



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**HETERO-OLIGOMERIZACIÓN DE MONÓMEROS CODIFICADOS POR GENES
DUPLICADOS: LEU4 Y LEU9 UN CASO ESPECÍFICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

GEOVANI LÓPEZ ORTIZ

Tutor: **Dra. Alicia González Manjarrez.**

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular. UNAM

Miembros del comité tutor:

Dr. Mario Calcagno Montáns. Facultad de Medicina. UNAM.

Dr. Armando Gómez Puyou. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

MÉXICO, D. F. JUNIO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HETERO-OLIGOMERIZACIÓN DE MONÓMEROS CODIFICADOS POR GENES DUPLICADOS: LEU4 Y LEU9 UN CASO ESPECÍFICO

RECONOCIMIENTOS

El trabajo de esta tesis doctoral se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Tutor Principal: Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular UNAM
Dr. Mario Calcagno Montáns	Facultad de Medicina UNAM

Se reconoce la asesoría y el apoyo técnico otorgados por la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, la Q.F.B. María Concepción José Núñez y la Q.F.B. Beatriz Aguirre López, sus sugerencias fueron cruciales en el desarrollo de las metodologías generadas en este trabajo. Asimismo, se reconoce la asistencia secretarial de Rocío Romualdo a lo largo de todo este trabajo doctoral.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), donativo 152448; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo IN204412 (<http://dgapa.unam.mx>); Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, México, donativo PIFUTP08-1654 (<http://www.icyt.df.gob.mx>); International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, donativo NoCRP/MEX10-03.

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT, número de becario: 207500.

Se reconoce la ayuda del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP), por el apoyo brindado para asistir a cursos y congresos donde se presentaron los resultados de este trabajo.

El jurado de examen doctoral fue integrado por:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez (Presidente)

Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Alfredo Torres Larios

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Leonardo Peraza Reyes

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez

Departamento de Química y Ciencias
Biológicas, Universidad de las Américas
Puebla.

AGRADECIMIENTOS

“He sido un hombre que busca y aún lo sigo siendo, pero ya no busco en las estrellas y en los libros, sino en las enseñanzas de mi sangre”.

Herman Hesse

De Fernanda: agradezco su amor, su compañía en los momentos amargos y felices, porque estamos cosidos a la misma estrella, por ser mi psicóloga y también la fuente de mi locura. Por ser el único sistema planetario sin fatiga, por esperarme durante noches y noches cuando el tiempo de experimentación se prolongaba. A ti Fernanda, por ser la madre de mis hijos y mi compañera te agradezco tanto. Te amo.

De Máximo: su capacidad de olvidar lo malo y su capacidad de entretenerse y encontrarle a todas las cosas siempre el lado más divertido, porque has estado a mi lado desde mis primeros viajes a Cuernavaca y has soportado mis ausencias y la falta de ánimo para jugar mientras tenía trabajo. Te amo mucho hijito.

De Evan: su sonrisa, su ternura, sus travesuras de bebé, sus ocurrencias; el haberme despertado por las mañanas con sus manitas y por extrañarme cuando he estado en España, porque tanto tú, como tu hermano son lo mejor que me ha pasado en la vida y mi mayor fuente de motivación. Te amo mucho hijito.

De la doctora Alicia González: su entusiasmo, su generosidad, el haber llegado junto conmigo hasta el final, porque una parte importante para que este trabajo llegara a buen término fue gracias a ella. Aprecio mucho sus momentos de reflexión y toda la ayuda brindada.

De mi madre: su sencillez, su cariño, porque sin notarlo ha sido inicio, guía y también destino. Te amo tanto...

De mi hermana Ruth: su sonrisa infinita, su tiempo para todos, sus comidas, su amor incondicional y sus brazos siempre abiertos.

De mis niñas Jessica, Ximena y Fátima: su amor, sus sonrisas, su inocencia y su compañía; todas ustedes son una fuente de inspiración para mí.

De mi cuñado Rodrigo: su bondad, su humildad, porque si hay alguien a quien admiro ese eres tú.

De mis suegros Doña Mayra y Don Máximo: sus buenos pensamientos, sus palabras, su apoyo, el estar atentos y preocupados por mí y por mi vida académica.

De mi hermana Evelin: su resiliencia, porque siempre te yergues ante la adversidad y continuas caminando donde otros hubiesen perecido.

De mi hermana Rosa: sus palabras y estar al pendiente de mi transcurso a lo largo del doctorado.

De mi hermano Edwin: su fuerza, su entereza, el tratar de vivir y ser siempre firmes y dignos; te extraño tanto... espero verte en el Valhala.

De Edgar: su amistad, su pasión por la música, las tardes de piano y cerveza, a ti también te echo de menos, espero verte al igual que a mi hermano en el Valhala y volver a tocar contigo esa música proscrita.

Del doctor Gómez Puyou: su tiempo, su sencillez, su amabilidad y su inteligencia, por ser una fuente de inspiración siempre positiva.

Del doctor Mario Calcagno: su ayuda, sus consejos y sus buenas palabras.

De la doctora Irma Lira: su pasión por la ciencia y por la huella que dejó en mí, porque en tan poco tiempo transmitió cosas muy positivas en mi aprendizaje.

Nórának a segítségéért, társaságáért és türelméért. Köszönet minden közös pillanatért.

Del buen James: su amistad, su compañía, las tardes innumerables de cerveza y risas, sus consejos siempre tan pertinentes, las discusiones de ciencia en el Rey y en el Ciruelo; he disfrutado mucho tu compañía, gracias mi amigo...

Del buen Mijaíl: su amistad, las risas, los trabajos a las tres de la mañana cuando purificamos mitocondrias y proteínas, así como su ayuda incondicional; te estimo mucho *broder*.

Del buen Alan: su madurez, su pasión por los viajes, su compañía.

De Ximena: su amistad, su inteligencia, su ayuda y el siempre tener una frase de ánimo, sólo faltaron las cervezas.

De Eréndira: su ayuda tan importante, su generosidad y el interesarse siempre en Evan y en mi familia. Eres muy linda.

De Alejandra: su ayuda en los quehaceres del laboratorio, porque eres una parte importante en el funcionamiento del mismo, por las charlas a las 7 de la mañana, muchas gracias por todo.

De Dariel: sus pláticas enriquecedoras y siempre interesantes, por toda la ayuda brindada.

De Citlali: las discusiones sobre ciencia siempre tan pertinentes, así como sus consejos los cuales fueron en todo momento bien recibidos.

De José Carlos: su ayuda y su buen ánimo, sin duda tu carácter hacia llevadera la estancia en el laboratorio.

De Guadalupe: los dulces y las pláticas, es una lástima que no hayamos coincidido por más tiempo en el lab.

De Aranzazú: sus préstamos de reactivos, el escucharme, el ser una buena compañera en el lab.

De Cristina: su buen carácter, la ayuda brindada a lo largo de todo este tiempo, las pláticas nocturnas y los préstamos recurrentes.

De Cynthia: su amistad y su cariño, por estar al final de este viaje.

De Diana: su gentileza, su buen carácter, sus pláticas, por ser y estar.

De todos mis alumnos: su comprensión, su buen talante cuando necesite su apoyo y por enriquecerme tanto como persona.

De Stefy y Alfred: su buen carácter, me hubiese gustado conocerlos más.

De Yasmeen: sus buenos deseos y sus pláticas, gracias por tu amistad.

De mis ex compañeros Hugo, Maritrini, Luis, Jorge y Florencia: su amistad, su apoyo y todos los momentos que tanto disfrutamos, como diría Aute, queda la música...

A mi hermana Chelo que está en España: por tu cariño que es recíproco, por los atardeceres en Mairena, los tintos en el Guadalquivir y las cervezas en Sevilla, por integrarme a tu familia. A todos ellos por ser tan majos conmigo los llevo presente en mis pensamientos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
ABREVIATURAS USADAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
3. OBJETIVO.....	25
3.1. Objetivos particulares.....	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSIONES.....	58
7. CONCLUSIONES.....	61
8. PERSPECTIVAS.....	63
9. REFERENCIAS.....	65
10. ANEXO 1A.....	71
11. ANEXO 1B.....	75
12. PUBLICACIONES.....	76

RESUMEN

Después de la secuenciación del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se concluyó que existe una gran cantidad de genes duplicados. La importancia fisiológica, bioquímica y evolutiva de dicha duplicación se discute en la actualidad.

El objetivo de este trabajo se centró en determinar la existencia de interacciones entre proteínas parálogas, así como su impacto en la levadura *S. cerevisiae*. Después de un análisis que involucró diferentes enzimas parálogas, se eligieron las α -isopropilmalato sintasas (α -IPMS) Leu4 y Leu9. Ambas isoenzimas intervienen en el primer paso de la biosíntesis de leucina y catalizan la conversión de α -cetoisovalerato a α -isopropilmalato.

Se estableció que la diversificación funcional de Leu4 y Leu9 ha seguido rutas diferentes. Tales diferencias están asociadas a su regulación génica, sus efectos sobre la velocidad de crecimiento, las concentraciones intracelulares de leucina cuando se generaron mutantes y a la concentración relativa de las isoenzimas en un contexto metabólico determinado (fermentación vs respiración). Asimismo, se determinó que ambas α -IPMS han diversificado también en su inhibición por leucina. En este estudio se demuestra la existencia de una tercera isoenzima constituida por la asociación heterodimérica Leu4-Leu9, la cual presenta una inhibición por leucina distinta a la observada en los homodímeros Leu4 y Leu9. A partir de los datos obtenidos, se concluye que la diversificación de las α -IPMS ha generado un sistema eficiente de regulación que controla la biosíntesis de leucina, a través de la producción del α -isopropilmalato y la formación de complejos homo y heterodiméricos, los cuales presentan perfiles diferenciales de inhibición por retroalimentación.

Se propone que la formación de enzimas hetero-oligoméricas codificadas por genes parálogos, tiene una repercusión evolutiva, bioquímica y fisiológica. Todos estos factores constituyen mecanismos moleculares que influyen en la retención de genes duplicados.

ABSTRACT

After sequencing the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* it was concluded that there are a large numbers of duplicated genes. The physiological, biochemical and evolutionary importance of such duplication is still being discussed.

The aim of this study was to determine the existence of interactions between paralogous proteins as well as their impact on the yeast *S. cerevisiae*. After analyzing different paralogous enzymes, the α -isopropylmalate synthases (α -IPMS) Leu9 and Leu4 were chosen. Both isoenzymes are involved in the first step in the biosynthesis of leucine and catalyze the conversion of α -ketoisovalerate into α -isopropylmalate.

In this present work it was established that the functional diversification of Leu4 and Leu9 has followed different routes giving raise to differences in their gene regulation, its effects on the growth rate, intracellular concentrations of leucine in mutants generated and the relative concentration of isoenzymes in a given metabolic context (i.e. fermentation vs respiration). Also, it was determined that both α -IPMS are different in their inhibition by leucine. We also showed the existence of a heterodimeric isoenzyme Leu4-Leu9 which has a distinct inhibition by leucine when compared to Leu9 or Leu4 homodimers. From the data obtained it is concluded that the diversification of α -IPMS has generated an efficient regulatory system that controls the biosynthesis of leucine, through the production of α -isopropylmalate and the formation of homo and heterodimeric complexes with differential feedback inhibition profiles.

Based on these results we proposed that the formation of hetero-oligomeric enzymes encoded by paralogous genes have an evolutionary, biochemical and physiological significance; all these factors constitute molecular mechanisms involved in the retention of duplicated genes.

Abreviaturas Usadas

ACS1	Gen que codifica para la enzima acetil-CoA sintetasa Acs1
ACS2	Gen que codifica para la enzima acetil-CoA sintetasa Acs2
BAT1	Gen que codifica para la enzima aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada Bat1
ALD4	Gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa Ald4
ALD6	Gen que codifica para la enzima aldehído deshidrogenasa Ald6
ENO1	Gen que codifica para la enzima enolasa Eno1
ENO2	Gen que codifica para la enzima enolasa Eno2
GDH1	Gen que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa Gdh1
GDH3	Gen que codifica para la enzima glutamato deshidrogenasa Gdh3
HXK1	Gen que codifica para la enzima hexocinasa Hxk1
HXK2	Gen que codifica para la enzima hexocinasa Hxk2
LEU4	Gen que codifica para la enzima α -isopropilmalato sintasa Leu4
LEU9	Gen que codifica para la enzima α -isopropilmalato sintasa Leu9
LYS20	Gen que codifica para la enzima homocitrato sintasa Lys20
LYS21	Gen que codifica para la enzima homocitrato sintasa Lys21
PYC1	Gen que codifica para la enzima piruvato carboxilasa Pyc1
PYC2	Gen que codifica para la enzima piruvato carboxilasa Pyc2
PYK1	Gen que codifica para la enzima piruvato cinasa Pyk1
PYK2	Gen que codifica para la enzima piruvato cinasa Pyk2
TDH1	Gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa Tdh1
TDH2	Gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa Tdh2
TDH3	Gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa Tdh3
URA7	Gen que codifica para la enzima citidina 5'-trifosfato sintetasa Ura7
URA8	Gen que codifica para la enzima citidina 5'-trifosfato sintetasa Ura8
Ac-CoA	Acetil coenzima A.
α-KIV	α -Cetoisovalerato sustrato de las α -IPMS.
α-IPMS	α -isopropilmalato sintasa(s), hace referencia a ambas isoenzimas Leu4 y Leu9 o a cada una por separado.

α-IPM	α -isopropilmalato, producto de la reacción catalizada por las α -IPMS, intermediario en la biosíntesis de leucina y coactivador de Leu3.
BiFC	Análisis de complementación de fragmentos fluorescentes. (<u>B</u> imolecular <u>F</u> luorescence <u>C</u> omplementation).
DIC	Contraste de interferencia diferencial (<u>D</u> ifferential <u>I</u> nterference <u>C</u> ontrast).
<i>ENO2pr</i>	Promotor <i>ENO2</i> .
<i>ENO1pr</i>	Promotor <i>ENO1</i> .
GFP	Proteína verde fluorescente.
IC₅₀	Concentración media máxima inhibitoria.
Leu3	Regulador transcripcional involucrado en la biosíntesis de leucina y el periodo de vida en <i>S. cerevisiae</i> .
<i>leu4</i>Δ	Mutante con una deleción en el gen <i>LEU4</i> .
<i>leu9</i>Δ	Mutante con una deleción en el gen <i>LEU9</i> .
<i>leu4</i>Δ <i>leu9</i>Δ	Doble mutante con deleciones en los genes <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> .
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction).
yN	Fragmento que corresponde a los primeros 155 aminoácidos de la yECitrine.
yC	Fragmento que corresponde del aminoácido 155 al 238 de la yECitrine.
YPD	Medio rico de crecimiento para levadura (<u>Y</u> east extract, <u>P</u> eptone, <u>D</u> extrose).
YPGal	Medio de crecimiento para levadura (<u>Y</u> east extract, <u>P</u> eptone, <u>G</u> alactose).

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.	Procesos posteriores a la duplicación de genes.....15
Figura 2.	Importancia de la duplicación génica en el surgimiento de vías metabólicas.....17
Figura 3.	Alineamiento de secuencias de las α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9.....21
Figura 4.	Compartimentalización de enzimas involucradas en la biosíntesis de leucina.....22
Figura 5.	Principio de análisis de BiFC.....23
Figura 6.	Estrategia para marcar proteínas por el extremo carboxilo con yECitrine.....29
Figura 7.	Estrategia experimental para determinar interacciones mediante BiFC.....30
Figura 8.	Construcción de módulos y cepas para validar interacciones mediante BiFC.....31
Figura 9.	Localización subcelular de proteínas parálogas analizadas en este estudio.....39
Figura 10.	Validación del análisis de BiFC.....41
Figura 11.	Detección de interacciones entre proteínas analizadas en este estudio.....42
Figura 12.	Curvas de crecimiento de las mutantes <i>leu4Δ</i> , <i>leu9Δ</i> y <i>leu4Δ leu9Δ</i>45
Figura 13.	Determinaciones de pozas intracelulares de leucina.....46
Figura 14.	Análisis de northern blot y actividad específica en las α -IPMS.....47
Figura 15.	Análisis de citometría de flujo en cepas etiquetadas con yECitrine.....48
Figura 16.	Localización de Leu4 y Leu9, análisis de interacción por BiFC.....49
Figura 17.	Citometría de flujo en las α -IPMS etiquetadas con las mitades yN y yC.....50
Figura 18.	Análisis de northern blot y actividad específica de α -IPMS con <i>ENO2pr</i>51
Figura 19.	Análisis de densitometría en geles de SDS-PAGE.....52
Figura 20.	Curva de calibración para determinar la masa molecular de las α -IPMS.....52
Figura 21.	Separación de las distintas α -IPMS mediante gel nativo de agarosa.....53
Figura 22.	Análisis de IC ₅₀54
Figura 23.	Curvas de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustratos.....55
Figura 24.	Curvas de saturación a diferentes concentraciones de leucina.....56

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas usadas en este estudio.....	26
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.....	27
Tabla 3. Localización subcelular y características de proteínas parálogas analizadas.....	40
Tabla 4. Purificación de las α -isopropilmalato sintasas.....	51
Tabla 5. Parámetros cinéticos de Leu4, Leu9 y del heterodímero Leu4-Leu9.....	57

1. INTRODUCCIÓN

Contexto histórico

Charles Darwin propuso en *Sobre el origen de las especies* que la variabilidad era la materia prima de la evolución. Sin embargo, no desestimó que la modificación de ciertos órganos a través del tiempo tuviera su génesis sobre *elementos primordiales muchas veces repetidos*, los cuales cambiarían continuamente hasta constituir nuevos órganos y sistemas (Darwin, 1859). Esta primera aproximación sobre la multiplicidad de estructuras divergiendo a través del tiempo, sirvió de precedente en la concepción de la duplicación génica. Hacia 1918, Calvin postula que pueden existir diversos elementos redundantes en los cromosomas, los cuales a su vez podrían mutar y realizar funciones distintas de las que alguna vez llevaron. Los experimentos de Müller (1935) al insertar parte del cromosoma X en el cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster*, mostraron que estos organismos podían continuar vivos después de adquirir elementos repetidos y lo que es más, postularon -al igual que Calvin- que algo similar podía pasar naturalmente y que ese evento de duplicación generaría a la postre genes que en la actualidad serían considerados no homólogos, aun cuando provinieran del mismo ancestro.

Después de 1953, tras el descubrimiento de Watson y Crick de la estructura del DNA, se confirmaron plenamente los postulados evolutivos de un origen común para todos los seres vivientes. La caracterización estructural del DNA abrió una ventana en las investigaciones filogenéticas de las especies, lo cual llevó a contextualizar la evolución en términos moleculares y genéticos. Con esto se concluyó que los procesos evolutivos no se restringían únicamente a las especies en cuanto a características fenotípicas, sino que abarcaban los diferentes planos de organización estructural en los organismos; de tal forma que órganos, tejidos, genes y proteínas se modifican a lo largo del tiempo. Esto ha sido un factor importante para explicar los cambios macroevolutivos en términos de pasos microevolutivos.

La duplicación de genes como determinante en la evolución molecular

En 1965 se propuso que enzimas relacionadas respecto a su catálisis o rutas metabólicas podían estar emparentadas filogenéticamente y por consiguiente pudieron haber evolucionado a partir de proteínas ancestrales (Zuckerandl & Pauling, 1965). Dicha hipótesis adquirió una gran relevancia y posteriormente se convirtió en una herramienta imprescindible en los análisis filogenéticos (Woese, 1987). En 1965 Horowitz amplía su teoría de la evolución retrógrada (1945) y manifiesta que las enzimas pueden evolucionar después de la duplicación genética por

retención de su especificidad al sustrato y modificación de sus capacidades catalíticas. Las diversas posturas sobre la duplicación de genes y su importancia en la evolución molecular encontraron eco en los trabajos de Ohno (1970), según los cuales, la duplicación genética es el mecanismo principal en la innovación de genes y de funciones asociadas a sus productos.

La preponderancia de la duplicación de genes, a pesar de haber sido concebida hace más de 50 años, adquirió mayor relevancia una vez que existieron metodologías moleculares que permitieron la caracterización específica de los distintos tipos de duplicación, entre los que destacan: duplicación de genes parcial o interna; duplicación completa de genes; duplicación cromosomal parcial; aneuploidía o duplicación cromosomal y finalmente poliploidía o duplicación total del genoma (Li & Graur, 1991). Los trabajos de Ohno (1970) sobre este aspecto en particular, fueron preponderantes; a saber, tras la duplicación de genes, mientras una copia continua realizando su misma función, la otra puede modificarse mediante mutaciones para “asignar” una función diferente al producto que sintetiza; lo cual puede conferir una ventaja selectiva para el organismo, evidenciando con ello que la evolución actúa sobre estructuras preexistentes. Ejemplos como los de la mioglobina y la hemoglobina, así como la historia molecular del citocromo C, ilustran procesos exitosos de divergencia por duplicación de genes (Ohno, 1999).

Duplicación de genes y evolución de nuevas funciones

Entre los procesos posteriores a la duplicación génica pueden llegar a presentarse los siguientes escenarios:

Pseudogenización: ocurre cuando una de las copias del gen duplicado acumula mutaciones sobre su región regulatoria y/o codificante y por consiguiente no hay un producto de síntesis, es decir, una de las copias se pierde por completo.

Subfuncionalización: ambos genes resultan ser necesarios para llevar a cabo la función original, a pesar de que han acumulado mutaciones, ya sea en su región codificante y/o regulatoria, o simplemente su patrón de expresión es diferencial y dependerá del contexto metabólico en el cual se encuentra el organismo en cuestión (Lynch & Force, 2000., DeLuna *et al.*, 2001., Contreras-Shannon *et al.*, 2005).

Duplicación por dosis génica: después de que un organismo haya presentado una aneuploidía o poliploidía, la carga metabólica hacia la síntesis de elementos tiene que repartirse

entre las nuevas copias como un efecto amortiguador a dicho aumento de genes. Es decir, el excedente de un producto resulta ser una ventaja, tal y como sucede con los diferentes tipos de RNAr (Thomas, 1993., Wolfe & Shields, 1997).

Neofuncionalización: se presenta cuando un gen duplicado cambia lo suficiente como para que su producto de síntesis adquiera una nueva función al tener propiedades catalíticas y estructurales diferentes a las establecidos por un primer homólogo (Ohno, 1970., Kimura & Ohta, 1974). Sobre este último punto es importante resaltar que existen pocos ejemplos de neofuncionalización, posiblemente debido al hecho de que las secuencias de los genes duplicados se hayan modificado de tal forma que el análisis filogenético resultaría prácticamente imposible.

Conforme ha pasado el tiempo, ha aumentado el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la duplicación génica, han surgido nuevos escenarios cuya finalidad es ilustrar todos aquellos procesos posteriores a dicha duplicación. Moore y Purugganan (2005) han contrastado las visiones actuales con aquellas que existían en la década de los setentas y han encontrado que con el avance de nuevas metodologías y estudios bioquímicos, moleculares y evolutivos, surgen escenarios más complejos relacionados con el destino de los genes duplicados (Figura 1).

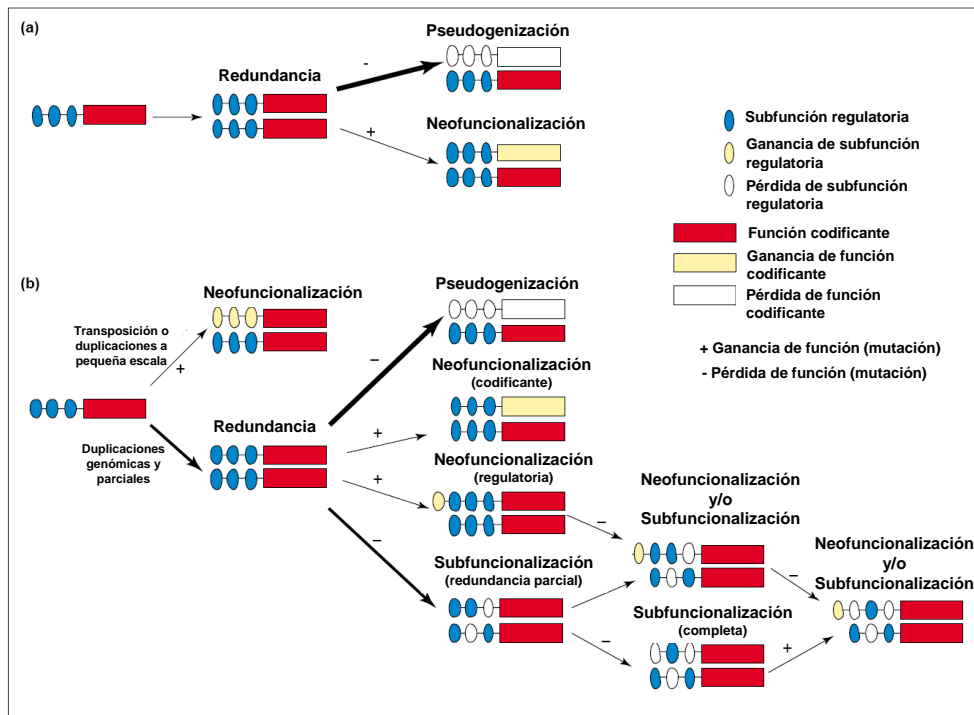


Figura 1. Pro(a) Classic Ohno model of duplicate gene fates. Mechanisms of duplication and fates of genes are indicated. Thickness of arrows indicate relative frequency of possible fates. (b) Recent theoretical work supports a much more complex model for the fates of duplicate genes.

a década de

***Saccharomyces cerevisiae*: vida con 6 mil genes**

En la actualidad, existe una gran cantidad de evidencias que muestran que la existencia de genes duplicados es una característica de la mayoría de especies con genomas hasta ahora secuenciados (Zhang, 2003; Kafri, 2006). Después de la secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, se concluyó que existe una gran cantidad de elementos repetidos sobre su genoma, el cual está compuesto por 12,068 kilobases; la cantidad de genes que potencialmente codifican para diversas proteínas asciende a casi 6000 (Goffeau *et al.*, 1996). Análisis posteriores llevaron a considerar que la cantidad de genes duplicados en *S. cerevisiae* difícilmente podía atribuirse a innumerables procesos de duplicación, de tal forma, la explicación más plausible para esa interrogante era considerar que había pasado por una duplicación total de su genoma; Wolfe y Shields (1997), analizando regiones duplicadas en esta levadura, encontraron que existe un 16% de genes duplicados en su genoma y que provienen de esta duplicación total ocurrida 100 millones de años atrás. La importancia fisiológica, bioquímica y evolutiva de dicha duplicación y la posterior pérdida selectiva de genes sugiere una adaptación de *S. cerevisiae* para sobrevivir en condiciones respiratorias y fermentativas, lo que implicaría también, que determinados genes son regulados dependiendo de la fuente de carbono y de las condiciones respiratorias (Piskur, 2001; DeLuna *et al.*, 2001).

El impacto en la duplicación de genes en la evolución de vías metabólicas

Los estudios evolutivos se basan en similitudes y diferencias en los diferentes planos de organización celular y taxonómica, bajo esta premisa, es posible realizar una serie de análisis comparativos a nivel molecular, que sirvan de evidencia para explicar el origen y la evolución de las vías metabólicas (Cunchillos & Lecointre, 2003). En la actualidad, existen dos modelos que plantean cómo surgieron y evolucionaron las vías metabólicas: el primero de ellos fue visualizado en 1945 por Horowitz y se le denominó modelo de “stepwise” o de evolución retrógrada, el cual establece que en una serie de pasos sucesivos que dan como resultado un producto final (i.e. aminoácidos), la última enzima de la vía fue la primera en surgir, mientras que la segunda en aparecer es la penúltima vía y así sucesivamente.

Según Horowitz, los metabolitos intermediarios de las diferentes rutas se encontraban presentes en la denominada tierra primitiva. En este primer escenario, después de una

duplicación génica, la enzima paróloga se modificaría y realizaría la catálisis previa al sentido de la reacción (Figura 2A).

En 1976, Jensen propuso el modelo del mosaicismo (Patchwork), según el cual, células ancestrales, al poseer concentraciones pequeñas de genes, poseían cantidades limitadas de enzimas. Para contrarrestar el efecto -de una disposición limitada de enzimas-, enzimas “primitivas” debieron de poseer una amplia especificidad en la captación de sustratos.

Para Jensen, la presencia de metabolitos ofreció a las células ancestrales una gran flexibilidad bioquímica con un contenido mínimo de genes. Estas enzimas tenían una gran capacidad de catalizar reacciones químicas similares en diferentes vías metabólicas. Tras una duplicación génica, las enzimas parálogas se especializarían por diferentes sustratos, permitiendo con ello, ampliar el repertorio de enzimas tras la duplicación (Figura 2B).

En síntesis, Jensen, al igual que Horowitz, pone de manifiesto la importancia de la duplicación de genes y asegura que basta una nueva enzima -producto de una duplicación- para que a la postre pueda instaurarse una nueva vía metabólica (Jensen, 1976). Un ejemplo que ilustra el segundo punto asociado con la oligomerización se centra en los barriles ($\beta\alpha$)₈. Debido a su capacidad catalítica, estos han sido un tema importante en los estudios evolutivos actuales (Höcker, 2005); algunos de ellos sugieren que su origen fue a través de eventos de duplicación genética (Höcker *et al.*, 2004), los cuales determinaron a lo largo del tiempo, la diversificación y especificidad de sustrato características de cada enzima (Lang *et al.*, 2000).

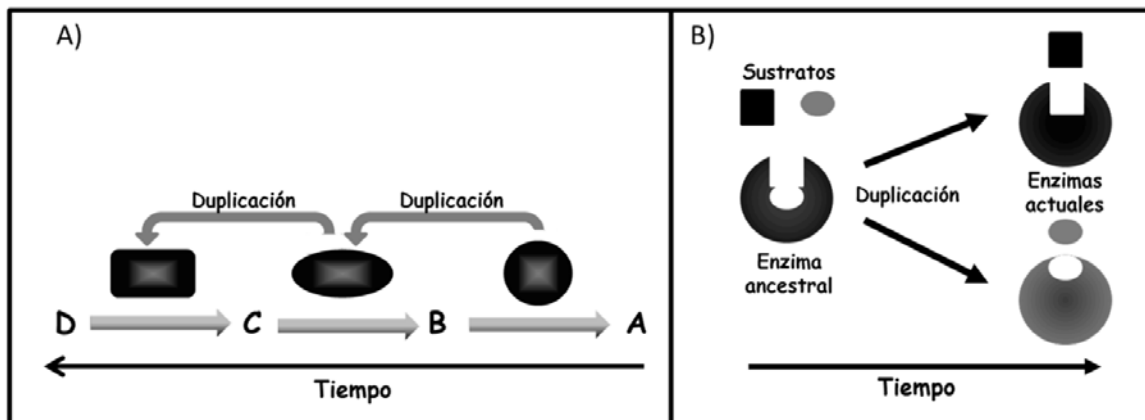


Figura 2. Importancia de la duplicación génica en el surgimiento de vías metabólicas. **A.** Hipótesis de Horowitz de evolución retrograda, tras continuas duplicaciones se instaura toda una vía metabólica cuyo surgimiento va en orden inverso a su producto final. **B.** Hipótesis del mosaicismo de Jensen donde enzimas con amplia especificidad a sustratos, tras una duplicación se especializan en sólo uno de ellos, de tal forma que se amplía el repertorio de enzimas las cuales a su vez pueden crear toda una vía metabólica (Tomado de López *et al.*, 2011).

Interacciones homoméricas y heteroméricas entre productos de genes parálogos: su papel como una fuente de versatilidad funcional

Un aspecto trascendental relacionado con la organización de proteínas oligoméricas lo constituye el estudio de la transición de estructuras homoméricas a heteroméricas y el análisis de esta transición en el surgimiento de nuevas funciones. Dicha versatilidad funcional puede implicar una mayor estabilidad de los complejos, la adquisición de propiedades cinéticas diferentes o modificaciones en las redes de interacción con otras proteínas (Andreeva & Murzin, 2006). En este sentido, el estudio de la organización oligomérica de los productos de genes parálogos representa un modelo único, ya que en estos casos podrían coexistir las formas homoméricas y heteroméricas. En principio, el heterómero no resultaría ventajoso sobre el homómero, a menos que el primero hubiese adquirido propiedades funcionales específicas en comparación al segundo. Un estudio ilustrativo sobre este aspecto, se llevó a cabo usando como modelo a la chaperona CCT de arqueas; Archibald y colaboradores propusieron que las CCT ancestrales funcionaban como homómeros, sin embargo, tras una duplicación génica que ocurrió en algún momento de la evolución de estos genes, seguida por la fijación de mutaciones deletéreas en una de las subunidades de CCT, dieron como resultado una disminución de la estabilidad de los homo-oligómeros, favoreciendo la fijación de estructuras heteroméricas (Archibald *et al.*, 2001). Como resultado de este proceso, las CCT de las arqueas quedaron estructuradas como heterómeros. El trabajo llevado a cabo con arqueas y eucariontes indica que la adquisición de mutaciones en cada uno de los miembros de los genes duplicados puede resultar en la división de funciones o especialización a condiciones metabólicas diferentes (subfuncionalización) a través de la organización en formas hetero-oligoméricas (DeLuna *et al.*, 2001., Quezada *et al.*, 2008).

La formación de hetero-oligómeros permite también una conformación de proteínas en las que la capacidad catalítica y la regulatoria residen en monómeros diferentes. La isocitrato deshidrogenasa mitocondrial de *S. cerevisiae* está constituida por un octámero con dos tipos de subunidades que comparten un 42% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Las subunidades codificadas por *IDH2* constituyen el dominio catalítico, en tanto que las codificadas por *IDH1* constituyen el dominio regulatorio (Keys & McAlister-Henn, 1990).

Nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de caracterizar y estudiar diferentes proteínas parálogas en la levadura *S. cerevisiae*, entre las que destacan las glutamato

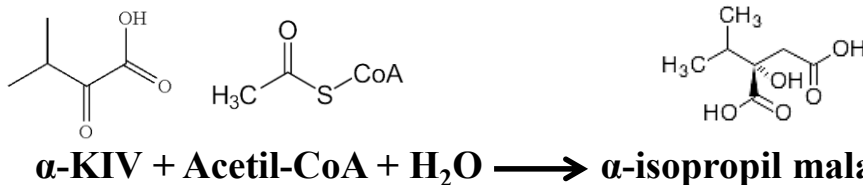
deshidrogenasas dependientes de NADP^+ , Gdh1 y Gdh3, así como las homocitrato sintasas Lys20 y Lys21. Se ha propuesto que, para estas enzimas, la hetero-oligomerización ha sido clave en su diversificación y retención.

Gdh1 y Gdh3 poseen un 87% de identidad de aminoácidos, estas enzimas sintetizan glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato; el glutamato es un metabolito esencial en la biosíntesis de aminoácidos, así como de purinas y pirimidinas. Ambas enzimas hexaméricas difieren en cuanto a su cinética, su regulación alostérica y su afinidad por los sustratos (DeLuna *et al.*, 2001); experimentos previos señalan que la expresión de *GDH1* es constitutiva, mientras que *GDH3* llega a tener una expresión importante en condiciones respiratorias. Análisis de geles nativos con proteínas purificadas en condiciones respiratorias, mostraron que existe una conformación de hexámeros híbridos entre Gdh1 y Gdh3. La importancia de esta hetero-oligomerización podría estar asociada a un consumo diferencial del α -cetoglutarato. Gdh1 tiene una mayor afinidad por este sustrato y es la única isoforma durante el metabolismo fermentativo, sin embargo, durante la respiración hay una mayor demanda de α -cetoglutarato hacia otra vías, tales como el ciclo de los ácidos tricarbónicos, el cual se encuentra funcionando sólo de manera parcial durante la fermentación. Es justo durante la respiración que la asociación entre Gdh1 y Gdh3 se hace patente; Gdh3 tiene una menor afinidad por el α -cetoglutarato y regula de manera negativa a Gdh1 (DeLuna *et al.*, 2001). De tal forma, los hexámeros híbridos pueden regular el consumo de este metabolito para que pueda ser utilizado durante la síntesis de otros compuestos bajo condiciones de una mayor demanda del mismo.

Las homocitrato sintasas Lys20 y Lys21 presentan un 88% de identidad en nucleótidos y 92% en aminoácidos. Intervienen en el primer paso de la biosíntesis de lisina y presentan una regulación alostérica diferencial por lisina $-I_{0.5}$ de 1mM para Lys20 y 0.15mM para Lys21 (Feller *et al.*, 1999). Se ha sugerido que existe la formación de hetero-oligómeros entre Lys20 y Lys21. Esta propuesta se apoya en las siguientes observaciones: a) La proteína Lys20 se degrada más rápido en ausencia de Lys21. b) La proteína Lys21 es insuficiente para producir niveles silvestres de lisina, por lo que se ha postulado que Lys21 protege de la degradación a Lys20 y este mismo heterocomplejo favorece una tasa de producción óptima de homocitrato y por ende de lisina, en condiciones fermento-respiratorias, justo donde los sustratos son más abundantes que durante el metabolismo respiratorio (Quezada *et al.*, 2008).

Leu4 y Leu9: un caso específico

Los genes parálogos *LEU4* y *LEU9* codifican para las enzimas mitocondriales α -isopropilmalato sintasa (α -IPMS) Leu4 y Leu9 respectivamente. Comparten un 83% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos e intervienen en el primer paso dentro de la biosíntesis de leucina (Figuras 3 y 4). Ambas catalizan la conversión de α -cetoisovalerato (α -KIV) a α -isopropilmalato (α -KIV) (Chang *et al.*, 1984). Se ha postulado que Leu4 y Leu9 provienen de la duplicación total del genoma que dio lugar al linaje de *S. cerevisiae* y que probablemente influyó de manera importante en la adaptación de esta levadura al metabolismo facultativo (Wolfe & Shields, 1997., Byrne & Wolfe., 2005., Piskur *et al.*, 2006). De ambas enzimas, la más estudiada es Leu4, de la cual se conocen sus parámetros cinéticos y su estado oligomérico que corresponde a un dímero (Tracy & Kohlhaw, 1977). De la isoforma Leu9 sólo se sabe que su retroinhibición por leucina es menor en comparación con Leu4; asimismo, el papel de Leu9 en la biosíntesis de leucina sólo se hace patente en mutantes *leu4* Δ (Chang *et al.*, 1985).



Reacción catalizada por las α -IPMS Leu4 y Leu9.

Como se mencionó previamente, la localización subcelular de ambas enzimas es mitocondrial; sin embargo, Leu4 presenta una isoforma citosólica cuyos niveles oscilan entre el 10% y 20% del total de la concentración de esta enzima (Beltzer *et al.*, 1988). Cepas con deleciones en ambos genes son auxótrofas de leucina, mientras que mutantes sencillas de *leu4* Δ y *leu9* Δ son capaces de crecer en ausencia de este aminoácido, por lo que se presume un papel redundante de ambas isoformas.

Leu4 es la isoforma predominante en glucosa como fuente de carbono (Casalone *et al.*, 2000) y se ha establecido que lleva a cabo el 80% de la actividad de isopropilmalato sintasa en cepas silvestres, mientras que Leu9 contribuye con el 20% restante (Chang *et al.*, 1985). La interrogante de si Leu9 aporta ese pequeño porcentaje debido a la concentración de la misma o algún factor intrínseco de la enzima sigue abierta. Asimismo, se desconocen los cambios en la concentración de estas enzimas dependiendo de su contexto metabólico. Los estudios sobre una posible interacción entre estas proteínas parálogas –teniendo como antecedente a las glutamato

deshidrogenasas y las homocitrato sintasas- resultan ser muy relevantes, ya que las diferencias en puntos isoeléctricos (5.8 y 6.7 para Leu4 y Leu9, respectivamente) y su estado oligomérico, las convierten en una pareja ideal para determinar las características cinéticas de los presuntos complejos diméricos que las conforman, esto es, asociaciones de Leu4-Leu4, Leu9-Leu9 y un posible heterodímero Leu4-Leu9.

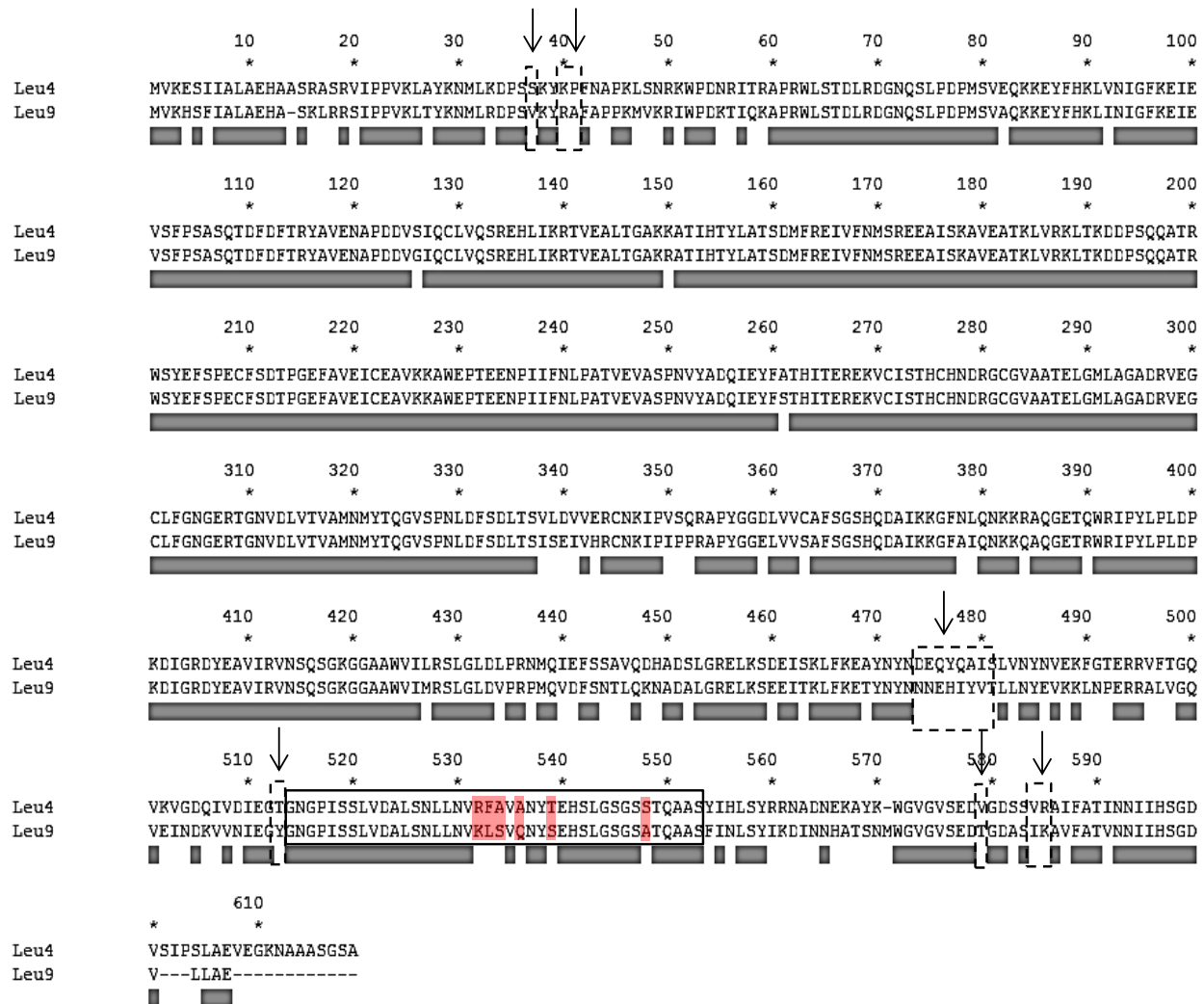


Figura 3. Alineamiento de secuencias de las α -isopropilalato sintasas Leu4 y Leu9. Ambas enzimas muestran un alto grado de identidad en aminoácidos (83%). El recuadro limita una zona denominada región regulatoria, ésta se encuentra asociada a la inhibición por leucina. Los recuadros punteados con la flechas en la parte superior indican las regiones de la interface donde se presenta diferencias entre ambas proteínas.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido –por su facilidad para la manipulación en el laboratorio y su importancia biotecnológica- uno de los eucariontes más ampliamente estudiados. Después de la secuenciación de su genoma, se estableció la posibilidad de realizar toda una serie de

investigaciones a nivel global sobre sus perfiles de RNAm (Lashkari *et al.*, 1997), niveles de expresión y localización de las proteínas dentro de la topología de la célula (Ghaemmaghami *et al.*, 2003, Huh *et al.*, 2003), así como su interactoma (Gavin *et al.*, 2002., Krogan *et al.*, 2006). Este último punto ha permitido profundizar aún más en el entendimiento de las redes de interacción proteína-proteína en la levadura. Sin embargo y pese a los diferentes mapas generados hasta ahora, los estudios de interacción entre proteínas parálogas han sido poco vislumbrados, lo cual puede deberse a dos factores importantes: 1) las metodologías empleadas para abordar el estudio de interacciones; 2) muchas de estas proteínas presentan una expresión diferencial respecto a su paróloga, es decir, existen proteínas cuya expresión es constitutiva, mientras que la expresión de la otra paróloga sólo puede manifestarse bajo ciertas condiciones de estrés o diversos tipos de metabolismo -e.g. fermentativo vs respiratorio-, diversas fuentes de glucosa, etc. Un ejemplo de ello es la coexistencia de las enzimas Gdh1 y Gdh3 que se suscita únicamente durante el metabolismo respiratorio (DeLuna *et al.*, 2001).

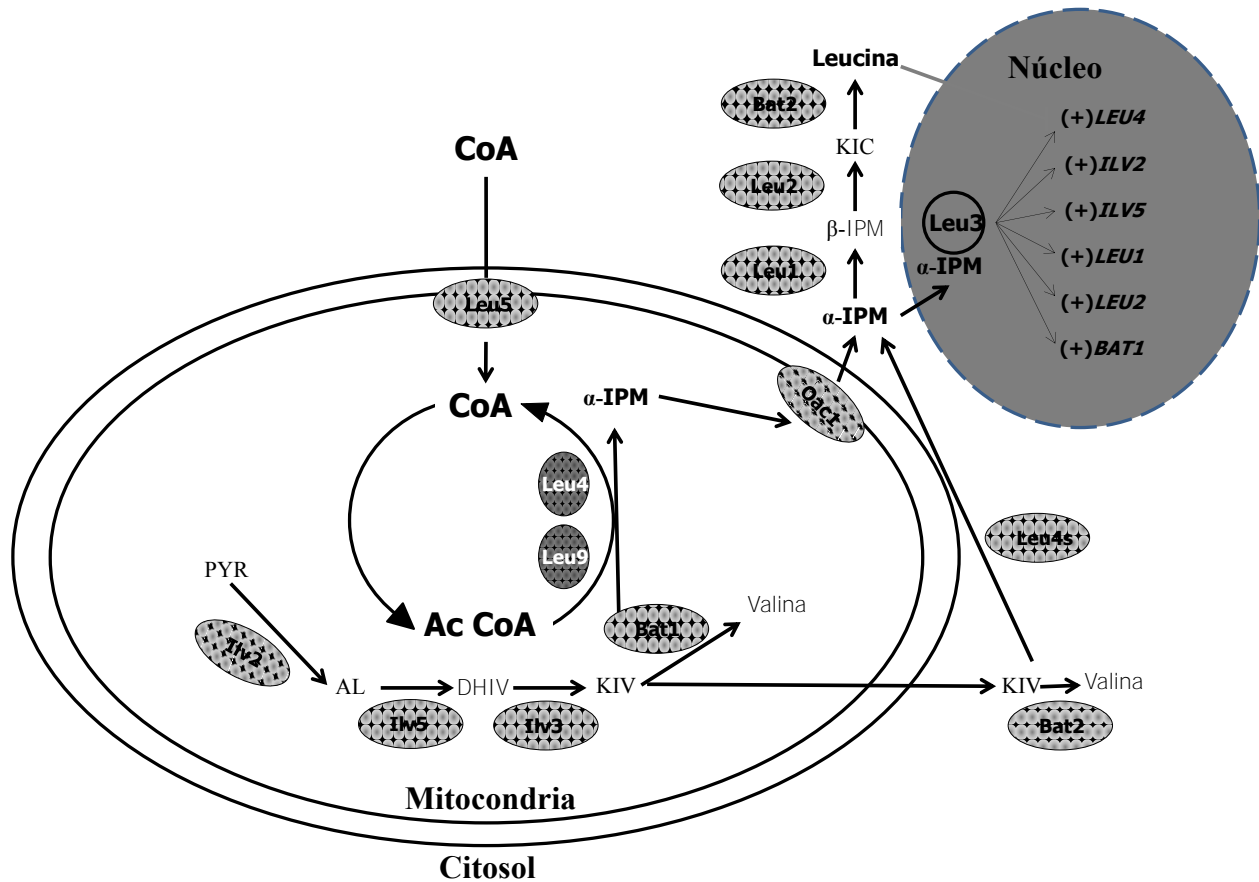


Figura 4. Esquema que ilustra la compartimentalización de las enzimas involucradas en la biosíntesis de leucina, las α -IPMS Leu4 y Leu9 se muestran enmarcadas con líneas punteadas.

Determinación de interacciones proteína-proteína mediante el uso de microscopía

Una de las técnicas más comunes para detectar interacciones entre proteínas, lípidos y enzimas es a través de la fluorescencia por transferencia de energía, mejor conocida como FRET por sus siglas en inglés (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Esta técnica consiste en la utilización de un fluoróforo que actúe como donador (e.g. Cyan Fluorescent Protein o CFP) y otro que actúe como aceptor (e.g. Yellow Fluorescent Protein o YFP). Si la banda de emisión del donador se traslapa con la banda de absorción del aceptor y si están suficientemente cerca uno del otro, se produce una transferencia de energía que va del aceptor al donador. El aumento de la emisión del aceptor después de que el donador ha sido excitado se conoce como FRET (Stryer, 1987., Selvin, 1995). Debido a que el margen de medición de FRET es comparable al de una gran cantidad de moléculas biológicas ($\approx 10\text{nm}$), su utilización para determinar interacciones moleculares en el interior de células se ha convertido en una herramienta imprescindible (Miyawaki, 2003., Takanishi *et al.*, 2006., Szczesna-Skorupa *et al.*, 2003).

Otra de las técnicas utilizadas para determinar la interacción entre diferentes proteínas es mediante fusiones de mitades de la secuencia génica de la proteína Verde Fluorescente o GFP (Green Fluorescent Protein) y sus derivadas a proteínas o enzimas que presuntamente están interaccionando. La mitad amino de la GFP que corresponde a los primeros 173 aminoácidos se fusiona a la proteína A, mientras que la mitad carboxilo que abarca del aminoácido 173 al 238 se fusiona a la proteína B; si existe una interacción entre A y B, los fragmentos amino y carboxilo de la GFP se asocian y emiten una señal de fluorescencia. Para tal efecto, las distancias de interacción no pueden ser mayores a 10nm; esta metodología recibe el nombre de BiFC, del inglés Bimolecular Fluorescence Complementation (Figura 5. Kerppola, 2006^a., Kerppola, 2006^b., Sung & Huh 2007).

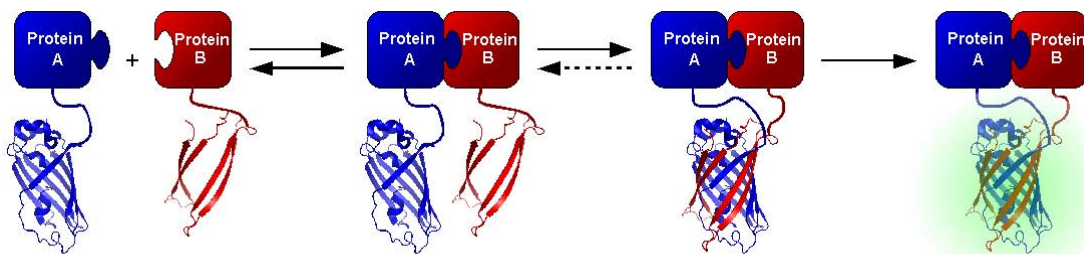


Figura 5. Principio de análisis de BiFC. La proteína A se fusiona con la mitad amino de la GFP o sus derivadas, mientras que la proteína B se fusiona con mitad carboxilo de la misma proteína fluorescente: si hay interacción entre A y B se reconstituye la GFP y emite una señal visual, permitiendo con ello observar directamente al microscopio el resultado de dicha interacción ([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/04/BiFC_\(details\).png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/04/BiFC_(details).png)).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Después de la secuenciación de *Saccharomyces cerevisiae*, se concluyó que existía una gran cantidad de genes duplicados en su genoma (Goffeau *et al.*, 1996). La importancia fisiológica, bioquímica y evolutiva de dicha duplicación sugiere una adaptación de esta levadura para sobrevivir en condiciones respiratorias y fermentativas (Piskur, 2001., Wolfe & Shields, 1997., Byrne & Wolfe, 2005., Piskur *et al.*, 2006).

Nuestro grupo de trabajo se ha dado a la tarea de caracterizar y estudiar diferentes proteínas parálogas en *S. cerevisiae*, entre las que destacan las glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP⁺, Gdh1 y Gdh3, así como las homocitrato sintasas Lys20 y Lys21, se ha propuesto que para estas enzimas, la hetero-oligomerización de los productos de los genes duplicados que las codifican, ha sido clave en su diversificación y en su retención (DeLuna *et al.*, 2001., Quezada *et al* 2008).

Hasta ahora no se ha estudiado a detalle el impacto fisiológico, bioquímico y evolutivo de la hetero-oligomerización entre proteínas parálogas en *S. cerevisiae*. Dichas interacciones podrían propiciar una mayor versatilidad enzimática, la cual sería un factor que influya en la diversificación funcional de las isoenzimas, así como en la retención de los genes parálogos que las codifican.

Los genes parálogos *LEU4* y *LEU9* codifican para las enzimas α -isopropilmalato sintasa (α -IPMS) Leu4 y Leu9, respectivamente. Comparten un 83% de identidad a nivel de secuencia en aminoácidos e intervienen en el primer paso de la biosíntesis de leucina. Ambas catalizan la conversión de α -cetoisovalerato (α -KIV) a α -isopropilmalato (α -IPM). Los estudios sobre una posible interacción entre estas proteínas parálogas -teniendo como antecedente a las glutamato deshidrogenasas y las homocitrato sintasas- resultan ser sumamente relevantes para entender los procesos de diversificación funcional en estas isoenzimas, así como su contribución en los procesos metabólicos en *S. cerevisiae*.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de los complejos hetero-oligoméricos para un grupo selecto de enzimas codificadas por genes parálogos en *Saccharomyces cerevisiae*; establecer para las α -IPMS Leu4 y Leu9 su impacto bioquímico y fisiológico.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la localización subcelular de un grupo selecto de enzimas parálogas en *S. cerevisiae*.
- Identificar mediante BiFC la formación de complejos homo y hetero-oligoméricos entre productos de genes duplicados.
- Determinar para la pareja Leu4 y Leu9 -cuyas enzimas forman homo y hetero-oligómeros-, su impacto sobre la fisiología en *S. cerevisiae*.
- Determinar el impacto fisiológico, así como los parámetros cinéticos de los homo-oligómeros Leu4-Leu4, Leu9-Leu9 y del hetero-oligómero y Leu4-Leu9.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas usadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente
BY4741	<i>MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 LEU4 LEU9</i>	Open Biosystems
BY4741-700	<i>MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ENO1pr-yECitrine LEU4 LEU9</i>	Este estudio
BY4741-701	<i>MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 LEU4-yECitrine LEU9</i>	Este estudio
BY4741-702	<i>MATa his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 LEU4 LEU9-yECitrine</i>	Este estudio
Y8205	<i>MATa his3Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2</i>	
BY8205-701	<i>MATa/a his3 Δ1 /his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0/ met15 Δ0 ura3 Δ0 / ura3 Δ0 can1 Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 LEU4- yN-URA3 LEU9-yC-HIS5</i>	Este estudio
BY8205-702	<i>MATa/a his3 Δ1 /his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0/ met15 Δ0 ura3 Δ0/ ura3 Δ0 can1 Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 LEU4-yC- HIS5 LEU9-yN-URA3</i>	Este estudio
BY8205-703	<i>MATa/a his3 Δ1 /his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0/ met15 Δ0 ura3 Δ0 / ura3 Δ0 can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 BAT1-yN-URA3 BAT1-yC-HIS5</i>	Este estudio
BY8205-704	<i>MATa/a his3 Δ1 /his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0/ met15 Δ0 ura3 Δ0/ ura3 Δ0 can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 BAT1-yN-URA3 BAT1pr-Bat1-17aa-yN-HIS5</i>	Este estudio
Y37237	<i>MATa/MATa ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 YNL104c::kanMX4/YNL104c::kanMX4</i>	Euroscarf collection
Y32364	<i>MATa/MATa ura3Δ0/ura3Δ0 leu2Δ0/leu2Δ0 his3Δ1/his3Δ1 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0; YOR108w::kanMX4/YOR108w::kanMX4</i>	Euroscarf collection
S288C	<i>MATa mall gal2</i>	Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
CLA11-700	<i>MATa LEU4 LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	
CLA11-701	<i>MATa leu4Δ::kanMX4 LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	Este estudio

CLA11-701-2	<i>MATa leu4Δ::natMX4 LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	Este estudio
CLA11-702	<i>MATa LEU4 leu9Δ::kanMX4 leu2::LEU2 ura3</i>	Este estudio
CLA11-703	<i>MATa leu4Δ::URA3 leu9 Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-703-2	<i>MATa leu4Δ::natMX4 leu9Δ::kanMX4 leu2::LEU2 ura3</i>	Este estudio
CLA11-704	<i>MATa ENO2pr-LEU4 leu9Δ:: kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-704-1	<i>MATa ENO2pr-LEU4-yECitrine leu9Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-705	<i>MATa leu4Δ::URA3 ENO2pr-LEU9 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-705-1	<i>MATa leu4Δ::natMX4 ENO2pr-LEU9-yECitrine leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA11-706	<i>MATa ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	Este estudio

Tabla 2

Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Características	Fuente
pKT175	<i>yECitrine-CaURA3</i>	Sheff & Thorn, 2004
pKT101	<i>CFP-SpHIS5</i>	Sheff & Thorn, 2004
pKT175-yN- <i>CaURA3</i>	<i>yN155- CaURA3</i> . Codifica para los primeros 155 aminoácidos de la yECitrine	Duhne, 2012
pKT101-yC- <i>SpHIS5</i>	<i>yC155 SpHIS5</i> . Codifica del aminoácido 155 al 238 de la CFP	Duhne, 2012

El plásmido pKT175 posee el gen *URA3* de *Candida albicans* como marcador de selección y la secuencia codificante para la proteína yECitrine. Se obtuvo el marcador de selección para el plásmido pKT175-yC-*SpHIS5* del pKT101 que contiene el gen *HIS5* de *Schizosaccharomyces pombe*, el cual que complementa la actividad de su ortólogo en *S. cerevisiae*.

Construcción de módulos y transformación de levaduras para determinar la localización subcelular de un grupo selecto de proteínas parálogas

Los criterios para seleccionar las proteínas parálogas que pudieran formar hetero-oligómeros fueron:

- a. Niveles de identidad mayores al 60%.
- b. Enzimas que presentaran estructura cuaternaria.
- c. Misma localización subcelular.
- d. Existencia simultánea en al menos una condición metabólica.
- e. Posible interacción entre proteínas parálogas reportada en análisis globales (Gavin *et al.*, 2002., Krogan *et al.*, 2006).

Se realizó una serie de construcciones para las siguientes parejas de genes parálogos: *ACSI*, *ACS2*, *ALD4*, *ALD6*, *ENO1*, *ENO2*, *GDH1*, *GDH3*, *HXK1*, *HXK2*, *LEU4*, *LEU9*, *LYS20*, *LYS21*, *PYC1*, *PYC2*, *PYK1*, *PYK2*, *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*, *URA7*, *URA8*. Se utilizó como templado el plásmido pKT175 (Sheff & Thorn, 2004). Se amplificaron módulos de 2.3 kb que contenían la secuencia codificante para la proteína fluorescente yECitrine, -esta es una variante de la GFP-, y los genes *URA3* de *C. albicans* y *HIS5* de *S. pombe* se utilizaron como marcadores de selección (la lista de oligonucleótidos, así como su descripción, se muestran en el anexo 1A). Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron las siguientes: primer paso 94°C 5 min, segundo paso 94°C 1 min, tercer paso 61°C 1 min, cuarto paso 72 °C 2:30 min, quinto paso 72°C 10 min; los pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces. Se verificaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%. Estos módulos se purificaron por columna y se observó su concentración final nuevamente en un gel de agarosa al 1%.

La cepa BY4741 se transformó con los módulos arriba mencionados utilizando la técnica de acetato de litio (Gietz & Woods, 2002). Las células transformadas se plaquearon sobre el medio de selección correspondiente (Figura 6). Una vez que crecieron colonias aisladas en el medio de selección, se purificaron y se obtuvo DNA genómico de las mismas utilizando Tritón X-100, finalmente se confirmaron mediante PCR (ver los oligonucleótidos en el anexo 1). Las condiciones para el PCR de confirmación fueron: primer paso 94°C 5 min, segundo paso 94°C 1 min, tercer paso 61°C 1 min, cuarto paso 72 °C 3 min, quinto paso 72°C 10 min ; los pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces.

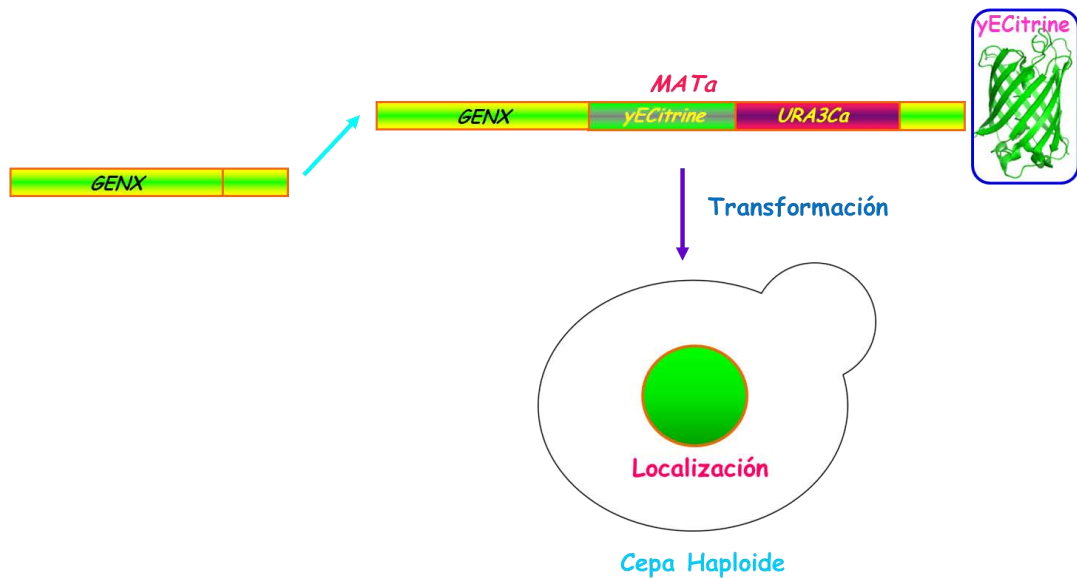


Figura 6. Estrategia utilizada para marcar proteínas por el extremo carboxilo con yECitrine. Una vez fusionada la proteína yECitrine a las proteínas parálogas, se determinó la localización subcelular de las distintas proteínas mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.

Construcción de cepas para análisis de BiFC mediante microscopía confocal

Los análisis de interacción entre proteínas se han visto ampliamente favorecidos a partir del uso de la GFP y sus demás variantes. En este trabajo se utilizó la metodología de BiFC para analizar las asociaciones oligoméricas en proteínas que cumplieran las siguientes características: a) misma localización subcelular, b) niveles similares de expresión, c) coexistencia en al menos una condición metabólica y d) formación de complejos oligoméricos. Los incisos a-c, se comprobaron a partir de cepas previamente descritas y etiquetadas con la proteína yECitrine. Los plásmidos utilizados para el análisis de BiFC están descritos en la tabla 2. Se amplificaron módulos mediante PCR con los fragmentos complementarios de yECitrine, yN (secuencia que codifica para los primeros 155 aminoácidos de la proteína yECitrine) y yC (secuencia codificante del aminoácido 155 al 238 de la proteína yECitrine); las condiciones de PCR y los oligonucleótidos ocupados fueron los mismos que se describieron para el marcado con yECitrine. El módulo yC-*HIS5Sp* se fusionó a un gen que codifica para una proteína seleccionada en la cepa haploide BY4741 *MATα*, mientras que el módulo yN-*URA3Ca* se fusionó a su parálogo en la cepa haploide Y8205 *MATα*. Una vez confirmada la correcta inserción del módulo mediante PCR en ambas cepas, se procedió a realizar cruces entre éstas para generar cepas diploides BY4741*MATα* / Y8205*MATα*. Finalmente se hicieron análisis de microscopía confocal para determinar interacciones entre estas proteínas parálogas (Figura 7).

Estrategia experimental para determinar interacciones proteína-proteína en levadura mediante BiFC

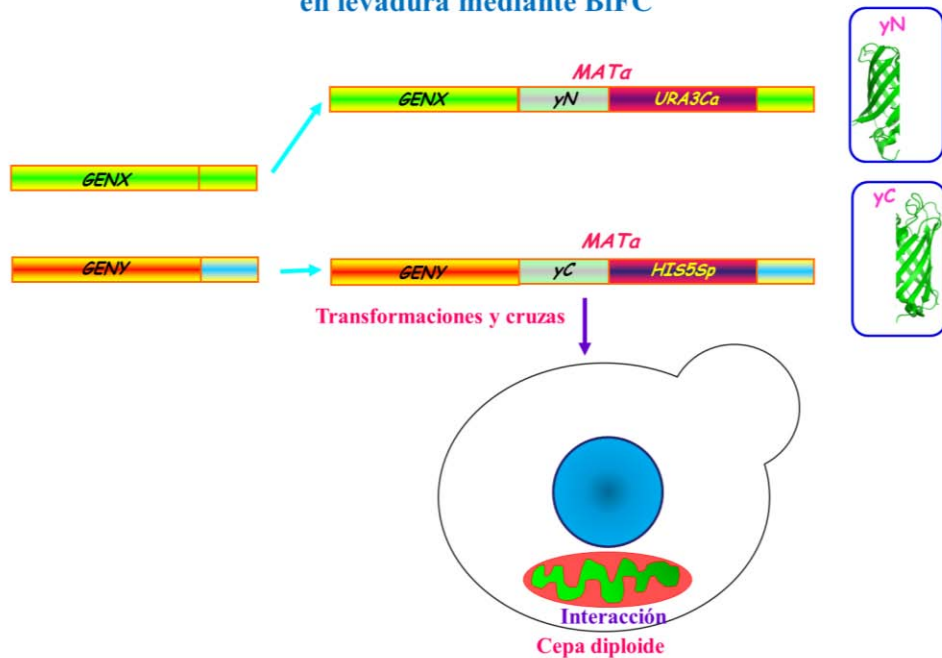


Figura 7. Esquema que ilustra la estrategia experimental de las construcciones realizadas para determinar interacciones mediante BiFC. Se realizan fusiones de las mitades de yECitrine, yN y yC en cepas haploides *MATa* y *MATa*; posterior a ello se realizan cruzas y se obtienen cepas diploides que expresan proteínas con las mitades complementarias de yECitrine y se procede a determinar por microscopia confocal si existen interacciones entre las proteínas marcadas.

Validación de BiFC

Paralelo a los análisis de BiFC en proteínas parálogas, se procedió a realizar una serie de controles para validar este tipo de ensayos. Los controles consistieron en fusionar la mitad yN al extremo carboxilo de la proteína mitocondrial Bat1 en la cepa BY4741 *MATa* y la mitad yC a Bat1 en la cepa Y8205 *MATa*, se realizaron las cruzas y se obtuvieron cepas diploides. Para el diseño del control negativo se ocupó la cepa *BATI* marcada con la mitad yN y se hizo una cruce con una cepa Y8205 *MATa* a la que se le fusionó después de la secuencia de internalización mitocondrial (SIM) el extremo yC. Una vez construidas ambas cepas diploides se realizó citometría de flujo y microscopía confocal. El mismo procedimiento se hizo para la proteína citoplásmica *ENO1* (Figura 8). Las condiciones de PCR fueron las mismas que se describieron para amplificar los módulos que contenían yECitrine y los marcadores de selección.

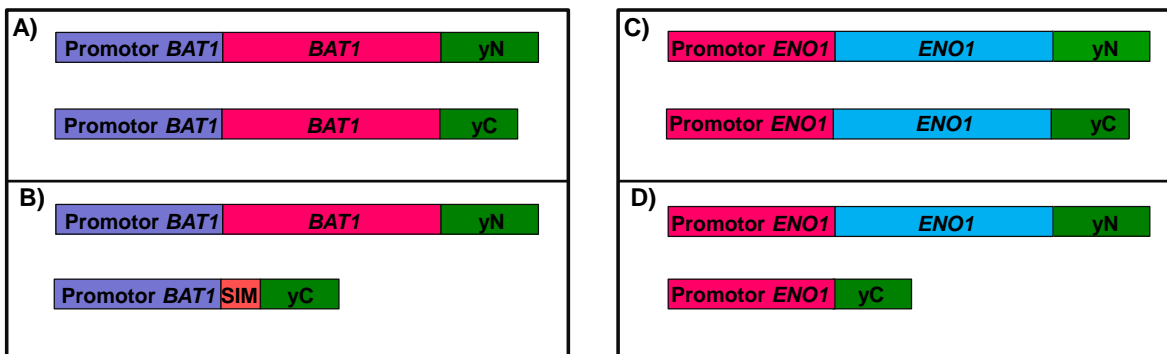


Figura 8. Construcción de módulos y cepas para validar interacciones mediante BiFC. **A)** Control positivo. Construcciones en cepas diploides donde el gen *BAT1* de BY4741 *MAT α* y el gen *BAT1* *MAT α* fueron marcados con los extremos yC y yN respectivamente. **B)** Control negativo. El fragmento yN se fusionó al gen *BAT1*. Módulos para construir la cepa diploide BY4741 *MAT α* *BAT1*yN / Y8205 *MAT α* Promotor *BAT1*-SIMyC. Si la asociación de los fragmentos complementarios de la yECitrine se da de manera independiente a una interacción real entre los oligómeros Bat1-Bat1, se espera que en la intensidad de fluorescencia entre Bat1yN y Bat1 SIMyC sea similar a la del control positivo. **C)** Control positivo para Eno1. **D)** Control negativo Eno1.

Selección de las enzimas parálogas α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9

Una vez que se determinaron interacciones entre diferentes proteínas parálogas, se eligieron para realizar análisis bioquímicos y fisiológicos las enzimas α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9. Los criterios de selección se basaron en: 1) su estado oligomérico –aparentemente son dímeros-, 2) sus diferencias relacionadas con los puntos isoelectrónicos, lo cual facilitaría su purificación y finalmente, 3) la localización subcelular de ambas isoenzimas, lo que implicaría una mayor probabilidad de interacción.

Construcción de mutantes

La tabla 1 describe las características de las cepas utilizadas en este estudio. Las mutantes sencillas de α -IPMS en *S. cerevisiae* *leu4 Δ , *leu9 Δ así como la doble mutante *leu4 Δ *leu9 Δ , provienen de la cepa CLA1-2 (*ura3* Δ *leu2::LEU2*) (Quezada *et al.*, 2008). Para la construcción de la mutante *leu4 Δ , la secuencia del gen *LEU4* fue reemplazada mediante recombinación homóloga utilizando un módulo que contenía el gen *kanMX4* y extremos de recombinación antes de los codones de inicio y término de *LEU4*; se utilizó como templado DNA genómico de la cepa Y37237 (Euroscarf collection) y los oligonucleótidos G1 y G2 (Wach *et al.*, 1997). Las transformantes se seleccionaron por su resistencia a G418 y fueron confirmadas por PCR. Para la construcción de la cepa *leu9 Δ se utilizó el mismo procedimiento previamente descrito; el templado fue DNA genómico de la cepa Y32364 (Euroscarf collection) y se utilizaron los oligos G3 y G4. La doble mutante *leu4 Δ *leu9 Δ se obtuvo al reemplazar el gen de********

LEU4 por el de *URA3*, en una cepa *leu9Δ*. Los oligos ocupados para amplificar el módulo de *URA3* fueron G1 y G2 y se utilizó como templado DNA genómico de la cepa silvestre S288C. Las transformantes fueron seleccionadas por su prototrofia a uracilo y confirmadas mediante PCR.

Construcción de cepas *LEU4* y *LEU9* bajo el promotor de *ENO2*

Para el diseño de quimeras de *LEU4* y *LEU9* bajo el promotor de *ENO2*, las secuencias codificantes tanto de *LEU4* y *LEU9* fueron amplificadas utilizando como templado DNA genómico de la cepa CLA11-700 y los oligonucleótidos G9, G10 y G11, G12 respectivamente, de 50 pb de identidad antes de los codones de inicio y término de *ENO2*. Los módulos generados se transformaron en la doble mutante *leu4Δ leu9Δ*. Las transformantes se seleccionaron por su prototrofia a leucina y se confirmaron mediante PCR. Las cepas generadas fueron: CLA11-704 (*MATa ENO2pr-LEU4 leu9Δ leu2::LEU2 ura3*) y CLA11-705 (*MATa leu4Δ ENO2pr-LEU9 leu2:: LEU2 ura3*). La doble quimera *ENO2pr-LEU4* y *ENO2pr-LEU9* se construyó de la siguiente manera: un módulo con la construcción *ENO2pr-LEU4* fue amplificado de la cepa CLA11-704 con los oligonucleótidos G13 y G14 y se utilizó para un segundo PCR con los oligos G15 y G16; el módulo generado con 50 pares de recombinación antes y después de los codones de inicio y término de *LEU4*, se utilizó para transformar la cepa CLA11-705. Las transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a 5-FOA (5-Fluoroorotic Acid). La correcta inserción del módulo fue verificada mediante PCR, la cepa generada fue CLA11-706 *MATa ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9 leu2:: LEU2 ura3*.

Transformación de cepas

Las cepas de *S. cerevisiae* se transformaron utilizando el protocolo previamente descrito por Gietz y Woods (2002). Las cepas transformadas se seleccionaron por su prototrofia en medio mínimo al marcador de selección correspondiente, o bien por resistencia a NAT y G418 en medio rico YPD.

Extracción de aminoácidos para la determinación de pozas de leucina

Los extractos y las muestras utilizados para la determinación intracelular de aminoácidos y su análisis posterior se realizaron tal y como se describió previamente (Quezada *et al.*, 2011).

Los cultivos de células se hicieron en medio mínimo glucosa-amonio y etanol-amonio OD₆₀₀ ~0.6.

Determinación de actividades de α -isopropilmalato sintasa

Las células crecieron hasta una OD₆₀₀ de ~0.6 en glucosa o etanol como fuentes de carbono. Cepas que expresaban *LEU4* o *LEU9* desde el promotor de *ENO2* se crecieron en YPGal 2% hasta un OD₆₀₀ de ~1.6, una vez alcanzada esta OD se adicionó glucosa a un 10% y las células se colectaron después de 6 horas por centrifugación y se lavaron 2 veces con agua destilada. Los extractos crudos se obtuvieron al romper las células con perlas de vidrio y buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5, 1 mM PMSF y 1 mM de DTT. La actividad de α -isopropilmalato sintasa se determinó con 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico; DTNB, reactivo de Ellmant) 5 mM en 1 mL de buffer de reacción que contenía: 50 mM de buffer de fosfatos pH 7.5, 140 mM de KCl, 4 mM de MgCl₂, 0.25 mM de acetil-CoA y 10 mM de α -cetoisovalerato (α -KIV). Después de 5 minutos se adicionó la enzima para empezar con la determinación, la cual se obtuvo a partir de la pendiente generada por el cambio en la absorbencia a 412 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 400, en celdas de 1 cm de paso de luz. La producción de NTB2-se cuantificó utilizando un coeficiente de extinción de 14.15 M⁻¹ cm⁻¹ (Riddles *et al.*, 1983). La actividad específica está dada en nmoles de CoA formados por minuto por mg de proteína. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (1951) y a 280 nm.

Citometría de flujo

Las cepas marcadas con yECitrine se crecieron en glucosa o etanol como fuentes de carbono hasta una OD₆₀₀ de ~0.6. Las cepas que crecieron en YPGal 2% se llevaron a una OD₆₀₀ de ~1.6 y se indujeron durante 6 horas con glucosa al 10%. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron 2 veces con agua destilada, se resuspendieron con FACS Flow 695 (BD, USA No. 342003) a una OD₆₀₀ ~0.1 y se registraron 10 000 eventos. El análisis se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD FACS Calibur (BD, USA). La señal de fluorescencia se obtuvo a 480 nm de excitación y 530 nm de emisión. El análisis de datos se llevó a cabo con el programa Cyflogic. Se obtuvo para ello la media geométrica de cada grupo de datos como una medida de prevalencia relativa de proteína, como previamente fue reportado (Kojima *et al.*, 2011).

Análisis de microscopía confocal

Para determinar la localización subcelular de Leu4 y Leu9 marcadas con yECitrine, las cepas se tiñeron con MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes) de acuerdo con las especificaciones del productor. La colocalización de la señal de yECitrine y MitoTracker se determinó a través de imágenes secuenciales. Imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio confocal (FluoView FV1000 laser confocal system Olympus). Objetivo 60x (UPLASAPO 60x O NA:1.35) zoom x5.0, x10.0 y x20.0 y 3.5 μm de apertura confocal.

Los parámetros de excitación y de emisión fueron los siguientes: para la visualización de yECitrine, la excitación fue de 488 nm y la emisión de 520 nm de campo claro 500 nm, intervalo de 30 nm. Para el MitoTracker la excitación fue de 543 nm y la emisión de 598 nm, campo claro 555 nm, intervalo 100nm. Las cepas diploides fueron marcadas con MitoTracker Deep Red 633 (Molecular Probes). El análisis subsecuente de imágenes se llevó a cabo con el programa Olympus Fluo View FV1000 (versión 1.7).

Purificación de α -isopropilmalato sintasas

Las enzimas α -isopropilmalato sintasas se purificaron de las cepas CLA11-704, CLA11-705 y CLA11-706, las cuales sobre-expresan *LEU4*, *LEU9* y *LEU4 LEU9*, respectivamente desde el promotor de *ENO2*. Las células se crecieron en YPGal (2%) hasta una OD_{600} de ~ 1.6 y posteriormente se adicionó glucosa al 10% durante 6 horas, finalmente se aislaron mitocondrias de acuerdo con Boldogh y Pon, 2007. Las mitocondrias se concentraron por centrifugación y se lavaron 2 veces con agua estéril fría. La ruptura de mitocondrias se realizó con perlas de vidrio y buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5, 1 mM de DDT y 1 mM de PMSF; la proteína obtenida se colocó en una columna de Q Sefarosa (Sigma Q1126) previamente equilibrada con buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5. Las proteínas que no se adhirieron a la matriz se eluyeron utilizando 4 volúmenes de columna. Las diferentes isoenzimas de α -isopropilmalato sintasas se obtuvieron utilizando buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 y un gradiente lineal de 0.0-0.5 M de NaCl. Las fracciones que mostraron una mayor actividad se colectaron y se dializaron utilizando un Amicon de 30 kDa y buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5.

Determinación de la masa molecular de α -isopropilmalato sintasas

La masa molecular nativa de las α -isopropilmalato sintasas se determinó en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada previamente con 50 mM de buffer de fosfatos pH 7.5 + 0.15 M de NaCl. La columna se calibró con los marcadores de peso molecular: tiroglobulina (670 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y albúmina sérica bovina (66 kDa). El flujo en la columna fue de 0.25 ml/min. Las fracciones eluidas de 0.25 ml se colectaron y fueron monitoreadas a 280 nm con un dispositivo Pharmacia FPLC system.

Gel nativo de agarosa

Las cepas que expresaban el gen codificante de yECitrine bajo el promotor de *ENO1* o fusionadas al extremo C-terminal de las α -IPMS codificadas por genes regulados por *ENO2*, se crecieron tal y como se describió en el apartado de purificación. Las células se concentraron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua estéril fría. Se obtuvieron extractos crudos de proteína mediante ruptura con perlas vidrio y buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.5, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF. Se preparó un gel horizontal de agarosa al 1% (UltraPure LMP Agarose Gibco, Cat. No. 5517UA) disuelta en buffer 25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 19.2 mM de glicina. El gel se sumergió en una cámara de electroforesis que contenía el mismo buffer previamente descrito de acuerdo a Kim *et al.*, 2000. Extractos crudos de cepas que expresaban la proteína yECitrine sola o fusionada a las α -IPMS se cargaron en el gel. La electroforesis de proteína en geles nativos de agarosa se realizó a 4°C y 35V durante 5 horas. La fluorescencia de yECitrine se visualizó directamente sobre el transiluminador de UV.

Análisis de northern blot

Los análisis de northern blot se llevaron a cabo de acuerdo con Struhl y Davis, 1981. Las muestras de RNA total de levadura se obtuvieron a partir de cultivos de 100 ml a una OD₆₀₀ de ~0.6 en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol al 2% como fuente de carbono. Se utilizaron los productos de PCR como sondas. Para *LEU4* un producto de PCR de 192 pb se amplificó con los oligonucleótidos G65 y G66, para *LEU9* un producto de PCR de 193 pb fue amplificado con los oligonucleótidos G67 y G68, un fragmento de 1200 pb de *ACT1* se utilizó como control interno de cargado. Las imágenes de transferencia se analizaron utilizando el programa ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

Cinética enzimática y análisis de datos

Se realizaron mediciones de velocidad inicial variando ambos sustratos simultáneamente (acetil-CoA 0.005 - 0.2 mM y α -KIV 0.01 - 0.25 mM), los resultados se analizaron por regresión no lineal con un ajuste global a la ecuación 1 usando el programa Prism.

Ecuación 1.

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_{ia}K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]}$$

Donde v representa la velocidad inicial; V_{max} velocidad máxima; A , concentración de acetil-CoA; B , concentración de α -KIV; K_a y K_b son los valores de K_m para A y B , respectivamente y K_{ia} es la constante de disociación para A .

Para estudiar la inhibición por leucina se realizaron curvas de saturación a diferentes concentraciones de la misma; 0.0, 0.04, 0.08, 0.12 y 0.2 mM para Leu4 y 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mM para Leu9. Para el complejo heterodimérico Leu4-Leu9 las concentraciones fueron 0.0, 0.25, 0.5, 0.7 y 1.0 mM. A cada concentración de leucina la acetil-CoA se varió de 0.005 a 0.25 mM, mientras que el α -KIV permaneció fijo a 2.5 mM. Con el fin de elegir el modelo de inhibición los resultados fueron ajustados a diferentes modelos incluyendo el de cooperatividad, usando para ello el programa Dynafit; el mejor ajuste fue con un modelo de inhibición mixta. Cuando α -KIV se varió de 0.0025 a 2.5 mM, la concentración de acetil-CoA se mantuvo fija a 0.25 mM. Los datos se ajustaron en forma global a la ecuación 2. Cuando se varió la concentración de acetil-CoA los resultados se ajustaron a la ecuación 3. Para el análisis cinético se utilizó el programa Prism.

En las ecuaciones 2 y 3, I es la concentración de leucina; K_{is} es la constante de disociación de leucina a la enzima libre y K_{ii} es la constante de disociación de la leucina al complejo enzima-sustrato.

Ecuación 2.

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_a \left(1 + \frac{K_{ib}}{B}\right) \left(1 + \frac{I}{K_{is}}\right) + [A] \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) \left(1 + \frac{I}{K_{ii}}\right)}$$

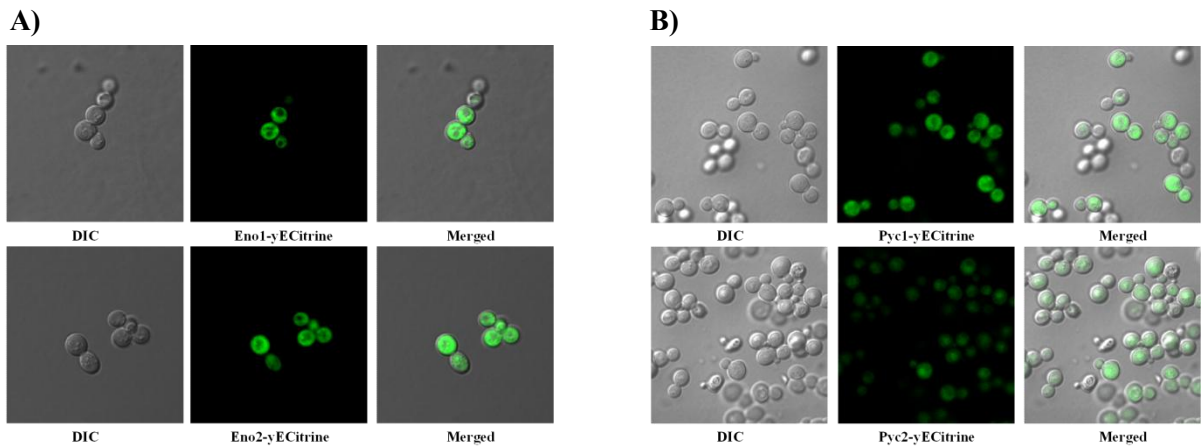
Ecuación 3.

$$v = \frac{V_{max}[B]}{K_b \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \left(1 + \frac{I}{K_{is}}\right) + [B] \left(1 + \frac{K_a}{A}\right) \left(1 + \frac{I}{K_{ii}}\right)}$$

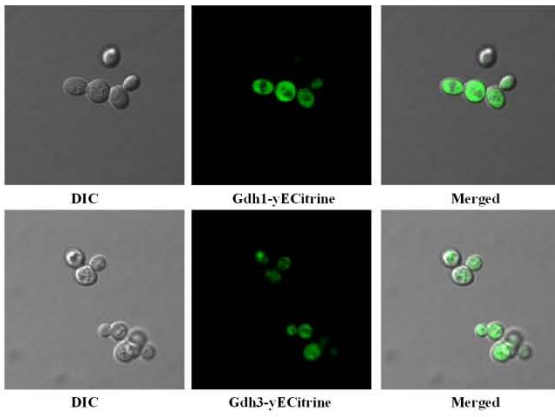
5. RESULTADOS

Una fracción importante de proteínas parálogas analizadas en este estudio comparten la misma localización subcelular

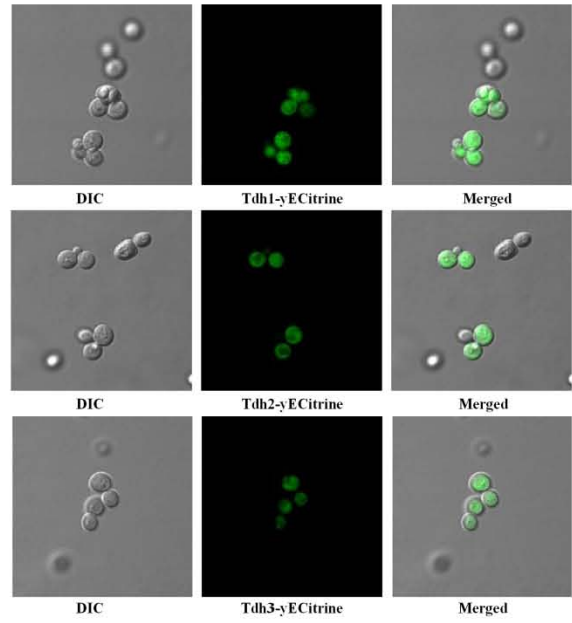
Un paso crucial para analizar interacciones entre proteínas parálogas, fue determinar su localización subcelular. Si dicha localización era compartida por ambas proteínas, la interacción entre éstas podría ser viable. Con el objetivo de determinar la ubicación subcelular de un grupo selecto de proteínas parálogas, éstas se marcaron por el extremo carboxilo con la proteína yECitrine y se procedió a realizar microscopía confocal. La mayoría de las proteínas analizadas coexisten en el mismo compartimento subcelular; enzimas de la glucólisis ocuparon primordialmente el citoplasma; entre estas destacan: Hxk1/Hxk2, Eno1/Eno2, Tdh1/ Tdh2/Tdh3 y Pyc1/Pyc2. Las enzimas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos se encuentran distribuidas en mitocondria y núcleo -Leu4/Leu9 y Lys20/Lys21- respectivamente (figura 9 y tabla 3). A pesar de que la selección de parejas, se realizó sobre proteínas que presumiblemente presentaban la misma localización subcelular (Hu *et al.*, 2003), esto no coincidió para las parejas Ald4/Ald6, Acs1/Acs2, Ura7/Ura8 y Pyk1/Pyk2 (figura 9 y tabla 3).



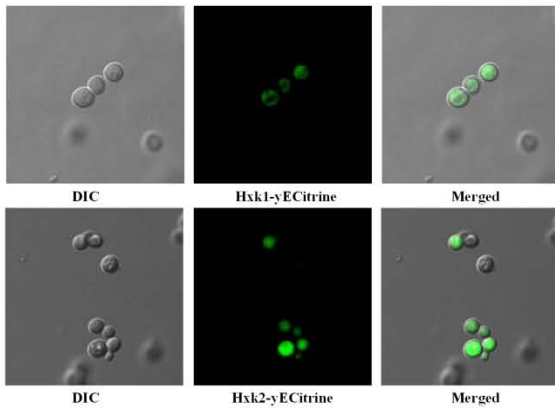
C)



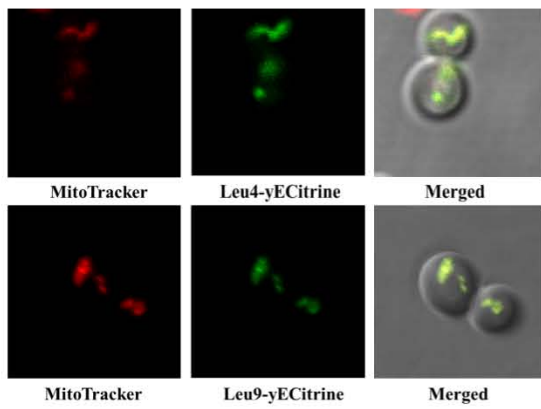
D)



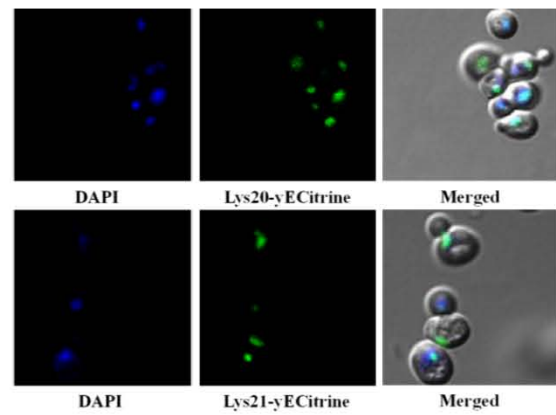
E)



F)



G)



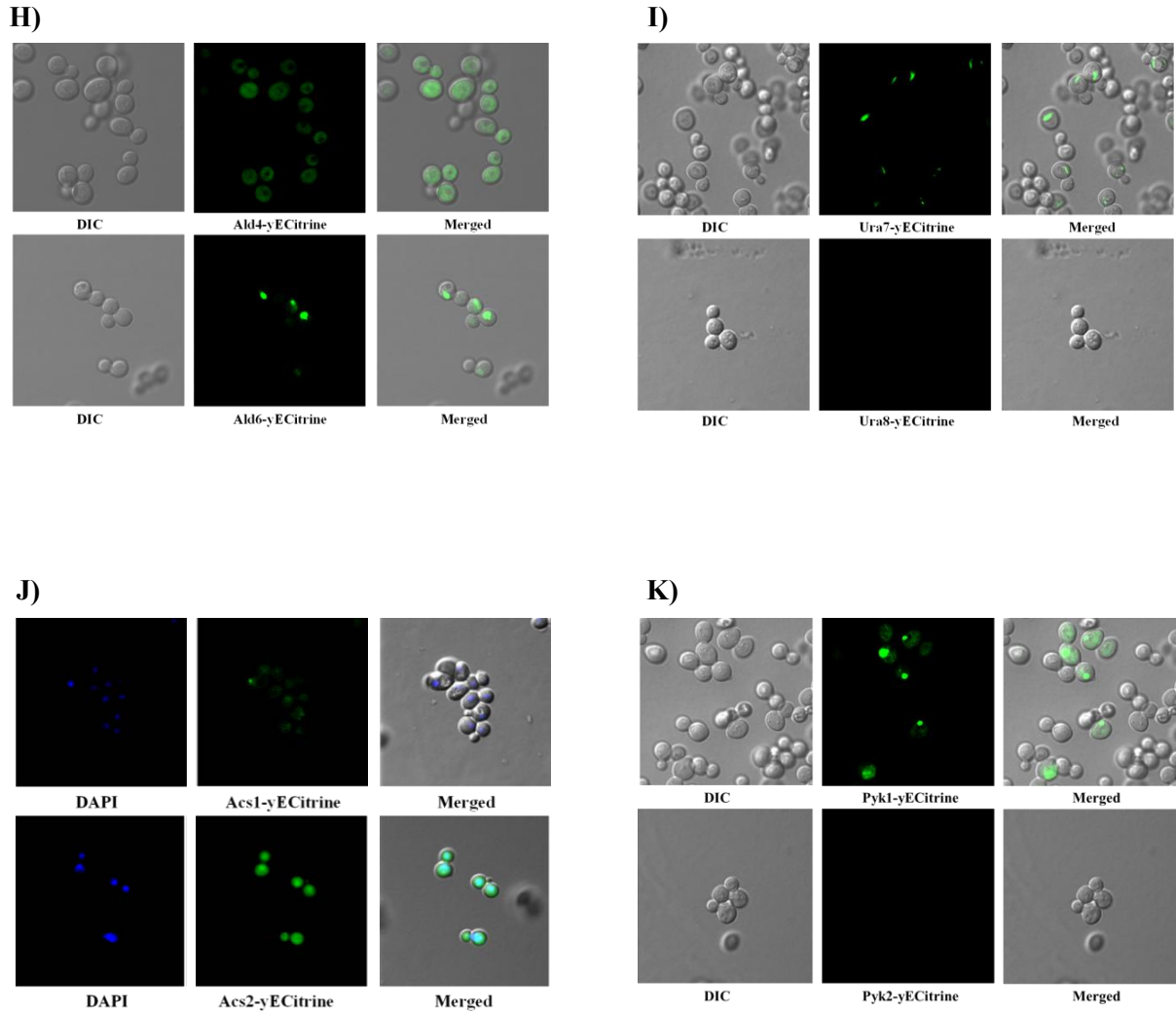


Figura 9. Localización subcelular de proteínas parálogas analizadas en este estudio. Imágenes obtenidas por microscopía confocal. **A)-E)** Proteínas parálogas localizadas en citoplasma. **E)** y **F)** Proteínas parálogas involucradas en biosíntesis de aminoácidos, se utilizó MitoTracker y DAPI como marcadores mitocondria y de núcleo respectivamente. **H)-J)** Proteínas parálogas que no comparten la misma localización subcelular y por lo tanto fueron eliminadas de este estudio. Las células crecieron en medio mínimo glucosa amonio, $O.D_{600}$ entre 0.4 y 0.6. La cepa marcada con Gdh3-yECitrine se creció en etanol amonio ($O.D_{600}$ 0.6), condición metabólica donde nuestro grupo de trabajo ha determinado su presencia.

Después de analizar mediante microscopía confocal las parejas de proteínas mencionadas en la figura 9, se descartaron varias de ellas debido a la falta de fluorescencia o bien porque no presentaban la misma localización. La tabla 3 es un resumen de las parejas de proteínas parálogas mencionadas en la figura 9.

Proteínas	Identidad	Localización	Puntos isoeléctricos	Formas oligoméricas	Peso kDa
Acs1 y Acs2	58%	Citoplasma. Núcleo/citoplasma	(6.6) (6.6)	Trímeros	(79.1) (75.4)
Ald4 y Ald6	56%	Citoplasma. No determinado	(6.7) (5.1)	Tetrámero	(56.7) (54.4)
Eno1 y Eno2*	95%	Citoplasma	(6.6) (5.8)	Dímero	(46.8) (46.9)
Gdh1 y Gdh3*	87%	Citoplasma	(5.5) (5.2)	Hexámeros	(49.5) (49.6)
Hxk1 y Hxk2*	77%	Citoplasma	(5.1) (5)	Dímeros	(53.7) (53.9)
Leu4 y Leu9*	83%	Mitocondria	(5.8) (6.7)	Dímeros	(68.4) (67.2)
Lys20 y Lys21*	92%	Núcleo	(7.2) (6.2)	Dímeros	(47) (48.5)
Pyc1 y Pyc2*	93%	Citoplasma	(6.1) (6.4)	Tetrámeros	(130) (130.1)
Pyk1 y Pyk2	71%	Citoplasma. No determinada	(7.6) (6.9)	Tetrámero	(54.5) (55.1)
Tdh1 y Tdh2*	87%	Citoplasma	(8.5) (6.9)	Tetrámeros	(35.7) (35.8)
Tdh1 y Tdh3*	88%	Citoplasma	(8.5) (6.9)	Tetrámeros	(35.7) (35.7)
Tdh2 y Tdh3*	96%	Citoplasma	(6.9) (6.9)	Tetrámeros	(35.8) (35.7)
Ura7 y Ura8	78%	No determinado. No determinado	(5.9) (5.3)	Dímero	(64.7) (64.5)

Tabla 3. Localización subcelular y características generales de las proteínas parálogas analizadas en este estudio. El asterisco sobre las proteínas indica el grupo de parejas sobre las que se realizarán estudios de BiFC para determinar posibles interacciones. El peso en kDa entre paréntesis, es por unidad monomérica.

Análisis de BiFC

Para detectar interacciones proteína-proteína, empleamos la metodología conocida como BiFC, la cual consiste en la fusión y asociación de fragmentos complementarios de la proteína GFP y sus demás variantes. Esta metodología ha resultado ser de gran utilidad para determinar interacciones entre diversas proteínas y su uso se ha extendido a diferentes organismos (Kerppola, 2006., Kerppola, 2008., Sung & Huh 2007). Para ello, se realizaron construcciones con las mitades complementarias yN (primeros 155 aminoácidos de yECitrine) y yC (del aminoácido 155 al 238 de la CFP). Las parejas elegidas fueron: Eno1/Eno2, Gdh1/Gdh3, Hxk1/Hxk2, Leu4/Leu9, Lys20/Lys21, Pyc1/Pyc2 y Tdh1/Tdh2/Tdh3 (Tabla 3). Después de realizar las construcciones y cruces de las cepas pertinentes, se realizaron los análisis de microscopía confocal.

Las mitades complementarias yN y yC no interactúan entre ellas

Se desarrollaron una serie de controles para validar los ensayos de BiFC. Para ello se ocupó la proteína dimérica Eno1, la cual interviene en la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (Entian *et al.*, 1987). Como control positivo se realizaron cruces entre las

cepas haploides *ENO1pr-ENO1-yN* y *ENO1pr-ENO1-yC*; las cuales generaron una cepa diploide que expresaba simultáneamente Eno1-yN y Eno1-yC; ambos fragmentos complementarios se fusionaron al C-terminal de Eno1. Esta cepa mostró un alto nivel de fluorescencia cuando se analizó por microscopía confocal, lo cual implica que cuando hay una interacción directa entre dos proteínas que tienen fusionados los fragmentos complementarios yN y yC, -como en el caso de la proteína dimérica Eno1-, hay una asociación de dichos fragmentos con su correspondiente emisión de fluorescencia (Duhne 2012., Figura 10 panel superior). El control negativo consistió en realizar cruza entre las cepas haploides *ENO1pr-yN* y *ENO1pr-ENO1-yC*; la cepa diploide generada a partir de estas cruza expresaba únicamente la mitad yN bajo el promotor de *ENO1* y la mitad yC fusionada al C-terminal de Eno1. Esta cepa no mostró fluorescencia cuando se analizó por microscopía confocal (Figura 10 panel inferior). Lo anterior implica que las mitades complementarias yN y yC no interactúan por sí mismas, sino que requieren por fuerza estar asociadas a proteínas que interactúan entre ellas, para que se reconstituya la proteína fluorescente yECitrine.

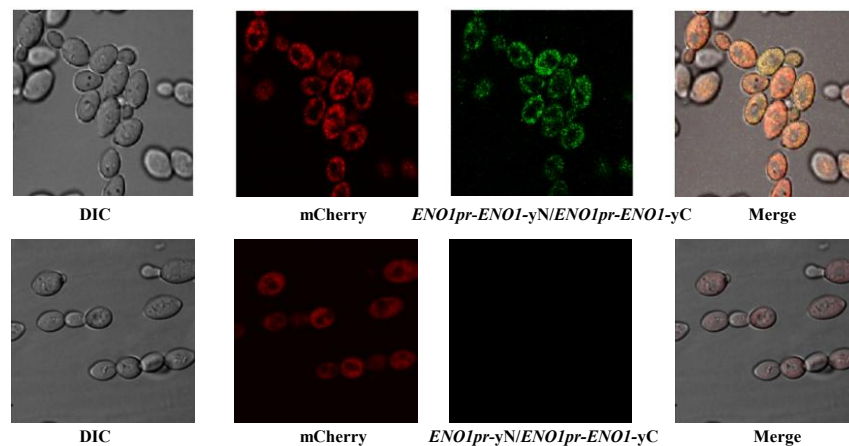


Figura 10. Los fragmentos complementarios yN y yC no interactúan entre ellos. Panel superior, cepa diploide que expresa los fragmentos yN y yC fusionados al C-terminal de Eno1. Panel inferior, cepa diploide utilizada como control negativo, la mitad yN se expresa directamente bajo el promotor de *ENO1*, mientras que la mitad yC se encuentra fusionada por el C-terminal de Eno1. El gen que codifica para mCherry –control de localización citoplásmica- se encuentra expresado bajo el promotor de *TEF1*.

Análisis de microscopía confocal muestra que existen interacciones entre proteínas parálogas involucradas en glucólisis y biosíntesis de aminoácidos

Después de realizar cruza de cepas haploides que expresaban una proteína paróloga fusionada por el C-terminal a los fragmentos yN o yC, se procedió a analizar las cepas diploides resultantes mediante microscopía confocal y se determinó que existen interacciones entre las enolasas Eno1 y Eno2, las hexocinas Hxk1 y Hxk2, las gliceraldehído 3-fosfato

deshidrogenasas Tdh1 y Tdh2, las glutamato deshidrogenasas Gdh1 y Gdh3, las homocitrato sintasas Lys20 y Lys21 y las α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9 (Figura 11).

A continuación se ilustran proteínas parálogas cuya visualización de fragmentos fluorescentes sugiere una interacción hetero-oligomérica. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal utilizando como marcador mitocondrial MitoTracker y como marcador de núcleo DAPI. Las cepas crecieron en medio mínimo glucosa amonio $OD_{600} \sim 0.6$. La cepa Gdh1-yN/Gdh3-yC fue la única que se creció en etanol amonio como fuente de carbono a una OD_{600} de ~ 0.6 .

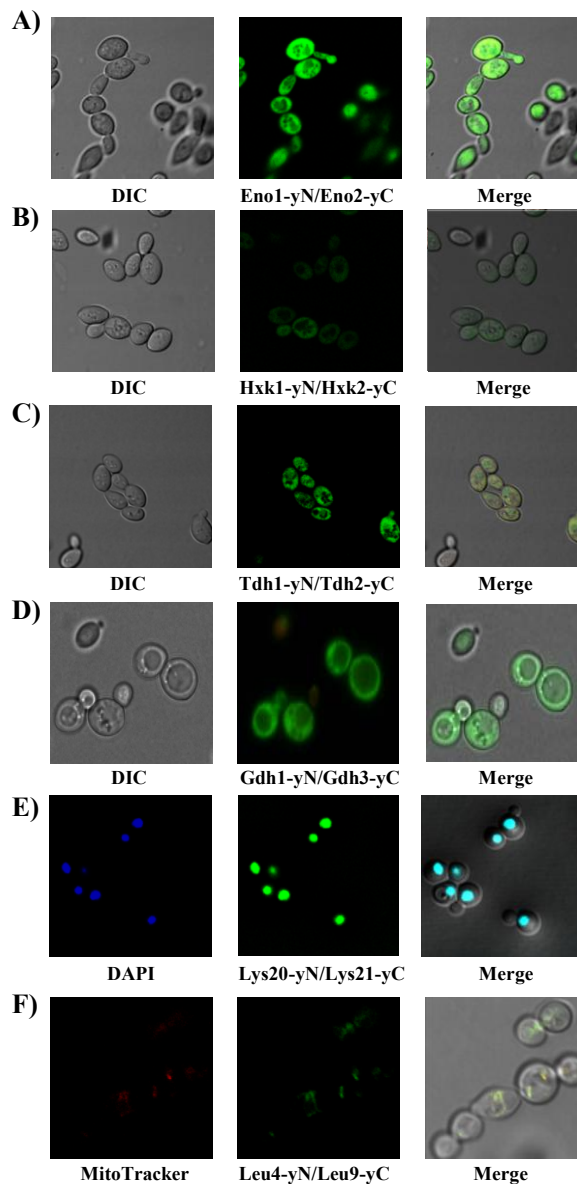


Figura 11. Presencia de interacciones entre proteínas parálogas involucradas en glucólisis y biosíntesis de aminoácidos. **A)** Enolasas: Eno1 y Eno2 presentan 95% de identidad; participan en la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. **B)** Hexocinasas: Hxk1 y Hxk2 presentan 77% de identidad; participan en la fosforilación de

glucosa dentro del primer paso de la glucólisis. **C)** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas: Tdh1 y Tdh2 presentan 96% de identidad; catalizan la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3 bis-fosfoglicerato. **D)** Glutamato deshidrogenasas: Gdh1 y Gdh3 presentan 87% de identidad; catalizan la formación de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato. **E)** Homocitrato sintasas: Lys20 y Lys21 presentan 92% de identidad; participan en el primer paso en la biosíntesis de lisina; forman homocitrato a partir de acetil-CoA y α -cetoglutarato. **F)** α -isopropilmalato sintasas: Leu4 y Leu9 presentan 83% de identidad; participan en el primer paso en la biosíntesis de leucina; forman α -isopropilmalato a partir de Acetil-CoA y α -cetoisovalerato.

A partir de los análisis de BiFC, se estableció que varias parejas de proteínas mostraban interacciones entre ellas, lo cual es relevante, ya que esto implicaría que hay cierta propensión para que las proteínas parálogas que se han conservado a lo largo de la evolución de *S. cerevisiae* interactúen. Ante tales evidencias, es importante analizar las implicaciones bioquímicas y fisiológicas de dichos complejos hetero-oligoméricos.

Selección de las enzimas α -IPMS: Leu4 y Leu9

Después del análisis de localización subcelular y de interacción a través de BiFC, se seleccionaron las α -IPMS Leu4 y Leu9 para determinar su impacto bioquímico y fisiológico en el metabolismo de *S. cerevisiae*. Como se mencionó previamente, dicha selección obedeció a 2 factores importantes: a) su estado oligomérico. Presumiblemente son dímeros, lo cual podría asegurar la existencia de sólo 2 complejos homodiméricos Leu4-Leu4 y Leu9-Leu9 y de un heterodímero Leu4-Leu9 y b) debido a las diferencias de sus puntos isoeléctricos (5.8 para Leu4 y 6.7 para Leu9) se podría favorecer la separación de las diferentes isoenzimas para su análisis cinético.

Mutantes *leu4* Δ *LEU9* incrementan la poza intracelular de leucina

Con el fin de determinar la contribución de las α -IPMS Leu4 y Leu9 en el crecimiento y la biosíntesis de leucina en *S. cerevisiae*, se generaron mutantes sencillas *leu4* Δ , *leu9* Δ , así como la doble mutante *leu4* Δ *leu9* Δ ; se analizó su crecimiento y las concentraciones intracelulares de leucina. Se determinó que la doble mutante *leu4* Δ *leu9* Δ es auxótrofa de leucina, lo cual indica que sólo existen estas 2 enzimas para la generación de α -IPM (Chang *et al.*, 1985), mientras que la mutante sencilla *leu4* Δ resultó ser una auxótrofa parcial de leucina; finalmente, la mutante sencilla *leu9* Δ no presentó ningún fenotipo de crecimiento en las condiciones estudiadas (glucosa amonio y etanol amonio. Figura 12A, B). Un punto importante fue que la mutante sencilla *leu4* Δ presentó un tiempo lag mayor a la mutante *leu9* Δ en etanol; esta diferencia fue de casi de 30 horas. El crecimiento de la doble mutante así como el de la mutante sencilla *leu4* Δ se restituye a

los niveles de la cepa silvestre *LEU4 LEU9* cuando se le adiciona leucina al medio de cultivo, tanto en glucosa como en etanol (Figura 12A, B). Estas observaciones sugerían que la mutante sencilla *leu4Δ* tenía bajos niveles de leucina y que necesitaba de su adición exógena para alcanzar el crecimiento de la cepa silvestre. Sin embargo, al analizar la poza de leucina, se observó que esta cepa es la que acumula una mayor cantidad de este aminoácido (Figura 13). Este resultado, aparentemente contradictorio, sugiere que la diferencia de crecimiento se debe a un incremento de metabolitos en la vía de la biosíntesis de leucina y no a una ausencia de la misma, lo cual va en detrimento de la célula. Esto también implicaría que Leu4 se inhibe por retroalimentación, mientras que la isoforma Leu9 se ve liberada de esta regulación; cuando Leu9 se encuentra como la única isoenzima, drena sustratos hacia la biosíntesis de leucina, los cuales son importantes en otras vías metabólicas.

Paralelo a las determinaciones de las velocidades específicas de crecimiento, se realizaron ensayos de complementación en la mutante sencilla *leu4Δ* y la doble mutante *leu4Δ leu9Δ*. Dichas complementaciones se llevaron a cabo utilizando el plásmido monocopia pRS416 que contiene los genes de *LEU4* o *LEU9*. La mutante *leu9Δ* se omitió de este análisis debido a su ausencia de fenotipo. A partir de los ensayos de complementación, se pudo observar que tanto la mutante sencilla *leu4Δ*, como la mutante doble *leu4Δ leu9Δ*, mostraron niveles de crecimiento idénticos a los de la cepa silvestre *LEU4 LEU9* cuando se complementaron con el plásmido pRS416-*LEU4*, esto tanto en glucosa o etanol como fuentes de carbono (Figura 12C, D). La complementación con el plásmido pRS416-*LEU9* no mostró una mejora en la velocidad específica de crecimiento de la mutante sencilla *leu4Δ*, mientras que en la doble mutante *leu4Δ leu9Δ*, la complementación con pRS416-*LEU9* mostró un fenotipo parecido al de la mutante *leu4Δ* (Figura 12C, D). Los resultados anteriores indican que la presencia de Leu4 es suficiente para tener un crecimiento silvestre, mientras que el papel que desempeña Leu9 se hace patente en la doble mutante *leu4Δ leu9Δ*.

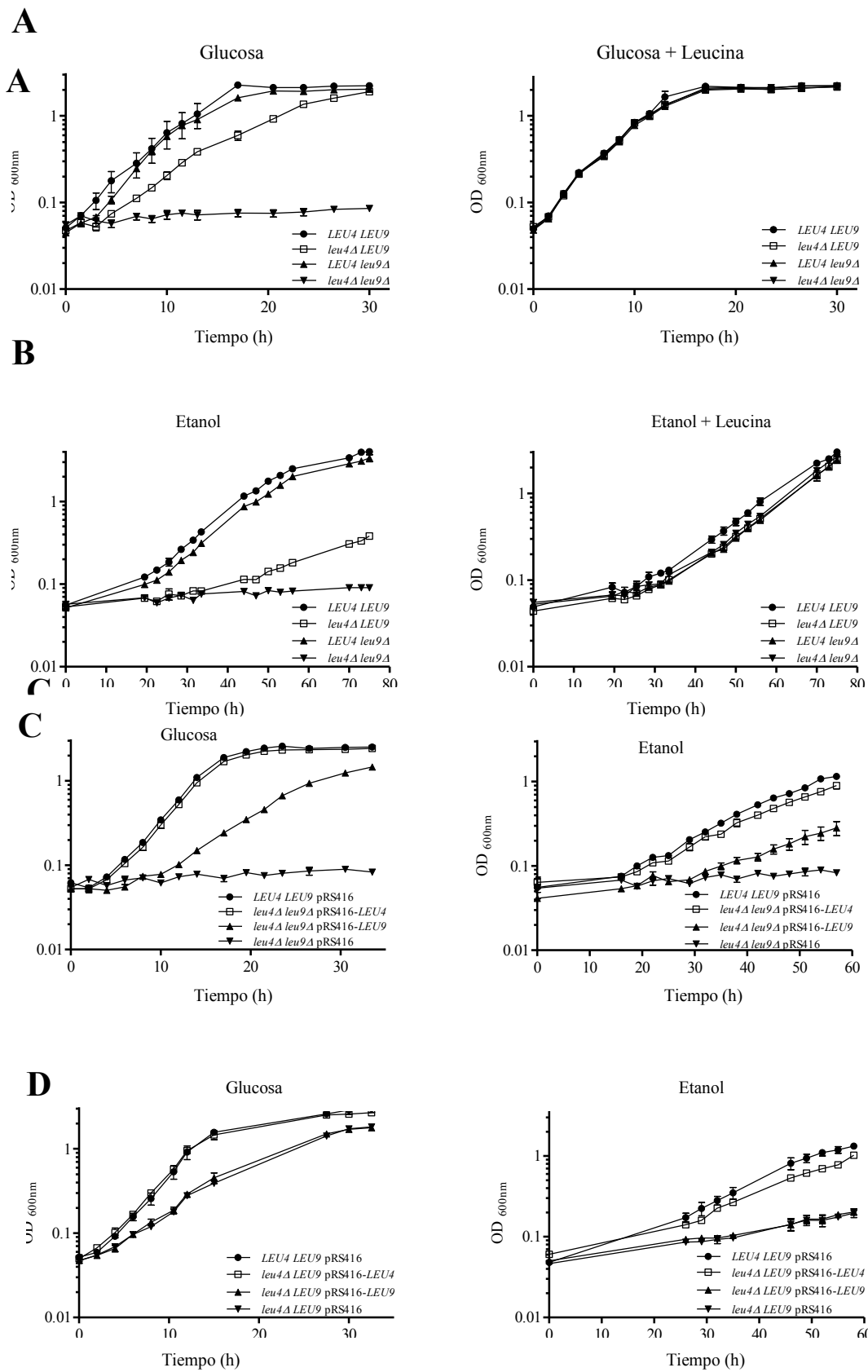


Figura 12. Curvas de crecimiento de las mutantes *leu4Δ*, *leu9Δ* y *leu4Δ leu9Δ*. En las gráficas se ilustran las cinéticas de crecimiento de las diferentes mutantes de α -isopropilmalato sintasa en 2 diferentes fuentes de carbono,

glucosa y etanol. **A, B.** La cepa con una doble mutante *leu4Δ* y *leu9Δ* es auxótrofa de leucina, mientras que la mutante sencilla *leu4Δ* es una auxótrofa parcial; el crecimiento de estas mutantes se restituye una vez que se les adiciona leucina a los medios de cultivo. **C, D.** Complementaciones de las mutantes pertinentes con los plásmidos pRS416-*LEU4*, pRS416-*LEU9* y el plásmido vacío pRS416.

En las gráficas de la figura 12A, B se ve un claro efecto sobre el crecimiento en una mutante *leu4Δ*, puesto que es la única mutante que afecta directamente la velocidad específica de crecimiento, la mutante sencilla *leu9Δ* no afecta el crecimiento. Una observación interesante es que al parecer hay un efecto más marcado de la mutante *leu4Δ* sobre el crecimiento en medio mínimo etanol-amonio, por lo que es probable que esta proteína juegue un papel más importante en este contexto metabólico.

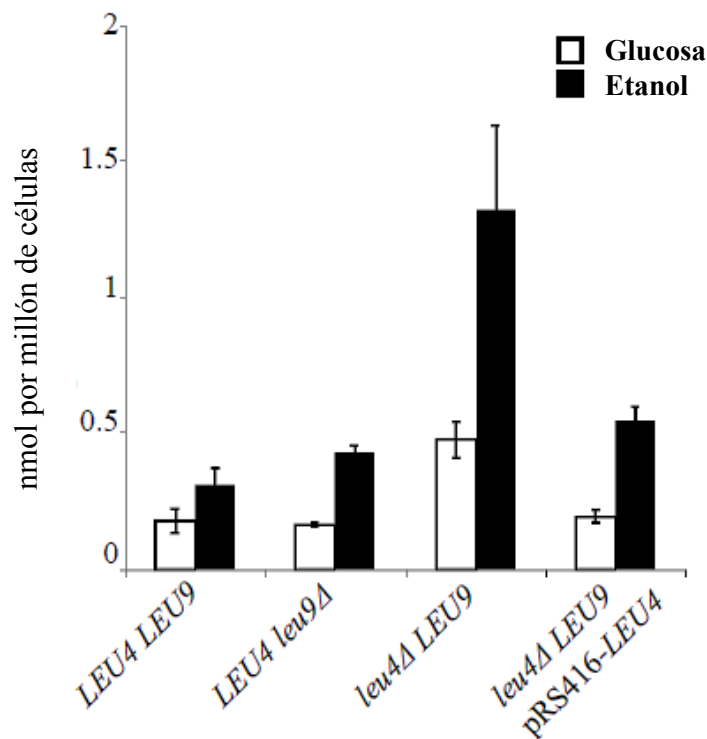


Figura 13. La mutante *leu4Δ LEU9* presentó una mayor concentración intracelular de leucina que la cepa silvestre *LEU4 LEU9*. Las pozas de leucina de las cepas mencionadas se obtuvieron a partir de cultivos que crecieron en medio mínimo glucosa amonio o etanol amonio $OD_{600} \sim 0.6$.

***LEU4* y *LEU9* tienen perfiles de expresión distintos y sus productos de síntesis presentan diferentes actividades específicas**

Los procesos celulares se encuentran en cambio constante; asimismo, genes y proteínas se ven sujetos a este tipo de fluctuaciones, las cuales son metabólicamente dependientes (DeLuna *et al.*, 2001., Entian *et al.*, 1987., Quezada *et al.*, 2008). En este estudio se compararon los niveles de los transcritos de los genes *LEU4* y *LEU9* mediante análisis de northern blot (Figura 14A), así

como la concentración relativa de las isoenzimas Leu4 y Leu9 durante el metabolismo fermentativo y respiratorio (crecimiento en glucosa y crecimiento en etanol. Figura 14B). Los niveles del transcrito de *LEU4* aumentan durante el crecimiento en etanol comparado con el de glucosa, mientras que el nivel de transcrito de *LEU9* es casi idéntico en ambas fuentes de carbono; sin embargo y de manera sorprendente, aumenta en mutantes *leu4Δ* (figura 14A), el mecanismo involucrado en este tipo de regulación se desconoce, aunque existen reportes donde la concentración de una proteína aumenta en ausencia de su parálogo como una forma de contrarrestar el efecto a dicha ausencia.

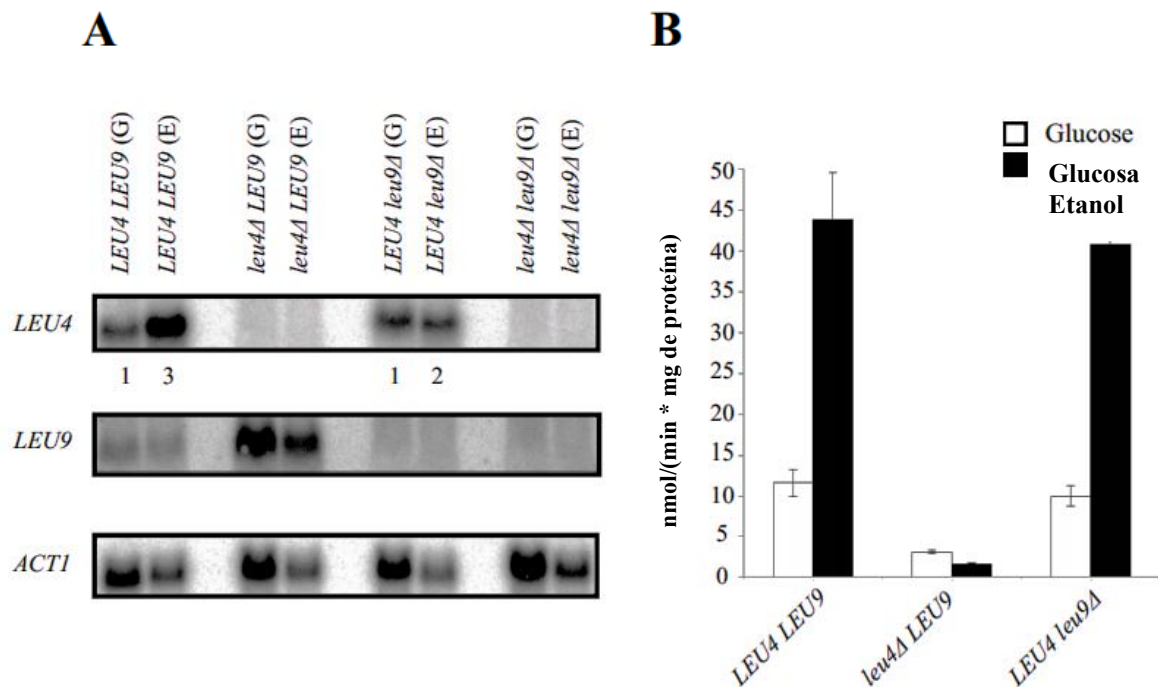


Figura 14. **A**. El análisis de northern blot indica que la acumulación del mensajero *LEU4* es mayor en etanol que en glucosa, mientras que el mensajero de *LEU9* se incrementa en una mutante *leu4Δ*. **B**. La actividad específica de α -IPMS es mayor en Leu4 que en Leu9 en tanto en glucosa como en etanol. Las cepas en ambos experimentos se crecieron en medio mínimo glucosa amonio y etanol amonio OD₆₀₀ ~0.6.

Leu4 es la isoforma predominante tanto en glucosa como en etanol

Se determinó la actividad específica de las α -IPMS en extractos celulares provenientes de las cepas *LEU4 LEU9*, *leu4Δ LEU9*, *LEU4 leu9Δ*, con el objetivo de determinar la contribución de Leu4 y Leu9 durante el crecimiento en glucosa y en etanol (Figura 14B). En en ambas condiciones metabólicas Leu4 aportó una mayor actividad específica. Para responder a la interrogante de si esta isoenzima tenía una mayor capacidad catalítica o simplemente si esa diferencia de actividad estaba relacionada a una mayor concentración relativa de la enzima, se procedió a realizar citometría de flujo en las cepas Leu4-yECitrine y Leu9-yECitrine. En dichos

análisis se determinó que la isoenzima Leu4- mostró una mayor prevalencia que Leu9 y por lo tanto, las diferencias de actividad específica están asociadas a una mayor concentración de Leu4, la cual aumenta a más del doble en etanol amonio (metabolismo respiratorio, Figura 15). Es probable que debido a esto, se observe un efecto más marcado en el crecimiento de la mutante *leu4Δ* durante la respiración, es decir, en condiciones respiratorias, la isoforma ideal para producir α -IPM es Leu4. De manera opuesta, la concentración de Leu9 disminuye casi 5 veces cuando pasa de glucosa a etanol. Esto sugiere que hay un mecanismo regulatorio a nivel transcripcional o postraduccional que evita la presencia de esta isoforma durante la respiración.

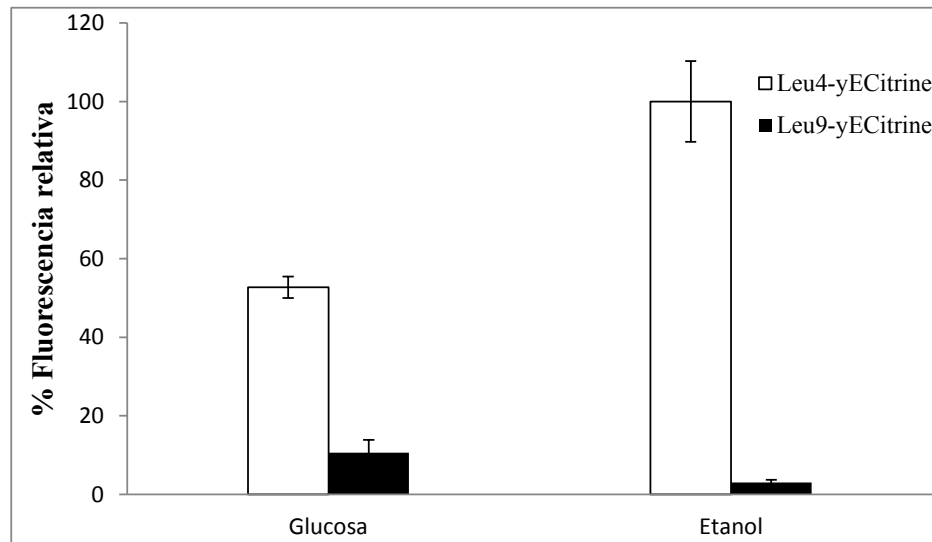


Figura 15. Leu4 es la isoforma predominante tanto en glucosa como en etanol. Los análisis de citometría de flujo se realizaron sobre cepas de α -IPMS etiquetadas con yECitrine que crecieron en glucosa amonio o etanol amonio $OD_{600} \sim 0.6$. Se grabaron 10 00 eventos y se determinó la fluorescencia relativa de acuerdo a Kojima *et al.*, 2011.

Las α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9 se localizan en la mitocondria y forman complejos hetero-oligoméricos *in vivo*

Como se describió previamente, se determinaron asociaciones hetero-oligoméricas mediante BiFC entre una serie de proteínas parálogas (Figura 11). En este estudio se determinó que Leu4 y Leu9 se encuentran en la mitocondria y durante el crecimiento en glucosa forman hetero-oligómeros Leu4-Leu9 (Figura 16). Para validar los ensayos de BiFC en la mitocondria, se utilizó como control positivo la cepa diploide (*BAT1-yN-URA3/BAT1-yC-HIS5*) que expresaba el fragmento yN fusionado al C-terminal de la proteína dimérica mitocondrial Bat1 (Branched chain amino transferase) y el fragmento yC también a Bat1 (cepa diploide BY-8205-703). Como control negativo mitocondrial se utilizó la cepa diploide (*BAT1pr-17 a.a-yN- URA3/ BAT1-yC-HIS5*) que expresaba la mitad yN fusionada al C-terminal de los primeros 17

aminoácidos de Bat1, los cuales se encargan de importar la mitad yN a la mitocondria, mientras que la mitad yC se fusionó al C-terminal de Bat1. La ausencia de fluorescencia en este control negativo confirma que la asociación de fragmentos complementarios de la yECitrine depende exclusivamente de una interacción directa entre las proteínas a las que están fusionados dichos fragmentos (Figura 16).

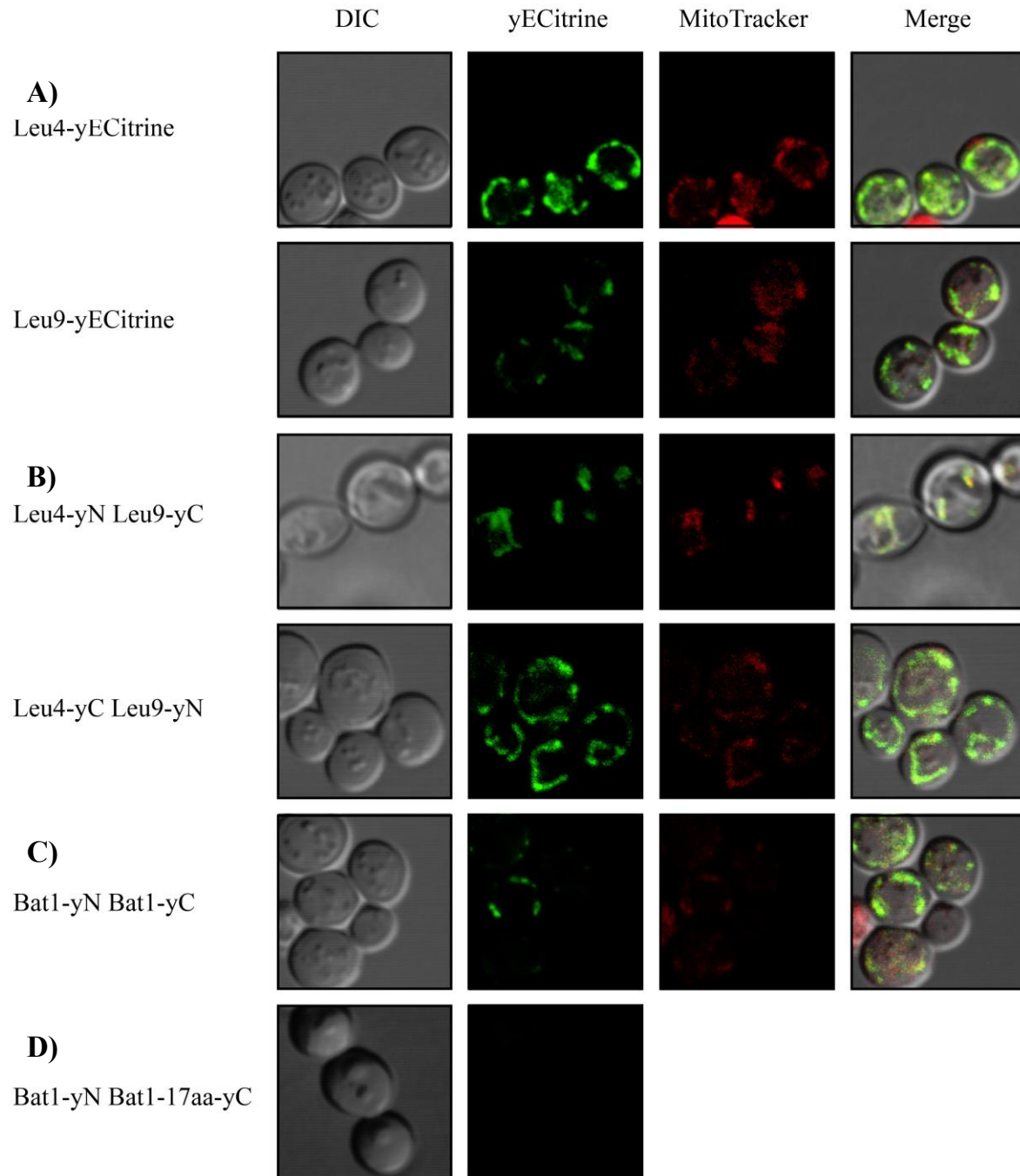


Figura 16. **A)** Localización subcelular de las enzimas Leu4 y Leu9. **B)** Determinación de interacciones entre las proteínas Leu4 y Leu9 mediante BIFC, la línea de abajo representan el recíproco, en las dos líneas los genes que

codifican para ambas proteínas se encuentran bajo el control de sus promotores endógenos. **C)** Control positivo de BiFC, para ello se ocupó la proteína dimerica Bat1 que también se localiza en mitocondria (Colón *et al*; 2011). **D)** Control negativo mitocondrial, la proteína Bat1 se marcó con el extremo yN mientras que los 17 aminoácidos que codifican para la señal de localización mitocondrial de Bat1 se encuentran fusionados al extremo yC de yECitrine (veáse material y métodos). Todas las cepas analizadas se crecieron en medio mínimo glucosa amonio OD₆₀₀ ~0.6.

Una vez determinada la interacción entre Leu4 y Leu9, se realizaron una serie de construcciones y cruza, con las mitades complementarias yN y yC, con el objetivo de determinar la prevalencia de los distintos arreglos homo y hetero-oligoméricos mediante citometría de flujo. Los análisis muestran que muy probablemente durante el crecimiento en medio mínimo glucosa amonio sólo existen dos isoformas de las α -IPMS, el homodímero Leu4 y el heterodímero Leu4-Leu9 (Figura 17).

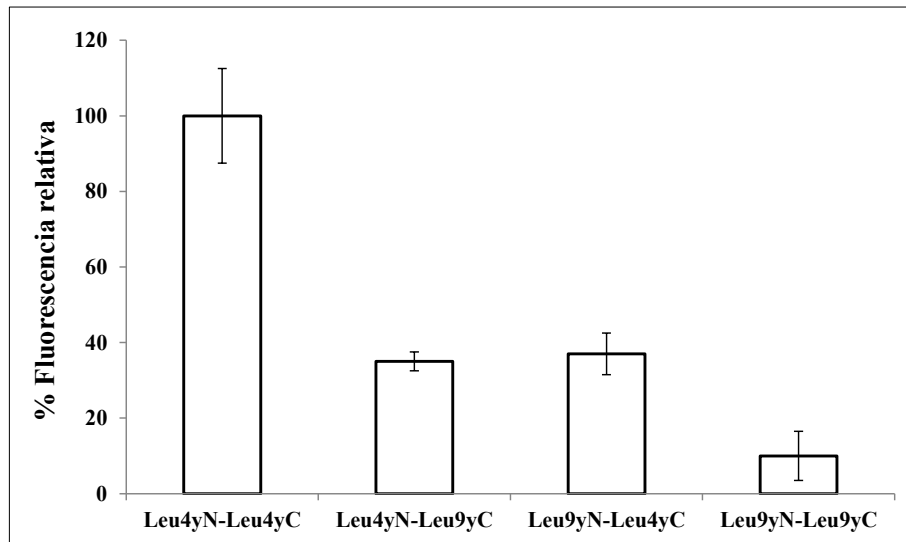


Figura 17. Análisis de citometría de flujo. Cepas diploides etiquetadas con las mitades complementarias yN y yC. La cepa Leu4yN-Leu4yC es la que presentó una mayor intensidad de fluorescencia; esto significa que la isoforma más abundante es el homo-oligómero Leu4. El hetero-oligómero Leu4yN-Leu9yC, -así como su recíproco Leu9yN-Leu4yC-, mostraron una intensidad de fluorescencia de alrededor del 35%. Sin embargo Leu9yN-Leu9yC mostró un valor cercano al 5%; por lo tanto, las isoformas que prevalecen son el homo-oligómero Leu4 y el hetero-oligómero Leu4-Leu9.

La diferentes isoenzimas de las α -IPMS se organizan como dímeros

Una parte importante de este trabajo consistió en determinar los parámetros cinéticos de los diferentes homo-oligómeros Leu4-Leu4, Leu9-Leu9 y el hetero-oligómero Leu4-Leu9, cuya existencia se había comprobado mediante BiFC. El primer paso para ello fue realizar quimeras de *LEU4*, *LEU9*, *LEU4 LEU9* bajo del promotor de alta expresión *ENO2*. Una vez realizadas estas construcciones, se hicieron análisis de northern blot, de las actividades enzimáticas y de citometría de flujo, con el objetivo de determinar su cambio en la cantidad de transcrito, de actividad específica, así como de su prevalencia relativa en comparación con la cepa silvestre (Figura 18).

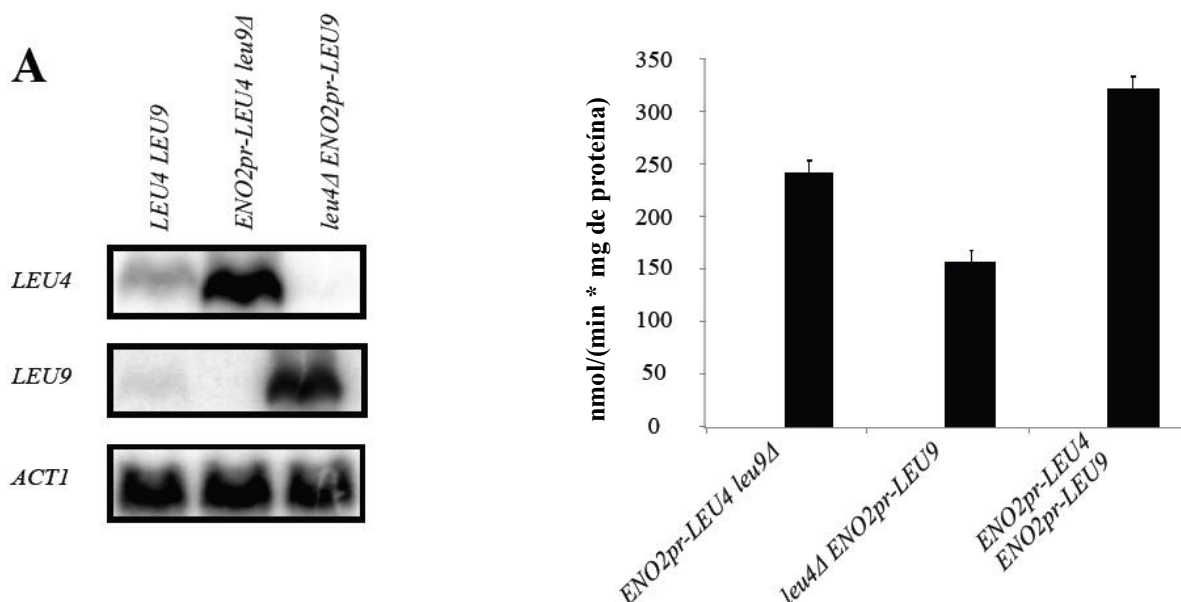


Figura 18. Los niveles de transcritos de las α -IPMS así como de sus productos de síntesis aumentan cuando se encuentran bajo el promotor de *ENO2*. **A** Niveles de transcritos. **B** Actividad específica.

Después de determinar que los niveles de transcritos y de la actividad enzimática aumentaron en cepas que expresaban los genes que codificaban para las α -IPMS, se procedió a purificar estas enzimas a partir de las cepas correspondientes *ENO2pr-LEU4 leu9Δ* (CLA11-704), *leu4Δ ENO2pr-LEU9* (CLA11-705) y *ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9* (CLA11-706); dichas enzimas fueron purificadas a partir de mitocondrias con un enriquecimiento de 30-, 26-, y 17-veces respectivamente (Tabla 4).

Proteína	Paso de purificación	Actividad total (unidades*)	Proteína total (mg)	Actividad específica (unidades/mg)	Veces de purificación	Recuperación (%)
Leu4-Leu4	Extracto crudo			0.24		
	Extracto mitocondrial	156.27	71.36	2.19	9.1	100
	Q sefarosa	60.04	8.34	7.20	30	38.42
Leu9-Leu9	Extracto crudo			0.16		
	Extracto mitocondrial	107.67	56.37	1.91	12	100
	Q sefarosa	40.82	9.72	4.20	26	37.91
Leu4-Leu9	Extracto crudo			0.32		
	Extracto mitocondrial	109.34	68.34	1.60	5	100
	Q sefarosa	59.69	10.47	5.70	17	54.59

Tabla 4. Purificación de las α -isopropilalato sintasas. * μ moles de acetil-CoA formados por minuto.

El gel desnaturante de SDS-PAGE mostró en todos los casos una banda a 68 kDa, la cual corresponde a los monómeros de las distintas isoenzimas de las α -IPMS (Figura 19).

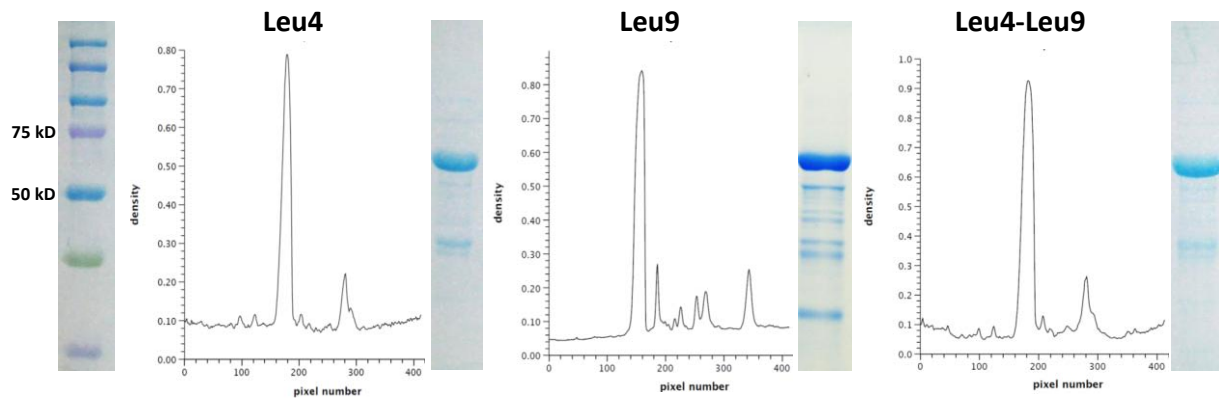


Figura 19. Análisis de densitometría en geles de SDS-PAGE. α -IPMS purificadas a partir de las cepas: *ENO2pr-LEU4 leu9 Δ* (CLA11-704) columna 1, *leu4 Δ ENO2pr-LEU9* (CLA11-705) columna 2 y *ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9* (CLA11-706) columna 3.

La organización oligomérica de las enzimas purificadas a partir de las cepas referidas se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular. El peso molecular de las enzimas en su estado nativo fue de 130-150 kDa, lo cual sugiere que todas ellas se organizan en forma de dímeros (Figura 20); para el caso de Leu4, esto ya se había reportado previamente (Tracy & Kohlhaw, 1977).

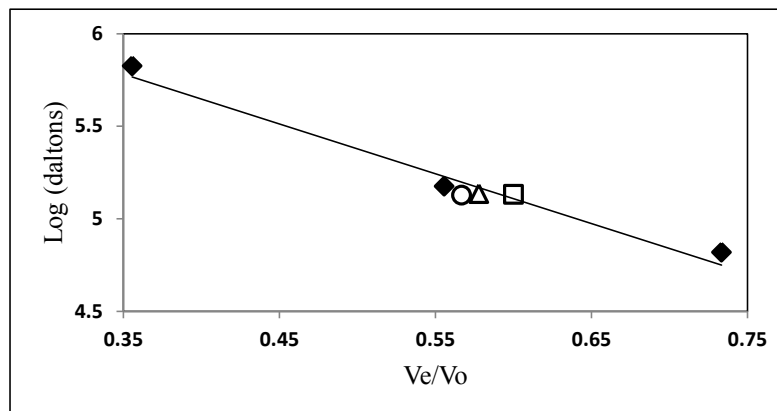


Figura 20. Curva de calibración para determinar la masa molecular de las α -IPMS. \circ Homodímero Leu4, Δ Homodímero Leu9, \square Heterodímero Leu4-Leu9. Las masas moleculares oscilaron entre 130-150 kDa.

La asociación heterodimérica Leu4-Leu9 se favorece por encima de las isoformas homodiméricas Leu4-Leu4 y Leu9-Leu9

Leu4 y Leu9 forman heterodímeros cuando sus genes se encuentran bajo promotores endógenos (Figura 16). Para determinar si la expresión simultánea de *LEU4* y *LEU9* bajo el

promotor de *ENO2* resultaba en la formación de heterodímeros Leu4-Leu9, se realizaron geles nativos de agarosa en cepas que tenían diferencialmente etiquetadas a las α -IPMS con yECitrine. Las cepas utilizadas fueron: *ENO2pr-LEU4-yECitrine leu9Δ* (CLA11-704-1), *leu4Δ ENO2pr-LEU9-yECitrine* (CLA11-705-1), *ENO2pr-LEU4-yECitrine ENO2pr-LEU9* (CLA11-706-1) y *ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9-yECitrine* (CLA11-706-2). Estas cepas se crecieron en YPGal (2%) y después se les adicionó glucosa al 10% (ver material y métodos). Se prepararon extractos crudos de proteína y se sometieron a electroforesis en un gel nativo de agarosa. En la figura 21 se muestran las diferencias de corrimiento electroforético dadas por los distintos puntos isoeléctricos de Leu4 (5.8) y Leu9 (6.7). En la línea 1 se cargó la proteína yECitrine como control; las bandas en las líneas 2 y 5 corresponden únicamente a homodímeros Leu4 y Leu9 respectivamente, mientras que las líneas 3 y 4 muestran una banda intermedia que corresponde a asociaciones heterodiméricas Leu4-Leu9. Estos resultados muestran que cuando ambas enzimas se encuentran expresadas de manera similiar, sólo se forman heterodímeros Leu4-Leu9, impidiendo con ello la formación de homodímeros de Leu4 o de Leu9.

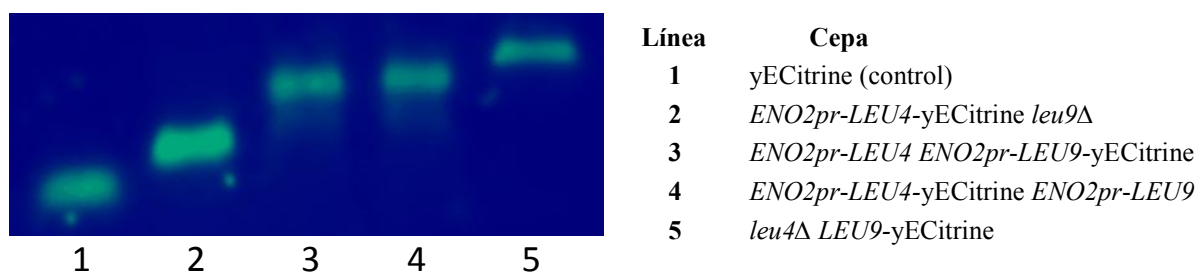


Figura 21. Separación por puntos isoeléctricos de las diferentes α -IPMS mediante gel nativo de agarosa. Cuando ambas isoenzimas se encuentran en concentraciones similares hay una preferencia en la formación de heterodímeros Leu4-Leu9 (líneas 3 y 4), lo que se refleja en un desplazamiento intermedio entre los homodímeros Leu4 y Leu9 (líneas 2 y 5 respectivamente).

En paralelo a los geles nativos de agarosa, se hicieron análisis de inhibición por leucina (IC_{50}) con extractos crudos en las cepas *ENO2pr-LEU4 leu9Δ* (CLA11-704), *leu4Δ ENO2pr-LEU9* (CLA11-705) y *ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9* (CLA11-706). Análisis de IC_{50} mostraron que en los homodímeros Leu4, Leu9 y en el heterodímero Leu4-Leu9, sólo se observan curvas de inhibición monofásica, las cuales mostraron una sensibilidad por leucina diferente para las tres enzimas (Figura 22A); esto indica que sólo existe un componente responsable del comportamiento monofásico en las curvas referidas. Sin embargo, cuando se mezclaron cantidades equimolares de Leu4 y Leu9, se formó una curva de inhibición bifásica (Figura 22B),

esto implicaría que en esa preparación existen dos componentes -es decir homodímeros Leu4 y Leu9- que actúan de manera independiente y que en el tubo de ensaye no pueden disociarse para formar complejos heterodiméricos. Estas observaciones indican también, que en los homodímeros Leu4 y Leu9, los sitios de unión al inhibidor, presentan una diferente afinidad por el mismo. Esto confirma, al igual que en la figura 21 que cuando coexisten ambas α -IPMS a concentraciones similares, se forma preferentemente el heterodímero Leu4-Leu9.

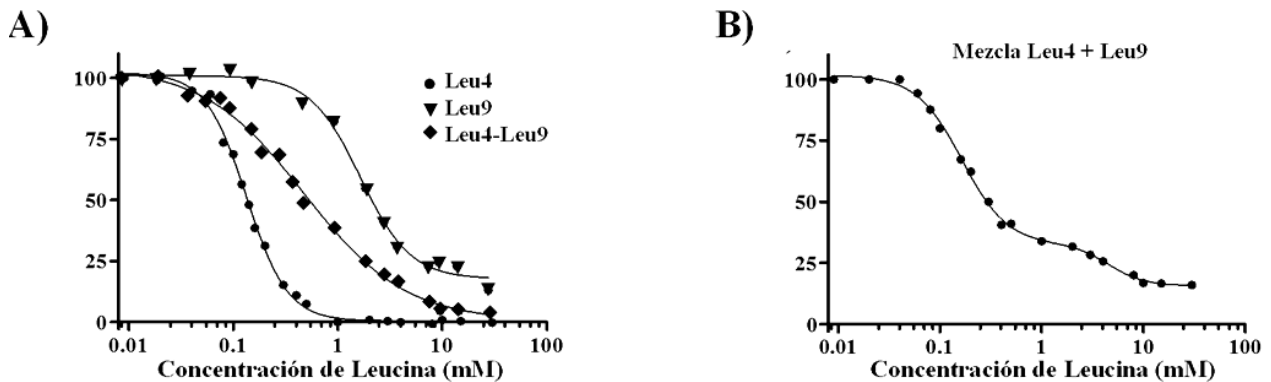


Figura 22. Análisis de IC₅₀ en extractos crudos de las cepas *ENO2pr-LEU4 leu9Δ*, *leu4Δ ENO2pr-LEU9* y *ENO2pr-LEU4 ENO2pr-LEU9*. A) ●Homodímero Leu4 (IC₅₀ 0.13 mM Leucina), ▼Homodímero Leu9 (IC₅₀ 1.78 mM Leucina), ◆Heterodímero Leu4-Leu9 (IC₅₀ 0.51 mM Leucina), B) Mezcla de concentraciones equimolares de homodímeros Leu4 y Leu9. Estos resultados son el promedio de al menos 2 experimentos independientes.

Una vez determinada la existencia de los homodímeros Leu4 y Leu9 y del heterodímero Leu4-Leu9, se estudiaron sus parámetros cinéticos con enzimas purificadas.

Los análisis cinéticos de los homodímeros y el heterodímero de las diferentes isoformas de α -IPMS muestran distintos patrones de sensibilidad a leucina

Un punto importante en este trabajo fue establecer los parámetros cinéticos de los homodímeros Leu4 y Leu9 y del heterodímero Leu4-Leu9; esto con la finalidad de determinar si habían adquirido diferentes capacidades catalíticas relacionadas con su afinidad por sustratos o su sensibilidad a leucina. Los análisis cinéticos se realizaron con enzimas purificadas. En ausencia de leucina, las tres isoenzimas mostraron una cinética hiperbólica y afinidades similares por los sustratos acetil-CoA (*K_a*) y α -KIV (*K_b*), así como su *k_{cat}* (Figura 23 y Tabla 5).

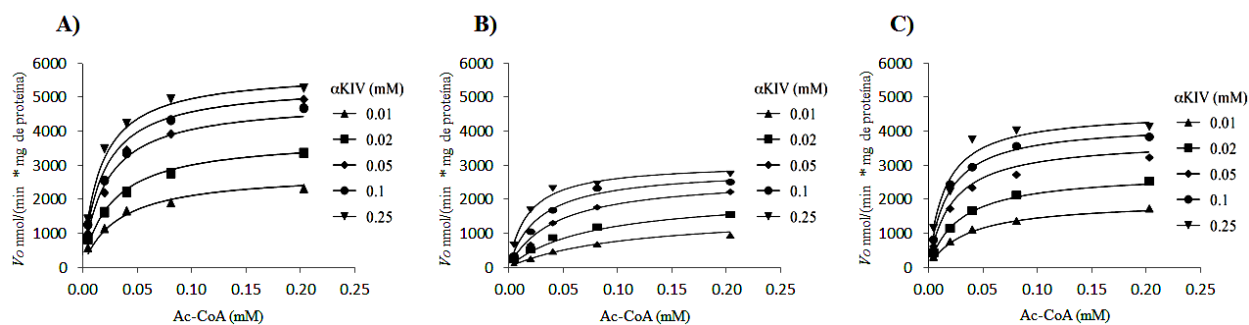


Figura 23. Curvas de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustratos. **A)** Homodímero Leu4, **B)** Homodímero Leu9, **C)** Heterodímero Leu4-Leu9. Las líneas continuas representan el ajuste global a la ecuación 1 descrita en material y métodos.

Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 1, la cual corresponde a una reacción ordenada bi-bi bajo en estado estacionario (Segel, 1993). A pesar que todas las propiedades cinéticas fueron similares, se observaron pequeñas diferencias en la K_{ia} , que corresponde a la constante de disociación que describe la asociación de la acetil-CoA con la enzima libre. El homodímero Leu9 mostró una afinidad menor por este sustrato en comparación con Leu4 y el heterodímero Leu4-Leu9 (Tabla 5). Las diferencias más marcadas se observaron cuando se analizó la inhibición por leucina. Dicho aminoácido actúa como un inhibidor mixto, lo cual implica que en presencia de leucina existe un decremento tanto por la afinidad por los sustratos, como de la V_{max} . Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 2, cuando la acetil-CoA fue el sustrato variable y a la ecuación 3, cuando el sustrato variable fue el α -KIV (Figura 24A-F). Este modelo predice que el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como a la enzima unida al sustrato; el primer proceso se ve reflejado en las constantes K_{is} , mientras que el segundo se observa en el valor de la K_{ii} (Tabla 5, ecuaciones 2 y 3). Estos valores están relacionados con la afinidad por leucina que presentan las distintas α -IPMS.

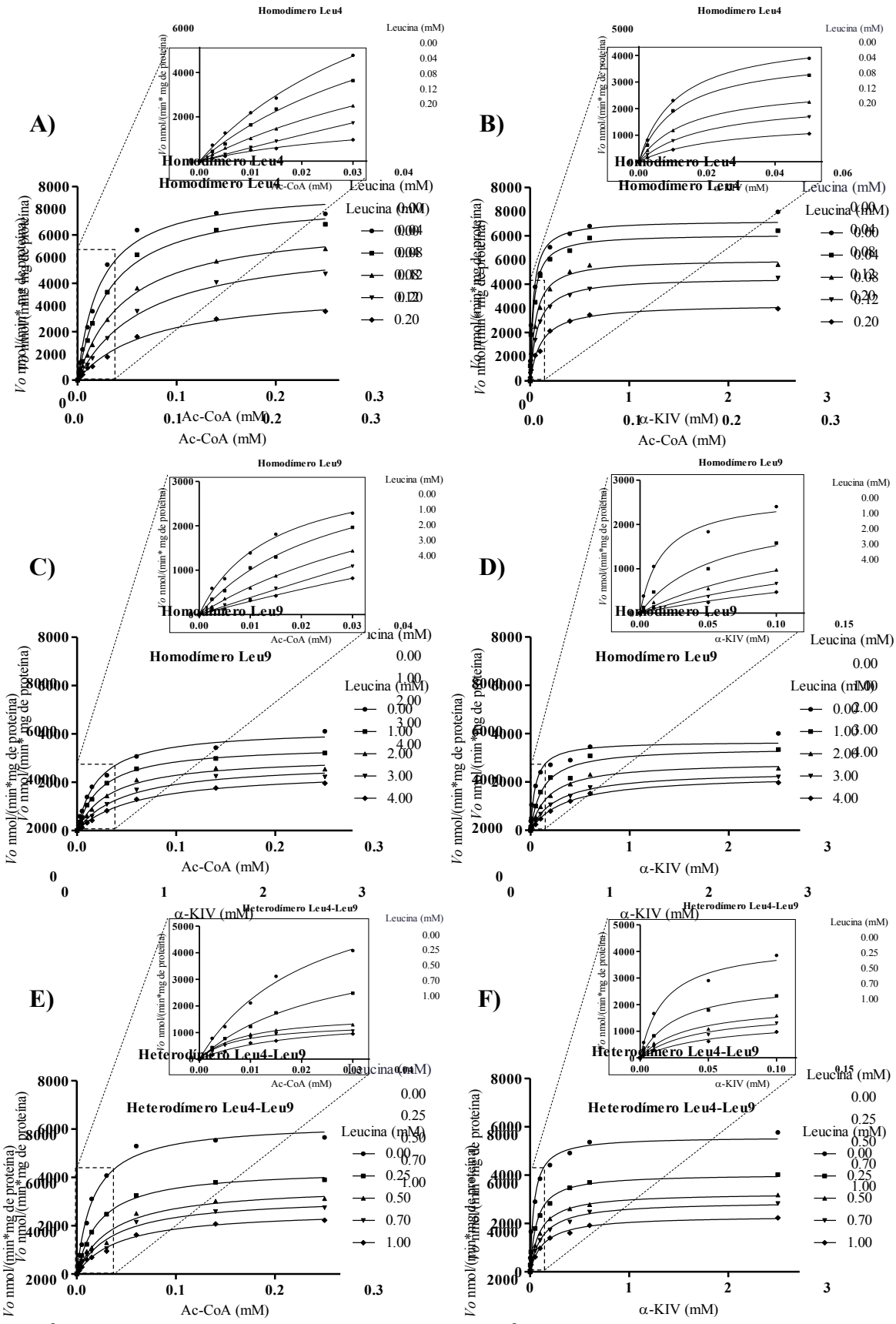


Figura 24. El heterodímero Leu4-Leu9 muestra una sensibilidad intermedia por leucina, en comparación con la isoforma resistente Leu9 y la isoforma sensible Leu4. Curvas de saturación a diferentes concentraciones de leucina.

A) y B) Homodímero Leu4. C) y D) Homodímero Leu9. E) y F) Heterodímero Leu4-Leu9. Las líneas continuas representan el ajuste global a las ecuaciones 2 ó 3.

El análisis cinético señala que el homodímero Leu9 es la isoforma menos sensible a la inhibición por leucina, mientras que el heterodímero mostró una sensibilidad intermedia por el inhibidor; la isoforma más sensible fue el homodímero Leu4 (Tabla 5). Dado que los niveles intracelulares de acetil-CoA son saturantes para las tres enzimas (0.23 mM, Quezada *et al.*, 2011) se puede considerar que la forma predominante es la enzima unida a la acetil-CoA para las tres isoformas. Si se supone que la concentración de α -KIV también es saturante, la constante de inhibición fisiológica de mayor relevancia es la *Kii*. El homodímero Leu9 mostró una *Kii* de 5.48, dicho valor es 24 veces mayor que el desplegado por Leu4 (*Kii* 0.226., Tabla 5). Esto lleva a proponer que Leu9 no es la enzima más adecuada para detectar la concentración de leucina y determinar el control del flujo a través de la vía biosintética.

Respecto al heterodímero Leu4-Leu9 (*Kii* 0.703), es importante mencionar que mostró una inhibición menor por leucina que el homodímero Leu4 (Tabla 5). La inhibición presente en el heterodímero, le permitiría a la célula acumular una concentración intracelular de leucina 3 veces mayor que la acumulada por el homodímero Leu4 (*Kii* 0.226).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de los homodímeros Leu4, Leu9 y del heterodímero Leu4-Leu9

	s ⁻¹		Mm			
	<i>Kcat</i>	<i>Ka</i> (Ac-CoA)	<i>Kia</i> (Ac-CoA)	<i>Kb</i> (α -KIV)	<i>Kis</i>	<i>Kii</i>
Leu4-Leu4	13.79	0.014 ± 0.002	0.047 ± 0.017	0.011 ± 0.002	0.048 ± 0.009	0.226 ± 0.045
Leu9-Leu9	7.28	0.009 ± 0.003	0.207 ± 0.078	0.009 ± 0.002	1.379 ± 0.202	5.448 ± 0.668
Leu4-Leu9	10.91	0.013 ± 0.002	0.047 ± 0.016	0.014 ± 0.003	0.207 ± 0.025	0.703 ± 0.047

Los valores representan el ajuste de los parámetros cinéticos. ± Error estándar. En todos los ajustes el valor de R^2 fue siempre mayor a 0.981. Valores similares de *Kis* y *Kii* fueron obtenidos a partir de la ecuación 2 ó 3 tal como se describió material y métodos.

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo se centró en determinar la existencia de interacciones entre proteínas parálogas, así como su impacto bioquímico y fisiológico en *S. cerevisiae*. Para ello se eligieron las α -IPMS Leu4 y Leu9. La diversificación funcional en estas proteínas ha seguido rutas diferentes asociadas a su regulación, sus efectos sobre la velocidad de crecimiento, las concentraciones intracelulares de leucina en las diferentes mutantes (*leu4* Δ , *leu9* Δ , *leu4* Δ *leu9* Δ) y la concentración relativa de las isoenzimas en un contexto metabólico determinado (glucosa vs etanol).

Ambas α -IPMS han diversificado también en su inhibición por leucina. Asimismo, se ha determinado una tercera isoenzima constituida por asociaciones heterodiméricas Leu4-Leu9, la cual presenta un grado de inhibición alostérica diferente a la de los homodímeros. Este heterodímero podría contribuir a una mayor versatilidad enzimática asociada a la producción del α -isopropilmalato, el cual presenta una función dual: la primera de ellas en la biosíntesis de leucina y la segunda asociada a la capacidad del regulador Leu3 (el α -IPM es un co-inductor de este regulador), para determinar el periodo de vida en la levadura (Garay *et al.*, 2014). Los resultados de este trabajo indican que la *K_{ii}* del heterodímero Leu4-Leu9 (0.703 mM) es similar a la concentración intracelular de leucina (0.60 mM., Kitamoto *et al.*, 1988), lo cual podría hacer que esta isoforma sea la más adecuada en el control de la biosíntesis de leucina, así como en el balance de flujo relacionado con los sustratos e intermediarios dentro de la vía durante la fermentación; esto se debe a que Leu4 a las concentraciones de leucina señaladas, estaría prácticamente inhibida; sin embargo, si sólo existiera Leu9, se comprometería la disponibilidad de los intermediarios únicamente hacia la biosíntesis de leucina. Por tal motivo, la isoforma Leu9 es la menos adecuada durante la respiración, pues justo en este escenario, los sustratos tienen un papel más importante. Estas observaciones se confirman con los datos de citometría de flujo, los cuales indican que Leu4 es la isoforma predominante durante el crecimiento en etanol como fuente de carbono (Figura 15).

Las diferentes mutantes generadas muestran que el papel más relevante lo realiza Leu4, la cual prevalece en las condiciones estudiadas; asimismo presenta una doble función: la primera de ellas en la producción de α -IPMS y la segunda como regulador de la concentración de Leu9. Se ha determinado que ambas isoenzimas juegan un papel importante durante el estrés oxidativo (Martínez-Pastor *et al.*, 2010) y en estas condiciones (YPD, H₂O₂ 5mM), la mutante *leu9* Δ

LEU4, presenta un menor crecimiento que la cepa silvestre, así mismo, se determinó que los niveles de Leu9 aumentaron de manera importante en estas condiciones, es muy probable que bajo este escenario de estrés, cuando Leu4 y Leu9 están a concentraciones similares, la isoforma que tendría el papel más relevante sería el heterodímero. Se requieren estudios a detalle para determinar la contribución de estas isoenzimas sobre la fisiología de *Saccharomyces cerevisiae*, durante el estrés oxidativo, para ello, se podrían llevar a cabo: análisis de pozas de leucina, determinación de crecimiento en mutantes, evaluación de las fluctuaciones de Leu4 y Leu9 marcadas con yECitrine mediante citometría de flujo y realizar geles nativos de agarosa en cepas etiquetadas con la misma proteína fluorescente, esto último para determinar la existencia de complejos homo y heterodiméricos.

Se ha establecido que la oligomerización de las proteínas es un fenómeno universal relacionado con una gran variedad de procesos celulares, de entre los que destacan: 1) el aumento en la estabilidad de complejos, 2) el incremento de la actividad enzimática, 3) la transducción de señales y el transporte de iones y moléculas a través de la membrana celular y 4) mecanismos adicionales de regulación, entre otros. El papel esencial que juega la oligomerización sugiere que existe una fuerte presión selectiva para mantener interfaces de interacción en todas las macromoléculas biológicas (Han *et al.*, 2007).

Análisis *in silico* muestran que la conservación de interacciones después de la duplicación génica es frecuente. Las interacciones homo-oligoméricas son importantes desde una perspectiva funcional y estructural, dado este escenario serían sistemáticamente seleccionadas a través de la evolución (Pereira-Leal *et al.*, 2007). Sin embargo, existen ejemplos donde se propone que la asimetría entre hetero-oligómeros de proteínas parálogas, podrían otorgar una mayor libertad evolutiva y por lo tanto, llegar a ser una fuente de innovación (Andreeva & Murzin, 2006., Ben-Shem *et al.*, 2004). La preferencia de asociación Leu4-Leu9 indica que evolutivamente se ha seleccionado un componente a nivel de interfaces, que da como resultado una enzima con propiedades inhibitorias intermedias a los homodímeros, esto implicaría que la formación de complejos hetero-oligoméricos, contribuye de manera importante en la versatilidad enzimática.

En este trabajo se analizaron las implicaciones bioquímicas y fisiológicas de las interacciones entre Leu4 y Leu9, asimismo, se determinó que cuando los genes que codifican para estas proteínas se expresan de manera simultánea, bajo el promotor de *ENO2*, la isoforma predominante es el complejo heterodimérico Leu4-Leu9 (Figura 21). Como se mencionó

previamente, esta evidencia resulta ser sumamente relevante ya que análisis estadísticos muestran una alta prevalencia en la formación de homodímeros, dado que el efecto de interfaces idénticas propicia una alta afinidad en la formación de dichos complejos. Ante tal escenario, se plantea que existe una presión de selección que favorece dichas asociaciones homo-oligoméricas (Lukatsky *et al.*, 2006). Se ha predicho que los heterodímeros tienen un efecto negativo sobre la adecuación, sin embargo, este tipo de estudios tienen un sesgo debido a que se han realizado en condiciones donde una de las proteínas parálogas está ausente o se expresa en menor proporción que la otra (Lukatsky *et al.*, 2007). El caso de la preferencia de asociación entre Leu4 y Leu9 cuando sus genes se expresan bajo el promotor de *ENO2* abre una ventana de posibilidades para analizar este fenómeno. Las preguntas a contestar son ¿qué sucedería con otros grupos de proteínas parálogas que interaccionan, si sus genes son expresados bajo promotores idénticos? ¿Habría una mayor prevalencia de homo o hetero-oligómeros? ¿Cuáles serían las ventajas bioquímicas, fisiológicas y evolutivas de dichas asociaciones? Estas preguntas no sólo serían relevantes para *S. cerevisiae*, sino para todas las especies y ello conllevaría a un nuevo paradigma dentro de los estudios bioquímicos y evolutivos actuales.

7. CONCLUSIONES

- La expresión de *LEU4* se induce en condiciones respiratorias, mientras que *LEU9* se induce en una mutante *leu4Δ*; el mecanismo regulatorio involucrado en este proceso se desconoce en la actualidad.
- La mutante *leu4Δ LEU9* presenta una mayor poza de leucina que la cepa silvestre *LEU4 LEU9* y la mutante *LEU4 leu9Δ*.
- La isoforma predominante en las condiciones estudiadas (glucosa vs etanol) es el homodímero Leu4. La presencia del homodímero Leu9 en etanol es marginal.
- Nuestros análisis sugieren que Leu4 tiene una función dual: la primera asociada a la producción de α -IPMS, mientras que la segunda es inhibir la concentración de Leu9 libre, formando para ello complejos heterodiméricos Leu4-Leu9.
- El heterodímero Leu4-Leu9 es la isoforma predominante cuando ambos genes se encuentran bajo el promotor de *ENO2*. Esto implicaría que probablemente y bajo las condiciones estudiadas, donde hay una mayor concentración de Leu4, no existen homodímeros de Leu9, si no que todos los monómeros de esta isoenzima están siendo captados por homodímeros de Leu4 para formar complejos heterodiméricos.
- Durante el crecimiento en glucosa las isoformas predominantes son el homodímero Leu4 y el heterodímero Leu4-Leu9, esto lleva a proponer que muy probable que no existan dímeros libres Leu9. En glucosa, como en etanol monómeros de Leu9 estarían asociándose de manera preferencial con monómeros de Leu4.
- La diferencia más importante de las 3 isoformas de α -IPMS radica en su inhibición por leucina.

- El heterodímero Leu4-Leu9 muestra una inhibición intermedia por leucina (IC_{50} 0.51 mM de Leucina) en comparación con los homodímeros Leu4 y Leu9 (0.13 mM y 1.78 mM de Leucina, respectivamente).
- La diversificación funcional en las α -IPMS en *S. cerevisiae* ha seguido rutas diferentes, esto repercute en su regulación transcripcional, sus efectos sobre la velocidad de crecimiento, las concentraciones intracelulares de leucina cuando se generan mutantes, las concentraciones relativas de isoenzimas en un contexto metabólico determinado, así como a su inhibición diferencial por leucina.

8. PERSPECTIVAS

Una de las implicaciones más interesantes en los procesos de oligomerización entre proteínas parálogas lo constituye el hecho de la distribución de estos oligómeros en un contexto metabólico determinado, es decir: ¿si las proteínas parálogas eventualmente pueden formar distintos homo y heterómeros, cuál es la prevalencia de estas distintas isoformas? ¿Habrá más homómeros que heterómeros o por el contrario serán más representativos los heterómeros?

El desarrollo de este trabajo plantea una serie de preguntas que pueden enriquecer nuestro entendimiento sobre el impacto de la hetero-oligomerización entre productos de genes duplicados, la versatilidad de las enzimas, así como su influencia en la evolución no solo de *S. cerevisiae* sino de las especies en general. Entre las preguntas que valen la pena atender están las siguientes:

- ¿Qué mecanismos regulatorios están implicados en la mutante *leu4Δ* que hace que *LEU9* se induzca?
- ¿Qué mecanismos determinan la preferencia de asociación entre los monómeros de Leu4 y Leu9? Análisis fisicoquímicos, de dinámica molecular, así como de cristalografía serán necesarios para responder a esta interrogante.
- ¿Cuál sería la tendencia de asociación entre diversas proteínas parálogas cuyos genes se encuentren expresados de manera similar? En el caso de las α -IPMS se favoreció el heterodímero Leu4-Leu9, análisis a gran escala podrían establecer principios de asociaciones que indiquen preferencias de asociación homo y heteroméricas. En la actualidad, se tiene contemplado implementar la metodología de complementación por fragmentos de DHFR (Dihydrofolate reductase, Tarassov *et al.*, 2008), para realizar análisis globales mediante el uso de robots, esto permitirá establecer preferencias de asociación entre homo y hetero-oligómeros codificados por genes duplicados.

- La diversificación funcional por la que han atravesado las α -IPMS Leu4 y Leu9, puede servir como modelo para estudiar la diversificación de estas enzimas en otras levaduras. Se sabe que en *S. cerevisiae*, la duplicación Leu4 y Leu9 ocurrió alrededor de hace 100 millones de años a partir de una duplicación total de su genoma; sin embargo, la levadura *Kluyveromyces lactis*, no atravesó por ese evento de duplicación total, pero tiene también dos α -IPMS denominadas *KILeu4* y *KILeu4bis*. Los estudios realizados hasta ahora por nuestro grupo de trabajo indican que estas enzimas tienen una localización subcelular distinta: *KILeu4* es citoplásmica, mientras que *KILeu4bis* es mitocondrial; mutantes sencillas de estas mismas isoenzimas no presentan fenotipo de crecimiento en comparación a las de *S. cerevisiae* y su regulación transcripcional no se ve afectada por el crecimiento en glucosa o etanol como fuente de carbono. Lo anterior sugiere, que enzimas parálogas con diferentes orígenes evolutivos presentan distintos patrones de divergencia funcional, bajo esta premisa, es necesario incorporar otras especies de levaduras, para tener un escenario más amplio sobre la diversificación y contribución de las diferentes α -IPMS en la evolución de los hemiascomicetos.

9. REFERENCIAS

- Andreeva A, Murzin AG. (2006). Evolution of protein fold in the presence of functional constraints. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 399-408.
- Archibald JM, Blouin C, Doolittle WF. (2001). Gene duplication and the evolution of group II chaperonins: implications for structure and function. *J Struct Biol* **135**: 157-69.
- Beltzer JP, Morris SR, Kohlhaw GB. (1988). Yeast LEU4 encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase. *J Biol Chem* **263**:368-74.
- Ben-Shem A, Frolow F, Nelson N. (2004). Evolution of photosystem I - from symmetry through pseudo-symmetry to asymmetry. *FEBS Lett* **564**:274-280.
- Boldogh IR, Pon LA. (2007). Purification and Subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol* **80**: 45-64.
- Byrne KP, Wolfe KH. (2005). The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* **15**:1456-61.
- Casalone E, Barberio C, Cavalieri D, Polsinelli M. (2000). Identification by functional analysis of the gene encoding alpha-isopropylmalate synthase II (LEU9) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:539-45.
- Chang LF, Cunningham TS, Gatzek PR, Chen WJ, Kohlhaw GB. (1984). Cloning and characterization of yeast Leu4, one of two genes responsible for alpha-isopropylmalate synthesis. *Genetics* **108**:91-106.
- Chang LF, Gatzek PR, Kohlhaw GB. (1985). Total deletion of yeast *LEU4*: further evidence for a second alpha-isopropylmalate synthase and evidence for tight *LEU4-MET4* linkage. *Gene* **33**:333-39.
- Contreras-Shannon V, Lin AP, McCammon MT, McAlister-Henn L. (2005). Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem* **280**:4469-75.
- Darwin, C.(1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life*. Murray. London.
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, González A. (2001). NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 43775-83.
- Duhne, M. (2012). Análisis in vivo de las interacciones oligoméricas de Eno1 y Eno2 en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura en IBB.UNAM.

Colón M, Hernández F, López K, Quezada H, González J, López G, *et al.* (2011). *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS ONE* **6**: e16099.

Cunchillos C, Lecointre G. (2003) Evolution of Amino Acid Metabolism Inferred through Cladistic Analysis. *J Biol Chem* **48**: 47960-70.

Entian KD, Meurer B, Kohler H, Mann K H, Mecke D. (1987). Studies on the regulation of enolases and compartmentation of cytosolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **923**:214-21.

Feller A, Ramos F, Pierard A, Dubois E. (1999). 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.

Ghaemmaghami S, Huh W-H, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure, O'shea KE, Weissman JS. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–41.

Garay E, Campos SE, González de la Cruz J, Gaspar AP, Jinich A, DeLuna A. (2014). High-resolution profiling of stationary-phase survival reveals yeast longevity factors and their genetic interactions. *PLoS Genet* **10**: e1004168.

Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141–47.

Gietz RD, Woods AR. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87–96.

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD., *et al.* (1996). Life with 6,000 genes. *Science* **274**: 546-67.

Han JH, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J. (2007). The folding and evolution of multidomain proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 319-30.

Höcker B. (2005). Directed evolution of ($\beta\alpha$)₈-barrel enzymes. *Biomol eng*: 31-38.

Höcker B, Claren J, Sterner R. (2004) Mimicking enzyme evolution by generating new ($\beta\alpha$)₈-barrels from ($\beta\alpha$)₄-half-barrels. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16448-53.

Horowitz NH. (1945). "On the evolution of biochemical syntheses." *Proc Natl Acad Sci USA* **31**: 153-7.

Horowitz NH. (1965). The evolution of biochemical syntheses-retrospect and prospect. In *Evolving Genes and Proteins*. V. Bryson and H. J. Vogel. New York, Academic Press.

HuhW-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS & O'shea KE. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686–91.

Jensen RA. (1976). "Enzyme recruitment in evolution of new function." *AnnuRev Microbiol* **30**: 409-25.

Kafri R, Levy M, Pilpel Y. (2006). The regulatory utilization of genetic redundancy through responsive backup circuits. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:11653-58.

Kerppola T. (2006)a. Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**:1278-86.

Kerppola T. (2006)b. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:449-56.

Keys DA & McAlister-Henn L. (1990). Subunit structure, expression, and function of NAD(H)-specific isocitrate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**: 4280-7.

Kimura M, Ohta T. (1974). On Some Principles Governing Molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 2848-52.

Kim R, Yokota H, Kim S-H. (2000). Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. *Anal Biochem* **282**: 147–49.

Kitamoto K, Yoshizawa K, Ohsumi Y, Anraku Y. 1988. Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**:2683–2686.

Kohlhaw GB. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**:1-15.

Kojima T, Karasawa S, Miyawaki, A, Tsumuraya T, Fujii I. (2011) Novel screening system for protein–protein interactions by bimolecular fluorescence. *J Biosci Bioeng* **111**: 397-401.

Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637-43.

Lang D, Thoma R, Henn-Sax M, Sterner R, Wilmanns M. (2000). Structural evidence for evolution of the β/α barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science* **289**: 1546-50.

Lashkari DA, DeRisi JS, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13057–62.

Li W-H, Graur D. (1991). Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts.

López G, Flores M, Duhne M, Sánchez J, Manjarrez A. (2011). En Mensaje Bioquímico, Vol. XXXV, 2011, 27-38. Álvarez, F.G., Bustos, J. I., Castañeda P. C., Guevara, F. J., Vázquez M. H. (eds). UNAM, México D.F.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–75.

Lukatsky DB, Zeldovich KB, Shakhnovich EI. (2006). Statistically enhanced self-attraction of random patterns. *Phys Rev Lett.* **97**:178101.

Lukatsky DB, Shakhnovich BE, Mintseris J, Shakhnovich EI. (2007). Structural similarity enhances interaction propensity of proteins. *J Mol Biol* **365**: 1596–1606.

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

Martínez-Pastor M, Proft A, Pascual-Ahuir A. (2010). Adaptive changes of the yeast mitochondrial proteome in response to salt stress. *OMICS* **14**: 541-52.

Miyawaki A. (2003). Visualisation of the spatial and temporal dynamics of intracellular signalling. *Dev Cell* **4**: 295-305.

Moore RC, Purugganan MD. (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 122-28

Müller HJ. (1935). The origination of chromatin deficiencies as minute deletions subject to insertion elsewhere. *Genetica* **17**:237–52.

Ohno S. (1970). Evolution by Gene Duplication. Heidelberg, Springer-Verlag.

Ohno S. (1999). Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-99. *Cell & developmental biology* **10**: 517-522.

Pereira-Leal JB, Levy ED, Kamp C, Teichmann SA. (2007). Evolution of protein complexes by duplication of homomeric interactions. *Genome Biol* **8**(4): R51.

Piskur J. (2001). Origin of the duplicated regions in yeast genomes. *Trends Genet* **17**: 302-303.

Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet* **22**(4):183-86.

Quezada H, Aranda C, DeLuna, A, Hernández H, Calcagno M, Marín-Hernández A, González A. (2008). Specialization of the paralogue LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **154**: 1656–67.

- Quezada H, Marín-Hernández A, Aguilar D, López G, Gallardo-Pérez JC., *et al.* (2011). The Lys20 homocitrate synthase isoform exerts most of the flux control over the lysine synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **82**: 578–90.
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Meth Enzymol* **91**: 49–60.
- Sheff MA, Thorn KS. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661-70.
- Segel IH. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and 733 Steady State Enzyme Systems*, New York: John Wiley & Sons, pp. 274-298.
- Selvin PR. (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol* **327**: 472-500.
- Struhl K, Davis RW. (1981) Transcription of the *HIS3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **152**: 535–52.
- Stryer L. (1987). Fluorescence energy transfer as spectroscopic ruler. *Annu RevBiochem* **47**: 819-46.
- Sung MK, Huh W-K. (2007). Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein–protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 767–75.
- Szczesna-Skorupa E, Mallah B, Kemper B. (2003). Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Cytochromes P450 2C2 and 2E1 Molecular Interactions in Living Cells. *J Biol Chem* **278**: 31269-76.
- Takanishi CL, Bykova EA, Cheng W, Zheng, J. (2003). GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Research* **1091**: 132-39.
- Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM., *et al.* (2008). An *in vivo* map of the yeast protein interactome. *Science* **320**: 1465–70.
- Thomas JH. (1993). Thinking about genetic redundancy. *Trends Genet* **9**: 395-99.
- Tracy WJ, Kohlhaw GB. (1977). Evidence for Two Distinct CoA Binding Sites on Yeast α -Isopropylmalate Synthase. *J Biol Chem* **252**: 4085-91.
- Ulm EH, Böhme R, Kohlhaw G. (1972). Alpha-isopropylmalate synthase from yeast: purification, kinetic studies, and effect of ligands on stability. *J Bacteriol* **110**:1118–26.
- Wach A, Brachat, A, Alberti-Segui C, Rebischung O, Philippsen P. (1997). Three new dominant drug resistant cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1065-75.
- Woese RC. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-71.

Wolfe KH, Shields DC. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-13.

Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *TREE* **18**: 292-98.

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**: 357-66.

10. ANEXO 1A

Lista de oligos para amplificar los módulos provenientes de los plásmidos pKT175-yECitrine-*URA3*, pKT175-yN155-*URA3* y pKT101-yC155-*HIS5*. Las construcciones provenientes del primer plásmido se utilizan para marcar por el extremo carboxilo con la proteína yECitrine, mientras que los dos restantes se ocupan para marcar con las mitades complementarias yN y yC de la proteína yECitrine y mediante cruzar realizar el análisis de interacción mediante BiFC. Los oligos son los mismos para los tres casos, lo único que cambia es el módulo del plásmido que amplifican. Las mayúsculas corresponden a la secuencia específica del gen, mientras que las minúsculas es la secuencia utilizada para amplificar el módulo.

>ACS1Fw Tag
5'-CATTGTCAAACCCTGGCATTGTTAGACATCTAATTGATTCGGTCAAGTTGggtgacggtgctggttta-3'
>ACS1Rv Tag
5'-AACACACGAAAAAAAAAAGTCGTCAATATAAAAAGGAAAGAAATCATCATcgtgaattcgagctcg-3'
>ACS2Fw Tag
5'-CTGCCATCATTCTGCTGTAGAGAACCAATTTTCTCTCAAAAAAAGAAAggtgacggtgctggttta-3'
>ACS2Rv Tag
5'-ACAGAAAAGGAGCGAAATTTTATCTCATTACGAAATTTTCTCATTTAAGtctgaattcgagctcg-3'
>ALD4 Fw Tag
5'-CTTTACAAAACACTTGAAGTTAAAGCGGTCCGTGCCAAATTGGACGAGggtgacggtgctggttta-3'
>ALD4 Rv Tag
5'-TTAATTTTATGTATGTAAGCATCGATTGGACACCAGGCTTATTGATGACCtctgaattcgagctcg-3'
>ALD6 Fw Tag
5'-AAGAAGTCTACCATGCATACACTGAAGTAAAAGCTGTCAGAATTAAGTTGggtgacggtgctggttta-3'
>ALD6 Rv Tag
5'-TATATGAAAGTATTTTGTGTATATGACGGAAAGAAATGCAGGTTGGTACAtcgtgaattcgagctcg-3'
>ENO1Fw Tag
5'-GTGACAACGCTGTTTTCGCTGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAATTAggtgacggtgctggttta-3'
>ENO1Rv Tag
5'-TAAATGACAAAAAACGTGTTTTTTGGACTAGAAGGCTTAATCAAAAGCTtctgaattcgagctcg-3'
>ENO2Fw Tag
5'-GTGACAAGGCTGTCTACGCCGGTGAAAACCTCCACCACGGTGACAAGTTGggtgacggtgctggttta-3'
>ENO2Rv Tag
5'-ATGATGAAAAATAAGCAGAAAAGACTAATAATTCTTAGTTAAAAGCACTtctgaattcgagctcg-3'
>GDH1Fw Tag
5'-CAAGGTCTCTGATGCTATGTTTGACCAAGGTGATGTATTTggtgacggtgctggttta-3'
>GDH1Rv Tag
5'-TTTTATGAACTTCCTCTTTCTTTCTTTTAGACTATTTAtcgtgaattcgagctcg-3'
>GDH3Fw Tag
5'-CATGGTGGCTGACGCAATGCTTGACCAGGGAGACGTTTTTggtgacggtgctggttta-3'
>GDH3Rv Tag
5'-CAGATAGTTACGAACAAAAAGAAAATAGCGCTTACGGCTAtcgtgaattcgagctcg-3'

>HXK1Fw Tag
5'- TGTCCGAAAAAAGAATTGCCGAAGGTAAGTCTCTTGGTATCATTGGCGCTggtgacggtgctggttta-3'
>HXK1Rv Tag
5'- TAATATTAAGGGAGGGAAAAACACATTTATATTTTCATTACATTTTTTTTCatcgatgaattcgagctcg-3'

>LEU4Fw Tag
5'-CATCTTTGGCCGAGGTCGAAGGTAAGAATGCTGCGGCATCTGGCTCTGCAggtgacggtgctggttta-3'
>LEU4Rv Tag
5'-AAGTATAGAAATAAATAGAAGCGAATAAGTCCTGAAATACAGAAAAGTTCtcatgaattcgagctcg-3'

>LEU9FwTag
5'-TTGCTACTGTCAATAATATTATTCATTCCGGGGATGTTCTACTGGCAGAGggtgacggtgctggttta-3'
>LEU9RvTag
5'-TAAAAATACATATATATATAACATGAGTAATCATAAGCTACTCCTTTCTAtcgatgaattcgagctcg-3'

>LYS20Fw Tag
5'-GGCCACCATCCCCGCCCAAGCGGACTAAGCCATCCGCCggtgacggtgctggttta-3'
>LYS20Rv Tag
5'-AATAAGTGAAAGAACATAATGTAATGGTTTGGGAACGTTAtcgatgaattcgagctcg-3'

>LYS21Fw Tag
5'-TTCCAATGGGCATGTTTCTAAAAAGGCAAAGGTCACCAAAGgtgacggtgctggttta-3'
>LYS21Rv Tag
5'-GTATGTTTGAATATGTGTACTATATATAATGAACTAtcgatgaattcgagctcg-3'

>PYC1Fw Tag
5'-CTGATTTATTAGTTCTATTAGAAGACCAAGTTCCTGTTGAAACTAAGGCAggtgacggtgctggttta-3'
>PYC1Rv Tag
5'-AATAAATAAGATTCGGGTATATTATACATTATAAATGAGAACTAACCGGTtcatgaattcgagctcg-3'

>PYC2Fw Tag
5'-ATTTGTTGGTTGTCTAGAGAAGAAGAAACCCTACCCCCATCCCCAAAAAAGggtgacggtgctggttta-3'
>PYC2Rv Tag
5'-AGTACAGCTAGTATTTTCAGATGTCATAAAATATAATTAACGAGTAAAAAtcatgaattcgagctcg-3'

>PYK1Fw Tag
5'-GTTTCAAGGCCGGTGTCTGGTCACTCCAACACTTTGCAAGTCTCTACCGTTggtgacggtgctggttta-3'
>PYK1Rv Tag
5'-AAAAATATAATTCAAAAAAATAATATCTTCATTCAATCATGATTCTTTTTtcatgaattcgagctcg-3'

>PYK2Fw Tag
5'-GAGTCGGCCATTCCAATACCTTACGCATTTCTACTGTTGGTCAAGAATTCggtgacggtgctggttta-3'
>PYK2Rv Tag
5'-ATGGACAATTAATAAAATTAAGTAAAAAATAAAGGACTTTAATTTTTAtcgatgaattcgagctcg-3'

>TDH1Fw Tag
5'-ACGGTACTCCGCCAGAGTTGTTGACTTGATCGAATATGTTGCCAAGGCTggtgacggtgctggttta-3'
>TDH1Rv Tag
5'-ATTTATGTATATTCAAAAAAATCATTATCCTCATCAAGATTGCTTTATtcatgaattcgagctcg-3'

>TDH2Fw Tag
5'-ACGGTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTggtgacggtgctggttta-3'

>TDH2Rv Tag
5'-AATTATTAATAATAAAAACTAAATCATTAAGTAAGTAAAGGAGTTAAATtcgatgaattcgagctcg-3'

>TDH3Fw Tag
5'-ACGGTACTCTACCAGAGTTGTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTggtgacggtgctggtta-3'
>TDH3Rv Tag
5'-AAGCTATAAAAAGAAAATTTATTTAAATGCAAGATTTAAAGTAAATTCACtcgatgaattcgagctcg-3'

>URA7Fw Tag
5'-TCATTGAAGGTAAGTACGATCTTGAGGCCGCGAAAACAAATTCAACTTggtgacggtgctggtta-3'
>URA7Rv Tag
5'-AGAAATTTATCTTTGTTAATGCAGTAGACTTTTAATTCTAAAATTTTGATtcgatgaattcgagctcg-3'

>URA8Fw Tag
5'-CAAGACCGTTTTGGGGCTTGTGGCCGACGCTCCGACACTTGGTGAAGggtgacggtgctggtta-3'
>URA8Rv Tag
5'-CGCATCAATTCATTCATTTTCATTTCCCTCGCTTAGATTTATGTCCTTGAtcgatgaattcgagctcg-3'

Oligos de Confirmación. Los siguientes oligos se utilizaron para confirmar las cepas transformadas y todos se encuentran ~300pb antes del codón de término (oligos Fw) y ~300pb después del codón de término (oligos Rv).

>ACS1Fw Conf 5'-CGTGTAGACGATGTGGTGAAC-3'
>ACS1Rv Conf 5'-GTCATGTGTAAGACGGCTAGG-3'

>ACS2Fw Conf 5'-AGCTGCTGTTGTCGGTATTCC-3'
>ACS2Rv Conf 5'-CCCGTAACCTTCTCGTAATGC-3'

>ALD4Fw Conf 5'-GGCGAACGATTCTGAATACGG-3'
>ALD4Rv Conf 5'-CTGCTAACTGGGTGGTGTG-3'

>ALD6Fw Conf 5'-CCAGTTGTCAGTGTGCGAAAG-3'
>ALD6Rv Conf 5'-CATTGCAGCGGTATTGTCAGG-3'

>ENO1Fw Conf 5'-CATCAAGGCTGCTCAAGACTC-3'
>ENO1Rv Conf 5'-GCACATACGACACATCCTCTC-3'

>ENO2Fw Conf 5'-CACCAACCCAGCTAGAATTGC-3'
>ENO2Rv Conf 5'-GCCACCATTCAAAGACGACAC-3'

>GDH1Fw Conf 5'-AGGCTGCTAACTTGGGTGGTGTG-3'
>GDH1Rv Conf 5'-GGTGTCCAATCGATGCTTACATAC-3'

>GDH3Fw Conf 5'-ATGATCAACTGCTTCAACGACTGC-3'
>GDH3Rv Conf 5'-ACATGTAATCTCCTACCCGAC-3'

>HXK1Fw Conf 5'-GTGCAGGTGCTGCTGTTATTG-3'
>HXK1Rv Conf 5'-TGGAAGGGTCGTACCAGAAAG-3'

>HXK2Fw Conf 5'-GGTGCTAGAGCTGCTAGATTG-3'
>HXK2Rv Conf 5'-TAAGCGTAGTGAGGTGGAGAC-3'

>LEU4FwConf 5'-CGCAAGCTGCTTCTTACATCC-3'
>LEU4RvConf 5'-CTGGGCCACCTTAGATTTACC-3'

>LEU9FwConf 5'-TGCAACCCAAGCGGCATCTTT-3'
>LEU9RvConf 5'-CCAGTGATGGCACCAACAAAC-3'

>LYS20Fw Conf 5'-AGCTGGGTGATGTCAGATCGCTGA-3'
>LYS20Rv Conf 5'-GATGGGTGTCAGCAACTAGACAGT-3'

>LYS21Fw Conf 5'-AGAGATATATCCACTTCGCCAACA-3'
>LYS21Rv Conf 5'-CTCAATTGAACATCGGAGTAGGAG-3'

>PYC1Fw Conf 5'-CAGGCTGTGGGTGATTTGAAC-3'
>PYC1Rv Conf 5'-CAAGGTACGGTGTGCAATCTG-3'

>PYC2Fw Conf 5'-CACCAGCAGAACCTGATGAAG-3'
>PYC2Rv Conf 5'-GCGCTGGAATGGTCTAAGAAG-3'

>PYK1Fw Conf 5'-CTGAAACCGCTGTCATTGCTG-3'
>PYK1Rv Conf 5'-TAGCGTATCCTTTCGCCATCC-3'

>PYK2Fw Conf 5'-TGAACCGAAACGCCTAGACGA-3'
>PYK2Rv Conf 5'-GCAGAAGTAAGGCACGACTTG-3'

>TDH1Fw Conf 5'-AAGATGCCGTTGTCTCCTCTG-3'
>TDH1Rv Conf 5'-GTGGTCGTGGAACCTGCATAG-3'

>TDH2Fw Conf 5'-GCTGTTGTCTCCTCTGACTTC-3'
>TDH2Rv Conf 5'-GGGCCGCAGATTCCAATATAC-3'

>TDH3Fw Conf 5'-AAGGCTGTCGGTAAGGTCTTG-3'
>TDH3Rv Conf 5'-GATGGCTGTACCGATAGGAAC-3'

>URA7FwConf 5'-GACACTGGAAAGCGTTGTGAG-3'
>URA7RvConf 5'-CCATTGCGATGTGGGTGTTTG-3'

>URA8FwConf 5'-GGCACGATGAGATTGGGTTTG-3'
>URA8RvConf 5'-TCGCTGGTAACAGTCCTAACG-3'

11. ANEXO 1B

Nombre	Secuencia	Aplicación
G1	5'-GTGCGCTTTATTGACGAGAGTCTG-3'	<i>ScLEU4</i> Fw Secuencia para amplificar -915 pb de <i>LEU4</i> y el cassette <i>kanMX4</i> en la cepa Y37237.
G2	5'-CCATATCTAGGGCTAGTGCTTGTT-3'	<i>ScLEU4</i> Rv Secuencia para amplificar 142 pb río abajo del codón de paro de <i>LEU4</i> y el cassette de <i>kanMX4</i> en la cepa Y37237.
G3	5'-CCTCTTCATCATCTGTGGAGACAC-3'	<i>ScLEU9</i> Fw Secuencia para amplificar -720 pb de <i>LEU9</i> y el cassette <i>kanMX4</i> en la cepa Y32364.
G4	5'-CACTTCTTCGATGTCTGTGTGGAA-3'	<i>ScLEU9</i> Rv Secuencia para amplificar 117 pb río abajo del codón de paro de <i>LEU4</i> y el cassette <i>kanMX4</i> en la cepa Y32364.
G9	5'-TTAGTTTCTTTCATAACACCAAGCAACTAATACTATAACATAAATAATAatggtaaagagagtattattgc-3'	<i>ScENO2pr-LEU4</i> Fw 50 pb río arriba del codón de inicio de <i>ENO2</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar el ORF de <i>LEU4</i> (minúsculas).
G10	5'-ATGATGAAAAAATAAGCAGAAAGACTAATAATTCTTAGTTAAAGCACTttatgcagagccagatgccgc-3'	<i>ScENO2pr-LEU4</i> Rv 50 pb río abajo del codón de término de <i>ENO2</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar el ORF de <i>LEU4</i> (minúsculas).
G11	5'-TTAGTTTCTTTCATAACACCAAGCAACTAATACTATAACATACAATAATAatggtaaacattcgttcatag-3'	<i>ScENO2pr-LEU9</i> Fw 50 pb río arriba del codón de inicio de <i>ENO2</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar el ORF de <i>LEU9</i> (minúsculas).
G12	5'-ATGATGAAAAAATAAGCAGAAAGACTAATAATTCTTAGTTAAAGCACTttactctgccagtagaacatc-3'	<i>ScENO2pr-LEU9</i> Rv 50 pb río abajo del codón de término de <i>ENO2</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar el ORF de <i>LEU9</i> (minúsculas).
G13	5'-TGGTTACCAAGAAGATGCCGC-3'	Construcción de <i>ScENO2pr-LEU4</i> . Fw Secuencia para amplificar <i>ScENO2pr-LEU4</i> en la cepa <i>CLA11-704</i> .
G14	5'-CAGGTATCATCTCCATCTCC-3'	Construcción de <i>ScENO2Pr-LEU4</i> . Rv Secuencia para amplificar <i>ScENO2pr-LEU4</i> en la cepa <i>CLA11-704</i> .
G15	5'-ACTAGAAGTTTACTGTAGACTTTTTCTTACAAAAAGACAAGGAACAATCtggttaccaagaagatgccgc-3'	<i>ScENO2Pr-LEU4</i> Fw secuencia para recombinar 50 pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar <i>ENO2pr-LEU4</i> (minúsculas).
G16	5'-AAGTATAGAAATAAATAGAAAGCAATAAGTCCTGAAATACAGAAAAGTTCcaggtatcatctccatctccc-3'	<i>ScENO2Pr-LEU4</i> Rv secuencia para recombinar 50 pb río abajo del codón de término <i>LEU4</i> (mayúsculas), secuencia para amplificar <i>ENO2pr-LEU4</i> (minúsculas).
G65	5'-CTGACTCCTTGGGTAGAG-3'	<i>ScLEU4</i> Fw Secuencia para amplificar la sonda para el análisis de northern blot.
G66	5'-CTGTACCTTCAATATCGACG-3'	<i>ScLEU4</i> Rv Secuencia para amplificar la sonda para el análisis de northern blot.
G67	5'-AGATGCCTTAGGAAGAGAG-3'	<i>ScLEU9</i> Fw Secuencia para amplificar la sonda para el análisis de northern blot.
G68	5'-TCCGTAGCCTTCGATGTTG-3'	<i>ScLEU9</i> Rv Secuencia para amplificar la sonda para el análisis de northern blot.

12. PUBLICACIONES

A continuación se enlistan las publicaciones generadas durante el doctorado, tanto de primer autor como en colaboraciones realizadas.

López G, Quezada H, Duhne M, González J, Lezama M, *et al.*, (2015). Diversification of Paralogous α -Isopropylmalate Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **14**: 564-77.

Geovani López, Mirelle Flores, Mariana Duhne, Joao Sánchez y Alicia González. **Duplicación génica**: implicaciones bioquímicas, fisiológicas y evolutivas en *Saccharomyces cerevisiae*. Págs. 27-39. Mensaje Bioquímico 2011. **UNAM**.

Quezada H, Marín-Hernández A, Aguilar D, **López G**, Gallardo-Pérez JC, Jasso-Chávez R, González A, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. The Lys20 homocitrate synthase isoform exerts most of the flux control over the lysine synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2011 **82**:578-90.

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

Hernández, H., Aranda, C., **López, G.**, Riego, L., González, A. (2010). Hap2-3-5-Gln3 determine *GDH1* and *ASN1* transcriptional activation under repressive nitrogen sources in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* + 157: 879-89