



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Instituto de Fisiología Celular  
Bioquímica y Biología Estructural

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DEL GEN -TIPO ANCESTRAL- *KlGDH1* DE *Kluyveromyces lactis* Y *LkGDH1* DE *Lachancea kluyveri* VS LOS GENES PARÁLOGOS *GDH1/GDH3* DE *Saccharomyces cerevisiae***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:  
**BIÓL. JOSÉ CARLOS CAMPERO BASALDUA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Ma. Alicia González Manjarrez**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**COMITÉ TUTOR:** **Dra. Gloria Soberón Chávez**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
**Dr. Roberto Coria Ortega**  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., NOVIEMBRE 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**REGULACIÓN Y FUNCIÓN DEL GEN -TIPO ANCESTRAL- *K1GDH1* DE *Kluyveromyces lactis* Y *LkGDH1* DE *Lachancea kluyveri* VS LOS GENES PARÁLOGOS *GDH1/GDH3* DE *Saccharomyces cerevisiae***

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Dr. en Ciencias Biomédicas del programa de “Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México”.

El trabajo doctoral se llevo a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el departamento de Bioquímica y Biología Estructural.

El comité tutor estuvo formado por:

Dra. M. Alicia González Manjarrez Instituto de Fisiología Celular-UNAM

Dra. Gloria Soberón Chávez I. de Investigaciones Biomédicas-UNAM

Dr. Roberto Coria Or Instituto de Fisiología Celular-UNAM

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México), con el donativo número: CB-2014-239492-B; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo número: IN201015 (<http://dgapa.unam.mx>).

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por le CONACyT con un número de becario: 903025.

Se reconoce la ayuda del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)”, por el apoyo brindado para asistir a congresos y presentar los avances del proyecto.

Se agradece el apoyo brindado por la Química Beatriz Aguirre López, técnico del laboratorio de la Dra Alicia González.

# ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
ABREVIATURAS USADAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	12
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio	12
1.2 La Duplicación génica	13
1.3 El destino de los genes duplicados	16
1.4 El genoma de <i>S. cerevisiae</i>	17
1.5 La glutamato deshidrogenasa (Gdh) en <i>S. cerevisiae</i>	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
3. RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO	30
4. OBJETIVOS	32
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
5.1 Lista de cepas	34
5.2 Lista de plásmidos	35
5.3 Análisis <i>in silico</i> y obtención de codificantes y promotores	36
5.4 Diseño de oligonucleótidos	36
5.5 Extracción de DNA genómico en levadura	36
5.6 Construcción de mutantes nulas	37
5.7 Construcción de plásmidos	40
5.8 Condiciones de cultivo	43
5.9 Extracción de RNA total e Hibridación tipo Northern blot	43
5.10 Análisis de posicionamiento de nucleosomas	44
5.11 Extracción y cuantificación de proteínas en levadura	47
5.12 Determinación de actividad de NADP <sup>+</sup> -Gdh	48
5.13 Purificación de las proteínas NADP <sup>+</sup> -Gdh's	48

5.14 Extracción de metabolitos	51
5.15 Cinética de inhibición por glutámico	51
5.16 Análisis filogenético	51
6. RESULTADOS	54
6.1 Análisis de identidad entre las NADP <sup>+</sup> -Gdh's	54
6.2 Caracterización fenotípica	55
6.3 Análisis funcional basado en estudios de complementación	61
6.4 Perfil de expresión de los genes <i>ScGDH1</i> , <i>ScGDH3</i> , <i>LkGDH1</i> y <i>KlGDH1</i>	67
6.5 Purificación de las NADP <sup>+</sup> -Gdh's de <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> y <i>K. lactis</i>	71
6.6 Caracterización cinética de las NADP <sup>+</sup> -Gdh's de <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> y <i>K. lactis</i>	74
6.7 Poza intracelular de metabolitos	78
6.8 Cinética de Inhibición por glutámico	79
6.9 Relación evolutiva de las NADP <sup>+</sup> -Gdh's de levadura	81
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	84
7.1 La caracterización funcional fue necesaria para agrupar las NADP <sup>+</sup> -Gdh's en pares similares	84
7.2 Los pares de genes <i>ScGDH1/LkGDH1</i> y <i>ScGDH3/KlGDH1</i> muestran diferente complementación heteróloga	87
7.3 La comparación cinética agrupo a las enzimas <i>ScGdh1</i> y <i>LkGdh1</i> en un grupo diferente de las enzimas <i>ScGdh3</i> y <i>KlGdh1</i>	88
8. CONCLUSIONES	92
9. ANEXOS	94
10. APÉNDICES	113
11. BIBIOGRAFÍA	127

## ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS, ANEXOS Y APÉNDICES

CONTENIDO		Pág.
<b>Tablas</b>		
Tabla 1	Cepas usadas en este trabajo	34
Tabla 2	Plásmidos usados en este trabajo	35
Tabla 3	Velocidad de crecimiento y actividad específica de las cepas <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> y <i>K. lactis</i>	60
Tabla 4	Actividad de NADPH <sup>+</sup> - Gdh en las cepas complementadas	66
Tabla 5	Parámetros cinéticos de las NADP <sup>+</sup> - Gdh´s	77
Tabla 6	Poza intracelular de metabolitos	81
Tabla 7	Inhibiciones por glutámico	81
<b>Figuras</b>		
Fig 1.	Metabolismo central del nitrógeno	13
Fig 2.	Duplicación total del genoma en diferentes organismos	15
Fig 3.	Posible destino de genes duplicados	17
Fig 4.	Origen del linaje de <i>Saccharomyces</i> y <i>Kluyveromyces</i>	18
Fig 5.	Organización de genes duplicados en <i>S. cerevisiae</i>	19
Fig 6.	Árbol filogenético de los Ascomicetos	20
Fig 7.	Perfil de expresión del gen <i>GDH3</i>	24
Fig 8.	Estructura oligomérica y afinidad por $\alpha$ -KG de Gdh1 y Gdh3	25
Fig 9.	Construcción de mutantes	40
Fig 10.	Gel de digestión para generar monosomas	45
Fig 11.	Ensayo de posicionamiento de nucleosomas (NuSA)	46
Fig 12.	Sintenia de NADP <sup>+</sup> -Gdh´s	54
Fig 13.	Velocidad específica de crecimiento de las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	57
Fig 14.	Velocidad específica de crecimiento de las cepas de <i>L.</i>	57

*kluyveri* y *K. lactis*

Fig 15.	Complementación heteróloga de <i>S. cerevisiae</i>	62
Fig 16.	Complementación heteróloga de <i>L. kluyveri</i>	64
Fig 17.	Complementación heteróloga de <i>K. lactis</i>	65
Fig 18.	Perfil de expresión de los genes <i>ScGDH1</i> y <i>ScGDH3</i>	69
Fig 19.	Perfil de expresión de los genes <i>LkGDH1</i> y <i>KlGDH1</i>	70
Fig 20.	Inducción de las proteínas <i>ScGdh1</i> , <i>ScGdh3</i> , <i>LkGdh1</i> y <i>KlGdh1</i>	71
Fig 21.	Purificación de las proteínas <i>ScGdh1</i> , <i>ScGdh3</i> , <i>LkGdh1</i> y <i>KlGdh1</i>	72
Fig 22.	Cinética de pH	73
Fig 23.	Cinética de afinidad por $\alpha$ -KG	75
Fig 24.	Cinética de afinidad por NADPH	76
Fig 25.	Cinética de afinidad por NH <sub>4</sub> Cl	77
Fig 26.	Cinética de inhibición por glutámico	80
Fig 27.	Relación evolutiva de las NADP <sup>+</sup> -Gdh's de levadura	82

**Anexos**

Anexo 1	Oligonucleótidos usados para la construcción de cepas y plásmidos en este trabajo	94
Anexo 2	Oligonucleótidos usados para la generación de sondas para ensayos tipo Northern Blot	96
Anexo 3	Oligonucleótidos usados para el ensayo de NuSA	97
Anexo 4	Mapa de los plásmidos usados en el presente estudio	105
Anexo 5	Especies usadas para el alineamiento entre Gdh's	111

**Apéndices**

Apéndice A	Transformación de levadura por acetato de litio	113
Apéndice B	Obtención de DNA genómico de levadura	114
Apéndice C	Obtención de RNA total de <i>S. cerevisiae</i>	115
Apéndice D	Determinación de proteína por Lowry	118

Apéndice E	Preparación de cocteles para medir actividad de NADP <sup>+</sup> -Gdh en <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> y <i>K. lactis</i>	120
Apéndice F	Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de las NADP <sup>+</sup> -Gdh's de <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> y <i>K. lactis</i>	121
Apéndice G	Determinación de $\alpha$ -KG intracelular	123
Apéndice H	Determinación de metabolitos intracelulares	125

## ABREVIATURAS USADAS

<b><math>\alpha</math>-KG</b>	alfa-cetoglutarato
<b>AA</b>	amino ácidos
<b>ACT1</b>	Gen que codifica para actina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ampi</b>	Ampicilina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>Chloran</b>	Cloranfenicol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>FT</b>	Factores de transcripción
<b>G418</b>	Geneticina
<b>GDH1</b>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP -1
<b>GDH3</b>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP -3
<b>GOGAT</b>	Glutamina oxoglutarato amino transferasa
<b>Glu</b>	Glutámico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Índice de concentración media máxima inhibitoria
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>Kb</b>	Kilobases.
<b>KDa</b>	KiloDaltones
<b>Kl</b>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<b>Lk</b>	<i>Lachancea kluyveri</i>
<b>M</b>	Molar

<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>MAE</b>	Amortiguador MOPS+ Acetato de sodio + EDTA
<b>mM</b>	Mili molar
<b>μM</b>	Micro molar
<b>nat</b>	Nourseotricina
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamina Adenina Dinucleotido Fosfato
<b>NADPH</b>	Nicotinamina Adenina Dinucleotido Fosfato reducido
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>NuSA</b>	Ensayo de Posicionamiento de nucleosomas
<b>OD</b>	Densidad Óptica
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> ).
<b>pb</b>	pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).
<b>PEG</b>	Polietilenglicol.
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>Sc</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>TE</b>	Tris pH 8 + EDTA
<b>TES</b>	Solución con Tris-HCl, EDTA y SDS
<b>UAS</b>	Secuencias de activación río arriba
<b>WGD</b>	Duplicación de todo el genoma ( <i>Whole Genome Duplication</i> ).
<b>YPD</b>	Medio rico (extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa)
<b>Δ</b>	Símbolo que hace referencia a una delección
<b>≈</b>	Símbolo que hace referencia a una aproximación
<b>::</b>	Símbolo que hace referencia a una inserción

## RESUMEN

### REGULACIÓN Y FUNCIÓN DEL GEN -TIPO ANCESTRAL- *KlGDH1* DE *Kluyveromyces lactis* Y *LkGDH1* DE *Lachancea kluyveri* VS LOS GENES PARÁLOGOS *GDH1/GDH3* DE *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los genes *ScGDH1* y *ScGDH3* codifican para glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP (NADP-GDHs) catalizan la síntesis de glutámico a partir de amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). La previa caracterización cinética mostro que estas enzimas tienen propiedades alostéricas diferentes y una alta o baja velocidad de utilización de  $\alpha$ -KG. En consecuencia, la acción coordinada de *ScGdh1* y *ScGdh3*, regulan la utilización equilibrada de  $\alpha$ -KG para llevar a cabo la biosíntesis de glutámico bajo condiciones fermentativas o respiratorias, salvaguardando a provisión de energía.

Aquí abordamos la cuestión de si existe una correlación entre las propiedades regulatorias y cinéticas de las isoenzimas NADP-GDH presentes en *S. cerevisiae* (*ScGdh1* and *ScGdh3*), *Kluyveromyces lactis* (*KlGDH1*) y *Lachancea kluyveri* (*LkGDH1*) y su historia evolutiva. Nuestros resultados mostraron que las propiedades cinéticas de la única NADP-GDH en *K. lactis* y *L. kluyveri* son respectivamente similares a *ScGDH3* o *ScGDH1*, que surgieron del evento de duplicación de genoma completo del linaje de *S. cerevisiae*, mientras que, *KlGDH1* y *LkGDH1* se originaron de un clado de GDH, a través de un evento de hibridación entre especies antiguas que precedió de la divergencia entre el clado de *Saccharomyces* y otro que contenía los géneros *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium*. Por lo tanto, las propiedades cinéticas de las NADP-GDHs que determinan la capacidad de utilizar el  $\alpha$ -KG y la síntesis de glutamato no correlacionan con el origen evolutivo.

**Palabras clave:** glutamato deshidrogenasa, cinéticas, filogenia, genes duplicados en levadura, enzimas parálogas, diversificación funcional.

## ABSTRACT

### REGULACIÓN AND FUNCIÓN OF-ANCESTRAL TYPE- GEN *KlGDH1* OF *Kluyveromyces lactis* AND *LkGDH1* OF *Lachancea kluyveri* VS PARALOGOUS GENES *GDH1/GDH3* OF *Saccharomyces cerevisiae*

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the *ScGDH1* and *ScGDH3* encoded glutamate dehydrogenases (NADP-GDHs) catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG). Previous kinetic characterization showed that these enzymes displayed different allosteric properties and respectively high or low rate of  $\alpha$ -KG utilization. Accordingly, the coordinated action of *ScGdh1* and *ScGdh3* regulated balanced  $\alpha$ -KG utilization for glutamate biosynthesis under either fermentative or respiratory conditions, safeguarding energy provision.

Here we have addressed the question of whether there is a correlation between the regulation and kinetic properties of the NADP-GDH isozymes present in *S. cerevisiae* (*ScGdh1* and *ScGdh3*), *Kluyveromyces lactis* (*KlGDH1*) and *Lachancea kluyveri* (*LkGDH1*) and their evolutionary history. Our results show that the kinetic properties of *K. lactis* and *L. kluyveri* single NADP-GDHs are respectively similar to either *ScGDH3* or *ScGDH1*, which arose from the whole genome duplication event of the *S. cerevisiae* lineage, although, *KlGDH1* and *LkGDH1* originated from a *GDH* clade, through an ancient interspecies hybridization event that preceded the divergence between the *Saccharomyces* clade and the one containing the genera *Kluyveromyces*, *Lachancea* and *Eremothecium*. Thus, the kinetic properties which determine the NADP-GDHs capacity to utilize  $\alpha$ -KG and synthesize glutamate do not correlate with their evolutionary origin.

**Key words:** glutamate dehydrogenase, kinetics, phylogeny, yeast gene duplication, paralogous enzymes, functional diversification.

# **1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

# 1.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

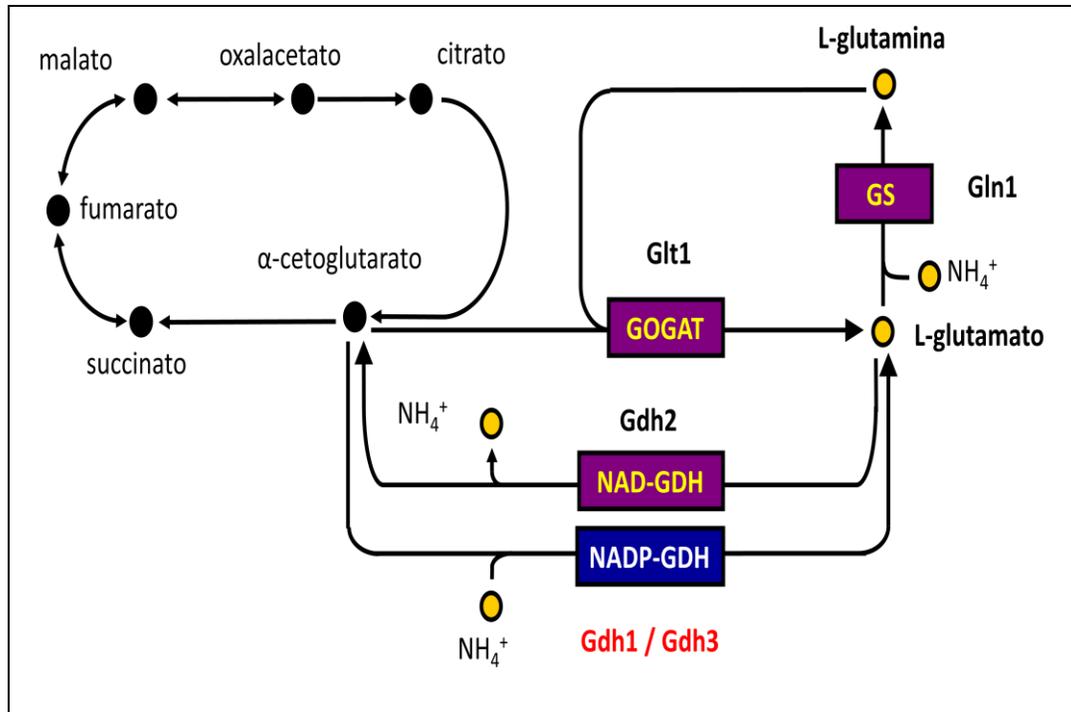
## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio

La levadura del pan, *S. cerevisiae*, es considerada un organismo modelo debido a algunas características en su ciclo de vida. Es un organismo unicelular no patógeno, el tiempo generacional es muy corto (aproximadamente 90 minutos), facilidad de réplica en placas permitiendo aislamiento de mutantes, un sistema genético bien definido facilitando su cultivo y manipulación en el laboratorio, etc. (Sherman, 1998). Esta levadura, ha sido ampliamente utilizada en diversos campos del conocimiento tales como la biotecnología, genética, biología molecular, etc. (Mell y Burgess, 2002). Además de ser un organismo con el genoma totalmente secuenciado desde 1996. El proyecto de secuenciación fue encabezado por André Goffeau, donde participaron más de 600 científicos de 96 laboratorios. A partir de la resolución de la secuencia de este organismo se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio (Dujon, 1996).

Los estudios en esta levadura han facilitado el entendimiento de aspectos relacionados con el metabolismo de carbono (Broach, 2012) y metabolismo de nitrógeno (Magasanik, 2005). Este organismo eucarionte ha permitido conocer diversos fenómenos que parecen estar conservados en la línea evolutiva, por ejemplo, la duplicación génica (Wolfe, 1997).

Dicho lo anterior, *S. cerevisiae* resulto magnifico modelo de estudio para el desarrollo de este proyecto, debido a su metabolismo fermento-respiratorio (Anaerobio facultativo). Gracias a esta peculiaridad, la célula puede crecer en medios con glucosa o etanol como unica fuente de carbono y responder de manera distinta a diferentes fuentes de nitrógeno (Fig. 1) dependiendo de la facilidad con la que pueda internalizar y procesarla; las moléculas nitrogenadas que sean más complejas de degradar son fuentes secundarias, porque requieren un gasto de energía

mayor que con aquellas fuentes de nitrógeno primarias en donde se requiere mucho menor cantidad de energía (Cooper 2004; Magasanik *et al.* 2003).



**Figura 1. Metabolismo central del nitrógeno en *S. cerevisiae*.** Muestra la manera en como el nitrógeno inorgánico se une al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato por medio de Gdh1 y Gdh3, aunque también puede unirse al glutamato y por la Gln1 formar glutamina, una vez que se forma la glutamina, esta puede formar nuevamente glutamato por acción de la Glt1 realizando una reacción de transaminación favoreciendo la unión al  $\alpha$ -cetoglutarato. El glutamato que se forma y la glutamina pueden generar diferentes aminoácidos necesarios para la célula.

## 1.2 La duplicación génica

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 y Paling, 1995). Dicha hipótesis adquirió una gran relevancia y

posteriormente se convirtió en una herramienta imprescindible en los análisis filogenéticos (Woese, 1987). Horowitz en 1965 amplía su teoría de la evolución retrograda 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 conocida 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.

Los genomas son modificados por una serie de procesos que involucran sustituciones, inserciones, deleciones, retrotransposiciones, redistribución de exones, transferencia lateral de genes, duplicaciones sencillas y de genoma completo (Levasseur y Pontarotti, 2011). Las duplicaciones pueden ser de un segmento, es decir de unos pocos nucleótidos o de varias kilobases (kb) y aunque este tipo de duplicaciones es el más común, además existe un proceso llamado poliploidización o duplicación de genoma completo (*Whole Genome Duplication* WGD, por sus siglas en inglés). Este evento ha ocurrido en muchos organismos eucariontes, desde el protozoo *Plasmodium* y la levadura *Saccharomyces* hasta la planta *Arabidopsis*, incluso la aparición de los vertebrados se cree que está ligada a este proceso; esto ha representado grandes ventajas adaptativas para los organismos que experimentan una WGD (Fig. 2) (Ohno, 1970).

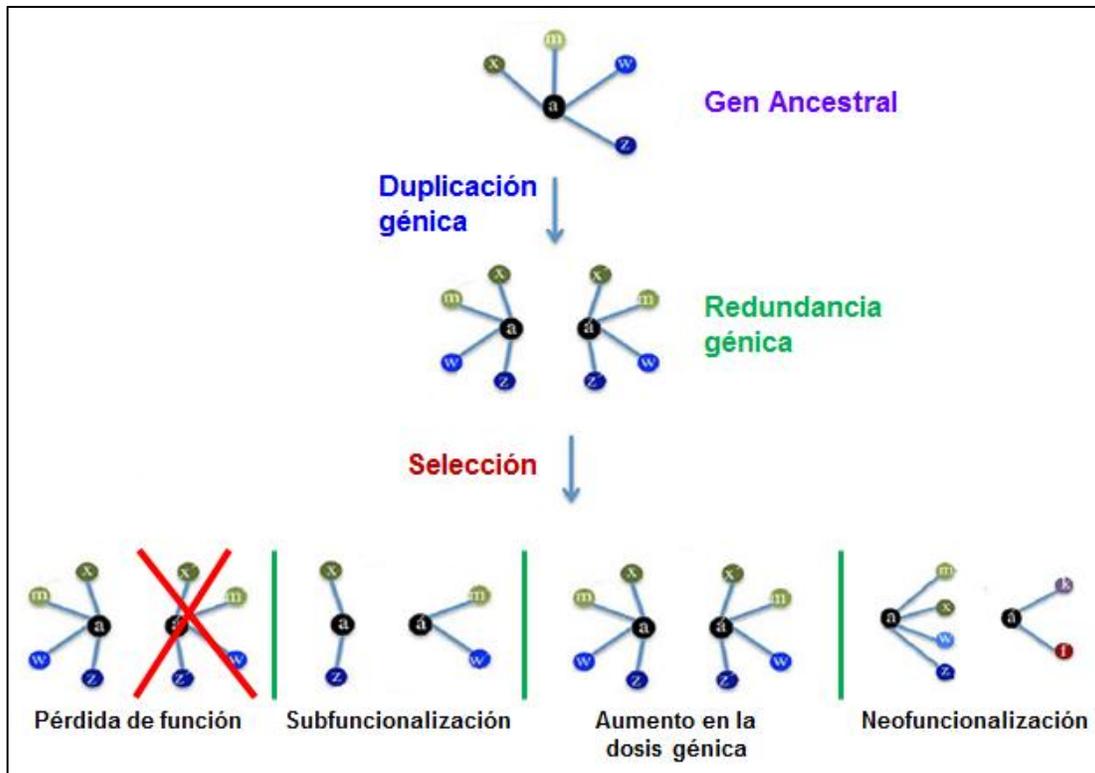
La duplicación de genoma completo ofrece una ruta de innovación evolutiva mayor comparada con múltiples duplicaciones independientes, permitiendo adaptaciones a gran escala a nuevos ambientes (Bruce *et al*, 2004) favoreciendo que



Experimentos realizados en varias especies, desde unicelulares hasta mamíferos, indican que los genes divergen rápidamente después de una duplicación (Chung *et al.* 2006), y se ha observado tanto en humanos como en levaduras que la divergencia en la secuencia de la proteína y la divergencia a nivel de expresión correlaciona e incrementa con el tiempo evolutivo (Gu *et al.* 2005).

### **1.3 El destino de los genes duplicados**

El destino de los genes duplicados puede ser: i) neo-funcionalización, en este modelo se propone que mientras una copia del gen, preserva su función original, la otra copia adquiere una nueva función; ii) pérdida de la función, una de las copias generadas mantiene la función del gen original y las copias adicionales se pierden o son conservadas como pseudogenes; iii) subfuncionalización, que se ha reportado es una alternativa a la pérdida o ganancia de función en los genes duplicados, ya que la función original es repartida en las dos copias generadas de la duplicación; y iv) dosis geénica, cuando dos copias génicas provenientes de una duplicación son retenidas sin ningún tipo de divergencia funcional (Ohno S. 1970, Walsh JB.,1995, Conrad *et al.* 2007)(Fig. 3). El modelo llamado (DDC) Duplicación Degeneración Complementación, considera que tras la duplicación, las dos copias presentan modificaciones, de tal suerte que se requieren ambas para llevar a cabo la función ancestral (Force A, et al. 1999).

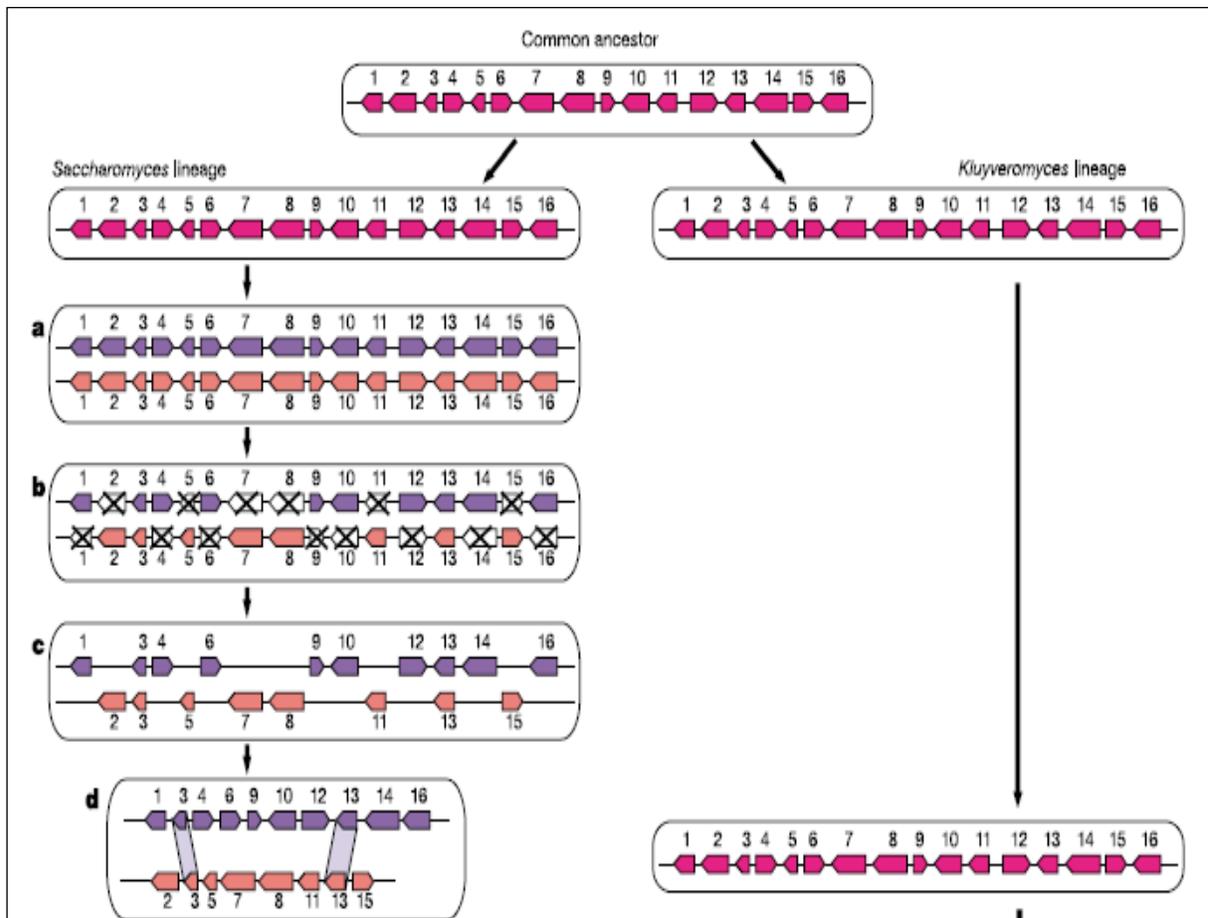


**Figura 3. Posible destino de los genes duplicados.** En la figura se esquematiza el posible destino que pueden tener los genes duplicados, donde a partir de un gen ancestral, se da una duplicación favoreciendo la redundancia génica, peor con el paso del tiempo la selección y de las dos copias generadas una de las copias puede perderse, ambas copias pueden sub-especializarse, a mantener la redundancia génica o que una de las dos copias adquiera una nueva función (Modificado de Fares et al. 2013).

#### 1.4 El genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Existe gran cantidad de evidencias que muestran que la existencia de genes duplicados es una característica de la mayoría de las especies en las que su genoma ha sido secuenciado (Zhang, 2003; Kafri, 2006). Así mismo, diversos estudios han mostrado que el genoma actual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se originó a partir de la duplicación completa de 8 cromosomas

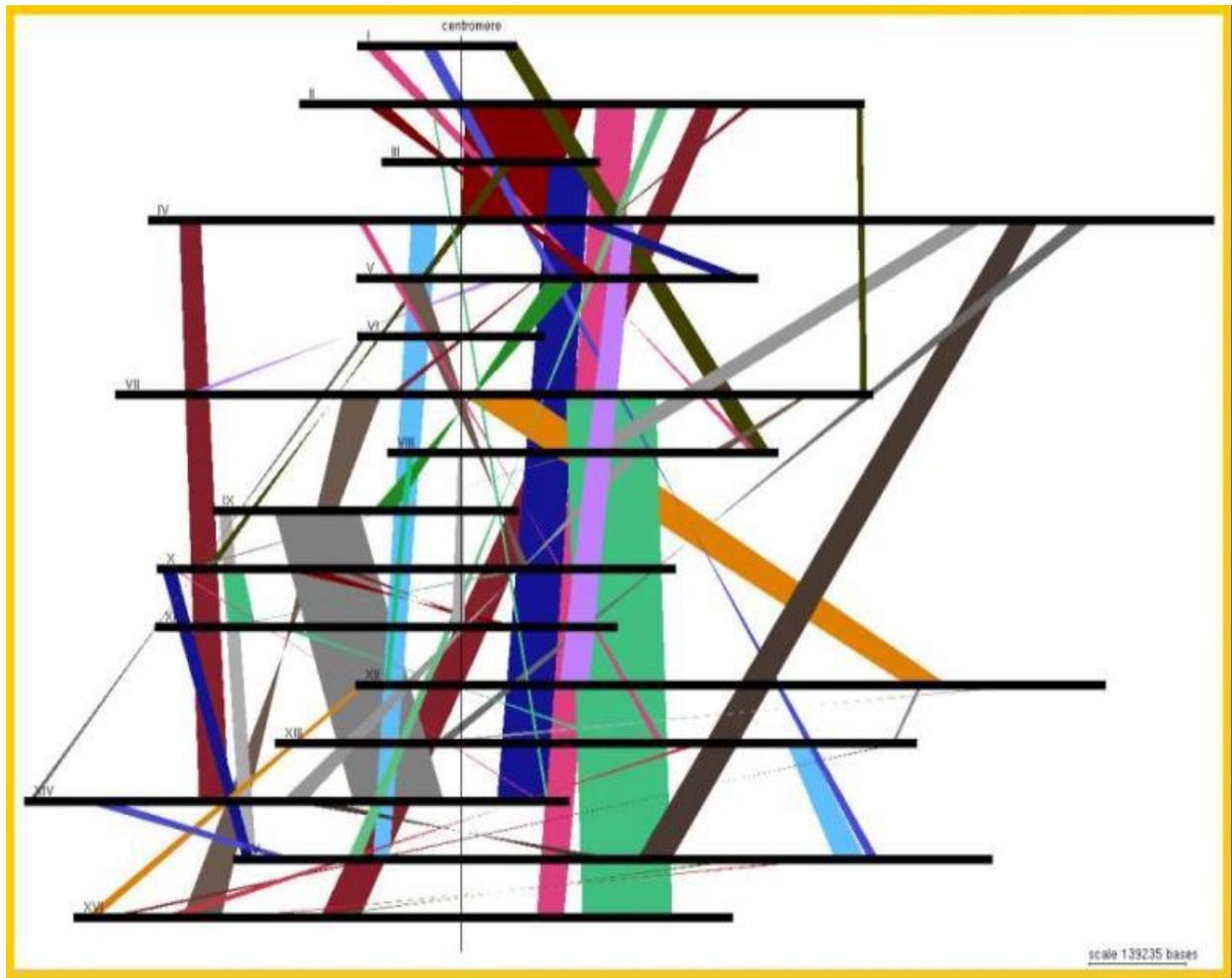
ancestrales, regresando a la ploidía normal, debido a la pérdida masiva del 80% de los genes duplicados (Fig. 4) (Piskur, J.2001).



**Figura 4. Origen del linaje de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*.** a) El linaje de *Saccharomyces* experimento la duplicación de su genoma completo, y con el paso del tiempo hubo una pérdida y retención selectiva de algunos genes duplicados que llevo a postular la hipótesis de que la retención de ciertos duplicados permitió el establecimiento al metabolismo facultativo; b) mientras que por otro lado el linaje de *Kluyveromyces* no experimenta esta duplicación del genoma, y mantiene un metabolismo aerobio estricto.

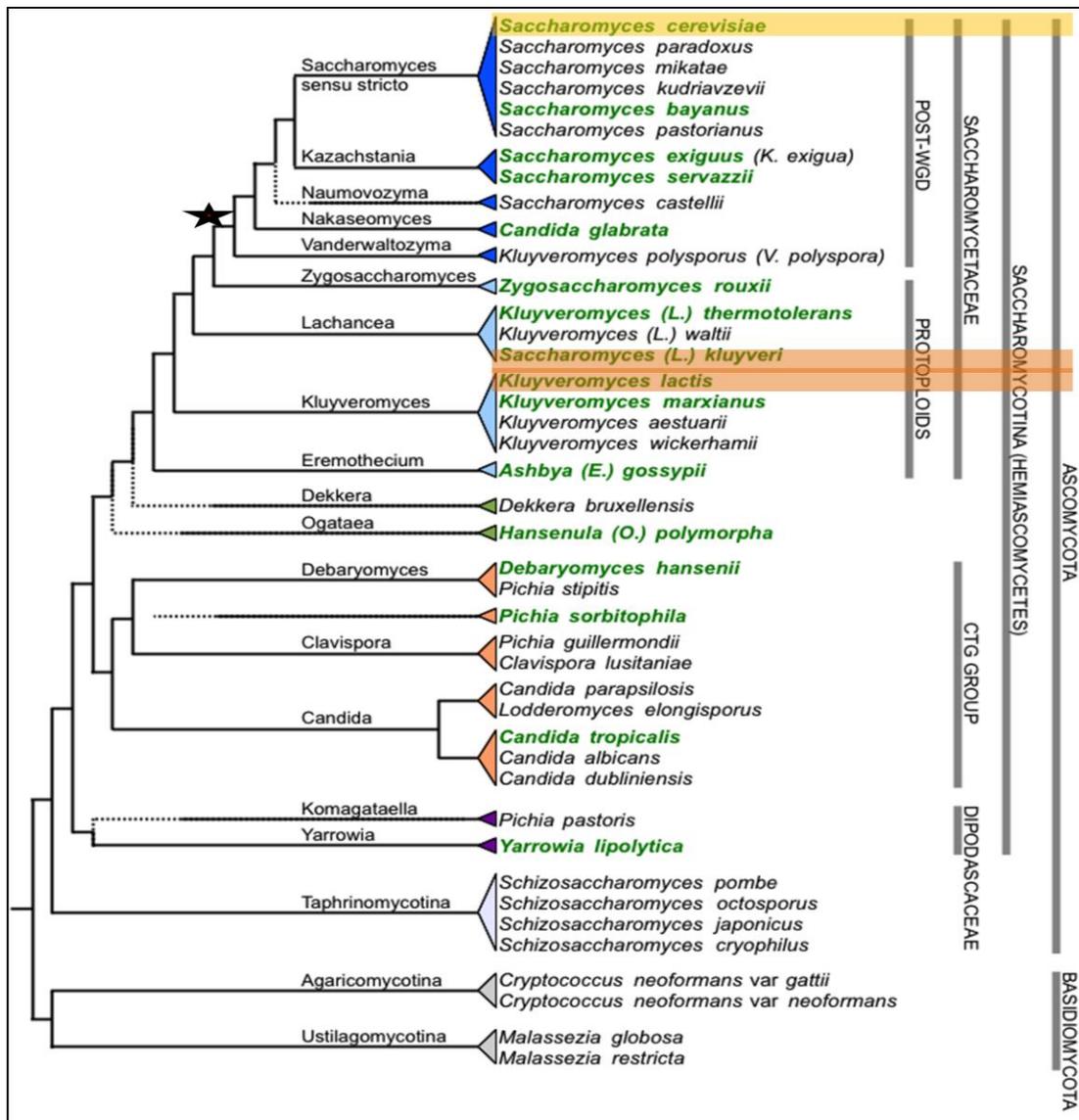
La secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* dio a conocer que existe una gran cantidad de secuencias repetidas sobre su genoma, estas secuencias se encuentran acomodadas en bloques de genes parálogos que tuvieron que provenir de un evento de duplicación, Recientemente se ha demostrado que la duplicación de

genoma completo de *S. cerevisiae* fue en realidad una fusión celular entre dos especies diploides diferentes (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). Las dos principales evidencias que soportan la poliploidia son: 1) que mantienen homología entre ambas secuencias parálogas y ii) la sinténia, donde las regiones parálogas mantienen el mismo orden con respecto al centrómero (Fig. 5) (Kellis, *et al.* 2004).



**Figura 5. Organización de los genes duplicados en *S. cerevisiae*.** La organización de los bloques de genes homólogos y sinténicos sustentan la hipótesis de que *Saccharomyces cerevisiae* experimentó una duplicación de genoma completo, ya que comparado con otras levaduras pre WGD, solo se aprecian 8 cromosomas, mientras que en caso de *S. cerevisiae* se presentan 16 cromosomas (Líneas negras horizontales). Así mismo se muestra cómo hay bloques de genes (barras de colores) que van en la misma orientación respecto al centrómero (línea vertical gris) y estas posicionan un bloque específico de genes en un cromosoma y este se encuentra duplicado en otro cromosoma.

Es claro que la duplicación de genoma completo ocurrió en el género *Saccharomyces* y estudios de filogenia soportan dicho evento, ya que existen especies muy cercanas a *S. cerevisiae*, denominado *sensu stricto* que además de mantener características de metabolismo similares, mantienen sintenia y homología en sus regiones duplicadas. Así mismo se puede apreciar que el clado de *Kluyveromyces* y *Lachancea* no presentan estas características en su genoma; por lo que se puede concluir que el evento de WGD ocurrió antes del origen de las especies de *Saccharomyces* y posterior a *Kluyveromyces* y *Lachancea* (Fig. 6).



**Figura 6. Árbol filogenético de los Ascomycetos.** Filogenia que señala el punto en el que ocurrió el evento de duplicación de genoma completo (estrella negra), el cual se encuentra entre los géneros *Vanderwaltozyma* y *Zygosaccharomyces*; a *S. cerevisiae* (recuadro amarillo) ubicada post-WGD; *K. lactis* y *L. kluyveri* (recuadro naranja), especies que divergieron antes del evento de WGD.

Luego de este evento de duplicación, sólo una pequeña fracción de genes con copias adicionales fue retenida, alrededor del 13% de proteínas de *S. cerevisiae* fueron originadas por esta duplicación, entre ellas se encuentran proteínas cinasas, factores de transcripción, miosinas, ciclinas y enzimas del metabolismo central del carbono y nitrógeno. Se ha propuesto que la retención selectiva de algunos genes duplicados favoreció la adquisición del metabolismo fermentativo en *S. cerevisiae* (Piskur *et al.*, 2006). Por otro lado se cree que el evento de duplicación del genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae*, coincide con el evento de aparición de las angiospermas (plantas con fruto) y se cree que evolutivamente se retuvieron aquellos genes involucrados en el metabolismo del carbono y nitrógeno, necesarios para degradar los azúcares y carbohidratos de los frutos (Wolfe *et al.* 1997).

Las especies *Kluyveromyces lactis* y *Lachancea kluyveri* son organismos que, como se observa en la figura 6, divergieron antes de la WGD, por lo que son considerados como modelo tipo ancestral, ya que su genoma es más parecido al ancestro común de estos hemiascomycetos que el de *S. cerevisiae*. Esto implica que los genes duplicados en *S. cerevisiae* (parálogos) están en una sola copia en *K. lactis* y *L. kluyveri* (ortólogos).

Dentro de los bloques de genes duplicados presentes en *S. cerevisiae* encontramos a los genes parálogos *GDH1* y *GDH3*.

## 1.5 Las Glutamato Deshidrogenasas (Gdh's) en *S. cerevisiae*

Existen dos rutas que determinan la biosíntesis de glutámico en los hongos: la primera dada por la glutamato deshidrogenasa NADP<sup>+</sup>-dependiente (NADP<sup>+</sup>-GDH) y la segunda que depende de la acción coordinada de la glutamino sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Magasanik, 2003). Estas enzimas asimilan el amonio y glutamato en la glutamina, de los cuales los grupos amino son distribuidos posteriormente a otros componentes. Los cinco esqueletos de carbono de este amino ácido derivan del  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por lo tanto, la biosíntesis de glutamato representa una intersección crucial en el metabolismo de carbono y nitrógeno y, como tal su regulación debe equilibrar las necesidades de biosíntesis y producción de energía (DeLuna *et al.*, 2001). El balance Redox y la defensa contra el estrés oxidativo también se ven influidas por la biosíntesis de glutamato ya que este aminoácido es un precursor del glutatión (Guillamon *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012).

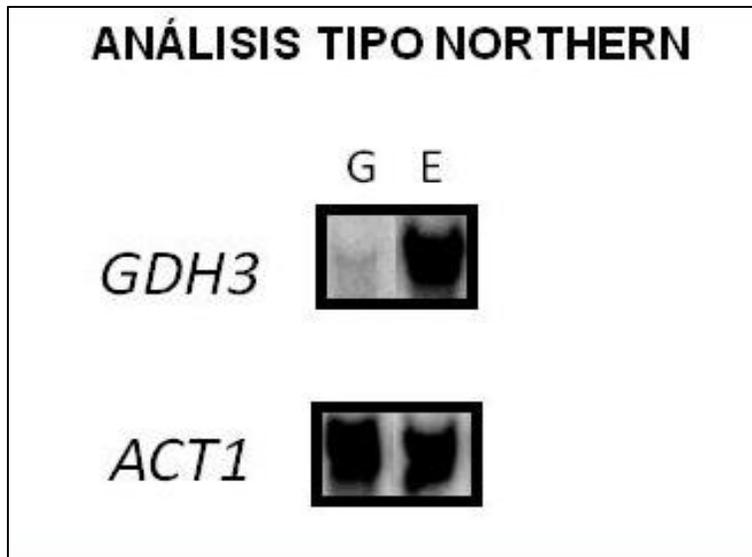
A pesar de la contribución relativa de las dos vías productoras de glutamato, la biosíntesis de este aminoácido varía según las especies y las condiciones de crecimiento, se ha reportado que la NADP<sup>+</sup>-GDH ( 1.4.1.4 ) desempeña un papel principal en *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en amonio como única fuente de nitrógeno, en donde la inactivación de los genes que codifican la NADP<sup>+</sup>-GDH, reducen dramáticamente la velocidad de crecimiento (Perysinakis *et al.*, 1994; Macheda *et al.*, 1999; Fincham, 1951; Magasanik, 2003). La modulación de la actividad de NADP<sup>+</sup>-GDH *in vivo* coordina los flujos metabólicos de acuerdo a las modificaciones en la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono y contribuye al mantenimiento de un estado redox equilibrado. En *Candida albicans*, *S. pombe* y algunas especies de *Aspergillus*, esta modulación implica el uso  $\alpha$ -KG a través de la regulación alostérica y la cooperatividad cinética (Holmes *et al.*, 1989; Perysinakis *et al.*, 1994; Noor and Punekar, 2005), Mientras que en *Candida*

*tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii* y *Aspergillus terreus*, la cinética hiperbólica de la NADP<sup>+</sup>-GDH determina la utilización intermedia de  $\alpha$ -KG (Holmes *et al.*, 1989; Alba-Lois *et al.*, 2004; Choudhury and Punekar, 2009).

La levadura *S. cerevisiae* es el primer microorganismo descrito en el que la actividad de NADP<sup>+</sup>-GDH es codificada por los genes *ScGDH1* y *ScGDH3* (Avendaño, 1997). La proteína *ScGdh1* pesa 51 kDa mientras que *ScGdh3* 46 kDa, lo que sugiere la existencia de una modificación post-traducciona (Fig. 8). Todos los miembros de la familia de las glutamato deshidrogenasas, presentan una estructura hexamérica  $\alpha$ 6 50 kD (DeLuna *et al.*, 2001).

*ScGDH1* y *ScGDH3* han sido ampliamente estudiados por ser un ejemplo de divergencia tanto funcional (actividad de la proteína) como en la regulación transcripcional. Se sabe que cuando *S. cerevisiae* se crece en un medio con glucosa como única fuente de carbono, *ScGdh1* representa la principal vía de síntesis de glutamato; sin embargo, en fuentes no fermentables de carbono como etanol, *ScGdh3* tiene un papel fundamental modulando la tasa de biosíntesis de glutamato, de esta forma proporciona un mecanismo de balance de utilización de  $\alpha$ -cetoglutarato, además *ScGdh3* es incapaz de complementar la falta de *ScGdh1* en ciertas condiciones (DeLuna *et al.*, 2001).

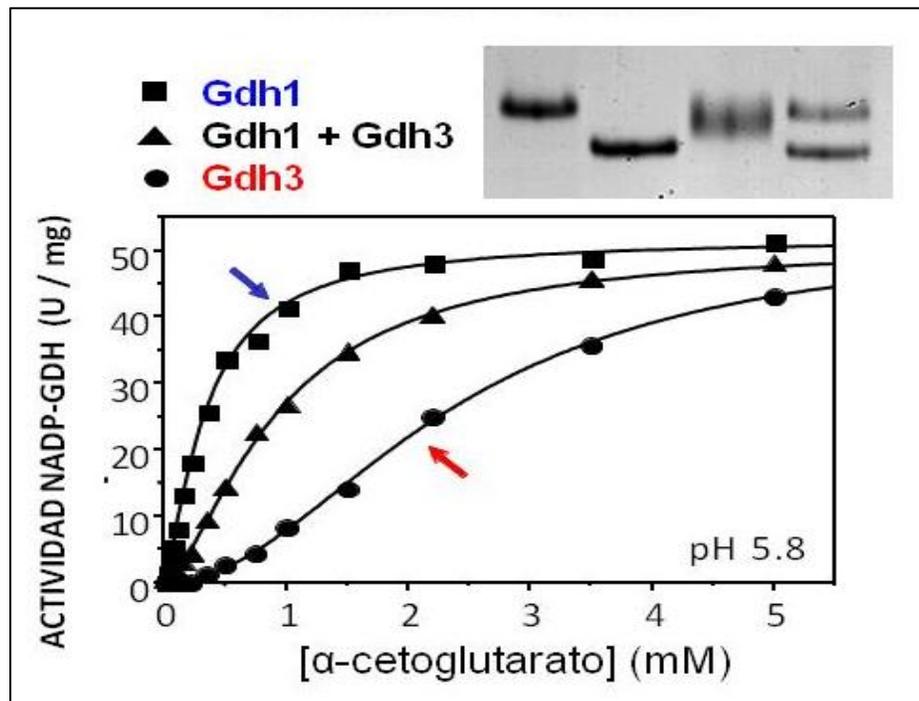
Con respecto a la expresión, se conoce que el gen *ScGDH1* está regulado por activadores transcripcionales tales como Gln3, Gcn4 y Leu3 involucrados en la regulación de genes del metabolismo del nitrógeno así como del carbono (complejo HAP), además presenta una regulación a través de complejos de remodelación de cromatina (Riego, 2002). Por otro lado, estudios de expresión han demostrado que *GDH3* está reprimido en glucosa (Fig. 7), debido a que el complejo SAGA mantiene compacta la cromatina en esta condición, mientras que en presencia de etanol, su expresión aumenta y la cromatina está relajada (Avendaño, 2005).



**Figura 7. Expresión de *GDH3*.** Análisis tipo Northern blot que muestra como el gen *GDH3* se encuentra reprimido en glucosa como fuente de carbono mientras que en etanol se observa la máxima expresión del mensajero.

*ScGdh1* muestra una cinética hiperbólica para la saturación por  $\alpha$ -KG y es la isoforma predominante bajo la fase exponencial del crecimiento en glucosa y cuando el acetato más rafinosa son usados como fuente de carbono (DeLuna *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2011). Mientras que *ScGdh3* es una enzima cooperativa que presenta una cinética sigmoideal para la utilización de  $\alpha$ -KG, esta isoforma contribuye significativamente a la actividad de  $\text{NADP}^+$ -GDH durante el crecimiento en etanol como única fuente de carbono (Fig. 8) (DeLuna *et al.*, 2001; Avendano *et al.*, 2005) y llega a ser la isoforma predominante durante la fase estacionaria (Lee *et al.*, 2012). Se ha propuesto que las diferencias cinéticas de *ScGdh1* y *ScGdh3* controlan la utilización de  $\alpha$ -KG para fines biosintéticos sin comprometer el flujo a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos para la producción de energía durante el crecimiento en glucosa o etanol como única fuente de nitrógeno (DeLuna *et al.*, 2001). La no redundancia de *ScGdh1* y *ScGdh3* puede ser el resultado de un proceso evolutivo en el que la duplicación de un gen ancestral y la divergencia de los

parálogos resultante condujo a la especialización en la producción de glutamato bajo diferentes condiciones asociadas con el metabolismo facultativo peculiar de *S. cerevisiae* (Avendano *et al.*, 2005).



**Figura 8. Estructura oligomérica y afinidad por  $\alpha$ -KG.** En el gel nativo se observa a Gdh1 (carril 1) purificado de una cepa *gdh3 $\Delta$* , a Gdh3 (carril 2) purificado de una cepa *gdh1 $\Delta$* , a la posible formación de heterooligómeros entre Gdh1 y Gdh3 purificados de una cepa silvestre crecida en etanol como fuente de carbono (carril 3) y una mezcla de las proteínas Gdh1 y Gdh3 después de la purificación en las mutantes sencillas (carril 4). Y en la gráfica se muestra la afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato de las proteínas puras Gdh1 (azul), Gdh3(rojo) y de la cepa WT en etanol (negro).

Como ya se mencionaba anteriormente, se ha propuesto que el linaje de *S. cerevisiae*, proviene de una duplicación del genoma completo (WGD) y que un grupo seleccionado de los genes resultantes duplicados se han conservado en dos copias, entre ellos los genes parálogos *ScGDH1* y *ScGDH3* (Seoighe y Wolfe, 1999).

Sin embargo, estudios evolutivos de las NADP<sup>+</sup>-GDHs en los hongos, no han abordado las características de los genes tipo ancestral pre-WGD, dichas características están presentes en los Saccharomycetos y evolucionaron durante la duplicación de todo el genoma. El grupo de los *Saccharomycetales* (o *Hemiascomycetos*) incluye especies estrechamente relacionadas a *Saccharomyces cerevisiae* por lo que la secuencia de su genoma y la manipulación genética representan una herramienta valiosa para desarrollar estudios evolutivos funcionales. En las levaduras *Kluyveromyces lactis* y *Lachancea kluyveri* no está duplicado el gen de *GDH*.

En lo que respecta al metabolismo del carbono que opera en estas levaduras, es evidente que cada uno muestra diferentes niveles de adaptación al estilo de vida fermentativo: el metabolismo de *K. lactis* es estrictamente respiratorio, por esta razón no puede crecer en condiciones anaeróbicas y no se pueden producir mutantes deficientes respiratorias (Breunig *et al.*, 2000). *L. kluyveri* muestra una capacidad fermentativa intermedia entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*, ya que puede crecer en condiciones anaeróbicas y producir mutantes deficientes respiratoria en medios ricos en azúcar, pero solo fermenta en ausencia de oxígeno (Moller *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2002). Mientras que en *S. cerevisiae* predomina el metabolismo fermentativo cuando las concentraciones de azúcar son altas independientemente de la disponibilidad de oxígeno. Incluso reprime el metabolismo respiratorio en presencia de altas concentraciones de glucosa o fructuosa a través de la represión catabólica de carbono (Gancedo, 1998). Esta levadura puede crecer anaeróbicamente y producir mutantes deficientes respiratorias (Gancedo, 1998).

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## 2.- Planteamiento del problema

Nuestro grupo ha sido uno de los primeros en caracterizar la función y regulación de genes ortólogos *tipo ancestral*, en paralelo con el análisis de la diversificación de los parálogos correspondientes en *S. cerevisiae* (Colón M., et al. 2011). El resultado del estudio de la pareja *BAT1/BAT2*, cuyos productos están implicados en la síntesis y catabolismo de amino ácidos de cadena ramificada, permitió concluir que la función de la proteína única *tipo ancestral* presente en *K. lactis* se ha diversificado en *S. cerevisiae*, de tal suerte, que en esta última se requieren los dos genes parálogos para llevar a cabo la función del ancestro.

Este proyecto considera que el análisis de la regulación, en combinación con la caracterización cinética del ortólogo *KlGDH1*, *LkGDH1* y de sus productos, puede constituir un enfoque que permita comprender de manera cabal la diversificación y sub-especialización de los genes parálogos *GDH1/GDH3* de *S. cerevisiae*.

# **3. RELEVANCIA E IMPACTO DEL PROYECTO**

### **3.- Relevancia e impacto del proyecto**

El estudio del destino evolutivo de genes duplicados, analizando tanto las propiedades de los genes y productos parálogos, así como las del gen y producto ortólogo *tipo ancestral*, proveerá nuevos puntos de vista dentro del campo que estudia la retención y sub-funcionalización de genes duplicados. Nuestros resultados permitirán plantear un modelo que proponga hipótesis para explicar los mecanismos de evolución y diversificación del par de parálogos de *S. cerevisiae* a partir del gen tipo ancestral.

## **4. OBJETIVOS**

## 4.- OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

“Conocer la función, propiedades cinéticas de las enzimas *KlGdh1*, *LkGdh1* y el perfil de expresión del gen -Tipo Ancestral- *KlGDH1* de *Kluyveromyces lactis*, *LkGDH1* de *Lachancea kluyveri* y compararlas con *Gdh1* y *Gdh3* de *Saccharomyces cerevisiae*”

### 4.2 Objetivos Particulares:

- Estudio del fenotipo en la cepa silvestre y en las diferentes mutantes de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.
- Análisis funcional basado en estudios de la complementación entre los genes parálogos *GDH1* y *GDH3* de *S. cerevisiae* y el único ortólogo *LkGDH1* y *KlGDH1* presente en *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente.
- Análisis del posicionamiento de nucleosomas en la región promotora de (*GDH1*, *GDH3*, *LkGDH1*) y *KlGDH1*.
- Enfoque bioquímico de las enzimas *ScGdh1*, *ScGdh3*, *LkGdh1* y *KlGdh1*.

# **5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

## 5.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 5.1 Lista de cepas

**Tabla 1.** Cepas de *S. cerevisiae*, *K. lactis* y *L. kluyveri* usadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
CLA1	<i>MATa ScGDH1 ScGDH3 ScGLT1 ura3 leu2</i>	Valenzuela,L., <i>et al.</i> 1995
CLA2	<i>MATa Scgdh1Δ::kanMx4 ScGDH3 ScGLT1 ura3 leu2</i>	DeLuna, A., <i>et al.</i> 2001
CLA3	<i>MATa ScGDH1 Scgdh3Δ::LEU2 ScGLT1 ura3</i>	Valenzuela,L., <i>et al.</i> 1995
CLA4	<i>MATa ScGDH1 ScGDH3 Scglt1Δ::URA3 leu2</i>	Valenzuela,L., <i>et al.</i> 1995
CLA5	<i>MATa Scgdh1Δ::kanMx4 Scgdh3Δ::LEU2 ScGLT1 ura3</i>	DeLuna, A., <i>et al.</i> 2001
CLA6	<i>MATa Scgdh1Δ::kanMx4 Scgdh3Δ::LEU2 Scglt1Δ::URA3</i>	DeLuna, A., <i>et al.</i> 2001
CLA1-1	<i>CLA1/pRS416 leu2</i>	Este estudio
CLA2-1	<i>CLA2/pRS416 leu2</i>	Este estudio
CLA2-2	<i>CLA2/pRS416-ScGDH1 leu2</i>	Este estudio
CLA2-3	<i>CLA2/pRS416-ScGDH3 leu2</i>	Este estudio
CLA2-4	<i>CLA2/pRS416-LkGDH1 leu2</i>	Este estudio
CLA2-5	<i>CLA2/pRS416-KlGDH1 leu2</i>	Este estudio
CLA5-1	<i>CLA5/pRS416</i>	Este estudio
CLA5-2	<i>CLA5/pRS416-ScGDH1</i>	Este estudio
CLA5-3	<i>CLA5/pRS416-ScGDH3</i>	Este estudio
CLA5-4	<i>CLA5/pRS416-LkGDH1</i>	Este estudio
CLA5-5	<i>CLA5/pRS416-KlGDH1</i>	Este estudio
Lk156-1	<i>Mata LkGDH1 LkGLT1 ura3</i>	(Montalvo, J., <i>et al.</i> 2015
Lk156-2	<i>Mata Lkgdh1Δ::kanMx4 LkGLT1 ura3</i>	Este estudio
Lk156-3	<i>Mata LkGDH1 Lkgl1Δ::natMx4 ura3</i>	Este estudio
Lk156-4	<i>Mata Lkgdh1Δ::kanMx4 Lkgl1Δ::natMx4 ura3</i>	Este estudio
Lk156-1-1	<i>Lk156-1/pLk-EE</i>	Este estudio
Lk156-2-1	<i>Lk156-2/pLk-EE</i>	Este estudio
Lk156-2-2	<i>Lk156-2/pLk-EE-ScGDH1</i>	Este estudio
Lk156-2-3	<i>Lk156-2/pLk-EE-ScGDH3</i>	Este estudio
Lk156-2-4	<i>Lk156-2/pLk-EE-LkGDH1</i>	Este estudio
Lk156-2-5	<i>Lk156-2/pLk-EE-KlGDH1</i>	Este estudio
KIWM37-1	<i>Mata KlGDH1 KlGLT1 his3 ura3</i>	Valenzuela,L., <i>et al.</i> 1995

<i>KIWM37-2</i>	<i>Mata Kl<sub>gdh1</sub>Δ::natMx4 KIGLT1 his3 ura3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-3</i>	<i>Mata KlGDH1 Klgl1Δ::kanMx4 his3 ura3</i>	Valenzuela,L., <i>et al.</i> 1995
<i>KIWM37-4</i>	<i>Mata Kl<sub>gdh1</sub>Δ::natMx4, Klgl1Δ::kanMx4 his3 ura3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-1-1</i>	<i>KIWM37-1/ YEpKD352 his3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-2-1</i>	<i>KIWM37-2/ YEpKD352 his3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-2-2</i>	<i>KIWM37-2/ YEpKD352-ScGDH1 his3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-2-3</i>	<i>KIWM37-2/ YEpKD352-ScGDH3 his3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-2-4</i>	<i>KIWM37-2/ YEpKD352-LkGDH1 his3</i>	Este estudio
<i>KIWM37-2-5</i>	<i>KIWM37-2/ YEpKD352-KIGDH1 his3</i>	Este estudio

## 5.2 Lista de plásmidos

**Tabla 2.** Plásmidos usados en este trabajo (Anexo 4).

Plásmido	Características	Fuente
pRS416	Plásmido mono copia, tiene origen de replicación para levadura y cura auxotrofia por Uracilo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Colon M., et al. 2011
YEpKD352	Plásmido multicopia, tiene origen de replicación para levadura y cura auxotrofia por Uracilo en <i>Kluyveromyces lactis</i>	Colon M., et al. 2011
pLk-EE	Plásmido mono copia, tiene origen de replicación para levadura y cura auxotrofia por Uracilo en <i>Lachancea Kluyveri</i>	Este estudio
pFA6A	Contiene cassette de resistencia a kanMx4 (Geneticina (G418))	Wach <i>et al.</i> , 1997
p4339	Contiene cassette de resistencia a natMx4 (Nourseotricina (Clon-nat))	Goldstein and McCusker, 1999.

### **5.3 Análisis *in silico* y obtención de secuencias codificantes y promotoras**

Para este trabajo se utilizó como región promotora del gen de interés (*GDH1*, *GDH3*, *KlGDH1* y *LkGDH1*) 1000pb río arriba del ATG. Estas secuencias se obtuvieron de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) y GENOLEVURES Database (<http://www.geneolevures.org/>).

### **5.4 Diseño de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos se diseñaron con *primer3* (<http://primer3.ut.ee/>). Las temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) y ausencia de *hairpin* de cada pareja de oligonucleótidos se obtuvieron mediante la página *Oligonucleotide properties calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Los oligonucleótidos usados para la elaboración de las diferentes mutantes se enlistan en el Anexo 1.

### **5.5 Extracción de DNA genómico de levadura**

La obtención del DNA genómico de levadura, se realizó usando el protocolo de extracción de DNA con Triton X-100 (APENDICE B), con diferentes fines: i) la amplificación de módulos mediante PCR para verificar cepas que se sacaban de glicerol y para la generación de mutantes; ii) verificar mutantes generadas en este proyecto y iii) para ensayos de RT-PCR.

## 5.6 Construcción de mutantes nulas

La construcción de las mutantes se llevó a cabo por una inserción por recombinación homóloga (APENDICE A) de un módulo amplificado a partir del plásmido pFA6a-*kanMx4* el cual confirió resistencia a geneticina (marcador de selección) (Wach *et al.*, 1997); o de un módulo amplificado a partir del plásmido p4339-*natMx4* el cual confirió resistencia a nourseotricina (marcador de selección) (Fig. 9).

Para el caso de *L. kluyveri*, la mutante sencilla *Lkgdh1Δ* (*Lk156-2*) fue obtenida reemplazando el ORF de *LkGDHI* con el marcador de selección *kanMx4*. El gen *LkGDHI* fue reemplazado por recombinación homóloga usando un módulo que contenía el cassette de *kanMX4* (1469 pb) flanqueados por 1067 pb de la región 5'UTR (-1074 a -7) y 1146 pb de la región 3'UTR (+1368 a +2514) de la secuencia de *LkGDHI*. Este módulo (3320 pb) fue amplificado usando la técnica de PCR con los oligonucleótidos 107 y 108 (-979 a +2341) usando como templado tres módulos independientes i) el módulo *LkGDHI* 5'UTR usando los oligonucleótidos 101 y 102 y un DNA genómico de la cepa *Lk156-1* como templado, ii) el módulo de *kanMX4* el cual fue amplificado del plásmido pFA6a usando los oligonucleótidos 105 y 106, y iii) el módulo *LkGDHI* 3'UTR usando los oligonucleótidos 103 y 104 y un DNA genómico de la cepa *Lk156-1* como templado. El producto de la reacción de PCR fue transformado en la cepa *Lk156-1*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a G418 (200 µg ml<sup>-1</sup>). Posteriormente se usaron los oligonucleótidos 108-1 y 108-2 para verificar la construcción *Lkgdh1Δ::kanMx4*, estos primers generaron un módulo de 1517 pb (+216 de *kanMx4* a +2648 de la región 3'UTR de *LkGDHI*) usando como templado DNA genómico que se extrajo de las colonias resistentes a G418. Las secuencias de oligonucleótidos se encuentran listadas en el Anexo 1.

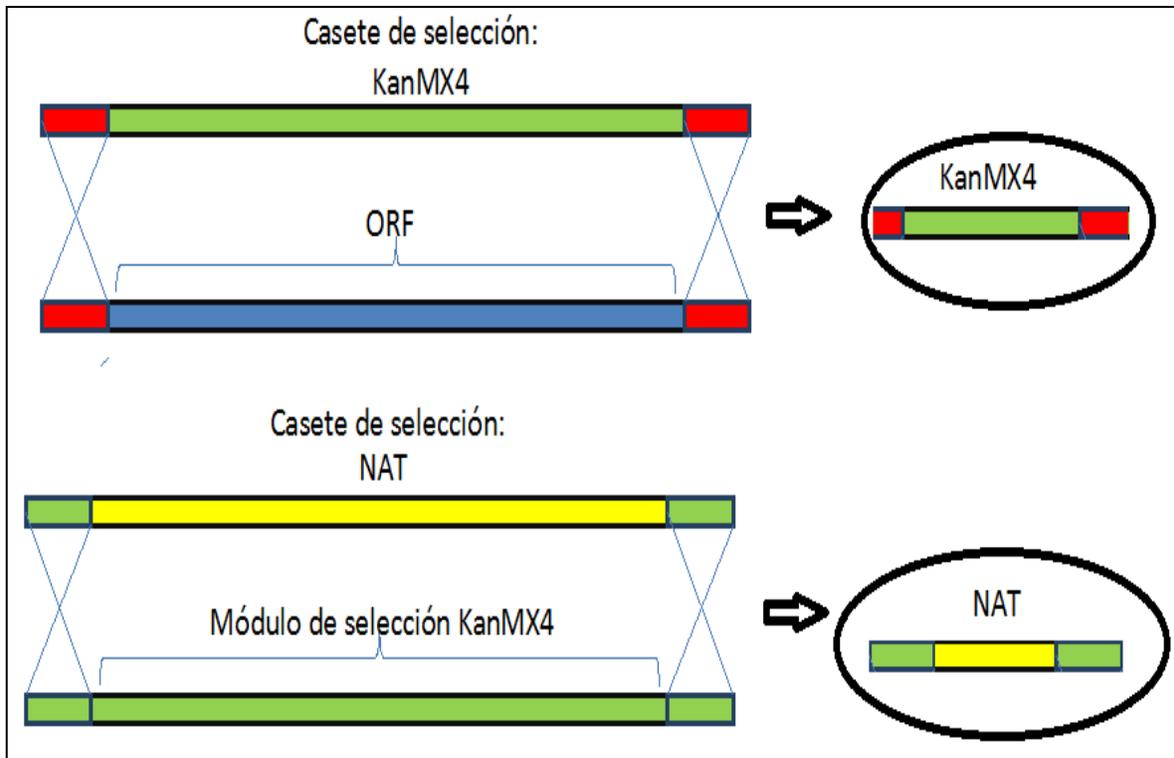
La cepa mutante de *L. kluyveri* *Lkgl1Δ* (*Lk156-3*) fue obtenida reemplazando el ORF de *LkGLT1* con el marcador de selección *natMx4*. El gen de *LkGLT1* fue reemplazado por recombinación homóloga usando un módulo que contenía el cassette de *natMX4* (1477 pb), flanqueado por 1005 pb de la región 5'UTR (-1006 a -1) y 1006 pb de la región 3'UTR (+6438 a +7444) de la secuencia de *LkGLT1*. Este módulo (3488 pb) fue amplificado usando la técnica de PCR con los oligonucleótidos 111 y 114 usando como templado tres módulos independientes: i) el módulo *LkGLT1* 5'UTR fue amplificado usando los oligonucleótidos 111 y 112, ii) el módulo *natMx4* module flanqueado por regiones homólogas al extremo 5'UTR y 3'UTR del gen *LkGLT1*, el cual fue amplificado del plásmido p4339 usando los oligonucleótidos 109 y 110, y iii) el módulo *LkGLT1* 3'UTR usando los oligonucleótidos 113 y 114. El producto de la PCR fue transformado en la cepa *Lk156-1*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a nourseotricina (100 µg ml<sup>-1</sup>). Los oligonucleótidos 115 y 116 fueron usados para verificar la construcción *Lkgl1Δ::natMx4*, estos oligonucleótidos generaron un fragmento de 1012 pb (+875 de *natMx4* a +1887 del 3'UTR de *LkGLT1*) usando DNA genómico de las transformantes resistentes a nourseotricine como templado.

Para generar la cepa doble mutante de *L. kluyveri* (*Lk156-4*), cómo se describió anteriormente para la cepa *Lkgdh1Δ::kanMx4*, el cassette fue transformado en la cepa *Lk156-3*. Las transformants fueron seleccionadas por su Resistencia a G418 (kanamycin) (200 µg ml<sup>-1</sup>) y nourseotricine (100 µg ml<sup>-1</sup>). Los oligonucleotides 108-1 y 108-2 fueron usados para verificar la construcción como se describe anteriormente para la cepa *Lk156*, usando DNA genómico de las colonias resistentes a G418 y nourseotricine como templado.

Para la cepa en *K. lactis* *KlGDH1Δ* (*KlW37-2*), la mutante fue obtenida por reemplazar el ORF de *KlGDH1* con el marcador de selección *natMx4*. El gen *KlGDH1* fue reemplazado por recombinación homóloga usando un módulo que contenía el cassette de *natMX4* (1578 pb) flanqueado por 1000 pb de la región

5'UTR (-1000 a -1) y 997 pb de la región 3'UTR (+1386 a +2383) de la secuencia del gen *KIGDHI*. Este módulo (3575 bp) fue amplificado por la extensión sobrelapada de una reacción de PCR usando los oligonucleótidos 119 y 122 usando como templado tres módulos independientes: i) el módulo de *KIGDHI* 5'UTR fue amplificado usando los oligonucleótidos 119 y 120, ii) el módulo de *natMx4* flanqueado por regiones homólogas a la región 5'UTR y 3'UTR del gen *KIGDHI*, el cual fue amplificado del plásmido p4339 usando los oligonucleótidos 117 y 118, y iii) el módulo de amplificado de *KIGDHI* 3'UTR usando los oligonucleótidos 121 y 122. El producto de la PCR fue transformada en la cepa *KIWM37-1*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a nourseotricina (100 µg ml<sup>-1</sup>). Los oligonucleótidos 123 y 124 fueron usados para verificar la construcción *Klgh1Δ::natMx4*, Estos primers generaron un módulo de 2030 pb (-277 de la región 5'UTR de *KIGDHI* a +1670 de la región 3'UTR de *KIGDHI*) usando DNA genómico de las transformantes resistentes a nourseotricina como templado.

Para generar la cepa doble mutante de *K. lactis Klgh1Δ-Klgl1Δ* (*KIWM37-4*), cómo se describió anteriormente para la cepa *Klgh1Δ::natMx4*, el cassette fue transformado en la cepa *KIWM37-3* (Valenzuela *et al.*, 1995). Las transformants fueron seleccionadas por su resistencia a G418 (geneticina) (200 µg ml<sup>-1</sup>) y nourseotricine (100 µg ml<sup>-1</sup>). Los oligonucleotides 123 y 124 fueron usados para verificar la construcción como se describe anteriormente para la cepa *KIWM37-2*, usando DNA genómico de las colonias resistentes a G418 y nourseotricine como templado.



**Figura 9. Construcción de mutantes.** El esquema ilustra la forma en como se realiza una mutante usando el método de recombinación homóloga, donde se usan un par de oligonucleotidos específicos homólogos a un cassette que genera resistencia y despues este módulo es integrado por recombinación homóloga en el locus específico del genoma.

### 5.7 Construcción de Plásmidos que llevan integrado el gen *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* o *KlGDH1*

Todas las técnicas estándares de bilogía molecular fueron seguidas, como se describe previamente (Sambrook *et al.*, 1989). Los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* fueron amplificados por PCR junto con su respectiva secuencia promotora 5' y clonada dentro de los vectores vector pRS416 (*CEN6-ARSH4-URA3*), p*Lk*-EE (*CEN6-ARSH4-LkURA3*) (donado por la Dra. Lina Riego-Ruiz), o YEpKD352 (pKD1 ori-*KIURA3*), respectivamente (Anexo 4) (Colon *et al.*, 2011; Wach *et al.*, 1994). La clonación dentro del plásmido pRS416 fue hecha de la siguiente manera: Para el gen *ScGDH1*, unos 2514 pb de la región ubicada entre los

-850 pb rio arriba del codon de inicio y +275 pb rio abajo del codon de paro, fueron amplificados con los oligonucleótidos 133 y 134 usando DNA genómico de *S. cerevisiae* (CLA1) WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pRS416 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I y después de la purificación de gel fueron ligados para generar el plásmido pRS416-*ScGDH1*. Para el gen *ScGDH3*, unos 2466 pb entre -780 pb rio arriba del codon de inicio y +288 pb rio abajo del codon de paro fueron amplificados usando los oligonucleótidos 135 y 136 usando DNA genómico de la cepa de *S. cerevisiae* (CLA1) WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pRS416 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I y después de la purificación de gel fueron ligados para generar el plásmido pRS416-*ScGDH3*. Para el gen *LkGDH1*, unos 2611 pb entre -920 pb rio arriba del codon de inicio y +281 pb rio abajo del codon de paro fueron amplificados usando los oligonucleótidos 137 y 138 usando DNA genómico de la cepa de *L. kluyveri* (Lk156-1) WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pRS416 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sac*I y después de la purificación de gel fueron ligados para generar el plásmido pRS416-*LkGDH1*. Para el gen *KlGDH1*, unos 2532 pb entre -874 pb rio arriba del codon de inicio y +248 pb rio abajo del codon de paro fueron amplificados usando los oligonucleótidos 139 y 140 usando DNA genómico de la cepa de *K. lactis* (KIWM37-1) WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pRS416 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xba*I y después De la purificación de gel fueron ligados para generar el plásmido pRS416-*KlGDH1*. Estos plásmidos fueron transformados también en las cepas CLA2 y CLA5 como está indicado en la tabla 1. Las clonaciones fueron secuenciadas para checar la integridad del ORF.

Las clonaciones dentro del plásmido p*Lk*-EE fueron hechas de la siguiente manera: Para el gen *ScGDH1*, los plásmidos pRS416-*ScGDH1* y p*Lk*-EE fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I y después purificados por gel,

el fragmento que contenía a *ScGDH1* y el plásmido p*Lk*-EE fueron ligados para generar el plásmido p*Lk*-EE-*ScGDH1*. Para el gen *ScGDH3*, los plásmidos pRS416-*ScGDH3* y p*Lk*-EE fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sac*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *ScGDH3* y el plásmido p*Lk*-EE fueron ligados para generar el plásmido p*Lk*-EE-*ScGDH3*. Para el gen *LkGDH1*, los plásmidos pRS416- *LkGDH1* y p*Lk*-EE fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xba*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *LkGDH1* y el plásmido p*Lk*-EE fueron ligados para generar el plásmido p*Lk*-EE- *LkGDH1*. Y para el gen *KlGDH1*, los plásmidos pRS416- *KlGDH1* y p*Lk*-EE fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sma*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *KlGDH1* y el plásmido p*Lk*-EE fueron ligados para generar el plásmido p*Lk*-EE-*KlGDH1*. Estos plásmidos fueron transformados también en la cepa *Lk156-2* como está indicado en la tabla 1. Los genes clonados fueron secuenciados para verificar la integridad del ORF.

Las clonaciones dentro del plásmido YEpKD352 fueron hechas de la siguiente manera: Para el gen *ScGDH1*, los plásmidos pRS416-*ScGDH1* y YEpKD352 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sac*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *ScGDH1* y el plásmido YEpKD352 fueron ligados para generar el plásmido YEpKD352-*ScGDH1*. Para el gen *ScGDH3*, los plásmidos pRS416-*ScGDH3* y YEpKD352 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Sma*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *ScGDH3* y el plásmido YEpKD352 fueron ligados para generar el plásmido YEpKD352-*ScGDH3*. Para el gen *LkGDH1*, los plásmidos pRS416- *LkGDH1* y YEpKD352 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xba*I y después purificados por gel, el fragmento que contenía a *LkGDH1* y el plásmido YEpKD352 fueron ligados para generar el plásmido YEpKD352- *LkGDH1*. Y para el gen *KlGDH1*, los plásmidos pRS416- *KlGDH1* y YEpKD352 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Xho*I y después purificados por gel, el fragmento que

contenía a *KIGDH1* y el plásmido YEpKD352 fueron ligados para generar el plásmido YEpKD352- *KIGDH1*. Estos plásmidos fueron transformados también en la cepa *KIWM37-2* como está indicado en la tabla 1. Los genes clonados fueron secuenciados para verificar la integridad del ORF.

Las cepas de levadura (*S. cerevisiae*, *L. kluyveri* and *K. lactis*) fueron transformadas usando un método que ya estaba descrito por Ito *et al.*, 1983. Las transformantes fueron seleccionadas por prototrofia de uracilo en medio mínimo (MM).

### **5.8 Condiciones de cultivo**

Las cepas fueron crecidas en un medio mínimo (MM) que contenía sales, elementos traza y vitaminas siguiendo la fórmula de base de nitrógeno para levadura (Difco). Glucosa (2%, w/v) o etanol (2%, w/v) fue usada como fuente de carbono. 40 mM sulfato de amonio o 5 mM de glutámico fue usado como fuente de nitrógeno. Se agregaron los suplementos necesarios para satisfacer las auxotrofías requeridas a la siguiente concentración: 0.1 mg ml<sup>-1</sup>. Las células fueron incubadas a 30° C con agitación constante (250 rpm). El crecimiento fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm (Thermo Fisher Scientific, Genesys 20 model 4001/4 spectrophotometer).

### **5.9 Extracción de RNA total de levadura e Hibridación tipo Northern Blot**

El análisis tipo Northern Blot (NB) se llevaron a cabo de acuerdo con Struhl y Davis, 1981. Las muestras de RNA total de levadura se obtuvieron de cultivos de 200 ml a una OD<sub>600</sub> de 0.3, 0.6 y 0.9 en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol al 2% como fuente de carbono. La extracción

se hizo siguiendo el protocolo de fenol ácido (APENDICE C). Después de la extracción, la muestra de RNA se cargó en un gel de agarosa siguiendo el protocolo de hibridación tipo NB (APENDICE C) y la membrana se hibridó con las sondas generadas para *GDHs* y como control de carga se usó el gen ribosomal *ACT1* para el caso de *S. cerevisiae* y el gen ribosomal *18s* para *L. kluyveri* y *K. lactis*. Las sondas se amplificaron usando los oligonucleótidos descritos en el anexo 2.

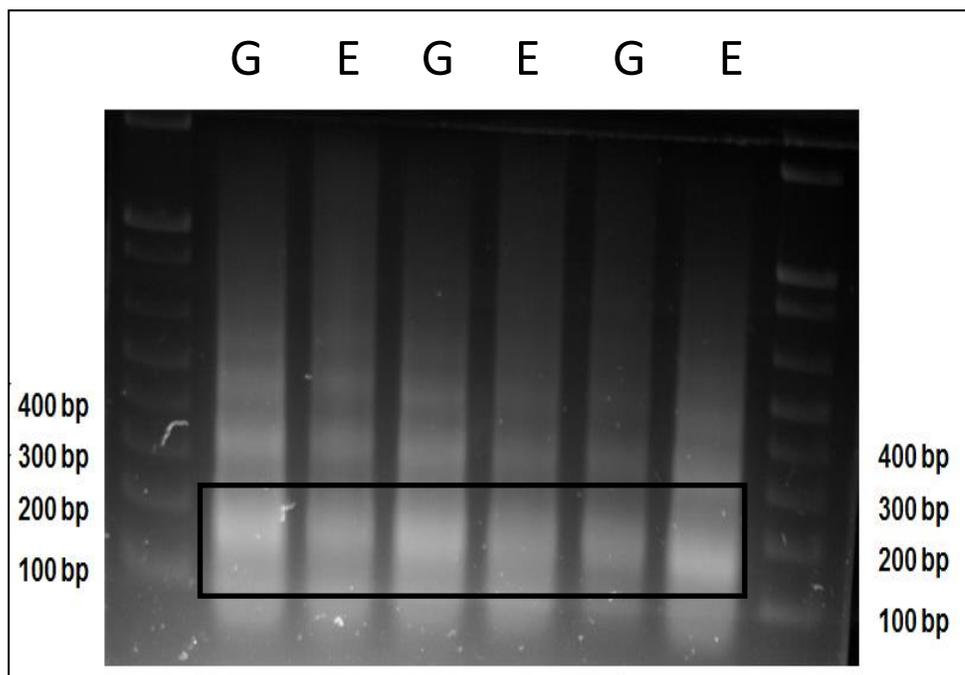
### 5.10 Análisis de posicionamiento de nucleosomas (NuSA)

El análisis de posicionamiento de nucleosomas se realizó para observar la organización de la cromatina en los promotores de los parálogos *ScGDH1* y *ScGDH3* y con un fin comparativo se realizó también sobre los ortólogos en las especies tipo ancestral *K. lactis* y *L. kluyveri* (*KlGDH1* y *LkGDH1* respectivamente). El procedimiento para realizar el estudio del posicionamiento de nucleosomas sobre los promotores de *ScGDH1*, *ScGDH3*, *KlGDH1* y *LkGDH1* se realizó como describe Infante *et al.*2012.

Se crecieron cultivos celulares en MM con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y 2% glucosa o etanol como fuente de carbono a una OD 600 nm de 0.5, una vez que se tenían las condiciones deseadas del cultivo se le agrega formaldehído al 37% y se mantiene en agitación constante por 15 minutos, el formaldehído genera enlaces covalentes entre las proteínas y el DNA lo que hace la interacción fija; a esto se le llama entrecruzamiento (*crosslinking*, en inglés), después se incubaron con glicina 2.5 M por 5 minutos más. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugan a 1200 rpm por 5 minutos. Posterior a esto, el sobrenadante se elimina y el pellet se resuspende en amortiguador Z2 (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.4,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y zimoliasa 10 mg/mL); se dejan incubando 20 minutos a 30°C. Se centrifugaron los esferoplastos a 1500 rpm, 10 minutos por 4°C, después de la centrifugación se resuspendieron en amortiguador NPS (espermina 0.05 mM,

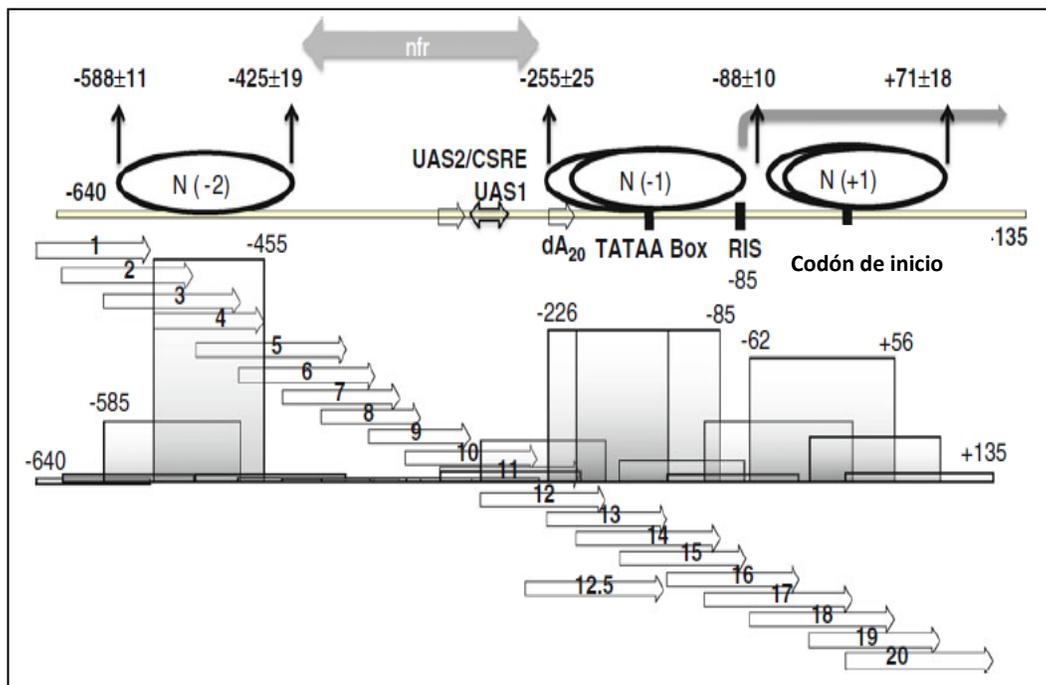
NP-40 0.075% v/v, NaCl 50 mM, Tris-HCl 10mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y β-mercaptoetanol 1 mM) y se transfirieron a tres tubos de 1.5 mL en donde se agregó 3 μL MNasa (15 U/μL). Se realizaron 3 digestiones a 50 min, 60 min y 70 min a 37°C .

Transcurrido el tiempo se adicionaron 60 μL de SDS al 10% y 10 μL de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL y se incubaron a 65°C ON. Al día siguiente se hizo una extracción de DNA con Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se precipitó por 30 minutos el DNA con alcohol etílico al 100% y 20 μL de NaCl 5 M a -20°C. Se centrifugaron las muestras a 13500 rpm por 20 minutos y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente para después resuspender el pellet en TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA pH 8 1 mM) finalmente se cargó en un gel de agarosa al 1%. Con la digestión se observó un bandeo en el gel (Fig. 10).



**Figura 10. Gel de digestión para generar monosomas.** Digestión con MNasa a los 50, 60 y 70 minutos de digestión, en glucosa amonio (G) y en etanol-amonio (E), la banda de interés es la banda monosomal de 147 pb (recuadro negro), que es la longitud del DNA protegido por un nucleosoma.

Posteriormente se cortó la banda de interés (monosomal) y se purificó por el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de Promega y se procedió a realizar un análisis Q-PCR. Los oligonucleótidos empleados para los promotores fueron diseñados aproximadamente cada 100 pb, estos permiten ir amplificando la región determinada en forma consecutiva. Al hacer el entrecruzamiento con el formaldehído, los nucleosomas quedan fijos y por lo tanto, protegen al DNA, al tratar con la MNasa, ésta no puede acceder y por ende no degrada al DNA, en las regiones donde no hay nucleosomas, el DNA está libre y puede ser degradado por la MNasa. Cuando hacemos el Q-PCR las regiones donde hay mayor amplificación es porque hay DNA que quedó protegido (Fig. 11). Una vez que se obtuvieron los datos de Q-PCR; es decir la cantidad de amplificación; éstos se grafican con respecto a la posición que amplificaron en el promotor.



**Figura 11. Nucleosome Scanning Assay.** Representación gráfica para determinar el posicionamiento de nucleosomas. Las flechas enumeradas representan el par de oligonucleótido que se generan, los cuales van amplificando una región determinada, los óvalos sobre la línea que representa el promotor, son una representación gráfica de los nucleosomas. Cuando hay un nucleosoma, se protege al DNA y hay

Para estos casos se hizo una normalización contra un gen que posee un nucleosoma que nunca se reposiciona independientemente de la condición fisiológica, *VCXI*, un gen que codifica para un transportador vacuolar de calcio. Se buscó el ortólogo en *K. lactis* y *L. kluyveri* con el objetivo de localizar la misma región para poder emplear como normalizador. Los oligonucleótidos empleados para la obtención del posicionamiento de los nucleosomas en el promotor de *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* se encuentran listados en el anexo 3.

### **5.11 Extracción y Cuantificación de proteína total de levadura**

Para la obtención de extractos de proteína total, se inoculo una colonia aislada en 10 ml de YPD y se incubo a 30°C y 250 rpm toda la noche, transcurrido el tiempo se colectan las células por centrifugación dando dos lavados con agua previamente fría. Se inocula el medio de cultivo, el cual fue medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol al 2% como fuente de carbono a una OD<sub>600nm</sub> de 0.05 y se incuba a 30°C con 250 rpm., hasta alcanzar la OD deseada, la cual fue 0,6. Se colectan las células por centrifugación (3000 rpm x 5 min), el pellet se resuspende en 50 µl de agua fría empleando vortex y se vuelve a centrifugar a 3000 rpm x 5 min.

El pellet se resuspende en 20 ml de buffer A (TRIS 100 mM a pH 7.5, EDTA 1 Mm, DTT 1 Mm, PMSF 1 mM y TLCK 50 µg/g de células), centrifugar a 3000 rpm x 5 min a 4°C, se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 2 ml de buffer A. las muestras se dividen en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml y se agrega 0.5 ml de perlas de vidrio a cada tubo. Posterior a esto, las muestras se agitan en vortex a máxima velocidad por un min y se incuba en hielo por un min, este paso se repite de 6 a 7 veces. Para finalizar, las muestras se centrifugan a 3000 rpm x 10 min a 4°C, transcurrido el tiempo, el sobrenadante se toma con mucho cuidado y se alícuota en tubos eppendorf con 200µl y se almacenan a -20° para su uso (Cogoni et al., 1995).

La determinación de proteína se realizó siguiendo el protocolo de Lowry (APENDICE D).

### **5.12 Determinación de actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh**

La actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh se determinó usando una modificación de los protocolos descritos por DeLuna y Valenzuela (DeLuna A., *et al.*, 2001; Valenzuela, L., *et al.* 1995). Esta modificación permite medir la actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh en *Kluyveromyces lactis* y se siguió el protocolo descrito en el APÉNDICE E.

El buffer de reacción se incubó a 30°C en un espectrofotómetro Cary 50 Bio (VARIAN). Se monitorea la absorbancia a 340 nm de 0 a 5 min. La reacción se inicia con la adición del extracto crudo, la absorbancia se monitorea por 30 min más. Una vez terminado el ensayo, se calcula la pendiente (velocidad inicial) de la fase exponencial de la curva de la muestra y de los controles (sin extracto). La actividad se calculó con la fórmula indicada en el APENDICE E.

### **5.13 Purificación de Proteína NADP<sup>+</sup>-Gdh**

#### **Clonación y expresión:**

Los genes *ScGDH1* y *ScGDH3* fueron amplificados por PCR usando los oligonucleótidos 125/126 y 127/128 respectivamente, usando DNA genómico de la cepa *CLAI* WT como templado. Los productos de PCR y del plásmido pET-28a(+) (Anexo 4) fueron digeridos con las enzimas *NheI/XhoI* y después de la purificación por gel fueron ligados (16°C ON). El gen *LkGDH1* fue amplificado con los oligonucleótidos 129 y 130, usando DNA genómico de la cepa *Lk156-1* WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pET-28a(+) fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI/BamHI* y después de la purificación por gel fueron

ligadas. El gen *KIGDH1* fue amplificado con los oligonucleotidos 131 y 132, usando DNA genómico de la cepa *KIWM37-1* WT como templado. El producto de la PCR y el plásmido pET-28a(+) fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI/BamHI* y después de la purificación por gel fueron ligadas.

Las ligaciones fueron transformadas en la cepa DH5 $\alpha$  *E. coli*. Después de la purificación de los plásmidos, se verificó la correcta integración por secuenciación. Para la expresión heteróloga, se transformaron los productos en la cepa BL21 de *E. coli*. Las clonas seleccionadas, fueron crecidas en medio LB suplementado con 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de kanamicina, incubadas a 37 °C con agitación constante (250 rpm). Cuando los cultivos se encontraban en una OD DE 0.6 a 600 nm, se indujo la expresión de las proteínas con 100  $\mu\text{M}$  de IPTG (Iso-Propil-Tio-Galactoside), incubando el cultivo 4 horas a 30 °C con agitación constante (250 rpm), transcurrido el tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación (3500 rpm x 15 min) y el pellet, fue guardado a -70 °C para su posterior utilización.

#### **Obtención de la fracción soluble del extracto de proteína:**

Las células fueron lavadas y resuspendidas en 20 ml de 30 mM imidazol, 1mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Los extractos de proteína fueron obtenidos por sonicación con un tip sonicador, colocando los tubos de muestra en hielo; 5 ciclos (60% amplitud, un segundo on y un segundo off por 1 minuto) con un minuto de incubación en hielo entre cada ciclo. Después se centrifugaron a 3500 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante fue guardado a -20 °C para su posterior utilización.

#### **Cromatografía de afinidad:**

Para purificar las proteínas NADP<sup>+</sup>-GDHs, el sobrenadante obtenido de la extracción fue pasado por una columna equilibrada de níquel (Ni-NTA Agarose 100, Thermo Fisher Scientific), posterior a esto, la columna fue lavada 10 veces con 1 ml de imidazol 30 mM. La proteína fue eluída con 2 ml de imidazol 500 mM y

guardada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso. La homogeneidad de las proteínas fue verificada en una electroforesis de geles de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) y teñidos con azul de Coomassie (Fig. xx).

### **Ensayo enzimático y determinación de proteína:**

La fracción soluble completa del extracto de proteína fue preparada por lisis de los pellets celulares (sonicación) durante la fase exponencial del crecimiento. La actividad de  $\text{NADP}^+$ -GDH fue medida por el método de Doherty (Doherty, 1970) y la concentración de proteína fue medida por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando BSA como estándar.

### **Cinética enzimática y análisis de los datos cinéticos:**

La actividad de  $\text{NADP}^+$ -GDH fue medida por la reacción de aminación a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -KG (0.02-12 mM), NADPH (5-500  $\mu\text{M}$ ), o cloruro de amonio (1-100 mM) y a concentración saturante el resto de los sustratos (8 mM  $\alpha$ -KG, 250  $\mu\text{M}$  NADPH, y 100 mM de cloruro de amonio). El progreso de la reacción fue siempre la conversión del 5% del sustrato inicial. Las mediciones fueron hechas en 100 mM de Tris a pH 7.5 para *ScGdh1*, *ScGdh3* y *LkGdh1* o 0.1 M de fosfato de potasio a pH 7.5 para *KlGdh1*. Para los experimentos en los cuales el pH fue de 5.8 se usó un buffer que contenía 25 mM ácido acético, 25 mM MES y 50 mM de TRIS o fosfato de potasio a pH 5.8. Los datos cinéticos fueron analizados por una regresión no lineal, usando el programa GraphPad Prism 7.00 (Software Inc.). Todos los ensayos fueron elaborados a 340 nm con una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el espectrofotómetro (Varian Cary 50).

#### **5.14 Extracción de metabolitos para la determinación de $\alpha$ -cetoglutarato y glutámico intracelular**

Los extractos y las muestras utilizadas para la determinación intracelular de metabolitos y su análisis se realizaron siguiendo lo descrito previamente por Quezada *et al.* 2011. Los cultivos de células se hicieron en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa o etanol al 2% como fuente de carbono. Las células se sacaron en una OD 600 nm de 0.5 $\approx$ . Para la obtención de los metabolitos, se siguió el protocolo del apéndice G.

#### **5.15 Cinética de Inhibición por Glutámico**

Para conocer la cinética de inhibición de las Gdhs de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*, se prepararon extractos crudos de proteína de cultivos en MM glucosa o etanol 2% como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. Las células se sacaron a una OD 600 nm de 0.5 $\approx$ . Una vez que se tenían los extractos, se midió la concentración de proteína. La reacción fue corrida en el espectrofotómetro a 340 nm a 30 °C por 30min aproximadamente (Varian Cary 50). Para la mezcla de reacción se pusieron los diferentes sustratos a concentración saturada al igual que la proteína y solo se fue variando la concentración de glutámico para poder obtener las curvas de inhibición. Una vez que se generaron las curvas, se hizo el cálculo del IC<sub>50</sub> usando el programa GraphPad Prism 7.00 (Software Inc.).

#### **5.16 Análisis filogenético**

Se usaron un total de 26 taxa en el análisis, incluyendo dos ascomicetos como grupo control (Anexo 5). Las secuencias de glutamato deshidrogenasas fueron obtenidas de las bases de datos YGOB (<http://ygob.ucd.ie>) (Byrne and Wolfe, 2005)

y ESEMBLEFungi (<http://fungi.ensembl.org/index.html>) (Kersey *et al.*, 2016), usando la secuencia de ScGdh1 como guía.

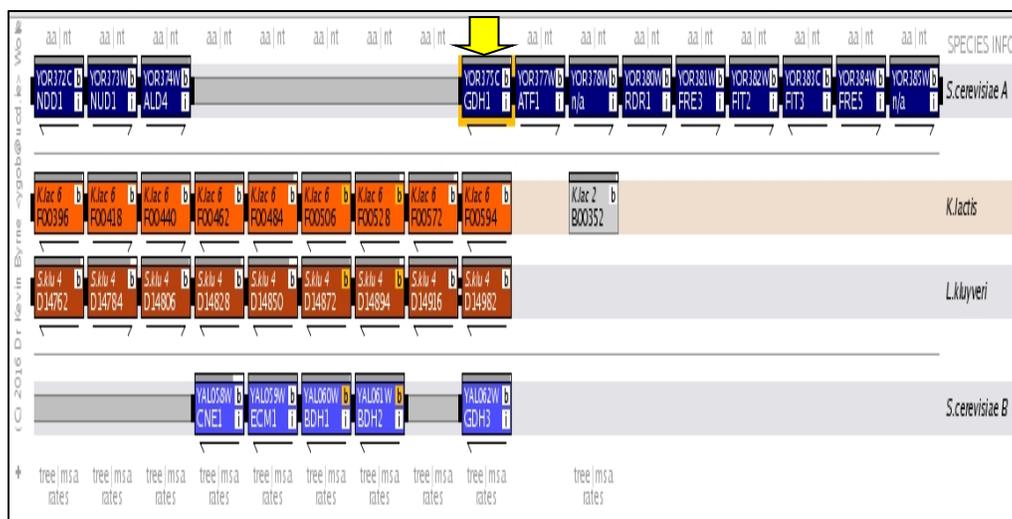
El árbol filogenético fue construido con *MEGA* versión 6 software (<http://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2013), usando 500 replicados, basado en el alineamiento de secuencias construidas con el programa de multi-alineamiento Muscle. Alternadamente, el análisis filogenético fue también conducido con el método de máxima similitud, con el fin de mejorar la exactitud de el análisis filogenético.

## **6. RESULTADOS**

## 6.- RESULTADOS

### 6.1 Análisis de identidad entre las NADP-Gdh's

Las glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP<sup>+</sup> son encargadas de llevar a cabo la biosíntesis de glutámico a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio. Para poder realizar el presente estudio, se seleccionaron dos organismos como modelo tipo ancestral y se hizo un alineamiento para conocer el porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos entre *ScGDH1* *ScGDH3* de *S. cerevisiae* y *GDH1* de *L. kluyveri* y *K. lactis*. Encontrando que *ScGDH1* y *ScGDH3* tienen un 87% de identidad en secuencia de aminoácidos, *ScGDH1* con *KlGDH1* un 74%, *ScGDH3* con *KlGDH1* un 77%, *ScGDH1* con *LkGDH1* un 80%, *ScGDH3* con *LkGDH1* un 74 % y *LkGDH1* con *KlGDH1* un 80 %. De la misma manera se realizó un análisis de sintenia para ver si la única *GDH1* presente en *L. kluyveri* y *K. lactis* eran ortólogos de *ScGDH1* y *ScGDH3* de *S. cerevisiae* (Fig. 12), encontrando que en efectos conservaban el orden sinténico y nos permite corroborar que solo hay una copia de *GDH1* presente en ambos organismos tipo ancestrales (<http://www.ygob@ucd.ie>).



**Figura 12. Sintenia de NADP-Gdh's:** Usando las secuencias de los genes *ScGDH1* (Azul marino), *ScGDH3* (Azul cielo), *LkGDH1* (marrón) y *KlGDH1* (naranja), se encuentra que en son sinténicos y dado esto *LkGDH1* y *KlGDH1* son considerados ortólogos de *ScGDH1* y *ScGDH3* (Flecha amarilla).

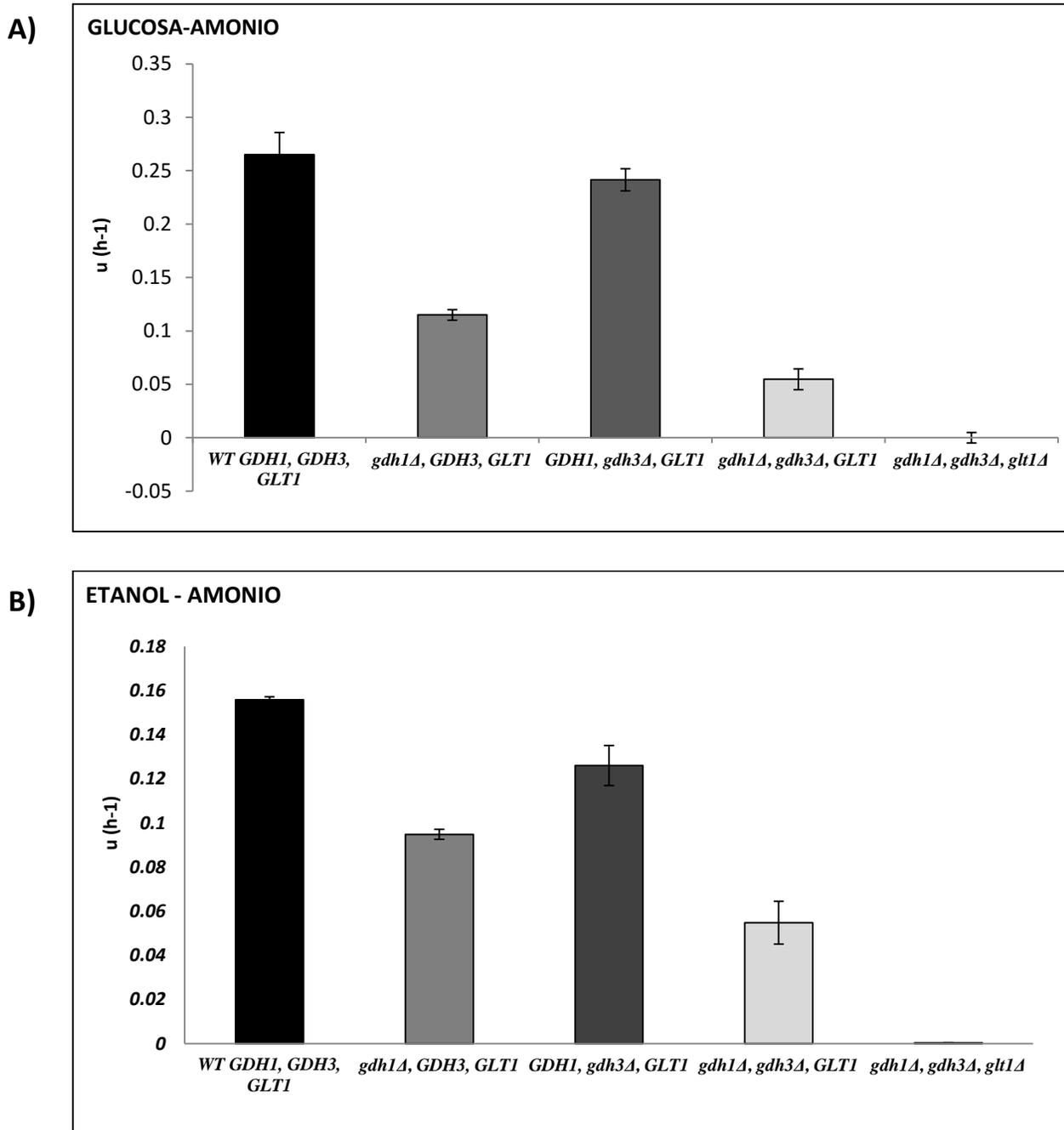
## 6.2 Caracterización fenotípica

El primer objetivo del estudio fue la caracterización fenotípica de las cepas a estudiar; para poder cumplir con tal: se sacó la colección de cepas de *S. cerevisiae* de glicerol y se generaron las mutantes sencillas *Lkgdh1Δ*, *Lkgl1Δ*, *Klgdh1Δ*, *Klgl1Δ* y dobles mutantes *Lkgdh1Δ-Lkgl1Δ* y *Klgdh1Δ-Klgl1Δ* en *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente; una vez que ya se tenía la colección de mutantes comprobadas de las tres levaduras, se procedió a crecerlas en medio mínimo usando glucosa o etanol al 2% como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. Y se obtuvo la velocidad específica ( $\mu$ ) de crecimiento monitoreando la OD 600 nm de cada cultivo en el espectrofotómetro.

En *S. cerevisiae* se puede observar que en un medio con glucosa o etanol como única fuente de carbono, la mutante sencilla *Scgdh1Δ* disminuye a la mitad de la velocidad de crecimiento comparada con la cepa silvestre (WT), mientras que la mutante sencilla *Scgdh3Δ* no muestra efecto en el crecimiento respecto a la WT en glucosa, peor si en etanol ya que disminuye un 10 % aproximadamente; para el caso de la doble mutante *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* se observó que la velocidad de crecimiento se redujo en un 70-80 % aproximadamente y solo en la triple mutante *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ-Scglt1Δ* no hubo crecimiento (Fig. 13).

En cuanto a la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (Gdh-NADP<sup>+</sup>) de *S. cerevisiae*, la cepa silvestre *ScWT* en glucosa como única fuente de carbono tiene una actividad de 0.741  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , la mutante sencilla *Scgdh1Δ* se puede apreciar que se pierde la mayoría de la actividad mientras que en la mutante sencilla *Scgdh3Δ* no se ve afectada; en la doble *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* y triple mutante *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ-Scglt1Δ* se pierde por completo la actividad de Gdh en esta condición (Tabla 3). Pero cuando la actividad es medida en etanol como fuente de carbono se observa que en la mutante sencilla *Scgdh1Δ* pierde la mitad de la actividad de Gdh; mientras que en la mutante sencilla *Scgdh3Δ* no se ve afectada

la actividad, y en la doble *Scgdh1Δ- Scgdh3Δ* y triple mutante *Scgdh1Δ- Scgdh3Δ- Scglt1Δ* al igual que en glucosa como única fuente de carbono la actividad de Gdh no se detectó (Tabla 3).

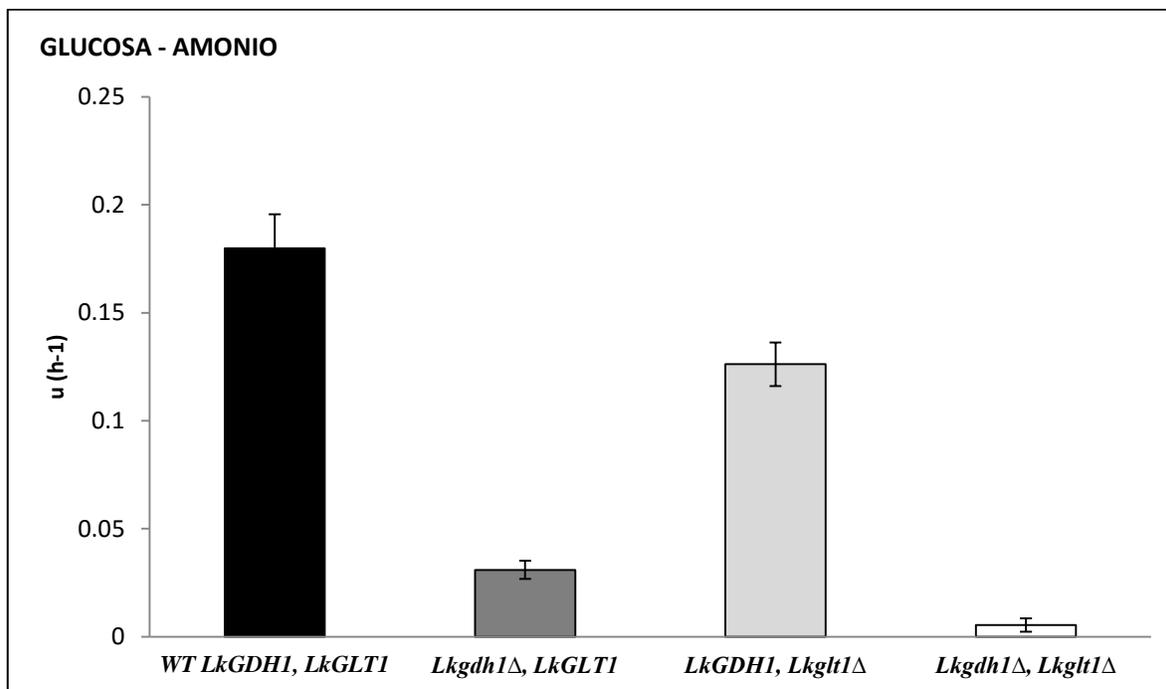


**Figura 13. Velocidad específica de crecimiento, de las cepas de *S. cerevisiae*.** A) *S. cerevisiae* glucosa – amonio (WT 0.258  $h^{-1}$ ) y B) etanol – amonio (WT 0.156  $h^{-1}$ ).

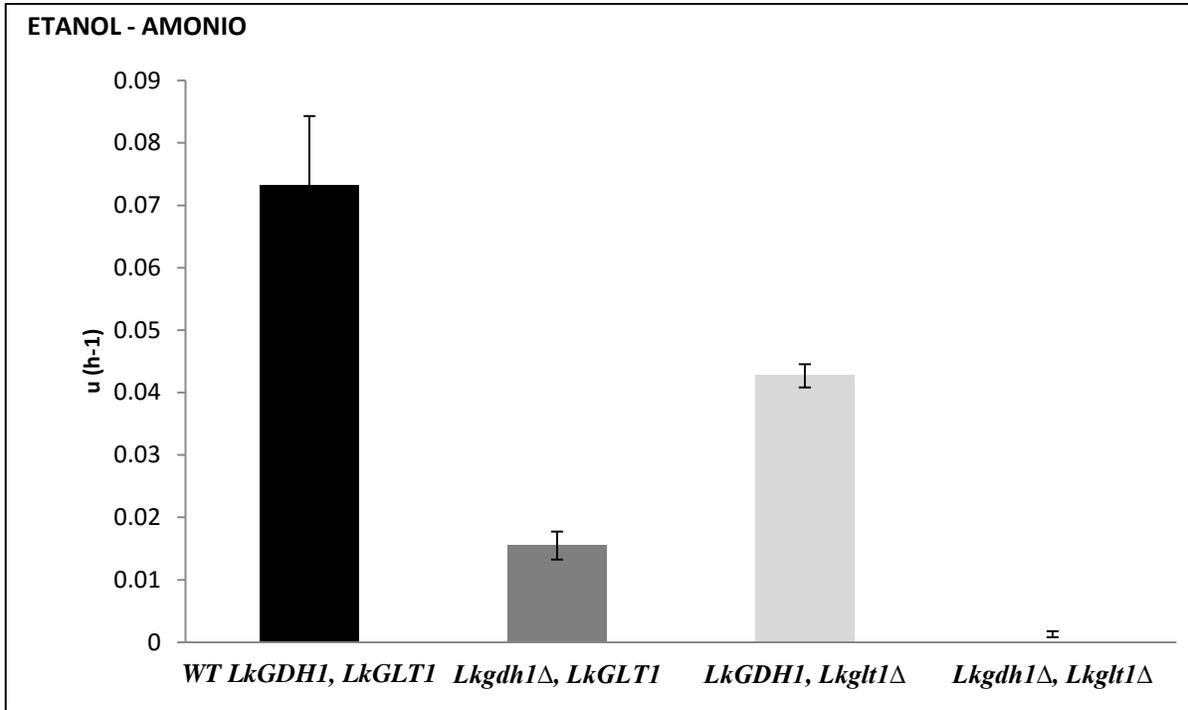
En *L. kluyveri* y *K. lactis* se puede observar que en un medio con glucosa o etanol como única fuente de carbono, las mutantes sencillas *Lkgdh1Δ*, *Klgdh1Δ* disminuye a la velocidad de crecimiento de un 60% a un 80% respectivamente comparada con la cepa silvestre (WT), mientras que en las mutantes sencillas *Lkgl1Δ*, *Klgl1Δ* la velocidad de crecimiento solo disminuyo de un 25% a un 40% respectivamente comparado con la cepa silvestre. Y solo en las dobles mutante *Lkgdh1Δ*-*Lkgl1Δ*, *Klgdh1Δ*-*Klgl1Δ* no hubo crecimiento (Fig. 14).

Al medir la actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>-Gdh) en *L. kluyveri* y *K. lactis*, se observó que las mutantes sencillas *Lkgdh1Δ*, *Klgdh1Δ* y dobles mutantes *Lkgdh1Δ*-*Lkgl1Δ*, *Klgdh1Δ*-*Klgl1Δ* pierden por completo la actividad enzimática, mientras que en la mutantes sencillas *Lkgl1Δ*, *Klgl1Δ* no se ve afectada la actividad (Tabla 3).

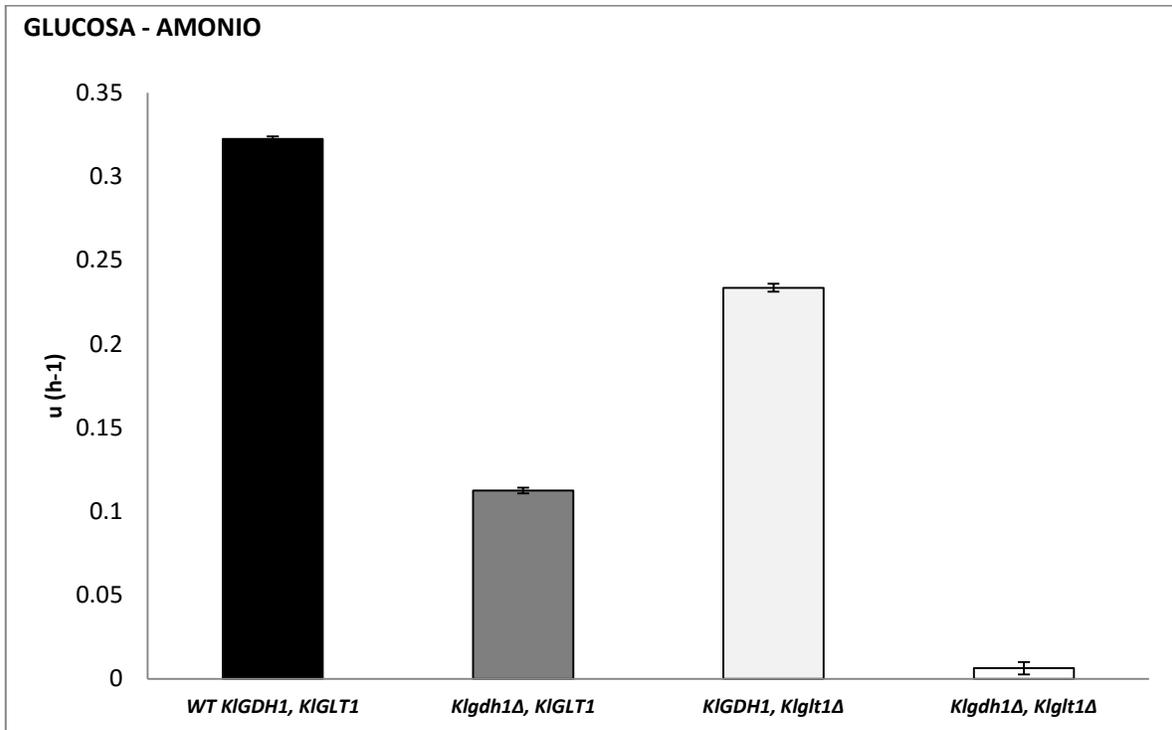
**A)**



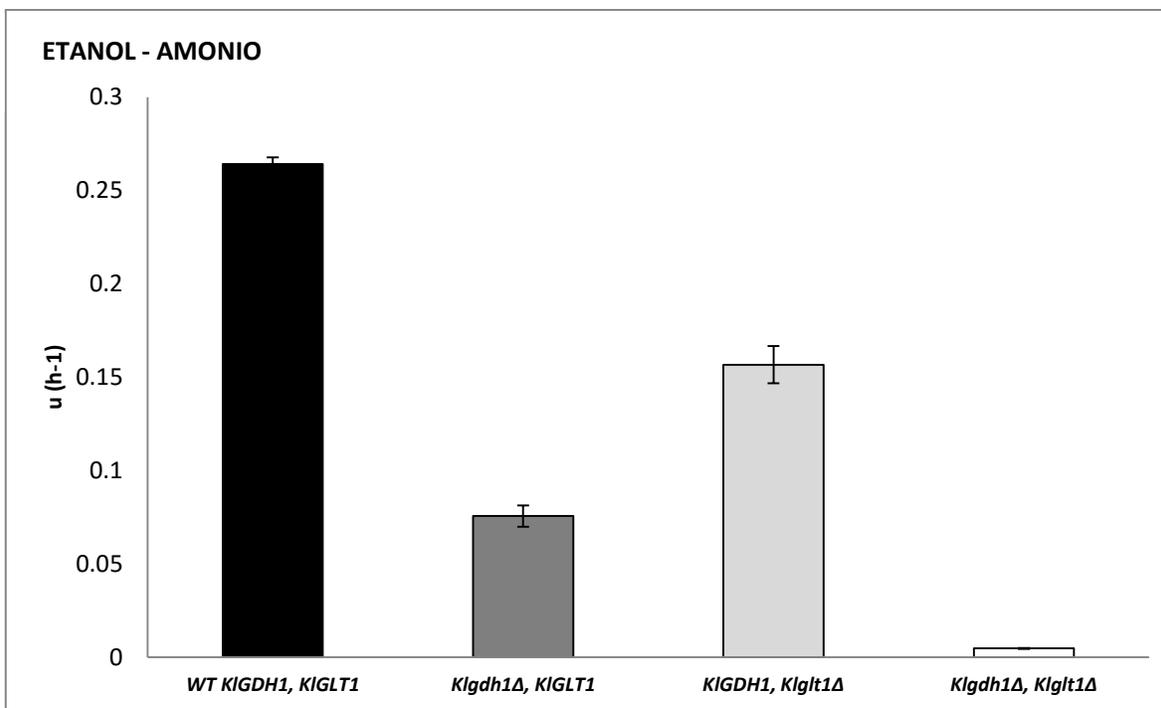
B)



C)



D)



**Figura 14.** Velocidad específica de crecimiento, de las cepas *L. kluyvery* y *K. lactis*. A) *L. kluyvery* glucosa – amonio (WT 0.179 h<sup>-1</sup>), B) *L. kluyvery* etanol – amonio (WT 0.073 h<sup>-1</sup>), C) *K. lactis* glucosa – amonio (WT 0.322 h<sup>-1</sup>) y D) *K. lactis* etanol – amonio (WT 0.264 h<sup>-1</sup>).

Como *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KIGDH1* están involucradas en la biosíntesis de glutámico, se crecieron las cepas en medio mínimo con glutámico (Glu) 5 mM como única fuente de nitrógeno y 2% glucosa o etanol como fuente de carbono. Esto con la finalidad de recuperar el fenotipo en las mutantes donde se veía una disminución del crecimiento al deletar el o los genes involucrados en este pasó de metabolismo de glutámico. Los resultados arrojaron que las mutantes en *gdhΔ* recuperan el fenotipo silvestre (Tabla 3), pero en el caso de las mutantes *gl1Δ* el fenotipo no se recupera al 100 % cuando el glutámico es adicionado al medio, el dato es muy claro en las mutantes sencillas *gl1Δ* de *L. kluyveri* y *K. lactis*, mientras que para *S. cerevisiae* el efecto se aprecia mucho mejor en la triple mutante (Tabla 3). Así mismo se midió la actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh en estas condiciones y se obtuvo que cuando el glutámico es adicionado al medio y usado como única fuente de nitrógeno la actividad de Gdh no se afecta (Tabla 3)

**Tabla 3.** Velocidad de crecimiento y actividad específica de las cepas de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.

Cepas	Velocidad de crecimiento (%)				Actividad Específica ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )			
	Glucosa	Glucosa +Glu	Etanol	Etanol +Glu	Glucosa	Glucosa +Glu	Etanol	Etanol +Glu
<i>S. cerevisiae</i>								
WT <i>ScGDH1 ScGDH3 ScGLT1</i>	100	100	100	100	0.741 (0.05)	0.710 (0.05)	0.818 (0.05)	0.801 (0.06)
<i>Scgdh1</i> $\Delta$ <i>ScGDH3 ScGLT1</i>	37	98	60	95	0.048 (0.02)	0.046 (0.07)	0.459 (0.04)	0.435 (0.04)
<i>ScGDH1 Scgdh3</i> $\Delta$ <i>ScGLT1</i>	91	93	80	91	0.749 (0.06)	0.698 (0.03)	0.938 (0.03)	0.704 (0.04)
<i>Scgdh1</i> $\Delta$ <i>Scgdh3</i> $\Delta$ <i>ScGLT1</i>	20	96	35	95	ND	ND	ND	ND
<i>ScGDH1 ScGDH3 Scglt1</i> $\Delta$	97	94	94	92	0.654 (0.03)	0.694 (0.08)	0.901 (0.06)	0.781 (0.02)
<i>Scgdh1</i> $\Delta$ <i>Scgdh3</i> $\Delta$ <i>Scglt1</i> $\Delta$	ND	74	ND	78	ND	ND	ND	ND
<i>L. kluyveri</i>								
WT <i>LkGDH1 LkGLT1</i>	100	100	100	100	0.252 (0.02)	0.279 (0.07)	0.465 (0.03)	0.424 (0.02)
<i>Lkgdh1</i> $\Delta$ <i>LkGLT1</i>	17	96	20	95	ND	ND	ND	ND
<i>LkGDH1 Lkgl1</i> $\Delta$	70	81	59	77	0.229 (0.03)	0.253 (0.03)	0.418 (0.05)	0.451 (0.08)
<i>Lkgdh1</i> $\Delta$ <i>Lkgl1</i> $\Delta$	ND	72	ND	73	ND	ND	ND	ND
<i>K. lactis</i>								
WT <i>KlGDH1 KlGLT1</i>	100	100	100	100	0.431 (0.03)	0.489 (0.08)	0.645 (0.04)	0.682 (0.05)
<i>Klgdh1</i> $\Delta$ <i>KlGLT1</i>	43	98	32	97	ND	ND	ND	ND
<i>KlGDH1 Klgl1</i> $\Delta$	75	76	64	62	0.446 (0.04)	0.434 (0.04)	0.593 (0.02)	0.587 (0.08)
<i>Klgdh1</i> $\Delta$ <i>Klgl1</i> $\Delta$	ND	78	ND	65	ND	ND	ND	ND

### 6.3 Análisis funcional basado en estudios de complementación

Para determinar en qué medida las distintas NADP<sup>+</sup>-GDH's se especializaron a las peculiaridades metabólicas de las especies a las que pertenecen, se realizaron ensayos de complementación heteróloga. Con este fin *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* fueron clonados en los plásmidos pRS416, pRS416-*Lk* y YEpKD352 para expresarse en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente; estas clonaciones se hicieron bajo el control transcripcional de su respectivo promotor nativo como se describe en la Estrategia experimental. Ya que se tenían las clonaciones, se integraron por transformación con el plásmido pertinente en las mutantes *Scgdh1Δ*, *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ*, *Lkgdh1Δ* y *Klgdh1Δ* ya que estas pierden la actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh. A las cepas complementadas se les hizo curva de crecimiento, actividad enzimática de NADP<sup>+</sup>-Gdh y se compararon los datos.

Para descartar que el plásmido no influyera sobre el fenotipo o actividad enzimática de las cepas complementadas, se transformaron las cepas *Scgdh1Δ*, *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ*, *Lkgdh1Δ* y *Klgdh1Δ* con su respectivo plásmido vacío y se monitoreo el crecimiento de las cepas en medio mínimo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y 2% glucosa o etanol como única fuente de carbono, observando que en efecto los plásmidos por si solos no tienen efecto alguno sobre la cepa (Barras 1 y 2 de las Figuras 15, 16 y 17).

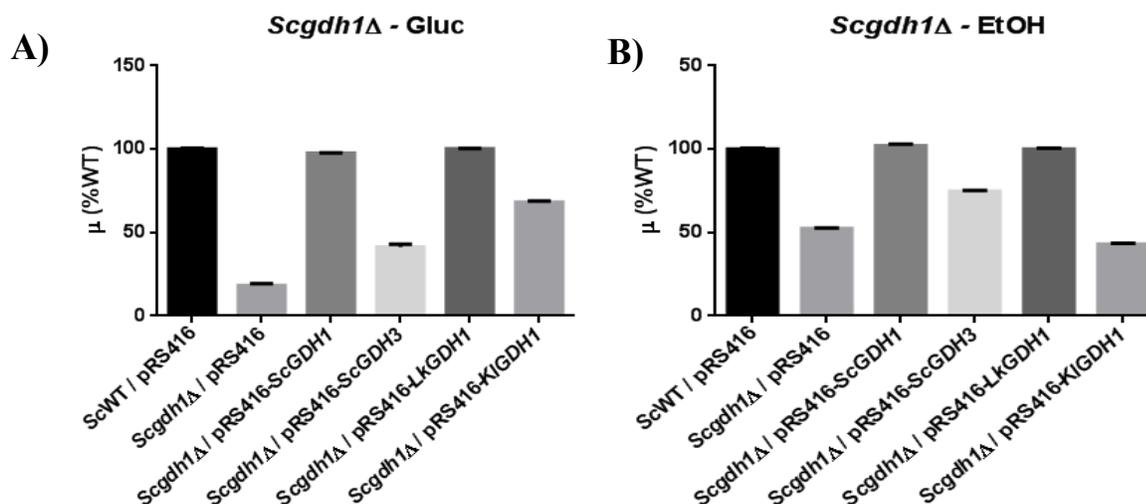
Cuando la cepas *Scgdh1Δ* y *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* de *S. cerevisiae* fueron complementada con el gen *ScGDH1*, se observó que se recuperaba el fenotipo comparado con la cepa silvestre (WT 0.230 h<sup>-1</sup> y 0.154 h<sup>-1</sup>) en ambas fuentes de carbono (tercera barra de la Fig. 15 A, B, C y D), la expresión heteróloga de este gen resulta en la actividad máxima de NADP<sup>+</sup>-Gdh como en la cepa silvestre en ambas fuentes de carbono (Tabla 4).

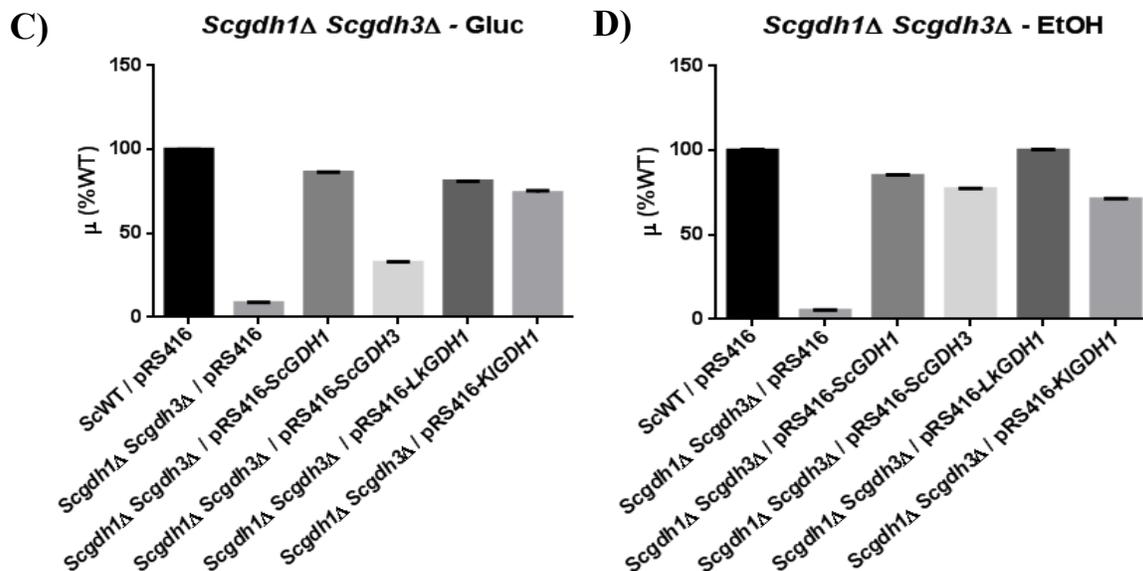
Cuando se complementan con el gen *ScGDH3*, se recupera un discreto pero significativo fenotipo en glucosa, pero en etanol el efecto es mucho más evidente,

pues el fenotipo casi se recupera al 100% (cuarta barra de la Fig. 15 A, B, C y D), al medir la actividad enzimática se obtuvo que en glucosa la actividad de la cepa es mínima, mientras que en etanol se aprecia un aumento de 6 veces más que en glucosa (Tabla 4).

La complementación de ambas cepas con el gen *LkGDH1* resultó en la recuperación del fenotipo comparado con la cepa silvestre en ambas fuentes de carbono (quinta barra de la Fig. 15 A, B, C y D) y la complementación total en comparación con la expresión heteróloga del gen se ve reflejada en la actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh detectada en estas cepas.

Y al complementar ambas cepas con el gen de *K. lactis* (*KIGDH1*) se obtuvo una complementación de un 75 – 95% en glucosa mientras que en etanol se obtuvo una complementación de un 80% en la doble mutante y en la mutante *Scgdh1* sencilla no hubo complementación (sexta barra en la Fig. 15 A, B, C y D), este dato corresponde con la actividad de Gdh detectada en las cepas complementadas (Tabla 4).



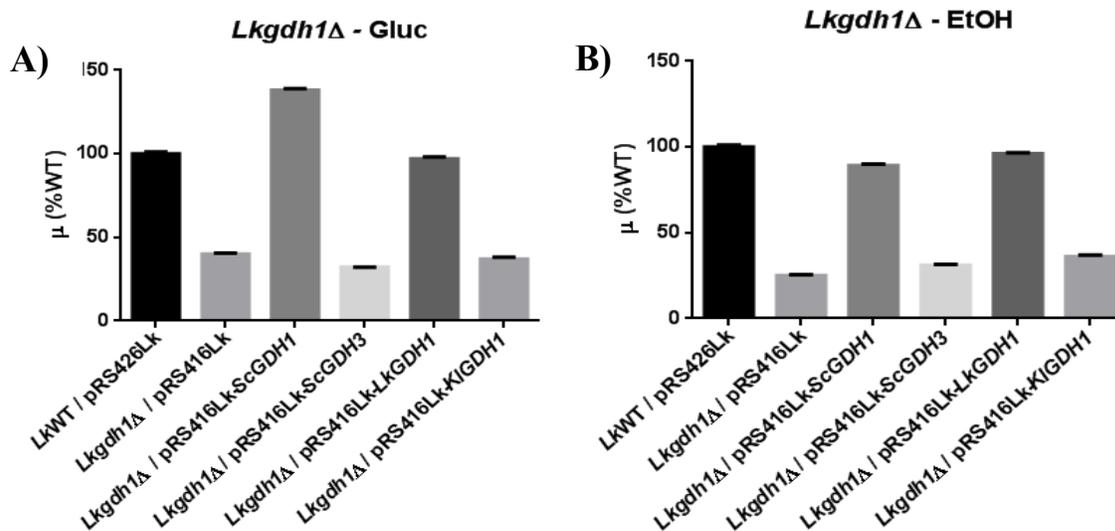


**Figura 15. Complementación heteróloga en *S. cerevisiae*.** Velocidad específica de crecimiento (%), de las cepas *Scgdh1Δ* y *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* complementadas con los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* A) *Scgdh1Δ* glucosa-amonio, B) *Scgdh1Δ* etanol-amonio, C) *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* glucosa-amonio y D) *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ* etanol-amonio.

Para el caso de la cepa de *L. kluyveri* (*Lkgdh1Δ*) complementada con el gen *ScGDH1* y con su propio gen *LkGDH1* se observa una complementación total en ambas fuentes de carbono (tercera y quinta barra de la Fig. 15 A y B) y este dato relaciona con la actividad de Gdh detectada en estas cepas, donde se aprecia que cuando se complementa con *ScGDH1* hay un aumento de casi el doble de actividad enzimática en glucosa como fuente de carbono, y en etanol la actividad es igual a la cepa silvestre (Tabla 4).

Al complementar con los genes *ScGDH3* y *KlGDH1* se obtuvo que en glucosa y etanol estos genes no son capaces de complementar la falta de *LkGDH1* (cuarta y sexta barra de la Fig. 15 A y B). Para verificar si la falta de complementación era porque la proteína no se estaba traduciendo, se midió actividad de Gdh y se encontró que en glucosa no fue posible detectar actividad, pero en etanol se obtuvo una actividad 6 veces menor ( $0.072 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para *ScGDH3*

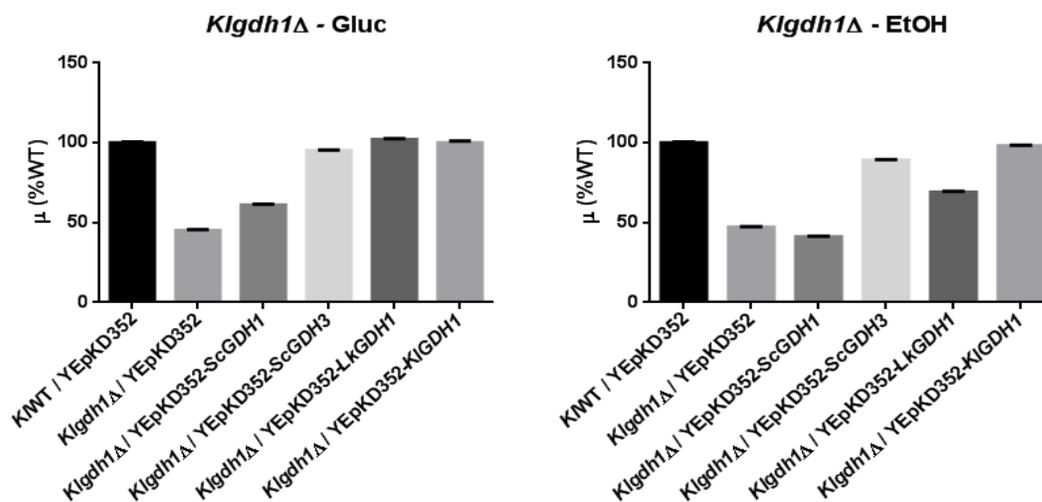
y  $0.091 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para *KlGDH1*) comparada con la actividad que se obtiene en la cepa silvestre ( $0.443 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) (Tabla 4).



**Figura 16. Complementación heteróloga en *L. kluyveri*.** Velocidad específica de crecimiento (%), de la cepa *Lkgdh1Δ* complementada con los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* A) *Lkgdh1Δ* glucosa-amonio, B) *Lkgdh1Δ* etanol-amonio.

Por último se realizaron las pruebas de complementación en la mutante *Klgdh1Δ* de *K. lactis*, con los cuatro genes en estudio. Al complementar la mutante sencilla *Klgdh1Δ* con los genes *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* se observó que estos son capaces de complementar la falta de *GDH* en *K. lactis* en glucosa o etanol como fuente de carbono (cuarta, quinta y sexta barra en la Fig. 16) y al complementar con *ScGDH1*, se encontró que este gen complementa parcialmente en glucosa como única fuente de carbono, pero no es capaz de complementar la falta *GDH* en etanol (tercera barra de la Fig. 16). Así mismo se observó que la complementación y no complementación coincide con los datos de expresión heteróloga de las proteínas, pues al medir la actividad de  $\text{NADP}^+$ -Gdh en la cepa complementada con los genes *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* la actividad es similar a la que se detecta en la cepa silvestre y cuando se complementó con *ScGDH1*, en glucosa la actividad es tres

veces menor comparada con la cepa silvestre y en etanol no se detectó actividad (Tabla 4).



**Figura 17. Complementación heteróloga en *K. lactis*** Velocidad específica de crecimiento (%), de la cepa *Klgh1Δ* complementada con los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* A) *Klgh1Δ* glucosa-amonio, B) *Klgh1Δ* etanol-amonio.

**Tabla 4.** Actividad específica de las cepas de *Scgdh1Δ*, *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ*, *Lkgdh1Δ* y *Klgh1Δ* complementadas con los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KIGDH1*.

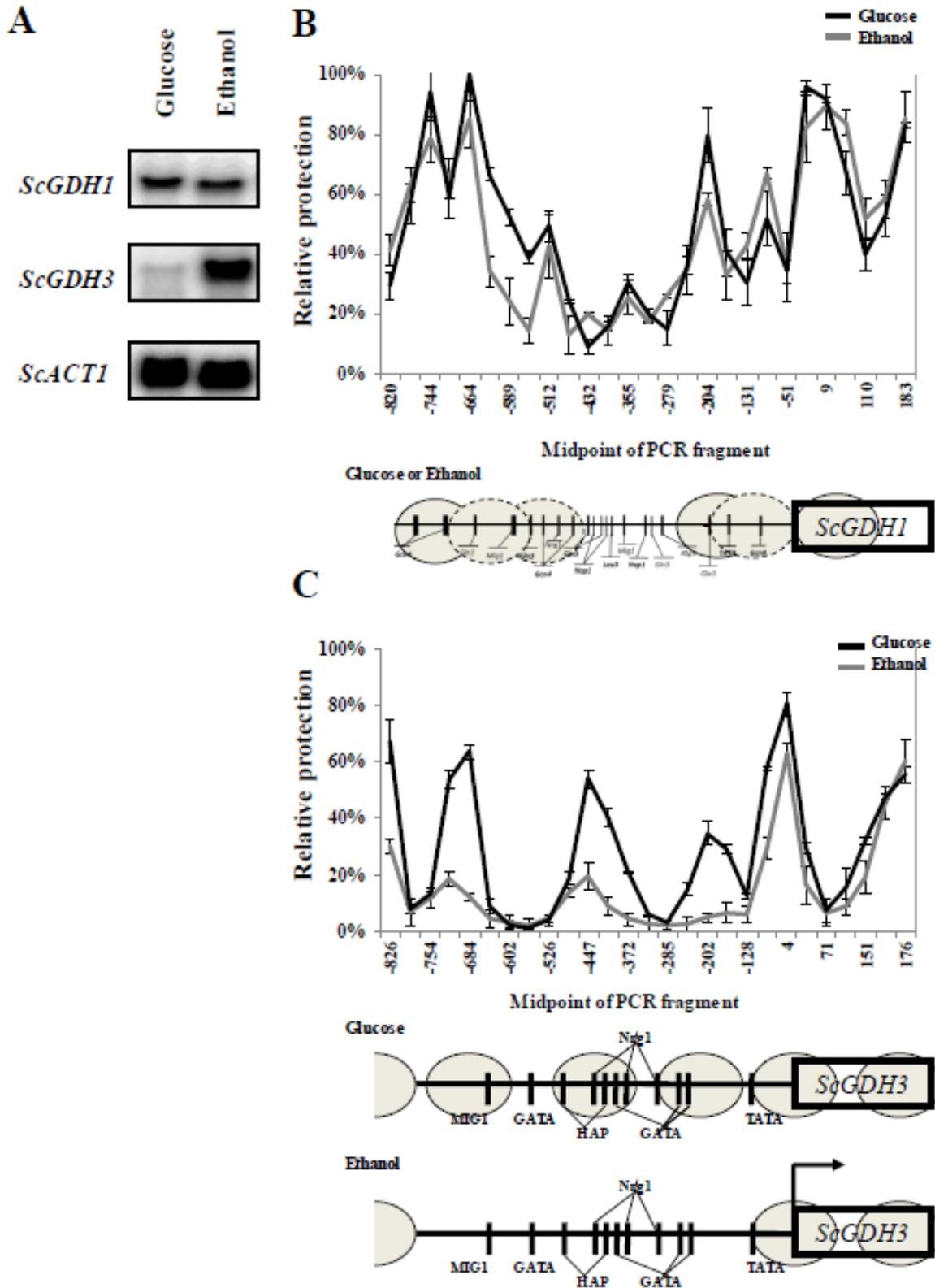
Cepas	Actividad Específica	
	Glucosa	Etanol
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
<i>Sc</i> WT/pRS416	0.721 (0.03)	0.710 (0.04)
<i>Scgdh1Δ</i> /pRS416	0.039 (0.03)	0.434 (0.04)
<i>Scgdh1Δ</i> /pRS416- <i>ScGDH1</i>	0.732 (0.03)	0.679 (0.06)
<i>Scgdh1Δ</i> /pRS416- <i>ScGDH3</i>	0.069 (0.01)	0.403 (0.02)
<i>Scgdh1Δ</i> /pRS416- <i>LkGDH1</i>	0.687 (0.03)	0.684 (0.04)
<i>Scgdh1Δ</i> /pRS416- <i>KIGDH1</i>	0.308 (0.01)	0.307 (0.03)
<i>Scgdh1Δ Scgdh3Δ</i> /pRS416	ND	ND
<i>Scgdh1Δ Scgdh3Δ</i> /pRS416- <i>ScGDH1</i>	0.684 (0.03)	0.664 (0.04)
<i>Scgdh1Δ Scgdh3Δ</i> /pRS416- <i>ScGDH3</i>	0.071 (0.01)	0.372 (0.05)
<i>Scgdh1Δ Scgdh3Δ</i> /pRS416- <i>LkGDH1</i>	0.593 (0.03)	0.508 (0.03)
<i>Scgdh1Δ Scgdh3Δ</i> /pRS416- <i>KIGDH1</i>	0.435 (0.02)	0.419 (0.06)
<b><i>L. kluyveri</i></b>		
<i>Lk</i> WT/pRS416 <i>Lk</i>	0.291 (0.07)	0.443 (0.04)
<i>Lkgdh1Δ</i> /pRS416 <i>Lk</i>	ND	ND
<i>Lkgdh1Δ</i> /pRS416 <i>Lk-ScGDH1</i>	0.467 (0.05)	0.379 (0.02)
<i>Lkgdh1Δ</i> /pRS416 <i>Lk-ScGDH3</i>	ND	0.072 (0.01)
<i>Lkgdh1Δ</i> /pRS416 <i>Lk-LkGDH1</i>	0.274 (0.07)	0.428 (0.03)
<i>Lkgdh1Δ</i> /pRS416 <i>Lk-KIGDH1</i>	ND	0.091 (0.01)
<b><i>K. lactis</i></b>		
<i>Kl</i> WT/ YE <p>KD352</p>	0.471 (0.07)	0.657 (0.05)
<i>Klgh1Δ</i> / YE <p>KD352</p>	ND	ND
<i>Klgh1Δ</i> / YE <p>KD352-<i>ScGDH1</i></p>	0.176 (0.05)	ND
<i>Klgh1Δ</i> / YE <p>KD352-<i>ScGDH3</i></p>	0.349 (0.04)	0.441 (0.06)
<i>Klgh1Δ</i> / YE <p>KD352-<i>LkGDH1</i></p>	0.431 (0.05)	0.325 (0.03)
<i>Klgh1Δ</i> / YE <p>KD352-<i>KIGDH1</i></p>	0.478 (0.08)	0.631 (0.05)

#### **6.4 Perfil de expresión de los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1***

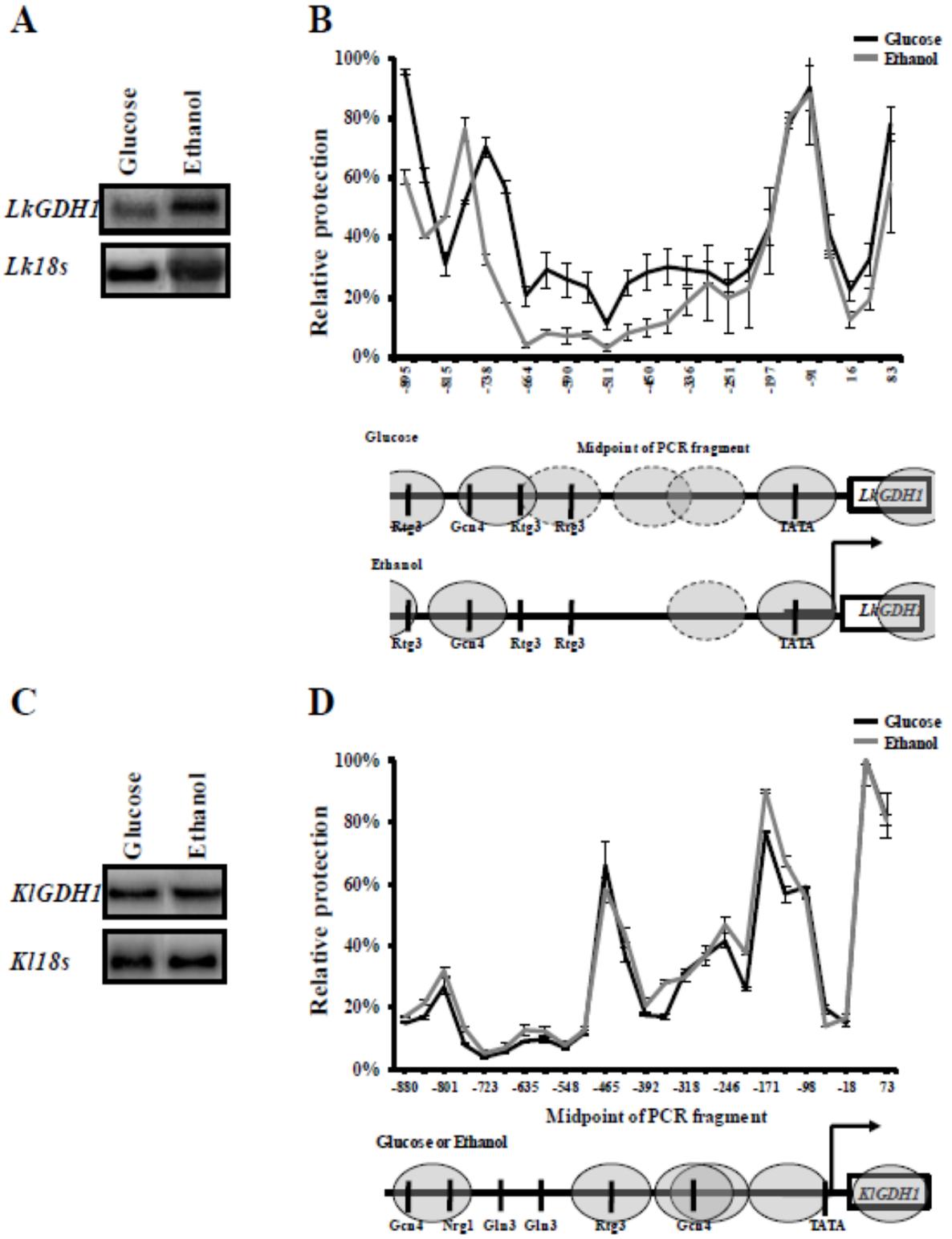
Con la finalidad de conocer el perfil de expresión de los genes que codifican las NADP<sup>+</sup>-Gdh en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*, se realizaron análisis tipo northern blot. Para dicho análisis se prepararon cultivos de medio mínimo con sulfato de amonio como única fuente de carbono y 2% glucosa o etanol como única fuente de carbono, y se crecieron las cepas *Sc* WT, *Lk* WT y *Kl* WT, una vez que las cepas se encontraban en fase exponencial de la curva de crecimiento (OD 600nm = 0.5), se procesaron para extraer el RNA total y se realizó ensayo de Northern Blot tal y como se describe en la Estrategia Experimental. Como se puede observar el gen *ScGDH1* en ambas fuentes de carbono mantiene su perfil de expresión, mientras que *ScGDH3* se encuentra reprimido en glucosa, pero cuando se usa etanol como fuente de carbono, este se induce (Fig. 18-A). Sin embargo cuando se analizó el perfil de expresión de *LkGDH1* se obtiene un perfil similar al de *ScGDH3*, ya que el mensajero de este gen se encuentra un poco reprimido en glucosa, pero en etanol se aprecia el aumento en la expresión (Fig. 19 -A), mientras que para el gen *KlGDH1* ocurre lo mismo que *ScGDH1* en ambas fuentes de carbono se expresa constitutivamente (Fig. 19-C).

En muchos casos la expresión de los genes puede depender de la posición en donde se encuentre ubicados a lo largo del cromosoma o de los elementos *cis* que se encuentran en la región promotora del gen. Y para conocer si la región promotora tenía un papel importante en el perfil de regulación que presentaron los genes, se realizaron ensayos de posicionamiento de nucleosomas (NuSA) a lo largo de la región promotora de los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1*. Para este ensayo, se crecieron las cepas WT de las tres levaduras en estudio en medio mínimo con glucosa o etanol como única fuente de carbono y sulfato amonio como fuente de nitrógeno. Una vez que los cultivos se encontraron en una OD 600 nm de 0.5 (fase exponencial de la curva de crecimiento), se agregó formaldehído al 37%, esto genera

que lo que esté ocurriendo en ese momento dentro de la célula se detenga. Después de fijar las muestras y de procesarlas como esta descrito en la Estrategia Experimental, se digirieron las muestras con MNasa durante 50, 60y 70 minutos. Las muestras resultantes de la digestión, se corrieron en un gel de agarosa al 1% para obtener la banda monosomal, ya que se identificó la banda que correspondía al mononucleosoma (147 pb aproximadamente), esta banda se purifico por Kit promega y se procedió a realizar un análisis de Q-PCR. Los oligonucleótidos empleados para los promotores fueron diseñados aproximadamente cada 100 pb, estos permiten ir amplificando la región promotora determinada en forma consecutiva. Para el caso del gen *ScGDH1*, se generaron oligonucleótidos que iban del sitio + 183 al -820, el perfil muestra que en glucosa o etanol los nucleosomas no cambian, pues los picos generados corresponden a los amplicones generados con los diferentes pares de oligonucleótidos (Fig. 18-B), mientras que para el gen *ScGDH3* se considero la región que iba del sitio +176 al -826 y en glucosa se observa que se encuentran posicionados varios nucleosomas a lo largo de la región promotora (zonas protegidas por nucleosomas (picos grandes)) y en etanol estos se desplazan generando picos bajos o zonas carentes de picos, lo cual nos dice que es una zona que no está protegida por nucleosomas (Fig. 18-C). Para la región promotora del gen *LkGDH1*, se uso la región del + 83 al -895 y el perfil observado indica que en glucosa como fuente de carbono se encuentran varios nucleosomas posicionados y en etanol se aprecia cómo se mueven algunos de ellos haciendo que la cromatina se vea más relajada en esta condición. Y para el promotor del gen *KlGDH1* los oligonucleótidos generados abarcaron del sitio +73 al -880 y el perfil de posicionamiento de nucleosomas nos indica que en ambas condiciones estudiadas no hay cambio en la cromatina para este gen. Estos datos correlacionan con el perfil de expresión obtenido en los ensayos tipo Northern Blot en ambas fuentes de carbono para los genes *ScGDH1/ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* y con la actividad enzimática de sus productos respectivamente (Fig. 18-A y Fig. 19-A, C. Tabla 3).



**Figura 18.** A) Perfil de Expresión de los genes *ScGDH1* y *ScGDH3* en glucosa y etanol; el gen *ScACT1* se usó como control de carga; B) Nucleosome Scanning Assay (NuSA) para el promotor del gen *ScGDH1* y C) Nucleosome Scanning Assay (NuSA) para el promotor del gen *ScGDH3*, en glucosa (línea negra) o etanol (línea gris). Los óvalos grises representan los nucleosomas.

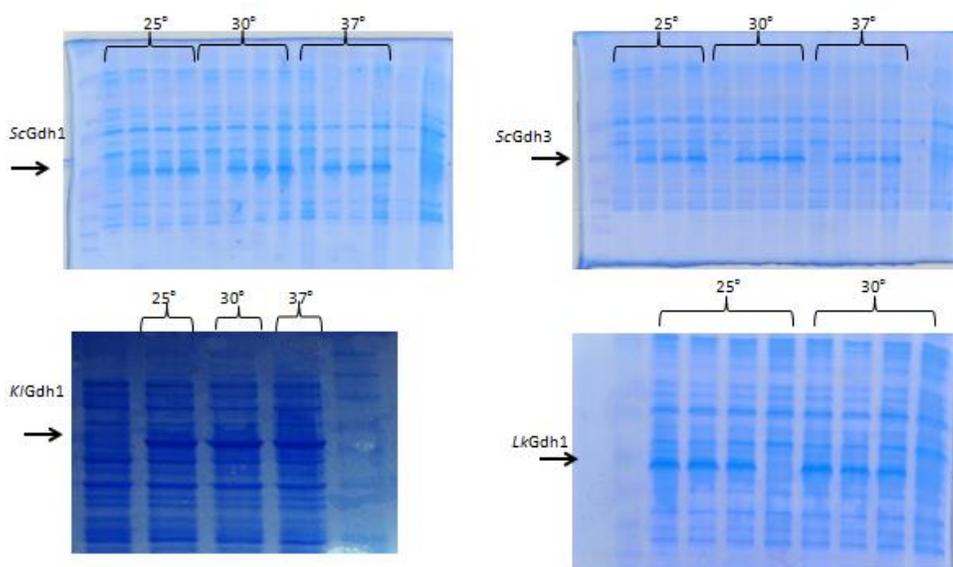


**Figura 19.** Perfil de Expresión de los genes *LKGDH1* (A) y *KIGDH1* (C) en glucosa y etanol; el gen *Lk18s* y *K118s* se usó como control de carga; B) Nucleosome Scanning Assay (NuSA) para el promotor del gen *LkGDH1* y C) Nucleosome Scanning Assay (NuSA) para el promotor del gen *KIGDH1*, en glucosa (línea negra) o etanol (línea gris). Los óvalos grises representan los nucleosomas.

## 6.5 Purificación de la NADP<sup>+</sup>Gdh de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*

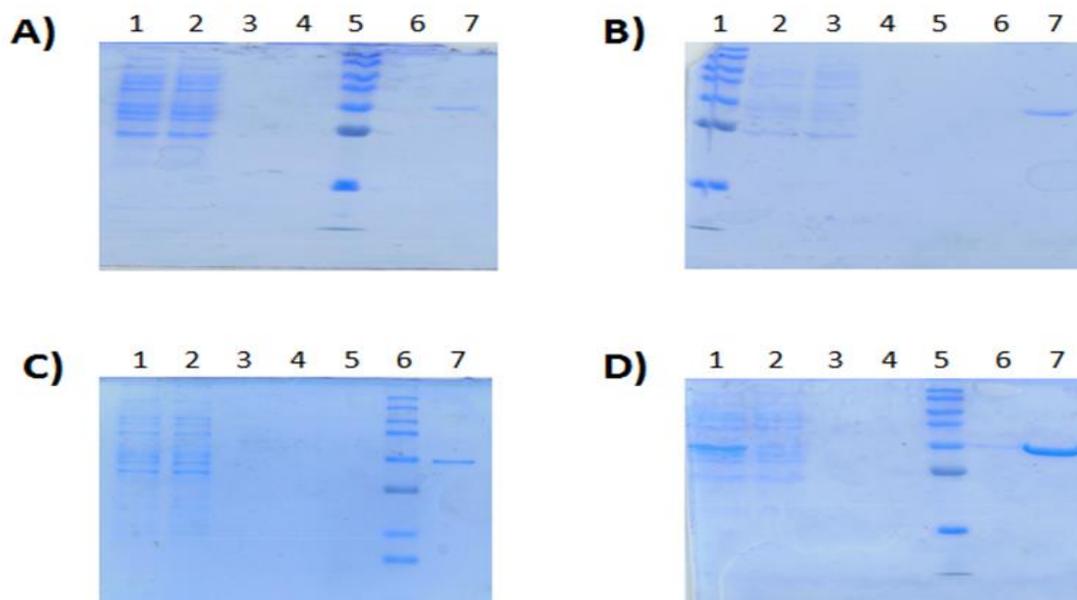
Con la finalidad de estudiar las propiedades bioquímicas de las glutamato deshidrogenasas dependientes de NADP<sup>+</sup> (NADP<sup>+</sup>-Gdh), se realizaron cinéticas de afinidad para la utilización de cada uno de los sustratos que estas enzimas requieren para llevar a cabo la biosíntesis de glutámico ( $\alpha$ -KG, NH<sub>4</sub>Cl y NADPH).

Los genes *ScGDH1*, *ScGDH3*, *LkGDH1* y *KlGDH1* fueron clonados en el plásmido pET28a(+) como se describe en la Estrategia experimental, ya que se tenían las clonaciones, estas se transformaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, con la finalidad de verificar la integración del gen en el vector. Posteriormente se hizo una Maxiprep usando el kit de promega para tener múltiples copias del plásmido construido, esta construcción se secuenció para verificar la correcta integración. Posteriormente, este plásmido se sub-clonó en la cepa BL21 de *E. coli*, para poder inducir la sobre expresión de la proteína de interés. La inducción de expresión se realizó con 100  $\mu$ M de IPTG durante 4 horas a distintas temperaturas. En la Fig. 20 se puede observar que en ninguna de las temperaturas existía cambio evidente para descartar o considerar alguna condición en específico, por lo que se decidió trabajar la inducción a 30° C.



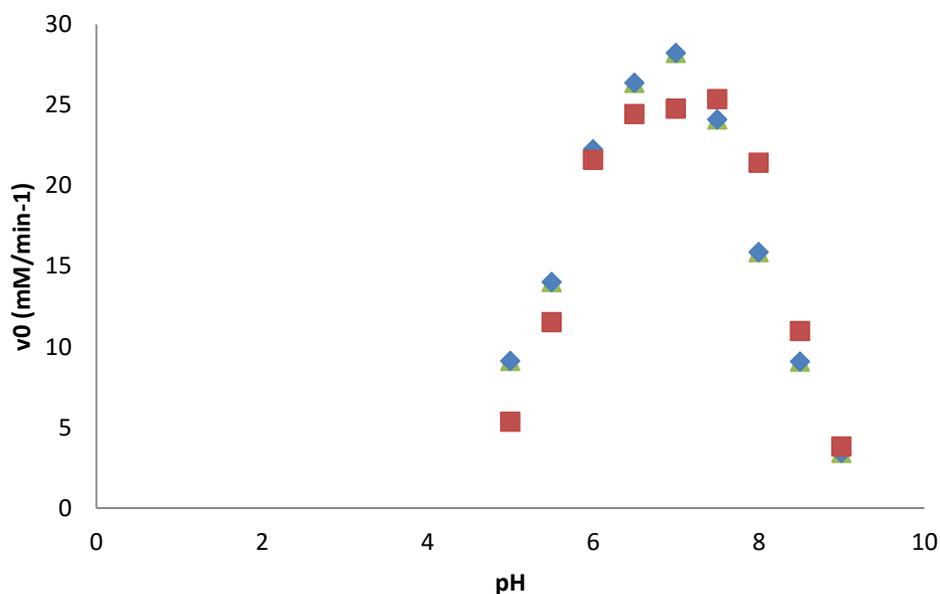
**Figura 20. Inducción de las proteínas *ScGdh1*, *ScGdh3*, *LkGdh1* y *KlGdh1*.** SDS-PAGE 12% de la proteína inducidas con IPTG a 25°C, 30°C y 37°C. Las bandas señaladas con la flecha negra, hacen referencia a la sobreexpresión de cada proteína.

Después de tener las condiciones de inducción, se procedió a la purificación de las proteínas por medio de una columna de níquel (Ni-NTA Agarose 100). Para ello se usaron cultivos de 100 ml de medio LB suplementado con  $30 \mu\text{g ml}^{-1}$  de kanamicina, los cultivos se crecieron a  $37^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una OD  $600\text{nm}$  de 0.6-0.8, una vez que se llegaba a la OD deseada, se indujo con  $100 \mu\text{M}$  de IPTG durante 4 horas a  $30^\circ\text{C}$ , transcurrido el tiempo, las células se lisaron por sonicación y la fracción soluble se pasó a columna de níquel; la columna se lavó 10 veces con imidazol  $30 \text{mM}$  y la proteína se recuperó con  $500 \text{mM}$  de imidazol. Para finalizar, la proteína purificada se cargó en un gel de SDS-PAGE al 12% y tal como se aprecia en la Fig. 21, la proteína es muy limpia para poder hacer los análisis cinéticos.



**Figura 21. Purificación de las proteínas de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.** Se muestran los geles SDS-PAGE 12%; en los cuatro paneles el carril 7 muestra la fracción pura de proteína. A) Proteína pura *ScGdh1*, B) Proteína pura *ScGdh3*, C) Proteína pura *LkGdh1* y D) Proteína pura *Klgdh1*.

A las proteínas purificadas se les midió la concentración de proteína por el método de Lowry y antes de hacer las caracterizaciones cinéticas, se realizó una curva de pH, en buffer de fosfatos para las proteínas *LkGdh1* y *KlGdh1* con la finalidad de conocer el mejor pH para poder hacer las cinéticas. Para el caso de *ScGdh1* y *ScGdh3*, ya se conocía que el rango en donde se obtenía la mayor actividad específica estaba entre 6.5 y 8 (DeLuna, *et al.*, 2001), mientras que para las proteínas *LkGdh1* y *KlGdh1* el rango de pH donde se ve la mayor actividad de Gdh se encontraba en el mismo rango que se reportaba para *S. cerevisiae* (Fig. 22).



**Figura 22. Cinética de pH.** Los rangos de pH usados para la cinética fueron de 5 a 9, en rojo se muestra a *L. kluyveri* y en azul a *K. lactis*.

## 6.6 Caracterización cinética de la Gdh-NADP<sup>+</sup> de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*

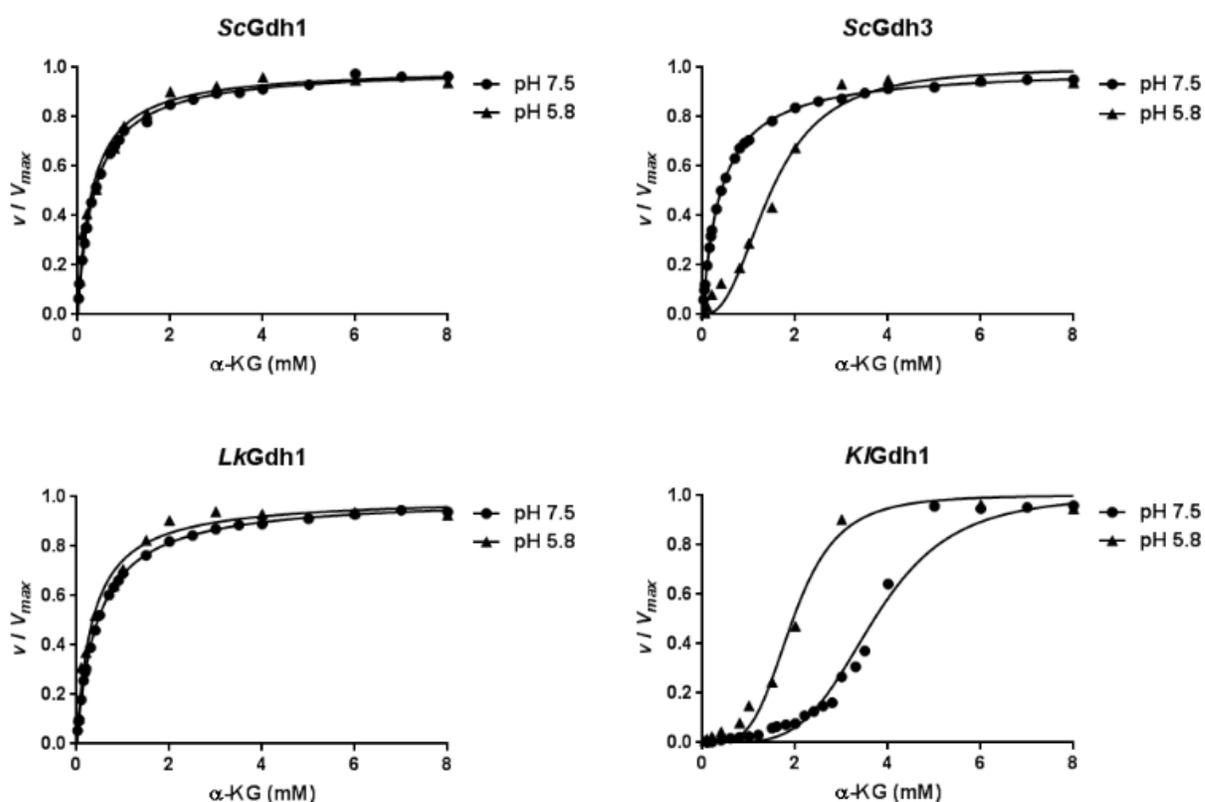
Conocer las propiedades bioquímicas de las proteínas nos permitirá encontrar elementos que nos ayuden a entender los resultados obtenidos en la prueba de complementación y en el perfil de expresión de cada gene en el presente estudio.

Para las cinéticas se usaron las fracciones puras de las proteínas obtenidas por la columna de níquel (Fig. 21), la velocidad inicial fue calculada variando cada uno de los tres sustratos ( $\alpha$ -KG (Fig. 23), NADPH (Fig. 24) y NH<sub>4</sub>Cl (Fig. 25)) variando uno de ellos y manteniendo la concentración de los dos restantes en concentración saturante (Estrategia Experimental). La reacción fue medida como se reporta previamente (DeLuna, A. *et al*, 2001).

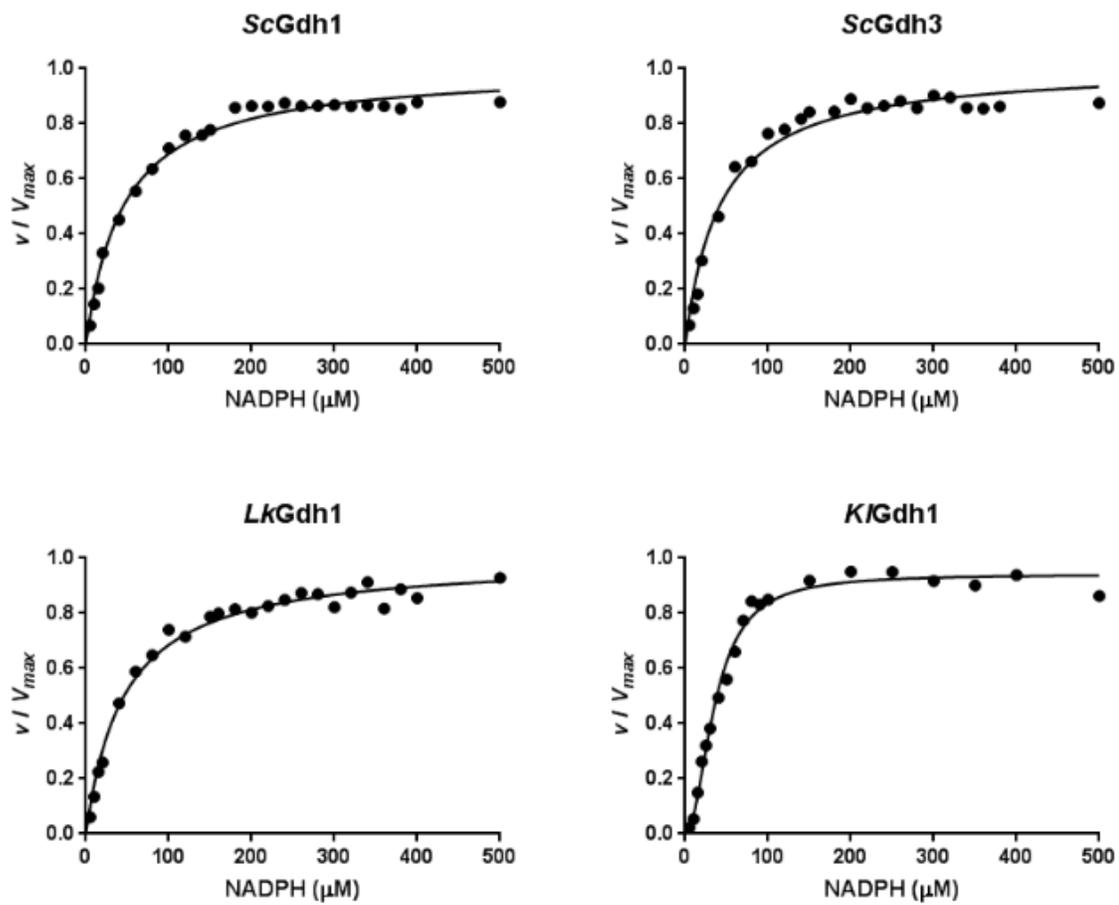
La respuesta al ir incrementando cada uno de los sustratos fue muy heterogéneo; pues al hacer la cinética a pH 7.5 para las proteínas *ScGdh1*, *ScGdh3* y *LkGdh1* de *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* respectivamente, se obtiene que el comportamiento que muestran es hiperbólico para los tres sustratos mientras que para *KlGdh1* de *K. lactis*, el comportamiento para los tres sustratos fue sigmoide (Figs. 23, 24 y 25). Sin embargo cuando se hacen la cinética por  $\alpha$ -KG a un pH de 5.8, se observa que para el caso de *ScGdh1* y *LkGdh1* se mantuvo el comportamiento hiperbólico, *KlGdh1* también mantiene su comportamiento sigmoide y *ScGdh3a* este pH se vuelve sigmoide (Fig. 23), esto coincide con lo reportado anteriormente para las proteínas *ScGdh1* y *ScGdh3a* este pH (DeLuna, A. *et al*. 2001).

Los datos experimentales para la respuesta hiperbólica o sigmoide observada en las cinéticas, fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten o ecuación de Hill respectivamente y los parámetros cinéticos se encuentran en la Tabla 5. A pH 7.5, las cuatro enzimas mostraron valores similares para los parámetros calculados, lo cual indica que los eventos catalíticos por unidad de tiempo ( $K_{cat}$ ) y las constantes

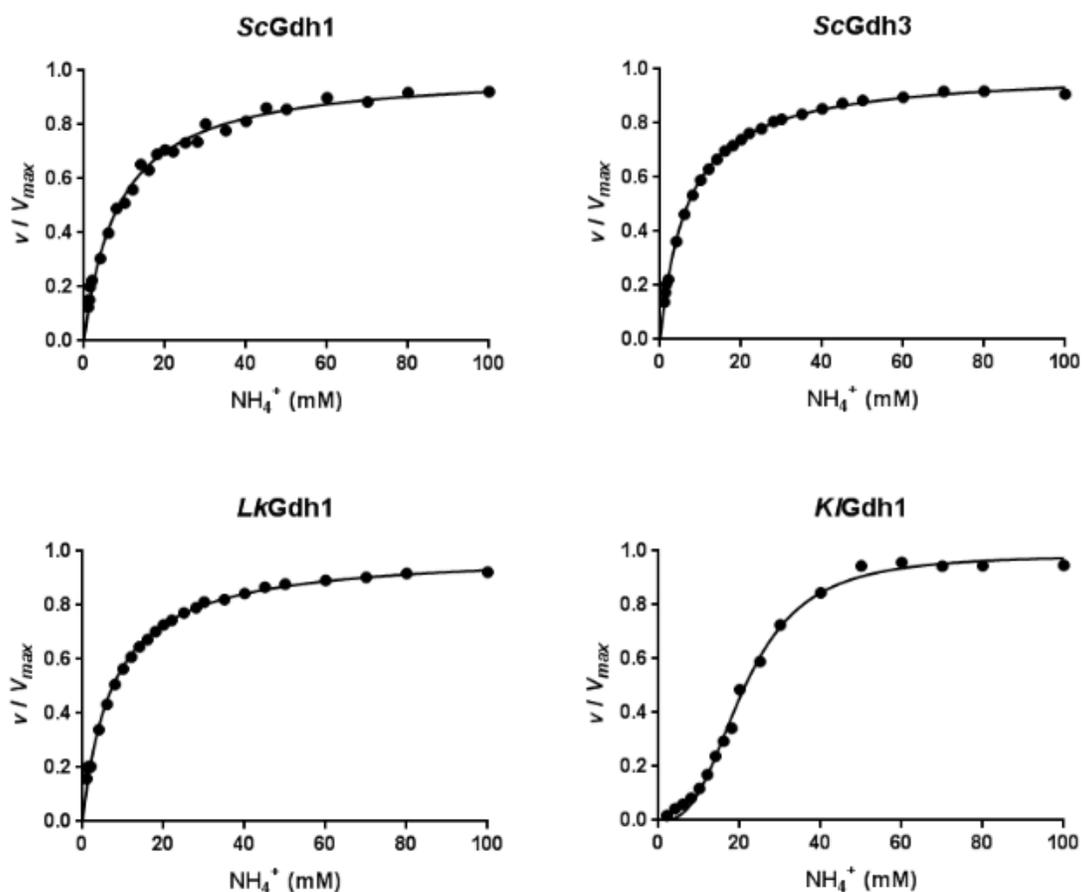
de afinidad ( $K_m$ ) son similares para el NADPH y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Tabla 4). *ScGdh1* y *LkGdh1*, mostraron valores de afinidad similares para  $\alpha\text{-KG}$ . Sin embargo *KlGdh1* muestra una baja afinidad y una fuerte cooperatividad por  $\alpha\text{-KG}$ , ya que el valor de la  $S_{0.5}$  fue ocho veces más grande que para las otras enzimas y el número de Hill llegó a ser hasta de 4.4 (Tabla 5). Estos valores fueron similares a los encontrados a pH 5.8 para la isoforma *ScGdh3*.



**Figura 23. Cinética de afinidad por  $\alpha\text{-KG}$ .** Se observa el efecto del pH sobre la cinética de  $\text{NADP}^+\text{-Gdh}$  por  $\alpha\text{-KG}$ . Las velocidades iniciales son mostradas como fracciones de la  $V_{max}$  correspondiente a diferentes concentraciones de  $\alpha\text{-KG}$  (0 a 8 mM). La reacción de aminación reductiva fue medida en proteínas recombinantes puras de *S. cerevisiae* (*ScGdh1* y *ScGdh3*), *L. kluyveri* (*LkGdh1*) y *K. lactis* (*KlGdh1*).



**Figura 24. Cinética de afinidad por NADPH.** Las velocidades iniciales son mostradas como fracciones de la  $V_{max}$  correspondiente a diferentes concentraciones de NADPH (0 a 500  $\mu\text{M}$ ). La reacción de aminación reductiva fue medida a pH 7.5 en proteínas recombinantes puras de *S. cerevisiae* (*ScGdh1* y *ScGdh3*), *L. kluyveri* (*LkGdh1*) y *K. lactis* (*KIGdh1*).



**Figura 25. Cinética de afinidad por  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .** Las velocidades iniciales son mostradas como fracciones de la  $V_{max}$  correspondiente a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0 a 100 mM). La reacción de aminación reductiva fue medida a pH 7.5 en proteínas recombinantes puras de *S. cerevisiae* (*ScGdh1* y *ScGdh3*), *L. kluyveri* (*LkGdh1*) y *K. lactis* (*KIGdh1*).

**Tabla 5. Parámetros cinéticos de las NADP-Gdh's estudiadas.**

Enzima	pH 7.5							pH 5.8		
	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m\text{-}\alpha\text{-KG}$ (mM)	$n_{H\text{-}\alpha\text{-KG}}$	$K_m\text{-NADPH}$ ( $\mu\text{M}$ )	$n_{H\text{-NADPH}}$	$K_m\text{-NH}_4^+$ (mM)	$n_{H\text{-NH}_4^+}$	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m\text{-}\alpha\text{-KG}$ (mM)	$n_{H\text{-}\alpha\text{-KG}}$
<i>ScGdh1</i>	13	0.37		45		8.6		12	0.31	
<i>ScGdh3</i>	14	0.4		42		6.9		13	$S_{0.5}=1.48$	2.4
<i>LkGdh1</i>	20	0.46		46		7.4		10	0.34	
<i>KIGdh1</i>	21	$S_{0.5}=3.61$	4.4	$S_{0.5}=39$	1.8	$S_{0.5}=21.4$	2.7	6	$S_{0.5}=1.95$	4

## 6.7 Poza intracelular de metabolitos

Existen muchos casos donde el sustrato y el producto final generado *in vivo* influyen en la regulación cinética de las enzimas (feedback). Para saber si las NADP<sup>+</sup>-Gdh's eran un ejemplo de este efecto feedback, se determinaron las pozas de  $\alpha$ -KG y glutamato intracelular para las cepas *Sc* WT, *Lk* WT y *Kl* WT. Para ello se crecieron cultivos en medio mínimo con sulfato amonio como única fuente de nitrógeno y 2% glucosa o etanol como única fuente de carbono. Una vez que los cultivos alcanzaron una OD 600 NM de 0.5  $\approx$ , las células se colectaron por centrifugación 3000 rpm x 5 minutos y se lavaron con agua fría. Transcurrido esto, el pellet celular se procesó como se describe en el apéndice G. La concentración estimada de  $\alpha$ -KG citosólica en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* estuvieron en un rango de 0.1 a 1.14 mM (Tabla 6), estos valores resultaron muy similares a lo reportado 0.4 a 1.76 (Hans *et al.* 2003; Cueto-Rojas *et al.* 2016).

De la misma manera se midió la concentración de glutámico intracelular en ambas fuentes de carbono fue muy similar (Apéndice H), encontrando que para *S. cerevisiae* y *K. lactis*, la poza fue muy alta (Tabla 5), mientras que para *L. kluyveri* la poza de glutámico resulto estar más baja en etanol que en glucosa, lo cual podría estar relacionado con el crecimiento tan disminuido que se tiene de esta cepa en etanol (Tabla 3) y con la baja concentración de  $\alpha$ -KG (Tabla 6). La concentración estimada de glutamato intracelular estuvo en un rango de 30 a 80 mM.

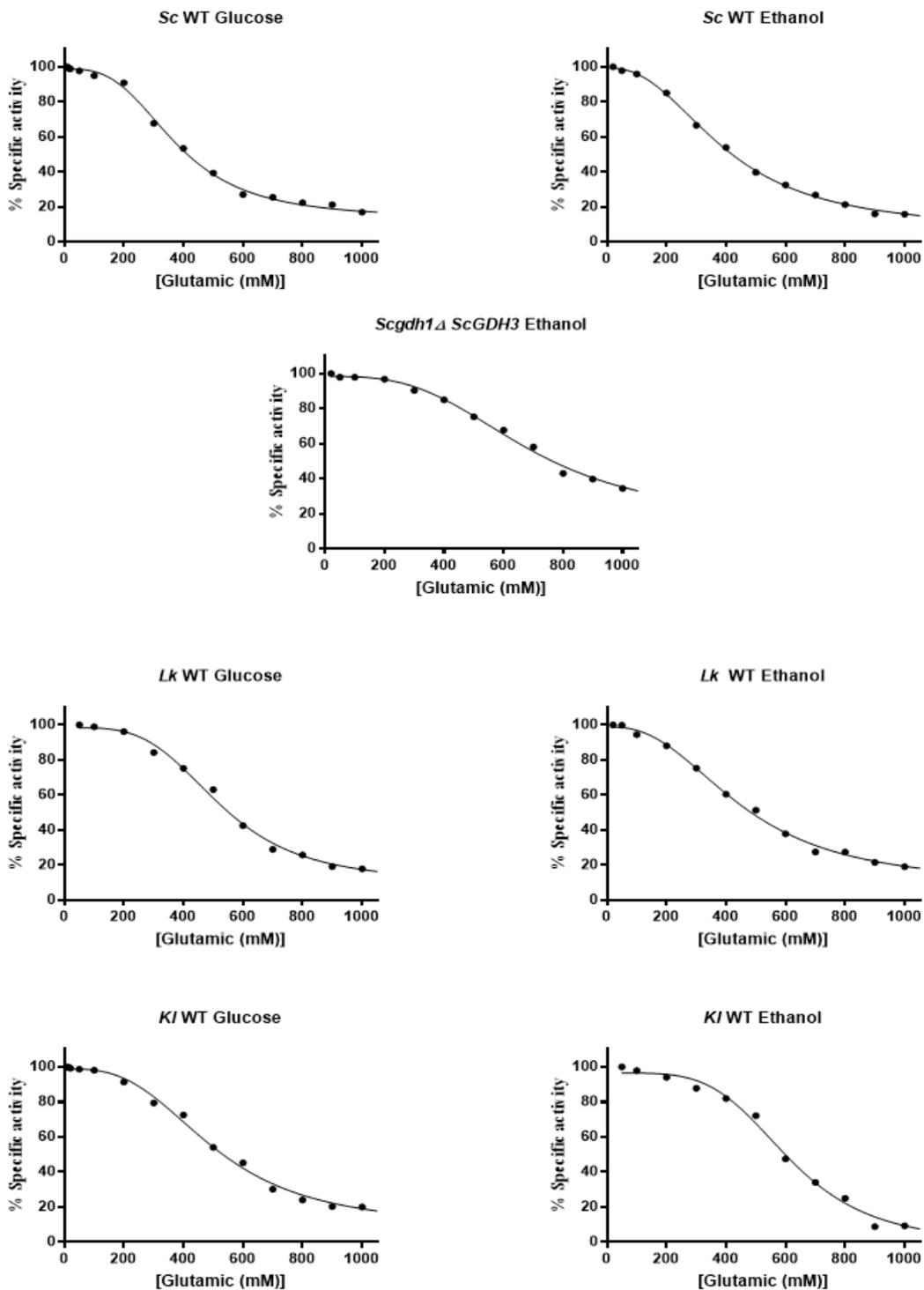
**Tabla 6.** Poza intracelular de metabolitos

	$\alpha$ -KG				Glutamato			
	Glucosa		Etanol		Glucosa		Etanol	
	(nmolx10 <sup>8</sup> células)	(mM)						
<i>S. cerevisiae</i>	1.0 (0.05)	0.5	2.4 (0.21)	1.1	100 (4)	46	81 (14)	37
<i>L. kluyveri</i>	2.1 (0.12)	1.0	0.2 (0.03)	0.1	20 (1)	9	98 (8)	45
<i>K. lactis</i>	1.5 (0.23)	0.7	1.4 (0.13)	0.7	25 (1)	11	40 (5)	18

## 6.8 Cinética de inhibición

Con la finalidad de conocer si las enzimas estudiadas en el presente trabajo tenían un efecto de inhibición por producto final, se realizaron estudios cinéticos de inhibición por Glutámico para las levaduras *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*. Para este análisis se prepararon extractos crudos de proteína de las cepas *Sc* WT, *Scgdh1Δ*, *Lk* WT y *Kl* WT. Las cepas se crecieron en medio mínimo con sulfato amonio como fuente de nitrógeno y 2% glucosa o etanol como única fuente de carbono. Cuando los cultivos alcanzaron una OD 600 nm de 0.5 $\approx$ , las células se procesaron como se describe detalladamente en la Estrategia Experimental, una vez que se tenían los extractos crudos, se midió la concentración de proteína por el método de Lowry.

Para las cinéticas, se midió la aminación reductiva producida por la NADP<sup>+</sup>-Gdh en el espectrofotómetro (Cary 50), usando los tres sustratos de la reacción en concentraciones saturante (8 mM de  $\alpha$ -KG, 200  $\mu$ M de NADPH y 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl) al igual que la concentración de proteína (extracto crudo). Con estas condiciones en la celda se buscó obtener la máxima pendiente de actividad y en base a eso se probaron distintas concentraciones de glutámico (0 a 1000 mM) para poder ver el efecto de inhibición para cada una de las proteínas (Fig. 26). Los datos obtenidos de la cinética se ajustaron a un modelo de inhibición usando el programa GraphPad Prisma 7.0 y se calcularon los IC<sub>50</sub> para cada una de las proteínas, encontrando que las Gdh's trabajadas en el presente estudio tienen un que va de los 376 a los 681 mM (Tabla 7), este valor es muy elevado respecto a la concentración de glutámico presente en la célula (Tabla 6).



**Figura 26.** Cinética de Inhibición por glutámico. La reacción de aminación reductiva fue medida a pH 7.5 en extracto crudo de proteína de las cepas *S. cerevisiae* (*Sc* WT y *Scgdh1Δ*), *L. kluyveri* (*Lk* WT) y *K. lactis* (*Kl* WT). Las concentraciones de glutámico usadas estuvieron en un rango de 0 a 1000 mM, El análisis de los datos se realizó en el programa GrphPad Prisma 7.0

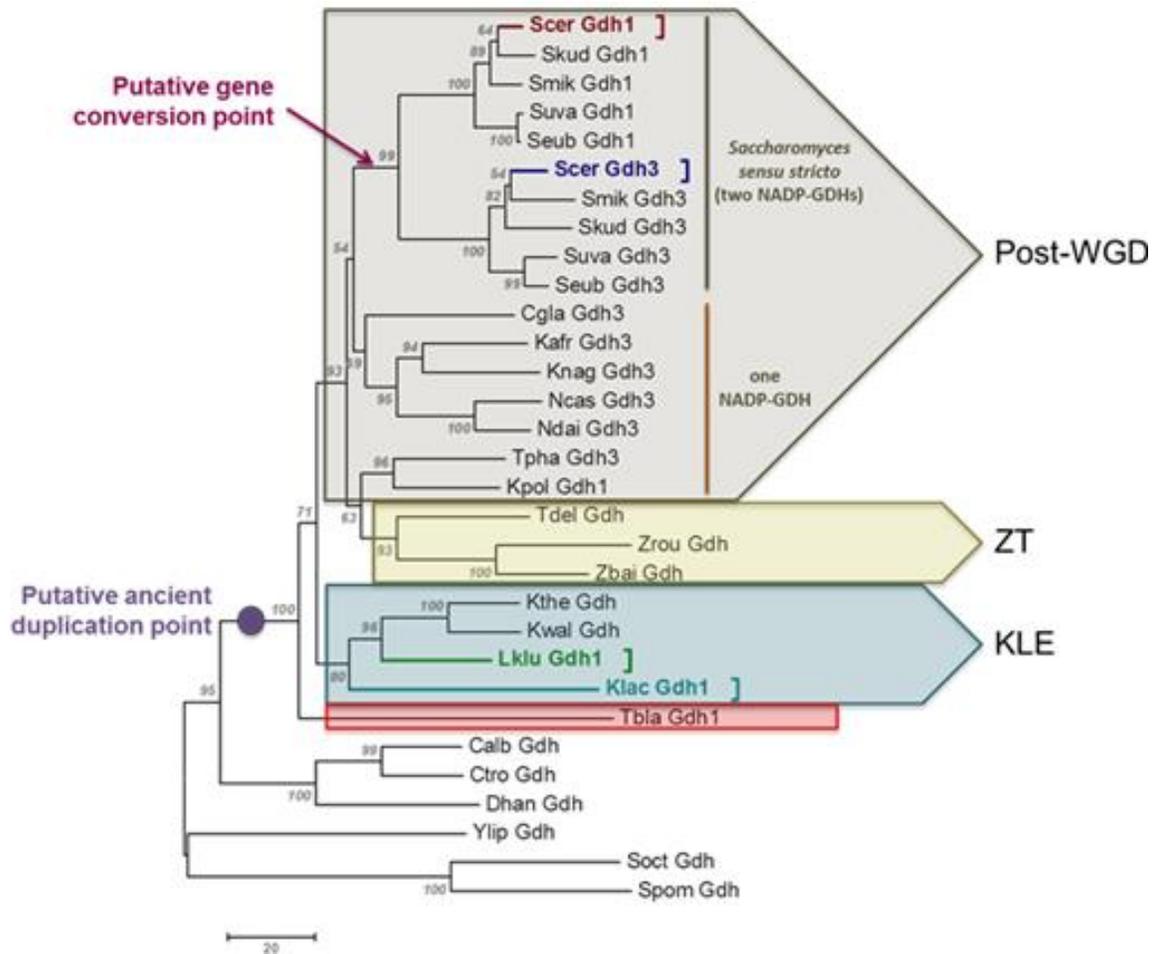
**Tabla 7.** Inhibiciones por glutámico de las NADP<sup>+</sup>-Gdh's

	<i>Sc</i> WT Glucosa	<i>Sc</i> WT Etanol	<i>Scgdh1</i> Δ WT Etanol	<i>Lk</i> WT Glucosa	<i>Lk</i> WT Etanol	<i>Kl</i> WT Glucosa	<i>Kl</i> WT Etanol
IC <sub>50</sub>	376 ± 10.3	397.7 ± 9.9	681.3 ± 17.5	523.7 ± 18.8	454.6 ± 20.1	503 ± 22.9	611.6 ± 24.7

### 6.9 Relación evolutiva de las NADP<sup>+</sup>-Gdh's de levadura

Con el fin de obtener ideas sobre si las propiedades cinéticas observadas para las enzimas *ScGdh1*, *ScGdh3*, *LkGdh1* y *KlGdh1* correlacionaban con el origen evolutivo de estas proteínas, se construyó un árbol filogenético con secuencias de GDH dependiente de NADP<sup>+</sup> de los representantes de los hongos de las diferentes clases taxonómicas (Fig. 27). En general la filogénesis de las Gdh's se parecían mucho en cuanto a su clasificación taxonómica, sin embargo, cabe resaltar tres aspectos importantes. 1) Se encontró que las secuencias de las proteínas *ScGdh1* y *ScGdh3* se agruparon en un clado separado junto con las *Gdh1* y *Gdh3* de las especies de *Saccharomices sensu stricto* pero no con las especies ortólogas identificadas por sintenia y entre estas especies ortólogas se incluyó a *L. kluyveri* y *K. lactis*. Estos resultados sugieren que ocurrió conversión génica entre las copias duplicadas de Gdh ancestrales del linaje de *S. cerevisiae* después de la duplicación total del genoma (Fig. 27 flecha roja: punto de conversión génica). 2) Aparte del clado de los *Saccharomices sensu stricto*, todas las levaduras posteriores a la duplicación total del genoma han conservado solo una de las copias de Gdh (en casi todos los casos, el ortólogo de *ScGdh3*) (Fig. 27 línea naranja). Y 3) *LkGdh1* y *KlGdh1* se agrupan juntas y pudieron ser originadas a partir de un clado Gdh, el cual fue generado a través de un evento de duplicación de genoma antigua que fue consecuencia de un proceso de hibridación, del cual procede la divergencia entre *Saccharomyces* y el clado que contiene los géneros *Lachancea*, *Kluyveromyces* y

*Eremothecium* (Fig. 27 grupo KLE), como ya se ha propuesto recientemente por Marcet-Houben y Gabaldon (2015). Esta observación también es soportada por el hecho de que la secuencia de Gdh de *Tetrapisispora blattae* (TBLA GDH1) (Fig. 27 rectángulo rojo) se agrupo fuera incluso del clado KLE y no con las otras especies post-WGD. Los números de acceso a las secuencias de las taxas de Gdh's-NADP usadas, se enlistan en el Anexo 5.



**Figura 27. Relación evolutiva de las NADP<sup>+</sup>-Gdh's de levaduras.** La filogenia fue construida usando el método de vecino cercanos (Saitou and Nei M, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas. El porcentaje de los arboles replicados en el cuales se asocian los taxas agrupados juntos en la prueba de arranque (500 réplicas) son mostradas junto a las ramas (Felsenstein 1985). El árbol fue dibujado a escala, las distancias evolutivas fueron computarizadas usando el número de diferentes métodos (Nei and Kumar, 2000) y están en las unidades del número de diferencias en amino ácidos por secuencia. El análisis envolvió 31 secuencias de amino ácidos. Las posiciones ambiguas fueron removidas por cada par de secuencias. Los análisis evolutivos fueron hechos en MEGA6 (Tamura *et al*, 2013). *S. cerevisiae* Gdh1 letra y corchete rojo, *S. cerevisiae* Gdh3 letra y corchete azul marino, *L. kluyveri* Gdh1 letra y corchete verde, *K. lactis* Gdh1 letra y corchete azul cielo. Clado post-WGD grupo con línea marrón, el clado ZT está conformado por los géneros *Zygosaccharomyces-Torulasporac* ( grupo amarillo claro), el clado KLE formado por los géneros *Kluyveromyces-Lachancea-Eremothecium* (grupo azul claro). *Torulaspora blatae* Tbla Gdh1 (cuadro

# **7. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

## 7.- Análisis de Resultados

Este estudio se dirigió a la cuestión de si existe una correlación entre la regulación de la actividad de NADP<sup>+</sup>-Gdh's y la historia evolutiva de los genes correspondientes en las tres especies de Saccharomycetales, mostrando diferentes niveles de adaptación al estilo de vida fermentativo. Para esta finalidad se compararon los resultados de la filogenia, las propiedades regulatorias, los análisis funcionales y los análisis cinéticos. Los resultados mostraron que las cinéticas y la capacidad de complementación heteróloga de la isoforma ScGdh1 de *S. cerevisiae* son muy similares a las de la única enzima presente en *Lachancea kluyveri* LkGdh1 más que con la isoforma ScGdh3. Mientras que las capacidades cinéticas y de complementación heteróloga de la enzima ScGdh3 se parecen a las de la única enzima presente en *Kluyveromyces lactis* KlGdh1.

### 7.1 La caracterización funcional fue necesaria para agrupar las NADP<sup>+</sup>-Gdh's en pares similares

Para analizar la contribución relativa de la glutamato deshidrogenasa (NADP<sup>+</sup>-GDH) y la glutamato sintasa (GOGAT) en la biosíntesis de glutámico, se construyeron cepas mutantes en los cuales los genes que codificaban para NADP<sup>+</sup>-GDH (*GDH1/GDH3*) o GOGAT (*GLT1*) fueron inactivados Tabla 1. En las tres especies de levadura, la inactivación de los genes que codifican para NADP<sup>+</sup>-GDH resultó en una fuerte reducción del crecimiento en ambas fuentes de carbono estudiadas (de un 60% a un 80% relativamente a lo correspondiente de la cepa WT) indicando que las proteínas ScGdh1/ScGdh3 en *Saccharomyces cerevisiae*, LkGdh1 en *Lachancea kluyveri* y KlGdh1 en *Kluyveromyces lactis* son el principales contribuyentes a la producción de glutamato bajo las condiciones estudiadas. La ruta de glutamino sintetasa-GOGAT en *S. cerevisiae* tienen una contribución mínima a la producción de glutámico bajo estas condiciones porque la cepa mutante *Scglt1Δ*

crece tan bien como una cepa silvestre (Tabla 3). Sin embargo en *L. kluyveri* y *K. lactis*, la ruta de GOGAT tiene una contribución muy significativa, ya que cuando se generaron las mutantes en el gen *glt1Δ* para ambas especies, resulto en la reducción del crecimiento de un 25% a un 40% (Tabla 3). Y como se esperaba las cepas donde se deletó a los genes que codifican para NADP<sup>+</sup>-GDH y GOGAT resultaron auxótrofas totales de glutámico. En especies pre-WGD solo hay un gen responsable de la actividad de NADP<sup>+</sup>-GDH porque la delección de el gen *LkGDH1* y *KlGDH1* resulto en la pérdida total de esta actividad (Tabla 3). De acuerdo con lo reportado por DeLuna *et al.*, 2001, la contribución de *ScGDH3* es evidente en etanol pero no en glucosa.

Cuando se suplemento el medio con glutamato, las mutantes *gdhΔ* recuperaron el fenotipo comparado con la cepa silvestre. Sin embargo este no fue el caso para las mutantes *ScgdhΔ-Scgdh3Δ-Scglt1Δ*, *Klgl1Δ* y *Lkgl1Δ* de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente, porque estas no recobraron el fenotipo por adición de glutámico. Como ya se había reportado previamente, en adición a la biosíntesis de glutámico, la GOGAT juega otro rol, el cual se ha descrito que es crítico para mantener el balance Redox y la homeostasis citosólica de NADH (Guillamon *et al.*, 2001).

La regulación transcripcional dependiente de la fuente de carbono del gen *ScGDH1* presento similitud con la regulación del gen *KlGDH1* porque los niveles de transcrito y el posicionamiento de los nucleosomas no cambian usando glucosa o etanol como fuente de carbono (Fig. 18A, 18B, 19C y 19D). Sin embargo, la regulación transcripcional de los genes *ScGDH3* y *LkGDH1* resulto en altos niveles de transcrito en etanol, más que en glucosa como fuente de carbono y esto coincide con el remodelamiento de la cromatina (Fig. 18A, 18C, 19A y 19B). Como ya se ha reportado previamente, la transcripción de el gen *ScGDH3* es alta en etanol como única fuente de carbono comparado con lo que se observa en glucosa y esto es dependiente de la organización de la cromatina (Avendaño *et al.*, 2005 y Riego *et*

*al.*, 2002). La contribución relativa de la isoforma *ScGdh3* resulto más alta en etanol que en glucosa, porque cuando la mutante sencilla *Scgdh3Δ* fue crecida en etanol la actividad específica de Gdh incremento 10 veces (Tabla 3); esto concuerda con resultados previos (DeLuna *et al.*, 2001), demostrando la contribución diferencial década enzima en la velocidad de crecimiento. Cuando *L. kluyveri* y *K. lactis* fueron crecidas en etanol como única fuente de carbono, las actividades enzimáticas incrementaron un 80% y 50% respectivamente, comparado con lo que se observa en glucosa (Tabla 3) y este aumento en la actividad se ve reflejado en el perfil de expresión y en el remodelamiento de la cromatina que los genes presentaron.

## **7.2 Los pares de genes *ScGDH1/LkGDH1* y *ScGDH3/KlGDH1* muestran distinta complementación heteróloga**

Como se esperaba, la expresión homóloga del gen *ScGDH1* en la mutante *Scgdh1Δ*, *LkGDH1* en mutante *Lkgdh1Δ* y *KlGDH1* en la mutante *Klgdh1Δ*, recuperaron el crecimiento WT cuando las cepas se crecieron en glucosa o etanol. La expresión homóloga del gen *ScGDH3* de *S. cerevisiae* resultó en una discreta pero significativa complementación en la cepa mutante *gdh1Δ* en glucosa y en etanol complementó al 100 %. Estos últimos resultados refuerzan la especialización de la isoforma *ScGdh3* en condiciones respiratorias y con la regulación dependiente de la fuente de carbono del gen *ScGDH3* (DeLuna *et al.* 2001; Avendaño *et al.*, 2005).

La expresión heteróloga de los genes *ScGDH1* y *LkGDH1* resultaron en una complementación similar en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri*, ya que en ambos casos se recuperó el crecimiento con respecto a la WT. Este efecto, sin embargo, no fue observado en la sobre expresión en *K. lactis*, pues en esta levadura la expresión del gen *LkGDH1* resulto en la complementación total del gen *Klgdh1Δ* en glucosa y una complementación parcial en etanol, mientras que la expresión del gen *ScGDH1* en la misma mutante tubo una complementación pobre en glucosa o etanol. La expresión

ectópica de los genes *ScGDH3* y *KlGDH1* también mostró una tendencia similar en los experimentos de complementación, al expresarlos en la mutante sencilla *Lkgdh1Δ* no pudieron compensar la falta de crecimiento mientras que al complementar la mutante *Scgdh1Δ*, estos mostraron una complementación significativa, pero nunca lograron complementar al 100 % como la cepa WT. La represión transcripcional del gen *ScGDH3* en glucosa, podrían contribuir a los bajos niveles de complementación del gen *ScGDH3* en a mutante *Scgdh1Δ* en glucosa (Avendaño *et al.*, 2005). Sin embargo cuando este mismo gen *ScGDH3* fue expresado en *K. lactis*, este complemento al 100% la falta de *Lkgdh1Δ* como si este fuera su gen endógeno.

Sin embargo, la caracterización cinética de las Gdh's-NADP y el patrón de complementación heteróloga de los genes correspondientes, resulta en una relación opuesta. Así la respuesta transcripcional no fue suficiente para comparar la función de las Gdh's. Todavía, la correlación cercana entre las actividades específicas de Gdh-NADP y las velocidades de crecimiento (Tabla 4; Figs. 15, 16 y 17) sugieren que los genes *ScGDH1* y *LkGDH1* podrían tener niveles de expresión similar en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* y los genes *ScGDH3* y *KlGDH1* en *S. cerevisiae* y *K. lactis*.

Estos resultados sugieren que la transcripción peculiar y/o los mecanismos cinéticos regulatorios agrupan a los genes *ScGDH1* Y *LkGDH1*, o las proteínas que codifican, en un grupo separado de los genes *ScGDH3* y *KlGDH1*. Sin embargo será necesario hacer análisis futuros para determinar si las similitudes entre la regulación y la complementación heteróloga, puede depender de factores transcripcionales presentes en el promotor de los genes.

### 7.3 La comparación cinética agrupo a las enzimas *ScGdh1* y *LkGdh1* en un grupo diferente de las enzimas *ScGdh3* y *KlGdh1*

La cinética hiperbólica y la alta afinidad por  $\alpha$ -KG son propiedades compartidas entre las enzimas *ScGdh1* y *LkGdh1* mientras que la cooperatividad de la enzima *ScGdh3* observada al utilizar el  $\alpha$ -KG es compartida con la única enzima presente en *K. lactis* (*KlGdh1*). (Tabla 5; Fig. 23). Sin embargo el significado fisiológico de la cooperatividad en la enzima *ScGdh3* no es claro, pues solo se observa cuando el pH se baja a 5.8 (Tabla 5) o más bajo (DeLuna *et al.*, 2001). El pH intracelular durante la fase exponencial de la curva de crecimiento se ha reportado que está muy cercano a lo neutro: 7.2 en glucosa y 6.8 en una mezcla de 2% etanol y 2% glicerol (Orij *et al.*, 2009). Y cuando las células se encuentran en estado estacionario, es decir, que dejan de crecer por ausencia de glucosa el pH es de 5.5 a 6.0 (Orij *et al.*, 2009). Estas últimas condiciones podrían reflejar la importancia del papel que desempeña *ScGdh3* en esta fase (estacionaria) (Lee *et al.*, 2012). Es posible que la cooperatividad de la enzima *ScGdh3* sea una característica de la proteína ancestral sin un verdadero rol fisiológico y metabólico “*in vivo*”; sin embargo, también puede ser el caso de que un efector alostérico desconocido induzca la cooperatividad durante la fase exponencial en etanol, cuyo efecto puede ser imitado en pH ácido “*in vitro*”. Las similitudes en los patrones de complementación de las enzimas *KlGdh1* y *ScGdh3* sugieren que la cooperatividad de *ScGdh3* puede ser importante “*in vivo*”.

La cooperatividad que se observa en el caso de la isoforma *KlGdh1* de *K. lactis*, se aprecia para los tres sustratos usados para llevar a cabo la reacción y la caracterización cinética, pero es muy notable para la utilización de  $\alpha$ -KG y amonio para los cuales el número de Hill fueron 4.4 y 2.7 respectivamente (Tabla 5). La concentración fisiológica estimada de  $\alpha$ -KG en esta levadura fue de 0.7 mM (Tabla 7) y para esta concentración, la constante catalítica de *KlGdh1* no es muy sensible a los cambios en la concentración de  $\alpha$ -KG. Esto sugiere que la disponibilidad de  $\alpha$ -

KG no determina la síntesis de glutámico en *K. lactis*. Sin embargo, la baja constante catalítica observada para la enzima *KlGdh1* a 0.7 mM, puede no ser compatible con el rápido crecimiento observado en *K. lactis* (Tabla 3). Es posible que los activadores que desconocemos contribuyan a la modulación de la única enzima *KlGdh1* de *K. lactis* “*in vivo*”. Interesantemente, las enzimas *ScGdh1/ScGdh3* de *S. cerevisiae* y *LkGdh1* de *L. kluyveri* tienen una respuesta muy alta a los cambios en las concentraciones fisiológicas de  $\alpha$ -KG (Tablas 4 y 6), esto sugiere que la velocidad de síntesis de glutámico es muy influenciada por la disponibilidad de  $\alpha$ -KG como lo reportado previamente por Quezada *et al.*, 2013. Cabe resaltar que cada vez hay más estudios que indican la importancia que tiene el  $\alpha$ -KG en la regulación metabólica. Así, la modulación intracelular de los niveles de  $\alpha$ -KG podrían constituir un mecanismo importante del control metabólico. En este sentido, se ha propuesto que en *Caenorhabditis elegans* el  $\alpha$ -KG es un metabolito clave que media la longevidad de este gusano por restricción dietética (Chin *et al.*, 2014). La concentración intracelular de  $\alpha$ -KG y succinato pueden contribuir a mantener la identidad celular y tienen un papel mecanístico en el estado transcripcional y epigenético en las células madre de ratón (Carey *et al.*, 2015). A un más interesante, existen estudios recientes sobre la función de *Gdh1* que revelan que las mutantes *gdh1Δ* muestran proteólisis del extremo N-terminal de la histona H3, sugiriendo que el  $\alpha$ -KG tiene un papel regulador importante en el silenciamiento de telómeros en *S. cerevisiae* (Su and Pillus, 2016).

La concentración intracelular de NADPH reportada es alrededor de 286  $\mu$ M (Zhang *et al.*, 2015; los autores consideran un volumen celular de 1.7ml/g de peso seco de células) lo cual corresponde a 6-7  $K_{m-NADPH}$  o  $S_{0.5-NADPH}$  (Tabla 5). Para esta concentración las actividades de las enzimas *Gdh*'s-NADP estudiadas aquí no respondieron a los cambios en la concentración de NADPH (Fig. 24), esto indica que la concentración fisiológica de este sustrato está cerca de saturación y no determina la actividad de *Gdh*-NADP “*in vivo*”. Por lo contrario, la concentración

intracelular de amonio es de 2.2 mM (Cueto-Rojas *et al.*, 2016, considerando un volumen celular de 1.7 ml/g de peso seco de células como en Zhang *et al.*, 2015). Este valor es muy inferior a la  $K_{m-NH_4}$  o  $S_{0.5-NH_4}$  y se muestra en la tabla 5, lo cual indica que la disponibilidad de amonio modula la actividad de Gdh-NADP “*in vivo*”. Así, la síntesis de glutámico por GDH-NADP parece estar determinada principalmente por la disponibilidad de  $\alpha$ -KG y amonio y el producto no se inhibe por producto final (glutámico).

Curiosamente, el comportamiento cinético de las enzimas presentes en las dos especies de levaduras que mostraran una capacidad fermentativa, cuando se pusieron a crecer en concentraciones altas de glucosa en el medio (*ScGdh1* y *LkGdh1* en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* respectivamente) fue hiperbólico, mostrando una alta afinidad por  $\alpha$ -KG ( $K_{m-\alpha-KG} \approx 0.4$  mM). Las enzimas presentes en las levaduras, en las cuales predominó el metabolismo respiratorio (isoformas *ScGdh3* y *KlGdh1* de *S. cerevisiae* y *K. lactis* respectivamente) cuya contribución a la síntesis de glutámico incrementa durante el metabolismo respiratorio en *S. cerevisiae* (Tabla 3), fueron cooperativas y mostraron una baja afinidad por  $\alpha$ -KG ( $S_{0.5-KlGdh1}$ , pH 7.5= 3.61 mM y  $S_{0.5-ScGdh3}$  pH 5.8= 1.95 mM). Esto sugiere que la cinética de GDH-NADP podría estar relacionada con la adaptación al estilo de vida fermentativo y respiratorio, pero se necesita hacer estudios en diversas especies de levadura para explorar más a fondo esta posibilidad.

# **8- CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

- La triple mutante *Scgdh1Δ-Scgdh3Δ-Scglt1Δ* de *S. cerevisiae*, y la doble mutante *Lkgdh1Δ-Lkglt1Δ*, *Klgdh1Δ-Klgl1Δ* de *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente son auxótrofas totales de glutámico.
- Las mutantes en *gdhΔ* pierden por completo la actividad de NADP-Gdh.
- *ScGDH1* y *KlGDH1* no se regula por la fuente de carbono, mientras que *ScGDH3* y *LkGDH1* en glucosa como fuente de carbono se reprimen y en etanol se inducen; este coincide con la remodelación de cromatina en ambas fuentes de carbono.
- La expresión heteróloga de los genes *ScGDH1/LkGDH1* resultó en un patrón de complementación similar en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri*, de igual manera resulta para el caso del par de genes *ScGD31/KlGDH1*.
- Las enzimas Gdh1, Gdh3 y *LkGdh1* muestran una alta afinidad por el  $\alpha$ -cetoglutarato a pH7.5.
- La enzima *KlGdh1* muestra baja afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato a pH7.5.
- A pH 5.8 *KlGdh1* tiene un comportamiento cinético similar a la isoforma respiratoria Gdh3 de *S. cerevisiae* mientras que *LkGdh1* tiene un comportamiento cinético similar a la isoforma fermentativa Gdh1 de *S. cerevisiae*.
- El glutámico no es un regulador negativo para las glutamato deshidrogenasas, en las condiciones estudiadas.
- La concentración de  $\alpha$ -KG intracelular no determina la síntesis de glutámico en *K. lactis*.
- *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* responden altamente a los cambios en la concentración de  $\alpha$ -KG intracelular.
- Las propiedades cinéticas que determinan la capacidad de NADP-GDH para utilizar el  $\alpha$ -KG y la síntesis de glutamato, no correlación con el origen evolutivo.

## **9. ANEXOS**

## ANEXO # 1

Oligonucleótidos usados para la construcción de cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Oligo	Secuencia del Oligonucleótido (5' - 3') *	Secuencias con letras negritas
101	AACTGGAATTACACCCTGGCTGAC	
102	<b>CCAGTGTCGAAAACGAGCTCGATTGTGCGTATCTACAGATGCTTGTGG</b>	21 pb homólogos a la región 5' terminal del marcador de selección <i>kanMX4</i>
103	<b>CTGGCGCGCCTTAATTAACCCGAGGTGACGTCTGGGAATAAGCTCC</b>	24 pb homólogos a la región 3' terminal del marcador de selección <i>kanMX4</i>
104	CTCTACCGTTGGTCTTGGTATGTTTG	
105	CGGGTTAATTAAGGCGCGCCAG	
106	CGAGCTCGTTTTCGACACTGG	
107	GCACCAATGCCACTCTCTTTTCTTCGG	
108	GGAGTTAAACTACAGGACCCGGAG	
108-1	CCTCGTTGGCTGTTTCAGATGG	
108-2	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	
109	<b>CGCTCCGGCGATATGCTATCACACGGCTCATCATGGCGGATTCCGCTGTATATAAGACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGC</b>	22 pb homólogos a la región 5' terminal del marcador de selección <i>natMX4</i>
110	<b>AGAAAAAAAACAAACCTTGAAGCAGAGTCACGTCTTCAATGCCTATCTACTGACAGTGCACCGACAGCAGTATAGCGACCAGC</b>	23 pb homólogos a la región 3' terminal del marcador de selección <i>natMX4</i>
111	CCTCTTCATCATCCGCAGATAA	
112	GCACGTCAAGACTGTCAAGGAGGGTCTTATATACCAGCGGAATC	
113	GCTGGTCGCTATACTGCTGTCGGTGCAGTGTAGTAGATAGGC	
114	GCCTATTCCTGCATCCTTTGA	
115	GTAGTCGTCTTGTGACTTGGC	
116	TTCTCGTCGTCACCAGCAT	
117	<b>GATTGATTATTTGTGAAAAGTAATAAGAATAACTATAACAAAACTTTTAAAGAGATCTGTTTAGCTTGCCCTCGTCCCCGCCG</b>	30 pb homólogos a la región 5' terminal del marcador de selección <i>natMX4</i>
118	<b>CGGAATTAAGTTCATTTTTAAATTTATGCTTTTCTAAGATAAGAACA CTCACTGAATTCGAGCTCGTTTTTCGACACTGGATGG</b>	25 pb homólogos a la región 3' terminal del marcador de selección <i>natMX4</i>
119	ATGAGAAAAGATAAAGACTGAATACCAACCCAAAAGGACAGTTTCGAGCGTATCACGCAA	
120	<b>CCGGGTGACCCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCTTTAAAAGTTTTGGTATAGTATTAGTTC</b>	40 pb homólogos a la región 5' terminal del

121	ACTAACGCCGCCATCCAGTGTCGAAAACGAGCTCGAATTCAGTGA GTGTTCTTATCTTAGAAAAGC	marcador de selección <i>natMX4</i> 40 pb homólogos a la región 3' terminal del marcador de selección <i>natMX4</i>
122	TATTGAACTTGGTATCTTCGCTTTCCACCTGAGAAATCTTCTTGCCGA CTTTACCAT	
123	GTGGCTATCTTGACGTCTGGCAGTTATACAG	
124	CAGAAACAGGTTGGCCTTACAAATGCAAGC	
125	GCGCGCGCTAGCATGTCAGAGCCAGAATTTCAACAAGC	Sitio de restricción para <i>NheI</i>
126	GCGCGCCTCGAGTTAAAATACATCACCTTGGTC	Sitio de restricción para <i>XhoI</i>
127	GCGCGCGCTAGCATGACAAGCGAACCAGAGTTTCAGC	Sitio de restricción para <i>NheI</i>
128	GCGCGCCTCGAGTAAAAACGTCTCCCTGGTCAAG	Sitio de restricción para <i>XhoI</i>
129	GCGCGCCATATGATGGCCAACCATACGAACC	Sitio de restricción para <i>NdeI</i>
130	GCGCGCGGATCCTTATTCCCAGACGTCACCTTG	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
131	GCGCGCGCTAGCATGTCTGCTGAACCATATGAACC	Sitio de restricción para <i>NheI</i>
132	GCGCGCGGATCCTTAGAAAACATCACCTTGGTGC	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
133	GCGCGCGGATCCCTTTAGGTTCAAGTCCGCTAAACTCTACA	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
134	CGCGCGCTCGAGATTCCTTACCGTTTGTGGCATAGTCGATCA	Sitio de restricción para <i>XhoI</i>
135	GCGCGCCTCGAGTAATGTTAAGATGAAATTTAAGTGAGCTGG	Sitio de restricción para <i>XhoI</i>
136	CGCGCGGATCCACACGTTTGGCCCTCAAACGACTCCTTGCCG	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
137	GCGCGCGGATCCGGTTGATTTACTTTTCAAATGGTCCTTCCT	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
138	CGCGCGGAGCTCGGAGCTTATTCCCAGACGTCAC	Sitio de restricción para <i>SacI</i>
139	GCGCGCGGATCCACCATAGCGTTTTTTCGCCGTCCGCTG	Sitio de restricción para <i>BamHI</i>
140	CGCGCGTCTAGACATGGATTTCAAATCCTAAATTTATATAAC	Sitio de restricción para <i>XbaI</i>

\*Todos los oligonucleotides, fueron generados en este trabajo.

## ANEXO # 2

Oligonucleótidos usados para la generación de sondas para ensayo tipo Northern Blot.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia del Oligonucleótido (5' - 3') *</b>	<b>NOTA</b>
141	GAGAATTGAGCAGACACATT	<i>Amplifican la sonda de ScGDH1</i>
142	AATAGCTTCTGGAGTGGAA	
143	AGTGTTACCTATTGTTTCTGTCCCGGAG	<i>Amplifican la sonda de ScGDH3</i>
144	CTGTATGCAGTCGTTGAAGCAGTTGATC	
145	GTTTTGCCGGTGACGAC	<i>Amplifican la sonda de ScACT1</i>
146	CTTTCGGCAATACCTGGG	
147	ATGGCCCAACCATACGAACCAGAATTTTC	<i>Amplifican la sonda de LkGDH1</i>
148	GAGAGTTTTGAGCCATTTC AAGCCAG	
149	AAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTC	<i>Amplifican la sonda de Lk 18s</i>
150	AAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCG	
151	ATGTCTGCTG AACCATATGA ACC	<i>Amplifican la sonda de KIGDH1</i>
152	TTAGAAAACATCACCTTGGTGC	
153	AAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTCTGG	<i>Amplifican la sonda de Kl 18s</i>
154	AAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCG	

### ANEXO # 3

Oligonucleótidos usados para ensayo de NuSA.

A)

Primer	Secuencia	Punto medio de amplicon (Coordenada del promotor)	5'/3'	Tamaño (pb)
1- <i>ScGDHI</i>	CGACAAGAAGGAGATGAACTT	-820	-871	103
1- <i>ScGDHI</i>	CCACAGCCCGCTAGAATAATT		-768	
2- <i>ScGDHI</i>	CAGTGATTCTGTCCAGCATTG	-769	-823	108
2- <i>ScGDHI</i>	CACTTTATACTGAATGGAGTTACT		-715	
3- <i>ScGDHI</i>	AATTATTCTAGCGGGCTGTGG	-744	-798	109
3- <i>ScGDHI</i>	TTATCGCAGCCCCATGAAG		-689	
4- <i>ScGDHI</i>	AGTAACTCCATTCAGTATAAAGTG	-690	-739	99
4- <i>ScGDHI</i>	ATGCGGAGTGGTGCCCA		-640	
5- <i>ScGDHI</i>	CTTCATGGGGCTGCGATAAA	-664	-709	91
5- <i>ScGDHI</i>	GTATAATTCAGGTTATGCCCAG		-618	
6- <i>ScGDHI</i>	TGGGCACCCTCCGCAT	-616	-657	83
6- <i>ScGDHI</i>	TTATCCAGCCAATCGTAAACG		-574	
7- <i>ScGDHI</i>	CTGGGCATAACCTGAATTATAC	-589	-640	103
7- <i>ScGDHI</i>	GAGTGGATGTAGCATCATATTC		-537	
8- <i>ScGDHI</i>	CGTTTACGATTGGCTGGATAA	-549	-595	93
8- <i>ScGDHI</i>	CATAAGGGGAGCCTGATACA		-502	
9- <i>ScGDHI</i>	AATATGATGCTACATCCACTCA	-512	559	94
9- <i>ScGDHI</i>	TAAGATCAGGCCCGTTTCCA		-465	
10- <i>ScGDHI</i>	TGTATCAGGCTCCCCTTATG	-475	-521	92
10- <i>ScGDHI</i>	TCGAGGCCATCCAATCAGA		-429	
11- <i>ScGDHI</i>	TGGAAACGGGCTGATCTTA	-432	-484	104
11- <i>ScGDHI</i>	TGAAAATGCATGGGCCGTTT		-380	
12- <i>ScGDHI</i>	ATCTGATTGGATGGCCTCGA	-391	-448	114
12- <i>ScGDHI</i>	ACGTGGGGTTCGTAATTTTC		-334	
13- <i>ScGDHI</i>	AACCGGCCCATGCATTTTCA	-355	-400	91
13- <i>ScGDHI</i>	AGCTGATAACAGCTTCTCTCT		-309	
14- <i>ScGDHI</i>	GAAATAGTACGACCCACGT	-311	-359	96
14- <i>ScGDHI</i>	TGCTGATTTTCATTATGGTACCT		-263	
15- <i>ScGDHI</i>	AGAGAGAAGCTGTTATCAGCT	-279	-330	103
15- <i>ScGDHI</i>	CTACTTCTTACGCTTTCTCTTC		-227	

16- <i>ScGDH1</i>	AGGTACCATAATGAAAATCAGCA	-242	-286	88
16- <i>ScGDH1</i>	TACGTATACTTTGCTTTAACAAGAA		-198	
17- <i>ScGDH1</i>	GAAGAAGAAAGCGTAAGAAGTAG	-204	-250	92
17- <i>ScGDH1</i>	GAAAATTTTCCAATCTTCTTACTT		-158	
18- <i>ScGDH1</i>	TTCTTGTTAAAGCAAAGTATACGTA	-162	-213	103
18- <i>ScGDH1</i>	ATGGGTAAACGCATTTGTAAGTC		-110	
19- <i>ScGDH1</i>	AAGTAAGAGAAGATTGGAAAATTTTC	-131	-184	106
19- <i>ScGDH1</i>	GAAAAGTCATTTAAAGAGTGAGAG		-78	
20- <i>ScGDH1</i>	GAGTTACAAATGCGTTTACCCAT	-86	-133	95
20- <i>ScGDH1</i>	TATATTAGAATAATGCGATAGTACGT		-38	
21- <i>ScGDH1</i>	CTCTCACTCTTTAAATGACTTTTC	-51	-100	98
21- <i>ScGDH1</i>	TCTTTTTCTTTTTGGTCTCCTAAC		-2	
22- <i>ScGDH1</i>	ACGTACTATCGCATTATTCTAATATA	+3	-50	94
22- <i>ScGDH1</i>	GAGACAACCTCTTCGTAAGCT T		+44	
23- <i>ScGDH1</i>	GTTAGGAGACCAAAAAGAAAAAGA	+9	-25	103
23- <i>ScGDH1</i>	GTGTTGTTTCGAAAAGAGTAGAGT		+78	
24- <i>ScGDH1</i>	AAGCTTACGAAGAAGTTGTCTC	+27	+22	96
24- <i>ScGDH1</i>	CTGGAACAGAAACAATTGGCAA		+118	
25- <i>ScGDH1</i>	ACTCTACTCTTTTCGAACAACAC	+110	+55	99
25- <i>ScGDH1</i>	TCATTTTCCCAGGTGACTCTG		+154	
26- <i>ScGDH1</i>	TTGCCAATTGTTTCTGTTCCAG	+148	+96	104
26- <i>ScGDH1</i>	TTATATTGCACTCTGTAACCTTGA		+200	
27- <i>ScGDH1</i>	CAGAGTCACCTGGGAAAATG	+183	+134	97
27- <i>ScGDH1</i>	TAGACCACCCTTGTATGGAC		+231	
28- <i>ScGDH1</i>	TCAAGGTTACAGAGTGCAATATAA	+225	+176	97
28- <i>ScGDH1</i>	CAAGAATTTCAAGATAGACAAGTTC		+273	

---

B)

Primer	Secuencia	Punto medio de amplicon (Coordenada del promotor)	5'/3'	Tamaño (pb)
1- <i>ScGDH3</i>	TGACGCACAAGATTCATAACAAAT	-826	-877	103
1- <i>ScGDH3</i>	ACATTAAAAATATTTACAGCCTAGCTT		-774	
2- <i>ScGDH3</i>	TACATTGTGCAGAAGGTCTTCA	-783	-832	98
2- <i>ScGDH3</i>	AACAAATTATGCCTCACTTGATATTA		-734	
3- <i>ScGDH3</i>	AAGCTAGGCTGTAAATATTTTAATGT	-754	-800	93
3- <i>ScGDH3</i>	GAAGTTCAGCTACATATAACAAATTA		-707	
4- <i>ScGDH3</i>	TAATATCAAGTGAGGCATAATTTGTT	-715	-750	70
4- <i>ScGDH3</i>	CTGAAACAATCCGGTGCTTG		-680	
5- <i>ScGDH3</i>	TAATTTGTTATATGTAGCTGA ACTTC	-684	-733	99
5- <i>ScGDH3</i>	GAATAATAGCTTCTACACTTTGAATT		-634	
6- <i>ScGDH3</i>	CAAGCACCGGATTGTTTCAG	-629	-680	103
6- <i>ScGDH3</i>	ACAAGCTGCCACAAGTATGTTTA		-577	
7- <i>ScGDH3</i>	AATTCAAAGTG TAGAAGCTATTATTC	-602	-660	116
7- <i>ScGDH3</i>	GACCCAACAAA ACTTAAAAATAAAAC		-544	
8- <i>ScGDH3</i>	AACATACTTGTGGCAGCTTGT	-549	-598	98
8- <i>ScGDH3</i>	CGTTTTATCATACTTTACTTTTTCTTT		-500	
9- <i>ScGDH3</i>	GTTTTATTTTTAAGTTTTGTGGGTC	-526	-570	89
9- <i>ScGDH3</i>	ATGGGCGTTAATTACTTTGGCA		-481	
10- <i>ScGDH3</i>	AAAGAAAAAGTAAAGTATGATAAACG	-486	-527	82
10- <i>ScGDH3</i>	TATATGCCTCCTATGCCTTCTT		-445	
11- <i>ScGDH3</i>	TGCCAAAGTAATTAACGCCCAT	-447	-493	92
11- <i>ScGDH3</i>	AGAATATCTGTCAGCAGCCATA		-401	
12- <i>ScGDH3</i>	AAGAAGGCATAGGAGGCATATA	-412	-467	110
12- <i>ScGDH3</i>	GAAGAAAAAGAAAAGTTGGTATAATAT		-357	
13- <i>ScGDH3</i>	TATGGCTGCTGACAGATATTCT	-372	-423	103
13- <i>ScGDH3</i>	TCTTCAAAGAGCTGGGCCAA		-320	
14- <i>ScGDH3</i>	ATATTATACCAACTTTTCTTTTTCTTC	-332	-384	104
14- <i>ScGDH3</i>	CTTTAAAATCTCATTGGCTCCCT		-280	
15- <i>ScGDH3</i>	TTGGCCCAGCTCTTTGAAGA	-285	-340	110
15- <i>ScGDH3</i>	ACTGTCCCTTTAATATCAATACTG		-230	
16- <i>ScGDH3</i>	AGGGAGCCAATGAGATTTTAAAG	-251	-303	104
16- <i>ScGDH3</i>	TGGTCATCACTTTTTCCATATTAAC		-199	
17- <i>ScGDH3</i>	CAGTATTGATATTAAGGGAAGT	-202	-254	104

17- <i>ScGDH3</i>	GTGAAAGTGAAATAAAAAGAAATACTC		-150	
18- <i>ScGDH3</i>	GTTGGTTAATATGGAAAAAGTGATG	-173	-224	102
18- <i>ScGDH3</i>	TCAAAGTCAGAAAGTCATTAAGTGT		-122	
19- <i>ScGDH3</i>	GAGTATTTCTTTTTATTTCACTTTTAC	-128	-177	99
19- <i>ScGDH3</i>	GTGTGGCCTATGTATGTACCT		-78	
20- <i>ScGDH3</i>	AGGTACATACATAGGCCACAC	-54	-99	91
20- <i>ScGDH3</i>	GTTTCGCTTGTCATTTTTTACTTTTTT		+8	
21- <i>ScGDH3</i>	ATATAGGGAAGTAGCAACAGTCA	-5	-50	91
21- <i>ScGDH3</i>	ATCTCATCGTAAGCCTGCTGA		+41	
22- <i>ScGDH3</i>	AAAAAGTAAAAAATGACAAGCGAAC	-43	-12	109
22- <i>ScGDH3</i>	CTTTTTTATACTGTGGGAATTTTTCAA		+97	
23- <i>ScGDH3</i>	TCAGCAGGCTTACGATGAGAT	+71	+20	102
23- <i>ScGDH3</i>	TCCGGGACAGAAACAATAGGT		+122	
24- <i>ScGDH3</i>	TTGAAAAATTCCCACAGTATAAAAAAG	+121	+70	102
24- <i>ScGDH3</i>	CTTGCTCGCCATTATCATTTC		-172	
25- <i>ScGDH3</i>	ACCTATTGTTTCTGTCCCGGA	+151	+101	99
25- <i>ScGDH3</i>	AACTGCACCCTGTATCCTTGA		+200	
26- <i>ScGDH3</i>	GAAAATGATAATGGCGAGCAAG	+200	+150	100
26- <i>ScGDH3</i>	CTGATGGGTGGAAGCGTAG		+250	
27- <i>ScGDH3</i>	TCAAGGATACAGGGTGCAGTT	+176	+129	94
27- <i>ScGDH3</i>	AAATTTTAGGATAGACAGGTTTAC		+223	
28- <i>ScGDH3</i>	CATAGGCCACACACACACA	-30	-90	121
28- <i>ScGDH3</i>	AAGCCTGCTGAAACTCTGGT		+31	
29- <i>ScGDH3</i>	TAGCAACAGTCACCGAAAAGAA	-6	-39	90
29- <i>ScGDH3</i>	AATCCTCCACAGAAGAAACGA T		+51	

---

C)

Primer	Secuencia	Punto medio de amplicon (Coordenada del promotor)	5'/3'	Tamaño (pb)
1- <i>LkGDH1</i>	GTTGGAATCAAAAAGTGGCATCA	-895	-946	102
1- <i>LkGDH1</i>	TGATCCTTTCCACTTTGTCACT		-844	
2- <i>LkGDH1</i>	ACTTTTGAAATGGTCCTTCCTG	-863	-911	97
2- <i>LkGDH1</i>	TTGCATCTGGTAGGACGTTCA		-814	
3- <i>LkGDH1</i>	AGTGACAAAGTGGAAAGGATCA	-815	-865	101
3- <i>LkGDH1</i>	AACCTTCCATGTTTCGTCATC		-764	
4- <i>LkGDH1</i>	TGAACGTCTACCAGATGCAA	-778	-834	113
4- <i>LkGDH1</i>	TGTTATCCCACGTGAGTACTT		-721	
5- <i>LkGDH1</i>	GATGACGAAACATGGAAGGTT	-738	-784	92
5- <i>LkGDH1</i>	GTTCTATTTAGCATATGTAGTTGG		-692	
6- <i>LkGDH1</i>	AAGTACTCACGTGGGATAACA	-695	-741	93
6- <i>LkGDH1</i>	AGTAAGGGACTTGGAGCTTG		-648	
7- <i>LkGDH1</i>	CCAACACTACATATGCTAAATAGAAC	-664	-715	103
7- <i>LkGDH1</i>	GAGGAAGGAGTCGAAAAAGAA		-612	
8- <i>LkGDH1</i>	CAAGCTCCAAGTCCCTTACT	-620	-667	95
8- <i>LkGDH1</i>	AGGGTTTTTTCAGTCCACGAA		-572	
9- <i>LkGDH1</i>	TTCTTTTTTCGACTCCTTCCTC	-590	-632	85
9- <i>LkGDH1</i>	ACGCCCTGTAAATGGCATCTT		-547	
10- <i>LkGDH1</i>	TTCGTGGACTGAAAAAACCT	-558	-592	69
10- <i>LkGDH1</i>	GTTTTATGAAAGAGGTGCCATTT		-523	
11- <i>LkGDH1</i>	AAGATGCCATTTACAGGGCGT	-511	-567	112
11- <i>LkGDH1</i>	GAGTGCTTAATTCTGACCAATC		-455	
12- <i>LkGDH1</i>	AAATGGCACCTCTTTCATAAAAC	-473	-523	100
12- <i>LkGDH1</i>	GTGGAGGGCACACAAAATTG		-423	
13- <i>LkGDH1</i>	GATTGGTCAGAATTAAGCACTC	-424	-476	105
13- <i>LkGDH1</i>	AACGTCGCCTCGGTTTTCTC		-371	
14- <i>LkGDH1</i>	CAATTTTGTGTGCCCTCCAC	-392	-442	101
14- <i>LkGDH1</i>	TACTGCGAAAAAGGCGTGCT		-341	
15- <i>LkGDH1</i>	GAGAAAACCGAGGCGACGTT	-336	-390	109
15- <i>LkGDH1</i>	AATCGGAACGTTTCGTCGCC		-281	
16- <i>LkGDH1</i>	AGCACGCCTTTTTCGCAGTA	-309	-360	102
16- <i>LkGDH1</i>	AACGCACTTGTCCTAAGCCA		-258	
17- <i>LkGDH1</i>	GGCGACGAAACGTTCCGATT	-251	-300	98

<b>17-LkGDHI</b>	AGCAAGATGAATCCAATCAACG		-202	
<b>18-LkGDHI</b>	TGGCTTAGGACAAGTGCGTT	-224	-277	106
<b>18-LkGDHI</b>	CTATCTTGTCAAGCCTGCGT		-171	
<b>19-LkGDHI</b>	CGTTGATTGGATTCATCTTGCT	-202	-223	103
<b>19-LkGDHI</b>	TACGCTCTACACCAAATCAAC		-120	
<b>20-LkGDHI</b>	ACGCAGGCTTGACAAGATAG	-141	-191	100
<b>20-LkGDHI</b>	CCTGGGGTATTTATACGTTTTAG		-91	
<b>21-LkGDHI</b>	GTTGATTTGGTGTAGAGCGTA	-91	-140	99
<b>21-LkGDHI</b>	AAGAGACAAAAACCTACAAAAACC		-41	
<b>22-LkGDHI</b>	CTAAAACGTATAAATACCCAGG	-62	-113	102
<b>22-LkGDHI</b>	GTGCGTATCTACAGATGCTTG		-11	
<b>23-LkGDHI</b>	GGTTTTGTAGTTTTTGTCTCTT	+8	-64	112
<b>23-LkGDHI</b>	GACTTCGTTGTAAGCTTGTTG		+48	
<b>24-LkGDHI</b>	CAAGCATCTGTAGATACGCAC	+25	-31	111
<b>24-LkGDHI</b>	TGGAACAAAGTAGAGTCCTTC		+80	
<b>25-LkGDHI</b>	CAACAAGCTTACAACGAAGTC	+83	+28	109
<b>25-LkGDHI</b>	ATGATTCTTTCCGGAACAGAGA		+137	
<b>26-LkGDHI</b>	GAAGGACTCTACTTTGTTCCA	+112	+60	103
<b>26-LkGDHI</b>	CATTTTCCCAAGTGACTCTGAAT		+163	
<b>27-LkGDHI</b>	TCTCTGTTCCGGAAGAATCAT	+168	+116	103
<b>27-LkGDHI</b>	CTTGCCAGAGTTGTATTGAAC		+219	

---

D)

Primer	Secuencia	Punto medio de amplicon (Coordenada del promotor)	5'/3'	Tamaño (pb)
1-KIGDHI	ATCGCGGCCATTTCCACCA	-880	-934	108
1-KIGDHI	ACTCGACCGCTTCTAAATTGT		-826	
2-KIGDHI	AGGAAATGTGCTAACTGATTGT	-851	-906	111
2-KIGDHI	AACTAAGGCAGTCTAAGCGTTT		-795	
3-KIGDHI	ACAATTTAGAAGCGGTTCGAGT	-802	-846	89
3-KIGDHI	TCCTAGAAGTAACCGTGGAAT		-757	
4-KIGDHI	AAACGCTTAGACTGCCTTAGTT	-767	-816	98
4-KIGDHI	AACCCCTCCGTTAAAAGTATCAT		-718	
5-KIGDHI	ATTCCACGGTTACTTCTAGGA	-723	-777	109
5-KIGDHI	TTGCCAGTACTATTCCCAGAA		-668	
6-KIGDHI	ATGATACTTTTAACGGAAGGGTT	-679	-740	123
6-KIGDHI	TCGTTTTTCAGCTCATATTGGCAT		-617	
7-KIGDHI	TTCTGGGAATAGTACTGGCAA	-635	-689	108
7-KIGDHI	GCTAAGATAAGGAAATTCGTGAT		-581	
8-KIGDHI	ATGCCAATATGAGCTGAAAACGA	-598	-639	82
8-KIGDHI	GCTCTGTTCAAATACTTCTTTTC		-557	
9-KIGDHI	ATCACGAATTTCTTATCTTAGC	548	-603	111
9-KIGDHI	CACTTTCGCACTTTCCGATC		-492	
10-KIGDHI	GAAAAGAAAGTATTTGAACAGAGC	-519	-580	113
10-KIGDHI	CTGGGCAATAGAATAACTCAAAG		-467	
11-KIGDHI	GATCGGAAAGTGCGAAAGTG	-465	-511	93
11-KIGDHI	CATCCCATTCAAACAAGAGTTAC		-418	
12-KIGDHI	CTTTGAGTTATTCTATTGCCAG	-440	-489	98
12-KIGDHI	CTTTGAGTTATTCTATTGCCAG		-391	
13-KIGDHI	GTAACCTTGTTTGAATGGGATG	-392	-440	97
13-KIGDHI	GGACCAATTTTTCTTTTTCGAT		-343	
14-KIGDHI	GCATTATTCAGATGAAGAAGAAG	-371	-414	86
14-KIGDHI	TCAATCACCAATCAAATACAGGA		-328	
15-KIGDHI	ATCGCAAAAGAAAAAATTGGTCC	-317	-365	95
15-KIGDHI	ATAGCCACAAATTACAAAGAGGA		-270	
16-KIGDHI	TCCTGTATTTGATTGGTGATTGA	-290	-340	99
16-KIGDHI	TTAAAACGTATAACTGCCAGAC		-241	
17-KIGDHI	TCCTCTTTGTAATTTGTGGCTAT	-246	-292	93

<b>17-KIGDH1</b>	TGGAACAAGTCAACTAACTACC		-199	
<b>18-KIGDH1</b>	GTCTGGCAGTTATACAGTTTTAA	-211	-263	104
<b>18-KIGDH1</b>	GAGGCAAGAGATGTAAACCAT		-159	
<b>19-KIGDH1</b>	GGTAGTTAGTTGACTTGTTC	-171	-220	98
<b>19-KIGDH1</b>	GCACTGTAATCAAGAAGTAAAAAG		-122	
<b>20-KIGDH1</b>	ATGGTTTACATCTCTTGCCTC	-126	-179	107
<b>20-KIGDH1</b>	CGTACTGTATCGTAGCCTAAG		-72	
<b>21-KIGDH1</b>	CTTTTTACTTCTTGATTACAGTGC	-98	-145	94
<b>21-KIGDH1</b>	CAATCTATGATGAAAGTAATTCGTA		-51	
<b>22-KIGDH1</b>	CTTAGGCTACGATACAGTACG	-38	-92	109
<b>22-KIGDH1</b>	TATGGTTCAGCAGACATCTTTAA		+17	
<b>23-KIGDH1</b>	TACGAATTACTTTCATCATAGATTG	+18	-75	115
<b>23-KIGDH1</b>	AGGCTTGTTGGAATTCTGGTT		+40	
<b>24-KIGDH1</b>	TTAAAGATGTCTGCTGAACCATA	+43	-6	97
<b>24-KIGDH1</b>	GTTTCTTGTCGAACAAAGTAGAG		+91	
<b>25-KIGDH1</b>	AACCAGAATTCCAACAAGCCT	+73	+20	105
<b>25-KIGDH1</b>	CAGAGACAACCTGGCAAAACCT		+125	
<b>26-KIGDH1</b>	CTCTACTTTGTTCGACAAGAAAC	+121	+69	103
<b>26-KIGDH1</b>	CTTTGTCAATTTCCAGGTAAC		+172	
<b>27-KIGDH1</b>	AGGTTTTGCCAGTTGTCTCTG	+154	+104	99
<b>27-KIGDH1</b>	ACTCTGAAACCAGTAGCGACT		+203	
<b>28-KIGDH1</b>	GTTACCTGGGAAAATGACAAAG	+202	+151	99
<b>28-KIGDH1</b>	TGGAATCTCAAACCACCCTTG		+251	

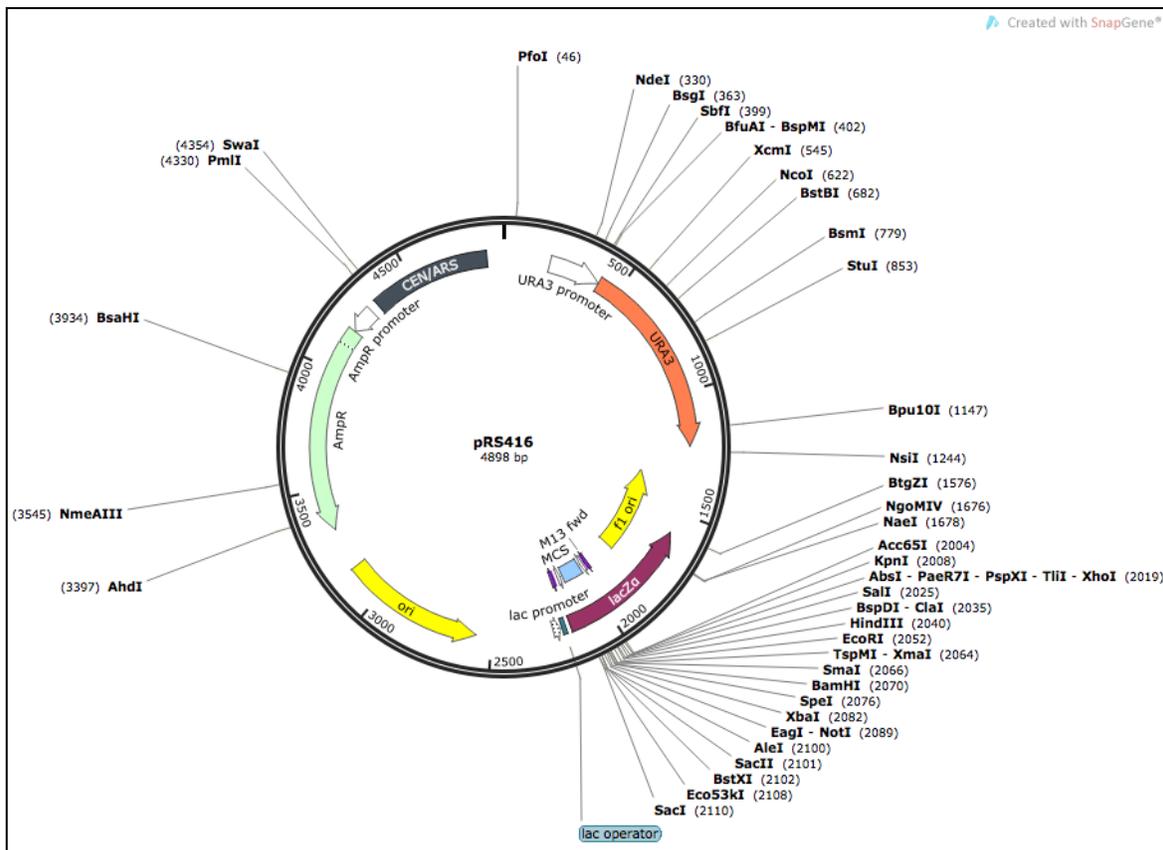
Oligonucleótidos para el gen *VCX1* normalizador para NuSA.

<b>Gen</b> <i>VCX1</i>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>
<i>S. cerevisiae</i>	Fw TCGGTGTGCATCCCTACTGA Rv AAGTGGTCTTCCTTGCCATGA
<i>K. lactis</i>	Fw CGAGCGAGCATTTTGGACCCGTTT Rv TGGAGACAGTAGTACCTGAGATGATC
<i>L. kluyveri</i>	Fw GGTGGGTACAACAGAATCCAACAG Rv GGCACAGGAAATGGCCAACAAGGA

## ANEXO #4

Mapas de plásmidos usados en el presente estudio.

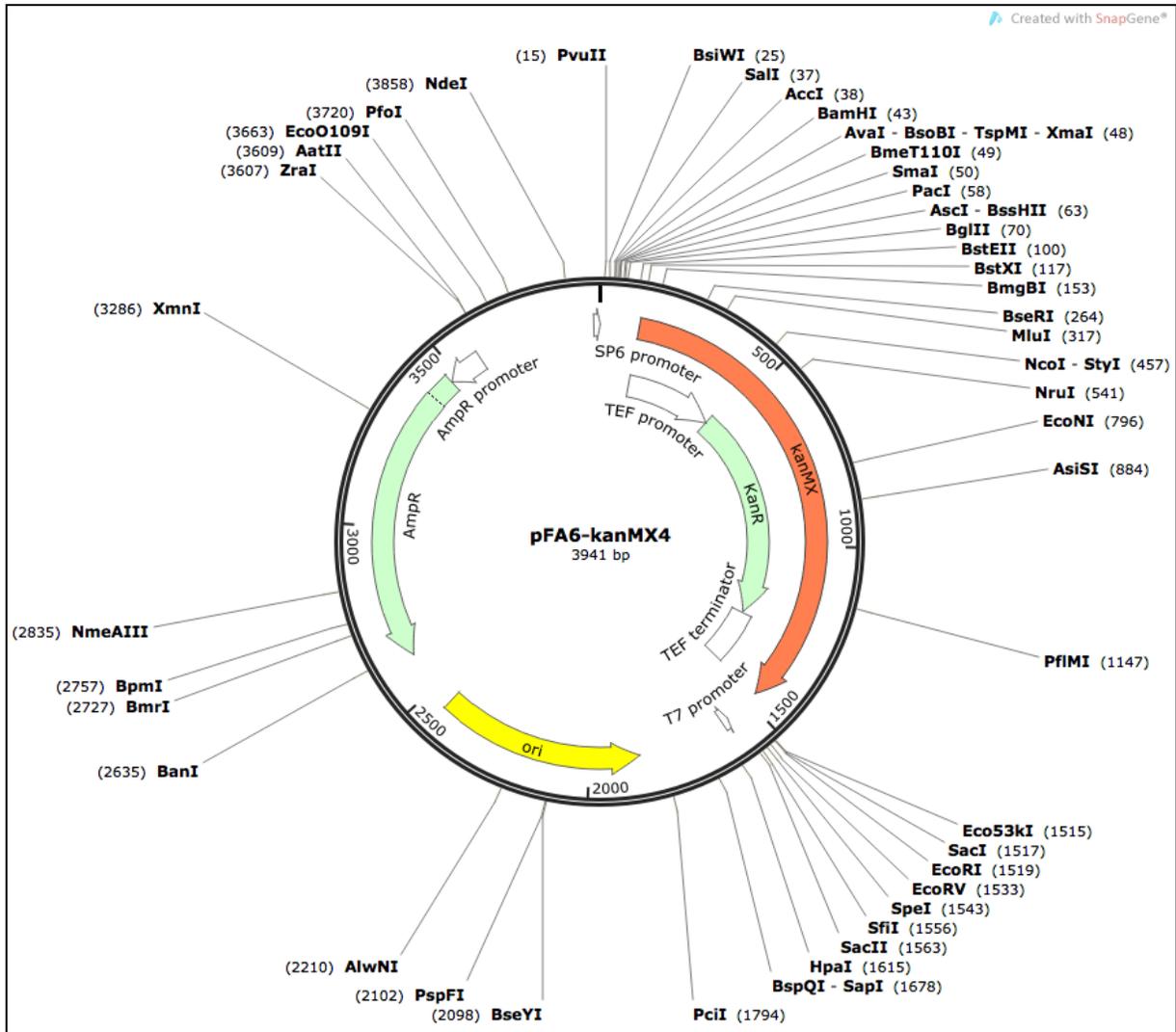
1.- **pRS416**: vector usado para hacer las pruebas de complementación en *S. cerevisiae*.



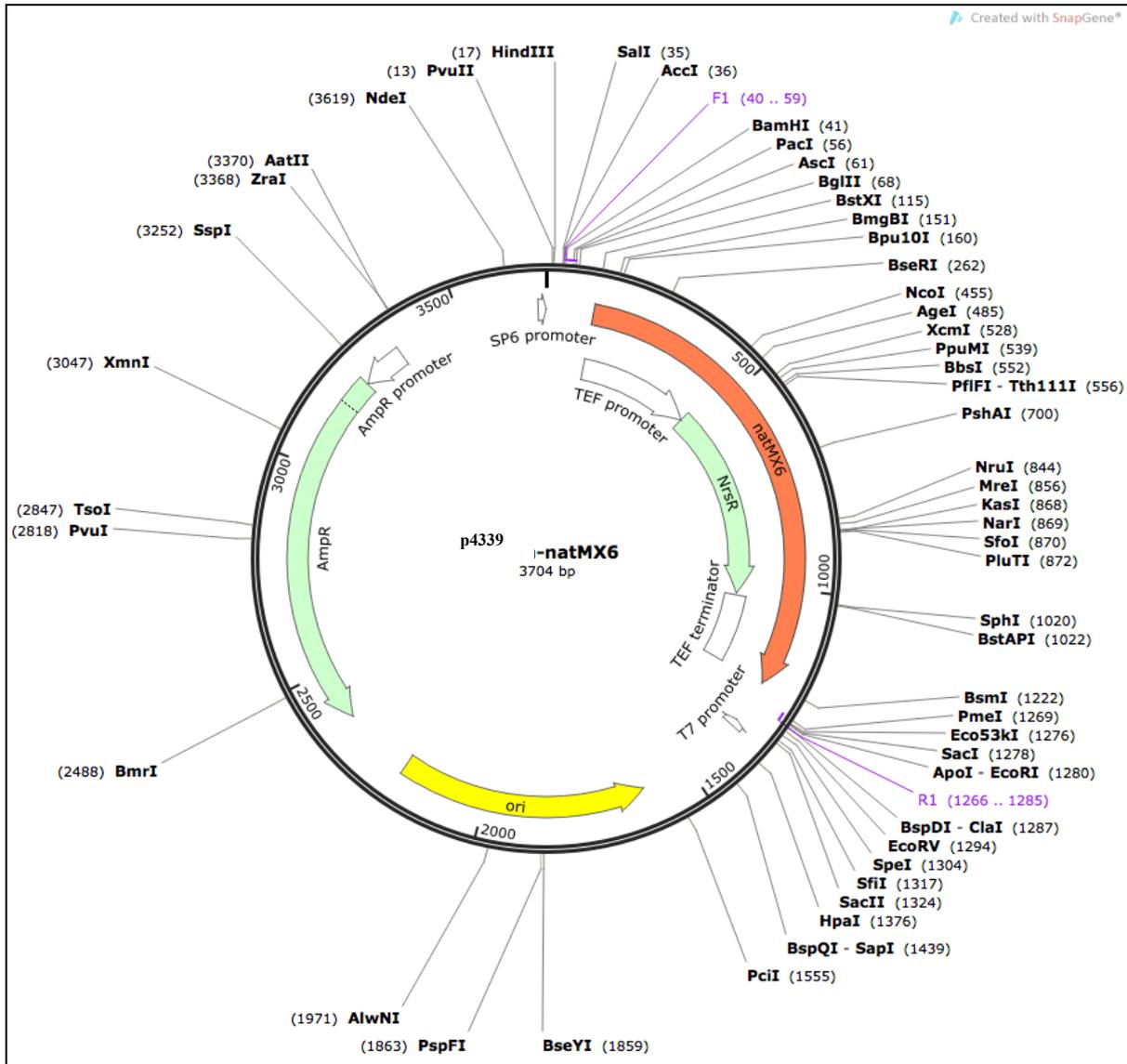
**2.- pRS416-Lk:** vector usado para hacer las pruebas de complementación en *L. kluyveri*.

**3.- YEpKD352:** vector usado para hacer las pruebas de complementación en *K. lactis*.

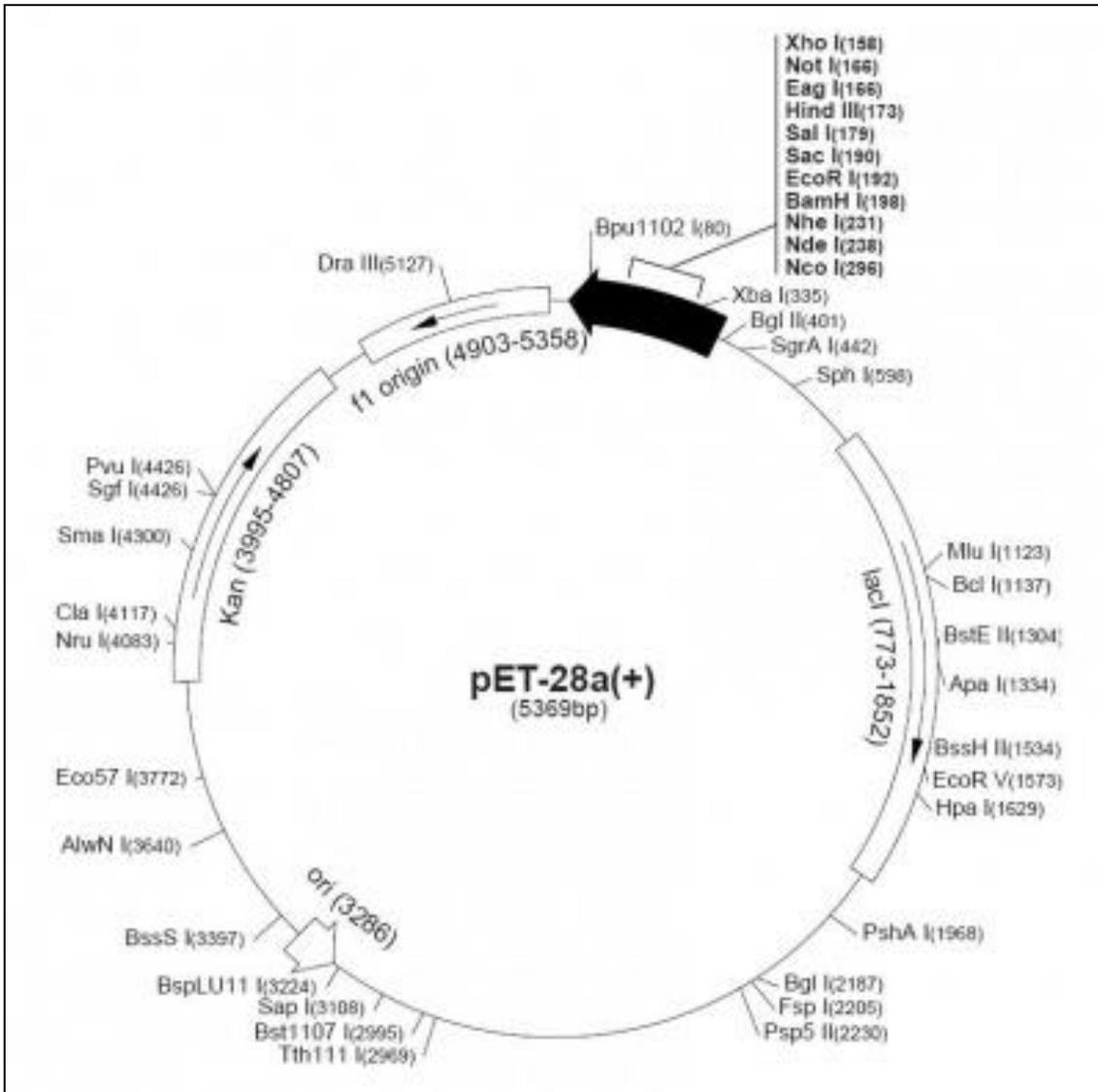
4.- **pFA6A**: vector que tiene integrado el cassette que confiere resistencia a genética (kanMX4), usado para generar mutantes sencillas en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.



5.- **p4339**: vector que tiene integrado el cassette que confiere resistencia a nourseotricina (*natMX4*), usado para generar mutantes sencillas en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.



6.- **pET28a(+)**: vector que tiene integradas varias repeticiones de His, usado para sobreexpresarlos genes *GDH1*, *GDH3*, *LkGDH1* y *KIGDH1* en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente.



**ANEXO 5.** Especies usadas para el alineamiento entre Gdhs.

	<b>Specie</b>	<b>Abbreviation (phylogenetic tree)</b>	<b>Systematic gene name or Accession number (NCBI)</b>
<b>Post-WGD</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Scer Gdh1	YOR375C
	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	Skud Gdh1	EJT43926
	<i>Saccharomyces mikatae</i>	Smik Gdh1	Smik_c510_20577
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Suva Gdh1	Suva_c773_24096
	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	Seub Gdh1	KOG96846
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Scer Gdh3	YAL062W
	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	Skud Gdh3	EJT44409
	<i>Saccharomyces mikatae</i>	Smik Gdh3	Smik_c1235_25
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Suva Gdh3	Suva_c942_30
	<i>Saccharomyces eubayanus</i>	Seub Gdh3	KOH01335
	<i>Candida glabrata</i>	Cgla Gdh3	CAGL0D00176g
	<i>Kazachstania africana</i>	Kafr Gdh3	KAFR0I00150
	<i>Kazachstania naganishii</i>	Knag Gdh3	KNAG0E04210
	<i>Naumovozyma castellii</i>	Ncas Gdh3	NCAS0A07680
	<i>Naumovozyma dairenensis</i>	Ndai Gdh3	NDAI0H02070
	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	Tpha Gdh3	TPHA0N00160
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	Kpol Gdh1	Kpol_538.50	
<b>ZT</b>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Tdel Gdh	TDEL0H04470
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Zrou Gdh	ZYRO0C00396g
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Zbai Gdh	CDH13190
<b>KLE</b>	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Kthe Gdh	KLTH0D00550g
	<i>Kluyveromyces waltii</i>	Kwal Gdh	Kwal_26.6727
	<i>Lachancea kluyveri</i>	Lklu Gdh1	SAKL0D14982g
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Klac Gdh1	KLLA0F00594g
	<i>Tetrapisispora blattae</i>	Tbla Gdh1	TBLA0F01800
	<i>Candida albicans</i>	Calb Gdh	EAK91047
	<i>Candida tropicalis</i>	Ctro Gdh	EER32364
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Dhan Gdh	CAG86519
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Ylip Gdh	CAG78362
	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Soct Gdh	EPX72089
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spom Gdh	SPCC622.12c.1

# **10. APENDICES**

## APENDICE A)

### **Transformación de levadura con acetato de litio.** (Ito et al., 1983)

Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente para colectar las células.

Lavar las células. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min a temperatura ambiente para colectar las células. Resuspender en 1 mL de agua estéril y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril.

Centrifugar a 14000 rpm por 5 seg y eliminar el sobrenadante. Lavar con 1 mL de TE/LiOAc recién preparado. Resuspender las células en 200  $\mu$ L de TE/LiOAc. Colocar 50  $\mu$ L de células en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. Agregar 10  $\mu$ L de DNA acarreador (DNA de espermatozoos de salmón, previamente sonicado y hervido durante 5 min. Incubar en hielo por 5 min antes de usarlo) y 1  $\mu$ g de producto de PCR o plásmido según sea el caso. Adicionar 300  $\mu$ L de PEG/TE/LiOAc al 45 % recién preparado y mezclar. Incubar a 30 °C, 250 rpm por 30 min.

Someter a choque térmico por 15 min a 42 °C, invirtiendo los tubos cada 3 min.

Preparar tubos falcón con 3 mL de YPD para las que serán transformadas para delección.

Centrifugar las células 14 000 rpm por 30 seg. Eliminar el sobrenadante.

Resuspender el botón celular en 1 mL de YPD y transferir al tubo con 3 mL de YPD en el caso de las células a transformar para delección. En el caso de las células a transformar con plásmido después de eliminar el sobrenadante se resuspende en el volumen necesario para platear en el medio selectivo adecuado. Las células para delección se incuban durante 3 h a 30 °C y 250 rpm.

Pasado el tiempo de incubación colectar las células por centrifugación y resuspender en TE. Sembrar en el medio de selección adecuado. Incubar a 30 °C para obtener colonias aisladas.

## APENDICE B)

### Obtención de DNA genómico de levadura

Colectar las células por centrifugación. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 500  $\mu$ L de agua estéril. Colectar por centrifugación a 14000 rpm por 2 min.

Desechar el sobrenadante y dar vórtex al botón para resuspender.

Adicionar 200  $\mu$ L de solución de Tritón X-100, 200  $\mu$ L de fenol-cloroformo-isoamílico, 0.3 g de perlas de vidrio limpias. Dar vórtex al máximo por 4 min. Adicionar 200  $\mu$ L de TE pH 8.

Centrifugar por 5 min en la microfuga. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio sin tocar las otras dos fases. Adicionar 1 mL de etanol al 100 % frío. Mezclar por inversión 5 o 6 veces.

Centrifugar por 2 min a 14 000 rpm, desechar el sobrenadante.

Resuspender el botón en 400  $\mu$ L de TE y adicionar 3  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 30 min. Adicionar 10  $\mu$ L de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol al 100%. Mezclar por inversión.

Centrifugar por 2 min a 14 000 rpm. Descartar el sobrenadante. Resuspender en TE o agua estéril.

#### Tritón X-100

2% Tritón X-100
1% SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl pH 8
1 mM de EDTA sódico.

## APENDICE C)

### Obtención de RNA total de *S. cerevisiae* (Collart & Oliviero, 2001)

#### SOLUCIÓN TES:

*Tris-HCl 10 mM, pH 7.5*

*EDTA 10 mM, pH 8*

*SDS 0.5%*

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

#### ACETATO DE SODIO 3M, pH 5.3. PM 82.03

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

1. Crecer un cultivo de células en 100 mL del medio deseado.
2. Transferir el cultivo a un tubo de 50 mL y centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min a 4 °C.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1 mL de agua DEPC fría. Transferir a dos tubos de 1.5 mL. Centrifugar 10 seg a 4°C y remover el sobrenadante. *Si se desea, el pastilla puede ser congelado en nitrógeno líquido y almacenarse a -70 °C por algunos meses.*
4. Resuspender el pastilla de células con el líquido remanente en el tubo y adicionar 400 µL de solución TES. Añadir 400 µL de fenol ácido y agitar en vórtex vigorosamente durante 10 seg. Incubar de 30 a 60 min a 65 °C con ocasional agitación en vórtex.
5. Colocar en una mezcla de hielo – agua durante 5 min. Centrifugar durante 5 min a velocidad máxima a 4 °C.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 400 µL de fenol ácido y agitar en vórtex vigorosamente. Repetir el paso 5.

7. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 400  $\mu$ L de cloroformo. Agitar vigorosamente en vórtex y centrifugar 5 min a velocidad máxima a 4 °C.
8. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 1 mL de etanol absoluto frío y precipitar.
9. Centrifugar 5 min a velocidad máxima a 4°C. Lavar la pastilla de RNA con etanol al 70% frío. Centrifugar y decantar. Resuspender la pastilla en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.
10. Cuantificar en Nanodrop y guardar a -70 para evitar su degradación o preparar muestra para cargar en gel de agarosa 1%.

Hervir hasta disolver. Cuando la temperatura haya alcanzado los 70 °C adicionar 6 mL de formaldehído, vaciar el gel y esperar a que gelifique.

#### **Gel para RNA**

Agarosa	1 g
MAE 10X	10 mL
Agua destilada	84 mL

#### **Buffer de la cámara de electroforesis.**

MAE 10X	100 mL
Formaldehído	30 mL
Agua destilada	870 mL

#### **Transferencia.**

El gel se lava con SSC 10X durante 20 min con agitación dos veces.

Preparar la transferencia y dejarla toda la noche.

Terminada la transferencia enjuagar la membrana por 30 seg en SSC 1X y escurrir.

#### **Hibridación.**

Pre-hibridar 1 h a 65 °C en el buffer de hibridación.

### **Buffer de hibridación.**

SDS 10 %	28 mL
Buffer de fosfatos disódico 0.5 M	12 mL
EDTA ph 8 0.5 M	40 µL

Adicionar la sonda marcada, previamente hervida.

Hacer dos lavados, el primero de 5 min y el segundo de 30 min con baja astringencia.

### **Baja Astringencia**

SSC 20X	50 mL
SDS 10 %	5 mL
Agua destilada	445 mL

Después hacer dos lavados, el primero de 5 min y el segundo de 30 min con alta astringencia.

### **Alta Astringencia**

SSC 20X	3.75 mL
SDS 10 %	5 mL
Agua destilada	491.25 mL

Después de los lavados colocar la membrana en plástico y exponer toda la noche.

## APENDICE D)

### Determinación de proteínas por Lowry.

Preparar la curva estándar con albúmina bovina.

<b>Albúmina (1µg/µL stock)</b>	<b>Agua (µL)</b>	<b>ABC (mL) 10 min.</b>	<b>Folin (µL) 30 min</b>	<b>D.O. (625 nm)</b>
0.0	1000	5	500	0.0
40	960	5	500	
80	920	5	500	
120	880	5	500	
160	840	5	500	
200	800	5	500	Aprox. 0.5

Para cada muestra se preparan tres tubos con cantidades crecientes de extracto más agua para obtener un volumen total de 1 mL.

<b>TUBO 1</b>		<b>TUBO 2</b>		<b>TUBO 3</b>		<b>D.O. cultivo</b>
Ext	Agua	Ext	Agua	Ext	Agua	
20	980	40	960	80	920	0.3 0 menos
10	990	20	980	40	960	0.5
5	995	10	990	20	980	1.0 0 mas

A cada tubo se le agregan 5 mL de la solución ABC, vórtex y esperar 10 min.

Se agregan a cada tubo 500 µL de folin diluido 1:1 con agua. Vórtex y esperar 45 min.

Leer la densidad óptica de cada muestra a 625 nm.

La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa fue determinada como se describe previamente (Valenzuela et al., 1998). Una unidad de  $\beta$ -galactosidasa corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de o-nitrofenol producido por minuto por miligramo de proteína ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mgP}^{-1}$ ) La proteína fue medida por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) , con albúmina sérica bovina como estándar.

**SOLUCIÓN ABC (100 mL).**

Solución A	98 mL
Solución B	1 mL
Solución C	1 mL

**SOLUCIÓN A.**

NaOH 0.1 N	4 g/L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 g/L

**SOLUCIÓN B.**

Tartrato de sodio y potasio	2%
-----------------------------	----

**SOLUCIÓN C.**

Sulfato de cobre (cúprico)	1%
----------------------------	----

Las soluciones B y C deben de almacenarse a 4 °C. La solución C además debe de guardarse en obscuridad.

## APENDICE E)

### Preparación de cocteles para medir actividad de NADP-GDH en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*.

SOLUCIÓN	1
$\alpha$ -cetoglutarato 5.6 mM	0.047 g
NH <sub>4</sub> Cl 50 mM	0.134 g
Tris-HCl 0.1 M pH 8.0	5 ml
H <sub>2</sub> O	35 ml

1) Para *S. cerevisiae* y *L. kluyveri*

SOLUCIÓN	2
$\alpha$ -cetoglutarato 5.6 mM	0.047 g
NH <sub>4</sub> Cl 50 mM	0.134 g
Fosfatos 0.1 M pH 8.0	5 ml
H <sub>2</sub> O	35 ml

2) Para *K. lactis*

A esta solución se le ajusta el pH con KOH a 7.2 y posterior a este y se afora a 50 ml.

Después de aforar y ajustar el pH se agrega el NADPH 0.14 mM (0.006 g).

Se preparan tres cocteles:

COCTEL	Completo (M3)	Sin $\alpha$ -KG (M1)	Sin NH <sub>4</sub> Cl (M2)
$\alpha$ -cetoglutarato 5.6 mM	0.047 g	-----	0.047 g
NH <sub>4</sub> Cl 50 mM	0.134 g	0.134 g	-----
*Tris-HCl 0.1 M pH 8.0	5 ml	5 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	35 ml	35 ml	35 ml
**NADPH 0.14 mM	0.006 g	0.006 g	0.06

\*\*Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 50 ml.

\*Cambiar a fosfatos en el caso de *K. lactis*.

Para medir la actividad:

c/muestra= 1 ml de coctel + muestra a 340 nm

A la pendiente obtenida con el coctel completo, se le restan las pendientes sin  $\alpha$ -KG y sin NH<sub>4</sub>Cl.

$$M3 = (M1 + M2) = M_{real}$$

$$AE = (M_{real} / 6.22) (\text{alícuota en ml}) / (\text{mgP/ml})$$

## APENDICE F)

### Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

Preparación del gel separador (22.2 mL para una placa).

	<b>Proteínas citoplasmáticas</b>				<b>Proteínas ribosomales</b>	
	<b>7%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>13%</b>	<b>15%</b>	<b>18%</b>
<b>Sol 1</b>	5.2mL	7.4mL	8.8mL	9.7mL	11mL	13.2mL
<b>Sol 2</b>	11mL	11mL	11mL	11mL	11mL	8.8mL
<b>Agua dest.</b>	5.8mL	3.5mL	2.2mL	1.3mL	-----	-----
<b>TEMED</b>	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
<b>APS 10%</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Preparación del gel concentrador (10 mL para 2 placas):

	<b>1D</b>	<b>2D</b>
<b>Sol 1</b>	1.66 mL	2.5 mL
<b>Sol 3</b>	5 mL	7.5 mL
<b>Agua dest.</b>	3.3 mL	5 mL
<b>TEMED</b>	10 µL	10 µL
<b>APS 10%</b>	100 µl	100 µl

#### **Solución 1**

	100 mL
Archilamida 30%	29.2 g
Bis-acrilamida 0.8%	0.8 g

#### **Solución 2**

	100 mL	200 mL
Tris-HCl pH 8.8	9.075 g	18.15 g
SDS 0.2%	0.2 g	0.4 g

### Solución 3

	100 mL
Tris-HCl pH 6.8	3.03 g
SDS 0.2%	0.2 g

### Buffer de corrida.

	1.5 L	1.5 L (2X)	2.6 L	2.6 L (2X)
Tris-HCl pH 8.3	4.541 g	9.08 g	7.87 g	15.74 g
Glicina	21.4 g	42.8 g	37.1 g	74.2 g
SDS	1.5 g	3 g	3 g	6 g

### Buffer de transferencia.

	2 L
40 mM Tris base	11.6 g
390 mM Glicina	58.5546 g
Metanol 20%	400 mL
SDS 0.0375%	0.75 g
Agua dest	c.b.p.

Determinar el volumen de muestra que se cargará. Hervir la muestra por 1 min.

Correr el gel y transferirlo.

La transferencia se lleva a cabo a 200 mA durante 2 h, sin olvidar mantener en frío la cámara.

## APENDICE G)

### Determinación de metabolitos intracelulares.

1. Poner un precultivo ON en YPD de la cepa a usar.
2. Inocular 400 ml de cultivo a DO=0.5 y esperar a que el cultivo alcance una OD=0.4.
3. Centrifugar 5 min a 3000 rpm
4. Resuspender el pellet en 2 ml de buffer Hepes 0.1M pH 8 en tubo falcon tapado y poner en baño maria (agua hirviendo) 5 min.
5. Pasar a dos microtubos y centrifugar 14000 15 min 4°C
6. Tomar el sobrenadante y MEDIR EL VOLUMEN TOTAL DE EXTRACTO OBTENIDO (\*)
7. Ensayo enzimático:

Extracto                      1952 uL

NH<sub>4</sub>CL 200 mM              20uL

ADP 200 mM                10uL

NADH                        15 uL La concentración de NAHD no la tengo pero la absorbancia debe estar entre 0.8-0.9 creo que es 1 mM

Esperar a que se establezca la absorbancia inicial a 340 nm en celda para UV y anotarla.

GDH                         3uL GDH comercial de sigma cat No. G2626, puede cambiar para que se alcance el plateau más rápido

Arrancar la reacción con GDH y esperar a que se establezca la A final (340 nm). Anotar la diferencia de absorbancias

$(A_i - A_f) / 6.22 \times 2\text{ml} \times 1000 = \text{nmoles de 2OG en la celda}$

Calcular los nanomoles en el volumen total de extracto obtenido (\*) y reportar como nmol/10<sup>8</sup>cells.

La relación entre DO → 10<sup>8</sup>cells cambia de cepa a cepa y de medio a medio. Si no la tienen, hay que establecerla con cámara de Neubauer. Yo usé 1 DO<sub>600 nm</sub> = 18.4 x10<sup>6</sup>cell/ml, usando la BY4741 en medio mínimo glucosa amonio.

El extracto que sobre lo usaremos para medir glutámico en la trampa de iones. Porfa manténganlo en congelación

## APENDICE H)

### Determinación de metabolitos intracelulares.

1. Poner un precultivo ON en YPD de la cepa a usar.
2. Inocular 400 ml de cultivo a  $DO=0.5$  y esperar a que el cultivo alcance una  $OD=0.4$ .
3. Centrifugar 5 min a 3000 rpm
4. Resuspender el pellet en 2 ml de buffer Hepes 0.1M pH 8 en tubo falcon tapado y poner en baño maria (agua hirviendo) 5 min.
5. Pasar a dos microtubos y centrifugar 14000 15 min  $4^{\circ}C$
6. Tomar el sobrenadante y MEDIR EL VOLUMEN TOTAL DE EXTRACTO OBTENIDO
7. Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm
8. Tomar 500 ul de sobrenadante y colocarlos en un tubo ependorf nuevo
9. Agregar 200 ul de ácido perclórico ( $HClO_4$ ) al 71% para precipitar proteínas que aún pudieran estar en disolución
10. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos
11. Neutralizar el  $HClO_4$  agregando 150 ul de KOH a saturación y monitorear el pH con banditas, mantener las muestras en hielo, ya que la reacción es altamente exotérmica
12. Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm
13. Tomar el sobrenadante y desechar el precipitado (Sales de  $KClO_4$ )
14. Guardara  $-20^{\circ}C$  para su análisis por HPLC.

# **11. BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Alba-Lois, L., Segal, C., Rodarte, B., Valdes-Lopez, V., DeLuna, A., and Cardenas, R. (2004) NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol* **48**: 68-72.
- Avendano, A., Deluna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and Gonzalez, A. (1997) GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 5594-5597.
- Avendano, A., Riego, L., DeLuna, A., Aranda, C., Romero, G., Ishida, C., *et al.* (2005) Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of GDH3, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **57**: 291-305.
- Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I.I., *et al.* (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 771-780.
- Broach JR, (2012) Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*. 192(1):73-105.
- Byrne, K. P. & Wolfe, K. H. (2005). The Yeast Gene Order Browser: Combining Curated Homology and Syntenic Context Reveals Gene Fate in Polyploid Species. *Genome Res* **15**, 1456–1461.
- Carey, B. W., Finley, S. L. W., Cross, R. J., Allis, D. C., and Thompson, B. C. (2015) Intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **518**: 413-416.
- Chin, M. R., Fu, X., Pai, Y. M., Vergnes, L., Hwang H., Deng, G., *et al.* (2014) The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* **510 (7505)**: 397-401.

- Chung WY, Albert R, Albert I, Nekrutenko A and Makova KD. (2006) Rapid and asymmetric divergence of duplicate genes in the human gene coexpression network. *BMC Bioinformatics* 7:46.
- Colon, M., Hernandez, F., Lopez, K., Quezada, H., Gonzalez, J., Lopez, 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.
- Cooper, TG. (2004). Nutrient-induced responses in eukaryotic cells. Vol. 7, pp. 225–257, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg.
- Conrad B and Stylianou EA, (2007) Gene Duplication: A Drive for Phenotypic Diversity and Cause of Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8:17–35
- Cornish-Bowden, A. (2014) Understanding allosteric and cooperative interactions in enzymes. *Febs j* 281: 621-632.
- Choudhury, R., and Punekar, N. S. (2009) *Aspergillus terreus* NADP-glutamate dehydrogenase is kinetically distinct from the allosteric enzyme of other *Aspergilli*. *Mycol Res* 113: 1121-1126.
- Cueto-Rojas, H. F., Maleki Seifar, R., Ten Pierick, A., Heijnen, S. J., and Wahl, A. (2016) Accurate measurement of the in vivo ammonium concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites* 6: 12.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Mean of Natural Selection or the Preservation of Favored Races in the Struggle for Life*. Murray. London.
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276: 43775-43783.
- Doherty, D. (1970) L-glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods in Enzymology* 17: 850-856.
- Dujon, B. 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends. Genet.* 7: 263-270.

- Fares M, Keane O, Toft C, Carretero-Paulet L and Jones GW, (2010) The Roles of Whole-Genome and Small-Scale Duplications in the Functional Specialization of *Saccharomyces cerevisiae* Genes. *PLOS Gen.* 9(1) e1003176.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol* **39**:783-791.
- Fincham, J. R. (1951) The occurrence of glutamic dehydrogenase in *Neurospora* and its apparent absence in certain mutant strains. *J Gen Microbiol* **5**: 793-806.
- Force A., Lynch M., Pickett B., Amores A. Yan Y. y Postlethwait J. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics Society of America.* **151**: 1531–1545.
- Gancedo, J. M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-361.
- Goldstein AL, McCusker JH (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15(14)**:1541-53.
- Gu X, Zhang Z and Huang W. (2005) Rapid evolution of expression and regulatory divergences after yeast gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:707–12.
- Guillamon, J. M., van Riel, N. A., Giuseppin, M. L., and Verrrips, C. T. (2001) The glutamate synthase (GOGAT) of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in central nitrogen metabolism. *FEMS Yeast Res* **1**: 169-175.
- Hagman, A., Säll, T. and Piskur, J. (2014) Analysis of the yeast short-term Cabtree effect and its irigin. *FEBS Journal* **281**: 4805-4814.
- Hans, M.A., Heinzle, E., and Wittmann, C. (2003) Free intracellular amino acid pools during autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **82**: 143-151.
- Holmes, A. R., Collings, A., Farnden, K. J., and Shepherd, M. G. (1989) Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *J Gen Microbiol* **135**: 1423-1430.

- Infante, J.J., Glynn, L., and Elton Y. (2011). Chromatin Remodeling and Protocols. *Methods in Mol Biol.* **833**: 63-87.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Kafri, R., Levy, M., and Pilpel, Y. (2006). The regulatory utilization of genetic redundancy through responsive backup circuits. *proc Natl Acad Sci USA.* **103**:11653-51168.
- Kellis M, Birren B and Lander ES, (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428 617-624.
- Kersey, J. P., Allen, E. J., Armean, I., Boddu, S., Bolt, J. B., Carvalho-Silva, D., and *et al.* (2016) Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucl Acid Res* **44** (D1): D574-D580.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1988) Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**: 2683-2686.
- Lee, Y. J., Kim, K. J., Kang, H. Y., Kim, H. R., and Maeng, P. J. (2012) Involvement of GDH3-encoded NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase in yeast cell resistance to stress-induced apoptosis in stationary phase cells. *J Biol Chem* **287**: 44221-44233.
- Levasseur A. & P. Pontarotti. 2011. The role of duplications in the evolution of genomes highlights the need for evolutionary based approaches in comparative genomics. *Biology Direct.* 6:11.
- López, G., Flores, M., Duhne, M., Sánchez, J. and Manjarrez, A. (2011). En Mensaje Bioquímico, UNAM. México D.F. Vol. XXXV. 27-38
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Macheda, M. L., Hynes, M. J., and Davis, M. A. (1999) The *Aspergillus nidulans* *gltA* gene encoding glutamate synthase is required for ammonium

- assimilation in the absence of NADP-glutamate dehydrogenase. *Curr Genet* **34**: 467-471.
- Magasanik, B. (2003) Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2**: 827-829. Magasanik B.2005. The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*.102: 16537–16538
- Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2015) Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *Plos Biology* **13(8)**: 1-26.
- Mell Chang Joshua y M Burgess Sean. 2002. Yeast as a Model Genetic Organism. *Nature*. 1-8.
- Miller, S.M., and Magasanik, B. (1990) Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**: 4927-4935.
- Moller, K., Christensen, B., Forster, J., Piskur, J., Nielsen, J., and Olsson, L. (2002) Aerobic glucose metabolism of *Saccharomyces kluyveri*: growth, metabolite production, and quantification of metabolic fluxes. *Biotechnol Bioeng* **77**: 186-193.
- Moller, K., Olsson, L., and Piskur, J. (2001) Ability for anaerobic growth is not sufficient for development of the petite phenotype in *Saccharomyces kluyveri*. *J Bacteriol* **183**: 2485-2489.
- Müller, HJ.(1935). The origination of chromatin deficiencies as minute deletionssubjet to insertionelsewhere. *Genetica*.**17**: 237-252.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. pp. 352.
- Noor, S., and Punekar, N. S. (2005) Allosteric NADP-glutamate dehydrogenase from aspergilli: purification, characterization and implications for metabolic regulation at the carbon-nitrogen interface. *Microbiology* **151**: 1409-1419.

- Ohno S (1970) Evolution by Gene duplication; Olson KA, editor. Berlin: Springer-Verlag.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., and Smits, G. J. (2009) In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**: 268-278.
- Pfeiffer, T., and Morley, A. (2014) An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci* **1**: 17.
- Perysinakis, A., Kinghorn, J. R., and Drainas, C. (1994) Biochemical and genetical studies of NADP-specific glutamate dehydrogenase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* **26**: 315-320.
- Piskur J, (2001) Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* 17(6):302.
- Piskur, J. Rozpedowska E., Polakova S., Merico A. y Compagno C.. 2006. How did Saccharomyces evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics.* 22: 183-186.
- 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**:579-590.
- Riego L, Avendaño A, DeLuna A, Rodríguez E and González A. (2002) GDH1 expression is regulated by GLN3, GCN4, and HAP4 under respiratory growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 79–85
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 1.1-7.87.
- Saitou N., and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Seoighe, C., and Wolfe, K. H. (1999) Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* **238**: 253-261.

- Sherman F., 1998. An introduction to genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Genetics*. 6:302-325.
- Struhl, K., Davis, RW. (1981). Transcription of the *HIS3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*. **152**:535-552.
- Su, X. B., and Pillus, L. (2016) Functions for diverse metabolic activities in heterochromatin. *PNAS* E1526-E1535.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., and Kumar, S. (2013) *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–2729.
- Tang, Y., Sieg, A., and Trotter, P. J. (2011) (1)(3)C-metabolic enrichment of glutamate in glutamate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Res* **166**: 521-530.
- Valenzuela, L., Guzman-Leon, S., Coria, R., Ramirez, J., Aranda, C., and Gonzalez, A. (1995) A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the petit-negative yeast *Kluyveromyces lactis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis. *Microbiology* **141 ( Pt 10)**: 2443-2447.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, O., and Philippsen, P. (1997). Three new dominant drug resistant cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **13**:1065-1075.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Woese, RC. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol Rev*. **51**:221-271.
- Wolfe, K. H., and Shields, D. C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution*. 18 292:298.
- Zhang, J., ten Pierick, A., van Rossum, H. M., Seifar, R. M., Ras, C., Daran, J. M., Heijnen, J. J., and Wahl, S. A. (2015) Determination of the cytosolic

NADPH/NADP ratio in *Saccharomyces cerevisiae* using shikimate dehydrogenase as sensor reaction. *Sci Rep* **5**: 12846.

Zuckerandl, E. and Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *JTheorBiol.* **8**:357-366.