



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA DIVERGENCIA FUNCIONAL DE *ALT1* Y *ALT2* DE
Saccharomyces cerevisiae A PARTIR DE LOS GENES TIPO
ANCESTRAL *LkALT1* y *KlALT1* de *Lachancea kluyveri* y
Kluyveromyces lactis

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Biol. XIMENA MARTÍNEZ DE LA ESCALERA FANJUL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**Dra. Ma. Alicia González
Manjarrez**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Juan Pablo Pardo Vázquez

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Luis Servín González

Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, JUNIO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Dra. 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. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina-UNAM
Dr. Luis Servín González	I. de Investigaciones Biomédicas-UNAM

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México), con el donativo número: CB-2014-239492-B (<http://www.conacyt.gob.mx/>); Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo número: IN201015 (<http://dgapa.unam.mx>); por el International Center for Genetic Engineering and Biotechnology con el donativo: NoCRP/MEX10-03

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por le CONACyT con un número de becario: 420248.

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.

Este trabajo esta dedicado al Dr. Armando Gómez Puyou, del Instituto de Fisiología Celular- UNAM, por todas sus enseñanzas y su dedicación a la ciencia.

ÍNDICE

CONTENIDO

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Posible Destino de los Genes Duplicados	14
1.2 <i>S. cerevisiae</i> Proviene de la Hibridación Entre Dos Levaduras	16
1.3 Las Transaminasas de Alanina	21
1.4 El Metabolismo de Alanina en <i>S. cerevisiae</i>	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGÍA	26
4.1 Cepas Utilizadas	26
4.2 Condiciones de cultivo	27
4.3 Construcción de Mutantes Nulas	27
4.4 Construcción de Plásmidos	29
4.5 Extracción de Aminoácidos	30
4.6 Extracción y Cuantificación de Proteína de Levadura	30
4.7 Determinación de Actividad de Transaminasa de Alanina	30
4.8 Construcción de Plásmidos y Expresión Heteróloga de Proteínas	31
4.9 Extracción y Cuantificación de la Proteína Sintetizada en <i>E. coli</i>	32
4.10 Purificación de Proteínas Expresadas Heterológamente	32
4.11 Caracterización Cinética	32
4.12 Extracción de RNA Total e Hibridación tipo Northern blot	33
4.13 Análisis de posicionamiento de nucleosomas	33
5. RESULTADOS	35

CONTENIDO

5.1	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	35
5.1.1	Velocidad de Crecimiento: Cepas Silvestres y Mutantes Nulas	35
5.1.2	Contribución a la Poza de Alanina: Cepas Silvestres y Mutantes Nulas	37
5.1.3	Velocidad de Crecimiento: Cepas Complementadas	38
5.1.4	Contribución a la Poza de Alanina: Cepas Complementadas	40
5.1.5	Actividad Específica de Transaminasa de Alanina: Cepas Silvestres y Mutantes Nulas	42
5.1.6	Actividad Específica de Transaminasa de Alanina: Cepas Complementadas	44
5.2	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	47
5.2.1	Forma Oligomérica y Sensibilidad a pH	47
5.2.2	Caracterización Cinética	50
5.3	REGULACION TRANSCRIPCIONAL	51
5.3.1	Perfil de Expresión	51
5.3.2	Análisis de la Organización de los Promotores (Nusa)	53
6.	DISCUSIÓN	55
6.1	UN ACERCAMIENTO A LA EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO DE ALANINA	55
6.2	LA HISTORIA EVOLUTIVA DE <i>ScALT2</i>	57
6.3	EL PAPEL DE LOS GENES DUPLICADOS	58
7.	ANEXOS	
Anexo 1	Oligonucleótidos Utilizados en Este Trabajo	60
Anexo 2	Oligonucleótidos Utilizados Para Ensayo de NuSA Sobre Promotor de <i>LkALT1</i>	63
Anexo 3	Oligonucleótidos Utilizados Para Ensayo de NuSA Sobre Promotor de <i>KlALT1</i>	64
Anexo 4	Mapa del Plásmido pRS416	67
Anexo 5	Mapa del Plásmido YEpKD352	68

CONTENIDO

Anexo 6 Mapa del Plásmido pFA6A	69
Anexo 7 Mapa del Plásmido pET28(a+)	70
Anexo 8 Secuencia del gen <i>LkALT1</i>	71
Anexo 9 Secuencia del gen <i>KlALT1</i>	72
Anexo 10 Contexto sintético de <i>ScALT1</i> y <i>ScALT2</i>	73
8. APÉNDICES	74
Apéndice A. Método de Electroporación Para Levaduras	74
Apéndice B. Obtención de DNA Genómico de Levadura	76
Apéndice C. Extracción de Aminoácidos de Levadura	77
Apéndice D. Determinación de Actividad de Transaminasa de Alanina	79
Apéndice E. Determinación de Proteínas por Lowry	84
Apéndice F. Inducción y purificación de proteínas heterólogas	86
Apéndice G. Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE	88
Apéndice H. Obtención de RNA total de <i>S. cerevisiae</i>	91
10. GLOSARIO	94
9. BIBLIOGRAFÍA	95

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Cepas de <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> , and <i>K. lactis</i> utilizadas en este trabajo	26
Tabla 2	Actividad específica de transaminasa de alanina en extractos obtenidos a partir de medios con glucosa- amonio o glucosa-alanina	44
Tabla 3	Parámetros cinéticos de <i>L. kluyveri</i> <i>LkAlt1</i> y <i>K. lactis</i> <i>KlAlt1</i> .	51
Figura 1	Posible destino de los genes duplicados Origen del linaje de <i>Saccharomyces</i> y <i>Kluyveromyces</i>	15
Figura 2	Origen del linaje de <i>Saccharomyces</i> y <i>Kluyveromyces</i> Ejemplo de árbol filogenético que soporta el escenario de la hibridación	17
Figura 3	Ejemplo de árbol filogenético que soporta el escenario de la hibridación	18
Figura 4	Posibles escenarios que pudieron dar origen al híbrido	19
Figura 5	Relación evolutiva de las <i>ALTs</i> de levaduras	20
Figura 6	Mecanismo de reacción de las transaminases de alanina Modelo que representa las vías implicadas en el metabolismo de alanina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
Figura 7	Modelo que representa las vías implicadas en el metabolismo de alanina en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Figura 8	<i>ScALT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> , <i>LkALT1</i> de <i>L. kluyveri</i> y <i>KlALT1</i> de <i>K. lactis</i> están implicados en el catabolismo de la alanina.	36
Figura 9	<i>ScALT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> , <i>LkALT1</i> de <i>L. kluyveri</i> y <i>KlALT1</i> de <i>K. lactis</i> están implicados en la biosíntesis de alanina.	38
Figura 10	<i>ScALT1</i> , <i>LkALT1</i> y <i>KlALT1</i> pueden sustituirse entre sí bajo condiciones catabólicas	39

Figura 11	Ensayo de complementación recíproca bajo condiciones biosintéticas.	41
Figura 12	Actividad específica de alanina transaminasa en extractos preparados a partir de cepas complementadas	46
Figura 13	Inducción y purificación de <i>LkAlt1</i> y <i>KlAlt1</i> .	48
Figura 14	pH óptimo de <i>LkAt1</i> y <i>KlAlt1</i> .	49
Figura 15	<i>LkAlt1</i> y <i>KlAlt1</i> son alanina transaminasas con un mecanismo de reacción ping pong.	50
Figura 16	Perfil de expresión y posicionamiento de nucleosomas de <i>LkALT1</i> y <i>KlALT1</i> .	52

ABREVIATURAS

α-Kg	α -cetoglutarato
Ala	Alanina
bd	bidestilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico.
DEPC	Dietilpirocarbonato
G418	Geneticina
Glu	Glutámico
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
KDa	Kilo Daltones
<i>KIALTI</i>	Gen que codifica a una transaminasa de alanina de <i>K. lactis</i>
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>KIALTI</i>	gen que codifica a una transaminasa de alanina de <i>L. kluyveri</i>
<i>L. Kluyveri</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>
M	Molar
MM	Medio mínimo
MAE	Amortiguador MOPS+ Acetato de sodio + EDTA
min	Minutos
mM	Mili molar
μM	Micro molar

NADP	Nicotinamina Adenina Dinucleotido Fosfato
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleotido Fosfato reducido
NG	No crece
NH₄	Sulfato de amonio
NuSA	Ensayo de Posicionamiento de nucleosomas
DO	Densidad Óptica
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>).
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).
PEG	Polietilenglicol.
PLP	Piridoxal 5' fosfato
PMP	Piridoxamina 5' fosfato
rpm	Revoluciones por minuto
<i>ScALT1</i>	gen que codifica a la transaminasa de alanina de <i>S. cerevisiae</i>
<i>ScALT2</i>	gen que codifica para la proteína <i>ALT2</i> de <i>S. cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Desviación estándar
seg	Segundos
TE	Tris pH 8 + EDTA
TES	Solución con Tris-HCl, EDTA y SDS
UTR	Secuencias no transcritas de un gen
WGD	Duplicación de todo el genoma (<i>Whole Genome Duplication</i>).
YPD	Medio rico (extracto de levadura, peptona de caseína y dextrosa)

- Δ Símbolo que hace referencia a una deleción
- :: Símbolo que hace referencia a una inserción

RESUMEN

La duplicación génica es uno de los principales mecanismos evolutivos, ya que proporciona la materia prima para la aparición de genes con funciones nuevas o especializadas. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se originó después de un evento de aloploidización, en el cual dos especies diferentes de levaduras ancestrales se aparearon. Las proteínas codificadas por *ScALT1* y *ScALT2* presentan un 65% de identidad y se ha propuesto que constituyen una pareja de genes parálogos que codifican para transaminasas de alanina. Un previo análisis de su función fisiológica demostró que mientras *ScALT1* codifica para una transaminasa de alanina, que constituye la vía principal de biosíntesis de alanina y la única vía para el catabolismo de este aminoácido, la proteína *ScAlt2* no muestra actividad de transaminasa de alanina y no está implicada en el metabolismo de este aminoácido. Además, estudios filogenéticos han sugerido que *ScALT1* y *ScALT2* provienen de cada una de las dos especies parentales que dieron origen al híbrido ancestral. Con el fin de comprender mejor la historia evolutiva de *ScALT1* y *ScALT2* el presente trabajo se ha dirigido al estudio de las propiedades de dos transaminasas de alanina, consideradas como tipo ancestral, *LkALT1* y *KlALT1*, presentes en *Lacchancea kluyveri* y en *Kluyveromyces lactis*, respectivamente. Estas especies tipo ancestral fueron elegidas ya que albergan genes *ALT1* que están relacionados con *ScALT1* y *ScALT2*. Los resultados presentados muestran que, aunque *LkALT1* y *KlALT1* son los genes ortólogos de *ScALT1* y que codifican para transaminasas de alanina, en ambas levaduras se observa una actividad de transaminasa de alanina independiente de *LkAlt1* y *KlAlt1*, al igual que la existencia de rutas adicionales de biosíntesis y catabolismo de alanina. Además, el análisis fenotípico de las mutantes nulas demostró que *KlAlt1* y *LkAlt1* tienen un papel adicional, no relacionado con el metabolismo de alanina, pero que es necesario para lograr una tasa de crecimiento tipo silvestre. Este estudio demuestra que la función ancestral de transaminasa de alanina ha sido retenida por la enzima codificada por *ScALT1*, en la cual el carácter catabólico se ha especializado y se ha perdido la función independiente del metabolismo de alanina que se observa en las enzimas tipo ancestral. El hecho de que *ScAlt2* conserva 64% de identidad con *LkAlt1* y 66% con *KlAlt1*, sugiere que *ScAlt2* diversificó después de la formación del híbrido. La diversificación funcional de *ScALT2* dio como resultado la pérdida tanto de la actividad de transaminasa de alanina como de la función independiente del metabolismo de alanina presente en *LkAlt1* y *KlAlt1*, puesto que *ScALT2* no complementó el fenotipo de la mutante *Lkalt1Δ*. Se puede concluir que el papel funcional de *LkALT1* y *KlALT1* como transaminasas de alanina fue delegado a *ScALT1*, mientras que *ScALT2* perdió este papel durante la diversificación que experimentó.

ABSTRACT

Gene duplication is one of the major evolutionary mechanisms providing raw material for the generation of genes with new or modified functions. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, originated after an allopolyploidization event, which involved mating between two different ancestral yeast species. *ScALT1* and *ScALT2* codify proteins with 65% identity, which were proposed to be paralogous alanine transaminases. Further analysis of their physiological role showed that while *ScALT1* encodes an alanine transaminase, which constitutes the main pathway for alanine biosynthesis and the sole pathway for alanine catabolism, *ScAlt2* does not display alanine transaminase activity and is not involved in alanine metabolism. Moreover, phylogenetic studies have suggested that *ScALT1* and *ScALT2* come from each one of the two parental strains which gave rise to the ancestral hybrid. The present work has been aimed to the understanding of the properties of the ancestral type *Lacchancea kluyveri* *LkALT1* and *Kluyveromyces lactis* *KIALTI*, alanine transaminases in order to better understand the *ScALT1* and *ScALT2* evolutionary history. These ancestral -type species were chosen since they harbor *ALT1* genes, which are phylogenetically related to *ScALT2*. Presented results show that, although *LkALT1* and *KIALTI* constitute *ScALT1* orthologous genes, encoding alanine transaminases, both yeasts display *LkAlt1* and *KlAlt1* independent alanine transaminase activity and additional unidentified alanine biosynthetic and catabolic pathway(s). Furthermore, phenotypic analysis of null mutants uncovered the fact that *KlAlt1* and *LkAlt1* have an additional role, not related to alanine metabolism but necessary to achieve wild type growth rate. Our study shows that the ancestral alanine transaminase function has been retained by the *ScALT1* encoded enzyme, which has specialized its catabolic character, while losing the alanine independent role observed in the ancestral type enzymes. The fact that *ScAlt2* conserves 64% identity with *LkAlt1* and 66% with *KlAlt1*, suggests that *ScAlt2* diversified after the ancestral hybrid was formed. *ScALT2* functional diversification resulted in loss of both alanine transaminase activity and the additional alanine-independent *LkAlt1* function, since *ScALT2* did not complement the *Lkalt1Δ* phenotype. It can be concluded that *LkALT1* and *KIALTI* functional role as alanine transaminases was delegated to *ScALT1*, while *ScALT2* lost this role during diversification.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 POSIBLE DESTINO DE LOS GENES DUPLICADOS

La duplicación génica desempeña un papel central en la evolución, debido a que en algunos casos puede robustecer genéticamente a un organismo o, en otros, proporcionar el material para la aparición de nuevas funciones o la especialización de las funciones preexistentes (Piskur, 2001). Se han propuesto distintos modelos para explicar el posible destino de los genes duplicados (Figura 1).

El modelo de aumento por dosis génica (*gene-dosage amplification*) postula que después de que un gen se duplica éste no experimenta una diversificación funcional, debido a que el aumento en la dosis génica representa una ventaja selectiva (Kondrashov *et al.*, 2002; Kondrashov and Kondrashov, 2006; Tang and Amon, 2013). Un ejemplo de la conservación de duplicados por el aumento de la dosis génica son las proteínas ribosomales. Por el contrario, se han desarrollado tres modelos en donde se considera que después de la duplicación ocurre una diversificación funcional. El modelo de pérdida de función o pseudogenización (*loss of function*) sostiene que, como resultado de la acumulación de mutaciones de pérdida de función, una de las copias se pierde convirtiéndose en un pseudogen (Conrad and Antonarakis, 2007), un ejemplo de esto se encontró en la pareja de genes *GAL1-GAL3* en donde el carácter dual del gen ancestral se distribuyó después de la duplicación en dos copias dando lugar a *GAL3* cuyo producto perdió completamente las propiedades enzimáticas mientras que *GAL1* conservó el papel de galactocinasa (Hittinger y Carroll, 2007). Alternativamente, el modelo de neofuncionalización (*neofunctionalization*) considera que una de las copias retiene la función ancestral, mientras que la otra copia adquiere una nueva función adaptativa, gracias a la acumulación de mutaciones neutrales (Ohno, 1970), como es el caso que se observa en la pareja de parálogos *ADH1* y *ADH2* en *S. cerevisiae*, en donde *Adh1* conserva las propiedades ancestrales tanto el patrón de expresión como las propiedades cinéticas que le permiten producir etanol mientras que *Adh2* adquirió nuevas propiedades que le permiten usar como sustrato el etanol para producir

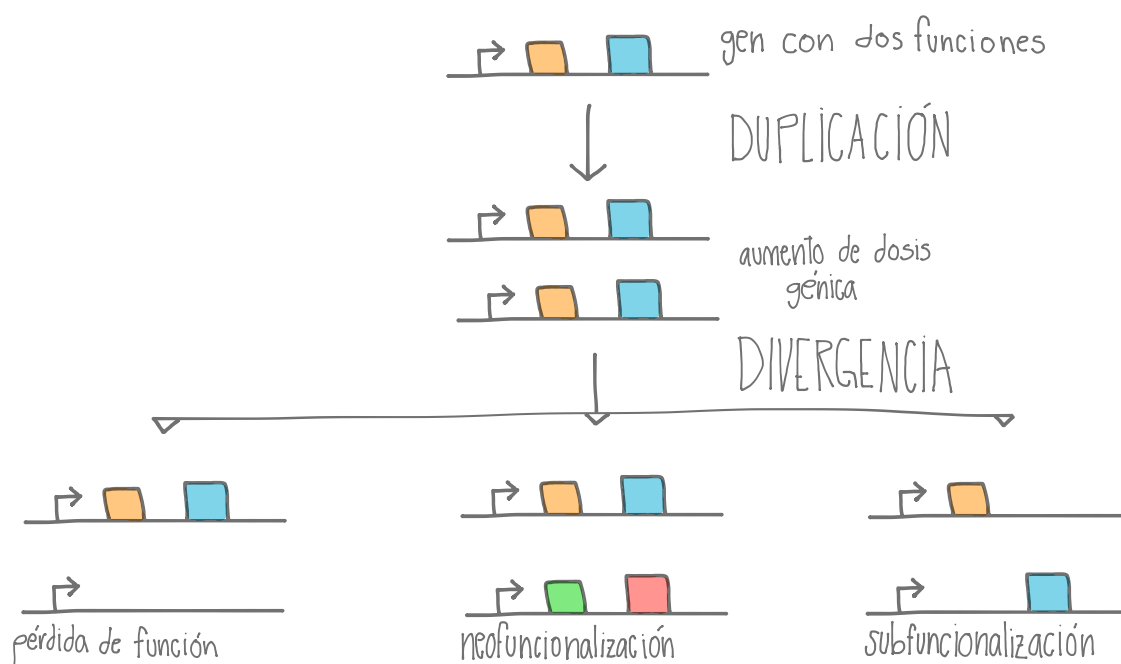


Figura 1. Posible destino de los genes duplicados. Esquema sobre el posible destino que pueden tener los genes duplicados, donde a partir de un gen ancestral, se da una duplicación que puede representar una ventaja adaptativa. Con el paso del tiempo puede haber divergencia entre las dos copias generadas. Una de las copias puede perderse, una de las dos copias puede adquirir una nueva función, o ambas copias pueden subespecializarse.

acetaldehído (Piskur *et al.*, 2006). Finalmente el modelo de subfuncionalización (*subfunctionalization*) propone que como consecuencia de la acumulación de mutaciones degenerativas la función ancestral se divide o se especializa entre las dos copias, por lo que ahora las dos copias son necesarias para llevar a cabo la función ancestral (Hughes, 1994; Innan and Kondrashov, 2010; Sikosek *et al.*, 2012; Espinosa-Cantú *et al.*, 2015), dos ejemplos en donde la retención de los genes se dio mediante la subfuncionalización son los que codifican a las NADP⁺ glutamato deshidrogenasas (*GDH1-GDH3*), y las homocitrato sintasas (*LYS20-LYS21*). En ambos casos, la subfuncionalización dio como resultado la especialización bioquímica de las enzimas codificadas que condujeron a la utilización equilibrada de un α -cetoácido durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables propiciando la adquisición de metabolismo facultativo (de Luna *et al.*, 2001 y Quezada *et al.*, 2008).

Estos modelos muchas veces se encuentran combinados entre sí, mientras que ciertas propiedades ancestrales pueden subfuncionalizar otras pueden perderse o aparecer (subpseudofuncionalización o neosubfincionalización) en una de las copias, por lo que el trabajo experimental detallado resulta valioso, así como la flexibilidad entre estas categorías, y en todos los casos es muy importante el estudio de la función de los genes o proteínas ancestrales para poder esclarecer que modelo(s) explica mejor la historia evolutiva de la pareja de parálogos que se estudia.

1.2 *S. cerevisiae* PROVIENE DE LA HIBRIDACIÓN ENTRE DOS LEVADURAS

Durante muchos años se aceptó que *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se originó a partir de una duplicación de todo el genoma, gracias al análisis de su secuencia genómica, se identificaron 55 bloques de genes duplicados. Cada pareja de genes duplicados, en su respectivo bloque, mantenía la misma posición y orientación respecto al centrómero (Figura 2). En estos bloques se encontró representado el 16% de los genes de *S. cerevisiae*. (Keogh *et al.*, 1998; Wolfe y Shields, 1997; Kellis *et al.*, 2004).

Estudios posteriores demostraron que esta duplicación de todo el genoma ocurrió justo antes de la separación de *Vanderwaltozyma polyspora* del linaje de *S. cerevisiae* (Scannell *et al.*, 2007), por lo que se observan bloques de genes duplicados en los géneros de *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovia*, *Nakaseomyces* y *Tetrapisispora*. Estas levaduras se han denominado post-duplicación de todo el genoma (post-WGD). Por el contrario las levaduras que divergieron antes de la duplicación de todo el genoma (pre-WGD), no presentan estos bloques de genes duplicados, y aun mas, al superponer dos bloques duplicados hermanos de una levadura post-WGD es posible reconstituir la única región ortóloga presente en una levadura pre-WGD.

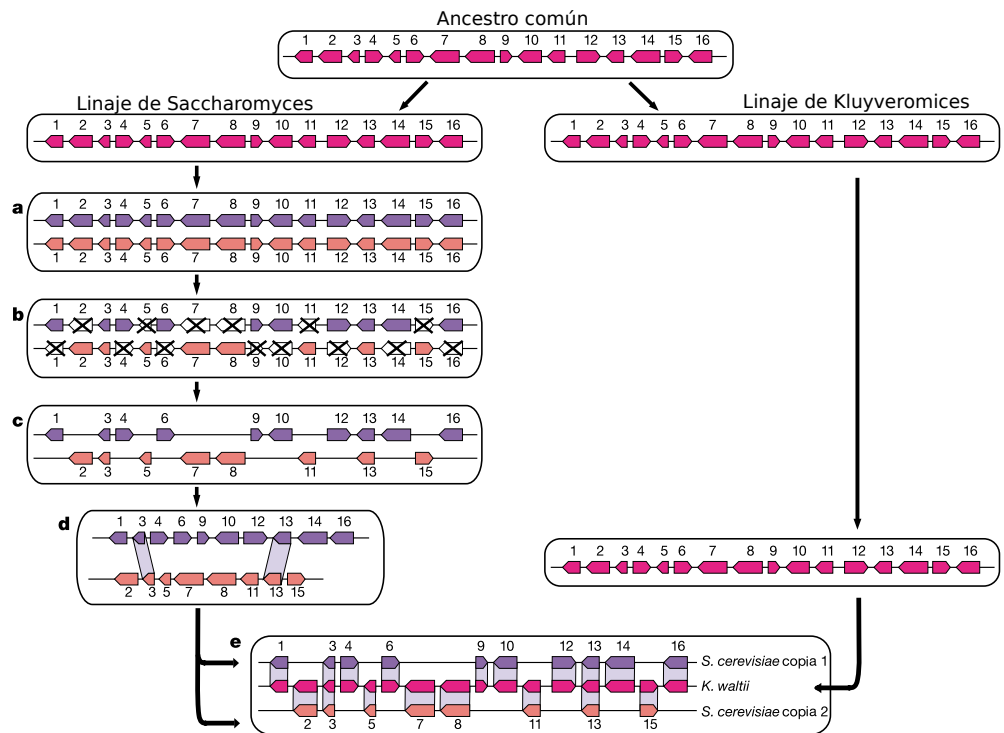


Figura 2. Origen del linaje de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. El linaje de *Saccharomyces* experimentó una duplicación total de genoma, y con el paso del tiempo hubo una retención selectiva de algunos genes duplicados que hoy se encuentran en bloques de genes duplicados en donde mantienen la sintenia (Kellis *et al.*, 2004).

Sin embargo, cuando se caracterizaron las relaciones filogenéticas de todos los genes parálogos presentes en los bloques provenientes de la duplicación de todo el genoma, no solo de *S. cerevisiae*, sino también en algunas especies post-WGD, se encontraron tres principales topologías de parentesco. La primera en donde ambos parálogos presentaron relaciones más cercanas con el clado de *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulaspora delbrueckii* (ZT); la segunda en donde ambas copias se encontraron relacionadas con el clado de *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium* (KLE), y finalmente, en la tercera topología se encontró que uno de los parálogos era filogenéticamente más cercano al clado KLE, mientras que la otra copia estaba relacionada con el clado ZT (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015). Esta evidencia indica que el linaje de *S. cerevisiae* se originó a partir de la formación de un híbrido entre dos especies diferentes, una cercana al clado KLE y otra relacionada con el clado ZT (Figura 3).

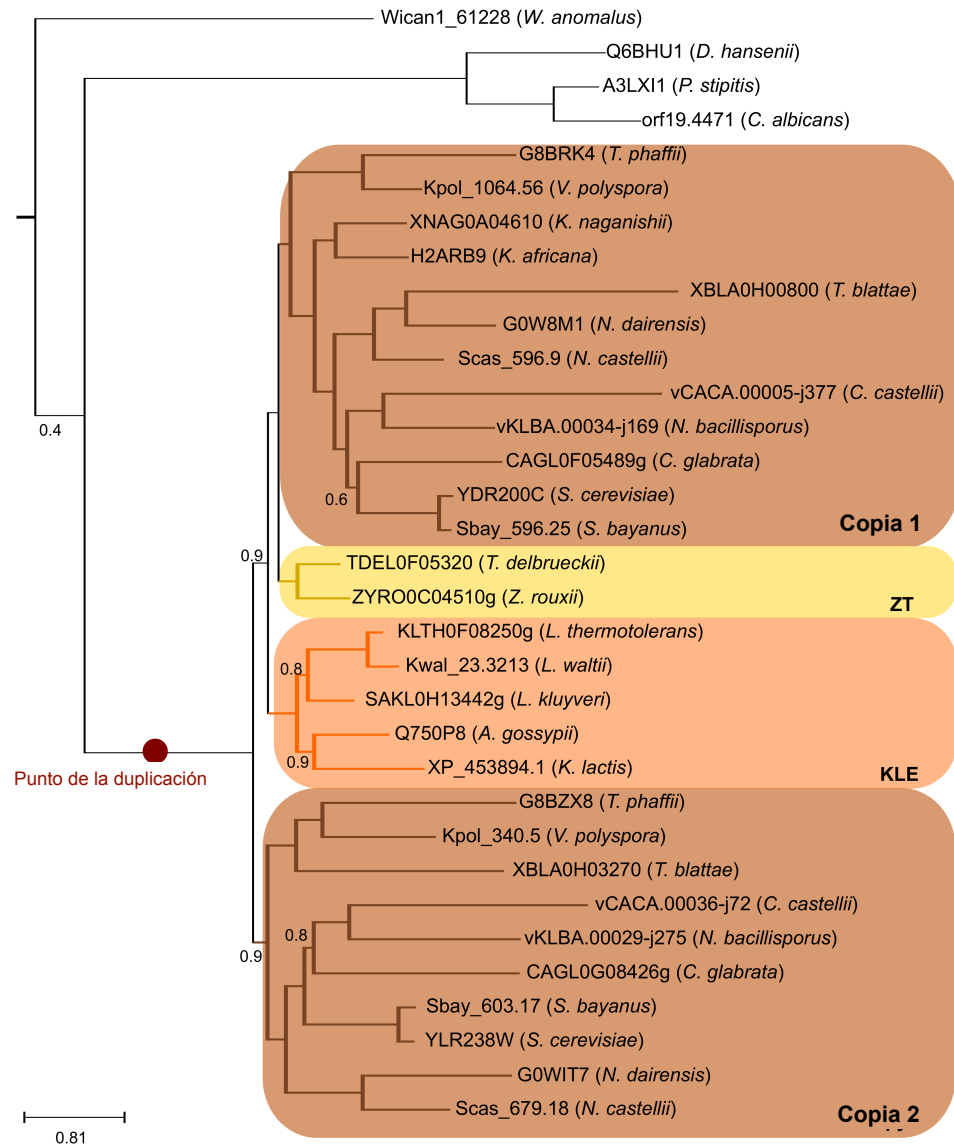


Figura 3. Ejemplo de árbol filogenético que soporta el escenario de la hibridación. Ejemplo de un árbol filogenético en donde las dos copias de un gen fueron retenidas después de la formación del híbrido. Una copia es filogenéticamente más cercana al clado *KLE*, mientras que la otra copia está relacionada con el clado *ZT* (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015)

A pesar de que sigue siendo una pregunta abierta si el híbrido fue el resultado de la fusión de dos células diploides o de dos células haploides que después experimentaron una duplicación de todo el genoma, ambos escenarios resultan en la formación de una levadura alotetraploide, con dos copias de cada gen cuando se encuentra en estado haploide y con cuatro copias en estado diploide (Figura 3). Después de la formación del alotetraploide, la recombinación intergénica, la conversión génica, la pérdida diferencial

de genes y la presión de selección, moldearon el genoma de *S. cerevisiae* hasta el que observamos hoy en día, un alotetraploide degenerado con bloques de genes duplicados (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015). Por lo tanto, los genes parálogos que se observan en el genoma de *S. cerevisiae* pueden venir de solo una de las especies involucradas en la formación del híbrido, o cada copia tener su origen en cada una de las especies parentales que formaron el híbrido (Figura 4).

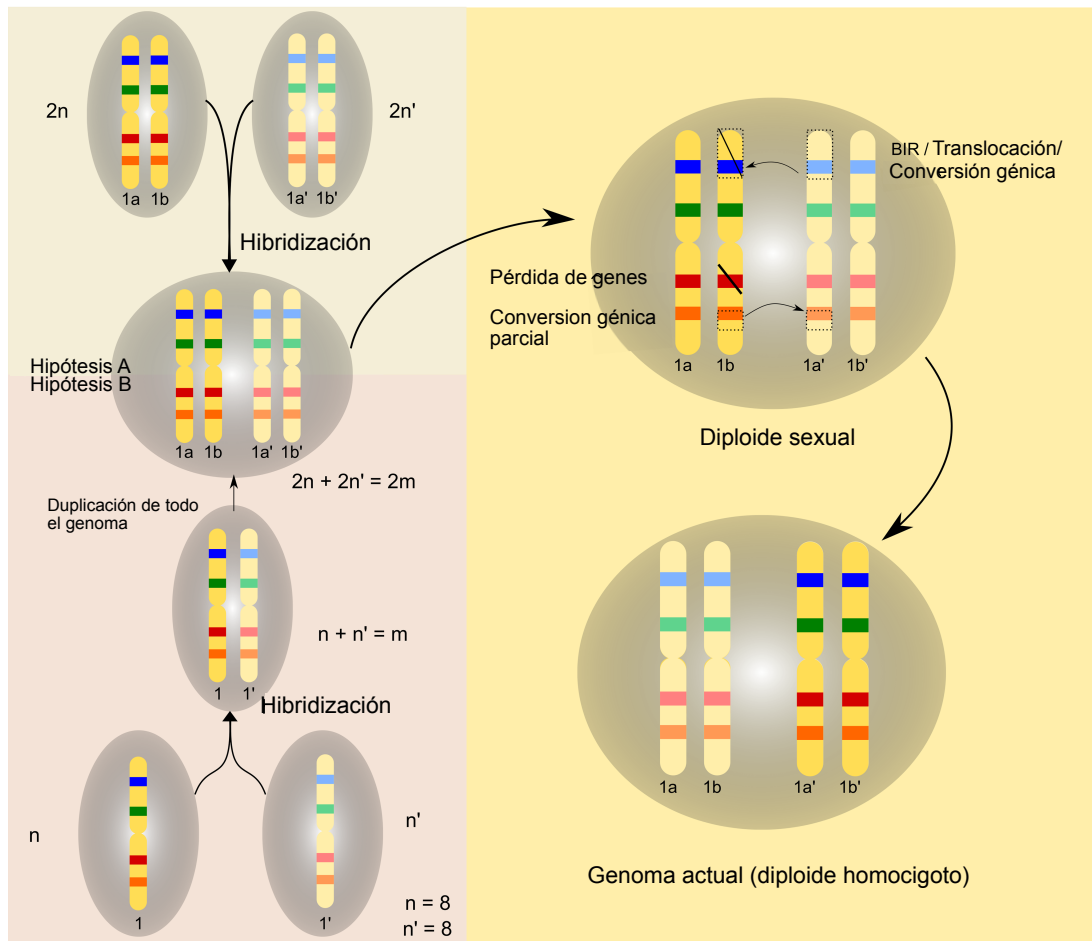


Figura 4. Posibles escenarios que pudieron dar origen al híbrido. En amarillo los cromosomas homeólogos de las dos especies involucradas en la formación del híbrido. Las bandas de colores representan genes, los genes del mismo color representan genes parálogos. La hipótesis A muestra la fusión de dos levaduras diploides y la formación de un alotetraploide. La hipótesis B muestra el apareamiento de dos levaduras haploides y la duplicación de todo el genoma que llevó a la formación de el alotetraploide. Del lado derecho, la célula contiene dos pares de cromosomas meióticos homólogos ($1a$ - $1b$ y $1a'$ - $1b'$) y muestra los diferentes eventos que han afectado al híbrido durante la diploidización. La célula en la parte inferior representa el genoma actual de la levadura en estado homocigótico diploide (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015).

Gracias a los criterios de identidad de secuencia y sintenia los genes *ScALTI* y *ScALT2* son considerados parálogos, cada uno de estos genes se encuentran en regiones cromosómicas consideradas bloques de genes duplicados, en donde ocupan la misma posición dentro del bloque y mantienen la orientación respecto al centrómero. Adicionalmente las proteínas que codifican comparten un 65% de identidad; sin embargo, mientras que *ScALTI* proviene de la cepa parental *ZT*, la cepa parental de la cual proviene *ScALT2* es mas cercana al clado *KLE* (Figura 5).

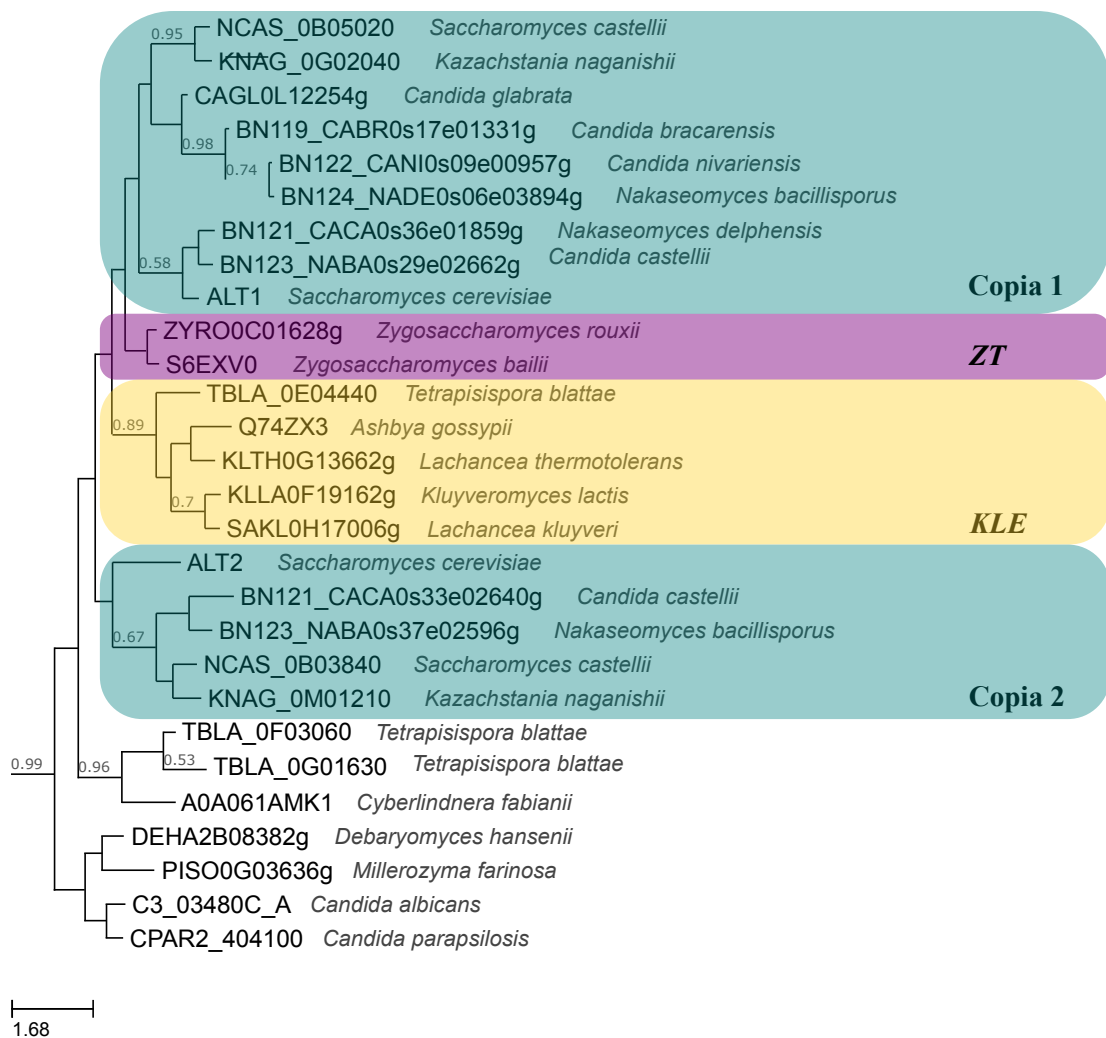


Figura 5. Relación evolutiva de las ALTs de levaduras. La filogenia fue modificada de la reportada en <http://www.phylomedb.org>. El clado *ZT* esta representado por dos géneros de *Zygosaccharomyces* (grupo morado), el clado *KLE* formado por los géneros *Kluyveromyces-Lachancea*(grupo amarillo). Los grupos a los que pertenecen *ScALTI* y *ScALT2* (cuadros verdes). URL: http://phylomedb.org/?q=search_tree&seqid=alt2

1.3 LAS TRANSAMINASAS DE ALANINA

La función que se les ha anotado a las proteínas codificadas por *ScALT1* y *ScALT2* es la de putativas transaminasas de alanina. Se sabe que las transaminasas de alanina catalizan la transaminación reversible entre la L-alanina y el α -cetoglutarato para formar glutamato y piruvato. Una característica general de las transaminasas es que utilizan como cofactor al piridoxal 5'-fosfato y presentan un mecanismo de reacción ping-pong.

La reacción catalizada por estas enzimas consiste en la unión del aminoácido (alanina), el cual transfiere el grupo amino al 5'-piridoxal fosfato, convirtiéndolo en piridoxamina 5'-fosfato, liberando piruvato, la enzima modificada (enzima unida a piridoxamina 5'-fosfato) es capaz ahora de unirse al α -cetoglutarato, el cual es el aceptor del grupo amino presente en el cofactor, reacción que resulta en la formación del glutamato y que deja a la enzima no modificada, es decir, unida al cofactor piridoxal 5'-fosfato (García, 2009., Bulos y Handler 1964). La reacción reversa ocurre de la misma manera, usando al cofactor como aceptor del grupo amino (Figura 6).

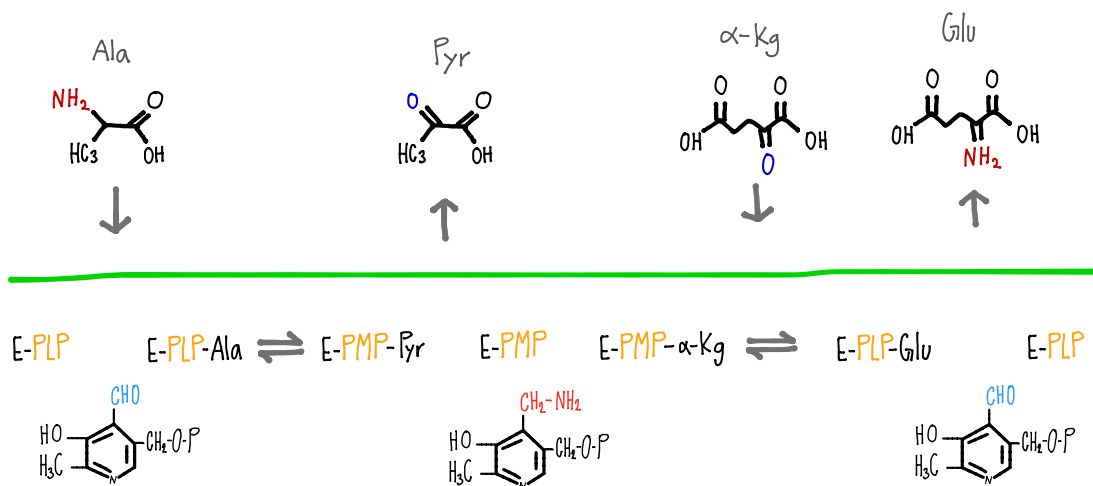


Figura 6. Mecanismo de reacción de las transaminasas de alanina. En la primera mitad de reacción la L-alanina se convierte en piruvato con la conversión del cofactor PLP a PMP. En la segunda parte de la reacción una molécula de α -cetoglutarato se convierte en L-glutamato y el PMP se recicla de nuevo al cofactor presente en la enzima en estado de reposo. Ala, alalanina; Pyr, piruvato; α -Kg, α -cetoglutarato; Glu, glutamato; E, enzima; PLP, piridoxal 5'-fosfato; PMP, piridoxamina 5'-fosfato.

La constante de equilibrio de las transaminasas es cercana a uno (Nisonoff *et al.*, 1953), esto quiere decir que en el equilibrio se encuentra la misma concentración de productos que de reactivos y dado que el logaritmo natural de la constante de equilibrio es proporcional a la energía libre de Gibbs (Klipp *et al.*, 2012), las reacciones catalizadas por las transaminasas presentan una energía libre de Gibbs cercana a cero, es decir que la reacción está en equilibrio y por lo mismo, la dirección de las reacciones de las por estas enzimas esta fuertemente gobernada por la concentración de los sustratos y productos. En conclusión la especialización de la enzima hacia la formación de sustratos o productos se ve impedida por la termodinámica de la reacción.

1.4 EL METABOLISMO DE ALANINA EN *S. cerevisiae*

Estudios previos sobre el metabolismo de alanina en *S. cerevisiae* y sobre el papel fisiológico de *ScAlt1* y *ScAlt2*, demostraron que cuando esta levadura se crece en un medio con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno (condiciones biosintéticas), la alanina es principalmente sintetizada por la transaminasa de alanina codificada por *ScALT1*, mientras que la proteína codificada por *ScALT2* no contribuye a la biosíntesis de este aminoácido (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012). Sin embargo, las mutantes *Scalt1Δ* no son auxótrofas de alanina, observación que indica la existencia de una vía de biosíntesis de alanina aun no descrita. Se ha postulado como posible vía alterna a la transaminasa de glutamina debido a que utiliza como sustratos piruvato y glutamina para producir alanina y α -ketoglutarato (Figura 7).

Es importante mencionar que la transaminasa de glutamina no puede participar en el catabolismo de alanina, puesto que el α -ketoglutarato se cicliza de manera espontánea y es utilizado por la ω -amidasa para producir α -ketoglutarato (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012), consistente con la ausencia de crecimiento en una mutante *Scalt1Δ* en un medio con alanina como única fuente de nitrógeno. Resultado que demuestra que la proteína *ScAlt1* constituye la única vía para catabolizar la alanina y que *ScAlt2* no

tiene ningún papel ni en la biosíntesis ni en el catabolismo de alanina. Además se encontró que *ScAlt2* no presenta actividad de transaminasa de alanina ni aun cuando fue sobre-expresada bajo el promotor Tet.

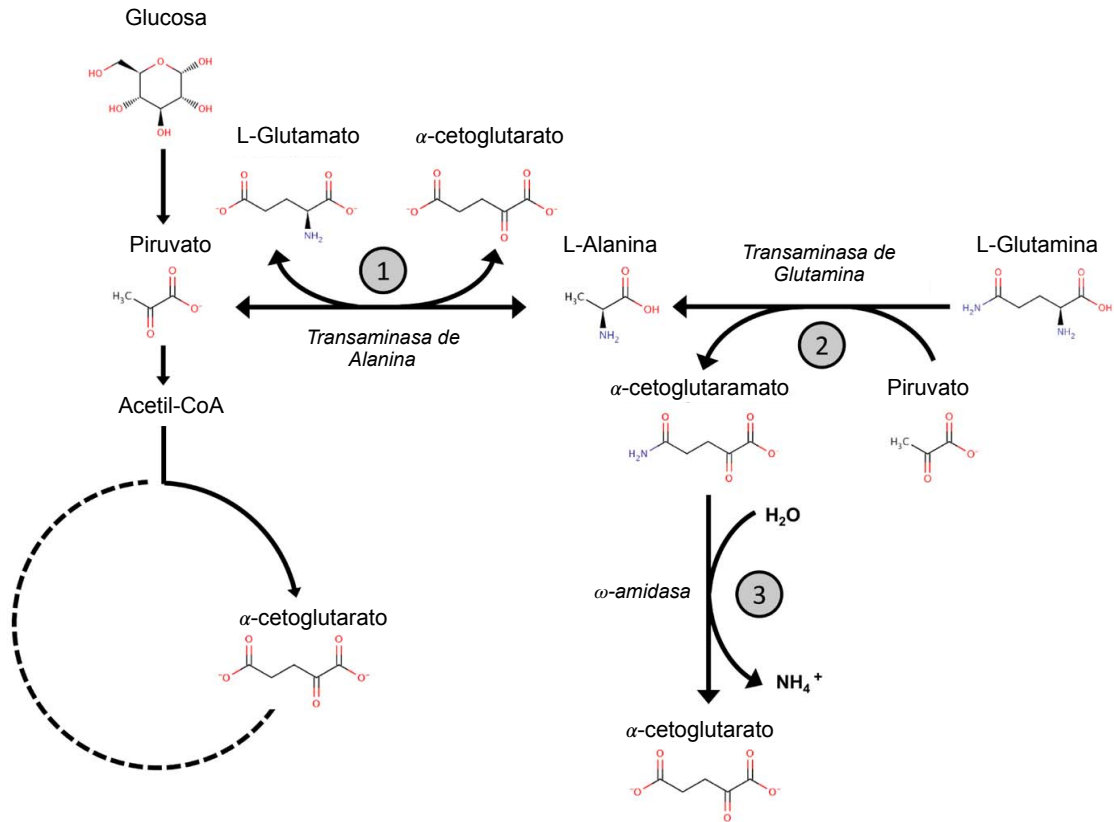


Figura 7. Modelo que representa las vías implicadas en el metabolismo de alanina en *Saccharomyces cerevisiae*. La alanina es biosintetizada a través de la reacción de la transaminasa de alanina codificada por *ALT1* (1). Se propone que la alanina también se sintetiza a través de la acción irreversible de la glutamina aminotransferasa (2), que pertenece a la vía de la ω -amidasa. Esta enzima cataboliza la glutamina a α -cetoglutarato conduciendo a la formación de amonio y α -cetoglutarato (3). Las líneas discontinuas indican que las enzimas del ciclo TCA son inactivas cuando se crecen en glucosa como la única fuente de carbono, excepto aquellas que conducen a la reposición de α -cetoglutarato (líneas sólidas) (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel fisiológico y la historia evolutiva de *ScALT1* y *ScALT2* resultan atractivas, puesto que durante mucho tiempo se había aceptado que ambos genes compartían el mismo origen y recientemente se ha inferido que provienen de cada una de las especies parentales involucradas en la formación del híbrido que dio origen al linaje de *S. cerevisiae*. Por consiguiente no es posible determinar *a priori* si al momento de la hibridación, estos dos genes, *ScALT1* y *ScALT2*, desempeñaban la misma función o ya habían divergido funcionalmente.

Para entender la diversificación funcional entre *ScALT1* y *ScALT2*, en este trabajo se decidió realizar la caracterización funcional de las presumibles transaminasas de alanina en levaduras pre-WGD cercanas a *ScALT2*, pero que también compartieran ancestría, aunque mas lejana, con *ScALT1*. Por consiguiente se seleccionaron a las especies *Lachancea Kluyveri* y *Kluyveromices lactis* (*L. kluyveri* y *K. lactis*), que pertenecen al clado *KLE*. Estas levaduras pueden ser consideradas como un *proxy* a la levadura tipo ancestral *KLE* implicada en la formación del híbrido.

Los genes *LkALT1* y *KlALT1*, de *L. kluyveri* y *K. lactis* respectivamente, fueron identificados como los ortólogos de *ScALT1* y *ScALT2* usando los criterios de identidad de secuencia y sintenia. La estrategia experimental para realizar su caracterización funcional fue la siguiente: I) para entender el papel de los genes bajo estudio se realizó un análisis fenotípico para esto primero se realizaron curvas de crecimiento y cuantificación de la poza de alanina de las cepas silvestres, mutantes nulas y posteriormente de las cepas complementadas en diferentes condiciones. Para robustecer este análisis también se analizaron las actividades enzimáticas de las cepas silvestres, mutantes nulas y posteriormente de las cepas complementadas en diferentes condiciones; II) para conocer las propiedades cinéticas se realizó la caracterización bioquímica de las enzimas codificadas por estos genes; III) finalmente para comprender estudiar la regulación transcripciones de estos genes se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes y el posicionamiento de los nucleosomas en los promotores en diferentes condiciones.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización funcional de las transaminasas de alanina putativas *KlAlt1* y *LkAlt1* presentes en *K. lactis* y *L. Kluyveri*, respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si *KlAlt1* y *LkAlt1* están implicadas en el metabolismo de alanina y si en los organismos tipo ancestral presentan una o varias rutas alternativas para metabolizar la alanina.
2. Determinar la organización oligomérica y los parámetros cinéticos de *KlAlt1* y *LkAlt1*.
3. Estudiar la regulación de la expresión de *KlALT1* y *LkALT* así como el posicionamiento de los nucleosomas sobre sus promotores.
4. Comparar los resultados obtenidos para el gen y la enzima de *K. lactis* y *L. kluyveri* con los de *ScALT1* y *ScALT2* de *S. cerevisiae* para entender como han divergido *ScALT1* y *ScALT2*.

4. METODOLOGÍA

4.1 CEPAS UTILIZADAS

La Tabla 1 describe las características de las cepas utilizadas en el presente trabajo. Todas las cepas construidas para este estudio fueron derivadas de *CLA1-2 (ura3 leu2 :: LEU2)*, *Lk156-1 (ura3)* o *Kl155 (ade2 his3 ura3)* para *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*, respectivamente. Mas información sobre las cepas mutantes como *Scalt1Δ (CLA1-2-1)*, *Scalt2Δ (CLA1-2-2)*, *Scalt1Δ Scalt2Δ (CLA1-2-D)* en las publicaciones de Quezada *et al.*, 2008 y García-Campusano *et al.*, 2012. La mutante nula *Lkalt1Δ (Lk156-2)* fue amablemente proporcionado por la Dra. Lina Riego del IPICYT y su construcción se describe mas adelante, al igual que la cepa mutante *Klalt1Δ (Kl155-2)* generada en este trabajo.

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

Cepa	genotipo relevante	Referencia
<i>CLA1-2</i>	<i>MATα ScALT1 ScALT2 ura3 leu2::LEU2</i>	Quezada, H. 2008
<i>CLA1-2-1</i>	<i>MATα Scalt1Δ::kanMX4 ScALT2 ura3 leu2::LEU2</i>	García- Campusano. 2009
<i>CLA1-2-2</i>	<i>MATα ScALT1 Scalt2Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	García- Campusano. 2009
<i>CLA1-2D</i>	<i>MATα Scalt1Δ::kanMX4 Scalt2Δ::natMX4 ura3 leu2::LEU2</i>	García- Campusano. 2009
<i>LK 156-1</i>	<i>Mata LkALT1 ura3</i>	Montalvo, J. <i>et al.</i> 2015
<i>Lk Y156-2</i>	<i>MATα Lkalt1Δ::kanMX4 ura3</i>	This study
<i>Kl 155</i>	<i>MATα ade2 his3 ura3</i>	Colón, M. 2010
<i>Kl 155-2</i>	<i>MATα Klalt1Δ::kanMX4 ade2 his3 ura3</i>	This study

4.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se cultivaron en un medio mínimo (MM) que contenía *yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco)*, glucosa (2% p / v) como fuente de carbono y sulfato de amonio 40 mM o alanina 7 mM como fuente de nitrógeno. Se añadieron al 0,01% (p / v) los aminoácidos necesarios para satisfacer las auxotrofías. El crecimiento del cultivo fue monitoreado mediante mediciones de la absorbancia a OD_{600nm} en intervalos de 30 min utilizando un Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd.). La agitación fue ajustada al máximo y la temperatura a 30°C. De lo contrario, las células se incubaron a 30 ° C con agitación (250 rpm) en matraces.

4.3 CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NULAS

La construcción de las mutantes se llevó a cabo mediante la inserción por recombinación homóloga (APENDICE A) de un módulo amplificado a partir del plásmido pFA6a-*kanMx4*, el cual confirió resistencia a geneticina (Wach *et al.*, 1997); la mutante nula *Lkalt1Δ* de *L. kluyveri* (*Lk156-2*) donada por la Dra. Lina Riego del IPICYT, fue obtenida mediante el remplazo del ORF de *LkALT1* por el marcador de selección *kanMx4*. El gen *LkALT1* fue remplazado por recombinación homóloga usando un modulo que contenía el cassette de *kanMX4* (1469 pb) flanqueados por 1146 pb de la región 5' UTR (-1118a -34) y 1207 pb de la región 3' UTR (+1604 a +2811) de *LkALT1*. Este módulo (3608 pb) fue amplificado usando la técnica de *overlapped extension PCR* con los oligonucleótidos X7 y X8 (-1007 a +2061) usando como templado tres módulos independientes i) el módulo *LkALT1* 5' UTR, que fue generado usando los oligonucleótidos X1 y X2 y el DNA genómico de la cepa *Lk156-1* como templado, ii) el módulo de *kanMX4* el cual fue amplificado a partir del plásmido pFA6a usando los oligonucleótidos X3 y X4, y iii) el módulo *LkALT1* 3' UTR, que se generó con los oligonucleótidos X5 y X6 y el 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 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Posteriormente se usaron los oligonucleótidos X9/X10 y X11/X12 para verificar la construcción *Lkalt1Δ::kanMx4*, estos *primers* generaron un módulo de 1517 y 1851 pb, respectivamente (desde el -1345 del 5' UTR de *LkALTI* hasta el +216 de *kanMx4*; y desde el +874 de *kanMx4* hasta el +2879 de la región 3' UTR de *LkALTI*) usando como templado el DNA genómico que se extrajo de las colonias resistentes a G418. Las secuencias de oligonucleótidos se encuentran listadas en el Anexo 1.

La cepa *Klalt1Δ* de *K. lactis* (*Kl155-2*), fue obtenida al reemplazar el ORF de *KIALTI* por el marcador de selección *kanMx4* mediante recombinación homóloga, usando un módulo que contenía el cassette de *kanMx4* (1507 pb) flanqueado por 987 pb de la región 5' UTR (-1169 a -222) y 1202 pb de la región 3' UTR (+1587 a +2771) del gen *KIALTI*. Este módulo (2495 bp) fue amplificado por la técnica de *overlapped extension PCR* usando los oligonucleótidos X13 y X18 usando como templado tres módulos independientes: i) el módulo de *KIALTI* 5' UTR, que fue amplificado usando los oligonucleótidos X13 y X14, ii) el módulo de *kanMx4* flanqueado por regiones homólogas a la región 5' UTR y 3' UTR del gen *KIALTI*, el cual fue amplificado del plásmido pFA6a usando los oligonucleótidos X15 y X16 y iii) el módulo de amplificado de *KIALTI* 3' UTR usando los oligonucleótidos X17 y X18. El producto de la reacción de PCR fue transformada en la cepa *Kl155*. Las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a geneticina (250 $\mu\text{g ml}^{-1}$). La correcta inserción del módulo fue verificada mediante PCR usando como templado el DNA genómico de las transformantes resistentes a geneticina y los oligonucleótidos X19/X20 y X21/X22 fueron usados para verificar la construcción *Klalt1Δ::kanMx4*, Estos *primers* generaron un módulo de 1495 y 1978 pb respectivamente (desde el -1496 del 5' UTR de *KIALTI* hasta el +216 de *kanMx4*; y desde el +1106 de *kanMx4* hasta el +3172 de la región 3' UTR de

KLALT1). Las secuencias de oligonucleótidos se encuentran listadas en el Anexo 1.

4.4 CONSTRUCCION DE PLÁSMIDOS

La clonación en los plásmidos pRS416 y YEpKD352 se realizó como se describe a continuación. Para clonar el gen *ScALTI* en el plásmido pRS416, se amplificó una región de 2848 bp entre -931 pb río arriba del codón de inicio y +137 pb río abajo del codón de paro con los desoxioligonucleótidos X23 y X24 y el DNA genómico de la cepa de tipo silvestre de *S. cerevisiae* (CLA1-2) como templado. Después de la amplificación por PCR y digestión de plásmidos con *EcoRI* y *XhoI*, se realizó la clonación usando el *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix*; Para clonar el gen *ScALTI* en el plásmido YEpKD352, se amplificó una región de 2619 pb entre -937 pb río arriba del codón de inicio y +95 pb río abajo del codón de paro con los desoxioligonucleótidos X25 y X26, utilizando también el DNA genómico de la cepa silvestre CLA1-2 como templado; Para el gen *ScALT2*, se amplificó una región de 2626 pb entre el -996 río arriba del codón de inicio y el +105 río abajo del codón de paro con desoxioligonucleótidos X27 y X28 usando DNA genómico de la cepa WT de *S. cerevisiae* (CLA1-2) como molde. Para el gen *LkALTI*, se amplificó una región de 2611 pb entre el -920 y el + 281 con los desoxioligonucleótidos X29 y X30 utilizando como templado el DNA genómico de la cepa de tipo silvestre de *L. kluyveri* (*Lk156-1*); Y para *KlALT1*, se amplificó una región de 2619 pb entre el -937 río arriba del codón de inicio y +95 río abajo del codón de paro con los desoxioligonucleótidos X31 y X32 usando el DNA genómico de la cepa tipo silvestre de *K. lactis* (K1155) como molde . Los productos de PCR y el plásmido pRS416 se digirieron con enzimas de restricción (*ScALTI KpnI/ SalI*, *ScALT2, EcoRI / BamHI* para *LkALTI SacI* y para *KlALT1 KpnI / SalI*) y se ligaron después de la purificación en gel.

4.5 EXTRACCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Los extractos celulares para la determinación intracelular de metabolitos fueron obtenidos y analizados siguiendo el protocolo 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 al 2% como fuente de carbono. El protocolo se encuentra en el apéndice C.

4.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA DE LEVADURA

Las células de levadura se cosecharon por centrifugación, y se lavaron con agua fría. Las pastillas celulares se resuspendieron en tampón de extracción en frío (HEPES 50 mM a pH 8, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). Para el tampón de extracción de *KlAlt1* se suplementó con el coctel de inhibidor de proteasas *cOmplete, mini protease inhibitor cocktail*, de Roche. Las células se rompieron mecánicamente con perlas de vidrio. El extracto resultante se centrifugó para eliminar residuos celulares (5,000 rpm, 4 °C, 15 min). Se recuperó el sobrenadante y se añadió piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100 µM. La concentración de proteína se midió por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albúmina de suero bovino como control.

4.7 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TRANSAMINASA DE ALANINA

El ensayo enzimático fue una versión modificada de (Graßl, 1985). La mezcla de reacción contenía tampón de reacción (pH 7 Tris-HCl 100 mM, alanina 400 mM, α -cetoglutarato 24 mM, NADH 300 µM, piridoxal-5-fosfato 40 µM y 5 U / ml de lactato deshidrogenasa). Como control, se realizaron ensayos sin alanina. Para determinar la actividad específica, la pendiente obtenida a partir de este control negativo se restó a la obtenido con el ensayo completo. Todos los ensayos se realizaron a 340 nm, 25 °C en un espectrofotómetro *Varian Cary 50*.

4.8 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS

Los genes *LkALTI* y *KlALTI* se amplificaron por PCR utilizando los pares de desoxioligonucleótidos X33/X34 y X35/X36, respectivamente. Para amplificar *LkALTI* se utilizó como templado el DNA genómico de la cepa *Lk156-1*. Alternativamente, para amplificar *KlALTI* se usó como molde el DNA genómico de la cepa de tipo silvestre *Kl155*. Los productos de PCR obtenidos y el plásmido pET-28a (+) fueron digeridos con *NheI* / *XhoI* para la clonación con *LkALTI* y *NdeI* / *XhoI* para la clonación de *KlALTI*. Después de la purificación en gel se ligaron plásmidos e insertos. Las ligaciones se transformaron en la cepa DH5 α de *E. coli*. Después de la purificación del plásmido, se verificó la correcta clonación mediante secuenciación. Para la expresión heteróloga, se transformó a la cepa de Rosetta2 (DE3) de *E. Coli*. La cepa Rosetta(DE3) es derivada de la cepa BL21 diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas puesto que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Las transformaste seleccionados se cultivaron en medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina y 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cloranfenicol, las células se incubaron a 37 °C con agitación (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una OD_{600nm} 0.75, se indujo la expresión de las proteínas con 100 $\mu\text{mol/L}$ de IPTG (Iso-Propil-Tio-Galactósido), se incubaron durante la noche a 30 °C con agitación (250 rpm). Las células inducidas por IPTG se cosecharon por centrifugación a 3750 rpm durante 30 min.

4.9 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SINTETIZADA EN *E. coli*

Las células se descongelaron y se resuspendieron en 4 ml de tampón de lisis por cada 100 ml de cultivo (imidazol 10 mmol/L, NaCl 50 mmol/L y Tris-HCl 10 mmol/L pH 8.0). Los extractos de proteínas se obtuvieron por sonicación (*Ultrasonic Processor Model: VCX 130*) con un sonicador de punta, con las muestras sobre hielo; se realizaron

cinco ciclos (60% de amplitud, un segundo encendido y un segundo apagado durante 1 min) con 1 min de incubación en hielo entre cada ciclo. Después de la centrifugación a 17,000 rpm durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se añadió piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100 μ M.

4.10 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS HETERÓLOGAMENTE

Para purificar las transaminasas de alanina expresadas de manera heteróloga, el sobrenadante obtenido, se cargó en una columna de níquel equilibrada (Ni-NTA Agarose 100, Thermo Fisher Scientific), que se lavó 30 veces con 30 mM de imidazol. La proteína se eluyó con 200 mM de imidazol y se añadieron 100 μ M de concentración final de piridoxal-5-fosfato. La homogeneidad de proteínas se verificó mediante la electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) teñido con azul de coomassie.

4.11 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Las mediciones se realizaron en condiciones de velocidad inicial, variando ambos sustratos simultáneamente, (para *LkAlt1* alanina de 1 a 20 mM y α -cetoglutarato de 0.05 a 1.50 mM, para *KlAlt1* alanina de 4 a 80 mM y α -cetoglutarato de 0.25 a 5 mM) . Los resultados se ajustaron de manera global a la ecuación para enzimas con un mecanismo ping-pong (Segel, 1975) con el *software Prism GraphPad Prism 6.00 (Software Inc.)*.

4.12 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL E HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN BLOT

El análisis tipo Northern Blot se llevó a cabo de acuerdo con Struhl y Davis, 1981. Las muestras de RNA total de levadura fueron obtenidas a partir de 100 ml de cultivo a la OD_{600nm} indicada. Los medios de cultivo utilizados fueron medio mínimo con glucosa al 2% y como fuente de nitrógeno sulfato de amonio o alanina. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de fenol ácido (APENDICE H) y como sondas se utilizaron productos de PCR. Para *LkALT1*, se amplificó un producto de 400 pb con los desoxioligonucleótidos X37 y X38; Para *KlALT1*, se amplificó un producto de PCR de 897 pb con los desoxioligonucleótidos X39 y X40; los genes ribosomales *Lk18s* y *Kl18s* se utilizaron como controles de carga. Tanto *Lk18s* como *Kl18s* se amplificaron con los desoxioligonucleótidos X41 y X42, respectivamente se amplificó un producto de 476 pb y 477 pb para *LkALT1* y *KlALT1*.

4.13 ANÁLISIS DE POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS

El procedimiento para realizar el estudio del posicionamiento de nucleosomas sobre los promotores de *LkALT1* y *KlALT1* se realizó según lo descrito por Infante *et al.* 2012. Se crecieron cultivos celulares en MM con sulfato de amonio o alanina como única fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono hasta una OD_{600nm} de 0.5. una vez alcanzada la OD_{600nm} deseada, se agregó formaldehído al 37% y el cultivo se mantuvo en agitación constante por 15 min, el formaldehído genera enlaces covalentes entre las proteínas y el DNA, lo que fija la interacción proteína-DNA; a esto se le llama entrecruzamiento (*crosslinking*), posteriormente los cultivos se incubaron con glicina 2.5 M por 5 min más. Transcurrido este tiempo, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla de células fue resuspendida en amortiguador Z2 (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, β-mercaptoetanol 10 mM y zimoliasa 10 mg/mL); en donde se dejó incubando 20 min a 30 °C. Se centrifugaron los esferoplastos a 1500 rpm, 10 min por 4 °C. Los esferoplastos fueron resuspendidos en amortiguador NPS (espermina 0.05 mM, NP-40 0.075% v/v, NaCl 50 mM, Tris-HCl

10mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM y β-mercaptoetanol 1 mM) y transferidos 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 indicado, se adicionaron 60 μL de SDS al 10% y 10 μL de proteinasa K a una concentración de 10 mg/mL y las muestras se incubaron a 65 °C ON. Posteriormente se hizo una extracción de DNA con Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Se precipitó por 30 min 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 min y el precipitado fue resuspendido en TE (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA pH 8 1 mM). A partir de la digestión y posterior electroforesis con agarosa 1.5%, se cortaron las bandas monosomales (150 pb) y se purificaron mediante el *Wizard SV Gel Clean-Up System Kit* (Promega, REF A9282) . Las muestras de DNA se diluyeron a 1:30 y se usaron en reacciones de PCR cuantitativo (qPCR) para cuantificar la protección relativa de MNasa de cada templado. El análisis de qPCR se realizó utilizando una máquina *Corbett Life Science Rotor Gene 6000*. El colorante de detección utilizado fue *SYBR Green* (2 × *KAPA SYBR FAST qBioline* y *Platinum SYBR Green* de *Invitrogen*). La reacción de PCR en tiempo real se realizó de la siguiente manera: 94 °C durante 5 min (1 ciclo), 94 °C por 15 seg, 58 °C por 20 seg y 72 ° por 20 seg (35 ciclos). La protección relativa se normalizo respecto a un nucleosoma bien posicionado de los gen *LkVCX1*, y *KlVCX1* que se posiciona a +250 pb del codon de inicio de estos ORFs. Los oligonucleotidos utilizados para ambos promotores amplifican aproximadamente del -950 al +250 pb (Anexos 2 y 3) de los loci de *LkALT1* y *KlALT1*.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

5.1.1 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO: CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES NULAS

Para determinar si *L. kluyveri* *LkALT1* y *K. lactis* *KlALT1* desempeñaban funciones fisiológicas similares a las de *ScAlt1*, se determinó la velocidad específica de crecimiento de las cepas silvestres *ScALT1*, *LkALT1* y *KlALT1*; y de las mutantes nulas *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* (Figura 8). En un medio biosintético, con amonio como única fuente de nitrógeno, la mutante *Scalt1Δ* mostró una velocidad específica de crecimiento igual a la observada en la cepa silvestre y en una condición catabólica, utilizando alanina como única fuente de nitrógeno esta cepa no mostró crecimiento, de esta manera se confirmaron los fenotipos previamente reportados por Peñalosa-Ruiz *et al.* en 2012.

En la condición biosintética estudiada, la cepa de *L. kluyveri* *Lkalt1Δ* mostró una tasa de crecimiento 20% menor que la observada en su respectiva cepa silvestre. Sorprendentemente, la adición de alanina al medio no restableció la velocidad de crecimiento. En una condición catabólica, cuando se proporcionó alanina como única fuente de nitrógeno, la velocidad de crecimiento de la mutante *Lkalt1Δ* fue de casi la mitad de la observada respecto a la cepa silvestre; tal reducción del crecimiento no se alivió por completo cuando se añadió sulfato de amonio al medio de crecimiento, lo que indica que el papel desempeñado por *LkAlt1* de *L. kluyveri* no se restaura completamente ni con alanina ni con sulfato de amonio, esta observación se discutirá más adelante.

Por el contrario, en un medio biosintético la mutante nula de *K. lactis* *Klalt1Δ* exhibió un fenotipo silvestre, y el fenotipo braditrófico observado en alanina como única fuente de nitrógeno fue totalmente restaurado en presencia de sulfato de amonio y alanina.

Estos resultados indican que, así como para *ScALTI*, los genes ortólogos *LkALTI* y *KlALTI* están involucrados en el catabolismo de alanina. Sin embargo, a diferencia de en *S. cerevisiae*, en *L. kluyveri* y *K. lactis* hay una o mas vías alternativas para catabolizar la alanina. La tasa de crecimiento mostrada por *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* en un medio biosintético sugiere que, así como para *S. cerevisiae*, existe una vía independiente para la biosíntesis de alanina, impidiendo la posibilidad de observar la contribución de *LkALTI* y *KlALTI* a la biosíntesis de alanina por un análisis de crecimiento.

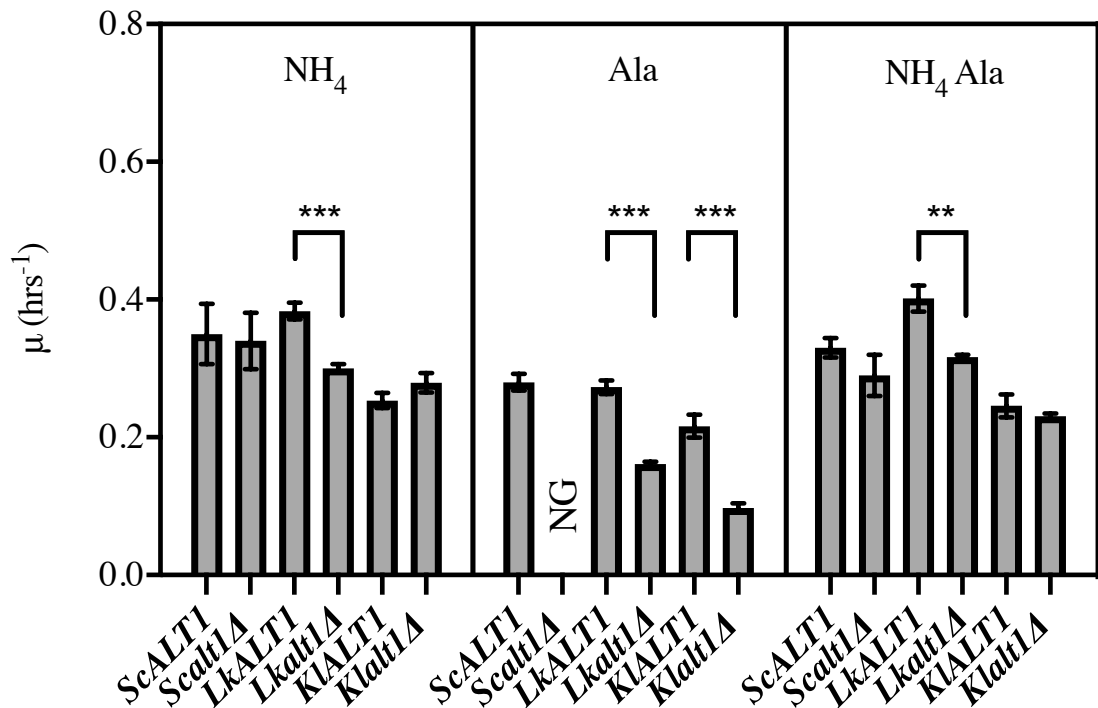


Figura 8. *ScALTI* de *S. cerevisiae*, *LkALTI* de *L. kluyveri* y *KlALTI* de *K. lactis* están implicados en el catabolismo de la alanina. Se crecieron a las cepas silvestres de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis* y a las mutantes sencillas en medios con glucosa como fuente de carbono y como única fuente de nitrógeno sulfato de amonio o alanina o sulfato de amonio más alanina. La velocidad específica de crecimiento se determinó durante la fase exponencial. Los valores presentados representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. No crece (NG).

5.1.2 CONTRIBUCIÓN A LA POZA DE ALANINA: CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES NULAS

Para analizar la contribución de *LkALT1* y *KlALT1* a la biosíntesis de alanina, se determinaron las concentraciones intracelulares de este aminoácido en las cepas silvestres y en las mutantes *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* durante la fase de crecimiento exponencial (OD_{600nm} 0.3-0.6) en un medio biosintético (Figura 9).

Puesto que se ha reportado que la concentración de alanina es igual en el citoplasma que en la vacuola y considerando el gran tamaño de los poros nucleares es posible asumir que la concentración de este aminoácido es la misma en el núcleo, citoplasma y vacuola (Kitamoto *et al.*, 1988). Dado que la suma del volumen de estos tres compartimentos representan alrededor del 90% del volumen de una célula, se consideró, para las tres especies estudiadas, un volumen celular de 42 fl, que es el volumen reportado para una célula haploide de *S. cerevisiae*, con este volumen fue posible estimar las concentraciones intracelulares de alanina (Jorgensen *et al.*, 2002, Klis *et al.*, 2014).

Consistente con lo reportado anteriormente, *ScAlt1* contribuyó con el 75-60% de la poza de alanina, mientras que la vía independiente a *ScAlt1* sólo proporcionó el 25-40% (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012). En las cepas *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* se observó una disminución del 42% y 70% en la concentración de alanina intracelular, en comparación con la encontrada en sus respectivas cepas tipo silvestre (Figura 9). En conjunto, los resultados presentados indican que *LkALT1* y *KlALT1* están implicados en la biosíntesis y el catabolismo de alanina, y que como en *S. cerevisiae*, existen vía(s) alternativa(s) implicadas en la biosíntesis de alanina, que proporcionan el 58% y el 30% de la alanina en *L. kluyveri* y *K. lactis*, respectivamente.

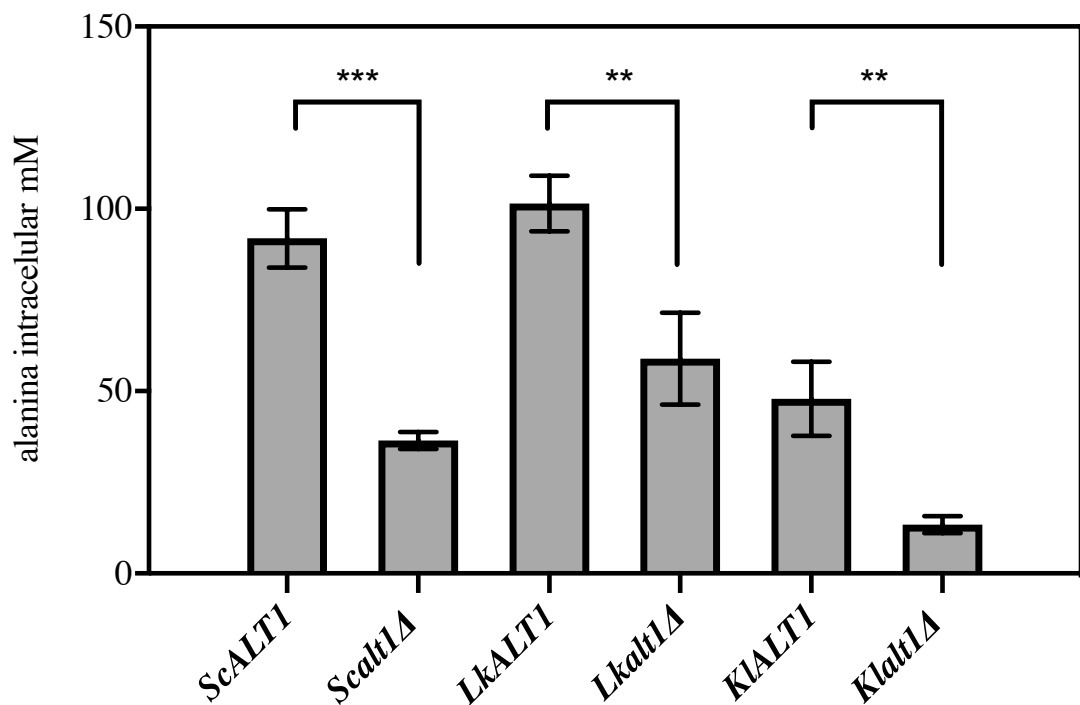


Figura 9. *ScALT1* de *S. cerevisiae*, *LkALT1* de *L. kluyveri* y *KIALT1* de *K. lactis* están implicados en la biosíntesis de alanina. La concentración intracelular de alanina se midió en extractos obtenidos a partir de células cultivadas con glucosa amonio. Después de que las células fueron cosechadas durante la fase exponencial, se prepararon extractos libres de células y se determinaron las pozas de alanina. Los valores se presentan como medias \pm DE de dos o tres experimentos independientes. No crece (NG).

5.1.3 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO: CEPAS COMPLEMENTADAS

Los resultados presentados anteriormente indican que *ScAlt1*, *LkAlt1* y *KIAlt1* tienen papeles fisiológicos cercanos. Para analizar si las tres enzimas realizaban funciones equivalentes, se determinó la velocidad específica de crecimiento de clonas obtenidas a partir de complementaciones recíprocas (Figura 10). En una condición catabólica, con alanina como única fuente de nitrógeno, las transformantes de una mutante *Scalt1Δ* con plásmidos que contenían a *ScALT1*, *LkALT1* o *KIALT1* mostraron una velocidad específica de crecimiento equivalente a la observada en un cepa silvestre (Figura 10A).

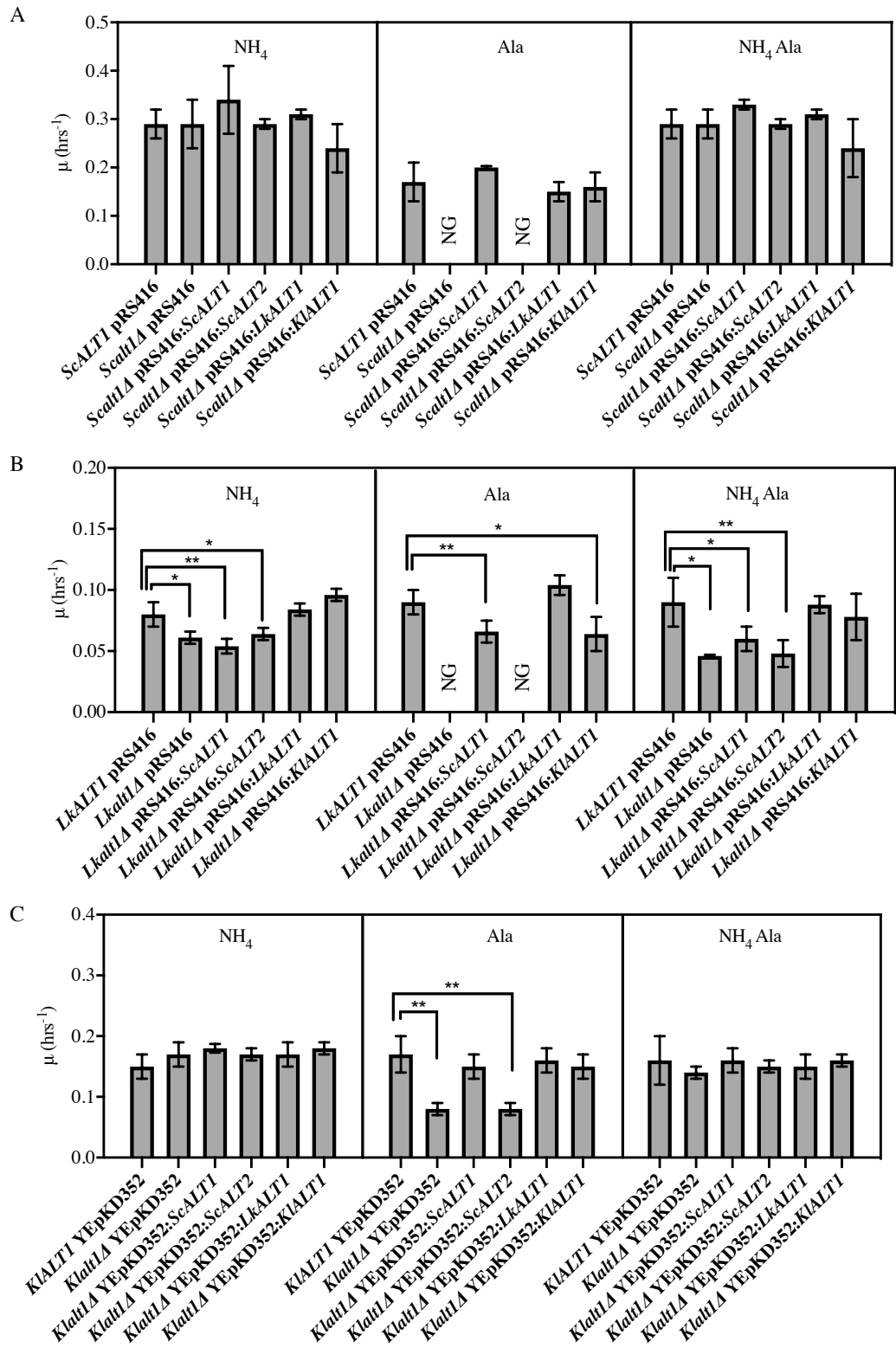


Figura 10. *ScALT1*, *LkALT1* y *KlALT1* pueden sustituirse entre sí bajo condiciones catabólicas. Se realizó una prueba de complementación recíproca en medios con glucosa como fuente de carbono y como única fuente de nitrógeno sulfato de amonio, alanina o sulfato de amonio más alanina. La velocidad específica de crecimiento se determinó durante la fase exponencial. Células transformadas pertinentes de (A) *S. cerevisiae*, (B) *L. kluyveri* y (C) *K. lactis*. Para la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* y *L. kluyveri*, se usó el plásmido pRS416 y para *K. lactis* el plásmido YEpKD352. No crece (NG). Los valores se presentan como la media \pm DE de dos a tres experimentos independientes.

Bajo las mismas condiciones catabólicas de cultivo, la cepa mutante *Lkalt1Δ* fue parcialmente complementada con plásmidos que contenían al los genes *ScALT1* o *KIALTI*, mientras que fue totalmente complementada cuando se la transformó con *LkALT1* (Figura 10B). Cuando una cepa mutante *Klalt1Δ* se transformó con plásmidos que albergaban a los genes *ScALT1*, *LkALT1* o *KIALTI* se logró alcanzar una velocidad de crecimiento como la observada en su respectiva cepa silvestre (Figura 10C). Como era de esperarse, *ScALT2* no logró complementar a ninguna de las tres mutantes probadas (Figura 10A-C). Este resultado indica que el carácter catabólico presente en *LkAlt1* y *KlAlt1* ha sido mantenido por *ScAlt1* y por lo contrario *ScALT2* ha perdido completamente la capacidad de suplir el papel catabólico de *ScALT1*, *LkALT1* o *KIALTI*.

Como se muestra en la Figura 8, la única mutante que mostró una disminución en la velocidad específica de crecimiento en una condición biosintética fue *Lkalt1Δ*. Cuando se transformó con plásmidos que albergaban a los genes *LkALT1* o *KIALTI*, se alcanzó la velocidad de crecimiento tipo silvestre, pero ni *ScALT1* ni *ScALT2* fueron capaces de restablecer la velocidad de crecimiento observada en la cepa tipo silvestre transformada con un plásmido vacío (Figura 10B).

5.1.4 CONTRIBUCIÓN A LA POZA DE ALANINA: CEPAS COMPLEMENTADAS

Las cepas mutantes *Scalt1Δ* y *Klalt1Δ*, no mostraron un defecto de crecimiento en presencia de sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Con el fin de analizar su función biosintética, se determinaron las concentraciones de alanina en extractos preparados a partir de las cepas mutantes transformadas con plásmidos que contenían los genes pertinentes, como controles se utilizaron las cepas tipo silvestre y las mutantes transformadas con plásmidos vacíos (Figura 11), todos los extractos se prepararon a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial (OD_{600nm} 0,3-0,6). Tanto *ScAlt1* y *LkAlt1* fueron capaces de restaurar las concentraciones de alanina intracelular de las mutantes *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* a la observada en sus respectivas cepas silvestres (Figura 11A-C). Las mutantes *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* transformadas con *KIALTI* mostraron

una concentración intracelular de alanina de tipo silvestre (Figura 11B-C). Sin embargo, *KlAlt1* no logró restablecer la concentración de alanina en la mutante *Scalt1Δ* (Figura 11A). La incapacidad de *KlAlt1* para restaurar la poza de alanina en la cepa *Scalt1Δ* en condiciones biosintéticas podría deberse a propiedades cinéticas peculiares de la proteína codificada por *KIALT1* y/o a una baja tasa transcripcional del gen *KIALT1* en el contexto de *S. cerevisiae*. Como se esperaba, todas las cepas mutantes transformadas con plásmidos que albergaban *ScALT2* presentaron una concentración intracelular de alanina equivalente a la encontrada en los controles negativos.

En conjunto los resultados presentados en este y el anterior inciso muestran que *ScAlt1*, *LkAlt1* y *KlAlt1* pueden sustituirse total o parcialmente entre sí cuando la alanina o el sulfato de amonio se utilizan como única fuente de nitrógeno, confirmando que *ScAlt1* ha retenido suficientes características ancestrales para concluir que *LkAlt1* y *KlAlt1* son los ortólogos funcionales *ScAlt1* con respecto a su papel en la biosíntesis y en el catabolismo de alanina, por el contrario, *ScAlt2* ha perdido su función en el metabolismo de la alanina.

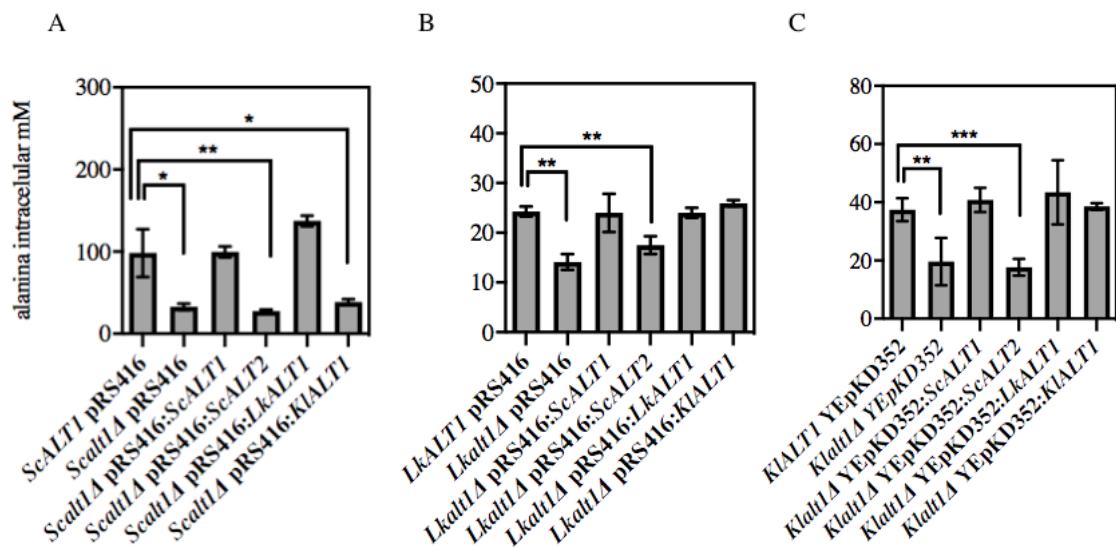


Figura 11. Ensayo de complementación recíproca bajo condiciones biosintéticas. La concentración intracelular de alanina, de las cepas transformadas de (A) *S. cerevisiae*, (B) *L. kluyveri* y (C) *K. lactis*, se obtuvo a partir de extractos de células cultivadas en glucosa-sulfato de amonio. Después de que las células fueron cosechadas durante la fase exponencial, se prepararon extractos libres de células y se determinaron las pozas de alanina. Los valores se presentan como la media \pm DE de dos a tres experimentos independientes.

Es importante resaltar que en un medio biosintético, con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, la mutante *Lkalt1Δ* con o sin plásmido vacío mostró una disminución en el crecimiento (Figura 8 y 10B) y este defecto en el crecimiento no fue recuperado ni al añadir alanina al medio (Figura 8) ni cuando esta mutante, *Lkalt1Δ*, fue transformada con un plásmido que contenía al gen *ScALT1* (Figura 10B), a pesar de que en la cepa *Lkalt1Δ* transformada con *ScALT1*, se recuperó la concentración intracelular de alanina al nivel observado en la cepa tipo silvestre (Figura 11B). Lo que indica que la disminución en el crecimiento de la mutante *Lkalt1Δ*, en una condición biosintética, no es debida a una concentración intracelular de alanina más baja. En conjunto, estas observaciones son pruebas experimentales sólidas para sostener que *LkALT1* tiene una función alternativa aún no identificada, que también está presente en *KIALT1*, puesto que los plásmidos que contenían el gen *KIALT1* no sólo restauraron la poza de alanina en la cepa mutante *Lkalt1Δ* (Figura 11B), sino que también, complementaron el fenotipo de crecimiento observado en la condición biosintética estudiada (Figura 10B). Cabe destacar el hecho de que en *K. lactis*, la función alternativa de *KIALT1* no da lugar a ningún fenotipo aparente cuando la mutante *Klalt1Δ* es crecida en sulfato de amonio o alanina como fuentes de nitrógeno. La observación de que *KIALT1* complementa a *Lkalt1Δ* desenmascara el hecho de que *KlAlt1* alberga una función independiente a la relacionada con el metabolismo de alanina, que es equivalente a la observada en *LkAlt1*. Por el contrario, *ScALT1* y *ScALT2* no pudieron restablecer la velocidad de crecimiento de la cepa *Lkalt1Δ* en un medio con sulfato de amonio y alanina como fuentes de nitrógeno (Figura 10B), lo que indica que ni *ScALT1* ni *ScALT2* pueden sustituir la función alternativa presente en *LkALT1* (8 y 10B).

5.1.5 ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE TRANSAMINASA DE ALANINA: CEPAS SILVESTRES Y MUTANTES NULAS

Para comparar las actividades de transaminasa de alanina de las enzimas *ScAlt1*, *LkAlt1* y *KlAlt1* tanto en condiciones biosintéticas como catabólicas, los extractos obtenidos durante fase exponencial (OD_{600nm} 0.4-0.6) de las cepas silvestres de *S. cerevisiae*, *L.*

kluyveri y *K. lactis*, crecidas en glucosa-sulfato amonio y glucosa-alanina, fueron utilizados en ensayos para determinar la actividad de transaminasa de alanina. Como controles negativos se emplearon los extractos de las cepas mutantes *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* (Tabla 2). Al igual que lo reportado en un informe anterior (Peñalosa *et al.*, 2012), la actividad específica de transaminasa de alanina de *ScAlt1* y *LkAlt1* aumentó aproximadamente diez veces en extractos provenientes de cultivos con alanina como única fuente de nitrógeno en comparación con los cultivos obtenidos a partir de sulfato de amonio. En *K. lactis*, la actividad de transaminasa de alanina fue equivalente en muestras preparadas a partir de cultivos con alanina o sulfato de amonio como únicas fuentes de nitrógeno.

De manera inesperada, se detectó actividad de transaminasa de alanina en los extractos de las cepas mutantes *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* crecidas tanto en amonio como en alanina como únicas fuentes de nitrógeno (Tabla 2). La actividad detectada en la mutante *Lkalt1Δ* en los extractos de sulfato de amonio fue similar a la observada en la cepa silvestre de *L. kluyveri*. Sin embargo, en extractos preparados a partir de células crecidas en alanina como única fuente de nitrógeno, la actividad de la cepa mutante *Lkalt1Δ* fue 20 veces menor que la observada en la cepa silvestre (0.12 frente a 2.77 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$), aunque sólo fue 2.5 veces inferior a la observada en extractos con sulfato de amonio (0.12 frente a 0.28 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), lo que sugiere la existencia de una transaminasa de alanina adicional.

De manera similar, extractos de la mutante *Klalt1Δ*, obtenidos a partir de medios con amonio o alanina como única fuente de nitrógeno, mostraron una actividad específica ligeramente menor que la observada en la cepa silvestre (0.024 vs 0.036 $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$), lo que nuevamente sugiere la existencia de una segunda transaminasa de alanina en *L. kluyveri* y *K. lactis*. Se puede concluir así, que las proteínas codificadas por *ScALT1*, *LkALT1* y *KlALT1* muestran actividad de transaminasa de alanina en las tres levaduras estudiadas y que la actividad de transaminasa de alanina tanto en *L. kluyveri*, como en *K. lactis* no está exclusivamente codificada por *LkALT1* y *KlALT1*.

Tabla 2. Actividad específica de transaminasa de alanina en extractos obtenidos a partir de medios con glucosa- amonio o glucosa-alanina

	Glucosa	
	NH ₄	L-alanina
<i>ScALT1</i>	0.093 ± 0.001	0.821 ± 0.093
<i>Scalt1Δ</i>	0.018 ± 0.001	NG
<i>LkALT1</i>	0.259 ± 0.014	2.771± 0.399
<i>Lkalt1Δ</i>	0.289 ± 0.142	0.120 ± 0.031
<i>KlALT1</i>	0.036 ± 0.003	0.036 ± 003
<i>Klalt1Δ</i>	0.024 ± 0.003	0.024 ± 0.002

Actividad específica expresada como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$. No crece (NG). Los valores se presentan como la media \pm DE de dos a tres experimentos independientes.

5.1.6 ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE TRANSAMINASA DE ALANINA: CEPAS COMPLEMENTADAS

Para confirmar la función ortóloga de las tres enzimas estudiadas, también se ensayó la actividad de transaminasa de alanina en extractos provenientes de las mutantes *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* transformadas con plásmidos que contenían a *ScALT1*, *ScALT2*, *LkALT1* o *KlALT1* que fueron obtenidos a partir de medios con glucosa-sulfato de amonio o glucosa-alanina, como controles se utilizaron las cepas silvestres y mutantes transformadas con plásmidos vacíos (Figura 5). En muchos casos se observó que los extractos provenientes de las cepas mutantes transformadas con plásmidos que albergaban a *ScALT1*, *LkALT1* o *KlALT1* exhibían una actividad específica más alta que la observada en las cepas de tipo silvestre (Figura 5A, C, D, F). Estos resultados pueden atribuirse al número de copias de los plásmidos, puesto que el plásmido YEpKD352 es multicopia y el pRS416 es centromérico (CEN), por lo que se esperan una o dos copias por célula (Sikorski y Hieter, 1989).

Las cepas *Scalt1Δ* transformadas con plásmidos que cargaban a los genes *ScALTI* o *LkALTI* mostraron una actividad específica más alta que la detectada en la cepa silvestre, tanto en extractos provenientes de medios con glucosa-amonio como con glucosa-alanina (Figura 5A, D). Al igual que en la cepa silvestre, la actividad específica de estas cepas transformadas fue mayor en extractos procedentes de un medio suplementado con alanina que con el de sulfato de amonio. La actividad específica de los extractos de la cepa *Scalt1Δ* transformada con *KIALTI* no fue detectable en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 5A, D). Sin embargo, como se describió anteriormente, los plásmidos que albergaban a *KIALTI* fueron capaces de sustituir funcionalmente a *ScALTI* en un medio con alanina como única fuente de nitrógeno (Figura 3A), lo que sugiere que la falta de actividad de transaminasa de alanina, en los extractos preparados a partir de esta cepa en glucosa-sulfato de amonio o glucosa-alanina, se debió a un artefacto *in vitro* que impide la detección de actividad en estos extractos. Se hipotetizó que la proteína de *K. lactis* expresada en *S. cerevisiae* se debe ir a cuerpos de inclusión en el proceso de extracción de proteína total. Sin embargo mas experimentos para probar esta hipótesis deben ser realizados.

En un medio con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno, los extractos de la mutante *Lkalt1Δ* transformada con un plásmido vacío presentaron una actividad específica de transaminasa de alanina equivalente a la encontrada en los extractos de su correspondiente cepa silvestre (Figura 5B). Como se ha observado anteriormente, en *L. kluyveri* la actividad de transaminasa de alanina no es exclusivamente ejecutada por *LkAlt1* (Tabla 2). Por lo tanto, la actividad medida bajo esta condición, en todas las cepas transformadas de *Lkalt1Δ*, corresponde a la suma de las actividades de la enzima heteróloga y de la transaminasa de alanina alternativa. A pesar de que esta otra actividad de transaminasa también está presente en extractos de *Lkalt1Δ* crecidos en alanina, su contribución es menor, al grado que no permitió el crecimiento de la cepa *Lkalt1Δ* transformada con el plásmido vacío pRS416. En este mismo medio catabólico, los extractos de la mutante *Lkalt1Δ* transformada con *LkALTI* presentaron una actividad similar a la detectada en extractos obtenidos a partir de la cepa silvestre, mientras que los obtenidos a partir de *Lkalt1Δ* transformada con *ScALTI* o *KIALTI* presentaron una actividad cuatro veces menor que la observada en la cepa silvestre (Figura 5E), en consonancia con el fenotipo de complementación parcial de estas cepas (Figura 3B).

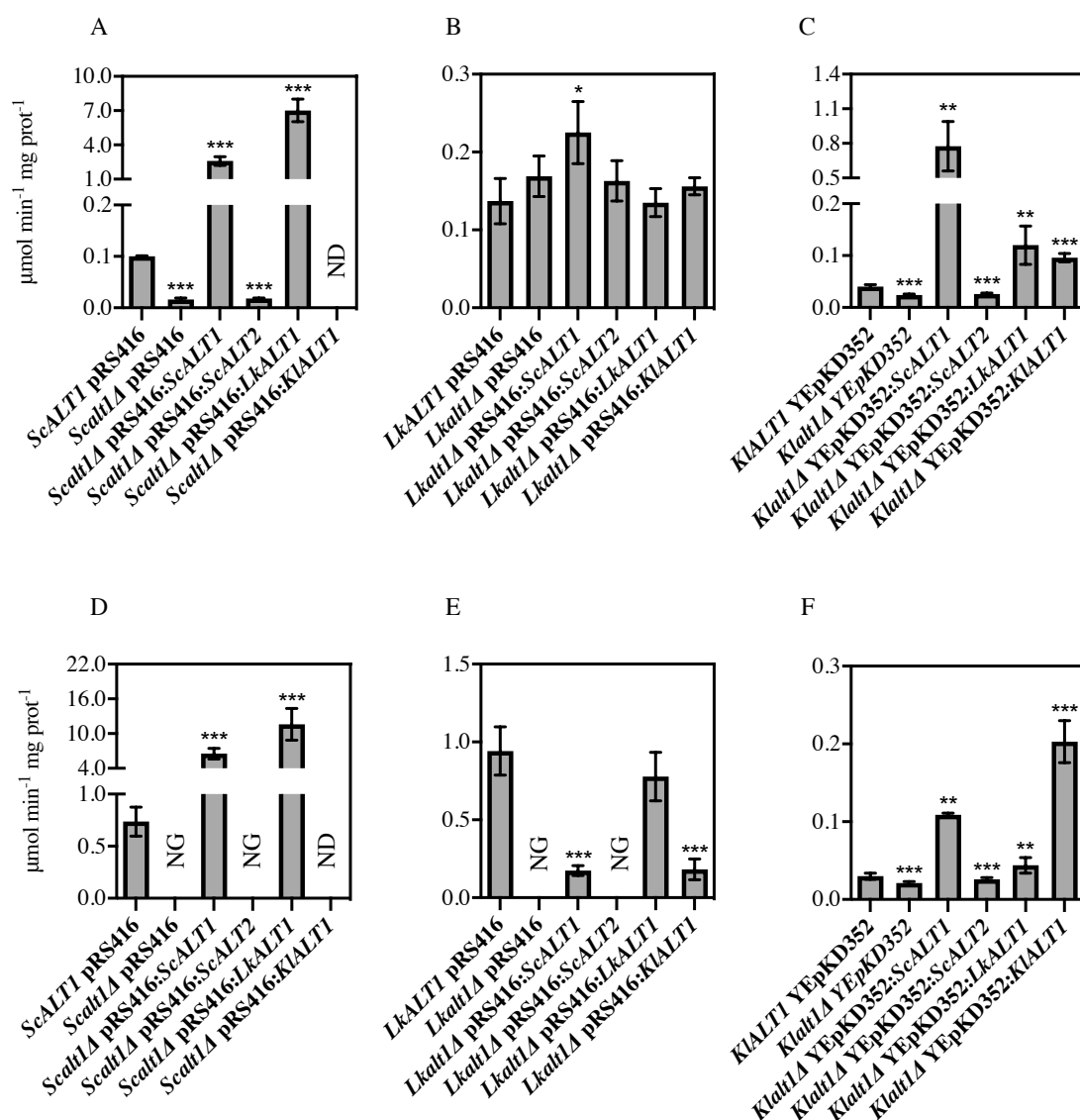


Figura 12. Actividad específica de alanina transaminasa en extractos preparados a partir de cepas complementadas. Extractos celulares de las cepas transformadas de (A) *S. cerevisiae*, (B) *L. kluyveri* y (C) *K. lactis* a partir de cultivos crecidos en medio glucosa-sulfato de amonio o (D), (E) y (F) extractos provenientes de cultivos con glucosa-alanina. La actividad específica se expresa como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$, los valores se presentan como la media \pm DE a partir de tres experimentos independientes. No crece (NG); No detectado (ND).

La actividad en extractos obtenidos a partir de glucosa-amonio o glucosa-alanina de la cepa *Klalt1 Δ* transformada con *ScALT1*, *LkALT1* o *KlALT1* fue mayor que la observada en la cepa silvestre. Todas las mutantes fueron transformadas con plásmidos que contenían el gen *ScALT2* y en la totalidad de los casos se pudo detectar una actividad

igual a la de los controles negativos (Figura 5A-F), congruente con la incapacidad de *ScALT2* para complementar a las cepas *Scalt1Δ*, *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ* (Figura 3 y 4). Este resultado concuerda con lo previamente reportado, que cuando el gen *ScALT2* es sobreexpresado utilizando un promotor TET, se produce un aumento en la concentración de la proteína *ScAlt2*, pero este no conduce a una actividad detectable (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012).

El aumento de la actividad en algunas muestras, debido al número de copias de los plásmidos, en comparación con su respectiva cepa silvestre, no fue seguido por un aumento en la concentración de alanina o una mayor velocidad de crecimiento (Figura 3 y 4), lo que indica que un aumento en la concentración de enzima, no resulta en una mayor producción de alanina, lo que sugiere, que *in vivo* estas enzimas trabajan lejos de su V_{max} , por lo que un aumento en la concentración de proteína no da lugar a un flujo mayor a través de estas enzimas.

5.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.2.1 FORMA OLIGOMERICA Y SENSIBILIDAD A pH

Para investigar las propiedades cinéticas de *LkAlt1* y *KlAlt1*, las enzimas marcadas con un epítopo del aminoácido histamina (*His-tag*) fueron sobreexpresadas heterológicamente en *E. coli*. Después de transformar la cepa Rosetta2 (DE3) con los plásmidos pET28a+:*LkALT1* o pET28a+:*KlALT1*, se determinó la condición óptima de inducción de ambas proteínas, variando la temperatura y el tiempo de inducción. En un gel de poliacrilamida se observó una inducción fuerte de *LkALT1* a 20 °C y 30 °C, tanto 4 horas después de la inducción como después de inducir toda la noche (ON). En el caso de *KlALT1* se indujo a 30 °C durante 4h o ON, en ambos tiempos se observó una fuerte inducción. Para las dos enzimas inducidas ON se obtuvo la mayor parte de la proteína en la fracción soluble (Figura 13A y B) Por lo que las ambas enzimas fueron inducidas a 30 °C ON.

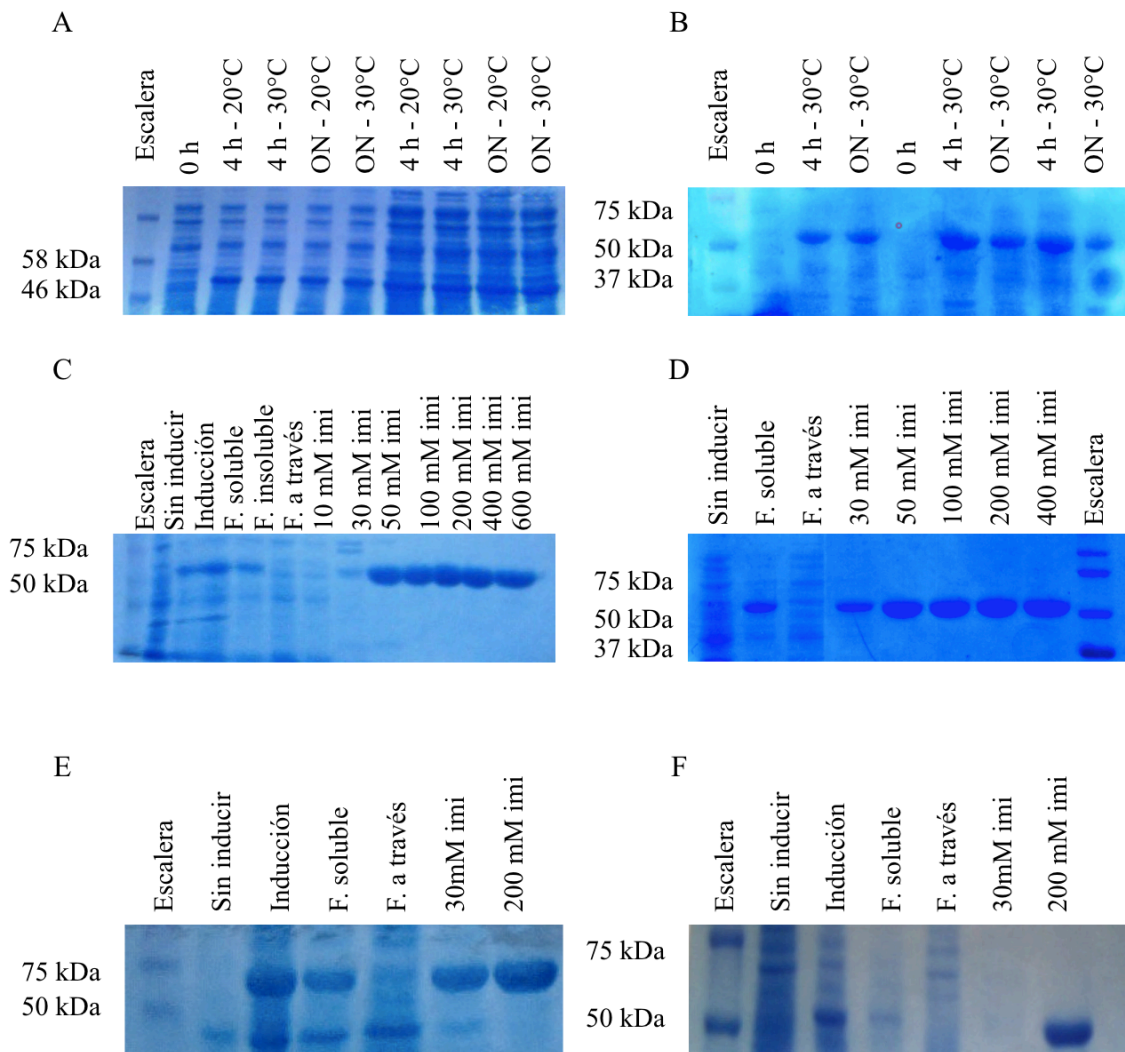


Figura 13. Inducción y purificación de *LkAlt1* y *KlAlt1*. Cantidad de extracto total normalizado por la $OD_{600\text{ nm}}$. Las fracciones insolubles se respuspendieron en el mismo volumen de buffer de lisis que las fracciones solubles. Se cargaron 15 μl A) y B) o 10 μl para C)-F) de cada muestra en gel SDS-PAGE 10%. Se tiñó con azul de coomasie. **A)** inducción de *LkAlt1*; **B)** inducción de *KlAlt1*; **C)** pasos de purificación de *LkAlt1*; **D)** pasos de purificación de *KlAlt1* **E)** purificación de *LkAlt1*; **F)** purificación de *KlAlt1*. Fracción soluble (F. soluble); Fracción insoluble (F. insoluble); Flujo a través de la columna (F. a través); imidazol (imi).

Una vez determinadas las condiciones de inducción, se establecieron las concentraciones de imidazol para lavar y eluir la muestra (Figura 13B y C) con lo que se logró purificar a ambas enzimas a homogeneidad electroforética. Mediante un SDS-PAGE desnaturizante fue posible observar que los monómeros de estas proteínas constan de una masa molecular de aproximadamente 50 kDa, de acuerdo con el valor

deducido a partir de sus secuencias de aminoácidos, que eran 61.16 y 59.23 kDa para *LkAlt1* y *KlAlt1* respectivamente (Figura 13D y E). Las estructuras oligoméricas de la transaminans en general es la de homodímeros con dos sitio activos por dímero, los sitios activos se encuentra en la interface del dímero y ambos monómeros contribuyen con residuos esenciales para la formación de los dos sitios activos. Para corroborar la integridad de las transaminasas de alanina *LkAlt1* *KlAlt1* se realizó un análisis por dispersión de luz de las muestras purificadas (*LkAlt1* 100.1 ± 10.8 kDa y *KlAlt1* 135.9 ± 25.8 kDa) que indicó que la forma activa de ambas enzimas es un homodímero como se esperaba. La actividad enzimática de las enzimas puras se midió en Tris-HCl a valores de pH comprendidos entre 5.5 y 8.5, para las dos enzimas se obtuvo una actividad máxima en un pH cercano a siete. Cabe mencionar que mientras *LkAlt1* fue sensible al pH ácido, *KlAlt1* fue sensible al pH básico (Figura 14).

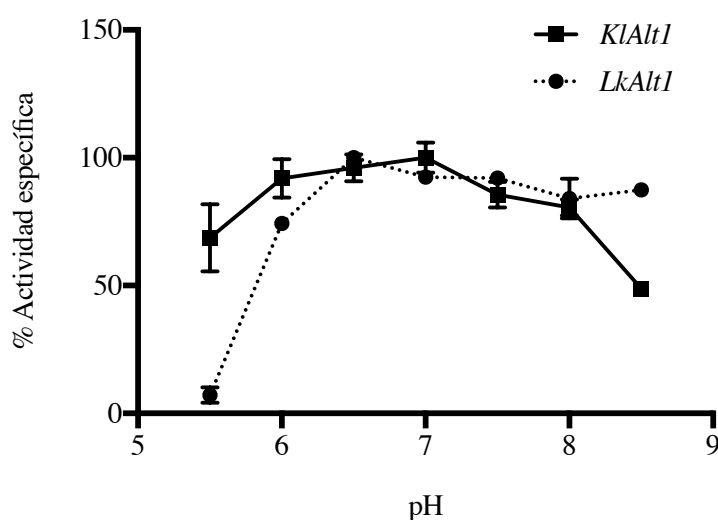


Figura 14. pH óptimo de *LkAt1* y *KlAlt1*. Después de la expresión y purificación heteróloga, se midió la actividad específica de *LkAt1* y *KlAlt1* a diferente pH. Los resultados se presentan como porcentaje de la actividad específica. Los valores se presentan como medias \pm SD de tres experimentos independientes.

5.2.2 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA

Se realizó una caracterización cinética de las enzimas *LkAlt1* y *KlAlt1* en condiciones de velocidad inicial utilizando diferentes concentraciones de α -cetoglutarato y alanina. El patrón resultante de los gráficos de doble recíproco, para ambas proteínas,

correspondió al esperado para enzimas con un mecanismo Ping-Pong (Figura 6A-B). Por lo tanto, los datos fueron ajustados de manera global a una ecuación Ping-Pong (Figura 6C-D). Los parámetros cinéticos obtenidos para *LkAlt1* y *KlAlt1* se presentan en la Tabla 3. Esta caracterización permite establecer que las proteínas ortólogas *LkAlt1* y *KlAlt1* son alanina transaminasas con k_{cat} y k_m similares, en ambos casos la afinidad por el α -cetoglutarato fue mayor que por la alanina (Tabla 3). Resultados previos indican que *ScAlt1* de *S. cerevisiae* también es una transaminasa de alanina (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012) con parámetros cinéticos cercanos a los observados en *LkAlt1* de *L. kluyveri* y en *KlAlt1* de *K. lactis* (Datos no publicados).

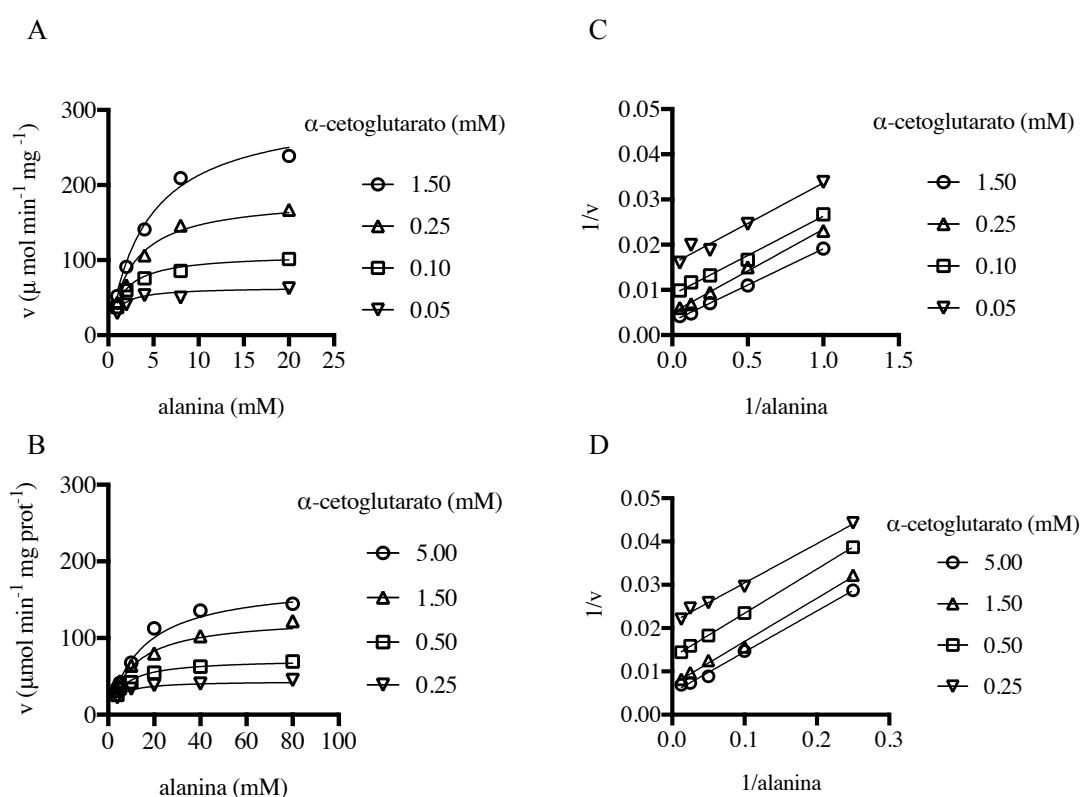


Figura 15. *LkAlt1* y *KlAlt1* son alanina transaminasas con un mecanismo de reacción ping pong. Las velocidades iniciales se midieron a diferentes concentraciones de alanina y α -cetoglutarato. Dobles recíprocos de (A) *LkAlt1* y (B) *KlAlt1*. Ajuste global de (C) *LkAlt1* y (D) *KlAlt1* a la ecuación ping pong. Los parámetros cinéticos correspondientes se muestran en la Tabla 3.

Table 3. Parámetros cinéticos de *L. kluyveri* LkAlt1 y *K. lactis* KlAlt1.

Enzima	kcat (s ⁻¹)	ka (mM)	kb (mM)	R ²
LkAlt1	355 ± 16.4	4.88 ± 0.5	0.22 ± 0.02	0.98
KlAlt1	203 ± 7.5	17.3 1.3	0.92 ± 0.08	0.98

Los Datos fueron ajustados a la ecuación para enzimas con un mecanismo ping pong. ka representa la km por alanina y kb la km for α -ketoglutarato \pm DE.

5.3 REGULACION TRANSCRIPCIONAL

5.3.1 PERFIL DE EXPRESIÓN

En *S. cerevisiae* los genes *ScALT1* y *ScALT2* muestran perfiles de expresión opuestos. Un análisis previo reveló que el perfil de expresión de *ScALT1* se asemeja al de un gen catabólico, cuya expresión se induce en presencia de alanina. Por el contrario en *ScALT2* se observa un patrón de expresión opuesto, el cual se reprime cuando hay alanina en el medio de cultivo (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012). Para investigar si el patrón de expresión de *LkALT1* y *KlALT1* era similar al de *ScALT1* o al de *ScALT2*, se realizó un análisis tipo *Northern blot* con muestras obtenidas a partir de cultivos de las cepas tipo silvestre en glucosa-amonio o glucosa-alanina, en diferentes fases de crecimiento (exponencial temprana, exponencial y diauxica).

El gen *LkALT1* se encontró reprimido en un medio con sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno y se indujo cuando la alanina fue la única fuente de nitrógeno (Figura 16A), similar al perfil de expresión reportado para el gen *ScALT1* (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012). *KlALT1* mostró una expresión constitutiva, se expresó de manera similar en ambas condiciones, glucosa-sulfato de amonio y glucosa-alanina (Figura 16B). La actividad enzimática siguió el mismo patrón que el perfil de expresión observado para los dos genes ortólogos *LkALT1* y *KlALT1* (Tabla 2).

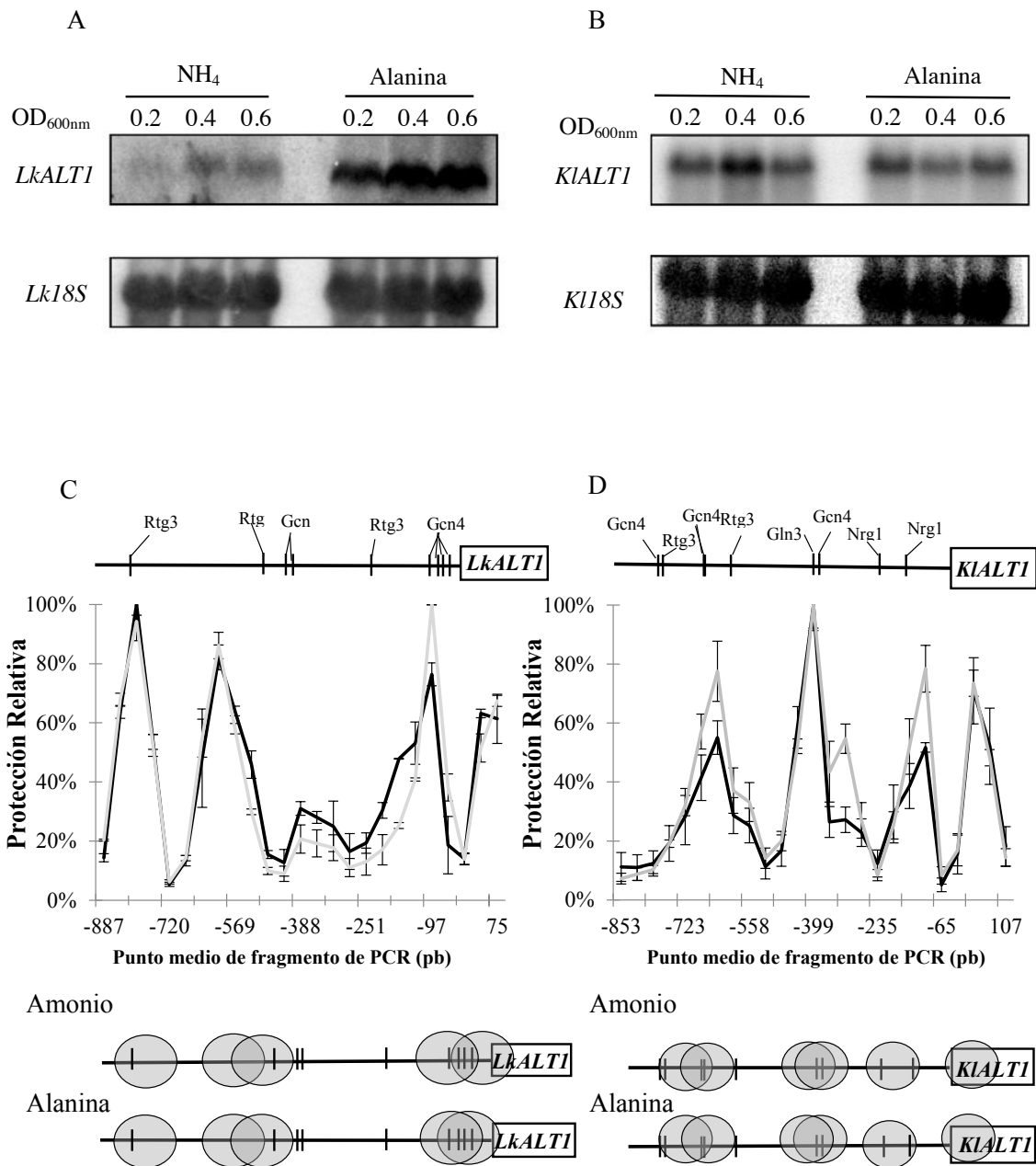


Figura 16. Perfil de expresión y posicionamiento de nucleosomas de *LkALT1* y *KIALTI*. El análisis tipo Northern blot mostró el perfil de expresión de *LkALT1* (A) y *KIALTI* (B) en glucosa-sulfato de amonio o glucosa-alanina. En ambos casos se usó como control de carga el RNA ribosomal *Lk18S* o *K118S* 1. Para determinar la organización de los nucleosomas en los promotores de *LkALT1* y *KIALTI*, se realizó un análisis del posicionamiento de nucleosomas, *Nucleosome Scanning Assay* (NuSA), las células se procesaron para obtener esferoplastos y fueron incubadas con MNasa. Los fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión con MNasa se analizaron por PCR cuantitativo (qPCR). (C) Promotor del gen *LkALT1* en glucosa-amonio (línea negra) o glucosa-alanina (línea gris); y (D) Ensayo de posicionamiento de nucleosomas (NuSA) sobre el promotor del gen *KIALTI* en glucosa-amonio (línea negra) o glucosa-alanina (línea gris); Los nucleosomas se muestran como óvalos grises y las líneas verticales muestran sitios de unión al DNA. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

5.3.1 ANÁLISIS DE LA ORGANIZACIÓN DE LOS PROMOTORES (NuSA)

Para determinar la organización de los nucleosomas en los promotores de *LkALT1* y *KIALTI*, se realizó un análisis del posicionamiento de nucleosomas, *Nucleosome Scanning Assay* (NuSA) en muestras obtenidas de cultivos en fase de crecimiento exponencial (OD_{600nm} 0.3) provenientes de medios con sulfato de amonio o alanina, como únicas fuentes de nitrógeno. Después de que la interacción DNA-nucleosoma se fijó con formaldehído, las células se procesaron para obtener esferoplastos y fueron incubadas con MNasa. Los fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión con MNasa se analizaron por PCR cuantitativo (qPCR). Para la normalización se utilizaron los locus *LkVCX1* de *L. kluyveri* (SAKL0F09878g), y *KIVCX1* de *K. lactis* (KLLA-ORF439) (Infante *et al.*, 2011). El posicionamiento de nucleosomas fue similar en los promotores de *LkALT1* y *KIALTI* cuando las células fueron crecidas en sulfato de amonio o alanina (Figura 16C y D), lo que indica que el diferente perfil de expresión observado en el gen *LkALT1* en sulfato de amonio o alanina no está relacionado con la organización de la cromatina (Figura 16A). Como se esperaba para *KIALTI*, que mostró una expresión equivalente en los medios estudiados, el análisis tipo NuSA mostró una organización de los nucleosomas similar en ambas condiciones de crecimiento (Figura 16D).

Dado que el posicionamiento de los nucleosomas no cambió en ninguno de los promotores ensayados, puede plantearse la hipótesis de que los factores transcripcionales implicados en la regulación transcripcional de *LkALT1* y *KIALTI* deben tener sitios de unión en una región libre de nucleosomas (NFR). En consecuencia, se realizó un análisis "*in silico*" de las cajas de unión de factores transcripcionales presentes en los promotores de *LkALT1* y *KIALTI* (www.yeasttract.com/), considerando las secuencias conservadas y consenso de los factores de transcripción conocidos para *S. cerevisiae*. En ambos promotores se encontraron elementos *cis* para Gcn4 y Rtg3 en regiones libres o protegidas por nucleosomas, además, en la región promotora de *KIALTI* se encontró una secuencia para Nrg1. Este análisis sugiere que *LkALT1* podría ser regulado por la acción combinada de los factores transcripcionales ortólogos Gcn4 y Rtg3 presentes en *L. kluyveri*, mientras que para *KIALTI* también se combina a Nrg1. Sin embargo, es necesaria una investigación mas profunda para determinar si los

reguladores predichos están involucrados en la regulación transcripcional de los genes *LkALT1* y *KlALT1*.

6. DISCUSIÓN

6.1 UN ACERCAMIENTO A LA EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO DE ALANINA

De las tres levaduras que se utilizaron como modelos experimentales en este trabajo, *K. lactis* fue la primera que divergió del linaje que conduce a *S. cerevisiae* (Marcet-Houben y Gavaldon, 2015, Huerta-Cepas *et al.*, 2014, Merico *et al.*, 2007), por lo que se puede considerar que esta levadura representa apropiadamente la fisiología del progenitor denominado *KLE*. En *K. lactis* el metabolismo de la alanina se realiza por más de una vía; A través de la transaminasa de alanina codificada por *KIALTI*, y probablemente por otra transaminasa de alanina aún no identificada. Sin embargo, la existencia de otras vías alternativas implicadas en el metabolismo de la alanina no pueden descartarse, por ejemplo, la glutamina transaminasa, que se sabe que existe en *S. cerevisiae* (Soberón y González, 1987), podría participar en la biosíntesis de alanina produciendo alanina y α -acetoglutarato a partir de piruvato y glutamina. En *K. lactis*, la expresión de *KIALTI* y la actividad enzimática que este gen codifica, es equivalente en condiciones biosintéticas y catabólicas. Además, la actividad de la transaminasa de alanina *KlAlt1* detectada, es similar a la observada en una mutante *Klalt1Δ* en los dos medios estudiados, lo que sugiere que *KlAlt1* está igualmente especializada en la biosíntesis de alanina que en su catabolismo. No obstante, mientras que en condiciones biosintéticas una cepa *Klalt1Δ* muestra una velocidad de crecimiento tipo silvestre, en un medio con alanina como única fuente de nitrógeno, esta cepa muestra una reducción en la velocidad específica de crecimiento, indicando que la o las vías alternativas implicadas en el catabolismo de alanina no pueden sustituir cabalmente el papel de *KlAlt*.

Además de *K. lactis*, *L. kluyveri* también se puede considerar una levadura tipo ancestral (*KLE*). En *L. kluyveri*, la biosíntesis y el catabolismo de alanina son llevados a cabo por más de una vía, ya que una mutante *Lkalt1Δ* es capaz de crecer en amonio o alanina como únicas fuentes de nitrógeno. En *L. kluyveri* la expresión *LkALTI* aumenta cuando se proporciona alanina como única fuente de nitrógeno, lo que resulta en una

mayor actividad de transaminasa de alanina, lo que constituye una especialización del papel catabólico en *LkALT1*. Además, en esta condición, la actividad de transaminasa de alanina independiente de *LkAlt1* disminuye, delegando el papel principal en el catabolismo de alanina a *LkAlt1*.

En *S. cerevisiae* la biosíntesis de alanina es redundante, pues una mutante *Scalt1Δ* presenta una velocidad específica de crecimiento silvestre, a pesar de que la concentración de alanina de esta mutante se reduce alrededor de un 70%. El patrón de expresión observado en el gen *LkALT1*, que favorece su papel catabólico, fue mantenido por *ScALT1*, pero la especialización en el catabolismo de alanina aumentó al grado en que la o las vías alternativas implicadas en el catabolismo de alanina presentes en *K. lactis* y *L. kluyveri* se perdieron en *S. cerevisiae*, por lo que *ScAlt1* es la única enzima capaz de catabolizar la alanina en esta levadura.

No es de extrañar que la especialización de *ScAlt1* y *LkAlt1* hacia el catabolismo de alanina se logró mediante un cambio en el patrón de expresión de estos genes, ya que las constantes de equilibrio de las transaminasas son cercana a uno, por lo tanto, la dirección de la reacción depende en gran medida de la concentración de sustratos y de productos. Y dado el mecanismo enzimático de la reacción, la modificación en los parámetros cinéticos de la enzima afectaría en la misma proporción la dirección biosintética y catabólica de la reacción (Nisonoff *et al.*, 1953). Podría considerarse que la especialización hacia el catabolismo de estas enzimas es importante para mejorar su carácter anaplarótico, que les permite suministrar piruvato al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Land, 2002). Esta propiedad anaplerótica de las alanina transaminasa parece ser menos importante para *K. lactis* que para *S. cerevisiae* y *L. kluyveri*, ya que el metabolismo de *K. lactis* es constitutivamente respiratorio (Breunig *et al.*, 2000) mientras que el de *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* es facultativo (Merico *et al.*, 2007, Moller *et al.*, 2002). Por lo tanto, la especialización catabólica de *L. kluyveri* y *S. cerevisiae* llegó al extremo en el que *S. cerevisiae* perdió las vías alternativas para el catabolismo de alanina presentes tanto en *L. kluyveri* como en *K. lactis*.

Sin embargo, la especialización del carácter catabólico no afectó el papel biosintético desempeñado por estas tres enzimas, que contribuyen con al menos la mitad de la poza de alanina, incluso cuando en las tres especies existe más de una vía para la biosíntesis

de alanina. Esta redundancia en el metabolismo de alanina también se encuentra en *E. coli*, donde la alanina es sintetizada por tres transaminasas diferentes, y sólo la triple mutante es auxotrofa de alanina (Yoneyama *et al.*, 2011). En este sentido, es importante considerar que en *E. coli* la alanina constituye el segundo aminoácido con mayor concentración, y en *Neurospora* y *S. cerevisiae* es el aminoácido que presenta la concentración intracelular más alta (Yuan *et al.*, 2006; Kim *et al.* Al., 2011, Canelas *et al.*, 2008). Aunque no existe información en cuanto a la concentración de aminoácidos libres para *L. kluyveri* y *K. lactis*, los resultados presentados en este trabajo indican que la alanina podría constituir uno de los aminoácidos con mayor concentración en estas levaduras. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la alanina podría desempeñar un papel importante, además del de formar parte de las proteínas, como se ha demostrado para otros aminoácidos (Binda *et al.*, 2009, Crespo y Hall, 2002, Stephen y Jamieson, 1997, Eisler *et al.* Al., 2004, Takagi *et al.*, 1997).

6.2 LA HISTORIA EVOLUTIVA DE *ScALT2*

Aunque el grupo taxonómico más cercano a *ScALT2* es el clado *KLE*, *ScAlt2* no es una transaminasa alanina, ni muestra la función alternativa codificada por *LkALT1* y *KlALT1*. Un análisis estructural que comparó las secuencias de *ScAlt1* y *ScAlt2* demostró que *ScAlt2* ha conservado el sitio de unión para la alanina y el piridoxal-5-fosfato, que es la coenzima que permite la actividad de transaminasa (Gracia-Campusano, 2009). Juntos, estos datos indican que en la cepa parental *KLE* la forma ancestral de *ScALT2* codificaba para una transaminasa de alanina. Por lo tanto, puede considerarse que cuando se formó el híbrido, la cepa parental *KLE* contribuyó con al menos dos transaminasas de alanina, una de ellas era la forma ancestral de *ScALT2* y otra codificada por un gen todavía no identificado, pero que codifica para la actividad de transaminasa presente en las mutantes *Lkalt1Δ* y *Klalt1Δ*. Además, la cepa parental *ZT* proporcionó al menos una tercera alanina transaminasa, la forma ancestral de *ScALT1*, que probablemente ya estaba especializada hacia el catabolismo de alanina, a través de la expresión génica, puesto que esta tendencia ya está presente en *L. kluyveri* *LkALT1*. La especialización de *ScALT1* hacia el catabolismo de alanina y su contribución a la biosíntesis de alanina, no sólo relajó la presión selectiva sobre la

conservación de la vía catabólica alternativa, proporcionada por el progenitor *KLE*, sino que también relajó la necesidad de conservar la función de transaminasa de alanina codificada por *ScALT2*. Por lo tanto, la divergencia entre *ScALT1* y *ScALT2* se podría explicar por tres diferentes modelos el de pérdida de función, el de subfuncionalization o el de neofunctionalization.

El escenario proporcionado por el modelo de pérdida de función es el más improbable, ya que el promotor *ScALT2* ha retenido la capacidad de responder a la concentración de alanina y se sintetiza una proteína soluble completa aunque sin actividad transaminasa (Peñalosa-Ruiz *et al.*, 2012). Si la divergencia entre *ScALT1* y *ScALT2* hubiera ocurrido mediante una subfuncionalización, se podría esperar que la actividad transaminasa presente en *LkAlt1* y en *KlAlt1* sólo hubiera sido retenida por *ScAlt1* y perdida por *ScAlt2*, como se muestra en este trabajo; Mientras que la función alternativa codificada por *LkALT1* y *KlALT1* habría sido delegada a *ScALT2* y perdida de *ScALT1*, lo cual no es consistente con el resultado que muestra que *ScAlt2* no complementa a la mutante *Lkalt1Δ*. Finalmente, en un modelo de neofuncionalización, se esperaría que la función *ScAlt2* estuviera ausente en *ScALT1*, *LkALT1* y *KlALT1*. Los datos aquí presentados apoyan este último escenario, sin embargo, se necesitan más estudios para comprender el papel de *ScAlt2* y para distinguir entre los tres escenarios presentados anteriormente.

6.3 EL PAPEL DE LOS GENES DUPLICADOS

Se ha hipotetizado que la duplicación del genoma ocurrió a finales del Cretácico, (sin embargo a la luz de la aloploidización se debe re-evaluar esta cronología) lo que coincide con el expansion de las plantas angiospermas (plantas con frutas), esta expansión significo un aumento de azúcares en el medio ambiente. Se ha propuesto que esto promovió una feroz competencia entre levaduras y diferentes bacterias por los relativamente nuevos azúcares, y que la poliploidización permitió a estas levaduras hacerse independientes del oxígeno y liberar etanol al medio, así conquistando un nuevo nicho. Pero probar esta hipótesis no ha resultado sencillo (Merico *et al.*, 2007 and Piskur *et al.*, 2001).

A pesar de la extensa investigación sobre el papel funcional de los genes duplicados en la levadura, no se ha llegado a un consenso general hasta la fecha, más que el que la mayoría de las funciones metabólicas codificadas por los genes provenientes de la WGD (ahora establecida como una hibridación) son importantes hoy en día y también fueron importantes en el momento de la duplicación (DeLuna *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados de los análisis globales no han proporcionado ninguna evidencia de una función predominante que mantenga a los genes duplicados en el genoma de *S. cerevisiae*, al contrario, estos estudios sugieren que son las características específicas adquiridas por las parejas de parálogos las que han sido seleccionadas (Kuepfer *et al.*, 2005). Por esta razón la caracterización funcional de las parejas de parálogos así como de sus genes tipo ancestral resulta valiosa para generar información sobre las características peculiares que estos duplicados han adquirido después de su duplicación y que son fácilmente pasadas por alto en los análisis globales.

7.

ANEXOS

ANEXO 1

Oligonucleótidos Utilizados en Este Trabajo

Nombre	Secuencia	Aplicación
X1	ATTCATCTCACTTTCTTCTC GCAACACC	<i>Lkalt1Δ</i> 5' módulo para delección
X2	CCC CTT CGT TCC CTA GTC ACT CCT TTC GGG TTA ATT AAG GCG CGC CAG	<i>Lkalt1Δ</i> 5' módulo para delección, en negritas extremo 5' del marcador de selección kanMX4
X3	CGGGTT AAT TAA GGC GCG CCA G	<i>Lkalt1Δ</i> kanMX4 módulo para delección
X4	CCAGTGTCGAAAACGAGCTC G	<i>Lkalt1Δ</i> kanMX4 módulo para delección
X5	CCAGTGTCGAAAACGAGCT CGAGTCTCAGAACCTTTTT TTAAGACGCTTG	<i>Lkalt1Δ</i> 3' módulo para delección, en negritas extremo 3' del marcador de selección kanMX4
X6	GCAGTCTAGGCAGGGATAGT AGGAATT	<i>Lkalt1Δ</i> 3' módulo para delección
X7	ATTAGCAGAGTGAGTGTTGT CCCTC	<i>Lkalt1Δ</i> fusión de módulos
X8	CCATATTTCAAGCACATGCC C	<i>Lkalt1Δ</i> fusión de módulos
X9	AAACCCTCCACCAGCATAAG TTC	<i>Lkalt1Δ</i> 5' confirmación
X10	ATT ACG GCT CCT CGC TGC AG	<i>Lkalt1Δ</i> 5' confirmación
X11	TGATTTTGATGACGAGCGTAA T	<i>Lkalt1Δ</i> 3' confirmación
X12	GGGTGACAACCACACAAATC TAGAG	<i>Lkalt1Δ</i> 3' confirmación
X13	AAAGTACCATAACGTGAACC GGG	<i>Klalt1Δ</i> 5' módulo para delección

Nombre	Secuencia	Aplicación
X14	GCCTTAATTAACCCGGGGATC CGTCGACCTGCAGCGTACGC AGTGTCAGAAGTGGGAGA ATTCC	<i>Klalt1Δ</i> 5' módulo para delección, en negritas extremo 5' del marcador de selección kanMX4
X15	GGAATTCTCCCACTTCTGA CACTGCGTACGCTGCAGGTC GAC	<i>Klalt1Δ kanMX4</i> módulo para delección, en negritas extremo 5' de <i>KLALT1</i> .
X16	TTGAAGTGGATGATGAAGCA TGCTCAGGCATACCCAGAAC ATCGATGAATTCGAGCTCG T	<i>Klalt1Δ kanMX4</i> módulo para delección, en negritas extremo 3' de <i>KLALT1</i> .
X17	CGAGCTCGAATTCATCGAT GTTCTGGGTATGCCTGAGCAT GC	<i>Klalt1Δ</i> 3' módulo para delección, en negritas extremo 3' del marcador de selección <i>kanMX4</i>
X18	TATCAAGGGAACGACAACAC GGACG	<i>Klalt1Δ</i> 3' módulo para delección
X19	GGCTTACTGCTGCTAAATCGC	<i>Klalt1Δ</i> 5' confirmación
X20	ATTACGGCTCCTCGCTGCAG	<i>Klalt1Δ</i> 5' confirmación
X21	GGCTCTGAGTAGATTCTCTTT GG	<i>Klalt1Δ</i> 3' confirmación
X22	GCCTCGGTGAGTTTTCTCCT	<i>Klalt1Δ</i> 3' confirmación
X23	CGACGGTATCGATAAGCTT GATATCGGGCACCATTATCAT CACCATAC AAGTCG	pRS416: <i>ScALT1</i> , en negritas región homóloga a pRS416
X24	GCATCTTCGCTTCTCTATGCC ATG TTTCCCACTAGTTCTAGAGC GGCC GCCA	pRS416: <i>ScALT1</i> , en negritas región homóloga a pRS416
X25	GCGCGCGGTACCTGCTAGCG GCAC CATTATCATCACC	YEpKD352: <i>ScALT1</i> , en negritas sitio de restricción para KpnI
X26	CTTACCAATGGCACCTAACTT TGC GTCGACGCGCGC	YEpKD352: <i>ScALT1</i> , en negritas sitio de restricción para Sall
X27	GCGCGCGAATTCGCTGAAG ACGTT CAACTCACC	pRS416: <i>ScALT2</i> y YEpKD352: <i>ScALT2</i> , en negritas sitio de restricción para EcoRI

Nombre	Secuencia	Aplicación
X28	CATGCATCATTCTTTACTAAG GGGGAT CCGCGCGC	pRS416: <i>ScALT2</i> y YEpKD352: <i>ScALT2</i> , en negritas sitio de restricción para BamHI
X29	GCAC GAGCT CCCAAGTATTT TTCATGTCAAGTC	pRS416: <i>LkALT1</i> y YEpKD: <i>LkALT1</i> , en negritas sitio de restricción para SacI
X30	CCATAAATTCAATTACAGTAA AG GAGCT CGTGC	pRS416: <i>LkALT1</i> y YEpKD: <i>LkALT1</i> , en negritas sitio de restricción para SacI
X31	CGCGCG GGTACCAAT CGGCTAATT CGAGTACTGGC	pRS416: <i>KlALT1</i> y YEpKD: <i>KlALT1</i> , en negritas sitio de restricción para KpnI
X32	CGAATCATGATCAAGCAACA CATA CGG TCGAC CGCGCG	pRS416: <i>KlALT1</i> y YEpKD: <i>KlALT1</i> , en negritas sitio de restricción para Sall
X33	GCGCGCG CTAG CATGTATAA GTTCCAACCTGCTGATAAGC	<i>LkALT1</i> His-tag, en negritas sitio de restricción para NheI
X34	CCTTCTTTGACAAGTACCGT GATTAG CTCGAG CGCGCG	<i>LkALT1</i> His-tag, en negritas sitio de restricción para XhoI
X35	GCGCGCC ATATG ACTGTGAA ACCAGCTCCAAAGC	<i>KlALT1</i> His-tag, en negritas sitio de restricción para NdeI
X36	CCTTCTTTGACAAGTACCGT GATTAG CTCGAG GCGCGC	<i>KlALT1</i> His-tag, en negritas sitio de restricción para XhoI
X37	TGACATGTTAGAGGAGATTC CTCGC	<i>LkALT1</i> sonda para Northern blot
X38	CCACCAACCCTGAAGAGATC GAA	<i>LkALT1</i> sonda para Northern blot
X39	TGCTTACTCTCAATCACAGG G	<i>KlALT1</i> sonda para Northern blot
X40	CCTCAAGGTGCCATGTACCT	<i>KlALT1</i> sonda para Northern blot
X41	AAGCTCGTAGTTGAACTTTG GGTCTGG	<i>Lk18S</i> y <i>Kl18S</i> sonda para Northern blot
X42	CGGCACCTTACGAGAAATCA AAGTCTT	<i>Lk18S</i> and <i>Kl18S</i> sonda para Northern blot

ANEXO 2

Oligonucleótidos Utilizados Para Ensayo de NuSA Sobre Promotor de *LkALTI*

Nombre	Secuencia	Aplicación
E1	Fw AAT CAT GAC CCG AGG TCT TAC Rv AAA GTA CAC GCC ATT CAA GCA	-940 a -834
E2	Fw ACC ACA CTC ACT GAG CAA G Rv TAG TGA TAA ACG TCT GGT ACA G	-890 a -789
E3	Fw TGC TTG AAT GGC GTG TAC TTT Rv CAA GAA AGA AGC TGT TAG TGT CA	-854 a -755
E4	Fw CTG TAC CAG ACG TTT ATC ACT A Rv TCT TGA GAA CAC TGG TTG CAC	-810 a -711
E5	Fw TGA CAC TAA CAG CTT CTT TCT TG Rv CTG TCG GTA AGA ACG TTG TAT	-777 a -664
E6	Fw GTG CAA CCA GTG TTC TCA AGA Rv TGG GTT TTC GTA GTT TTT AGT GC	-731 a -630
E7	Fw ATA CAA CGT TCT TAC CGA CAG Rv GTT GTT GTT TTT TCA TTT TTC CAC G	-684 a -593
E8	Fw GCA CTA AAA ACT ACG AAA ACC CA Rv ATG TAT CGC TCG AGC CAG T	-652 a -554
E9	Fw CGT GGA AAA ATG AAA AAA CAA CAA C Rv ACC TCT TTT CTC GGC TGT GT	-617 a -521
E10	Fw ACT GGC TCG AGC GAT ACA T Rv GTA TAT GGG AGA AAG AGA AGC	-572 a -471
E11	Fw ACA CAG CCG AGA AAA GAG GT Rv CTG TAT GAA AGT AGT AGA AGC G	-540 a -438

Nombre	Secuencia	Aplicación
E12	Fw GCT TCT CTT TCT CCC ATA TAC Rv CTC TAT ACG GCT CGT TCT GTA	-492 a -395
E13	Fw CGC TTC TAC TAC TTT CAT ACA G Rv ACT GCC TTG CCG TTT TTC C	-459 a -361
E14	Fw TAC AGA ACG AGC CGT ATA GAG Rv TGT TCA ATC AGC GAC GGC T	-415 a -312
E15	Fw GGA AAA ACG GCA AGG CAG T Rv CTT CAA AGG GCG CCT ATT GTA	-379 a -280
E16	Fw AGC CGT CGC TGA TTG AAC A Rv TGC CAA GAT TGT ACC AGT AGA A	-330 a -239
E17	Fw TAC AAT AGG CGC CCT TTG AAG Rv GTA CTT GCC GGA CAA AAC CA	-300 a -201
E18	Fw TTC TAC TGG TAC AAT CTT GGC A Rv AAT TGA AAC GAT TTT TGT CGA TGT T	-260 a -173
E19	Fw TGG TTT TGT CCG GCA AGT AC Rv TAA CGG AAA GGA GGA GAA ATC T	-220 a -122
E20	Fw AAC ATC GAC AAA AAT CGT TTC AAT T Rv CCG TGA AAA GGC GTG AAA AAT TT	-197 a -85
E21	Fw AGA TTT CTC CTC CTT TCC GTT A Rv AAC GAA GGG GTG GGA CGT	-143 a -51
E22	Fw AAA TTT TTC ACG CCT TTT CAC GG Rv TGA CGA GAG TTG TTT GCG TGA	-107 a -11
E23	Fw ACG TCC CAC CCC TTC GTT Rv GCA TTC TTA AGC TAG GAG TTC T	-68 a +40
E24	Fw TCA CGC AAA CAA CTC TCG TCA Rv TAG CGA TAT TAC CAG CAG TAG	-31 a +70

Nombre	Secuencia	Aplicación
E25	Fw AGA ACT CCT AGC TTA AGA ATG C Rv TAT AGG GCA CAA AGT TCG ACG	+19 a +130

ANEXO 3

Oligonucleótidos Utilizados Para Ensayo de NuSA Sobre Promotor de *KLALI*

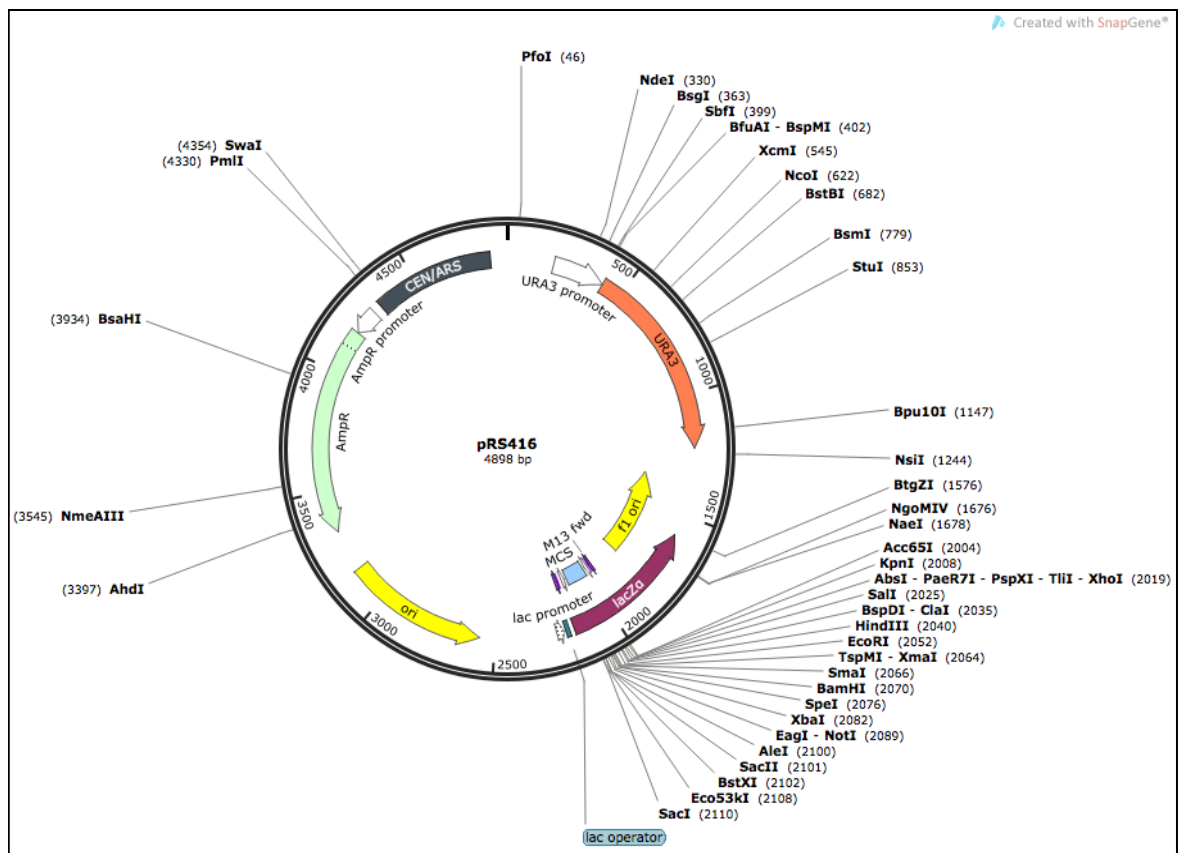
Name	Sequence	Application
F1	Fw TTC ACG ACA CTG TAT TAA GCG TA Rv ATT TTG CGG GTA TCT TGT TGC AA	-903 a -802
F2	Fw CTT AAG GTG GAA AGT CGG AAG Rv CTC GGT GTA GAT ACT ATT TAA CC	-860 a -769
F3	Fw TTG CAA CAA GAT ACC CGC AAA AT Rv AGG ACT GAT AGA AAA GTG GAC A	-824 a -731
F4	Fw GGT TAA ATA GTA TCT ACA CCG AG Rv AAA GTA AGC ATC AAC CGC CCA	-791 a -693
F5	Fw TGT CCA CTT TTC TAT CAG TCC T Rv GGC ATT GCA CAT CAA GGG TT	-752 a -655
F6	Fw TGG GCG GTT GAT GCT TAC TTT T Rv GCA AAA TAG TGC TGT AAG GAA AA	-713 a -620
F7	Fw AAC CCT TGA TGT GCA ATG CC Rv GCT CAT CAT TTT GAA TAT AAC AAT TG	-674 a -584
F8	Fw TTT TCC TTA CAG CAC TAT TTT GC Rv TGG GAC TGT GTT GAT CTG AAA T	-642 a -542
F9	Fw CAA TTG TTA TAT TCA AAA TGA TGA GC Rv AGC CTT AAA CCC AAA AGA AAA ACT A	-612 a -504
F10	Fw ATT TCA GAT CAA CAC AGT CCC A Rv GTA ACC CTT TAT CTT TTT TTT TCC T	-563 a -461

Name	Sequence	Application
F11	Fw TAG TTT TTC TTT TGG GTT TAA GGC T Rv ATG GAG GCA AGG ATT CAA AGT AT	-528 a -428
F12	Fw AGG AAA AAA AAA GAT AAA GGG TTA C Rv TAA TAG CGT AGT CCC GTC TTG A	-485 a -381
F13	Fw ATA CTT TGA ATC CTT GCC TCC AT Rv ACA ACT GTA CGT AAC AAA TGA ACA	-450 a -347
F14	Fw TCA AGA CGG GAC TAC GCT ATT A Rv CTG ATA ACG AAA AAC TAA AAA GTG	-402 a -293
F15	Fw TGT TCA TTT GTT ACG TAC AGT TGT Rv AAA AGA TGG AAT GGC TGA CCA	-370 a -270
F16	Fw CAC TTT TTA GTT TTT CGT TAT CAG Rv TCT TCT TTT TCT TTC AGT GTC AGA	-316 a -209
F17	Fw TGG TCA GCC ATT CCA TCT TTT Rv AAT GTA TTC TCG ACC TAT AGG A	-290 a -179
F18	Fw TCT GAC ACT GAA AGA AAA AGA AGA Rv AAA ATT CGC CCA ACT AAA TCT CGA	-232 a -126
F19	Fw TCC TAT AGG TCG AGA ATA CAT T Rv ACT AAA CGA GTA ACA GGA AAA C	-200 a -101
F20	Fw TCG AGA TTT AGT TGG GCG AAT TTT Rv AGC CAA ATT CCT CTC GAA GCT	-149 a -64
F21	Fw GTT TTC CTG TTA CTC GTT TAG T Rv AGT GTT TGA TGG AAA GCT CTT AAC	-122 a -7
F22	Fw AGC TTC GAG AGG AAT TTG GCT Rv AGT TAA CTC TGA CAG ACA ACA TCT	-84 a +22
F23	Fw GTT AAG AGC TTT CCA TCA AAC ACT Rv AAA GCT GGA GCA TTG ACT CTA	-30 a +71

Name	Sequence	Application
F24	Fw AGA TGT TGT CTG TCA GAG TTA ACT Rv TAA ACT TGT TAC AGA AGG CAT TGT	-2 a +102
F25	Fw TAG AGT CAA TGC TCC AGC TTT Rv TAA CAT CAT CTA GCG AAA GCT TTG	+50 a +163

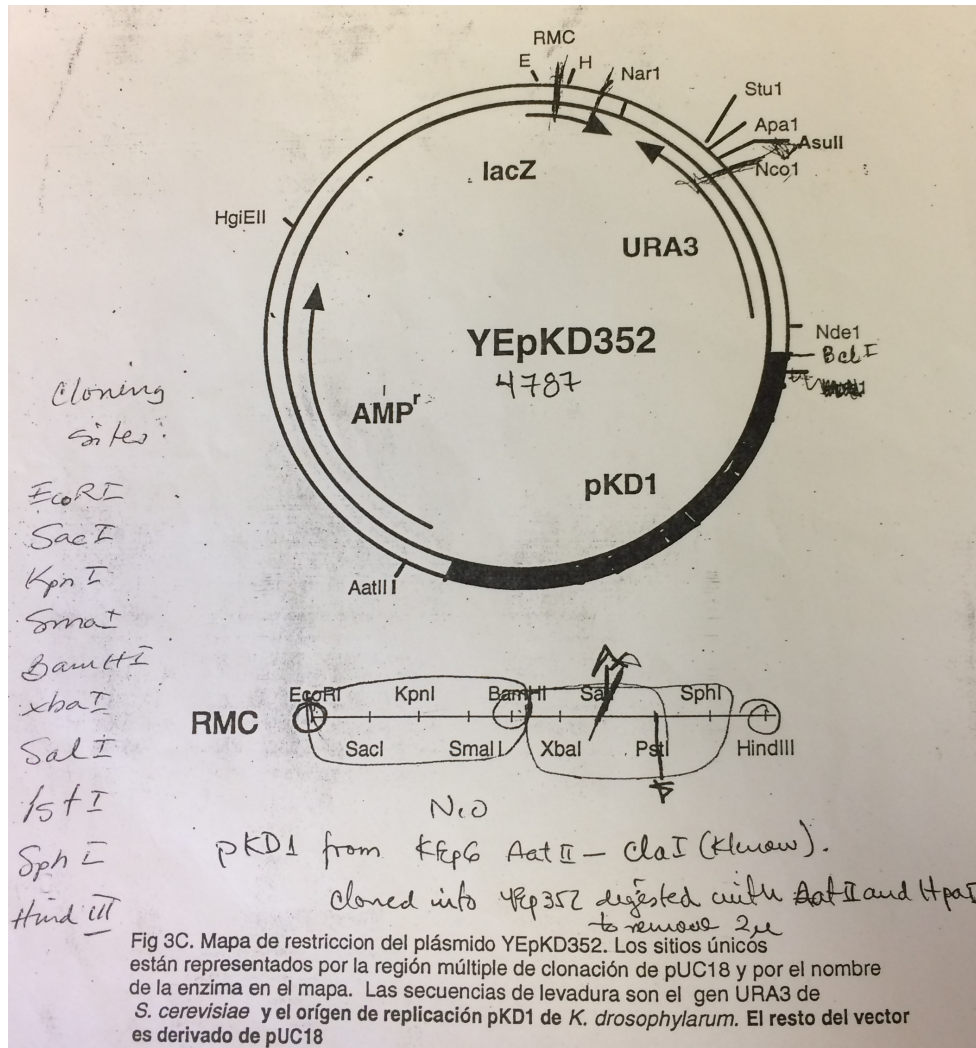
ANEXO 4

Mapa del Plásmido pRS416: vector usado para hacer las pruebas de complementación en *S. cerevisiae* y *L. Kluyveri*



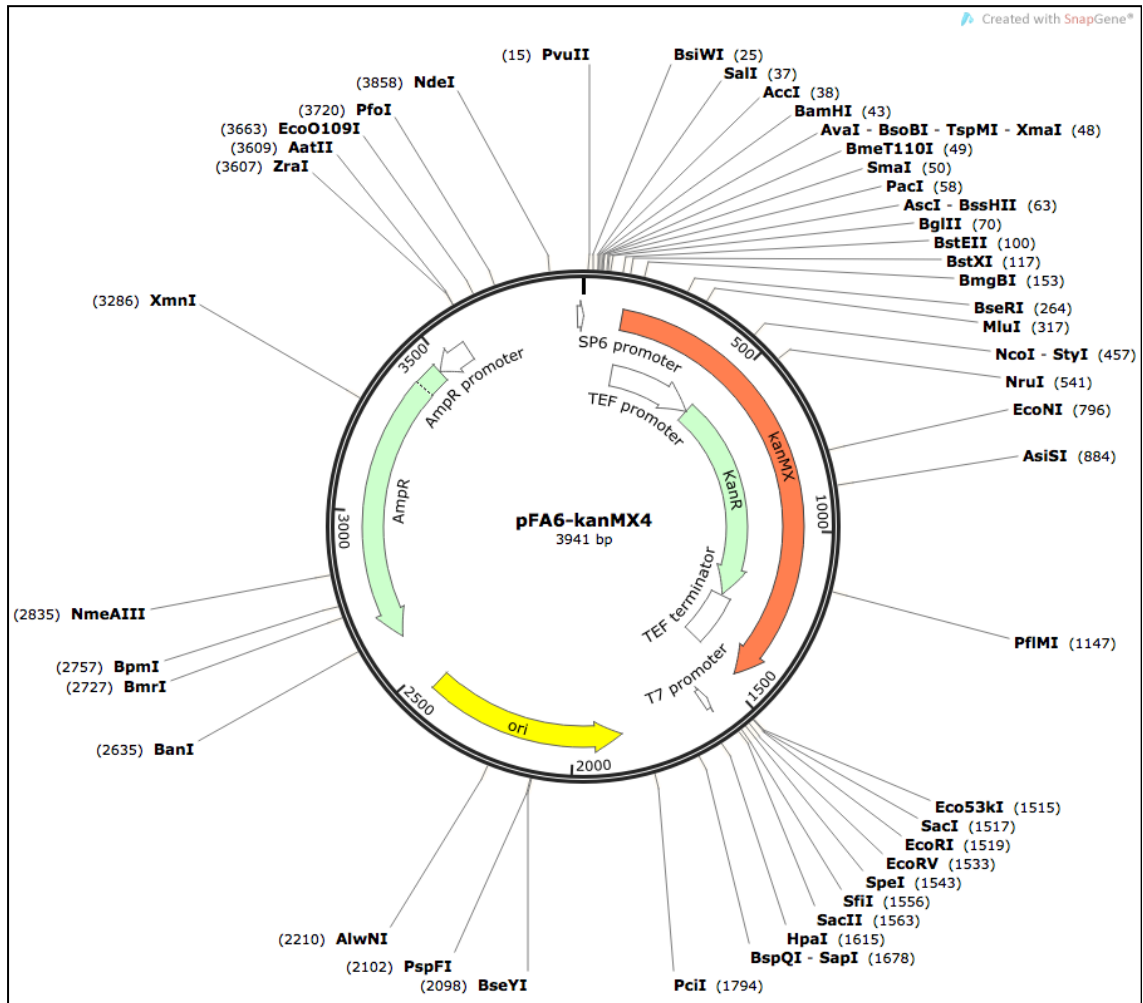
ANEXO 5

Mapa del Plásmido YEpKD352: vector usado para hacer las pruebas de complementación en *K. lactis*



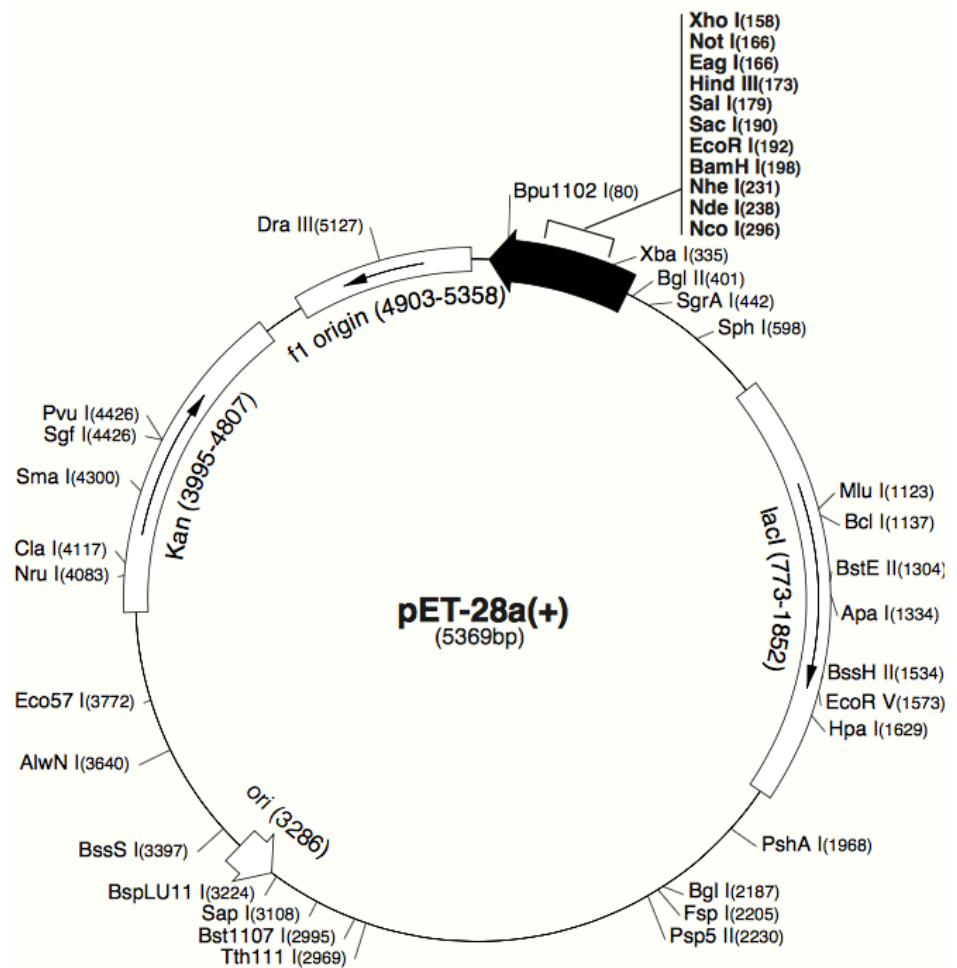
ANEXO 6

Mapa del Plásmido pFA6A: vector que tiene integrado el cassette que confiere resistencia a geneticina (kanMx4), usado para generar mutantes sencillas en *L. kluveri* y *K. lactis*.



ANEXO 7

Mapa del Plásmido pET28a(+): vector que tiene integradas siete repeticiones de His, usado para sobreexpresar los genes *LkALTI* y *KlALTI* de manera heteróloga



ANEXO 8

Secuencia del gen *LkALTI* (SAKL0H14244r.nt)

ATGTTAACAGTCGCTATAAGAACTCCTAGCTTAAGAATGCTAAGGACTACTACTGCTGG
TAATATCGCTAAGAATATGCCCACTCAACTCTTTTTTTGCGTTCCTTCTCGTCGAACT
TTGTGCCCTATAAGTTCCAACCTGCTGATAAGCTCTCCTTGAAGACTTGAATGAAAAC
GTTCTAAGGGCTAAATACGCTGTCAGAGGTAAGATTCCTCAAAGGCCGAGGAGTTGAA
GAATCAATTGGCCAGGGATCCTAAGTCTCTGCCATTTCGACAGAATCATCAATGCCAATA
TCGGTAACCCTCAGCAGTTGGACCAGAAACCGCTTACTTTTTTACAGACAGGTGTTGTCC
TTGTTGCAAACCCCTGACATGTTAGAGGAGATTCCCTCGCGAACAGCTGTCTCAAATATA
CAAGCCTGACGCTATCGACCGTGCTGCTAGGTTGCTGAGCAACATCGGCGGTTCTGTCTG
GTGCTTACTCCCATTCCAAGGTGTCTACGGGTTTAGGAAAACCGTTGCGGACTTTATC
ACCAAGAGAGATGGTGGCGAGGAGGCCTATGCTGAAGACATCTTTTTAACCGCCGGTGC
GTCCGCGGCCGTGTCTTACATCTTGTCAATCCTATGCAGAGGCCACAAACCGGTGTTT
TGATTCCAATCCCTCAGTATCCGTTGTACACCGCTTCTTTGGCCTTAAATAACTCTCAT
GCTTTGCCTTACTATTTGGACGAAGAATCCAACCTGGTCCACCAACCCTGAAGAGATCGA
AAAAGTCGTCACCAACTCGATTGCCAAAGGCGTGAACCCAAATGTTTGGTTGTCATCA
ATCCGGGCAATCCAACCGGTGCCATCTTATCTCCAGAGTCCATCGAAAAGATTTTTGAA
GTTGCCGCCAAGTACGGTATCGTCGTCATCGCCGATGAGGTGTACCAGGAAAACGTTTT
CAACGGTGCAGAGTTCCACTCTATGAGAAAAGTGCTCAAAGATCTACAGAGGAAACATC
ATGGTAAGTTTGACAACATCCAGTTGGCTTCCCTTGCACTCTACTTCGAAGGGTGTCTCT
GGTGAATGTGGACAGAGAGGTGGATACATGGAATTGCTAGGTTTTTCTCATGACGTTAG
ACAAGTTTTTTTTGAAATTAGCCTCCATCTCGCTATGCCCCGTTGTCACCGGCCAAGCCC
TAGTCGATTTGATGGTTTGCCACCAAAGCCAGGCGATGCTTCATATGAACAAGACCAA
AAAGAACGTTCTGAGATCCATGATGCCCTTGACGCCAGAGCTTCCATGCTTTACGAAAC
TTTCAACAGGTTGGAAGGTATCGAATGCCAGAAGCCACAGGGCGCCATGTACTTGTTC
CAAGGTTGGATCTATCCTACAAGGCTGTTCAAAAAGCCGAGCATCTTTCCTTGTCTCCA
GACGAATTTTACTGTCAAGAGCTGCTAGAAGCTACTGGTATTTGTACCGTTCCGGGTTT
TGGCTTTGGTCAAGTCCCAGGTAATCATTTGAGAACCCTTCTTGGCACCAGGTA
CTGACTGGATCAAAGCTTGGGAAGAATTTACAAAAAGTTTTACAATGAGTACCGTGAC
TAA

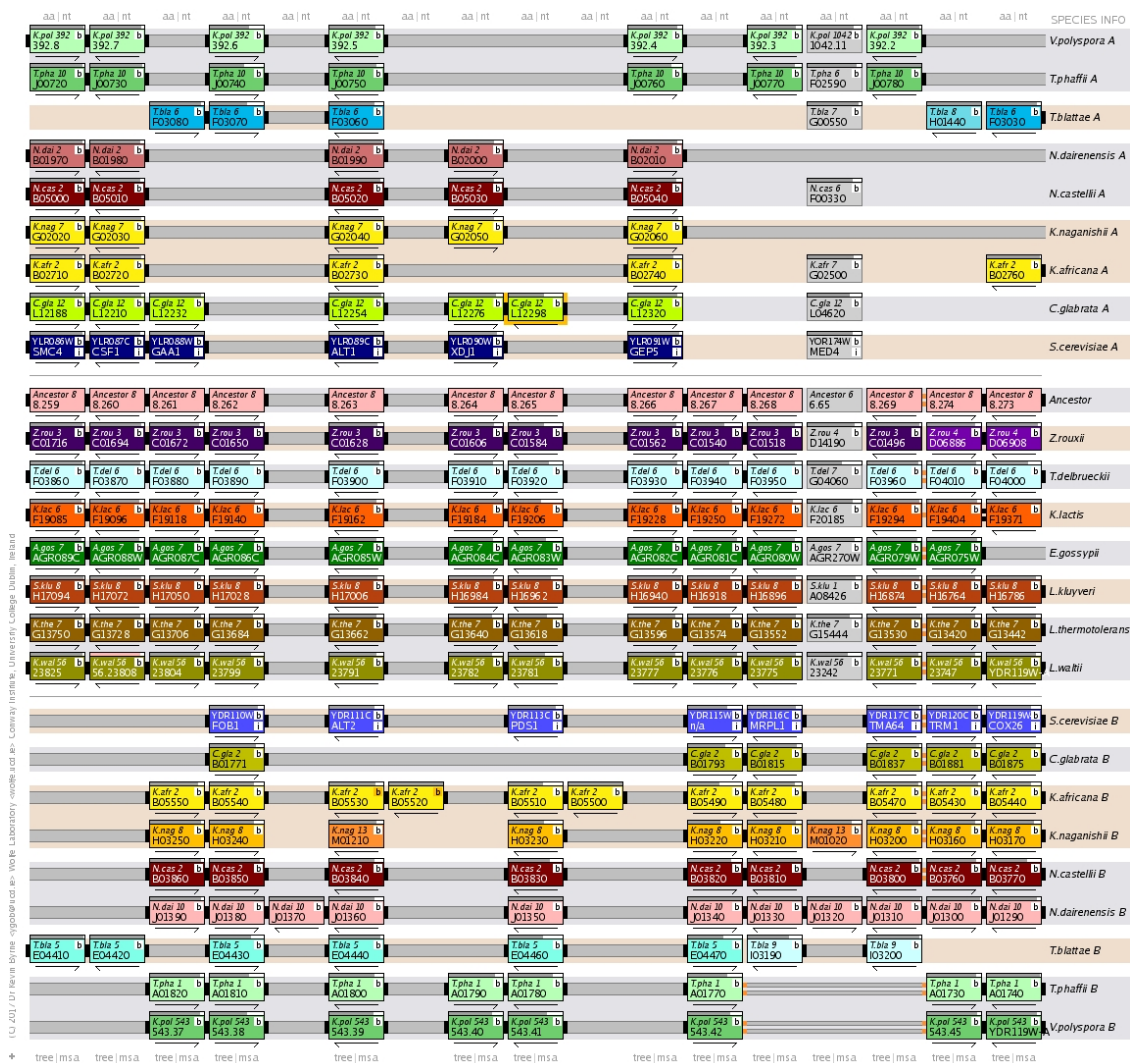
ANEXO 9

Secuencia del gen *KIALTI* (KLLA0F19162g.nt)

ATGTTGTCTGTCAGAGTTAACTTGAAGACCAGGATCAGTTCTGGCATGATTAGAGTCAA
TGCTCCAGCTTTGAAAAGTACAATGCCTTCTGTAAACAAGTTTAACCCAATTGCGTTTTT
CTACTACTGTGAAACCAGCTCCAAAGCTTTCGCTAGATGATGTTAATGAAAATGTTTTG
AAGGCTAAGTACGCTGTTAGAGGTAGAATTCCAATGAGGGCTGAGGAATTGAGAGATCA
GTTGAAAAGGATCCAAGTTCTTTACCCTTCTCTAAGATTATCAGTGCCAACATCGGTA
ACCCTCAACAATTGGACCAAAAACCTTTGACTTTTTTACAGAGAAGTATTATCTCTATTG
CAACATCCAGAACTGCTAGAAGAAGCTGATGAGGCTTTACAACTCTATATAAGACTGA
CTCCATTAAGCGTGCCAAAAGACTTTTTGTCTGAGGTTGGTGGATCCGTCGGTGCTTACT
CTCAATCACAGGGTGTTC AAGGAATTCGAGAAACCGTTGCAGACTTCATTACGAAGAGA
GATGACGGTGAAATATCTTACCCAGAAGATATTTACCTCACTGCTGGTGCATCTGCAGC
AGTTTCTTACATTCTCTCCATTCTATGCAAGGGCCCAAATACTGGCGTATTAATACCTA
TCCCACAATACCCGTTGTACACAGCATCTTTGGCTCTAAATAACTCTAGGCCTTTACCA
TACTACTTGAGAGAAGAACA AAAATTGGTCCACTGACCCAGAAGAAATTGAACAAGTCGT
GCTGGATGCAATTCAGAAGGGAATTAACCCACCTGTCTAGTTGTTATTAATCCAGGTA
ACCCA ACTGGTGCCATCCTTTCAGAACAGTCCATTCAAAGATCTTCGAAGTCGCTGCC
AAGTACGGTATTGTCGTCATCGCTGATGAAGTGTATCAAGAAAACGTATTCAAAGGCTC
TAAATTCTACTCAATGAAAAAAGTTTTGAGAACTTGCAAAAGACTTATCATGGACAAT
ACGACAACATTCAATTAGCTTCTCTACTCTACTTCCAAAGGTGTCTCGGGTGAATGT
GGTCAAAGAGGTGGTTATATGGAATTGGTCGGATTCAATCATGATATCAGACAGGTATT
CTTAAAATTGGCTTCTATTTCTTTATGTCCCGTGGTTACCGGTCAAGCCTTGGTGGACT
TAATGGTATCTCCACCTCAACCAGGTGATGAATCTTACGAACAAGATCAACAGGAACGT
GAAGATATTCATGACGCATTGGACGAACGTGCCTCTAACTTTTTCGAAACATTCTCTAG
ATTGGAAGGTATTGAATGCCGTAAACCTCAAGGTGCCATGTACCTATATCCAAAACCTCG
ATCTTCCTTATAAAGTTATCCAGGAAGCTCAGCATCTTGAAATGGAACCTGATGAATTT
TATTGTAAAGCATTACTAGAAAACACTGGTATTTGCACCGTTCAGGATCTGGTTTTCGG
ACAAGTCCCAGGTACTTATCACTTAAGAACCACATTCCTACCACCAGGGACCGAATGGG
TAGAAACATGGGAAAAATTCCACAAGGCCTTCTTTGACAAGTACCGTGATTAG

ANEXO 10

Contexto sintético de *ScALT1* y *ScALT2* (<http://ygob.ucd.ie>)



8. APÉNDICES

APENDICE A

Método de electroporación para levaduras

1. Crecer toda la noche un cultivo en YPD de la cepa a electroporar.
2. Inocular al día siguiente un matraz con 25 ml de medio fresco YPD a una $OD_{600nm} = 0.25$, esperar 3 a 4 horas para que llegue a OD_{600nm} entre 0.8-1.0.
3. Recuperar las células por centrifugación (4000 G/ 10 min).
4. Tirar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 que contenga 25 mM de dithiothreitol (DTT).
5. Incubar 15 min. a 37 °C a 200 rpm.
6. Recuperar las células por centrifugación (4000 G/ 10 min).
7. Lavar las células dos veces con buffer de electroporación STM (270 mM de sacarosa, 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 1 mM de $MgCl_2$). Primero con un volumen de 25 ml de STM y después con 12.5 ml de STM.
8. Recuperar las células por centrifugación (4000 G/ 10 min) y desechar el buffer STM.
9. Resuspender las células en 190 μ l de STM.
10. En tubos eppendorf de 1.5ml colocar 60 μ l de la suspensión de células (alcanza para 3 tubos/ cada uno con aprox. 6.6×10^7 células).
11. Adicionar 1 μ g de DNA por cada tubo.
12. Transferir la mezcla a celdas para electroporación de 2 mm pre-enfriadas.
13. Electroporar (Gene Pulser Xcell™): Dar pulso eléctrico 1.5 kV; 25 μ F; 500 Ω .

14. Resuspender las células en 1 ml de YPD y transferirlas a tubos Falcon e incubar 1:30 h a 30 °C a 200 rpm.
15. Transferir la suspensión de células a tubos eppendorf y centrifugar por 30 s a 12,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
16. Resuspender en 100 µl de agua miliQ estéril.
17. Platear la suspensión o las diluciones correspondientes en MM+NH₄. Las colonias aparecen entre los 3 a 4 días.

Nota: Del paso 6 al paso 12, las células se mantienen en hielo y la centrífuga se usa a 4 °C.

APENDICE B

Obtención de DNA genómico de levadura

1. Colectar las células por centrifugación. Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 500 μ L de agua estéril. Colectar por centrifugación a 14000 rpm por 2 min.
2. Desechar el sobrenadante y dar vórtex al botón para resuspender.
3. Adicionar 200 μ L de solución de Tritón X-100, 200 μ L de fenol-cloroformo-isoamílico, 0.3 g de perlas de vidrio limpias. Dar vórtex al máximo por 4 min. Adicionar 200 μ L de TE pH 8.
4. Centrifugar por 5 min en la microcentrífuga. Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio sin tocar las otras dos fases.
5. 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.
6. Resuspender el botón en 400 μ L de TE y adicionar 3 μ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 30 min. Adicionar 10 μ L de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol al 100%. Mezclar por inversión.
7. 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

Extracción de aminoácidos de levadura

18. Inocular 3 colonias aisladas en 10 ml de YPD. Dejar crecer over night a 30 °C y 250 rpm.

19. Inocular 25 ml de MMglc o MMglc EtOH a una OD_{600nm} 0.05.

20. Dejar crecer a 30 °C y 250rpm hasta una OD_{600nm} 0.6

21. Colectar 1.86×10^8 del cultivo siguiendo la referencia

$OD_{600nm} = 1.86 \times 10^7$ cel/ml

Referencia: volumen aproximado a colectar a una OD_{600nm} 0.6 es de aproximadamente 15 ml

22. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C el volumen determinado

23. Resuspender las células en 2 ml de buffer HEPES 100mM pH8

24. Colocar resuspensión en agua hirviendo (98 °C) por 4 min. Tapado para evitar evaporación

25. Determinar el volumen final de la muestra y anotarlo

26. Centrifugar 1 min. a a 3000 rpm.

27. Tomar 500 ml de sobrenadante en un tubo eppendorf

28. Agregar 200ul de ácido perclórico ($HClO_4$) al 71% para precipitar proteínas que aún pudieran estar en disolución

29. Centrifugara 14000 rpm durante 2 min.

30. Neutralizar el $HClO_4$ con KOH a saturación, monitorear el pH con banditas de pH agregando de i a 2 ul de las muestras. Reacción altamente exotérmica, manejar en hielo.

31. Centrifugar por 2 min. a 14000 rpm durante 2 min.

32. Tomar sobrenadante y desechar el precipitado (sales de KClO_4)

33. Guardar a -20 para su análisis por HPLC

APENDICE D

Determinación de actividad de transaminasa de Alanina

El volumen del cultivo se determina de acuerdo a la densidad óptica (OD_{600nm}) requerida. Para un ensayo estándar a una D.O. de 1.0 en medio mínimo, son suficientes 100-150mL de cultivo; para una D.O. de 0.5 se necesitará el doble de volumen de cultivo (200-300mL) para romper más o menos el mismo número de células que en el caso anterior.

Es importante mantener los tubos en hielo todo el tiempo.

34. Centrifugar las células a 3000 rpm en frío. Lavar 1 o 2 veces con agua fría. Centrifugar y desechar el sobrenadante.
35. Pesar las pastillas. Resuspender con **Buffer de Extracción**, agregando un volumen equivalente a la mitad del peso; transferir a un tubo de 1.5 mL. Agregar un volumen equivalente a 300 μ L de perlas de vidrio.
36. Dar vórtex a máxima velocidad durante 2 min, dejar reposar 1 minuto en el hielo. Repetir este paso 7-10 veces.
37. Centrifugar a 5000 rpm a 4 °C, durante 15 min. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a tubos nuevos de 1.5 mL. Agregar piridoxal-5-fosfato a una concentración final de 100 μ M. Este es el extracto crudo que se utiliza para hacer el ensayo de actividad de alanina aminotransferasa.
38. Cada reacción, en la que se ensaya una sola concentración de extracto, se lleva a cabo en un volumen de **1 mL**. Para cada condición que se desee estudiar (diferentes cepas o medios de cultivo), se utilizan por lo menos 4 concentraciones diferentes de extracto crudo; se puede iniciar con 2 μ L, 4 μ L, 8 μ L y 16 μ L. En un tubo Falcon nuevo se preparan el número de reacciones necesarias para llevar a cabo el ensayo. El **coctel completo** de actividad contiene lo siguiente:

Coctel completo	STOCK
400 mM alanina	1 M
24 mM 2-oxoglutarato	1 M
40 μ M piridoxal-5-fosfato	4 mM
250 μ M NADH	100 mM
5 U/mL LDH (lactato deshidrogenasa, SIGMA)	-
c.b.p 1mL Buffer de Ensayo	-

A cada concentración de extracto que se utilice corresponde una reacción control. El **coctel control** debe prepararse igual que el anterior, pero sin alanina. Se preparan volúmenes iguales de ambos cocteles.

39. Iniciar la reacción con la adición del extracto crudo. El espectrofotómetro debe programarse a temperatura constante de 30 °C, a una longitud de onda de 340nm; la reacción se monitorea durante 20-25 min. Lo que se mide es el cambio en absorbancia producido por la conversión de NADH a NAD.

40. Una vez que han finalizado todas las reacciones, se mide el cambio en absorbancia de cada una. A cada pendiente de la reacción completa se debe restar la pendiente del control sin alanina.

41. La actividad se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Act } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}) = \frac{\text{m}(\text{Abs min}^{-1}) \cdot \text{vol}_{\text{ensayo}} \text{ (ml)}}{\epsilon \text{ NADH}_{340\text{nm}} \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \cdot \text{l} \text{ (cm)} \cdot [\text{prot}] \text{ (mg ml}^{-1}) \cdot \text{vol}_{\text{extracto}} \text{ (ml)}}$$

IMPORTANTE: La alanina aminotransferasa es estable en los extractos durante muchas horas, siempre y cuando se mantenga en hielo pierde muy poca actividad. Nunca se probó la estabilidad de la enzima en el extracto por más de 12 horas, así que no se recomienda guardar los extractos para hacer ensayos pasadas las 12 horas de extracción. Los extractos se guardan a -20 °C sólo para calcular la concentración total de proteína.

Buffer de Extracción

- Preparar de 5 a 10 mL en tubos nuevos cada vez que se obtengan extractos. No almacenar. El buffer contiene lo siguiente:

Buffer de extracción		STOCK
50 mM	HEPES	1 M
1 mM	EDTA (dipotásico de preferencia) pH 8	0.5 M
1 mM	DTT	1 M
1 mM	PMSF	0.2 M

Buffer de Ensayo pH 8

- Preparar 500 mL, con las siguientes concentraciones:

Buffer ensayo		STOCK
50 mM	Tris-HCl	-
4 mM	MgCl ₂	1 M
140 mM	KCl	4 M

- Se ajusta el pH a 8 con HCl. Una vez ajustado el pH se esteriliza por autoclave.
- Almacenar en envase de vidrio a 4 °C.

Perlas de vidrio

- Almacenar en un recipiente pequeño de vidrio a 4 °C
- Utilizar exclusivamente para proteínas.

Alanina 1 M, pH 8

- Preparar 200 mL.
- Disolver la alanina en el **buffer de ensayo**.
- Ajustar el pH a 8. Esterilizar por filtración.
- Almacenar en tubos Falcon nuevos de 50 mL a -20 °C.

2-oxoglutarato 1 M, pH8

- Preparar 30 mL.
- Disolver 2-oxoglutarato de sodio en el buffer de ensayo.
- Ajustar pH a 8 con KOH. Esterilizar por filtración.
- Se almacena en alícuotas de 2 mL en tubos Eppendorf a -20°C.

Piridoxal-5-fosfato (PLP) 4 mM

- Preparar 10 mL en un tubo Falcon nuevo de 15 mL.
- Disolver el PLP en agua. No se esteriliza.
- Cubrir el tubo con aluminio, pues el PLP es fotolábil. Se almacena a 4 °C, por no más de 2 meses.

NADH 100 mM

- Preparar 1 mL en un tubo Eppendorf.
- Disolver en agua. No se esteriliza.
- Almacenar a -20° C.

EDTA dipotásico 0.5 M, pH 8

- Preparar 150 mL.
- Almacenar a 4 °C en un envase de vidrio. Utilizar exclusivamente para proteínas.

PMSF 0.2 M

- Preparar 5 mL.
- Disolver en isopropanol.
- Guardar en alícuotas de 400 μ L, en tubos eppendorf de 500 μ L
- Almacenar a -20° C

HEPES 1 M

- Preparar 30 mL.
- Guardar a -20 °C en alícuotas de 2 mL en tubos Eppendorf.
- No se esteriliza.

DTT 1M

- Preparar 15 mL
- Disolver en 10 mM acetato de sodio pH 5.2
- No se esteriliza. Almacenar en alícuotas de 1 mL, en tubos Eppendorf a -20 °C

APENDICE E

Inducción y purificación de proteínas heterólogas

- 1- Inocular una colonia en 10 ml de LB Kan Cm (50ug/ml y 70ug/ml)
- 2- Inocular un matraz de 1 L con 200 ml de LB Kan Cm (50ug/ml y 70ug/ml) a una OD_{600nm} 0.05 y esperar a que llegue a una OD_{600nm} 0.6 (aproximadamente 2 h)
- 3- Tomar 1 ml del cultivo (T0) centrifugarlo a 14000 rpm a 4 °C durante 10 min
- 4- Inducir el resto del cultivo con IPTG a una concentración final de 0.1mM (200ul para cultivo de 200ml) y dejar induciendo O.N.
- 4- Centrifugar el cultivo a 3500 rpm a 4 °C durante 10 min. Decantar el sobrenadante y dejarlo 15 min en hielo
- 5- Agregar 8 ml de buffer de lisis (4ml de buffer de lisis por cada 100 ml de cultivo)
- 6- Sonicar a 60% 30 segundos y dejando reposar 1 min 5 veces (hasta que el cultivo se vuelva translúcido)
- 7 centrifugar a 14000 rpm a 4 °C durante 30 min (guardar la fracción soluble)
- 8-Preparación de la columna. Resuspender la resina de Ni por inversión (SUAVEMENTE si no pierde eficiencia)
- 9- Agregar 1ml de H₂O y marcar la columna hasta donde llega el ml (esto permite conocer el volumen que corresponde a 1 ml)

10-Agregar la resina resuspendida hasta que la resina empacada llegue a la marca correspondiente al volumen de 1 ml

11- Equilibrar la columna con 10 volúmenes de buffer de equilibrio (NO DEJAR SECAR LA RESINA)

12- unos milímetros antes de que termine de salir el buffer de equilibrio agregar la fracción soluble y regular el flujo a 10 volúmenes por hora (medir el volumen de cada gota y el tiempo de salida entre una gota y otra para extrapolar a una hora)

13- realizar 3 lavados de 10 volúmenes cada uno con distinta concentración de imidazol (10, 30 y 50 mM) recolectar el ultimo ml de cada lavado

14- realizar 5 eluciones cada una con 1 ml de solución de imidazol (100, 200, 400, 600 y 800 mM) recolectar cada fracción.

NOTA cada fracción se guarda a 4 °C

BUFFERS

	EQUILIBRIO	LISIS	LAVADO	ELUCIÓN
0.1 M Tris-HCl pH 7.6	6 ml	4 ml	6 ml	4 ml
2M NaCl	750 ul	500 ul	750 ul	500 ul
1M Imidazol	100 ul	200 ul	900 ul	4 ml
H ₂ O	22.95	15.3 ml	22.35 ml	11.5 ml
TOTAL	30 ml	20 ml	30 ml	20 ml

APENDICE F

Determinación de proteínas por Lowry.

(Ensayo en placas de microtitulación)

- 1) Preparar solución ABC (Sol. A 19.6 ml + Sol. B 0.2 ml + Col.C 0.2 ml)
- 2) Preparar la solución de Folin diluyendo 1:1 con agua bidestilada (preparar justo antes de usar, prepara 5 ml)
- 3) Prepara la curva estándar utilizando diferentes volúmenes de una solución BSA [1 mg/ml], aforar a 40 ul con agua bd. Para las muestras utilizar 5,10,15,20 ul de una dilución 10^0 y 10^1 . Aforar a 40ul con agua bd.
- 4) Agregar 200 ul de la solución ABC a cada tubo. Mezclar con micro pipeta multi canal e incubar 10 min.
- 5) Agregar 20 ul de Folin diluído. Mezclar con micropipeta multicanal e incubar 30 min.
- 6) Leer la OD a 625 nm.

Albúmina (1mg/μL stock)	Agua (μL)	ABC (mL) 10 min.	Folin (μL) 30 min
0.0	40	200	20
1.5	38.5	200	20
3.0	37	200	20
4.5	35.5	200	20
6.0	34	200	20
8.0	32	200	20
10.0	30	200	20
15.0	25	200	20
20.0	20	200	20

SOLUCIÓN A.

NaOH 0.1 N	4 g/L
Na ₂ CO ₃	20 g/L

SOLUCIÓN B.

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

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

APENDICE G

Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE.

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

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

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

	1D	2D
Sol 1	1.66 mL	2.5 mL
Sol 3	5 mL	7.5 mL
Agua dest.	3.3 mL	5 mL
TEMED	10 µL	10 µL
APS 10%	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 H

Obtención de RNA total de *S. cerevisiae* (Collart y 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 el 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, la pastilla puede ser congelado en nitrógeno liquido y almacenarse a -70 °C por algunos meses.*
4. Resuspender la pastilla de células con el liquido remanente en el tubo y adicionar 400 µL de solución TES. Añadir 400 µL de fenol acido 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 acido y agitar en vórtex vigorosamente. Repetir el paso 5.
7. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 400 µL 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 μ 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 el pastilla de RNA con etanol al 70% frío. Centrifugar y decantar. Resuspender el pastilla en 50 μ L de H₂O.
10. Cuantificar en Nanodrop y guardar a -70 °C 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 μ L
-----------------	------------

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.

9. GLOSARIO

Alopoliploide	organismos que surgen a partir de la hibridación de dos organismos pertenecientes a diferentes especies, por lo que su genoma se proviene de dos o más especies.
Alopoliploidización	proceso mediante el cual se forma un alopoliploide.
Auxótrofo	organismo que sólo es capaz de proliferar en un medio de cultivo adicionado con algún metabolito, que el tipo silvestre, llamado protótrofo, no requiere, ya que puede sintetizarlo.
Bradítófo	organismo capaz de proliferar en medio mínimo, pero a una tasa menor que el tipo silvestre, llamado protótrofo, debido a que no puede sintetizar en cantidad suficiente un metabolito.
Genes ortólogos	Genes homólogos (comparten un ancestro común) que se encuentra en especies diferentes debido a la separación de las especies en las que se encuentran los genes.
Genes parálogos	Genes homólogos (comparten un ancestro común) que aparecen en una misma especie después de un evento de duplicación.
Neofuncionalización	proceso mediante una de dos copias de un gen adquiere una nueva función.
Protótrofo	Organismo capaz de crecer en medio mínimo ya que no requiere otros metabólicos distintos a los del tipo silvestre.
Pseudogenización	proceso mediante una de dos o más copias de un gen se pierde convirtiéndose en un pseudogen.
Sinténia	genes o segmentos cromosómicos conservados que mantienen el orden y la orientación respecto al centrómero.
Subfuncionalización	proceso mediante el cual la función de un par de genes duplicados se divide o se especializa entre las dos copias.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Binda, M., Peli-Gulli, M.P., Bonfils, G., Panchaud, N., Urban, J., Sturgill, T.W., *et al.* (2009). The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell* 35(5), 563-573. doi: 10.1016/j.molcel.2009.06.033.
- 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(9-10), 771-780.
- Canelas, A.B., Ras, C., ten Pierick, A., van Dam, J.C., Heijnen, J.J., and van Gulik, W.M. (2008). Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics* 4(3), 226-239. doi: 10.1007/s11306-008-0116-4.
- Conrad, B., and Antonarakis, S.E. (2007). Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 17-35. doi: 10.1146/annurev.genom.8.021307.110233.
- Crespo, J.L., and Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(4), 579-591.
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., Gonzalez, A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276: 43775–43783.
- DeLuna, A., Vetsigian, K., Shores, N., Hegreness, M., Colon-Gonzalez, M., Chao, S., Kishony, R., (2008). Exposing the fitness contribution of duplicated genes. *Nature Genetics* 40(5): 676-681. (2008)
- Eisler, H., Frohlich, K.U., and Heidenreich, E. (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp Cell Res* 300(2), 345-353. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.07.025.
- Espinosa-Cantú, A., Ascencio, D., Barona-Gómez, F., and DeLuna, A. (2015). Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. *Front Genet* 6. doi: 10.3389/fgene.2015.00227.
- García-Campusano, F.T.A. (2009) Estudio funcional de los parálogos *ALT1* y *ALT2* de *Saccharomyces cerevisiae* durante el metabolismo respiratorio y fermentativo

[disertation/PhD thesis].[Mexico City (CDMX)]:Universidad Nacional Autónoma de México.

Graßl, M. and Supp, M. (1981). "Amino Acids", in *Methods of Enzymatic Analysis*.

H.U. Bergmeyer (Federal Republic of Germany:VCH), 345-349.

Hittinger CT, Carroll SB (2007) Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 440: 677–682.

Huerta Cepas, J., Capella-Gutierrez, S., Pryszcz, L.P., Marcet-Houben, M., and Gabaldon, T. (2014). PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue), D897-902. doi: 10.1093/nar/gkt1177.

Hughes, A.L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc Biol Sci* 256(1346), 119-124. doi: 10.1098/rspb.1994.0058.

Infante, J. J., Glynn, L., & Elton, Y. (2011). Chromatin Remodeling and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 833, 63–87.

Innan, H., and Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat Rev Genet* 11(2), 97-108. doi: 10.1038/nrg2689.

Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breitkreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297(5580), 395-400. doi: 10.1126/science.1070850.

Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428(6983), 617-624. doi: 10.1038/nature02424.

Kim, J.D., Kaiser, K., Larive, C.K., and Borkovich, K.A. (2011). Use of (1)H Nuclear Magnetic Resonance To Measure Intracellular Metabolite Levels during Growth and Asexual Sporulation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 10(6), 820-831. doi: 10.1128/ec.00231-10.

Klipp, E., Liebermeister, L., Wierling, C., Kowald, A., Lehrach, H. & Herwig, R. (2009) *Systems Biology. A Textbook*. Wiley-Blackwell, Weinheim, 569 p., ISBN: 978-3-527-31874-2

Kitamoto, K., Yoshizawa, Y. Ohsumi, and Anraku, Y. (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae* J. *Bacteriol.* 170:2683–2686. doi: 10.1128/jb.170.6.2683-2686.

- Klis, F.M., de Koster, C.G., and Brul, S. (2014). Cell Wall-Related Bionumbers and Bioestimates of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 13(1), 2-9. doi: 10.1128/ec.00250-13.
- Kondrashov, A.S., Sunyaev, S., and Kondrashov, F.A. (2002). Dobzhansky-Muller incompatibilities in protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23), 14878-14883. doi: 10.1073/pnas.232565499.
- Kondrashov, F.A., and Kondrashov, A.S. (2006). Role of selection in fixation of gene duplications. *J Theor Biol* 239(2), 141-151. doi: 10.1016/j.jtbi.2005.08.033.
- Kuepfer, L., Sauer, U., Blank, L.M. (2005). Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res* 15(10):1421-30.
- Land, J.M. (2002). "Aspects of skeletal muscle biochemistry in health and disease", in Disorders of voluntary muscle. G. Karpati, D. Hilton-Jones and R.C. Griggs (United Kingdom: Cambridge university press), 122-141.
- 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(1), 265-275.
- 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 Biol* 13(8). doi: 10.1371/journal.pbio.1002220.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., and Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *Febs j* 274(4), 976-989. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05645.x.
- 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(2), 186-193.
- Nisonoff, A., Barnes FW Jr. and Enns T. (1953) Mechanisms in enzymatic transamination. *J Biol Chem* 204, 957-970.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication, London: George Alien & Unwin Ltd. Berlin: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-86659-3
- Peñalosa-Ruiz, G., Aranda, C., Ongay-Larios, L., Colon, M., Quezada, H., and Gonzalez, A. (2012). Paralogous *ALT1* and *ALT2* retention and diversification have generated catalytically active and inactive aminotransferases in

- Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 7(9), e45702. doi: 10.1371/journal.pone.0045702.
- Piskur, J., Rozpedowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C. (2001). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. *Trends in genetics*, 22(4): 183-6.
- Piskur, J. (2006). Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends in genetics*, 17(6): 302-303.
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernandez, H., Calcagno, M.L., Marin-Hernandez, A., *et al.* (2008). Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154(Pt 6), 1656-1667. doi: 10.1099/mic.0.2008/017103-0.
- Segel I.H. (1975). "Steady-state kinetics of multyreactant enzymes", in *Enzyme kinetics*. I.H. Segel (United States of America:John Wiley & Sons), 606-616.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122(1), 19-27.
- Sikosek, T., Chan, H.S., and Bornberg-Bauer, E. (2012). Escape from Adaptive Conflict follows from weak functional trade-offs and mutational robustness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37), 14888-14893. doi: 10.1073/pnas.1115620109.
- Soberón, M., and González, A. (1987). Glutamine degradation through the ω -amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 133(1), 9-14.
- Stephen, D.W., and Jamieson, D.J. (1997). Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSH1* gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 23(2), 203-210.
- Struhl, K., and Davis, R.W. (1981). Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 152(3), 535-552.
- Takagi, H., Iwamoto, F., and Nakamori, S. (1997). Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 47(4), 405-411.
- Tang, Y.C., and Amon, A. (2013). Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell* 152(3), 394-405. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.043.

- Wolfe, K.H., and Shields, D.C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387(6634), 708-713. doi: 10.1038/42711.
- Yoneyama, H., Hori, H., Lim, S.J., Murata, T., Ando, T., Isogai, E., *et al.* (2011). Isolation of a mutant auxotrophic for L-alanine and identification of three major aminotransferases that synthesize L-alanine in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75(5), 930-938. doi: 10.1271/bbb.100905.
- Yuan, J., Fowler, W.U., Kimball, E., Lu, W., and Rabinowitz, J.D. (2006). Kinetic flux profiling of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 2(10), 529-530. doi: 10.1038/nchembio816.