h. Metabolismo de la alanina en Saccharomyces cerevisiae

El metabolismo de la alanina en *S.cerevisiae* ha sido poco estudiado. Existen diversas vías descritas en varios organismos, en las que interviene la alanina como producto o como sustrato. Sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* sólo se han descrito algunos genes que podrían estar involucrados en el metabolismo de este aminoácido (Figura 5). En nuestro grupo se han anotado los genes *ALT1* y *ALT2* (YLR089c y YDR111c respectivamente)¹. Como se detalla más adelante, se ha comprobado que Alt1 es capaz de sintetizar y de catabolizar alanina (Figura 4).

Una de las enzimas de *S.cerevisiae* que podría participar en el metabolismo de la alanina es la transaminasa de alanina:glioxilato (EC 2.6.1.44), codificada por el gen *AGX1* (YFL030w). Únicamente está activa cuando el ciclo de glioxilato es funcional, es decir, cuando la levadura crece en fuentes de carbono no fermentables como etanol o acetato. En teoría, en estas condiciones podría contribuir con la síntesis de alanina, aunque la disponibilidad de piruvato es limitada, lo cual probablemente no permita que la reacción vaya en ese sentido. También es posible que transamine L-serina:piruvato, en cuyo caso los productos serían L-alanina e hidroxipiruvato (EC 2.6.1.51). (Ver figura 5 la reacción de Agx1).

Otra enzima que puede metabolizar alanina es la kinureninasa (EC 3.7.1.3), codificada por el gen *BNA5* (YLR231c). Está involucrada en el metabolismo del triptofano; la degradación de triptofano vía kinurenina. Junto con los demás genes de la vía está involucrado en la síntesis *de novo* de NAD⁺. La reacción se muestra en la figura 5.

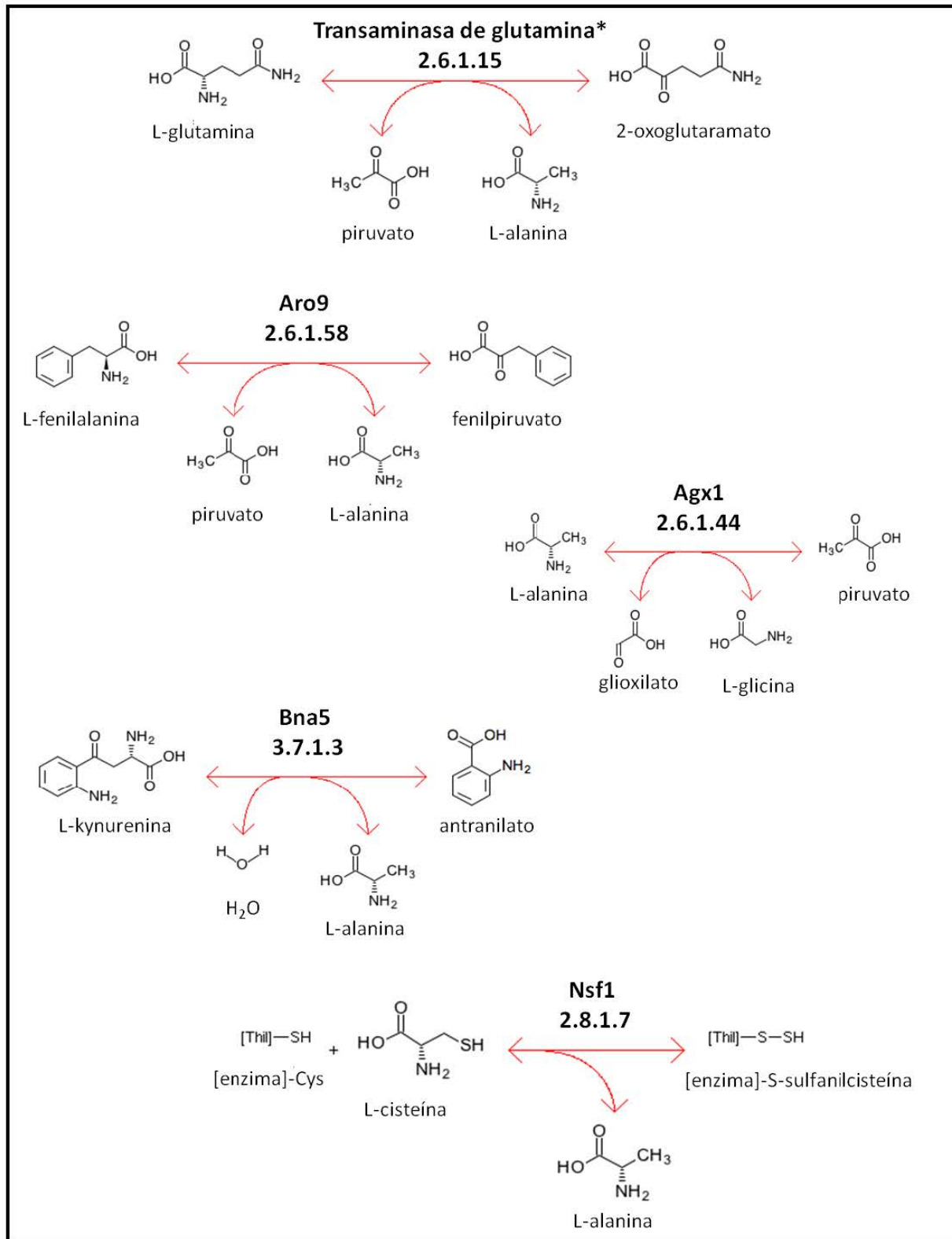


Figura 5. Utilización y producción de alanina en *S.cerevisiae*. Además de las transaminasas de alanina, las enzimas que se muestran están involucradas en alguna medida en el metabolismo de L-alanina. Todas las reacciones se pueden asociar a un gen, excepto la transaminasa de glutamina (*), de la cual sólo se ha detectado actividad. La información se obtuvo de la base de datos KEGG, los números corresponden a la reacción química descrita en esta base de datos.

La cisteína desulfurasa (EC 2.8.1.7) puede dar como producto L-alanina. Es un gen esencial codificado por *NFS1* (YCL017c), pero la función de esta enzima se asocia a la biogénesis de los centros Fe/S y de la tio-modificación de los tRNAs mitocondriales y citoplasmáticos.

La transaminasa de aminoácidos aromáticos II (EC 2.6.1.58), codificada por *ARO9* (YHR137w) también puede producir alanina cuando utiliza L-fenilalanina y piruvato como sustratos (RN:00692). La Tyr e His pueden ser sustratos en vez de la Phe; en la reacción reversa Met, Ser y Gln pueden reemplazar a la Ala (Figura 5).

Existe otra enzima cuya reacción es irreversible, que podría contribuir a la biosíntesis de alanina; está activa en condiciones fermentativas, y aunque no se ha encontrado el gen que codifica para ella, se ha detectado su actividad^{56,57}. Se trata de la transaminasa de glutamina (EC 2.6.1.15), que constituye el primer paso de la degradación de glutamina por la vía de la ω -amidasa. Esta vía alternativa de asimilación de glutamina permite obtener glutamato y amonio a partir de glutamina. En la primera reacción de la vía se transamina la glutamina con un cetoácido, produciéndose un aminoácido y 2-oxoglutamato. Los cetoácidos aceptores más comunes son piruvato y glioxilato, que al transaminarse forman alanina y glicina respectivamente. En la segunda reacción el 2-oxoglutamato es hidrolizado por la ω -amidasa para obtener 2-oxoglutarato y amonio; en ausencia de la ω -amidasa el 2-oxoglutamato se cicliza y por dicha razón este paso es irreversible^{58,59}. (Ver figura 5).

IV. ANTECEDENTES

a. El estudio de los genes parálogos del metabolismo de nitrógeno

El 44% de los genes del metabolismo de nitrógeno en *S.cerevisiae* están duplicados; de ellos, 9 parejas tuvieron origen en el evento ancestral de poliploidización²². En el laboratorio se han estudiado algunas de ellas, implicadas principalmente en el metabolismo de aminoácidos. Lo que se ha observado es que la retención de los parálogos representa una ventaja adaptativa bajo determinadas condiciones de crecimiento.

GDH1 y GDH3. Las glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP, Gdh1/Gdh3, que sintetizan glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato, son un claro ejemplo de adaptación al metabolismo fermento-respiratorio en *S.cerevisiae*. Durante la fermentación sólo se expresa *GDH1* y no *GDH3*. Gdh1 tiene una alta capacidad de utilización de 2-oxoglutarato, por lo que la tasa de síntesis de glutamato se vuelve alta en esta condición. A medida que la respiración aumenta, *GDH3* incrementa su expresión notablemente, volviéndose la proteína predominante durante la respiración. La presencia de Gdh3 representa dos formas de modulación negativa; por un lado, se forman hetero-oligómeros Gdh1/Gdh3, lo cual disminuye la eficiencia de utilización de 2-oxoglutarato, pues Gdh3 tiene una menor afinidad por este 2-oxoácido. El efecto que provoca la abundancia de Gdh3, en forma de homohexámeros o de heterohexámeros, es una reducción en la síntesis de glutamato durante la respiración, favoreciendo la disponibilidad de esqueletos de carbono para la obtención de energía a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos⁶⁰.

LYS20 y LYS21. Estos genes codifican para homocitrato sintasas, que catalizan la primera reacción de la vía de síntesis de lisina. En el estudio realizado en nuestro laboratorio se demuestra que la permanencia de ambos parálogos constituye una adaptación al metabolismo facultativo. Durante la fermentación ambos genes tienen un patrón de expresión similar y las proteínas juegan un papel redundante para mantener la poza de lisina, sin embargo las propiedades cinéticas de las enzimas son distintas. Lys21 está sujeta a una fuerte inhibición por lisina, que induce cooperatividad hacia la unión de 2-oxoglutarato. Mientras que Lys20 tiene una

mayor afinidad por el 2-oxoglutarato que Lys21, pero no tiene cooperatividad para la unión de este sustrato; y es poco sensible a la inhibición por lisina. Estas características constituyen una adaptación al metabolismo respiratorio, pues cuando la levadura crece en etanol, la falta de Lys21 se traduce en una disminución del crecimiento, que a diferencia de lo que sucede en el metabolismo fermentativo, no puede ser sustituida por Lys20. Se sugiere entonces que Lys21 se ha especializado durante el metabolismo respiratorio para limitar la utilización de 2-oxoglutarato, que es necesario también para la obtención de energía en la fosforilación oxidativa⁶¹.

BAT1 y BAT2. Codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (VIL). El principal hallazgo encontrado por nuestro grupo es la distribución de las funciones biosintéticas y catabólicas entre ambas copias. *BAT1* se expresa más que *BAT2* en condiciones en donde se favorece la biosíntesis de VIL, mientras que *BAT2* tiene una mayor expresión en condiciones donde se induce el catabolismo. Además, se propuso que la localización diferencial de las proteínas también se asocia a esta distribución de funciones. Bat1 se encuentra en la mitocondria, en donde los precursores anabólicos están más disponibles; la localización citosólica de Bat2 favorece la especialización de la enzima en el catabolismo de los aminoácidos ramificados⁶².

b. Los parálogos ALT1 y ALT2

La alanina es uno de los aminoácidos más abundantes; además de formar proteínas, puede convertirse en piruvato. El piruvato puede dirigirse al ciclo de los ácidos tricarbónicos y también puede entrar a la vía gluconeogénica. Aunque la vía de síntesis de alanina en los hongos en general no se conoce a detalle, se sabe que las alanino aminotransferasas pueden generar este aminoácido a partir de glutamato y piruvato, mediante una reacción reversible. En la levadura *Candida maltosa* ya se ha caracterizado una alanino aminotransferasa (AlaAT)⁴³.

En nuestro laboratorio se anotaron los genes *ALT1* y *ALT2* que podrían codificar para estas enzimas. Se generaron mutantes nulas individuales para ambos genes, así como una doble mutante. A partir de éstas, se ha confirmado el papel metabólico de *ALT1*, mas no se le ha

podido atribuir todavía una función a *ALT2*¹. A continuación se detallan algunos puntos de esta investigación.

En los datos mostrados en la figura 6, se observa el fenotipo de crecimiento en diferentes condiciones, de la cepa silvestre (*WT* en gris), de la mutante *alt1* Δ (en verde), de la mutante *alt2* Δ (en rojo) y de la doble mutante *alt1* Δ *alt2* Δ (en amarillo). En el primer grupo de barras se aprecia el crecimiento de las cepas en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. En esta condición todas las mutantes tienen velocidades de crecimiento muy similares a la de la silvestre. El crecimiento casi silvestre de la doble mutante *alt1* Δ *alt2* Δ indica que en glucosa-amonio, además de la vía de síntesis de alanina por medio de las transaminasas de alanina, existe(n) otra(s) vía(s) que provee(n) la alanina necesaria para sostener este crecimiento.

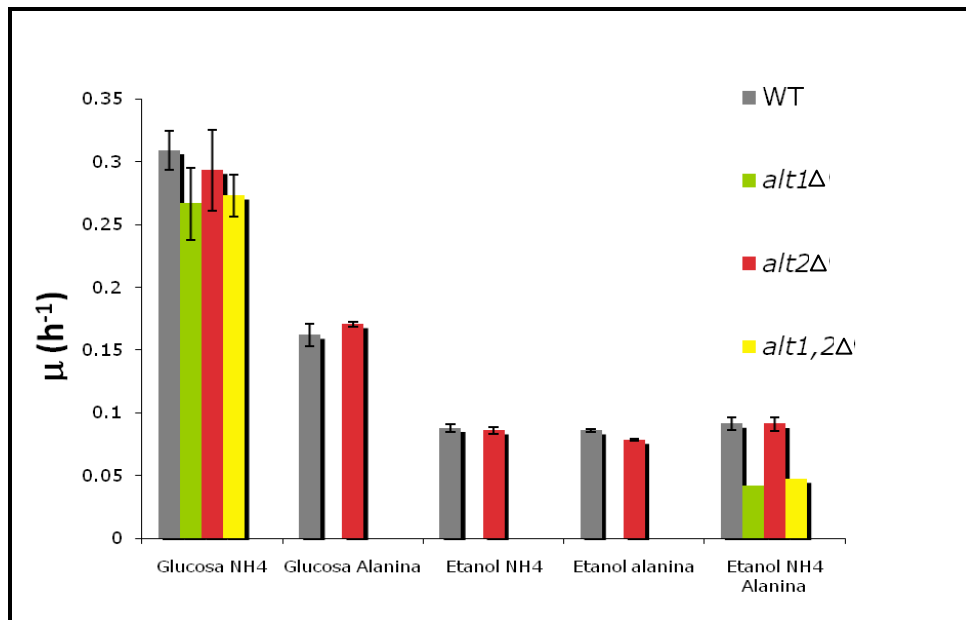


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento (μ) de mutantes en genes ALT en diferentes condiciones de crecimiento. El fenotipo de las cepas silvestre (gris) y las mutantes sencillas *alt1* (verde), *alt2* (rojo) y la doble mutante *alt1alt2* (amarillo) se analizó utilizando glucosa o etanol como fuente de carbono y amonio o alanina como fuente de nitrógeno. Datos de García-Campusano¹

En el segundo y cuarto grupo de barras, es evidente que cuando falta Alt1 (mutante *alt1* Δ y *alt1* Δ *alt2* Δ) las cepas no pueden catabolizar la alanina para utilizarla como única fuente de nitrógeno, en ninguna de las fuentes de carbono (glucosa o etanol), por lo tanto no crecen en presencia de alanina. En el tercer grupo de barras se observa que las mutantes

alt1Δ y *alt1Δalt2Δ* no pueden crecer en etanol-amonio; esto demuestra que Alt1 es indispensable para la biosíntesis de alanina en condiciones respiratorias y que no existe una vía alternativa que produzca alanina suficiente para sustituir la falta de Alt1. En el quinto grupo de barras lo que se observa es que cuando se agrega alanina al medio, las cepas que no pueden sintetizar el aminoácido *alt1Δ* y *alt1Δalt2Δ* pueden crecer, pero no al mismo nivel que la cepa silvestre, lo cual se puede interpretar como una necesidad adicional de catabolizar alanina para poder crecer adecuadamente.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La función de *Alt1* es muy clara; es indispensable para catabolizar y biosintetizar alanina. *ALT2* comparte un alto porcentaje de identidad con *ALT1* (67%), por lo que se pensaría que es también una alanina aminotransferasa. *ALT2* conserva los sitios que son importantes para la unión de la coenzima PLP, así como para la unión de los sustratos, y parece tener un marco abierto de lectura completo. *ALT2* también es muy parecido a sus ortólogos en diversos grupos biológicos. Ya que *ALT1* y *ALT2* no son redundantes, la permanencia de *ALT2* en el genoma de *S.cerevisiae* pudiera obedecer a que cumple una función dentro del metabolismo de carbono o de nitrógeno. Para ello es necesario averiguar cuál es la función de *ALT2* y si dicha función se relaciona con el metabolismo de la alanina.

VI. HIPÓTESIS

ALT2 codifica para una alanino aminotransferasa, que ha divergido de *ALT1*, por lo que no son enzimas redundantes.

VII. OBJETIVO

Averiguar qué función tiene *ALT2* en el metabolismo de la levadura *S. cerevisiae*.

Objetivos Particulares

- Determinar en qué condiciones se expresa el mRNA y la proteína de *ALT2* y comparar con la expresión de *ALT1*.
- Encontrar una manera de evaluar si Alt2 efectivamente es una enzima alanino aminotransferasa, llevando a cabo la caracterización fisiológica de las mutantes pertinentes.
- Determinación de actividad enzimática de alanino aminotransferasa para Alt2 y comparar con la actividad de Alt1.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Lista de cepas y construcción de mutantes

A continuación se enlistan las cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
CLA1-2 (WT)	<i>MATα ALT1 ALT2 ura3 leu3::LEU2</i>	[8]
CLA1-2-1 (alt1Δ)	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 ALT2 ura3 leu3::LEU2</i>	[8]
CLA1-2-2 (alt2Δ)	<i>MATα ALT1 alt2Δ::kanMX4 ura3 leu3::LEU2</i>	[8]
CLA1-2-D (alt1Δ alt2Δ)	<i>MATα alt1Δ::kanMX4 alt2Δ::natMX21 ura3 leu3::LEU2</i>	[12]
CLA 602 (nrg1Δ)	<i>MATα ALT1 ALT2 ura3 leu3 nrg1Δ::nat MX21</i>	Este trabajo
CLA 603 (nrg1Δ alt1Δ)	<i>MATα ALT2 ura3 leu3 alt1Δ kan nrg1Δ::nat MX21</i>	Este trabajo
CLA 604 (NRG1-myc¹³)	<i>MATα ALT1ALT2 ura3 leu3 ::LEU2 nrg1 ::myc13-KANMX</i>	
R1158-1 ALT1 ALT2-yECitrine (ALT2-yEC)	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 URA3::CMV-tTA ALT1 ALT2-yECitrine::HIS5</i>	Este trabajo
R1158-2 ALT1 tetO7ALT2-yECitrine (tetO7ALT2-yEC)	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 URA3::CMV-tTA ALT1 tetO7::kanMX4-ALT2-yECitrine::HIS5</i>	Este trabajo
R1158-3 alt1Δ ALT2 (alt1Δ R1158)	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 URA3::CMV-tTA alt1Δ::kanMX4 ALT2</i>	Este trabajo
R1158-4 alt1Δ tetO7-ALT2 (tetO7-ALT2 alt1Δ)	<i>MATα his3-1 leu2-0 met15-0 URA3::CMV-tTA alt1Δ::kanMX4 tetO7::natMX21-ALT2</i>	Este trabajo

Tabla1. Se muestran las cepas utilizadas, el genotipo relevante y la fuente. En la columna izquierda, en negritas y entre paréntesis, está la nomenclatura abreviada que se utiliza a lo largo del texto.

Mutantes alt1 Δ (alt1 Δ R1158, tetO7-ALT2 alt1 Δ y nrg1 Δ alt1 Δ). Todas las mutantes nulas para *ALT1* se construyeron interrumpiendo el gen *ALT1* con un *cassette* de resistencia a G418 (*kanMX4*), flanqueado por los extremos del gen *ALT1*. El producto de PCR de 2,612 pb se obtuvo a partir de DNA genómico de la mutante *alt1 Δ* CLA1-2. Los desoxioligonucleótidos utilizados fueron ALT1Fo(5'TCTTGCACGGTTCGCATCTCTCG3') y ALT1Re (5'-GATTAACGGGTGTTCTCGAACTACGC3'). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a geneticina (200mg l⁻¹). Se verificaron por PCR con los siguientes desoxioligonucleótidos ALT1ConFo (5'-TTCTGAAGGGGTCCAAGCCTAACG-3') y ALT1ConRe (5'-GGTGACAACCTCAATCCTCTAACCCA-3'). El tamaño del producto de PCR para la mutante *alt1 Δ* es

de 2456pb; el producto del gen silvestre es de 2739pb. Estos fragmentos se distinguen fácilmente en una electroforesis de agarosa al 0.8%.

Mutantes *nrg1Δ* y *nrg1Δalt1Δ*. Primero la cepa CLA-1 fue transformada con un módulo de resistencia a G418 (*kanMX4*), que se obtuvo amplificando por PCR el plásmido pRS416 con desoxioligonucleótidos Nrg1Fo(5'ATGTTTTACCCATATAACTATAGTAACCTCAATGTTTCTACTATGCCC GCACCGTACGCTGCAGGTCGAC3')yNrg1Re(5'TTATTGTCCCTTTTTCAAATGTGTTCTATAGTGTGCAAG CAATTATCATGATCGATGAATTCGAGCTCG3')que, además de ser homólogos al *cassette* de resistencia, en los extremos son homólogos al gen *NRG1*. De esta manera, por recombinación homóloga se sustituyó el gen *NRG1* por un gen de resistencia a G418 (geneticina, 200mg l⁻¹). Éste después se sustituyó por un *cassette* de resistencia a nourseotricina (*natMX21*), que se obtuvo a partir de la digestión del plásmido p4339 con *EcoR1*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a nourseotricina (100mg l⁻¹) y sensibilidad a G418. La mutante sencilla *nrg1Δ* que se obtuvo se verificó por PCR. La doble mutante *nrg1Δalt1Δ* se obtuvo a partir de ésta, eliminando el gen *ALT1*, como se describió anteriormente. Las mutantes fueron seleccionadas por la resistencia a los antibióticos apropiados. Se verificaron por PCR y por hibridación tipo Northern.

Mutantes *tetO7-ALT2 alt1Δ* y *tetO7ALT2-yEC*. En ambos casos se insertó el promotor de tetraciclina *tetO7* en el promotor endógeno de *ALT2* en la cepa R1158. El módulo *tetO7* se amplificó a partir del plásmido pCM325. Éste contiene el marcador de selección de resistencia a G418. Se diseñaron un par de desoxioligonucleótidos complementarios tanto a la región del promotor de *ALT2*, como al sitio múltiple de clonación de pCM325. Los desoxioligonucleótidos son ALT2F2 (5'-CTATTGTTTCTACTAATGTGCTGCGGGCTGATGTCCTCCACACGTCTTCACGTACGCTGC AGGTCGACGG3') y ALT2R2 (5'-AAATCCTTTGCGGTGAACACACCTTTCAAATCCTGTTGGTGTGTCATT GTCATAGGCCACTAGTGGATCTG3') El producto de PCR de 2.2Kb fue transformado en la cepa R1158. Las mutantes se seleccionaron por resistencia a G418 (geneticina, 200mg l⁻¹). Se verificaron por PCR y por secuenciación.

Para la mutante *tetO7-ALT2 alt1Δ* después de la inserción del promotor *tetO7*, el *cassette* de resistencia a G418 (*kanMX4*) fue reemplazado por un *cassette* de resistencia al antibiótico

nourseotricina (*natMX21*). Éste se obtuvo a partir de la digestión del plásmido p4339 con *EcoR1*. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a este último antibiótico (100mg l⁻¹) y sensibilidad a G418 (200mg l⁻¹). Posteriormente se eliminó de las mutantes obtenidas el gen *ALT1* como ya se ha descrito en párrafos anteriores.

La mutante etiquetada *tetO7ALT2-yEC* se obtuvo transformando con el *cassette yECitrine::HIS5*, que se insertó en extremo 3' de la región codificante de *ALT2*, de manera que la etiqueta quedara en extremo carboxilo de la proteína. Dicho *cassette* se amplificó por PCR a partir del plásmido pKT175-*HIS5*. Se utilizaron un par de desoxioligonucleótidos ALT2F1 (5'TTCAAGACT GGAAAGAATTCATCAAGATTTCTTCAGCAAGTATCGTAATGGTGACGGTGCTGGTTTA3') y ALT2R1 (5'ATGGATGCAAAACAAATAGAAAGCCATTATCATTAGTTTTTTTTTTTTCATTTCGATGAATTCGAGCTCG3') complementarios al extremo 3' de la región codificante de *ALT2*, y también complementarios al sitio múltiple de clonación de pKT175-*HIS5*. El marcador de selección *URA3* del plásmido original pKT175 fue reemplazado por *HIS5*. Las transformantes finalmente se confirmaron por PCR y por secuenciación.

ALT2-yEC. Se obtuvo transformando la cepa R1158 con el *cassette yECitrine::HIS5*. Los desoxioligonucleótidos utilizados para amplificar dicho *cassette* a partir del plásmido pKT175-*HIS5* son ALT2F1 y ALT2R1, descritos arriba. El procedimiento es esencialmente el mismo que se explica en el párrafo anterior.

ALT1-TAP y ALT2-TAP. Se obtuvieron de la colección de cepas etiquetadas con TAP de *Saccharomyces cerevisiae*⁶³.

NRG1-Myc¹³. Se utilizó la cepa CLA1-2 para etiquetar a la proteína Nrg1 en el C-terminal, con una secuencia de 13 péptidos de c-Myc. Se transformó con un fragmento de PCR que se obtuvo a partir del plásmido pFA6a-13Myc-KanMX6, descrito por Longtine⁶⁴. Se amplificó con desoxioligonucleótidos FwNRG1MYC y RvNRG1MYC, cuyas partes internas son homólogas al plásmido (minúsculas), y las partes externas complementarias a la región correspondiente al C-terminal de *NRG1* (mayúsculas). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a G418, la cual confiere el módulo KanMX6. Se verificaron por PCR, siendo el tamaño del producto silvestre

de 259pb, mientras que la cepa etiquetada tiene 3000pb. También se verificó que la traducción de Nrg1-Myc¹³ quedara en marco, por medio de un Western-blot, en el que se detectó con un anticuerpo anti-c-Myc. La secuencia de los desoxioligonucleótidos es

FwNRG1MYC

5'GATAATTGCTTGCAACACTATAGAACACATTTGAAAAAGGGACAACGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' y

RvNRG1MYC

5'ATAGTAGTACTGCTAATGAGAAAAACACGGGTATACCGTCAATTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'

Cultivos

Todos los cultivos se hicieron en medio mínimo, suplementado con sales, elementos traza y vitaminas, siguiendo la fórmula de Difco. Como fuente de carbono se utilizó glucosa (2% w/v) y como fuente de nitrógeno sulfato de amonio (40mM) o bien alanina (7mM). Dependiendo de las auxotrofías de cada cepa se suplementó el medio con uracilo(20mg l⁻¹) leucina (100mg l⁻¹) histidina (20mg l⁻¹) metionina (20mg l⁻¹). Los precultivos se hicieron en medio rico (YPD) en todos los casos, excepto para la extracción de RNA, que se hicieron en medio mínimo. Los cultivos se mantuvieron a 30°C con una agitación de 250 rpm.

Caracterización de fenotipo

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en un crecinómetro. Se trabajó con tres colonias aisladas para cada cepa. De cada una de éstas se inocularon 5mL de medio mínimo, a una densidad óptica (DO_{600nm}) inicial de 0.04. De este inóculo se utilizaron 300µL por pozo, con 3 repeticiones para cada condición. Se analizó el fenotipo de crecimiento durante 24-36horas, con lecturas cada 1.5horas. Con estos datos se obtuvo el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento (µ).

Hibridación tipo Northern

Se extrajo el RNA total de los cultivos, con el método descrito por Valenzuela⁶⁵. Se realizó una electroforesis en gel de las muestras, que después se transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare). Se hibridaron con sondas específicas para *ALT1* y *ALT2*, que se obtuvieron por PCR con los desoxioligonucleótidos descritos previamente en el trabajo de García-Campusano¹. Como control de carga se utilizó una sonda para un RNA ribosomal, *SCR1*. Las hibridaciones se analizaron con el programa ImageQuant 5.2 Molecular Dynamics.

SDS-PAGE e inmunodetección

Obtención de extractos de proteína. Se obtuvieron de cultivos en medio mínimo de las cepas etiquetadas (TAP y yEC). La pastilla de células se resuspendió con el amortiguador de extracción Pronase (1.4M sorbitol, 25mM Tris-Cl pH 7.5, 2mM MgCl₂, 20mM NaN₃). Posteriormente se agregó 1mM de PMSF y TCA al 85%. Las células se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio dando 8 ciclos de 1 minuto de vórtex y 1 minuto en hielo. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó 10 minutos a 5000rpm. La pastilla se solubilizó en amortiguador Thorner (8M urea, 5% SDS, 40mM Tris-Cl pH6.8, 0.1mM EDTA, 0.4mg/mL azul de bromofenol) y se ajustó el pH con Tris base no amortiguado, hasta volver al color indicador azul. Esta suspensión se utilizó directamente para cargar en los geles.

Inmunodetección. Las electroforesis de proteína (SDS-PAGE) se realizaron en geles al 10%, con voltaje constante (120V) durante 2 horas. Las transferencias se hicieron en membranas de nitrocelulosa por electroforesis, el amperaje fue constante (200mA) durante 2 horas. Para el caso de las cepas etiquetadas con TAP se inmunodetectó con un anticuerpo primario policlonal anti-TAP de conejo (CAB1001, OPEN Biosystems) en una dilución 1:5,000. El anticuerpo secundario se utilizó en una dilución 1:10,000, anti-conejo conjugado a peroxidasa de caballo (Anti-rabbit HRP conjugated, Santa Cruz Biotechnology). Para el caso de las cepas etiquetadas con YFP se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-GFP de ratón (11814460001, Roche Applied Science) en una dilución 1:5,000. El anticuerpo secundario utilizado anti-ratón (sin marca) conjugado a HRP, se utilizó en una dilución 1:10,000. Como control de carga se inmunodetectó con un anticuerpo contra las proteínas Lys20/Lys21 hecho en ratón (generoso regalo del Dr. Héctor Quezada), el cual se diluyó 1:7,500. El anticuerpo secundario anti-ratón se utilizó en una dilución 1:12,500.

Como sustrato de la peroxidasa (HRP) se utilizó Luminata Forte Western HRP Substrate de Millipore. Las membranas luminiscentes se expusieron a un film de rayos X.

Determinación de actividad de alanino aminotransferasa en extractos crudos

Obtención de extractos crudos para actividad de ALT. El protocolo es esencialmente el que reportó García-Campusano¹ con algunas modificaciones. Los extractos se obtuvieron de 125mL de cultivo en medio mínimo a una DO de 1.0. Se centrifugaron las células a 3,000 rpm y se lavaron con agua fría. La pastilla se resuspendió en un volumen de amortiguador de extracción (50mM HEPES, 1mM PMSF, 1mM DTT y 1mM EDTA) equivalente al 50% del peso húmedo. Se agregó alrededor de 1/3 del volumen total de perlas de vidrio. La ruptura mecánica se realizó con 8-10 ciclos de 1 minuto de vórtex y un minuto en hielo. Esto se centrifugó a 5,000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y en seguida se adicionó piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100µM. Con este extracto se trabajó para medir actividad de Alt.

Ensayo de actividad de alanino aminotransferasa. El ensayo está acoplado a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que al reducir el piruvato a lactato utiliza NADH. En la reacción se mide entonces el cambio en absorbancia del NADH a 340nm. El volumen de la reacción fue de 1mL; se utilizó un amortiguador pH8 con 50mM Tris, 4mM MgCl₂, 150mM KCl. La reacción completa consta de 400mM de alanina, 3mM (Alt2) o 24mM(A1) de 2-oxoglutarato, 250µM de NADH, 40µM de piridoxal-5-fosfato y 5U de LDH. La reacción se inició con la adición del extracto. Se utilizó como mínimo 4 concentraciones de extracto por cepa (siendo la segunda el doble de la primera y la mitad de la tercera, etc.). Por cada condición se utilizó un control correspondiente sin alanina. El cambio en absorbancia del control se restó del de la reacción completa. Los ensayos se realizaron a 30°C en el espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-Vis. Se cuantificó la proteína por el método de Lowry.

Cuantificación de pozas de alanina. La extracción de metabolitos para el análisis de las pozas intracelulares de alanina se ensayó con el método previamente descrito por Quezada, et.al.^{61,66}.

Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP). El entrecruzamiento (cross-linking) con formaldehído y la inmunoprecipitación se llevaron a cabo con el procedimiento descrito por Valenzuela⁶⁵.

Cultivos de levadura de 150mL, en las densidades ópticas indicadas ($0.3DO_{600nm}$ y $1.8DO_{600nm}$), se incubaron en hielo por 15 minutos y después se entrecruzaron durante 60 minutos con 1% de formaldehído, a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 125mM de glicina y se incubaron por 5 minutos en agitación suave. Las células se cosecharon y se lavaron con amortiguador Tris salino. La pastilla de células se resuspendió en amortiguador de lisis (140mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM HEPES/KOH, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato), adicionando un coctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, ROCHE). Las células se rompieron con perlas de vidrio y se obtuvo el sobrenadante. Estos extractos se sonicaron para obtener fragmentos de cromatina <1000pb, con un promedio <500pb. Se inmunoprecipitó la cromatina con 1 μ g de anticuerpo anti-c-Myc (9E 11, Santa Cruz Biotechnology) durante 3 horas, se lavó y se resuspendió en 1X TE/1% SDS. Se incubó toda la noche a 65°C para revertir el entrecruzamiento con formaldehído. Se trató a los inmunoprecipitados con proteinasa K (Roche), seguido de una extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, la cual se precipitó y se resuspendió en 1X TE. El set de desoxiligonucleótidos utilizados para hacer las reacciones de PCR son los siguientes: ALT1ChIPFo 5'-TCGCTACTCAAATCCCGACC-3' y ALT1ChIPRe 5'-CGAGAAAGCAGTAGTAGTAACG-3'. Para *ALT2* fueron ALT2ChIPFo 5'-GAGGACTTAGTTACTTAGATCC-3' y ALT2ChIPRe 5'-CCTCAAGATACAAGCCGTTTC-3'; para *LEU4*, LEU4Fw 5'-CTGACTCCTTGGGTAGAG-3' y LEU4Rv 5'-CTGTACCTTCAATATCGACG-3'. Los productos de PCR se resolvieron en geles de 1.5% agarosa, teñidos con bromuro de etidio.

IX. RESULTADOS

a. *Alt1* constituye la vía de principal de síntesis de alanina

Como se menciona en los antecedentes, se observó que la doble mutante *alt1Δalt2Δ* al crecer en MM (medio mínimo) glucosa-amonio no tiene un fenotipo de crecimiento muy diferente al de la cepa silvestre¹ (Ver figura 6, pág 17). Este resultado indica que la vía de síntesis de alanina en esta condición no se lleva a cabo exclusivamente por vía de las *ALTs*, es decir, existe(n) otra(s) vía(s) de síntesis de alanina. Si la única vía fuera por las transaminasas de alanina, la doble mutante no crecería. Dados estos resultados se decidió determinar cuál era la contribución individual de las *ALTs*, así como la de la(s) otra(s) vía(s) a la síntesis de alanina en condiciones fermentativas (glucosa-amonio). Para ello se obtuvieron extractos de metabolitos y se midieron las concentraciones intracelulares de alanina en las diferentes cepas: *alt1Δ*, *alt2Δ*, *alt1Δalt2Δ* y *WT*. Este experimento se realizó en varios puntos de la curva de crecimiento, para poder conocer la distribución de la biosíntesis de alanina en cada punto.

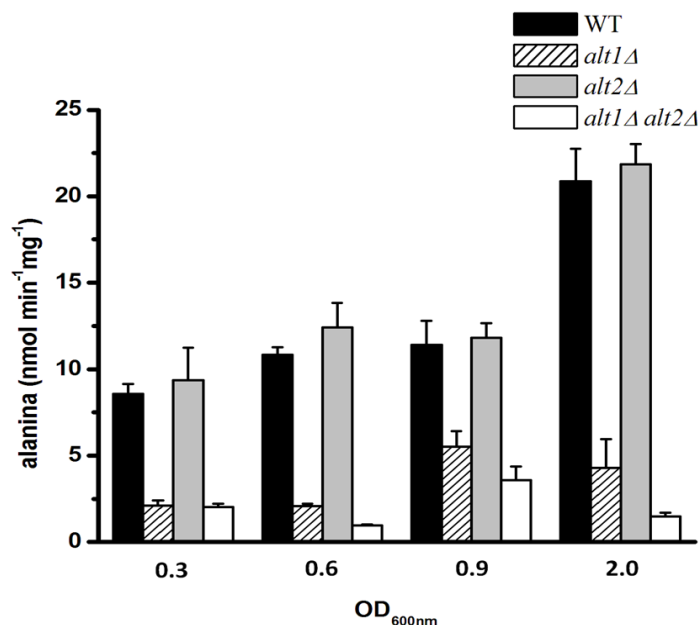


Figura 7. Concentración intracelular de alanina, cuando la levadura crece en glucosa-amonio. Se muestran las pozas de alanina que producen la cepa silvestre y las mutantes en los genes *ALT*, en diferentes etapas de crecimiento. Es claro que *Alt1* contribuye mayoritariamente a la síntesis del aminoácido. N=3.

Lo más evidente en este experimento es que Alt1 contribuye mayoritariamente a la síntesis de alanina en todos los puntos de la curva de crecimiento. Al comparar las pozas de la cepa silvestre (barras negras) y de la cepa *alt1Δ* (barras con líneas), se observa que al no estar Alt1, la cantidad de alanina disminuye drásticamente. Las barras grises (cepa *alt2Δ*) constituyen la poza de alanina con la que contribuyen Alt1 y la(s) otra(s) vía(s). La contribución exclusiva de Alt2 se obtiene de la diferencia entre la cepa *alt1Δ* y la doble mutante *alt1Δalt2Δ*. Es claro que Alt2 no contribuye con la biosíntesis de alanina y que la aportación de la(s) otra(s) vía es mínima, pero suficiente para que la doble mutante *alt1Δalt2Δ* tenga un crecimiento casi silvestre.

Parecería que al pasar la fase diáuxica y al llegar a la estacionaria, Alt2 contribuye con algo de alanina. Sin embargo, tomando en cuenta los demás datos obtenidos en este trabajo, pensamos que este efecto se debe a que Alt2 podría modular de alguna manera la(s) otra(s) vía(s).

b. ALT1 y ALT2 se regulan por el mismo represor Nrg1

En los trabajos que anteceden a éste había sido imposible encontrar una condición en la que se expresara *ALT2*. Como una alternativa a este problema, se decidió buscar *in silico* posibles represores transcripcionales en el promotor del gen que pudieran estar impidiendo su expresión. Los programas arrojaron que tanto en el promotor de *ALT1* como en el de *ALT2* había sitios de unión a los represores Nrg (*Nrg1* y *Nrg2*).

Después de repetir varios experimentos de expresión por Northern-blot se observó que efectivamente *Nrg1* (mas no *Nrg2*) es un represor de ambos genes, tanto en glucosa amonio, como en alanina. Este resultado se muestra en la figura 8, en donde se compara la expresión de la cepa silvestre con la de la mutante *nrg1Δ*. El aumento en la expresión de *ALT1* o de *ALT2* en la mutante *nrg1Δ* significa que el regulador efectivamente ejerce una represión transcripcional sobre estos genes.

En glucosa amonio (Figura 8-A), sobre todo después de la fase exponencial (0.3, 0.6 DO_{600nm}), se observa que en ausencia del represor, *ALT1* aumenta su expresión. En presencia de alanina, hay una inducción de la expresión de *ALT1*(Figura 8-B), y sólo se ve el efecto de *Nrg1* hasta la fase estacionaria (1.5 DO_{600nm}), en donde reprime a *ALT1*.

Para *ALT2* observamos que sólo se expresa de durante la fase exponencial (0.3 y 0.6DO) en glucosa amonio (Figura 8-A), y después de esta etapa del cultivo su expresión se reprime por completo por Nrg1. En presencia de alanina (Figura 8-B) *ALT2* se reprime desde el principio. Cuando no está Nrg1 la expresión de *ALT2* se mantiene todo el tiempo.

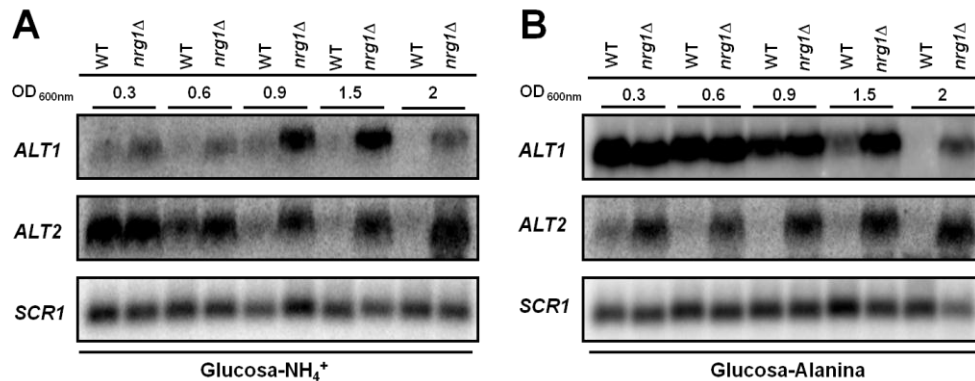


Figura 8. Northern-blot en donde se compara la expresión de *ALT1* y *ALT2* en las cepas silvestre y *nrg1*Δ en diferentes puntos de la curva de crecimiento. **A)** Las células crecieron en glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. **B)** Se utilizó alanina como fuente de nitrógeno. Experimento representativo de tres.

Es muy interesante que el mismo represor regule los dos genes al mismo tiempo de manera opuesta.

c. La regulación negativa de Nrg1 se debe a la interacción directa con los promotores

El efecto de un regulador puede ser directo o indirecto; un experimento de Northern-blot no permite hacer esta distinción. Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para determinar si Nrg1 se asocia directamente a los promotores de *ALT1* y *ALT2*.

Para ello se escogieron condiciones en donde fuera evidente la represión. Como se aprecia en la figura 8-B, en presencia de alanina *ALT2* se reprime por Nrg1 en cualquier etapa del crecimiento. En cambio *ALT1*, al crecer en alanina, se reprime por Nrg1 sólo hasta la fase estacionaria tardía, mas no en la fase exponencial, donde hay un claro efecto de inducción transcripcional. Los ChIPs se realizaron en glucosa-alanina en dos densidades ópticas: en fase exponencial (0.3DO_{600nm}) y en fase estacionaria tardía (1.8DO_{600nm}). Con un anticuerpo anti-c-Myc se colectaron todos los

promotores en donde estuviera unido el represor etiquetado Nrg1-Myc¹³ (cepa CLA-604). Después se buscó si entre estos fragmentos de cromatina estaban los promotores de *ALT1* y de *ALT2*, por medio de una reacción de PCR (Figura 9).

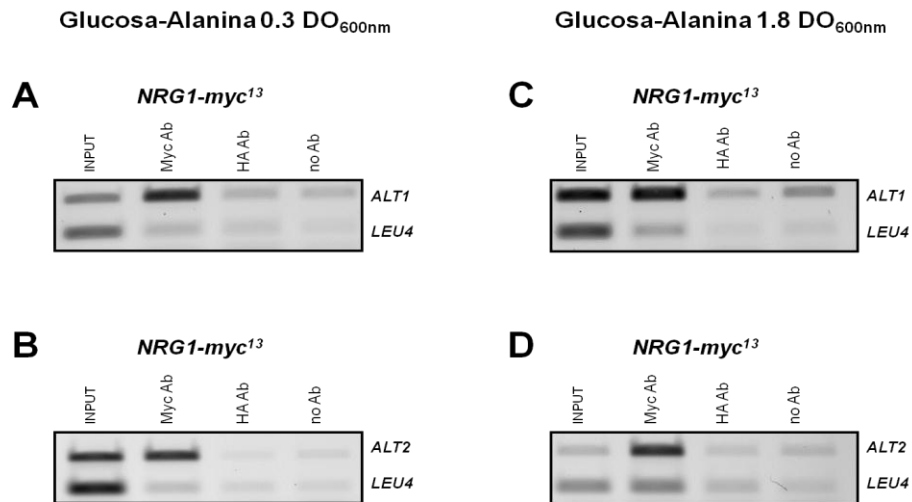


Figura 9. El represor Nrg1 siempre está unido a los promotores de *ALT1* y de *ALT2*, en glucosa-alanina en fase exponencial (A y B respectivamente) y en fase estacionaria (C y D respectivamente).

Respecto a la figura 9, se muestran los siguientes controles: en el primer carril de cada caso se muestra el *INPUT*, que corresponde a una muestra de cromatina sonicada sin ningún tratamiento, aquí deben amplificarse *ALT1*, *ALT2* y *LEU4*. En el tercer carril se muestra la amplificación de los promotores inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA (hemaglutinina), que no se asocia ni a *ALT1* ni a *ALT2*; éste es un control negativo así que la amplificación debe ser mínima o nula. El último control corresponde a una muestra en donde se llevó a cabo todo el tratamiento de inmunoprecipitación de cromatina, pero no se utilizó ningún anticuerpo (no Ab); al ser un control negativo la amplificación también debe ser mínima o nula. *LEU4* se utilizó como un control de una región codificante, y que por tanto no debe unirse a Nrg1. El segundo carril (Myc Ab) corresponde a la muestra de interés, en donde la amplificación de *ALT1* y de *ALT2* debería estar enriquecida de existir una asociación con Nrg1-Myc¹³.

Aun en condiciones de alta inducción de la expresión, el represor se asocia al promotor; tal es el caso de *ALT1* en fase exponencial (0.3DO_{600nm}) en presencia de alanina (Figura 9-A). La inducción transcripcional en este caso domina y suprime el efecto del represor. El silenciamiento permanente de *ALT2* en presencia de alanina (Figura 9B y D), así como la represión de *ALT1* en fase estacionaria (Figura 9-C), son un efecto directo de la unión de Nrg1 a los promotores.

Lo que se concluye de la figura 9 es que el represor Nrg1 efectivamente se encuentra unido a los promotores de *ALT1* y *ALT2* de manera constitutiva, al menos en glucosa alanina. Esto no es de sorprender cuando los genes están reprimidos, como ocurre para *ALT2* en fase exponencial 0.3DO_{600nm} y en fase estacionaria 1.8DO_{600nm} (Figura 9-B y D), y para *ALT1* en fase estacionaria (Figura 9-C). Lo que llama la atención es que el represor esté unido al promotor de *ALT1* (Figura 9-A) aun en una condición donde se induce al máximo la expresión del gen, en 0.3DO_{600nm} (ver Figura 8B).

d. Evaluación del papel fisiológico de ALT2

Nunca se había podido detectar la expresión de *ALT2*. Cuando se encontró que se expresaba en ausencia de su represor Nrg1 se planteó que en una mutante *nrg1Δ alt1Δ*, donde *ALT2* se expresa todo el tiempo, se podría rescatar el fenotipo de crecimiento producido por la falta de *ALT1*. Este fenotipo es muy claro en medio mínimo en estas tres condiciones: glucosa-alanina, etanol-amonio y etanol-alanina (ver figura 6). Se sugirió que al evaluar la cinética de crecimiento de la mutante *nrg1Δalt1Δ* en dichas condiciones se podría saber si *ALT2* tenía actividad de alanino aminotransferasa, de manera que pudiera complementar la falta de Alt1.

Se construyó la mutante *nrg1Δalt1Δ*. Se realizaron curvas de crecimiento, en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y amonio (figura 10) o alanina (figura 11) como fuentes de nitrógeno. Las cepas utilizadas fueron la cepa silvestre (WT, CLA1-2), la *alt1Δ*, *alt1Δalt2Δ*, *nrg1Δ* y *nrg1Δalt1Δ*.

En la primera prueba fisiológica se analizó si en la doble mutante *nrg1Δalt1Δ*, Alt2 podía complementar (aun parcialmente) la falta de Alt1 al crecer en MM glucosa-alanina. En esta condición las cepas que no tienen *ALT1* no pueden crecer, debido a que la alanina no se puede

catabolizar y por lo tanto, no se puede utilizar como fuente de nitrógeno. Lo que se esperaba era que la mutante *nrg1Δalt1Δ* creciera mejor en glucosa-alanina, en comparación con las mutantes *alt1Δ* y *alt1Δalt2Δ*. Lo que se observó no fue lo esperado, el fenotipo de crecimiento es el mismo para las tres cepas, por lo cual se concluyó que la inducción de la expresión de *ALT2* en la mutante *nrg1Δalt1Δ* no es suficiente para rescatar el fenotipo producto de la falta de *ALT1* (Figura 11).

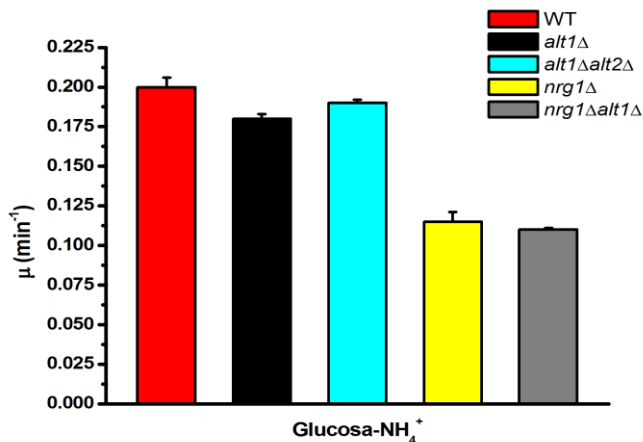


Figura 10. Velocidad específica de crecimiento (μ). Análisis del fenotipo de la mutante que expresa *ALT2* (*nrg1Δalt1Δ*). Se analizó el crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes *alt1Δ*, *alt1Δalt2Δ*, *nrg1Δ* y *nrg1Δalt1Δ*. Las cepas crecieron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno.

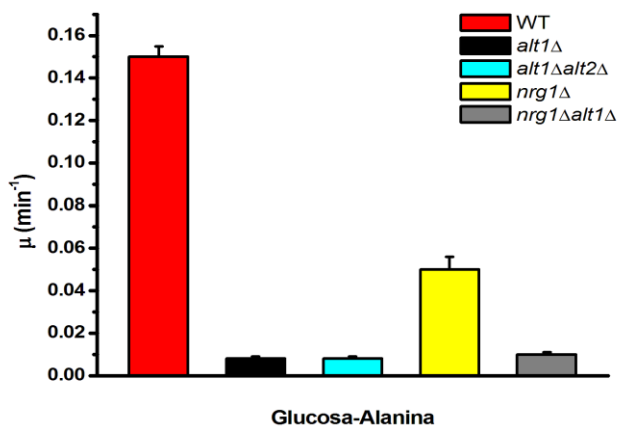


Figura 11. Velocidad específica de crecimiento (μ). Se analizó el crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes *alt1Δ*, *alt1Δalt2Δ*, *nrg1Δ* y *nrg1Δalt1Δ*. Las cepas crecieron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y alanina como fuente de nitrógeno.

Las mutantes sin *ALT1* también tienen un fenotipo muy claro en MM con etanol como fuente de carbono y amonio o alanina como fuente de nitrógeno¹; no pueden crecer. Se pretendía analizar la cinética de crecimiento de la mutante *nrg1Δalt1Δ* en estas condiciones, pero la mutante sencilla *nrg1Δ* no crece en etanol, por lo que fue imposible llevar a cabo estos experimentos.

La otra condición en la que se podía analizar un fenotipo de crecimiento era en medio mínimo glucosa-amonio (figura 10). Como se puede apreciar en la figura 6 y como ya se ha explicado, en esta condición todas las cepas crecen bien, pues se sintetiza alanina por vías alternas; por lo tanto, no se esperaba un rescate parcial de fenotipo en la mutante *nrg1Δalt1Δ*, como en el caso anterior. Lo que se observó fue que la falta de Nrg1 produce una velocidad de crecimiento menor que la que tienen las demás cepas en estas condiciones. Esto se puede explicar porque Nrg1 es un regulador global que reprime (entre muchos otros) genes de utilización de fuentes secundarias de carbono cuando la levadura crece en presencia de glucosa, también reprime genes mitocondriales importantes para la respiración⁶.

e. Las proteínas Alt1 y Alt2 en diferentes etapas de crecimiento

Dada la evidencia de que en la mutante *nrg1Δalt1Δ*, Alt2 no es capaz de complementar la función de Alt1, era indispensable saber si el mRNA de *ALT2* se estaba traduciendo.

Primero se realizó un Northern-blot únicamente con la cepa silvestre, con el fin de detallar la expresión de *ALT1* y *ALT2* en todas las etapas de crecimiento, tanto en glucosa amonio (figura 12-A), como en glucosa alanina (Figura 12-B). La expresión del mRNA se comparó con la cantidad de proteína en las mismas condiciones (Figuras 12C a F), también en diferentes puntos de la curva de crecimiento. Para dicho propósito se utilizaron las cepas etiquetadas *ALT1-TAP* y *ALT2-TAP*⁶³, con el fin de detectar a las proteínas utilizando un anticuerpo contra la etiqueta TAP. Cabe mencionar que aunque la colección de cepas etiquetadas proviene de una cepa diferente (S288C), la relación entre mRNA y proteína es congruente.

En glucosa amonio se observa un pico en la expresión de mRNA de *ALT1* en 0.9DO, pero hay expresión en todos los puntos (Figura 12-A). La proteína de Alt1 también se detecta en todos los puntos, con un máximo en 0.9DO (Figura 12-C). El mRNA de *ALT2* (Figura 12-A) se detecta sólo durante la fase exponencial (0.3-0.6 DO). La cantidad de proteína de Alt2 que se detecta es muy baja aunque corresponde a los puntos donde hay mRNA (Figura 12-D). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-Lys20/Lys21.

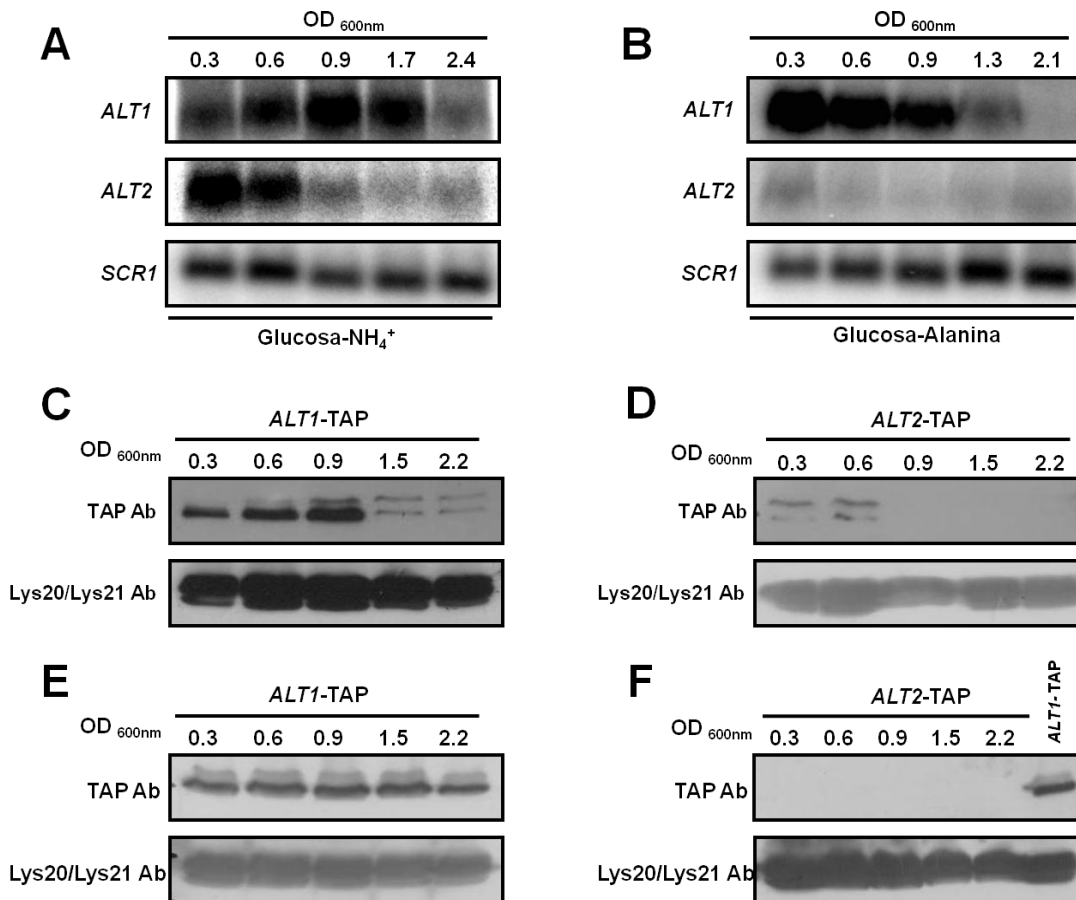


Figura 12. Expresión del mRNA por Northern-blot (A y B) y proteína de *ALT1* y *ALT2* (C-E) **A)** mRNA de *ALT1* y *ALT2* en glucosa-amonio **B)** en glucosa-alanina, en diferentes fases de crecimiento. **C-E)** Western blot en el que se detectan las proteínas etiquetadas *Alt1-TAP* y *Alt2-TAP* en diferentes etapas de crecimiento **C)** *Alt1-TAP* en glucosa-amonio **D)** *Alt2-TAP* en glucosa amonio **E)** *Alt1-TAP* en glucosa-alanina **F)** *Alt2-TAP* en glucosa-alanina. Se utilizó como control de carga anticuerpo Anti-Lys20/Lys21.

En la figura 12-B es clara la inducción de la expresión del mRNA de *ALT1* en presencia de alanina desde el inicio del crecimiento; conforme avanza el cultivo hacia la fase estacionaria (1.3DO en adelante) *ALT1* comienza a reprimirse, como ya se había descrito en la figura 8. En cambio, *ALT2* se reprime completamente en presencia de alanina (Figura 12-B). En presencia de alanina hay una gran cantidad de proteína *Alt1* en cualquier etapa, y aunque en fase estacionaria se detecta poco mRNA, la proteína está todo el tiempo (Figura 12-E). En cambio en presencia de alanina, no se observó proteína de *Alt2* en ningún punto, lo cual coincide con que no hay expresión de mRNA (Figura 12-F).

Las dos bandas que se observan para las proteínas Alt1-TAP y Alt2-TAP podrían explicarse (1) para el caso de Alt1 como un producto del procesamiento del péptido mitocondrial y (2) para Alt2 como un procesamiento que sufre la proteína por la presencia de la etiqueta TAP, ya que en otra inmunodetección con otra etiqueta (yEC, en la figura 14) se observa sólo una banda para la proteína Alt2.

f. Sobreexpresión de ALT2

Se supuso que quizá Alt2 no podía complementar la falta de Alt1 porque la cantidad de proteína era insuficiente. Con el propósito de sobreexpresar *ALT2* se construyó una cepa mutante en la que el promotor endógeno se sustituyó por el promotor de tetraciclina (*tetO7*), que es un promotor fuerte reprimible por tetraciclina. Esta misma cepa también se hizo nula para *ALT1*. Ya que el fondo genético de esta cepa es diferente a los que se han descrito anteriormente (R1158), también se construyó una mutante nula para *ALT1* en este fondo. De ahora en adelante estas cepas serán nombradas *tetO7-ALT2alt1Δ* y *alt1ΔR1158* respectivamente. Se analizó la expresión de éstas en diferentes puntos de la curva de crecimiento por Northern-blot (figura 13). Como se puede notar el mRNA de *ALT2* aumentó considerablemente en la cepa *tetO7-ALT2alt1Δ*, tal y como se esperaba.

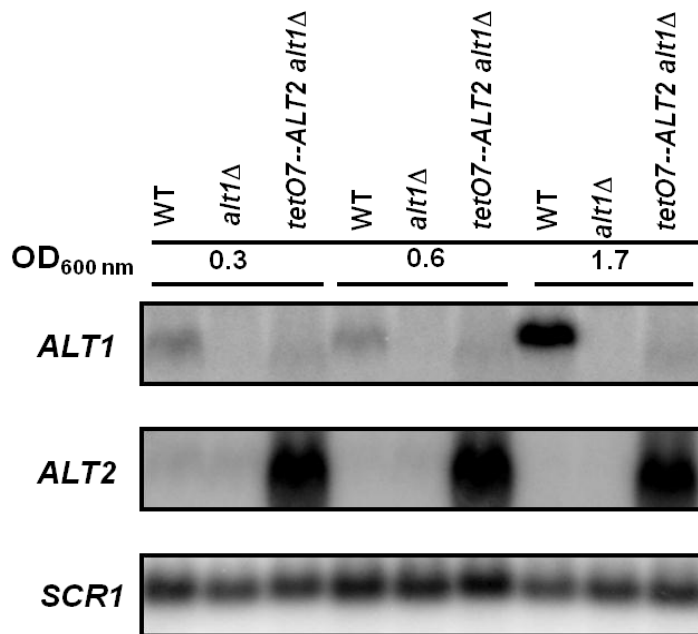


Figura 13. Northern blot en donde se compara la expresión aumentada de *ALT2* en glucosa amonio. Se muestran las cepas WT (R1158), *alt1Δ*R1158, *tetO7-ALT2alt1Δ* en diferentes fases de crecimiento. En la cepa *tetO7-ALT2alt1Δ* se muestra un aumento en la expresión de *ALT2* de hasta 25 veces. La expresión de *ALT1* es como anteriormente se ha mostrado y como se esperaba.

Este aumento en el mRNA debía ser congruente con un aumento en la cantidad de proteína. Para comprobarlo se realizó una inmunodetección en cepas etiquetadas con la variante de la proteína verde fluorescente γ ECitrine (γ EC), epítipo reconocido por el anticuerpo primario. La cepa control tiene al gen *ALT2* bajo su propio promotor (cepa *ALT2- γ EC*), con la etiqueta en el extremo carboxilo. La otra cepa tiene al gen *ALT2* bajo el promotor de tetraciclina *tetO7*, (cepa *tetO7-ALT2- γ EC*) y está etiquetada también en el carboxilo. Se extrajo proteína de cultivos de estas dos cepas, en tres puntos de la curva de crecimiento (0.3, 0.6 y 2.0 DO) en medio mínimo con glucosa amonio. En la inmunodetección se observa, tal y como se esperaba, un aumento notable de la cantidad de proteína Alt2 en la cepa *tetO7-ALT2- γ EC* (Figura 14-A) en comparación con la cantidad de proteína Alt2 con su promotor endógeno (Figura 14-B), en todos los puntos. Hay que destacar también que, aunque se trata de otro fondo genético, el resultado de la poca cantidad de proteína inmunodetectada de Alt2 (con promotor silvestre) es el mismo que se obtuvo con anterioridad con la cepa *ALT2-TAP* (Figura 14-B izquierda).

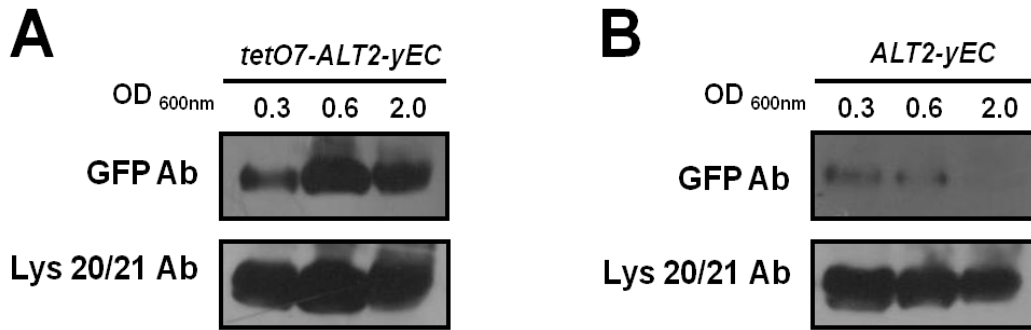


Figura 14. Inmunodetección de Alt2, con cepas etiquetadas con yEC. La cantidad de proteína de Alt2 que se muestra en **A)** depende del promotor endógeno. **B)** La sobreexpresión de *ALT2* con el promotor *tetO7* aumenta considerablemente la cantidad de proteína.

Se asumió que la cantidad de proteína de Alt2 detectada en el Western-blot con la cepa *tetO7-ALT2-yEC* sería equivalente a la de la cepa *tetO7-ALT2alt1Δ*, pues las dos cepas se construyeron con el mismo módulo de PCR, aunque de forma independiente. Se efectuó de esta forma porque la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* no está etiquetada, por lo que fue imposible determinar la cantidad de proteína Alt2 directamente en esa cepa.

Por la cantidad de proteína Alt2 que se detectó en la cepa *tetO7-ALT2-yEC* se consideró que sería suficiente para rescatar el fenotipo producido por la falta de Alt1. Para probar esta hipótesis se realizaron curvas de crecimiento de las

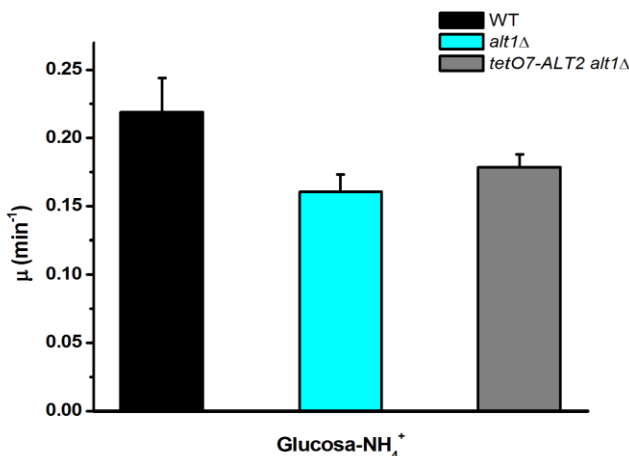


Figura 15. Velocidad específica de crecimiento (μ) en glucosa-amonio. Las cepas: silvestre R1158, en rojo *alt1Δ*R1158 y *tetO7-ALT2alt1Δ*. En esta condición las cepas crecen bien todas,

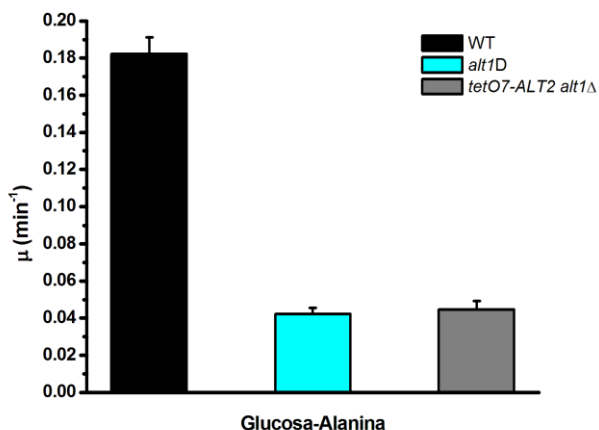


Figura 16. Velocidad específica de crecimiento (μ) de las cepas: silvestre R1158, *alt1Δ*R1158 y *tetO7-ALT2alt1Δ*. Es claro que en esta condición la sobreexpresión de *ALT2* no rescata el fenotipo de la falta de *ALT1*.

cepas WTR1158, *alt1Δ*R1158 y *tetO7-ALT2alt1Δ* en glucosa alanina. Las mutantes nulas para *ALT1* (*alt1Δ*) no pueden catabolizar la alanina y por lo tanto no pueden crecer con este aminoácido como única fuente de nitrógeno. Suponiendo que Alt2 cumple la función de una alanino aminotransferasa, se esperaba que en glucosa alanina la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* creciera mejor que la mutante *alt1Δ*R1158, pero no sucedió así. La mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* crece igual que la mutante *alt1Δ*R1158 (Figura 16). Este resultado indica que el fenotipo por la falta de Alt1 no se rescata ni siquiera parcialmente al sobreexpresar Alt2.

También se llevó a cabo un experimento de crecimiento en glucosa-amonio, pero ahí la falta de Alt1 no produce ningún fenotipo. Como se puede observar en la figura 15, las tres cepas tienen un crecimiento muy similar.

g. Determinación de actividad enzimática

La única opción que faltaba explorar para saber si la Alt2 era funcional era medir la actividad enzimática. Para dicho propósito se modificó el protocolo de García-Campusano¹, variando la concentración de alanina en un margen de 50mM a 500mM, así como la de 2-oxoglutarato de 3mM a 24mM. También se buscó un pH óptimo entre 5.4 y 9. Finalmente la actividad de Alt2 se midió a pH8 con 3mM de 2-oxoglutarato, 400mM de alanina. La de Alt1 se midió igual, pero con 24mM de 2-oxoglutarato. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Cepa	ACTIVIDAD ESPECÍFICA ($\mu\text{mol}^{\text{min}^{-1}}\text{mg}^{-1}$)
	OD ₆₀₀ 1.0
CLA1-2 (<i>ALT1 ALT2</i>)	0.104 ±0.03
CLA1-2-1 (<i>alt1Δ ALT2</i>)	0.011 ±0.003
CLA1-2-2 (<i>ALT1 alt2Δ</i>)	0.117 ±0.03
CLA1-2-D (<i>alt1Δ alt2Δ</i>)	0.018 ±0.003
CLA 603 (<i>alt1Δ ALT2 nrg1Δ</i>)	0.015 ±0.004
R1158-3 (<i>alt1Δ</i>)	0.019 ±0.008
R1158-4 (<i>tetO7 ALT2 alt1Δ</i>)	0.019 ±0.005

Tabla 2. Actividad específica en extracto crudo. La desviación estándar corresponde a cinco experimentos independientes.

entes

razones: (1) No contribuye con la poza de alanina, lo cual habla de que su actividad es nula o muy pobre (2) La expresión constitutiva de Alt2, con su promotor endógeno (mutante *nrg1Δalt1Δ*) o sobreexpresada (mutante *tetO7-ALT2alt1Δ*) no es suficiente para rescatar el fenotipo generado por la falta de Alt1, en glucosa alanina (3) la actividad detectada en todos los casos donde hay Alt2 es la misma que para la doble mutante *alt1Δalt2Δ*, que carece de actividad.

En ninguna de las condiciones que se probaron se pudo detectar la actividad de Alt2. Tampoco se le encontró ningún papel fisiológico; no parece haber una participación de Alt2 en el metabolismo de alanina.

η. Secuenciación de la cepa tetO7-ALT2alt1Δ.

Recientemente se obtuvo la secuencia de la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ*. El resultado de la secuenciación indica que al hacer la construcción sobre el gen *ALT2* se generó una deleción de una sola base, lo que resultó en la generación de un codón de paro, y por tanto al traducirse el mensajero se produce una proteína trunca sin función biológica. El hecho de que los análisis tipo

Western llevados a cabo con extractos de la mutante *tetO7-ALT2-yEC*, claramente mostraron la presencia de proteína Alt2, llevó a la suposición de que la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ*, no etiquetada con yEC también se traduciría correctamente, ya que se utilizó el mismo producto de PCR para preparar ambas cepas (*tetO7-ALT2-yEC* y *tetO7-ALT2alt1Δ*).

Esta mutante está en proceso de volverse a construir con una nueva estrategia, asegurando con los desoxiligonucleótidos que la proteína quede en marco, pues se insertan dos codones de inicio. De cualquier forma la hipótesis es que en la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* no se podrá medir actividad de Alt2 por dos razones: (1) los datos de la mutante *nrg1Δalt1Δ*, donde la proteína Alt2 está intacta indican que no tiene actividad de Alt *in vitro*, y tampoco *in vivo*, pues no complementa la falta de Alt1 al crecer en presencia de alanina; (2) los datos de las pozas indican que Alt2 no contribuye con la biosíntesis de alanina, por lo que es poco probable que se detecte actividad. Pero es muy importante volver a obtener la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* y confirmar o descartar esta hipótesis. Antes de hacer cualquier experimento se secuenciará y posteriormente se realizarán pruebas fisiológicas de complementación y se medirá actividad específica.

X. DISCUSIÓN

a. La síntesis de alanina en condiciones fermentativas está mediada principalmente por Alt1

En una mutante carente de Alt1 (*alt1Δ*) la concentración intracelular de alanina disminuye cerca del 75% (excepto en 0.9DO), aunque el 25% restante es suficiente para que las cepas crezcan bien. No se sabe cuál es la importancia de que la levadura mantenga pozas de aminoácidos tan elevadas, pero lo mismo sucede con la lisina⁶¹. Las vías alternas de biosíntesis de alanina, contribuyen en una proporción muy baja, pero al menos en estas condiciones, se necesita poca alanina para crecer. Quizá existe alguna condición en que la disminución de la poza de alanina afecte la adecuación.

Hay una ligera disminución de la poza de alanina en la doble mutante (*alt1Δ alt2Δ*), en fases tardías de crecimiento, en comparación con la mutante *alt1Δ*. Esto podría indicar que Alt2 contribuye ligeramente con la poza de alanina, lo cual parece poco probable debido a que la poza *wild type* y la que acumula una *alt2Δ* son idénticas. Más bien podría ser un efecto colateral de la doble mutación, afectando a la(s) otra(s) vía(s) de síntesis de alanina. Pero si no fuera así, el resultado indica que la actividad de alanino aminotransferasa de Alt2 es bajísima.

b. La regulación transcripcional de ALT1 y ALT2

Los genes mantienen una regulación muy fina. *ALT1* tiene una regulación típica de un gen catabólico, pues su expresión se induce por el sustrato (alanina). En cambio el perfil de expresión de *ALT2*, opuesto al de *ALT1* parece ser el de un gen anabólico, ya que su expresión se reprime por el producto final (alanina). Cuando *ALT1* se induce en presencia de alanina, *ALT2* se reprime por Nrg1, y la alanina actúa como co-represor. *ALT1* también se reprime por Nrg1, en este caso el metabolito co-represor, podría ser un producto del catabolismo de la alanina, como el piruvato. Este tipo de regulación para *ALT1* funcionaría para mantener la homeostasis metabólica y evitar ciclos fútiles. Las alanino aminotransferasas conectan directamente el metabolismo de nitrógeno

y el del carbono a través del piruvato, cuya concentración debe estar sujeta a una regulación estricta.

La regulación transcripcional de *ALT1* y *ALT2* sugiere que hay una distribución del papel metabólico de la alanina aminotransferasa entre estos dos genes, como sucede con *BAT1* y *BAT2*; por su perfil de expresión *Bat1* tiene un papel primordialmente biosintético en tanto que *Bat2* es preferencialmente una enzima catabólica⁶². El patrón de expresión de *ALT2* indica que podría participar en la biosíntesis, mientras que *ALT1* se comporta como un gen típicamente catabólico. Sin embargo, este perfil de regulación es el único dato que involucra a *ALT2* en el metabolismo de la alanina. Si en algún momento en el pasado evolutivo fue así, el gen perdió la función pero conservó la regulación. Esto es algo extraño, pues normalmente lo que sucede durante la diversificación con los genes duplicados es que conservan la función bioquímica, y la regulación diverge muy rápidamente⁶⁷.

c. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos como una herramienta para entender el mecanismo de regulación de ALT1 y de ALT2

La forma en que algunos reguladores del metabolismo de aminoácidos ejecutan sus funciones en *S.cerevisiae*, nos puede ayudar a entender mejor el mecanismo de regulación de *ALT2* y de *ALT1*. En seguida se darán algunos ejemplos que sirven para discutir qué podría estar pasando en el caso que estudiamos.

Metabolismo de leucina. La leucina no se puede utilizar como fuente de carbono ni de nitrógeno. Dos de las enzimas de la vía de síntesis, la isopropilmalato isomerasa y la β -isopropilmalato deshidrogenasa están codificadas por los genes *LEU1* y *LEU2* respectivamente. La inducción de la transcripción de éstos depende del regulador *Leu3* y de α -isopropilmalato, precursor de la leucina que funciona como co-inductor^{68,69}. En presencia de α -isopropilmalato *Leu3* se activa como factor transcripcional induciendo la expresión de *LEU2* y *LEU3*. En ausencia de α -isopropilmalato *Leu3* también se une a los promotores de *LEU2* y *LEU3*, pero disminuye su expresión (aunque no llega a cero)⁶⁹. En este ejemplo el α -isopropilmalato funciona como una señal para que se active la síntesis de leucina, por lo cual favorece junto con *Leu3* la transcripción

de las siguientes enzimas de la vía. En ausencia de α -isopropilmalato Leu3 reprime la expresión de *LEU2* y *LEU3*.

Metabolismo de prolina. Para que la prolina pueda ser utilizada como fuente de nitrógeno se tiene que catabolizar. Este mecanismo depende de la inducción de la expresión de *PUT1* y *PUT2*. Estos genes catabólicos codifican para la prolina oxidasa y pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa respectivamente⁷⁰. La inducción depende del regulador Put3, que se une al DNA en presencia o en ausencia de prolina⁷¹. Put3 cambia su conformación en presencia de prolina, se exponen los residuos acídicos centrales de la proteína y se vuelve activo para promover la transcripción de sus blancos *PUT1* y *PUT2*⁷². En este caso la vía catabólica se induce en presencia de prolina, que funciona como un co-inductor.

Metabolismo de arginina. La regulación de los genes del metabolismo de la arginina está mediada por un mismo complejo, cuyo núcleo es el regulador ArgRII, que interacciona con otros factores para formar complejos de represión o activación transcripcional, en respuesta a la presencia de arginina⁷³. ArgRII junto con ArgRI Mcm1 y ArgRIII (complejo ArgR) controlan la expresión de genes tanto anabólicos como catabólicos. La arginina es necesaria para que el complejo se una al DNA; de hecho se ha propuesto que ArgR es el sensor de arginina⁷⁴. Cuando la arginina funge como co-represor el complejo ArgR se une a sus genes blanco para reprimir la expresión de genes anabólicos; en cambio, cuando actúa como co-inductor impide la unión del represor CARGR a los promotores de los genes catabólicos CargA y CargB (arginasa y transaminasa de ornitina)^{73,75}. En ausencia del represor (CARGR) los genes catabólicos se pueden inducir. De esta manera, simultáneamente el mismo regulador (ArgR) activa los genes catabólicos y reprime los anabólicos en presencia de arginina.

La alanina actúa como co-regulador de la expresión de *ALT1* y *ALT2*. La alanina es un factor clave para la regulación de *ALT1* y de *ALT2*. Mientras que para *ALT2* funciona como un co-represor, para *ALT1* funciona como un co-inductor, lo mismo que sucede con la arginina en el caso anterior. Existen varios escenarios para explicar el mecanismo de regulación de estos genes, cuya represión además depende del mismo regulador, Nrg1. Por ejemplo, en glucosa-amonio, el represor podría estar unido a ambos promotores. Aunque esto produjera un cierto grado de

represión, la transcripción no es cero, ambos genes se expresan poco. Esto sería parecido a lo que ocurre con la represión de *LEU1* y *LEU2*, mediada por Leu3 en ausencia de α -isopropilmalato⁶⁹.

En presencia de alanina lo que podría ocurrir es que el aminoácido se una al complejo de represión del que Nrg1 forma parte (Nrg-R), impidiendo por completo la transcripción de *ALT2*. La alanina en cambio, funciona como co-inductor para *ALT1*. Es posible que la unión de la alanina al complejo de activación en el que podrían participar reguladores como Gcn4 y/o Gln3, cambie su conformación y le dé mayor capacidad para reclutar de manera eficiente a la maquinaria transcripcional. Esta inducción de *ALT1* a su máximo nivel permite que se catabolice la alanina del medio. La acumulación de piruvato, como producto del catabolismo de alanina, podría funcionar como una señal de represión para *ALT1*, uniéndose al complejo que forma Nrg1 (Nrg-R).

Para que *ALT1* y *ALT2* se puedan regular de manera opuesta con los mismos componentes, Nrg1 y alanina, Nrg1 tiene que interactuar con elementos diferentes en cada promotor. Los activadores también tienen que formar combinaciones diferentes en cada caso.

d. ALT2 no participa en el metabolismo de la alanina

Los resultados que se obtuvieron apuntan en una sola dirección, que *ALT2* no participa en el metabolismo de la alanina. La región regulatoria es funcional, pues está sujeta a un mecanismo de represión para el cual la alanina es determinante. En las condiciones estudiadas *ALT2* se puede transcribir y traducir, aunque en muy poca cantidad. La proteína que se traduce está completa, no hay un codón de paro que la trunque. Alt2 en condiciones de expresión constitutiva, en la mutante *nrg1Δalt1Δ*, tampoco juega ningún papel en el catabolismo de alanina y carece de actividad enzimática. La expresión pobre de *ALT2* llevó a la suposición de que al sobre-expresarla se podría averiguar algo sobre su papel fisiológico. Esto todavía está por verse por el hecho de que la mutante *tetO7-ALT2alt1Δ* tiene un corrimiento del marco de lectura. Se tendrán que hacer los experimentos de nuevo una vez que se vuelva a construir esa cepa con una estrategia mejor, que asegure que el mRNA quede en marco para la traducción.

No obstante, la hipótesis es que Alt2 no tendrá actividad, aunque se sobreexpresa, y si la tiene será muy baja. Esta hipótesis se apoya en experimentos *in vivo*, como las pozas de alanina, que revelaron que Alt2, si es que tiene algo de actividad, es bajísima. Otra prueba *in vivo* es la de complementación que muestra la curva de crecimiento de la mutante *nrg1Δalt1Δ*, en la que aunque *ALT2* se está expresando todo el tiempo, no es capaz de reemplazar la falta de *ALT1*. *In vitro* también se comprobó que Alt2 carece de actividad en condiciones en donde se expresa. No se detectó actividad en la cepa *nrg1Δalt1Δ*, ni tampoco en la *alt1ΔR1158*, ni en la *alt1Δ* Cla, en ninguna condición. Estos datos nos hacen pensar que Alt2 no tendrá actividad ni siquiera cuando se sobreexpresa, pero se harán los experimentos de cualquier forma.

Aunque la regulación de *ALT2* sugiere que es un gen que podría participar en la síntesis de alanina, los datos fisiológicos demuestran que no cumple con esta función. La pérdida de dicha función pudiera deberse a una serie de cambios en la región codificante, que bien podrían haber afectado la interfaz, o quizá los residuos que rodean y crean un ambiente para el sitio catalítico. Los aminoácidos que se presume que son importantes para la catálisis son idénticos en ambos genes *ALT1* y *ALT2*. Estos residuos están sujetos a una mayor presión de selección, con lo cual se vuelve más probable que se fijen cambios en el resto de la proteína.

e. Alt2 podría realizar una función diferente a la que se predice por homología

A pesar de estos cambios que provocaron la pérdida de función de alanino aminotransferasa, podría ser que *ALT2* se conserve en el genoma porque ejerce otra función. Cabe la posibilidad de que transamine otro aminoácido y/u otro 2-oxoácido. También puede ser que participe en algún mecanismo relacionado con estrés, pues el regulador Nrg1, entre otros, reprime muchos genes asociados a distintos tipos de estrés^{6,76}.

La posibilidad de que *ALT2* tenga otra función no es remota, ya que la duplicación génica es el material principal para la evolución de nuevas funciones³². *ALT1* se ha quedado con el papel de alanino aminotransferasa y además existe o existe(n) otra(s) vía(s) de síntesis de alanina, como ya se ha dicho. El gen *ALT2* podría haber estado sujeto a una menor presión de selección para conservar su función original, sin embargo podría haber evolucionado sin restricciones para

ejercer una nueva función. Un caso que podría ejemplificar el proceso de diversificación que han sufrido *ALT1* y *ALT2* es el de *LYS20* y *LYS21*. Este par de genes duplicados en *S. cerevisiae* codifican para homocitrato sintasas con un 92% de identidad. Estas enzimas constituyen el primer paso de la vía de síntesis de lisina; condensan 2-oxoglutarato y acetyl CoA para formar homocitrato y CoA⁷⁷. El descubrimiento de la localización nuclear de Lys20 y Lys21⁷⁸ resultó inusual en un principio, ya que el resto de las enzimas de la vía de síntesis de lisina se encuentran en la mitocondria o en el citosol⁷⁹. Recientemente se ha encontrado una explicación a esta localización misteriosa. Lys20 tiene actividad de acetyl-transferasa, se asocia con la acetyl-transferasa de histonas global Esa1 y con la variante de histona H2A.Z. En conjunto estas proteínas tienen un papel en la reparación de ciertos tipos de daño al DNA⁸⁰. La existencia de dos proteínas que realizan la misma función alberga la posibilidad de que una de ellas adquiera una nueva función, además de la función original. Posteriormente en la evolución la función original puede desaparecer, sin tanta restricción ya que existe un respaldo, es decir otra proteína que puede sustituirla. Las mutaciones que pueden dar origen a una nueva función en una proteína pueden ir en detrimento de la función original, dificultad que se puede resolver cuando existen genes duplicados, así pudo haber ocurrido con *ALT2*. Otra posibilidad es que las mutaciones que generan una nueva función no interfieran en nada con la función original, esto es, cuando las funciones radican en dominios diferentes de la proteína, como es el caso de Lys20⁸⁰.

Existe un análisis global *in silico* que sugieren que *ALT2* podría tener una función no relacionada con el metabolismo de la alanina. Este estudio propone que *ALT2* tiene interacciones genéticas con genes involucrados en el metabolismo de glicina y serina, así como de treonina y triptofano. Triples mutantes que involucran a *ALT2* y a dos genes asociados al metabolismo de aquellos aminoácidos, causan letalidad sintética. Es decir, la falta de uno o dos genes no produce un fenotipo, sin embargo las triples mutantes son letales. Esto habla de una posible interacción de los genes involucrados⁸¹. Las funciones que podrían establecerse a partir de estos datos guardan una relación clara con el metabolismo de nitrógeno, en especial con el metabolismo de aminoácidos: glicina, serina y treonina, que están muy conectados entre sí, y por otro lado el metabolismo de triptofano. Hay que tener en cuenta que estos datos provienen de un único análisis global, que aunque está basado en un amplio análisis con bases de datos diversas, es *in*

silico y cabe la posibilidad de que existan falsos positivos. Se tendría que probar puntualmente la relación entre *ALT2* y los genes que se proponen como sus interactores.

También para *ALT1* existen mutaciones que causan letalidad sintética. Y éstas se describen en diferentes estudios⁸²⁻⁸⁴. La doble delección de *ALT1* (y no triple, como para *ALT2*) en combinación con varias proteínas tipo chaperonas causa letalidad sintética. Este tipo de interacciones también sugiere que *ALT1* podría tener otra función diferente al metabolismo de alanina; quizá *ALT1* participe en algún mecanismo relacionado con estrés, lo cual es congruente con que se regula por Nrg1. O quizá podría participar en el proceso de importación mitocondrial y por eso interacciona con chaperonas.

Las evidencias de proteínas que realizan más de una función son crecientes. Este fenómeno en un principio fue denominado *gene-sharing* en los años 80, cuando Piatigorsky y Wistow descubrieron que las proteínas que forman el cristalino de muchos vertebrados también son enzimas metabólicas como lactato deshidrogenasa o arginino succinato liasa^{85,86}. De hecho se demostró que, en algunas especies de aves, las proteínas purificadas del lente tienen actividad enzimática⁸⁵. En este caso las subunidades de la proteína estructural del cristalino y de la enzima que se expresa en otros tejidos están codificadas por los mismos genes. En los invertebrados las proteínas del cristalino también están relacionadas con enzimas, por ejemplo, en los cefalópodos tienen homología con la glutatión-S-transferasa o con la aldehído deshidrogenasa en el caso de los ostiones. Pero a diferencia de lo que ocurre con algunos vertebrados, estos genes están en dos o más copias; y las copias que se expresan en el cristalino carecen de actividad enzimática⁸⁷. El fenómeno que solía llamarse *gene-sharing* hoy se conoce como *moonlighting*.

Para concluir con la discusión se mencionará el último ejemplo de *moonlighting* en *S. cerevisiae*. También se trata de una enzima metabólica que puede ejercer otra función. Arg5,6 es una enzima mitocondrial bien conocida por su papel en la biosíntesis de arginina. Además de esta función, recientemente se ha descubierto que esta proteína interacciona con el DNA de 22 genes tanto mitocondriales como nucleares, regulando su transcripción. En el trabajo de Hall y colaboradores se llevó a cabo un análisis extensivo de dichas interacciones que se probaron por varios métodos. Pero era necesario probar que Arg5,6 estaba funcionando como un factor

transcripcional. La prueba de ello fue que en una mutante nula *arg5,6Δ* disminuyó la cantidad de mRNA de *COB1*, un gen mitocondrial y de *PUF4*, un gen nuclear, demostrando que Arg5,6 ejerce un control transcripcional sobre ellos⁸⁸.

La homología que tienen las proteínas nos puede dar una idea de qué función realizan, sin embargo, debemos estar abiertos a que puede no tener la función predicha, aun cuando la homología sea muy alta. Una posibilidad es que lleve a cabo una función similar a la predicha, otra es que tenga una función completamente diferente y la otra es que tenga más de una función. También puede suceder que no tenga función porque se encuentre en proceso de pseudogenizarse.

CONCLUSIONES

- En condiciones fermentativas la principal vía de síntesis de alanina es por Alt1.
- En condiciones fermentativas se necesita muy poca alanina para alcanzar un fenotipo de crecimiento normal. Esta alanina se sintetiza por otra(s) vía(s). Y cuando falta Alt1 la poca alanina que se sintetiza por otras vías es suficiente para crecer.
- *ALT2* se transcribe en mRNA y es un gen con un promotor funcional, ya que se regula por Nrg1.
- *ALT2* se reprime en presencia de alanina; su perfil de expresión se asemeja al de un gen anabólico. Al menos en las condiciones estudiadas, su expresión se limita a la fase exponencial temprana en glucosa amonio.
- La proteína Alt2 conserva los residuos importantes para la unión de los sustratos y para la unión de PLP. Alt2 se traduce, y aunque la proteína parece estar completa, carece de actividad de alanino aminotransferasa.
- Alt2 no puede sustituir en ninguna medida la falta de Alt1.
- Alt1 realiza, tanto la función biosintética como la función catabólica del metabolismo de alanina. Aunque se expresa poco en glucosa amonio, en donde se favorece la biosíntesis, es suficiente para que la proteína sintetice una poza muy alta de alanina. Esto habla de una capacidad catalítica muy eficiente, ya que con poca proteína se sintetiza una gran cantidad de alanina.
- Alt2 no contribuye con la poza de alanina, lo cual habla de su carencia de papel biosintético *in vivo*, y si acaso lo hace su capacidad catalítica es muy pobre.
- La actividad *in vitro* indica que solo Alt1 realiza la función de alanino aminotransferasa. Y que Alt2 ha perdido esta actividad. Si Alt2 tuviera algo de actividad, es indetectable en extracto crudo, en ninguna de las variaciones que se realizaron para el ensayo.
- No se descarta la posibilidad de que Alt2 tenga otra función. El gen tiene un marco de lectura abierto, que se transcribe y se traduce en un producto que todo indica que está completo.

PERSPECTIVAS

- Encontrar cuáles son los activadores que determinan la transcripción de *ALT1* y de *ALT2*.
- Encontrar con qué otras proteínas está asociado Nrg1 en cada promotor (proteómica del complejo).
- Analizar si *ALT1* y *ALT2* están relacionados con algún mecanismo de estrés, ya que son regulados por Nrg1.
- Ver el estado de la cromatina de *ALT1* y *ALT2* en presencia y en ausencia de alanina. También ver el estado de la cromatina de *ALT1* y *ALT2* en la mutante *nrg1Δ*
- Encontrar qué complejos remodeladores de cromatina intervienen en la regulación de estos genes.
- Medir las pozas de piruvato en diferentes puntos de la curva de crecimiento en glucosa amonio y en glucosa alanina, para ver si las fluctuaciones en este metabolito son parte del mecanismo de represión de *ALT1*, mediado por Nrg1.
- Encontrar cuál es la relación entre *ALT2* y los genes con los que forma mutantes sintéticas letales.
- Probar si Alt2 puede transaminar otros aminoácidos y otros 2-oxoácidos.
- Purificar Alt1 y caracterizarla cinéticamente.
- Identificar las vías alternas de síntesis de alanina.

REFERENCIAS

1. Garcia-Campusano, F. et al. ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* **55**, 368-74 (2009).
2. Kellis, M., Birren, B.W. & Lander, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-24 (2004).
3. Greig, D. & Leu, J.Y. Natural history of budding yeast. *Curr Biol* **19**, R886-90 (2009).
4. Schuller, H.J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**, 139-60 (2003).
5. Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. & Broach, J.R. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**, 27-81 (2008).
6. Vyas, V.K., Berkey, C.D., Miyao, T. & Carlson, M. Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 1882-91 (2005).
7. Zhou, H. & Winston, F. NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* **2**, 5 (2001).
8. Park, S.H., Koh, S.S., Chun, J.H., Hwang, H.J. & Kang, H.S. Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 2044-50 (1999).
9. Usaite, R., Patil, K.R., Grotkjaer, T., Nielsen, J. & Regenber, B. Global transcriptional and physiological responses of *Saccharomyces cerevisiae* to ammonium, L-alanine, or L-glutamine limitation. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6194-203 (2006).
10. Godard, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**, 3065-86 (2007).
11. Magasanik, B. & Kaiser, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**, 1-18 (2002).
12. Hinnebusch, A.G. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**, 407-50 (2005).
13. Wiame, J.M., Grenson, M. & Arst, H.N., Jr. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microb Physiol* **26**, 1-88 (1985).
14. Giaever, G. et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-91 (2002).
15. Nowak, M.A., Boerlijst, M.C., Cooke, J. & Smith, J.M. Evolution of genetic redundancy. *Nature* **388**, 167-71 (1997).
16. Kitano, H. Biological robustness. *Nat Rev Genet* **5**, 826-37 (2004).
17. Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle, F.J., 3rd & Doyle, J. Robustness of cellular functions. *Cell* **118**, 675-85 (2004).
18. Papp, B., Pal, C. & Hurst, L.D. Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature* **429**, 661-4 (2004).
19. Wagner, A. Robustness and evolvability: a paradox resolved. *Proc Biol Sci* **275**, 91-100 (2008).
20. Wagner, A. Gene duplications, robustness and evolutionary innovations. *Bioessays* **30**, 367-73 (2008).
21. Marland, E., Prachumwat, A., Maltsev, N., Gu, Z. & Li, W.H. Higher gene duplicabilities for metabolic proteins than for nonmetabolic proteins in yeast and *E. coli*. *J Mol Evol* **59**, 806-14 (2004).
22. Wolfe, K.H. & Shields, D.C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-13 (1997).

23. Seoighe, C. & Wolfe, K.H. Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr Opin Microbiol* **2**, 548-54 (1999).
24. Piskur, J. Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet* **17**, 302-3 (2001).
25. Conant, G.C. & Wolfe, K.H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol* **3**, 129 (2007).
26. Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. & Compagno, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the Saccharomyces complex. *FEBS J* **274**, 976-89 (2007).
27. Dujon, B. et al. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44 (2004).
28. Liti, G. & Louis, E.J. Yeast evolution and comparative genomics. *Annu Rev Microbiol* **59**, 135-53 (2005).
29. Scannell, D.R., Butler, G. & Wolfe, K.H. Yeast genome evolution--the origin of the species. *Yeast* **24**, 929-42 (2007).
30. Conant, G.C. & Wolfe, K.H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* **9**, 938-50 (2008).
31. Kimura, M. & Ota, T. On some principles governing molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 2848-52 (1974).
32. Ohno, S., Wolf, U. & Atkin, N.B. Evolution from fish to mammals by gene duplication. *Hereditas* **59**, 169-87 (1968).
33. van Hoof, A. Conserved functions of yeast genes support the duplication, degeneration and complementation model for gene duplication. *Genetics* **171**, 1455-61 (2005).
34. Hittinger, C.T. & Carroll, S.B. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* **449**, 677-81 (2007).
35. Kondrashov, F.A. & Kondrashov, A.S. Role of selection in fixation of gene duplications. *J Theor Biol* **239**, 141-51 (2006).
36. Mehta, P.K., Hale, T.I. & Christen, P. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur J Biochem* **214**, 549-61 (1993).
37. Ward, D.E., Kengen, S.W., van Der Oost, J. & de Vos, W.M. Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic Archaeon pyrococcus furiosus and its role in alanine production. *J Bacteriol* **182**, 2559-66 (2000).
38. Claros, M.G. & Vincens, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-86 (1996).
39. Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C. & Sickmann, A. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J Proteome Res* **5**, 1543-54 (2006).
40. Blank, L.M., Lehmebeck, F. & Sauer, U. Metabolic-flux and network analysis in fourteen hemiascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* **5**, 545-58 (2005).
41. Eliot, A.C. & Kirsch, J.F. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* **73**, 383-415 (2004).
42. Lain-Guelbenzu, B., Cardenas, J. & Munoz-Blanco, J. Purification and properties of L-alanine aminotransferase from Chlamydomonas reinhardtii. *Eur J Biochem* **202**, 881-7 (1991).
43. Umemura, I., Yanagiya, K., Komatsubara, S., Sato, T. & Tosa, T. Purification and some properties of alanine aminotransferase from Candida maltosa. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 283-7 (1994).
44. Ricoult, C., Echeverria, L.O., Cliquet, J.B. & Limami, A.M. Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume Medicago truncatula. *J Exp Bot* **57**, 3079-89 (2006).
45. DeRosa, G. & Swick, R.W. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem* **250**, 7961-7 (1975).

46. Srivastava, A.S. et al. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **137**, 197-207 (2004).
47. Felig, P. The glucose-alanine cycle. *Metabolism* **22**, 179-207 (1973).
48. Yang, R.Z. et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* **49**, 598-607 (2009).
49. Jadhao, S.B. et al. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* **39**, 1297-302 (2004).
50. Yang, R.Z., Blaileanu, G., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R. & Gong, D.W. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* **79**, 445-50 (2002).
51. De Rosa, G., Burk, T.L. & Swick, R.W. Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. *Biochim Biophys Acta* **567**, 116-24 (1979).
52. Muench, D.G. & Good, A.G. Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase: cDNA cloning and expression analysis. *Plant Mol Biol* **24**, 417-27 (1994).
53. Good, A.G. & Crosby, W.L. Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. *Plant Physiol* **90**, 1305-9 (1989).
54. Good, A.G. & Muench, D.G. Long-Term Anaerobic Metabolism in Root Tissue (Metabolic Products of Pyruvate Metabolism). *Plant Physiol* **101**, 1163-1168 (1993).
55. Orzechowski, S., Socha-Hanc, J. & Paszkowski, A. Alanine aminotransferase and glycine aminotransferase from maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Biochim Pol* **46**, 447-57 (1999).
56. Soberon, M. & Gonzalez, A. Glutamine degradation through the omega-amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **133**, 9-14 (1987).
57. Soberon, M., Olamendi, J., Rodriguez, L. & Gonzalez, A. Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J Gen Microbiol* **135**, 2693-7 (1989).
58. Cooper, A.J. & Gross, M. The glutamine transaminase-omega-amidase system in rat and human brain. *J Neurochem* **28**, 771-8 (1977).
59. Cooper, A.J. & Meister, A. The glutamine transaminase-omega-amidase pathway. *CRC Crit Rev Biochem* **4**, 281-303 (1977).
60. DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L. & Gonzalez, A. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* **276**, 43775-83 (2001).
61. Quezada, H. et al. Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **154**, 1656-67 (2008).
62. Colon, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS One* **6**, e16099.
63. Puig, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-29 (2001).
64. Longtine, M.S. et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61 (1998).
65. Valenzuela, L., Aranda, C. & Gonzalez, A. TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**, 2331-4 (2001).
66. Gonzalez, B., Francois, J. & Renaud, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**, 1347-55 (1997).
67. Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N. & Regev, A. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* **449**, 54-61 (2007).

68. Kohlhaw, G.B. Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 1-15, table of contents (2003).
69. Sze, J.Y., Woontner, M., Jaehning, J.A. & Kohlhaw, G.B. In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science* **258**, 1143-5 (1992).
70. Marzluf, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32 (1997).
71. Axelrod, J.D., Majors, J. & Brandriss, M.C. Proline-independent binding of PUT3 transcriptional activator protein detected by footprinting in vivo. *Mol Cell Biol* **11**, 564-7 (1991).
72. des Etages, S.A., Falvey, D.A., Reece, R.J. & Brandriss, M.C. Functional analysis of the PUT3 transcriptional activator of the proline utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**, 1069-82 (1996).
73. Dubois, E., Hiernaux, D., Grennon, M. & Wiame, J.M. Specific induction of catabolism and its relation to repression of biosynthesis in arginine metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **122**, 383-406 (1978).
74. Amar, N., Messenguy, F., El Bakkoury, M. & Dubois, E. ArgRII, a component of the ArgR-Mcm1 complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine. *Mol Cell Biol* **20**, 2087-97 (2000).
75. Qui, H.F., Dubois, E. & Messenguy, F. Dissection of the bifunctional ARGRII protein involved in the regulation of arginine anabolic and catabolic pathways. *Mol Cell Biol* **11**, 2169-79 (1991).
76. Berkey, C.D., Vyas, V.K. & Carlson, M. Nrg1 and nrg2 transcriptional repressors are differently regulated in response to carbon source. *Eukaryot Cell* **3**, 311-7 (2004).
77. Feller, A., Ramos, F., Pierard, A. & Dubois, E. In *Saccharomyces cerevisiae*, feedback inhibition of homocitrate synthase isoenzymes by lysine modulates the activation of LYS gene expression by Lys14p. *Eur J Biochem* **261**, 163-70 (1999).
78. Chen, S., Brockenbrough, J.S., Dove, J.E. & Aris, J.P. Homocitrate synthase is located in the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 10839-46 (1997).
79. Betterton, H., Fjellstedt, T., Matsuda, M., Ogur, M. & Tate, R. Localization of the homocitrate pathway. *Biochim Biophys Acta* **170**, 459-61 (1968).
80. Scott, E.M. & Pillus, L. Homocitrate synthase connects amino acid metabolism to chromatin functions through Esa1 and DNA damage. *Genes Dev* **24**, 1903-13.
81. Deutscher, D., Meilijson, I., Kupiec, M. & Ruppin, E. Multiple knockout analysis of genetic robustness in the yeast metabolic network. *Nat Genet* **38**, 993-8 (2006).
82. Tong, A.H. et al. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808-13 (2004).
83. Zhao, R. et al. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* **120**, 715-27 (2005).
84. Dekker, C. et al. The interaction network of the chaperonin CCT. *EMBO J* **27**, 1827-39 (2008).
85. Piatigorsky, J. et al. Gene sharing by delta-crystallin and argininosuccinate lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3479-83 (1988).
86. Piatigorsky, J. & Wistow, G.J. Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* **57**, 197-9 (1989).
87. Piatigorsky, J. et al. Omega -crystallin of the scallop lens. A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 enzyme-crystallin. *J Biol Chem* **275**, 41064-73 (2000).
88. Hall, D.A. et al. Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* **306**, 482-4 (2004).

