



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización y purificación de las proteínas parálogas *ScAlt1* y *ScAlt2* de *Saccharomces cerevisiae* : Estudio de su diversificación funcional y de su papel en el metabolismo de alanina.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Eréndira Rojas Ortega

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alicia González Manjarrez
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Pablo Pardo Vásquez
Dra. Rosario Muñoz Clares
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ciudad de México, agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

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

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

Tutora principal:

Dra. Alicia González Manjarrez, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Comité tutorial:

Dra. Rosario Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM

Dr. Juan Pablo Pardo Vásquez, Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce los apoyos técnicos otorgados por: Q.F.B. Beatriz Aguirre López, Biól. Elizabeth Nallely Cabrera González, Q.F.B. Ma. Concepción José Núñez, M. en C. Norma Silvia Sánchez, Dra. Marieta Tuena Sangri, Dra. Martha Calahorra, M. en C. Natalia Ivanovna Copitin Niconova, Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, M. en C. Miguel Ángel Guerrero, Dr. Horacio Reyes Vivas, Dr. Alfredo Torres Larios, Dr. Hugo Aníbal Santamaría Suárez, Dr. Martín González Andrade, Ing. Francisco Pérez Eugenio, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Aurey Galván. Asimismo, se reconoce la asistencia secretarial de Rocío Romualdo, a lo largo de todo este trabajo doctoral.

Se reconoce a la Dra. Laura Ongay-Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta, por el préstamo de servicios y la asesoría constante en el uso de los equipos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México), donativo CB-2014-239492; Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativos IN201015 y IN204018.

Durante la realización de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT, número de becario: 345972

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

Jurado de examen doctoral



PMDCB/1029/2018

Rojas Ortega Erendira
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 21 de mayo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctorado EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Caracterización y purificación de las proteínas parálogas ScAlt1 y ScAlt2 de Saccharomyces cerevisiae: Estudio de su diversificación funcional y de su papel en el metabolismo de alanina.**", dirigida por el/la Dr(a). **Gonzalez Manjarrez María Alicia**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Tuena Sangri Marietta
VOCAL	Reyes Vivas Horacio
VOCAL	González Andrade Martín
VOCAL	Torres Quiroz Francisco
SECRETARIO	Flores Herrera Oscar

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de mayo de 2018.
COORDINADORA

Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel. 5623 7006

Aquí queda un pedacito de mi vida...



*“En memoria a dos grandes mujeres, mis abuelas:
María de Luz Díaz-Duran y Josefina Adame”*

Agradecimientos

A la vida por todas las oportunidades que me ha brindado, por todas las personas maravillosas que han caminado a mi lado, por los momentos vividos y todas las enseñanzas aprendidas.

A la Doctora Alicia, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por contagiarme de su alegría, entusiasmo y pasión por la ciencia. Por enseñarme que la ciencia es un arte, por darme la libertad de crear, por siempre confiar en mí, por ayudarme a madurar.

A los Doctores Juan Pablo y Rosario, muchas gracias por guiarme en este trabajo.

A la Doctora Marietta por siempre estar dispuesta a escucharme, gracias orientarme y darme su cariño.

A Lety, por siempre darme todo, por amarme incondicionalmente, por alentarme día a día a ser mejor. Por siempre enseñarme a dar lo mejor de mí, por darme la mano cada vez que me caigo, por no juzgarme cuando me equivoco y por enseñarme a ser fuerte. Gracias mamá sin ti no lo hubiera logrado.

A Javi, por ser un gran amigo, por siempre ser mi cómplice, por siempre alentarme a seguir mis sueños, por todas las pláticas y buenos momentos. Gracias por siempre tratarme igual que a mis hermanos, gracias por siempre enseñarme que el límite es el cielo.

A José por ser mi gran compañero y amigo. Por todo ese apoyo y amor. Por siempre estar ahí a pesar de todas las dificultades, por siempre darme la mano en los momentos más difíciles. Por compartir tantas risas y momentos felices.

A Isaias por siempre ser un ejemplo de superación, por enseñarme a que la vida se gana con trabajo arduo. Por siempre apoyarme en cada momento, por darme el mejor regalo, ser la tía de Alondra.

A Jesús por tantas risas y momentos divertidos, por siempre tener esas puntadas que me matan de risa, por enseñarme que la vida no es tan seria.

A mis abuelas Josefina y Lucha, por siempre ser un ejemplo a seguir, por inspirarme a seguir adelante a pesar de las dificultades. Por enseñarme la fortaleza de ser mujer, por ayudarme a que me encontrara a mí misma.

A mi pequeña Alondra, por recordarme que el mundo es maravilloso y sorprendente, por todo el cariño y alegría que inyecta a la familia.

A Berenice, Juan y Samantha, por ser grandes cuñados. Por ser parte de mi familia, por apoyarme en todo momento.

A la Familia Gallegos, por siempre tratarme como un integrante más de la familia.

A la Señora Luisa por siempre apostar por mí, por su cariño, por su comprensión, por todas sus pláticas.

A Hilda por su cariño y amistad de toda la vida.

A Yamile por todo lo que hemos vivido y crecido juntas, por elegir ser mi hermana, por el apoyo, las palabras y esas risas que hemos compartido a lo largo de 29 años.

A Julio por todo ese cariño, por todas esas platicas, desayunos, cenas y días de pizza. Por siempre estar ahí pendiente de mi, por todos sus consejos, por todas las risas, por todo el apoyo. Por convertirse en un gran hermano.

A Natalia por siempre estar al pendiente a pesar de vivir a miles de kilometros, por todo el cariño, consejos y nuestras grandes platicas. Por nuestros viajes anuales para reunirnos. Gracias Comadre! te quiero mucho.

A Stefy por convertirte en mi hermana menor, por siempre estar a mi lado, por nuestra cerveza del viernes, por ser una gran amiga, por todo el tiempo compartido, por nuestras viejas y nuevas aventuras.

A Berenice por su sabiduría, por su energía vital, por todas esas platicas inspiradoras, por todo el cariño, por todas nuestras noches de chicas.

A Bety por siempre orientarme, darme la mano, no dejarme caer. Por siempre darme su sincero punto de vista, por darme todo su cariño. Por todos los momentos vividos en Chicago.

A Chio por toda su paciencia, todo su cariño. Por siempre apoyarme en buenos y malos momentos, por todos sus consejos, por su amistad. Te extrañare muchísimo.

A Horacio y Martín, por tantísimo apoyo, por siempre estar dispuestos a escucharme, a discutir mis datos, a darme nuevas ideas. Sin su apoyo y amistad, este trabajo no hubiera sido posible.

A James por todo su apoyo en momentos difíciles, muchas gracias por tu amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Charly, Dariel, Aranzazú, Juan, Mijail, Angy, Jaqui, Elena, Masami, Fernanda, Alan, Juan Carlos, Estefy, Moni y Andy. Muchas gracias por todos los buenos momentos vividos, muchas gracias por todas las risas que compartimos.

A Cristy por ser tan buena amiga y compañera.

Al Dr. Peña por su generosidad.

A mis compañeros y amigos del 3r piso del edificio oriente, Cristina, Emilio, Natasha, Norma, Martha Monica y Laurita, por su apoyo incondicional.

A Hugo y Nayeli por toda su ayuda y consejos.

A Lety Garcia, por siempre hacer más amenos y fáciles los tramites.

Indice

Reconocimientos	2
Jurado de examen doctoral	4
Agradecimientos	6
Indice	8
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Lista de abreviaturas	12
Lista de Figuras	13
Lista de Ecuaciones.....	13
Lista de Tablas	13
1.0 Introducción.....	14
1.1 El origen de los genes duplicados.....	14
1.2 Genes Homologos: Ortólogo, Parólogo, Ohnólogo y Homoeólogo.....	15
1.3 Relevancia de los eventos de poliploidización.....	16
1.4 Métodos de identificación de eventos de poliploidización.....	18
1.4.1 Análisis filogenético.....	19
1.4.2 Análisis de la tasa de distribución de sustituciones neutrales de los genes	20
1.4.3 Análisis de conservación de la sintenia con otras especies	21
1.5 El destino de los genes duplicados.....	22
1.6 La evolución del concepto de poliploidización en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
1.7 Desarrollo de metabolismo fermentativo en <i>S. cerevisiae</i> a través de WGD.....	26
1.8 Relación entre el metabolismo de nitrógeno y el de carbono en <i>S. cerevisiae</i>	28
1.9 Metabolismo de la alanina en <i>S. cerevisiae</i>	29
1.10 Proteínas PLP dependientes	32
1.10.1 Química del PLP	32
1.10.2 Evolución de las proteínas PLP dependientes.....	39
1.10.3 Origen y evolución de las enzimas PLP dependientes con plegamiento tipo I.....	42
1.10.4 Evolución convergente y divergente en proteínas PLP dependientes	43
2.0 Planteamiento del problema.....	45
3.0 Objetivos	46
Objetivo general.....	46
Objetivos particulares:	46
4.0 Metodos.....	47
4. 1. Clonación y sobreexpresión de <i>ScALT1</i> y <i>ScALT2</i> en <i>Escherichia coli</i>	47
4. 2. Obtención de extractos solubles	48
4. 3. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC).....	48
4. 4. Ensayo enzimático de transaminasa de alanina	49
4. 5. Modelado molecular de las proteínas <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	49
4. 6. Análisis de Dicroísmo Circular.....	50
4. 7. Estabilidad térmica de <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	51
4. 8. Ensayos de Fluorescencia intrínseca de las proteínas <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	51
4. 9. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las proteínas	51
4. 10. Cromatografía de exclusión molecular (SEC).....	52
4.11. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	52
4. 12. Determinación de afinidad de unión a alanina <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	52
4.13. Determinación de actividad catalítica de <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> con diferentes aminoácidos	53

4.14 Determinación de la afinidad de <i>ScAlt1</i> hacia diferentes aminoácidos.....	54
4. 15. Espectroscopía de absorción	54
4. 16 Reducción de la base de Schiff de <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> por medio de borohidruro de sodio (NaBH_4)	54
4. 17. Cuantificación de la concentración de PLP	55
4. 18. Análisis filogenético.....	56
4.19. Reproducibilidad experimental.....	56
5.0 Resultados.....	57
5.1 Purificación de las proteínas <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	57
5.2 Caracterización cinética de <i>ScAlt1</i>	57
5.3 Modelaje molecular de <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	59
5.4 Análisis estructural <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i>	60
5.5 Determinación del diámetro de las proteínas <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> por medio de DLS.....	62
5. 6 Ensayos de unión a alanina	63
5.7 Formación de base de Schiff externa con otros sustratos.....	66
5.8 Determinación de la afinidad de <i>ScAlt1</i> con diferentes aminoácidos.....	67
5. 9 Determinación de la formación de la base de Schiff.....	70
5.10 Determinación de la reversibilidad de la base de Schiff	71
5.11 Inferencia de la historia evolutiva de las proteínas Alts	73
6.0 Discusión de Resultados	75
6.1 <i>ScAlt1</i> muestra un mecanismo ping-pong característico de las transaminasas	75
6.2 El modelaje molecular de las proteínas <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> , no explica la falta de actividad como transaminasa de alanina de <i>ScAlt2</i>	75
6.3 <i>ScAlt2</i> tiene una estructura similar a <i>ScAlt1</i> , a pesar de ello <i>ScAlt2</i> tiene una estructura más laxa	76
6.4 <i>ScAlt2</i> no es una transaminasa de alanina ya que no une alanina	76
6.5 <i>ScAlt1</i> es capaz de utilizar diferentes sustratos	77
6.6 <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> unen el PLP en forma de base de Schiff.....	78
6.7 La base de Schiff en <i>ScAlt1</i> y <i>ScAlt2</i> es reversible y dependiente del plegamiento	79
6.8 <i>ScAlt2</i> se agrupa en un clado independiente a <i>ScAlt1</i>	80
7.0 Conclusiones	80
8.0 Perspectivas	81
9.0 Bibliografía	82
10.0 Glosario.....	88
11.0 Artículo resultado del Doctorado.....	89

Resumen

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* surgió a partir de una hibridación entre dos levaduras de diferente especie (alopoliploidización), lo cual se cree siguió un proceso de duplicación total de su genoma. Los genes *ScALT1* y *ScALT2* provienen de este evento de poliploidización. Estos genes han diversificado en su función, ya que la proteína *ScAlt1* es una transaminasa de alanina la cual conserva su papel fisiológico ancestral, mientras *ScAlt2* ha perdido esta actividad.

Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* constituyen un ejemplo en el que uno de los miembros del par de genes carece del aparente papel fisiológico ancestral. Este estudio pretende entender cómo *ScAlt2* perdió su función ancestral y diversificó en su función. Para ello se realizó un estudio estructural en el cual se determinaron las diferencias en estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, así como las propiedades de unión del fosfato de piridoxal (PLP).

Se encontró que *ScAlt1* y *ScAlt2* son enzimas diméricas que tienen un 67% de identidad en secuencia de aminoácidos, estas proteínas han conservado intactos todos los residuos catalíticos típicos de una transaminasa de alanina, y tienen estructuras muy similares. Sin embargo, el análisis estructural nos indica que *ScAlt2* tiene una conformación más laxa que *ScAlt1*. Esta diferencia pudo haber modificado la geometría del sitio catalítico de *ScAlt2*, cambiando las interacciones del PLP con la proteína.

Un reflejo del cambio en las interacciones del PLP con la proteína son los tautómeros de la base de Schiff que se forman. En el caso de *ScAlt1* se forman dos tautómeros de la base de Schiff protonada, los tautómeros enolimina y cetoenamina, mientras que en *ScAlt2* únicamente se forma el tautómero de cetoenamina. Esto nos indica que el sitio activo de *ScAlt1* y *ScAlt2* tienen diferente polaridad y por tanto, se pudo modificar la interacción entre el PLP y *ScAlt2*, lo cual podría resultar en la falta de actividad de transaminasa de alanina que se observa en *ScAlt2*. La formación de una base de Schiff con PLP en *ScAlt2* y la formación de un clado independiente entre las proteínas *ScAlt2* de levaduras “*sensu stricto*”, nos sugiere que esta proteína tiene una función fisiológica que aún no ha sido descubierta.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae arose from an interspecies hybridization (allopolyploidization), followed by Whole Genome Duplication. Diversification analysis of *ScAlt1/ScAlt2* indicated that while *ScAlt1* is an alanine transaminase, *ScAlt2* lost this activity, constituting an example in which one of the members of the gene pair lacks the apparent ancestral physiological role. This paper analyzes structural organization and pyridoxal phosphate (PLP) binding properties of *ScAlt1* and *ScAlt2* indicating functional diversification could have determined loss of *ScAlt2* alanine transaminase activity and thus its role in alanine metabolism. It was found that *ScAlt1* and *ScAlt2* are dimeric enzymes harbouring 67% identity and intact conservation of the catalytic residues, with very similar structures. However, tertiary structure analysis indicated that *ScAlt2* has a more open conformation than that of *ScAlt1* so that under physiological conditions, while PLP interaction with *ScAlt1* allows the formation of two tautomeric PLP isomers (enolimine and ketoenamine) *ScAlt2* preferentially forms the ketoenamine PLP tautomer, indicating a modified polarity of the active sites which affect the interaction of PLP with these proteins, that could result in lack of alanine transaminase activity in *ScAlt2*. The fact that *ScAlt2* forms a catalytically active Schiff base with PLP and its position in an independent clade in “*sensu strictu*” yeasts suggests this protein has a yet undiscovered physiological function.

Lista de abreviaturas

WGD (Whole Genome Duplication) Duplicación total del genoma
Extinción KT Cretácico-Paleógeno o Cretácico-Terciario
Ks Fracción de sustitución sinónimas por sitios sinónimos
KLE Clado *Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium* (*Ashbya gossypii*)
ZT Clado *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulaspota delbrueckii*
NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NAD⁺ Nicotin adenin dinucleótido oxidado
NADH Nicotin adenin dinucleótido reducido
GDH1 Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (+)
GDH3 Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP (+)
Lys20 Homocitrato sintasa
Lys21 Homocitrato sintasa
Bat1 Aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada (BCAA) mitocondrial
Bat1 Aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada (BCAA) mitocondrial
Alts Alanina aminotransferasas
GAL1 Gen que codifica para una Galactoquinasa
GAL3 Regulador transcripcional
PLP Piridoxal 5 fosfato
IPTG Isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosido
PMSF Fenil-Metil-Sulfona-Fluoruro
BSA (Bovine Serum Albumin) Albumina Serica Bovina
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Herramienta basic de búsqueda de alineamiento local
PDB (Protein Data Bank) Base de Datos de Proteinas
DC Dicroísmo circular
SEC (Size Exclusion Chromatography) Cromatografía de Exclusión Molecular
DLS (Dynamic Ligth Scattering) Dispersión Dinámica de la Luz
FI Fluorescencia Intrínseca
IMAC (Inmovilizar metal affinity chromatography) Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
Gdn/HCl Hidrocloruro de Guanidina
V_{max} Velocidad máxima
K_m Constante de Michaelis-Menten
K_{cat} Constante catalítica
K_{sv} Constante de Quenching Stern-Volmer
T_m (Temperature melting) Temperatura de fusión
K_d Constante de disociación
B_{max} Unión específica máxima

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos más comunes de duplicaciones parciales del genoma	14
Figura 2. Subclasificación de los genes homólogos	16
Figura 3. Eventos de poliploidización en eucariontes	18
Figura 4. Filogenia de dos parálogos y un ortólogo	20
Figura 5. Representación de doble conservación de la sintenia	22
Figura 6. Diferentes topologías presentes en los genes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Figura 7. Hipótesis de como se origino el ancestro de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Figura 8. Diversificación de los genes ScAlt1 y ScAlt2 de <i>S.cerevisiae</i>	31
Figura 9. Versatilidad del PLP	33
Figura 10. Molécula de PLP	34
Figura 11. Mecanismo de formación de Base de Schiff	35
Figura 12. Formación de intermediarios quinonoides	36
Figura 13. Estructura coplanar entre el enlace imin y el anillo pirimidin del PLP	37
Figura 14. Estructura tridimensional de las proteínas PLP dependientes de 4 tipos de plegamiento	42
Figura 15. Purificación de las proteínas ScAlt1 y ScAlt2	57
Figura 16. ScAlt1 tiene un mecanismo ping-pong. a) Ajuste global a la ecuación de ping-pong	58
Figura 17. Alineamiento de secuencia y estructura de ScAlt1 y ScAlt2	59
Figura 18. Caracterización estructural de ScAlt1 y ScAlt2	61
Figura 19. Determinación de estructura oligomérica de ScAlt1 y ScAlt2 por medio de cromatografía de exclusión molecular	62
Figura 20. Diámetros teóricos de las proteínas ScAlt1 y ScAlt2	63
Figura 21. Triptófanos cercanos al sitio catalítico de ScAlt1 y ScAlt2	64
Figura 22. Titulación con alanina de las proteínas ScAlt1 y ScAlt2	65
Figura 23. Interacción de ScAlt1 y ScAlt2 con diferentes aminoácidos	66
Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína ScAlt1 en presencia de diferentes aminoácidos	67
Figura 25. Evaluación de la afinidad de ScAlt1 a diferentes aminoácidos	69
Figura 26. Estructura de la Base Schiff del PLP	70
Figura 27. Determinación de la formación de la Base de Schiff en ScAlt1 y ScAlt2	71
Figura 28. La unión de PLP a ScAlt1 y ScAlt2 es reversible en condiciones extremas y dependiente de plegamiento	72
Figura 29. Reconstrucción de historia evolutiva de las proteínas Alts	74

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1. Ecuación de un mecanismo ping-pong en estado estacionario	49
Ecuación 2. Ecuación de Stern-Volmer	52
Ecuación 3. Ecuación de unión específica de un sitio	53
Ecuación 4. Ecuación de unión específica con pendiente de Hill	54

Lista de Tablas

Tabla 1. Parámetros cinéticos de Alts en diferentes levaduras	59
---	----

1.0 Introducción

1.1 El origen de los genes duplicados

Los genes que provienen de una duplicación se originan a través de duplicaciones parciales o totales del genoma (WGD **W**hole **G**enome **D**uplication). Las duplicaciones parciales son aquellas donde únicamente un segmento del genoma se duplica. Las formas más comunes por las cuales se pueden llevar a cabo las duplicaciones parciales son:

- 1) **Errores en el entrecruzamiento**, lo cual da como resultado genes que se encuentran repetidos en tandem (figura 1) (Zhang, 2003).
- 2) **Retrotranscripción**, en este caso un mRNA se retrotranscribe a cDNA y se inserta al azar en el genoma, en general estos genes no se expresan ya que no cuentan con región promotora (figura 1) (Zhang, 2003).

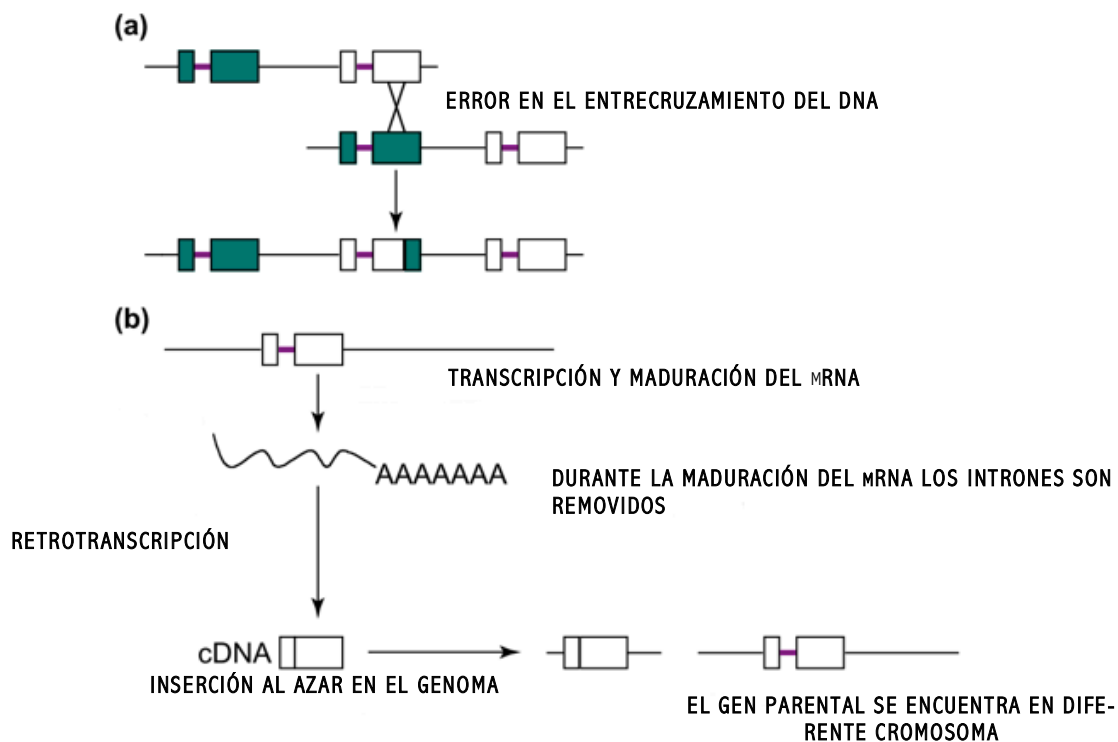


Figura 1. Mecanismos más comunes de duplicaciones parciales del genoma. a) Error en el entrecruzamiento del DNA, esta clase de error genera duplicaciones en tándem. b) Retrotranscripción, un mRNA se retrotranscribe a cDNA, el cual posteriormente se integra en una región al azar del genoma. Figura modificada de (Zhang, 2003).

En el caso de la WGD, se requiere que ocurra un evento de poliploidización. Existen dos mecanismos de poliploidización: La autoploidización (WGD) y alopoliploidización (hibridación). En la autoploidización la duplicación del genoma proviene de la fusión de dos células de la misma especie, mientras en la alopoliploidización la duplicación del genoma proviene de la fusión de células de diferente especie (Peer et al., 2017).

1.2 Genes Homologos: Ortólogo, Parálogo, Ohnólogo y Homoeólogo

El término homología es general y designa que dos genes compartieron un ancestro común, sin especificar el escenario evolutivo. De acuerdo a lo anterior los genes que se relacionan por medio de homología se denominan homólogos. Existen formas para categorizar los genes homólogos, tales como los términos: ortólogo, parálogo, ohnólogos y homoeólogo (figura 2) (Koonin, 2005).

Los ortólogos, son genes que se relacionan vía especiación (descendencia vertical), y que se derivaron a partir de un ancestro común. En la mayor parte de los casos existe una relación entre ortología y conservación de la función, a pesar de ello no se puede generalizar, debido a que en ocasiones esto no ocurre, a pesar de que el gen lleve a cabo la “misma función”, ésta puede no ser literalmente la misma, debido a que se encuentran en diferente contexto biológico (Koonin, 2005).

En el caso de los parálogos, nos referimos a aquellos genes que se originaron a partir de una duplicación, no importando si proviene de una duplicación parcial o total del genoma. Igual que en el caso de los ortólogos, la definición de parálogos no se refiere a la función biológica (Koonin, 2005).

Los genes ohnólogos, se nombraron así en honor a Susumu Ohno. Los ohnólogos son genes que provienen de un evento de WGD. Mientras que los homoeólogos, son genes que se adquirieron por un fenómeno de poliploidización entre diferentes especies (aloploidización) (Glover et al., 2016).

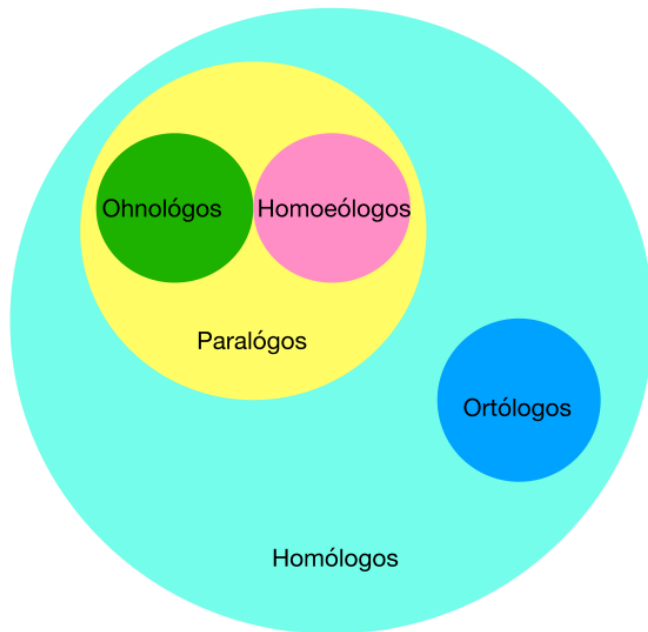


Figura 2. Subclasificación de los genes homólogos. Los genes homólogos, se dividen en: Ortólogos, genes homólogos en diferentes especies. Paralógos, genes homólogos que se encuentran en un mismo organismo. Los genes parálogos a su vez se clasifican de acuerdo a su origen en: Ohnólogo, son genes parálogos los cuales provienen de un evento de autoploidización. Finalmente los homeólogos, genes parálogos los cuales provienen de un evento de aloploidización.

1.3 Relevancia de los eventos de poliploidización

En todos los reinos eucariontes existen eventos de poliploidización, tan es así que el 60% de las plantas con flor tienen un origen poliploide; en el caso del reino animal los eventos de poliploidización son más raros que en el reino vegetal, a pesar de ello se sabe que los vertebrados y los insectos también atravesaron por dicho proceso, en el caso del reino Fungi únicamente se ha logrado demostrar el evento de poliploidización del linaje *Saccharomyces*. Los eventos de poliploidización en condiciones normales siempre se han visto como un camino que inevitablemente lleva a la muerte, a pesar de ello en condiciones ambientales extremas se ha demostrado que tiene gran impacto en la diversificación de las especies, lo cual favorece una mayor complejidad biológica e innovación evolutiva (figura 3) (Peer et al., 2017).

En términos de corto plazo la poliploidización, permite la segregación transgresiva, es decir permite que aparezcan fenotipos extremos e incrementan la vigorosidad, lo cual ayuda a que los

organismos se adapten a situaciones extremas, incrementando la oportunidad de supervivencia (Peer et al., 2017).

Se ha planteado que la poliploidización reduce el riesgo de la extinción de varias maneras: mediante redundancia funcional, robustez ante las mutaciones deletéreas, incrementando la tasa de evolución y de adaptación. En otros estudios se ha demostrado que la WGD ha sido precedida por eventos de extinción. Al analizar el número de familias de vertebrados extintos y existentes, hay una correlación en la cual se encuentran más organismos extintos en los organismos que no duplicaron su genoma que aquellos que si lo hicieron. La prueba más documentada de que los eventos de poliploidización reducen el riesgo de la extinción probablemente provenga de las plantas con flor. Se ha encontrado que plantas como las leguminosas, los cereales, las solanáceas (tales como el tomate y la papa), la lechuga y el algodón, de forma independiente atravesaron por una WGD alrededor de 60-70 millones de años. Este fenómeno de poliploidización coincide con la extinción masiva K-T (extinción dada entre el Cretácico-Paleógeno, llamada también extinción del Cretácico- Terciario), lo cual nos sugiere que los eventos de poliploidización ayudaron a sobrellevar los cambios ambientales extremos (Peer et al., 2017).

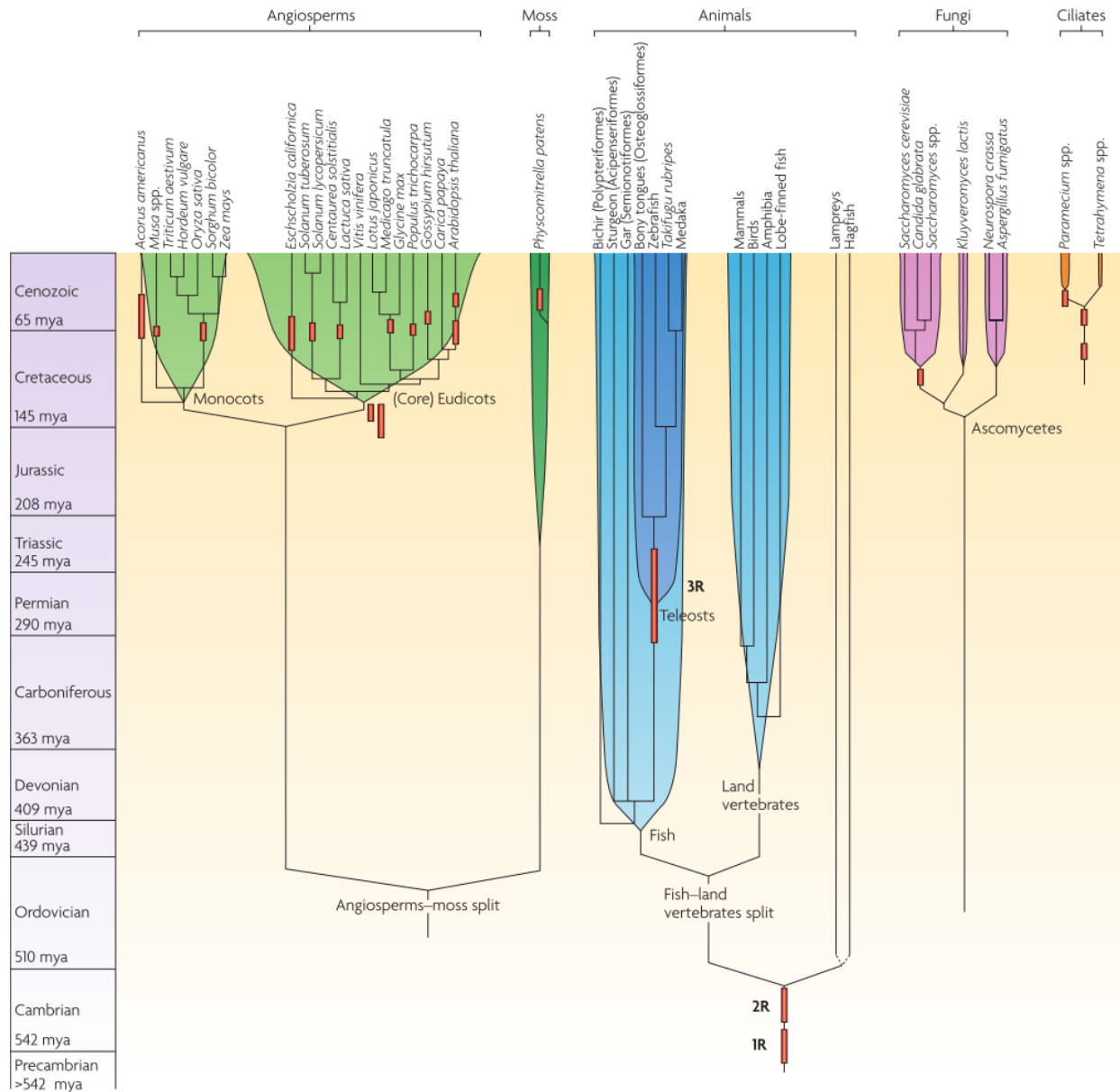


Figura 3. Eventos de poliploidización en eucariontes. En la filogenia de eucariontes se encuentran en rojo los eventos de poliploidización de plantas, pescados, vertebrados, hongos y ciliados, mya significa millones de años. En el caso del reino animal existieron tres pasos de poliploidización, los primeros dos eventos de poliploidización (1R, 2R) dieron origen a los vertebrados. El evento de poliploidización 3R se dio en los peces, lo cual ayudo a aumentar la biodiversidad (Peer et al., 2017).

1.4 Métodos de identificación de eventos de poliploidización

Determinar de manera inequívoca la existencia de un evento de poliploidización implica dar una lista de argumentos que sean consistentes con la hipótesis de que el organismo analizado

experimentó ese evento. Existen diferentes métodos que nos ayudan a demostrar o confirmar un evento de poliploidización. La mayor parte del tiempo los genes provenientes de una poliploidización representan una pequeña fracción de los genes parálogos totales, el resto de parálogos se encuentran compuestos por genes que surgieron de duplicaciones parciales del genoma. En general los métodos que se usan para detectar eventos de poliploidización tienen como objetivo diferenciar estos eventos del ruido que producen los genes parálogos proveniente de duplicaciones parciales. La dificultad de encontrar un evento de duplicación total del genoma radica en que la mayor parte de los genes duplicados se pierden, seguido de rearrreglos en el genoma. Los métodos más comunes para determinar eventos de poliploidización son: a) Análisis filogenético, b) Análisis de las tasas de distribución de sustituciones neutrales de los genes y c) Análisis de la conservación de la sintenia (Jaillon et al., 2009)

1.4.1 Análisis filogenético

En el análisis filogenético estudia la historia evolutiva de la familia de genes de forma independiente, lo cual revela si la presunta duplicación es anterior o posterior a un evento de divergencia. Para cada familia de genes es necesario, por lo menos, tres secuencias, dos parálogos de una especie y un ortólogo de otra especie relacionada. Cuando el evento de duplicación ocurrió después de la divergencia, los parálogos se agrupan en un solo clado y la distancia entre los parálogos es menor que entre los ortólogos. En el caso de que la duplicación se haya dado antes de la divergencia, la distancia entre los ortólogos puede resultar menor que la distancia que presentan entre los parálogos (figura 4) (Jaillon et al., 2009).

El análisis filogenético se puede utilizar para robustecer la hipótesis de una WGD y también se puede utilizar cuando el análisis de sintenia es deficiente (es decir, cuando no se cuenta con todo el genoma secuenciado o existen muchos rearrreglos en el genoma) (Jaillon et al., 2009).

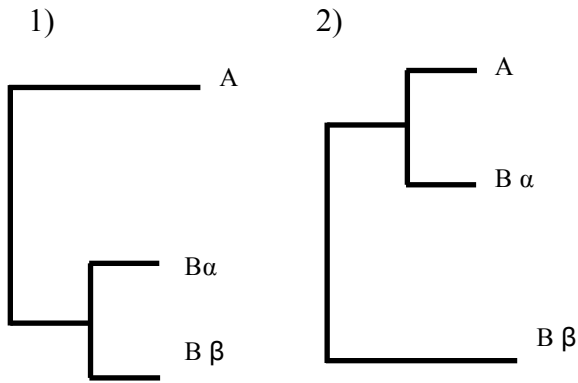


Figura 4. Filogenia de dos parálogos y un ortólogo. De acuerdo a la topología es posible determinar cuándo ocurrió la duplicación total del genoma. 1) Si los parálogos se agrupan en una sola rama y presentan menor distancia evolutiva entre sí que con el ortólogo (A), la duplicación total del genoma ocurrió después de la divergencia. 2) La distancia entre alguno de los parálogos con respecto al ortólogo es menor a la presente entre los parálogos ($B\alpha$ y $B\beta$), la duplicación total del genoma ocurrió antes de la diversificación.

Cuando por otra clase de análisis se prueba que existe una WGD, el análisis filogenético nos puede ayudar a determinar el momento en el que ocurrió. Antes de realizar un análisis filogenético con el fin de determinar si existió una WGD, es necesario considerar la tasa de evolución de los parálogos. En general, la mayor parte de los parálogos cuentan con tasas de evolución similares (evolución simétrica) pero en ocasiones la tasa de evolución entre parálogos es diferente (evolución asimétrica). Se ha demostrado que cuando la evolución entre los parálogos es simétrica el árbol que resulta del análisis filogenético es correcto, pero en los casos donde la evolución de los parálogos es asimétrica la topología de los árboles muestra que uno de los parálogos es más antiguo de lo que es en realidad, por lo tanto, se puede llegar a una mala interpretación, debido a que puede existir un artefacto llamado “atracción de ramas largas”, ubicando a la WGD como un evento más temprano de lo que en realidad es (Jaillon et al., 2009).

1.4.2 Análisis de la tasa de distribución de sustituciones neutrales de los genes

Si los genes provienen de una WGD tienen la misma edad, partiendo de este hecho se puede utilizar un análisis de las tasas de distribución de sustituciones neutrales. La tasa de sustituciones sinónimas entre dos parálogos se puede utilizar para dar un aproximado de cuándo ocurrió la WGD. Una fracción significativa de los parálogos que contengan una tasa de sustitución sinónima similar es argumento para identificar una WGD. Debido a que se puede dar más de una sustitución en el mismo sitio y que no se puede medir directamente. Existen diferentes méto-

dos que nos ayudan a determinar la tasa de substitución; uno de los más usados es la distribución Ks (fracción de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo) entre parálogos. Teóricamente la distribución Ks sigue un decaimiento exponencial; es decir, valores bajos de Ks corresponden a duplicaciones recientes, mientras que los valores altos de Ks corresponden a eventos antiguos, los eventos de WGD se encuentran al final de la curva. La tasa de decaimiento exponencial depende del grado de pérdida progresiva de los genes duplicados. La presencia de un pico a valores bajos de Ks se puede deber a duplicaciones recientes locales. Algunas limitantes de este análisis es lo difícil que es distinguir eventos muy antiguos debido a la saturación de sustituciones en sitios sinónimos, aunado a que en muchas ocasiones la tasa de mutación no permanece fija a lo largo del tiempo y entre los diferentes linajes; además, existen parálogos ancestrales que cambiaron debido a la conversión génica, lo cual da como resultado valores bajos de Ks , y, por tanto, una mala interpretación (Jaillon et al., 2009).

1.4.3 Análisis de conservación de la sintenia con otras especies

Los genomas que descienden de un ancestro común acumulan ínter e intra rearreglos cromosómicos. Dependiendo del tiempo que separa a las dos especies y la tasa de rearreglos cromosómicos estos se conservan en mayor o menor medida el orden de los genes ancestrales. La sintenia es el orden que mantienen los genes en un bloque con respecto al centrómero cuando se comparan segmentos cromosomales homólogos entre diferentes especies. La duplicación total del genoma se puede comprobar si se encuentran bloques sinténicos. Por ejemplo, si comparamos el orden de los genes en un cromosoma de un organismo que tienen un ancestro común, con el organismo de interés que no ha atravesado por una WGD, podríamos observar que los genes se encuentran ordenados de la siguiente forma [a, b, c, d, e, f, g, h, i, j], si el organismo de interés duplicó su genoma encontraremos que existe un fragmento de genoma [a, c, e, g, i, j], mientras que el segundo fragmento sería [b, d, f, g, h], ambos fragmentos de genoma se encuentran ligados a un único fragmento de genoma de un organismo con un ancestro común que no atravesó WGD; a esta relación le llamamos doble conservación de la sintenia y se observó por primera vez al comparar el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* contra el genoma de *Kluyveromyces waltii* (figura 5) (Jaillon et al., 2009).

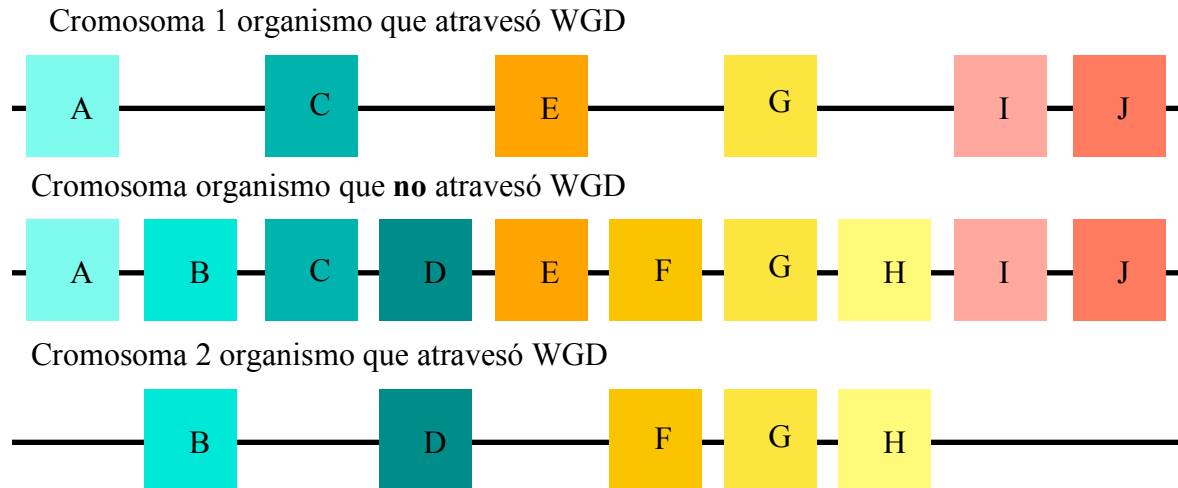


Figura 5. Representación de doble conservación de la sintenia. Se puede observar que el cromosoma del organismo que no atravesó el evento de WGD cuenta con los genes A,B,C,D,E,F,G,H,I,J. En el caso del organismo que atravesó la WGD los genes A,B,C,D,E,F,G,H,I,J se han repartido en los cromosomas 1 y 2, conservando la orientación hacia el centromero, así como el orden. En el cromosoma 1 se encuentran los genes A,C,E,G,I,J, mientras en el cromosoma 2 contiene los genes B,D,F,G,H.

1.5 El destino de los genes duplicados

La mayor parte de los genes duplicados se pierden a lo largo de algunos millones de años cuando no provee ventaja evolutiva alguna al organismo. Los genes que se preservan se mantienen por diferentes mecanismos: 1) Retención de la función ancestral, en ocasiones la retención de la función es benéfica para el organismo, ya que aumenta la dosis génica. 2) Subfuncionalización, la actividad del gen ancestral se reparte entre los dos genes parálogos, por lo tanto, es necesario la retención de ambas copias para llevar a cabo la función ancestral. 3) Neofuncionalización, uno de los genes duplicados adquiere una función nueva, la cual resulta beneficiosa para el organismo, ambas copias se retienen, ya que una lleva a cabo la función ancestral y la segunda copia realiza la nueva actividad (McGrath and Lynch, 2012).

Cundo los genes se retienen con la función ancestral para aumentar la dosis génica, se experimenta un fenómeno de selección positiva y de conversión génica, con lo cual se mantiene la función ancestral. Un ejemplo de genes que provienen de una duplicación y mantienen función ancestral son los genes que codifican proteínas ribosomales (McGrath and Lynch, 2012).

En el caso de la subfuncionalización existe selección positiva en ambas copias, lo cual ayuda a que cada duplicado se especialice y refine su función. Existen diferentes fenómenos cualitativos de subfuncionalización, uno de ellos es cuando la proteína se localiza en diferentes tejidos o compartimentos subcelulares, otro es cuando se expresan en tiempos diferentes. En el caso del fenómeno cuantitativo de subfuncionalización, se refiere a que ambas copias del gen se expresan menos que la proteína ancestral, con lo cual para mantener la dosis génica es necesario la preservación de ambos duplicados; en la mayor parte de las ocasiones las mutaciones se dan a nivel de los reguladores *cis* (McGrath and Lynch, 2012).

Un ejemplo de subfuncionalización son los genes parálogos α y β de la endonucleasa de tRNA de *Sulfolobus solfataricus*. En el ancestro únicamente existía un gen el cual tenía dos funciones, el extremo carboxilo representaba el extremo catalítico, mientras que el extremo amino estabilizaba la forma oligomérica (homotetrámero). En el caso de las endonucleasa de tRNA de *S. solfataricus* es un heterotetrámero con dos diferentes subunidades: α y β . La proteína α posee la capacidad catalítica, mientras que la subunidad β estabiliza la forma oligomérica de la proteína, por tanto, para llevar a cabo la actividad biológica fue necesario la retención de ambas copias (Hughes, 2005).

En la neofuncionalización, es necesario una presión de selección positiva para que mantenga las mutaciones que dieron origen a la nueva función. Debido a que una de las copias se encuentra bajo la selección positiva, el gen restante se encuentra bajo selección purificadora, lo cual ayuda a que se mantenga la función ancestral, por tal motivo un sello característico de las neofuncionalizaciones es una tasa de evolución asimétrica (McGrath and Lynch, 2012). Un ejemplo de neofuncionalización es la proteína anticongelante de tipo III del pez antártico zoártido, la cual se produjo a través de una duplicación de un gen que codifica para una enzima capaz de sintetizar ácido salicílico (Deng et al., 2010).

Adicionalmente a los mecanismos de retención génica mencionados, los parálogos que resultan de un evento WGD son sujetos a mecanismos únicos de preservación y evolución. A pesar de que los genes provenientes de un evento de poliploidización pueden atravesar por la subfuncionalización y neofuncionalización, se sabe que tienden a conservar su función ancestral, ya que en general conservan sus redes de interacción génica (Hakes et al., 2007).

Al realizar diversos estudios en organismos que provienen de un evento de poliploidización, se ha demostrado que en general existe una mayor retención de genes duplicados que genes que provienen de duplicaciones parciales. Se sabe que la retención de genes en un evento de poliploidización va de un 25 al 75%, la excepción es la levadura *Saccharomyces*, la cual retuvo únicamente el 8% de los genes duplicados (McGrath and Lynch, 2012).

Una posible explicación del por qué se tiende a preservar un mayor número de genes duplicados en un evento de poliploidización, es que a diferencia de las duplicaciones parciales del genoma, en la WGD se conserva la estequiometría de las interacciones, ya que se duplican todos los genes pertenecientes a las redes de interacción. En el caso de las duplicaciones parciales del genoma, existe un desbalance en las relaciones estequiométricas entre los otros genes que interactúan, así que al aumentar la expresión de solo un interactor de la red, se observa un desbalance en el sistema, lo cual tiene muchas veces efectos deletéreos. En cambio, cuando existe una WGD, todos los integrantes de la red de interacción se encuentran en la misma relación estequiométrica en la que se encontraban antes de la duplicación (McGrath and Lynch, 2012).

1.6 La evolución del concepto de poliploidización en *Saccharomyces cerevisiae*

En 1987 se propuso por primera vez que el genoma de *S. cerevisiae* provenía de un evento de WGD (Smith, 1987). En 1996 se secuenció por primera vez el genoma de un eucarionte, este eucarionte era *S. cerevisiae*. El genoma de *S. cerevisiae* es un genoma altamente compacto, consta de 12068 kb, con 5885 genes distribuidos en 16 cromosomas, a diferencia de otras levaduras donde el 40% de los genes contienen intrones, únicamente el 4% de los genes de *S. cerevisiae* los contienen. Al realizar un análisis computacional se encontró que existían regiones duplicadas, en especial en regiones pericentales, lo cual era un indicio de una WGD (Goffeau et al., 1996). En 1997 al analizar el genoma de *S. cerevisiae* se encontró que tenía 55 regiones con genes duplicados conservando la sintenia con regiones homólogas en *Kluyveromyces lactis*, lo cual confirmó la hipótesis de Smith. En este mismo estudio se planteó que la WGD del ancestro de *Saccharomyces* se dió después de la divergencia con *Kluyveromyces* (Wolfe and Shields, 1997). En 2004 se secuenció el genoma de *Kluyveromyces waltii*, al comparar su genoma con el

de *S. cerevisiae* se encontró una relación 1 a 2 en los genes que integran los bloques duplicados, además de conservar doble sintenia (Kellis et al., 2004).

En el año 2015, Marcet-Houben y Gabaldón realizaron un estudio evolutivo en el cual se analizó la filogenia de todos los genes de *S. cerevisiae*, encontrando un patrón heterogéneo en la topología de los árboles. En general, cuando un organismo es monofilético (es decir, únicamente cuenta con un ancestro) la topología de los árboles filogenéticos de todos los genes es homogénea; sin embargo, cuando el genoma de un organismo proviene de un evento de hibridación, la topología de los árboles filogenéticos es heterogénea, mostrando tres tipos de topología:

- **Topología A**, el gen analizado se agrupa con el parental A. Esto implica que el gen estudiado mantiene una mayor relación con el parental A.
- **Topología B**, el gen analizado se agrupa con el parental B. Esto implica que el gen estudiado mantiene una mayor relación con el parental B.
- **Topología C**, el gen analizado se posiciona como grupo externo (outgroup) de los parentales A y B. Al posicionarse como outgroup de A y B, a pesar de que se sabe que el gen analizado es más reciente que los genes A y B, se considera que mantiene un carácter híbrido, por tanto, tiene características de A y B (Marcet-Houben y Gabaldón, 2015).

En el caso de *S. cerevisiae* cuando se analizaron los árboles filogenéticos de los genes provenientes de la WGD, se encontró una alta heterogeneidad. Del 54-74% de los genes presentan una topología tipo A en la cual se agrupa con el clado ZT; del 4-14% presenta una topología tipo B, donde se agrupan con el clado KLE y del 14-28% presentan una topología tipo C, donde se posiciona como outgroup de los clados ZT y KLE (figura 6). Esta heterogeneidad en las tipologías de los genes es característica de organismos que sufrieron eventos de hibridación (Marcet-Houben y Gabaldón, 2015).

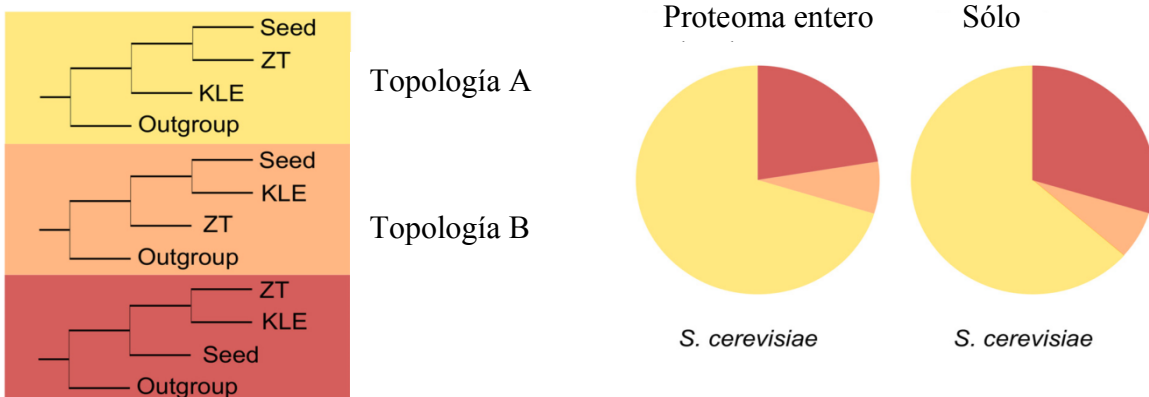


Figura 6. Diferentes topologías presentes en los genes de *S. cerevisiae*. A la izquierda se encuentran las diferentes topologías que presentan los genes de *S. cerevisiae*. A la derecha se presentan las gráficas circulares que representan la proporción de las diferentes topologías en el proteoma entero así como solo en las proteínas ohnologas (figura modificada de Marcet-Houben and Gabaldón, 2015).

Existen dos hipótesis de cómo surgió el ancestro de *S. cerevisiae*. La primera hipótesis supone que dos células haploides de diferentes especies relacionadas se fusionaron, formando una célula diploide, posteriormente esta célula híbrida diploide experimentó una WGD, finalmente esta célula tuvo rearrreglos en su genoma dando origen al genoma actual de *S. cerevisiae* (figura 7A). La segunda hipótesis plantea que dos células diploides de diferentes especies relacionadas se fusionaron y finalmente experimentaron rearrreglos en su genoma dando origen al genoma de *S. cerevisiae* (figura 7B) (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015).

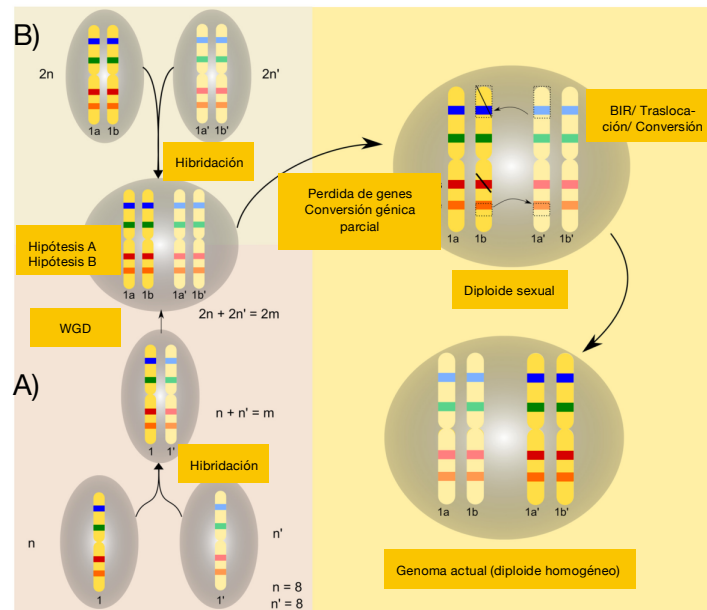


Figura 7. Hipótesis de cómo se originó el ancestro de *S. cerevisiae*. A) Origen a través de fusión de organismos haploides. B) Origen a través de fusión de organismos diploides. (figura modificada de (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015).

1.7 Desarrollo de metabolismo fermentativo en *S. cerevisiae* a través de WGD

El genoma de *S. cerevisiae* se originó a través de una WGD por medio de una hibridación (Wolfe and Shields, 1997; Kellis et al., 2004; Marcet-Houben and Gabaldón, 2015). La mayor parte de las levaduras son incapaces de crecer en condiciones anaerobias, a excepción de *Saccharomyces* y *Brettanomyces/Dekkera*. En el caso del ancestro de *S. cerevisiae* y *K. lactis* se

creo que era una levadura aerobia obligada. Después de que *Saccharomyces* se separara de *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* desarrolló la habilidad de crecer en condiciones anaerobias. Este paso de diversificación requirió una remodelación extrema del metabolismo y de los mecanismos de regulación, por tanto se cree que el proceso de hibridación proveyó las bases para la especialización de los genes y sus correspondientes proteínas para la optimización de un metabolismo facultativo (Piskur et al., 2006).

Se clasificaron los genes que se retuvieron de la WGD en el genoma de *S.cerevisiae*, encontrándose que la mayor parte de estos genes están relacionados con la vía glucolítica. Una consecuencia directa de retener genes relacionadas con la ruta glucolítica es el aumento en la concentración de enzimas de esta vía y por consecuencia un aumento en el flujo glucolítico, lo cual favorece la fermentación alcohólica sobre la respiración oxidativa. Favorecer un metabolismo fermentativo podría parecer desfavorable ya que es ineficiente, a pesar de ello, es rápido y en ciertas condiciones brinda una ventaja evolutiva (Conant and Wolfe, 2007).

Las levaduras del complejo *Saccharomyces* se caracterizan por su habilidad de: a) degradar glucosa o fructosa a etanol en presencia de oxígeno (Efecto Crabtree), b) crecer en ausencia de oxígeno, c) generar mutantes mitocondriales deficientes en la respiración llamadas mutantes petit (Merico et al., 2007).

Se realizó un estudio en el cual se evaluaron diferentes capacidades:

- Capacidad de fermentación
- Capacidad de crecer en condiciones anaerobias
- Capacidad de acumular etanol
- Capacidad de formación de mutantes petit.

El estudio se realizó en 40 diferentes levaduras que representan 150 millones de años a lo largo de la historia evolutiva de *Saccharomyces*. En el caso de las levaduras preWGD se observa que tienen características variables, mientras que las levaduras que se originaron a partir de la WGD tienen la capacidad de fermentar en presencia de oxígeno, generar mutantes petit y son capaces de acumular grandes concentraciones de etanol. Estas capacidades permitieron que el

complejo *Saccharomyces* se adaptara a un entorno con baja concentración de oxígeno (Merico et al., 2007).

Al finalizar el periodo cretácico surgió un nuevo nicho ecológico, las angiospermas, plantas con flores y frutos las cuales cuentan con alto contenido de azúcares. Las levaduras que eran capaces de fermentar entraron en competencia por estos azúcares con las bacterias. La habilidad de fermentar independientemente del oxígeno y de generar, de forma espontánea, mutantes *petit*, fue de vital importancia para la conquista de este nuevo nicho ecológico, debido a que las mutantes *petit* únicamente pueden fermentar y por tanto producir etanol, el cual se acumulaba e inhibía el crecimiento de otros microorganismos, lo cual resultó una ventaja evolutiva (Merico et al., 2007).

1.8 Relación entre el metabolismo de nitrógeno y el de carbono en *S. cerevisiae*

Como se mencionó la WGD permitió el desarrollo de un metabolismo fermentativo, por tanto muchos de los genes que se retuvieron de esta duplicación son genes relacionados con el metabolismo de carbono, aunque también se retuvieron genes involucrados en el metabolismo de los aminoácidos. La razón principal para que los genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos se retuvieran, es que el metabolismo de aminoácidos está ligado al metabolismo de carbono, ya que los precursores aminoácidos son intermediarios de la glucólisis y el ciclo de Krebs.

Un ejemplo de cómo se regula el metabolismo de ciertos aminoácidos a través del metabolismo de carbono, es la expresión de los genes *GDH1* y *GDH3*. Estos parálogos codifican isoformas de la glutamato deshidrogenasas dependientes de NADPH, las cuales producen glutamato a partir de NH_4^+ y α -cetoglutarato. A pesar de ello, cada isoforma se expresa en estados metabólicos diferentes, en el caso de *GDH1* se expresa tanto en condiciones fermentativas como respiratorias, mientras que *GDH3* se expresa únicamente en condiciones respiratorias. Además de diferir en su expresión, tienen diferente afinidad hacia el α -cetoglutarato, Gdh1 tiene mayor afinidad que Gdh3. Estas diferencias tanto en la expresión como en la afinidad por el sustrato se deben a que Gdh3 balancea la distribución del α -cetoglutarato en condiciones respiratorias ya

que se tiene que repartir entre la biosíntesis de glutamato como para la obtención de energía (De Luna et al., 2001).

Otro ejemplo en el cual se puede ver cómo se coordina el metabolismo de los aminoácidos con el metabolismo del carbono, son los parálogos *LYS20* y *LYS21*, estos codifican para homocitrato sintasas, que condensan al α -cetoglutarato y al acetilCoA y producen homocitrato, el primer paso para la biosíntesis de lisina. En este caso *Lys20* y *Lys21* tienen un papel redundante en condiciones fermentativas, pero en condiciones respiratorias *Lys21* es primordialmente el que se encuentra encargado de sintetizar homocitrato, siendo inhibida por lisina, con lo cual regula el uso de α -cetoglutarato en condiciones respiratorias (Quezada et al., 2008).

En el caso de los parálogos *BAT1* y *BAT2*, codifican para aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada y se regulan de acuerdo a la fuente de carbono y nitrógeno. Se encontró que *BAT1* se expresa cuando la fuente de nitrógeno es amonio, mientras que *BAT2* se expresa cuando la fuente de nitrógeno es VIL (valina, isoleucina y leucina) (Colón et al., 2011; González et al., 2017). En cuanto a su regulación, dependiente de la fuente de carbono, *BAT1* se expresa en condiciones fermentativas, mientras que *BAT2* se expresa en condiciones respiratorias. En el caso de su localización, *Bat1* y *Bat2* diversificaron, ya que *Bat1* se encuentra en la mitocondria y *Bat2* en el citosol, a pesar de ello la repercusión biológica aún no se ha determinado (Colón et al., 2011).

1.9 Metabolismo de la alanina en *S. cerevisiae*

El metabolismo de la alanina está fuertemente ligado al metabolismo del carbono. En condiciones de estrés nutricional la alanina se cataboliza formando piruvato que se transforma en oxaloacetato para producir glucosa (Felig, 1973). En *Arabidopsis*, la fermentación anaeróbica del piruvato permite la adaptación a condiciones de baja oxigenación. Durante el estado hipóxico/anóxico, la alanina se cataboliza formando piruvato que a su vez forma lactato, etanol o acetaldehído, con lo que se regenera el NAD^+ del NADH (Ismond et al., 2003). En *Medicago truncatula* la biosíntesis de alanina se utiliza para controlar el pH, ya que la alanina aminotransfera-

sa compete con la lactato deshidrogenasa para la utilización del piruvato, que previene la acidificación del medio (Ricoult et al., 2005).

En los mamíferos, las isoenzimas Alts tienen diferente localización subcelular, es decir, existe una isoforma mitocondrial (Alt-m), la cual se distribuye en órganos gluconeogénicos y una forma citoplasmática (Alt-c), la cual se distribuye en órganos glucogénicos. Durante los periodos de estrés nutricional la Alt-c forma alanina a partir de la degradación de los aminoácidos en los tejidos glucogénicos, la alanina viaja a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde se encuentra la Alt-m, la cual la cataboliza para formar glucosa (Felig, 1973).

ScALT1 y *ScALT2* son genes parálogos (homoeólogos), los cuales surgieron a partir del proceso de aloidización en *S. cerevisiae*, tienen un 65% de identidad, conservan el dominio de unión a piridoxal-5-fostato y los sitios de unión a alanina. En el caso de *ScALT1* se ha demostrado que codifica para una alanina aminotransferasa, la cual aporta un 80% de la poza de alanina y es la única encargada del catabolismo de alanina, ya que una mutante *Scalt1Δ* en medio rico en glucosa alanina no es capaz de crecer (García-Campusano et al., 2009; Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Igual que en el caso de *ScALT1* se estudió su papel en el metabolismo de alanina, analizando el fenotipo de crecimiento de la mutante *Scalt2Δ* en medio glucosa-amonio y glucosa-alanina. En el caso del gen *ScALT2*, no se encontró relación alguna con el metabolismo de la alanina. Al estudiar su regulación se determinó que *ScALT1* y *ScALT2* están regulados por Nrg1 y por alanina. El gen *ScALT1* tiene una regulación de tipo gen catabólico ya que se induce a través de alanina, mientras que *ScALT2* presenta una regulación de tipo gen anabólico pues se reprime por medio de alanina (figura 8) (Peñalosa-Ruiz et al., 2012).

A pesar de que se ha sobreexpresado *ScAlt2*, no se ha logrado detectar actividad de alanina aminotransferasa (Peñalosa-Ruiz et al., 2012), por lo cual se cree que posiblemente tenga otra función. En la literatura se describen casos de genes parálogos en los cuales uno de ellos codifica para una proteína con actividad y el otro parálogo codifica para una proteína regulatoria, tal es el caso de *GAL1/GAL3* (Hittinger and Carroll, 2007).

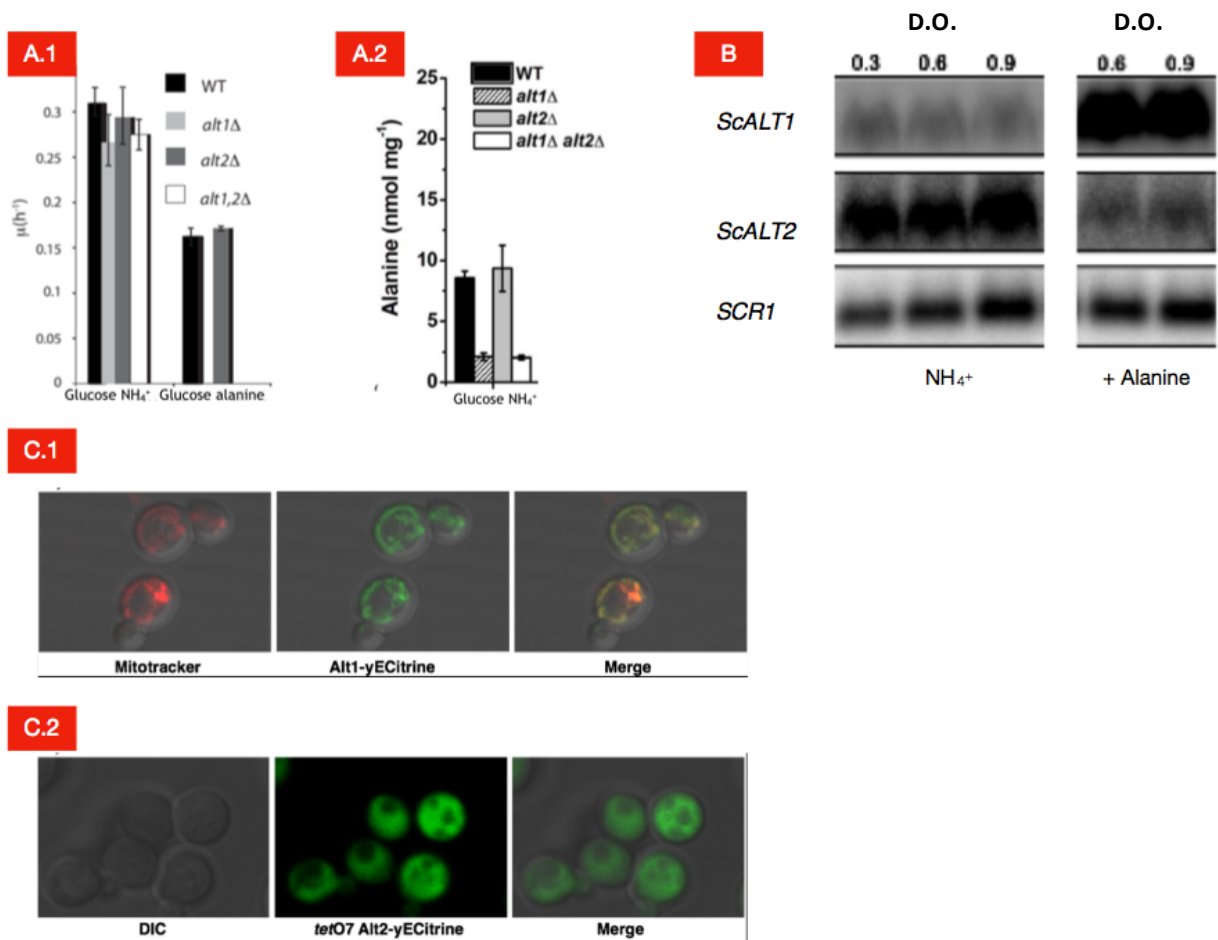


Figura 8. Diversificación de los genes *ScAlt1* y *ScAlt2* de *S.cerevisiae*. A) Diversificación funcional de los genes *ScALT1* y *ScALT2*. A.1) Existen rutas alternativas a *ScAlt1* y *ScAlt2* para la biosíntesis de alanina, ya que al evaluar el crecimiento en medio glucosa-amonio, tanto las mutantes sencillas como las dobles presentaron un fenotipo parecido al presente en la cepa silvestre (WT). *ScAlt1* es la única enzima que cataboliza a la alanina, ya que la mutante sencilla de *ScALT1* no es capaz de crecer en medio mínimo glucosa alanina, en el caso de la mutante sencilla *ScALT2*, se observó un fenotipo WT (figura modificada de Peñalosa-Ruiz et al., 2012). A.2) Se cuantificó la concentración intracelular de alanina en las diferentes cepas (WT, *Scalt1Δ*, *Scalt2Δ* y *Scalt1ΔScalt2Δ*) con lo cual se determinó el aporte de *ScAlt1* y *ScAlt2* en la poza de alanina. *ScAlt1* aporta un 80% de la poza de alanina, mientras que *ScAlt2* no parece estar relacionada con este metabolismo (figura modificada de Peñalosa-Ruiz et al., 2012). B) Al realizar un Northern Blot a diferentes densidades ópticas (D.O. 0.3, 0.6, 0.9), fue posible determinar que *ScAlt1* se induce en presencia de alanina, mientras *ScAlt2* se reprime (figura modificada de Peñalosa-Ruiz et al., 2012). C.1) Al etiquetar la proteína *ScAlt1* con yECitrine se encontró que *ScAlt1* se localiza en la mitocondria C.2) En el caso de *ScAlt2* se localiza en el citosol (figura proporcionada por el Dr. Geovani López).

Adicionalmente, se ha demostrado que en *S. cerevisiae* el metabolismo de la alanina está relacionado con la viabilidad y, al crear una mutante *Scalt1Δ*, la viabilidad se ve reducida en

comparación de la WT, se debe a que en momentos de restricción nutricional *ScAlt1* produce piruvato, el cual a su vez se convierte en oxoglutarato y alimenta al ciclo de Krebs. El piruvato formado por *ScAlt1* también se puede ir a la ruta gluconéogénica (Yu et al., 2013).

1.10 Proteínas PLP dependientes

Como se mencionó, *ScAlt1* y *ScAlt2* pertenecen a las proteínas PLP dependientes, por tal razón para entender el funcionamiento de estas proteínas es necesario comprender cómo se catalizan las reacciones por este cofactor.

1.10.1 Química del PLP

El piridoxal-5-fosfato (PLP), es la forma activa de la vitamina B6; a mediados de los años cuarenta fue identificado como el cofactor de las reacciones de transaminación. El PLP es un cofactor con gran versatilidad química, se sabe que puede llevar a cabo 160 diferentes reacciones químicas (de forma enzimática y no enzimática), las cuales representan el 4% de todas las actividades catalíticas que se han descrito (figura 9) (Eliot and Kirsch, 2004; Percudani and Peracchi, 2003; Raboni et al., 2010; Toney, 2005, 2011).

Las reacciones químicas más comunes que llevan a cabo las enzimas PLP dependientes son: transaminaciones, descarboxilaciones, racemizaciones, β eliminaciones y β sustituciones; además de este tipo de reacciones, pueden llevar a cabo reacciones retro-aldol, γ eliminaciones y γ sustituciones. Las actividades enzimáticas de las proteínas PLP dependientes están involucradas en rutas esenciales biosintéticas del metabolismo de glucosa, lípidos y aminoácidos. Todas las reacciones que llevan a cabo las enzimas PLP dependientes se pueden catalizar por el PLP de forma no enzimática (John, 1995; Percudani and Peracchi, 2003).

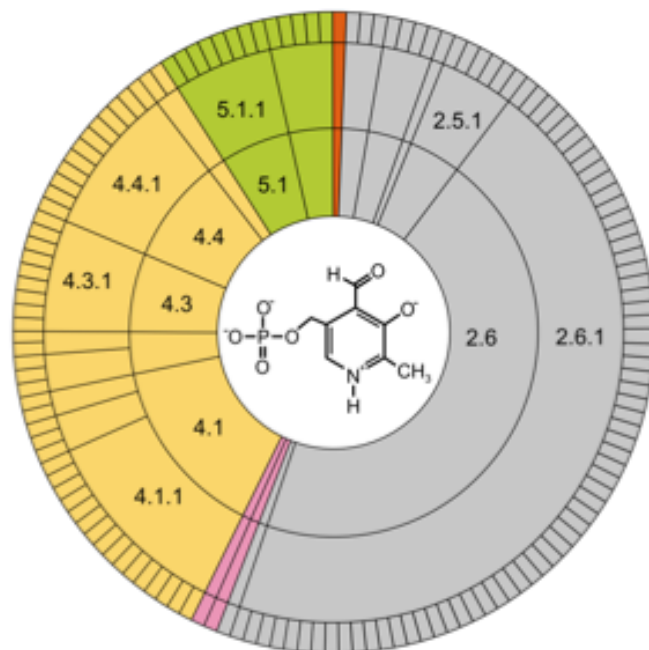


Figura 9. Versatilidad del PLP. El PLP puede llevar a cabo 160 diferentes reacciones. El tipo de reacción se distingue de acuerdo al color y al número que corresponde a la clave EC (Clase enzimática). En gris aquellas reacciones de transferencia (EC 2.6) dentro de las cuales encontramos reacciones donde se transfieren grupos nitrogenados (EC 2.6.1) y reacciones que transfieren grupos alquil y aril (EC 2.5.1). En rojo se encuentran las enzimas que llevan a cabo óxido reducciones. En verde encontramos las enzimas que llevan a cabo isomerizaciones, racemizaciones y epimerizaciones (EC 5.1), en específico enzimas que usan como sustrato aminoácidos ó derivados (EC 5.1.1). En amarillo se encuentran las reacciones de ruptura de enlaces no peptídicos, como las liasas que rompen enlaces carbono carbón (EC 4.1), como son las carboxil liasas (EC 4.1.1); liasas que rompen enlaces carbono nitrógeno (EC 4.3) tales como las amonio liasas (EC 4.3.1) y liasas que rompen enlaces carbono azufre (EC 4.4) como las enzimas que eliminan H₂S ó lo sustituyen (EC 4.4.1). En rosa aquellas enzimas que hidrolisan. Figura modificada de (Percudani y Peracchi, 2003).

El PLP es una molécula parecida al benzaldehído, con la diferencia es que cuenta con un grupo hidroxil unido al carbón 3, un grupo carboxilo en el carbono 4, un grupo fosfato unido al carbón 5 y el anillo aromático se ve sustituido por un anillo que contiene un nitrógeno en posición *para* (figura 10) (Raboni et al., 2010).

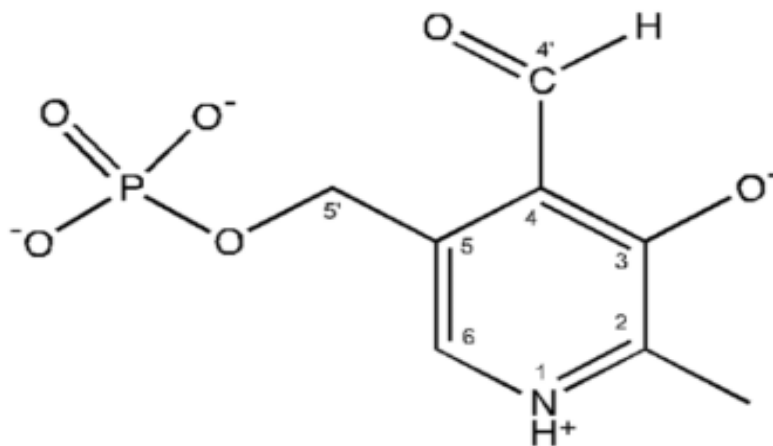


Figura 10. Molécula de PLP

Existen dos propiedades químicas independientes del PLP que son determinantes para la catálisis de las enzimas PLP dependientes. La primera es la formación de un enlace imino entre el grupo aldehído del PLP y una amina primaria. La segunda característica, es la capacidad de formar y estabilizar intermediarios carboaniónicos, los cuales se forman por rupturas heterolíticas de alguno de los enlaces químicos. Normalmente el cofactor forma dos tipos de enlaces imino, en la enzima libre (enzima que no ha unido sustrato) el PLP se encuentra unido mediante una aldimina interna (base de Schiff interna) con el grupo amino- ϵ de la cadena lateral de una lisina de la proteína; el segundo tipo de enlace imino es una aldimina externa (base de Schiff externa) que se forma entre el sustrato y el PLP (figura 11). Los enlaces imino interno y externo son reversibles, el paso de la base de Schiff interna a externa, es un paso obligado en la catálisis de toda enzima PLP dependiente, se da por medio de una reacción de transaldiminación, con la formación de un intermediario gemdiamin (Raboni et al., 2010).

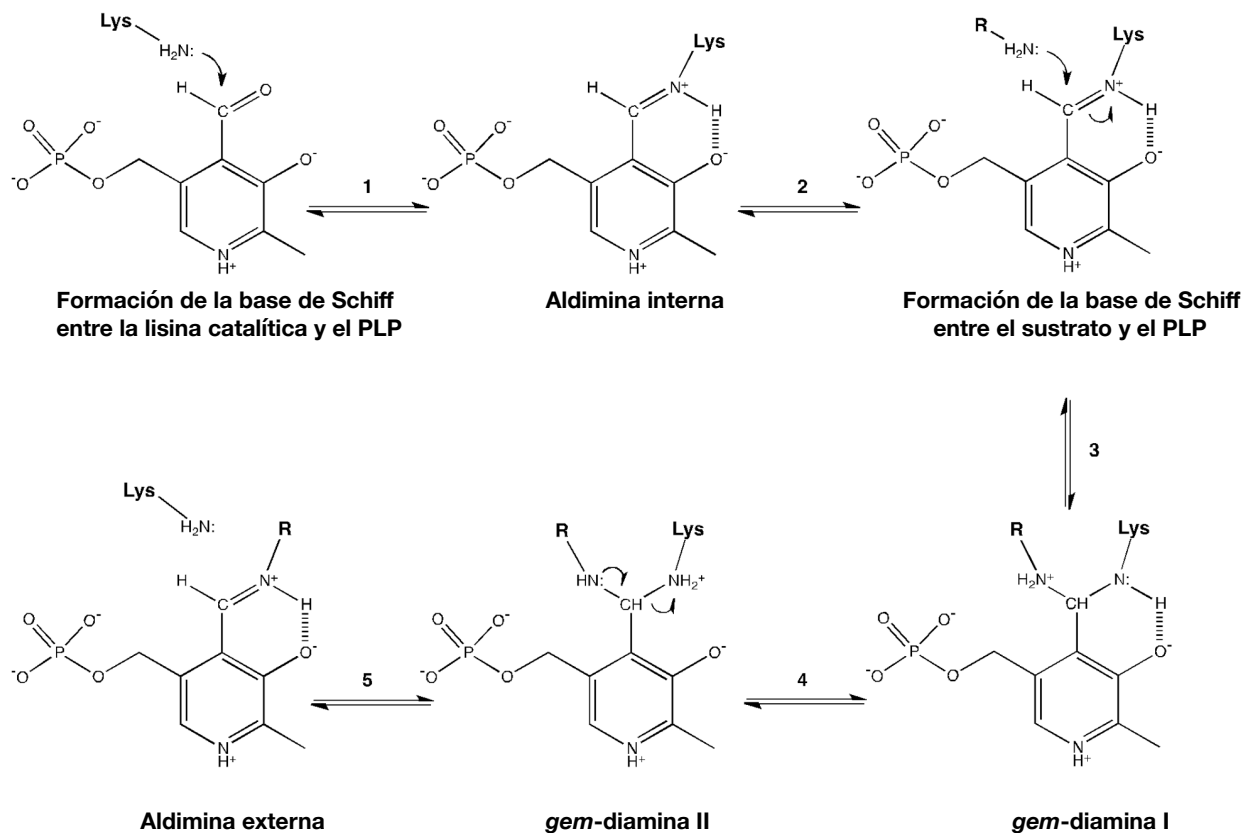


Figura 11. Mecanismo de formación de base de Schiff. (1) Formación de la aldimina interna con el grupo ϵ amino de la lisina del sitio activo; (2 a 5) reacción de transaldiminación: formación de la aldimina externa con el sustrato (aminoácido), con formación de intermediarios diaminas geminales. La reacción de transaldiminación entre las aldiminas internas y externas permite la unión del sustrato y la liberación del producto (figura modificada de Di Salvo et al. 2012).

El PLP es una molécula poco común debido a su eficiencia de reacción. Las reacciones que puede llevar a cabo el PLP, no son similares a ninguna reacción descrita por compuestos carbonílicos. La alta eficiencia del PLP para reaccionar, está dada porque el carbono 4' es altamente electrofílico, lo cual se debe al efecto de atracción de electrones del nitrógeno protonado del grupo piridinium. Además, el anión fenóxido que está en el carbono 3 estabiliza la carga positiva que tiene el nitrógeno del enlace imino por medio de resonancia y enlaces de hidrógeno, lo cual aumenta el carácter electrofílico del carbono 4 y acomoda fácilmente un par de electrones desapareados cuando se da la transaldimidación. Al mismo tiempo existen efectos coulómicos (inductivo y de campo) y de resonancia, el primer efecto es dependiente del segundo, lo cual confiere la capacidad del PLP de ser un receptor de electrones. El nitrógeno 1 (N1) del cofactor en

la base de Schiff externa, remueve electrones del carbono α del sustrato. El déficit de electrones incrementa si el nitrógeno del enlace imino se encuentra protonado, produciendo una polarización, y, por tanto, un debilitamiento de los enlaces del carbono α (figura 12) (Di Salvo et al. 2012).

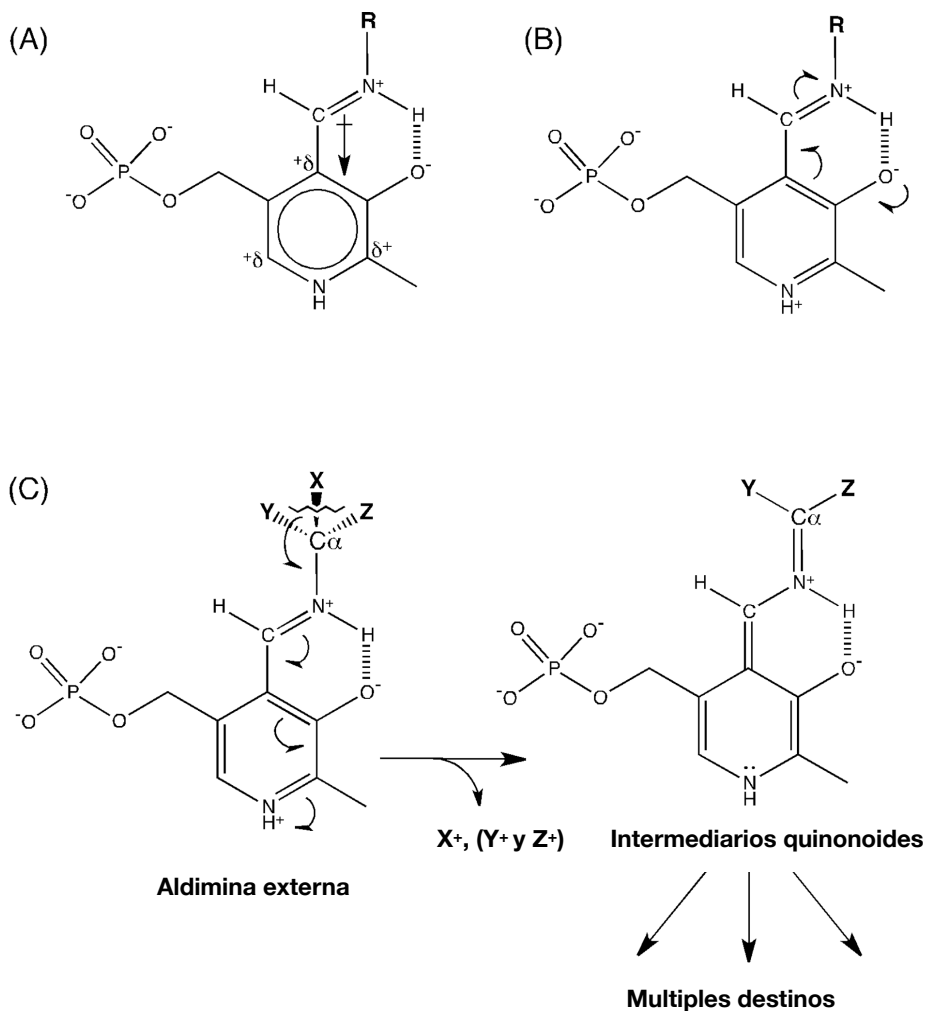


Figura 12. Formación de intermediarios quinonoides. A) Efecto coulombico y B) Efecto de resonancia que se observa en las reacciones catalizadas por PLP. C) Formación de intermediarios quinonoides sobre la ruptura heterolítica de alguno de los enlaces del carbono α . El PLP actúa como un atractor de electrones en la formación del intermediario quinonoide, el paso común en todas las reacciones canalizadas por PLP (figura modificada de Di Salvo et al. 2012).

La conjugación extensiva de los electrones π del anillo aromático, los cuales se extienden hasta el enlace imino y el oxígeno del sustituyente del carbono 3, ayuda a localizar de forma eficiente la carga negativa que se formó a partir de la ruptura heterolítica del enlace. El anillo de nitrógeno que cuenta con una carga neta positiva desempeñan un papel importante en la estabi-

lización de la carga negativa. Por otro lado, la ganancia de energía de deslocalización se debe de tomar en cuenta al momento de la transición del estado cuando ocurre la ruptura de enlaces. Un aspecto importante en la activación de los enlaces σ por medio de un sistema π , son los rearrreglos estereoquímicos. Dunathan a mediados de los años sesenta, fue el primero en proponer que la energía de deslocalización es la responsable de la ruptura de enlaces, el estado de transición tiene que atravesar por una geometría en la cual el enlace que se romperá tendrá que estar situado de forma perpendicular al plano del sistema π , ésta es una forma de controlar la especificidad de la reacción (figura 13) (Di Salvo et al. 2012; Raboni et al., 2010; Toney, 2005, 2011).

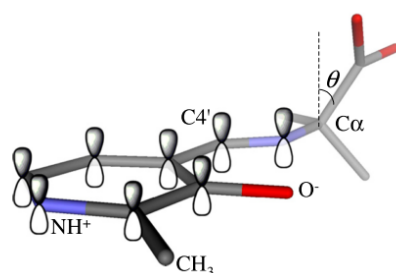


Figura 13. Estructura coplanar entre el enlace imin y el anillo pirimidin del PLP y el sustrato. El enlace que se rompe en las reacciones que dependen del PLP es aquel que se encuentra paralelo a los orbitales del sistema conjugado π , en otras palabras perpendicular al plano del sistema π , θ es el ángulo que se forma entre el plano del sistema π y el enlace del sustituyente que se romperá. Figura tomada de (Toney, 2011).

Como ya se ha mencionado, el PLP es capaz de catalizar un gran número de reacciones en completa ausencia de enzima (evidentemente a una tasa de reacción mucho menor). Se sabe que la tasa de reacción del PLP se acelera al adicionar iones metálicos como son cobre (Cu^{2+}) o aluminio (Al^{3+}). Este aumento en la velocidad de reacción se debe a que los metales quelan la base de Schiff haciendo que ésta tenga una estructura coplanar entre el enlace imin y el anillo pirimidin. El papel que desempeñan los iones metálicos, se sustituye en el caso de las enzimas por la formación de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno 3 y el nitrógeno del enlace imin. El grupo fosfato en el carbono 5 es un punto que ancla la coenzima a la enzima, este sitio de reconocimiento del grupo fosfato del cofactor se llama cup de unión de fosfato, en el caso del grupo metilo del carbono 2 no se ha encontrado ninguna función.

La eficiencia de las enzimas PLP dependientes se basa en la habilidad de acelerar específicamente un tipo de reacción; lo que da ésta especificidad de reacción en las enzimas, es la modulación de las interacciones que el PLP mantiene con las cadenas polipeptídicas que lo rodean. Las enzimas PLP dependientes son capaces de optimizar reacciones específicas a través de modular los estados electrónicos del PLP mediante cambios en el ambiente del sitio activo (Dajnowicz et al., 2017; Toney, 2005).

La interacción del PLP con el entorno del sitio activo optimiza una reacción específica y limita las otras posibles reacciones. La base de Schiff interna y externa tiene cuatro grupos ionizables: el oxígeno fenólico del carbono 3, el grupo fosfato del carbono 5', el nitrógeno del grupo pirimidin (N1), y nitrógeno de la base de Schiff (N2). El PLP en forma libre a pH fisiológico tiene protonado el oxígeno 3' y desprotonado el N1. Los pKa's de la base de Schiff del N2 son de 7 en la base interna y de 10 en la base externa (Dajnowicz et al., 2017; Toney, 2005, 2011).

Es bien sabido que el ambiente local del sitio activo de las enzimas cambia el pKa de los grupos ionizables del sustrato, de los residuos del sitio activo y del cofactor para aumentar la catálisis. Se ha propuesto que para los diferentes tipos de plegamiento de las proteínas PLP dependientes se tiene diferente estado de protonación, lo cual influye hacia qué tipo de reacción realizara la enzima (Di Salvo et al. 2012; Dajnowicz et al., 2017; Toney, 2005, 2011).

Las enzimas PLP dependientes pueden realizar una serie de transformaciones químicas a través de modular los estados electrónicos del PLP por interacciones débiles en el sitio activo. Existen dos hipótesis de cómo el PLP puede llevar a cabo las diferentes reacciones: 1) teoría de control esteroelectrónico, 2) modulación electrónica a través de la protonación.

En el caso del control esteroelectrónico, fue propuesto a mitad de los años 60's por Dunathan, en donde se plantea que uno de los enlaces es debilitado por su orientación, el enlace que se rompe es aquel que queda de forma perpendicular al sistema π del PLP (Dunathan, 1966, 1971).

En el caso de la hipótesis de la modulación electrónica, a través de la protonación, se propone que el entorno inmediato del cofactor es el que gobierna los estados de protonación del PLP, haciendo que la reacción vaya en una dirección u otra (Dajnowicz et al., 2017).

La modulación de la actividad por el estado de protonación y por el efecto estereoelectrónico se puede observar en las estructuras cristalográficas de la aspartato amino transaminasa (AAT) cristalizada a pH 7.5 y pH 4, debido a que existen diferencias significativas en los ángulos de torsión entre el enlace C=C y la distancia entre O-O. Al acidificar el medio (pH 4) se protona la base de Schiff y, a su vez, ésta forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno 3, cambiando el ángulo de torsión de 46° a 22°. Las consecuencias de los cambios en el estado de protonación en el cofactor de la AAT se ven reflejados en la geometría del sitio catalítico, lo cual puede explicar la falta de actividad enzimática de la AAT a pH 4 (Dajnowicz et al., 2017).

Se ha demostrado que para que se lleve cierto tipo de reacción es necesario un estado específico de protonación de los grupos funcionales. Por ejemplo, en el caso de la triptofano sintasa (TST) se tiene protonada la base de Schiff y desprotonado el N1. En la AAT, el N1 se encuentra protonado y el N2 desprotonado. En el caso de la AAT cataliza una reacción de transaminación, mientras la TST promueve una reacción de β eliminación. Las diferencias locales en los sitios activos de la AAT y de la TST, son dadas por los diferentes estados de protonación de sus grupos funcionales. Especialmente en la AAT y el aspártico forman un puente de hidrógeno con el N1, mientras que en la TST la serina se encuentra unida al N1. El diferente estado de protonación de estas dos enzimas es responsable de promover las dos diferentes actividades enzimáticas y a su vez evitar que otras reacciones secundarias ocurran (Dajnowicz et al., 2017).

1.10.2 Evolución de las proteínas PLP dependientes

Se cree que las enzimas PLP dependientes surgieron con una única característica: un sitio de unión al PLP (una lisina que formaba una base de Schiff con el cofactor). Se propone que la base de Schiff interna se conservó en la mayor parte de las enzimas PLP dependientes, ya que esto asegura que el PLP no se disocié de la proteína, en especial en sitios activos altamente expuestos al solvente (Raboni et al., 2010).

Se cree que las primeras enzimas PLP dependientes no tenían gran especificidad al sustrato, estas enzimas eran capaces de unir una gran cantidad de aminoácidos y eran catalíticamente promiscuas, es decir, eran capaces de llevar gran parte de las reacciones catalizadas por el PLP libre.

La optimización de las interacciones no covalentes permitió que 1) se especializaran las enzimas en cierto tipo de reacciones, 2) una especialización del sustrato, 3) una mejora en las capacidades catalíticas (Christen and Mehta, 2001; Mehta and Christen, 2000; Raboni et al., 2010).

Mejorar la especificidad de la reacción en las enzimas PLP dependientes significa en primer lugar, favorecer la ruptura específica de uno de los enlaces que unen el C α del aminoácido, ya sea el protón α , el carbono β o el grupo carboxilato. De acuerdo a la teoría de Dunathan, el enlace que se romperá es aquel que se orientará de forma perpendicular al plano del PLP, maximizando el solapamiento de los electrones π del cofactor y estabilizando la carga negativa que se producirá al romper alguno de los enlaces. Como se explicó en el apartado anterior esta modulación de las relaciones PLP dependientes se da por medio de la regulación de los estados de protonación de los grupos funcionales del PLP, lo cual se logra al controlar las interacciones de estos grupos funcionales y las cadenas laterales de la proteína (Christen and Mehta, 2001^a, 2001^b; Raboni et al., 2010). En estudios recientes, se ha encontrado que a pesar de la gran variedad de reacciones que pueden llevar las enzimas PLP dependientes, únicamente existen 6 ó 7 tipos de plegamientos de estas enzimas y que pequeñas modificaciones en el sitio activo dan como resultado cambios en la capacidad catalítica (Toney, 2014). Cada grupo estructural se puede considerar un linaje evolutivo independiente, el cual lleva a cabo múltiples tipos de reacciones (Christen and Mehta, 2001, 2001; Raboni et al., 2010).

En estudios previos se ha demostrado que las enzimas PLP dependientes se agrupan en 5 grupos principales de plegamiento:

Las proteínas con **plegamiento tipo I**: es el grupo más representativo, consiste en dos dominios estructurales, uno mayor y uno menor, donde el cofactor se encuentra en medio de ambos

dominios. La enzima prototipo de este grupo de plegamiento es la AAT, a pesar de ello, dentro de este linaje de proteínas se encuentran reacciones que se catalizan en el carbono α y β (figura 14a) (Eliot and Kirsch, 2004; Raboni et al. 2010).

La enzima prototipo del **plegamiento tipo II**: es la triptófano sintasa (TRPS), este tipo de enzimas solo puede catalizar reacciones de β eliminaciones y γ sustituciones. Las enzimas con plegamiento tipo II están conformadas por dos dominios del mismo tamaño (figura 14b) (Eliot and Kirsch, 2004; Raboni et al., 2010).

Las proteínas pertenecientes al **plegamiento tipo III**: tienen como enzima prototipo la alanina racemasa (AlaR), no se han descubierto muchas enzimas en este tipo de plegamiento, éstas están constituidas por dos dominios, uno constituido por un barril α/β y un dominio de laminas β -plegada (figura 14c) (Eliot and Kirsch, 2004; Raboni et al., 2010).

Las proteínas con **plegamiento tipo IV**: tienen como enzima prototipo la D amino transferasa (DAAT). Las enzimas con este tipo de plegamiento consistente en un dominio pequeño y otro grande (figura 14d).

Las proteínas con **plegamiento tipo V**: representan la glucógeno fosforilasa. En la mayoría de los casos son enzimas diméricas con dos sitios activos que se contraponen, el sitio activo está conformado por sitios de ambas subunidades (Eliot and Kirsch, 2004; Raboni et al. 2010).

Todas las enzimas PLP dependientes son proteínas oligoméricas que pueden ir de dímeros a dodecámeros, la forma monomérica de esta clase de enzimas es inactiva (Eliot and Kirsch, 2004; Raboni et al. 2010).

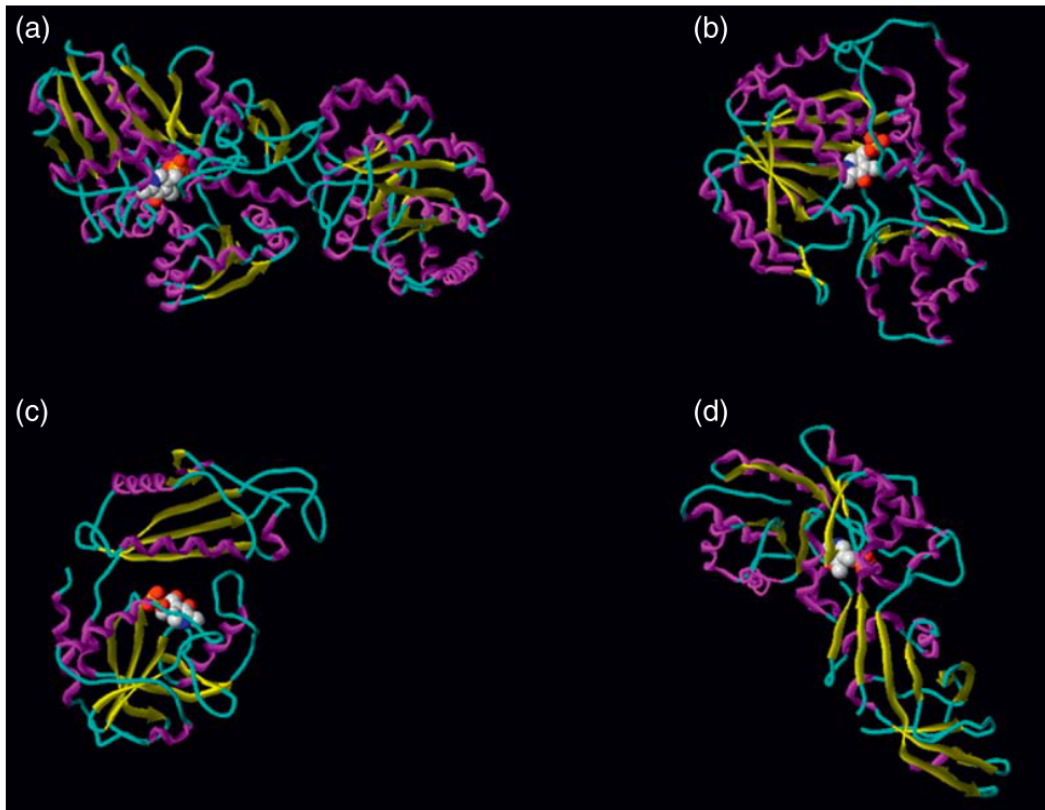


Figura 14. Estructura tridimensional de 4 tipos de plegamiento en las proteínas PLP dependientes. En a,b c y d se muestran los modelos tridimensionales prototipicos de cada tipo de plegamiento de las proteínas PLP dependientes. En morado se observan las α hélices, en amarillo las laminas β plegadas, en verde las regiones de coneccion entre las escruturas secundarias y finalmente la molécula de PLP se encuentra representada en modelo espacial (esferas). a) Aspartato amino transaminasa, plegamiento tipo I, b) triptofano sintasa, plegamiento tipo II, c) alanina racemasa, plegamiento tipo III d) D amino transferasa, plegamiento tipo IV. No se incluyó el plegamiento tipo V, representado por la glucógeno fosforilasa (Raboni et al. 2010).

1.10.3 Origen y evolución de las enzimas PLP dependientes con plegamiento tipo I

Las proteínas con plegamiento tipo I son por mucho, las proteínas con mayor diversidad funcional. Además esta clase de enzimas se encuentran mayormente distribuidas en los organismos actuales: un estudio de 20 genomas que van desde organismos de vida libre como metanógenos hasta el hombre, demostró que únicamente dos enzimas PLP dependientes eran comunes, las cuales pertenecen al plegamiento tipo I (la AAT y la serina hidroximetil transferasa SHMT). Esta observación nos hace pensar que las proteínas con plegamiento tipo I son las más antiguas

dentro del grupo de las PLP dependientes (Raboni et al., 2010; Mehta and Christen, 2000, 2001; Percudani and Peracchi, 2003). Una hipótesis alternativa aunque menos probable, es que las proteínas pertenecientes a los demás tipos de plegamiento no son tan adaptables en la adquisición y desarrollo de nuevas actividades y especificidad a nuevos sustratos (Mehta and Christen, 2000, 2001).

Christen y Mehta en el año 2000 reconstruyeron el pedigree de las enzimas PLP dependientes con plegamiento tipo I. Encontraron que el ancestro común se especializó en reacciones con cambios covalentes limitados en el carbono α , en particular, transaminaciones y descarboxilaciones. En el caso de las transaminasas, estas divergieron y formaron cinco diferentes subgrupos, tres subgrupos de transaminasas (ATI, ATII y ATIV), un grupo de acriltransferasas CoA dependientes, y un grupo que se especializó en reacciones de γ/β eliminación/remplazamiento. Se cree que las enzimas ancestrales tenían una propensión por especializarse en un tipo de reacción teniendo múltiples sustratos y posteriormente, vino la especialización de uso de pocos sustratos (Raboni et al., 2010; Mehta and Christen, 2000).

1.10.4 Evolución convergente y divergente en proteínas PLP dependientes

Con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, cada vez es más común tener mayor número de genomas a nuestra disposición. Esta información nos permiten el estudio de la evolución de las proteínas. En este sentido la identificación y clasificación de la estructura de las proteínas PLP dependientes se ve favorecida, ya que se conoce un gran número de estructuras, además de que sólo existen 6 ó 7 tipos de plegamiento, lo cual facilita su reconocimiento; funcionalmente, las enzimas PLP dependientes han sido estudiadas a lo largo de décadas y el tipo de reacciones que pueden llevar a cabo se entienden a la perfección. A pesar de ello existen grandes limitaciones para asignar una función de acuerdo a su secuencia de aminoácidos (Raboni et al., 2010; Percudani and Peracchi, 2003).

A pesar de que el criterio de homología nos permite determinar las relaciones estructurales y por tanto filogenéticas, existen muchos más factores para determinar la función de la proteína. En el caso de las proteínas PLP dependientes, existen problemas al tratar de asignar una función de acuerdo a un criterio de homología en secuencia de aminoácidos, ya que debido a los meca-

nismos de catálisis puede existir convergencia evolutiva (aparición de una misma actividad enzimática en dos linajes diferentes) y divergencia evolutiva (a pesar de tener el mismo ancestro común, las proteínas tienen diferentes actividades). El segundo factor que limita la terminación de la función por un criterio de homología es que esta clase de enzimas puede cambiar fácilmente su especificidad al sustrato (Raboni et al., 2010).

2.0 Planteamiento del problema

ScALT1 y *ScALT2* son genes homoeólogos de *S. cerevisiae*, los cuales tienen un 65% de identidad en la secuencia de aminoácidos y conservan tanto los sitios de unión al PLP como a la alanina. Se ha demostrado que *ScAlt1* es una alanina aminotransferasa, en el caso de *ScAlt2* no se ha podido determinar su función. Se sabe que la expresión de los genes *ScALT1* y *ScALT2* ha diversificado, al igual que su localización subcelular. *ScALT1* presenta una regulación catabólica ya que se induce en presencia de alanina (sustrato) y la proteína se encuentra en la mitocondria, mientras que *ScALT2* se reprime en presencia de alanina y la proteína se encuentra en el citosol. En el presente estudio se abordará la caracterización de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, para identificar las diferencias que provocaron que *ScAlt2* perdiera la capacidad como transaminasa de alanina.

3.0 Objetivos

Objetivo general

Caracterizar las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, con el fin de determinar las diferencias que hicieron que *ScAlt2* no tenga actividad como transaminasa de alanina.

Objetivos particulares:

- Purificar las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*
- Caracterizar las propiedades cinéticas de *ScAlt1*
- Realizar un análisis estructural comparativo entre las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*

4.0 Metodos

4. 1. Clonación y sobreexpresión de *ScALT1* y *ScALT2* en *Escherichia coli*

Los genes *ScALT1* y *ScALT2* de *S. cerevisiae* se amplificaron por medio de PCR, utilizando los pares de cebadores 1/2: FrwAlt1 (GCG CGC CAT ATG CAA TCT TCG CTA AAC GAC CTG C) y RvsAlt1 (CGC GCG CTC GAG CCC TTT TAT TCA GTC ACG GTA TTG G), y 3/4 FrwAlt2 (GCG CGC GCT AGC ATG ACA ATG ACA CAC CAA CAG G) y RvsAlt2 (CGC GCG CTC GAG TCA ATT ACG ATA CTT GCT GAA GAAGAA ATC) respectivamente. El ADN genómico que se utilizó como molde fue el de *S. Cerevisiae* CLA1 WT (MATa *ScALT1*) Cepa *ScALT2 ura3Δleu2Δ*). En el caso de la amplificación del gen *ScALT1*, no se incluyó la secuencia mitocondrial.

Los productos de PCR de *ScAlt1* y *ScAlt2* se digirieron con *NdeI/XhoI* y *NheI/XhoI* respectivamente, al igual que los plásmidos pET-28a (+). Los productos de la digestión se purificaron por medio del kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System”; posteriormente se ligaron los plásmidos y los insertos. Las ligaciones se transformaron en *E. coli* DH5α. Los plásmidos se purificaron por medio del kit “QIAGEN Plasmid maxi kit” y posteriormente se verificaron mediante secuenciación.

Para realizar la expresión heteróloga de los genes *ScALT1* y *ScALT2*, se transformaron células de *E. coli* Rosetta 2™ (DE3) (Novagen). Las clonas seleccionadas de *ScALT1* se cultivaron en medio LB con 50 µg·ml⁻¹ de kanamicina y 70 µg·ml⁻¹ de cloranfenicol, a 37°C con agitación (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una D.O. de 0.6 a 600 nm, se indujo la expresión de las proteínas con 200 µM de isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), se incubaron durante toda la noche a 30°C con agitación (250 rpm), las células se cosecharon por centrifugación a 1100 g durante 15 minutos, y el paquete celular se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para sobreexpresar la proteína *ScAlt2* en forma soluble, se modificó el protocolo San-Miguel (San-Miguel et al., 2013), el cual permite la inducción de la forma soluble de proteínas que tienden a incorporarse a cuerpos de inclusión. Las células transformadas con el plásmido pET28a (+) *ScALT2* se propagaron en medio LB con 50 µg·ml⁻¹ de kanamicina y 70 µg·ml⁻¹ de

cloranfenicol y se incubaron a 30°C con agitación (250 rpm). Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0.2 a 600 nm, se indujo la proteína con 100 µM de IPTG, incubándose durante una semana a 4°C con agitación (250 rpm). Las células se cosecharon por medio de centrifugación a 1100 g durante 15 minutos, el paquete celular se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* contaban con una etiqueta de histidina (6X His) en el extremo amino terminal.

4. 2. Obtención de extractos solubles

El paquete celular de *ScAlt1* se suspendió en 10 ml de buffer de lisis (30 mM imidazol, NaCl 1M, K₂HPO₄ 50 mM, 1 mM EDTA, 1 mM ditioneitol, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), pH 8). Los extractos solubles se obtuvieron mediante sonicación (VCX 130: Ultrasonic Processor), todo el proceso se realizó manteniendo los tubos en hielo, se realizaron 5 ciclos de sonicación de 1 min (70% de amplitud, un segundo encendido y un segundo apagado), cada ciclo de sonicación se intercaló con 1 minuto de incubación en hielo. Después de la centrifugación a 1100 g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se almacenó a 4°C. El extracto soluble de *ScAlt2* se preparó resuspendiendo las células en 10 ml de buffer de lisis (NaCl 2 M, K₂HPO₄ 50 mM, más una tableta de cocktail de inhibidor de proteasa “complet Mini” libre de EDTA (Roche Inc.) y 1 mM de fenil-metil-sulfona-fluoruro (PMSF), pH 8). El extracto proteico se obtuvo por medio de sonicación, tal como se describió arriba.

4. 3. Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC)

La purificación de la proteína *ScAlt1* se realizó cargando la fracción soluble del extracto proteico en una columna de níquel (Ni-NTA Agarosa, Qiagen), la cual se lavó con 50 volúmenes de 30 mM imidazol, 50 volúmenes de 50 mM imidazol y 10 volúmenes de 80 mM imidazol. *ScAlt1* se eluyó con 300 mM imidazol y se almacenó a 4°C. En el caso de la proteína *ScAlt2*, el extracto soluble se incubó con 1 ml de resina de níquel (Ni-NTA Agarosa, Qiagen), durante 1 hora en agitación y posteriormente se empaquetó la resina en una columna de vidrio, se lavó con 50 volúmenes de buffer de lisis y se siguió el protocolo descrito para la purificación de *ScAlt1*.

La homogeneidad de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se evaluó a través de un gel de poli-acrilamida SDS- PAGE (12%) y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie G250. Las proteínas fueron concentradas 10 veces con centricones marca Amicon® Ultra-15 con corte de 10KDa. Las proteínas se diluyeron hasta alcanzar el volumen inicial, añadiendo buffer de ensayo (50 mM K₂HPO₄, 4 mM MgCl₂, 100 mM de PLP, a pH 7.5), este proceso se realizó tres veces.

4. 4. Ensayo enzimático de transaminasa de alanina

El protocolo que se siguió es el descrito en el manual de Métodos de análisis enzimático (Bergmeyer, 2012). La mezcla de reacción contenía (50 mM de K₂HPO₄, 20 mM de alanina, 6 mM de α -cetoglutarato, 250 μ M de NADH, 5 Uml⁻¹ de lactato deshidrogenasa, y 40 μ M de PLP pH 7,5). Como control, los ensayos se realizaron sin alanina. Para determinar la actividad específica, se determinó la pendiente que representa la velocidad inicial de reacción, a cada ensayo se le restó la pendiente del control negativo. Todos los ensayos se realizaron a 25°C en un espectrofotómetro Varian Cary 50, siguiendo la absorbancia a 340 nm. La proteína se determinó de acuerdo con el método descrito por Lowry (Lowry et al., 1951), usando albúmina sérica bovina como estándar (BSA).

Para realizar la caracterización enzimática de *ScAlt1*, se determinaron las velocidades iniciales variando de forma simultánea la concentración de alanina y α -cetoglutarato. En el caso de la concentración de alanina se varió la concentración de 2 a 15 mM y del α -cetoglutarato de 0.05 a 10.00 mM. Se realizó un ajuste global a la ecuación de velocidad de un mecanismo ping-pong (Segel, 1993), utilizando GraphPad Prism 6.00 (Software Inc.).

$$V_0 = (V_{max} [A] [B]) / (K_{m_A} [B] + K_{m_B} [A] + [A] [B])$$

Ecuación 1. Ecuación de un mecanismo ping-pong en estado estacionario

Donde:

A= alanina B= α -cetoglutarato K_{m_A} = $K_{m_{alanina}}$ K_{m_B} = $K_{m_{\alpha\text{-cetoglutarato}}}$

4. 5. Modelado molecular de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*

La secuencia de ADN de *ScALT1* y *ScALT2* se obtuvo a partir del cromosoma S288c de *S. cerevisiae* (Secuencia de Referencia NCBI: NC_001144.5) y el cromosoma IV S288c (Secuencia de Referencia NCBI: NC_001136.10). Los dos genes, *ScALT1* y *ScALT2*, codifican proteínas de 1024 y 1014 aminoácidos de longitud, respectivamente. Para encontrar estructuras homólogas a *ScAlt1* y *ScAlt1*, se realizó una búsqueda de alineación local básica (por sus siglas en inglés BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1997), en el banco de datos de proteínas (por sus siglas en inglés PDB). Se encontró que, en ambos casos, la estructura cristalográfica que contaba con mayor identidad y cobertura fue la estructura de transaminasa de alanina de *Hordeum vulgare* (3TCM.pdb) (Duff et al., 2012), por tanto, se seleccionó como molde para el modelaje de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. La secuencia de aminoácidos de la transaminasa de alanina de *Hordeum vulgare* con las secuencias de *ScAlt1* y *ScAlt2* mostró una identidad del 46 y 45% y con una cobertura de 94 y 96%, respectivamente. Los modelos de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se construyeron usando el programa MODELLER 9.17, como se mencionó, usando como molde la estructura cristalográfica 3TCM.pdb (Webb and Sali, 2017); los modelos que fueron elegidos fueron aquellos con menor energía. Finalmente, se realizó un refinamiento estructural utilizando la aplicación Rosetta "relax" (Leaver-Fay et al., 2011). Los modelos fueron validados utilizando el software Verify-3D (software de evaluación de estructuras) (Lüthy et al., 1992) y What check (software de herramientas de verificación de proteínas) (Hooft et al., 1996). La estructura del ligando se construyó usando el software HyperChem (Froimowitz, 1993). Las estructuras de los ligandos se minimizaron usando Gaussian 09A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT).

4. 6. Análisis de Dicroísmo Circular

Las estructuras secundarias de *ScAlt1* y *ScAlt2* se evaluaron espectroscópicamente usando Dicroísmo Circular (DC) con un espectropolarímetro (Jasco J-810®, Easton, MD, EE. UU.) equipado con un soporte de células termostáticas Peltier en una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de longitud. Los espectros de DC en el UV lejano de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se obtuvieron haciendo un barrido de 190-280 nm en intervalos de 1 nm. La proteína se encontraba a una concentración de 0.25 mgml⁻¹ en K₂HPO₄ 50 mM, MgCl₂ 4 mM, PLP 100 μM a pH 7.5. Como

blanco se utilizó el mismo buffer pero sin adicionar proteína; los blancos se restaron de los datos espectroscópicos en presencia de las proteínas. Los experimentos se realizaron a 25 °C.

4. 7. Estabilidad térmica de *ScAlt1* y *ScAlt2*

La estabilidad térmica de *ScAlt1* y *ScAlt2* se determinó a partir de la señal de DC a 222 nm variando la temperatura de 8-90 °C, con un aumento a una velocidad de 1°C / 2.5 min; la proteína se encontraba a una concentración de 0.25 mg·ml⁻¹ en K₂HPO₄ 50 mM, MgCl₂ 4 mM, PLP 100 μM a pH 7.5. Los espectros sin proteína se sustrajeron de aquéllos que contenían las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, respectivamente. Se calculó la temperatura de fusión (T_m), que corresponde a la temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra desplegada.

4. 8. Ensayos de Fluorescencia intrínseca de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*

Los espectros de emisión de fluorescencia se determinaron con un espectrofluorómetro Shimadzu RF5-00U. Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se encontraban a una concentración de 200 μg·ml⁻¹ en 50 mM de K₂HPO₄, 4 mM de MgCl₂, 100 μM de PLP a pH 7.5. Las proteínas se excitaron a 295 nm y se realizó un barrido de 300 a 450 nm. Se utilizó como blanco el espectro de fluorescencia del buffer en el cual se encontraban las proteínas y se restó a los espectros de fluorescencia de las proteínas *ScAlt1* o *ScAlt2*. Para el experimento realizado con hidrocloreto de guanidina (Gdn/HCl), las proteínas se encontraban en una solución 6M Gdn/HCl, preparada en K₂HPO₄ 50 mM, MgCl₂ 4 mM, a pH 7.5. Los espectros de emisión se registraron después de 2h de incubación con Gdn/HCl.

4. 9. Apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las proteínas

Los espectros de emisión-fluorescencia se determinaron en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5-00U. Los espectros de emisión de fluorescencia de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se registraron de 300 a 450 nm, las muestras se se excitaron a una longitud de onda de 295 nm, las proteínas se encontraban a una concentración de 250μg·ml⁻¹. De forma gradual se fue adicionando, en pequeños volúmenes, una solución concentrada de acrilamida (8M) y se monitoreó

el cambio de la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (Eftink and Ghiron, 1976). Los resultados se ajustaron a la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv} [Q]$$

Ecuación 2. Ecuación de Stern-Volmer

F_0 / F = relación de la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de acrilamida
 $[Q]$ = [extintor] en este caso acrilamida K_{sv} = la constante de apagamiento.

4. 10. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Para determinar el peso molecular de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se realizó una cromatografía de exclusión molecular (SEC), con una columna con resina Superose 6 10/300 GL acoplada a un sistema de FPLC Äkta. La fase móvil era un buffer compuesto por K_2HPO_4 50 mM, $MgCl_2$ 4 mM, pH 7.5. Se monitoreó la proteína siguiendo la absorbancia a 280 nm. La columna se calibró con estándares de peso molecular de la marca Bio-Rad.

4.11. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

Se determinó el tamaño de las proteínas por medio de ensayos de dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés). Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se encontraban a una concentración de $1\mu g/\mu l$ en 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM $MgCl_2$, 100 mM de PLP, a pH 7.5. Antes de realizar los ensayos, las muestras fueron filtradas con filtros con un diámetro de poro de 0.22 μm . Para la realización de la prueba se utilizó una cubeta de cuarzo de 500 μl con un paso de luz de 10 mm. Los datos se obtuvieron con Zetasizer mV DLS, el cual se encuentra equipado con un láser de fotodiodo (830 nm) (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los valores de DLS son el promedio de 10 exploraciones distintas, las cuales se tomaron en un lapso de 10 segundos. El software del instrumento se usó para analizar los datos y obtener los diámetros de las proteínas.

4. 12. Determinación de afinidad de unión a alanina *ScAlt1* y *ScAlt2*

La afinidad de unión a alanina de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se determinó a través de una titulación registrando el cambio en la intensidad de fluorescencia a 389 nm. Los espectros de emisión de fluorescencia de *ScAlt1* y *ScAlt2* se realizaron con un espectrofluorómetro Shimadzu RF5-00, éstos se registraron de 300 a 450nm, excitando a una longitud de onda de 295nm. *ScAlt1* y *ScAlt2* ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) se titularon añadiendo concentraciones crecientes de alanina (0-50 mM), la cual se encontraba en K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, PLP 100 μM , pH 7.5. El valor de la constante de disociación (K_d) se calculó ajustando los datos a la siguiente ecuación:

$$Y = (\text{Bmax}X) / (\text{Kd} + X)$$

Ecuación 3. Ecuación de unión específica de un sitio

Y= Δ Fluorescencia intrínseca X= Concentración ligando Bmax= unión específica máxima

Kd= constante de unión al equilibrio

4.13. Determinación de actividad catalítica de *ScAlt1* y *ScAlt2* con diferentes aminoácidos

Se estudió la catálisis entre *ScAlt1* y *ScAlt2* con diferentes aminoácidos, para ello se determinó la formación de la Base de Schiff externa entre el PLP y diferentes sustratos. La formación de la Base de Schiff externa es indicativo de catálisis, ya que es el primer paso en las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de PLP. Para este propósito seguimos los cambios en el espectro UV-visible, a través del espectrofluorómetro NanoDrop™ y comparamos el espectro de la proteína con y sin adición del aminoácido. Cuando PLP forma una Base de Schiff externa, se observó la aparición de un pico máximo a 325 nm (Binter Alexandra et al., 2011). *ScAlt1* y *ScAlt2* se encontraban a $12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en KH_2PO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, PLP 500 μM . Para llevar a cabo la reacción se mezclaron 10 μl de la proteína con 1 μl de una solución stock 10X del aminoácido y obtuvo su espectro. Todas las soluciones Stock 10X de aminoácidos se prepararon en KH_2PO_4 50 mM y MgCl_2 4 mM. A continuación se presenta la concentración de las soluciones Stock 10X: alanina 162 mM, arginina 60mM, asparagina 8,2 mM, ácido aspártico 81 mM, cisteína 238 mM, ácido glutámico 81 mM, glutamina 171 mM, glicina 8 mM, histidina 20 mM, isoleucina 7 mM, leucina 5 mM, lisina 19 mM, metionina 1,6 mM, fenilalanina 5 mM, prolina 2,3 mM, serina 23 mM, treonina 22 mM, triptófano 2mM, tirosina 3mM y valina 361 mM.

4.14 Determinación de la afinidad de *ScAlt1* hacia diferentes aminoácidos

Debido a que *ScAlt1* forma una Base de Schiff externa con: cisteína, glutamina, serina, alanina, histidina, ácido glutámico y aspartato; se decidió determinar su afinidad a estos aminoácidos. Para ello se evaluó el cambio en su espectro de emisión de fluorescencia en presencia de los diferentes aminoácidos, los cuales se encontraban a una concentración de 10 mM. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5-00U. La proteína *ScAlt1* se encontraba a una concentración de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en 50 mM de K_2HPO_4 , 4 mM de MgCl_2 , 100 μM de PLP a pH 7.5. Se excitó a 295 nm y se realizó un barrido de 300 a 450 nm. Posteriormente se realizaron las titulaciones de *ScAlt1*, con los diferentes aminoácidos siguiendo el cambio de intensidad de fluorescencia a 389 nm tal como se describe en la sección 4.11. En algunos casos, como es la curva de titulación de los aminoácidos ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina e histidina no se ajustaron a la ecuación 3, estas curvas de titulación se ajustaron a la ecuación de unión específica con pendiente de Hill, ya que mostraron cooperatividad.

$$Y=B_{\text{max}}*X^h/(K_d^h+X^h)$$

Ecuación 4. Ecuación de unión específica con pendiente de Hill

$Y = \Delta$ Fluorescencia intrínseca $X =$ Concentración ligando $B_{\text{max}} =$ unión específica máxima

$K_d =$ constante de unión al equilibrio $h =$ constante de Hill

4. 15. Espectroscopía de absorción

Los espectros UV-visible de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se registraron en un espectrofotómetro Cary 400 (Varian) y se analizaron usando el software Cary WinUV (Varian). Las proteínas analizadas tenían una concentración de 6 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteína en K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7.5 a temperatura ambiente. Los espectros de *ScAlt1* y *ScAlt2* obtenidos en presencia de PLP se registraron inmediatamente después de la adición de 100 μM de PLP.

4. 16 Reducción de la base de Schiff de *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de borohidruro de sodio (NaBH_4)

Para confirmar la existencia de la base de Schiff interna, se realizó una reacción de reducción por medio de borohidruro de sodio (NaBH_4), esta reacción se puede comprobar por medio de espectrofotometría, ya que la reducción de la base de Schiff presenta un cambio en el espectro y aparece un pico único con máximo en 325 nm. Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se encontraban a una concentración de $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, PLP 100 μM pH 7.5. Para realizar la reducción de las muestras, se añadió 15 μl de NaBH_4 1 M (preparado en K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7.5), y se incubó durante 1 hr en oscuridad. Los espectros se registraron en el espectrofotómetro Cary 400 (Varian), se realizó un barrido en el espectro UV-Visible entre 300 y 600nm. Los registros se realizaron en dos condiciones: sin agente reductor, con lo cual se deseaba confirmar la formación de la base de Schiff interna y con NaBH_4 . Antes de registrar los espectros de las proteínas con NaBH_4 , se dializaron las proteínas en K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4mM, pH 7.5.

4. 17. Cuantificación de la concentración de PLP

Se cuantificó la concentración de PLP unido a las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. Para partir de condiciones homogéneas, las proteínas se saturaron con PLP (llevando a una concentración final de 500 μM) e incubando a 4°C durante una hora. El exceso de PLP se eliminó por medio de una columna de Penefsky (Penefsky, 1979). La concentración de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se ajustó a $6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ tanto en los ensayos en estado nativo como en estado desnaturizante. Todos los espectros UV-Visible (300-600 nm) se determinaron en el espectrofotómetro Cary 400 UV-visible (Varian). A todos los espectros de absorción de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se les restó el espectro del blanco, el cual era K_2HPO_4 50 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7.5. *ScAlt1* y *ScAlt2*, se desnaturizaron con 6 M Gdn/HCl y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Se obtuvieron los espectros UV-Visibles de *ScAlt1* y *ScAlt2* en estado nativo y después de la desnaturización. Para determinar si el PLP se unía irreversiblemente a las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, la proteína desnaturizada se separó del PLP libre por medio de un Amicon Ultra-15 con corte de 10 kDa, posteriormente se obtuvieron los espectros UV-Visibles del PLP libre. La cuantificación de PLP libre se realizó por medio de una curva de calibración. Para averiguar si la proteína conservaba el PLP unido a pesar de la desnaturización, se obtuvo el espectro UV-Visible de la proteína desnaturizada y dializada.

4. 18. Análisis filogenético

Se analizaron 33 taxas, 27 hemiascomicetos y 6 ascomicetos; éstos últimos se utilizaron como outgroup. Todas las secuencias de aminoácidos analizados se obtuvieron del portal “Fungal Orthogroups Repository” (<https://portals.broadinstitute.org/regev/orthogroups/>) y de la Base de datos “Phylome Data Base” (<http://phylomedb.org/?q=about>) (Huerta-Cepas et al., 2014). La alineación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Alts se realizó con el método Muscle. La inferencia de la historia evolutiva de las proteínas Alts se realizó por medio del método de Máxima Verosimilitud (por sus siglas en inglés ML). Para determinar el mejor modelo evolutivo se utilizó el Criterio de Información Bayesiano (por sus siglas en inglés BIC). El modelo que mejor se ajustó a la evolución de las proteínas Alts fue el modelo LG + G + I. La robustez de la topología del árbol ML se probó mediante 1000 réplicas de bootstrap. La alineación, la determinación del mejor modelo evolutivo y la construcción del árbol filogenético se realizaron en Mega versión 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>) (Hall, 2013).

4.19. Reproducibilidad experimental

En el siguiente trabajo se muestran resultados representativos, los experimentos se realizaron 2 o 3 veces.

5.0 Resultados

5.1 Purificación de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*

Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* se purificaron por medio de IMAC. Para determinar la homogeneidad y pureza de las proteínas se realizó una electroforesis SDS PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%. Como se observa en la figura 15, ambas proteínas tienen un corrimiento que las posiciona entre los marcadores de peso molecular de 75 y 50 kDa, lo cual concuerda con el peso molecular teórico del monómero de *ScAlt1* (61 kDa) y en *ScAlt2* (59 kDa).

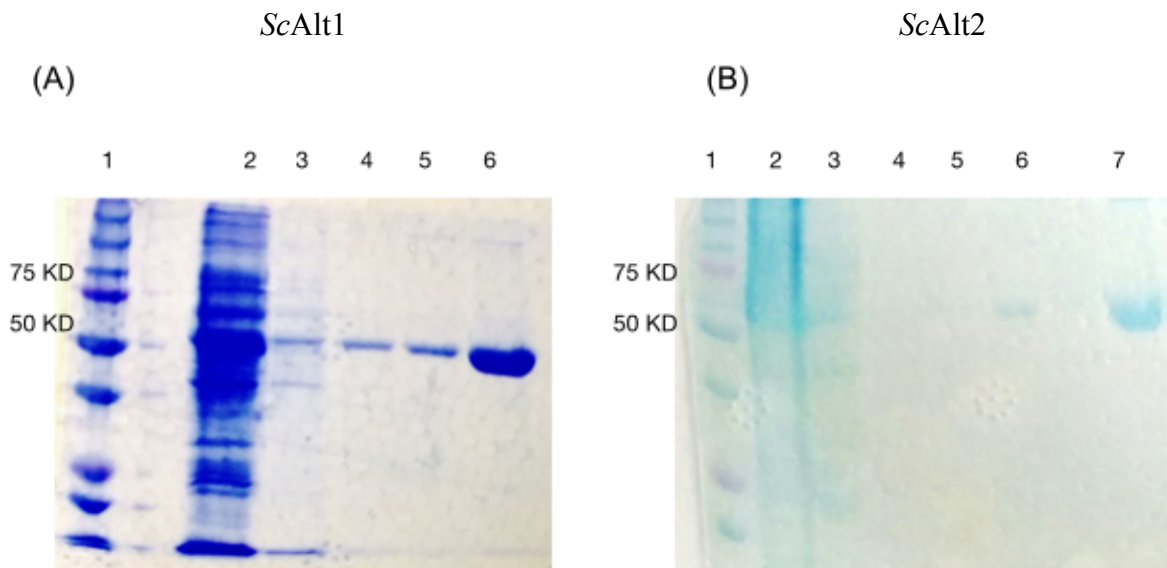


Figura 15. Purificación de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. Las proteínas recombinantes *ScAlt1* y *ScAlt2* de *S. cerevisiae* se produjeron en *E. coli*. A) *ScAlt1* (61 KDa): Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, Fracción soluble; Carril 3, lavado con 30 mM imidazol; Carril 4, lavado con 50 mM imidazol; Carril 5, lavado con 80 mM imidazol; Carril 6, elución con imidazol 300 mM. B) *ScAlt2* (59 KD): Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, Fracción soluble; Carril 3, lavado con buffer de lisis; Carril 4; lavado con 30 mM imidazol; Carril 5, lavado con 50 mM imidazol; Carril 6, lavado con 80 mM imidazol; Carril 7, elución con imidazol 300 mM.

5.2 Caracterización cinética de *ScAlt1*

A las proteínas purificadas *ScAlt1* y *ScAlt2*, se les determinó la actividad como transaminasa de alanina. En el caso de la proteína *ScAlt1* presentó actividad como transaminasa de alanina, mientras que la proteína *ScAlt2* no, lo cual concuerda con resultados obtenidos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Peñalosa-Ruiz et al., 2012).

Se decidió realizar la caracterización cinética de *ScAlt1*, para ello se determinó la velocidad inicial variando la concentración de los sustratos de forma simultánea (alanina y α -cetoglutarato). Al graficar los dobles recíprocos (gráficos de Lineweaver–Burk), se obtienen una serie de líneas paralelas, lo cual nos sugiere un mecanismo ping-pong en estado estacionario (figura 16B). Todos los datos se ajustaron por medio de un análisis global a la ecuación de ping-pong (figura 16A), los parámetros cinéticos se encuentran descritos en la tabla 1, en la cual se integraron los parámetros cinéticos obtenidos por Escalera-Fanjul (Escalera-Fanjul et al., 2017). Al comparar las constantes cinéticas de *ScAlt1* con los parámetros cinéticos de *LkAlt1* y *KlAlt1* se observa que los valores de K_m de *ScAlt1* muestra valores similares a los presentes en *LkAlt1* y *KlAlt1*, mientras que la k_{cat} de *ScAlt1* de *S. cerevisisiae* es aproximadamente el doble a la presente *LkAlt1* y el triple a la presente en *KlAlt1*.

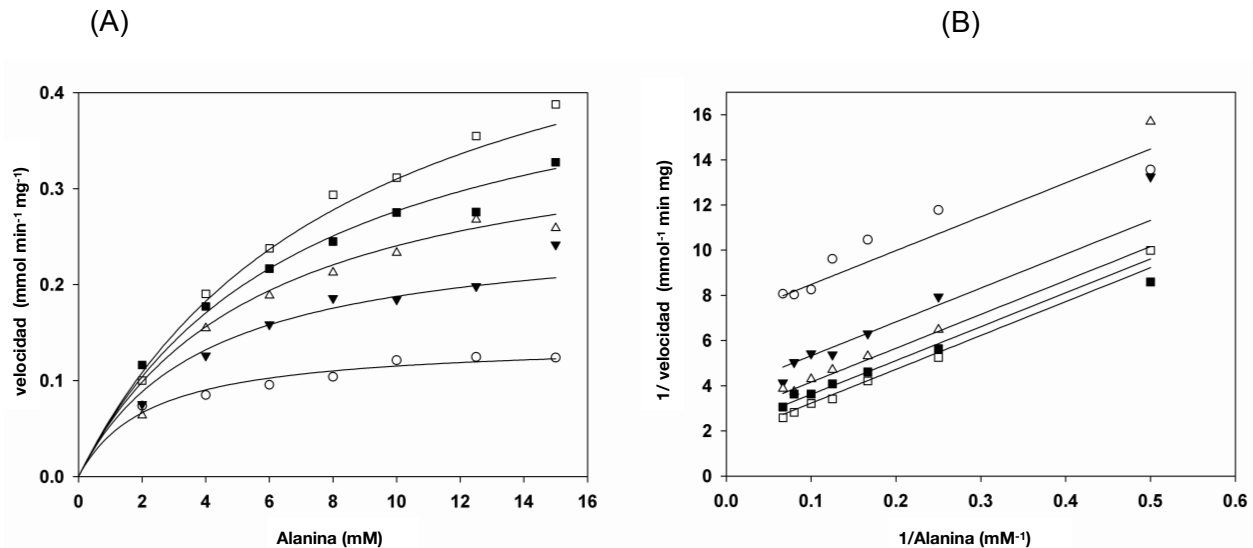


Figura 16. *ScAlt1* tiene un mecanismo ping-pong. A) Ajuste global a la ecuación de ping-pong. K_a (alanina)= 10.39 ± 1.12 mM, K_b (α -cetoglutarato)= 0.67 ± 0.06 mM, V_{max} = 0.69 ± 0.04 mmol mg⁻¹min⁻¹ $R^2=0.98$. B) Gráfica de doble recíprocos de *ScAlt1*, la velocidad inicial está en función de una concentración fija de α -cetoglutarato. Círculos blancos 0.2 mM α -cetoglutarato, triángulos negros 0.4 mM α -cetoglutarato, triángulos blancos 0.8 mM α -cetoglutarato, cuadrados negros 1.5 mM α -cetoglutarato, cuadrados blancos 4.0 mM α -cetoglutarato.

Tabla1. Parámetros cinéticos de Alts en diferentes levaduras.

	Ka alanina (mM)	Kb α cetoglutarato (mM)	V_{max} (mmol·mg⁻¹·min⁻¹)	k_{cat} s⁻¹	
<i>ScAlt1</i>	10.39	0.67	0.69	698	En este trabajo.
<i>LkAlt1</i>	4.88	0.22	----	355	(Escalera-Fanjul et al., 2017)
<i>KlAlt1</i>	17.22	0.92	----	205	(Escalera-Fanjul et al., 2017)

5.3 Modelaje molecular de *ScAlt1* y *ScAlt2*

Al comparar la secuencia primaria de *ScAlt1* y *ScAlt2* con la transaminasa de alanina de *Hordeum vulgare* (3TCM), se encontró que *ScAlt1* y *ScAlt2* conservan todos los sitios de unión a alanina, así como los sitios de unión al PLP (figura 17A). Se realizó una predicción estructural mediante herramientas de modelaje molecular, y no se encontraron diferencias significativas en la estructura global de las proteínas (figuras 17B, C), ni tampoco en el sitio catalítico (figuras 17D). Por esta razón se decidió realizar un análisis estructural de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*.

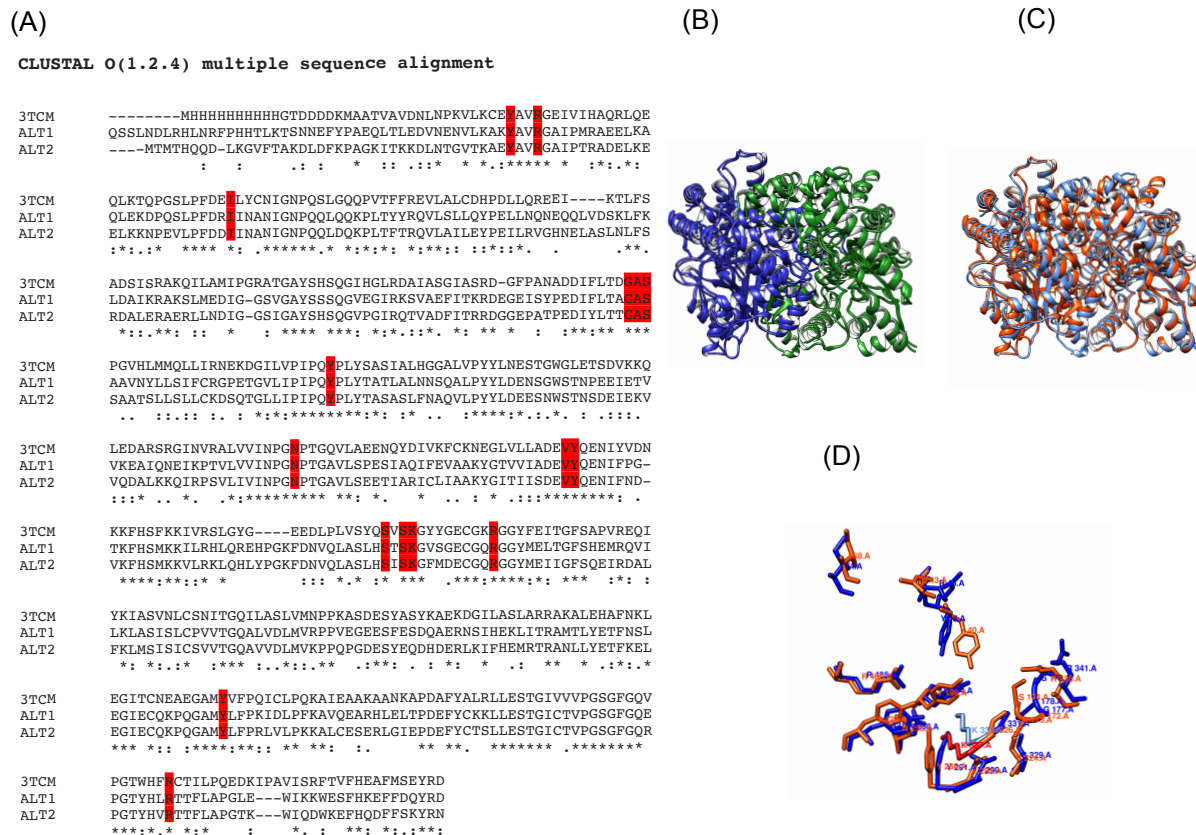


Figura 17. Alineamiento de secuencia y estructura de ScAlt1 y ScAlt2. A) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas ScAlt1, ScAlt2 y la transaminasa de alanina de *Hordeum vulgare* (3TCM). Los residuos involucrados en la unión a alanina y al PLP se marcaron en rojo. B) Alineamiento estructural de los modelos de las proteínas ScAlt1 y ScAlt2. Ambos modelos representan al dímero, la subunidad A se marca en azul, mientras que la subunidad B se marca en verde. C) Comparación de los modelos ScAlt1 y ScAlt2, ScAlt1 en azul, ScAlt2 en rojo. D) Comparación de los residuos catalíticos de ScAlt1 (azul) y ScAlt2 (rojo).

5.4 Análisis estructural ScAlt1 y ScAlt2

Tomando en cuenta que al alinear las secuencias de aminoácidos de ScAlt1 y ScAlt2 muestran un 67% de identidad, determinamos el efecto de sus diferencias sobre su estructura nativa. Se realizó un estudio de estructura secundaria de las proteínas recombinantes ScAlt1 y ScAlt2 por medio de Dicroísmo Circular (DC) en el UV lejano. Se encontró que ScAlt1 y ScAlt2 tienen estructura secundaria similar, los valores relativos de α -helices y β -plegadas se encuentran enmarcados en la Figura 18A. Adicionalmente, se evaluó la termoestabilidad de las proteínas ScAlt1 y ScAlt2 en presencia de PLP siguiendo la señal de DC a 222 nm, ScAlt1 (55°C), muestra una mayor estabilidad térmica que ScAlt2 (49°C) (figura 18B).

Las diferencias entre la estructura terciaria de ScAlt1 y ScAlt2 se evaluaron por medio de fluorescencia intrínseca en condiciones al estado nativo y desnaturalizantes (figura 18C). En condiciones nativas ScAlt1 y ScAlt2 se encuentran plegadas, ya que al agregar el agente desnaturalizante (guanidina 6 M) promueve un corrimiento del máximo de fluorescencia hacia el rojo, en el caso de ScAlt1 (24 nm) y ScAlt2 (17 nm). Adicionalmente ScAlt1 y ScAlt2 muestran diferencia en sus máximos de fluorescencia (333 nm y 340 nm, respectivamente); esta diferencia se puede deber a que existe mayor acceso al solvente en ScAlt2.

Para comprobar si ScAlt2 presenta mayor acceso al solvente, se determinó la constante de Stern-Volmer mediante experimentos de apagamiento con acrilamida. ScAlt2 (2.96 M^{-1}) mostró una constante de apagamiento Stern-Volmer mayor a la presentada por ScAlt1 (1.48 M^{-1}), confirmando que ScAlt2 tiene mayor accesibilidad al solvente (figura 18D). Finalmente, se determinó la estructura cuaternaria por medio de cromatografía de exclusión molecular, en ambos casos las proteínas eluyeron como dímeros (figura 19A-B).

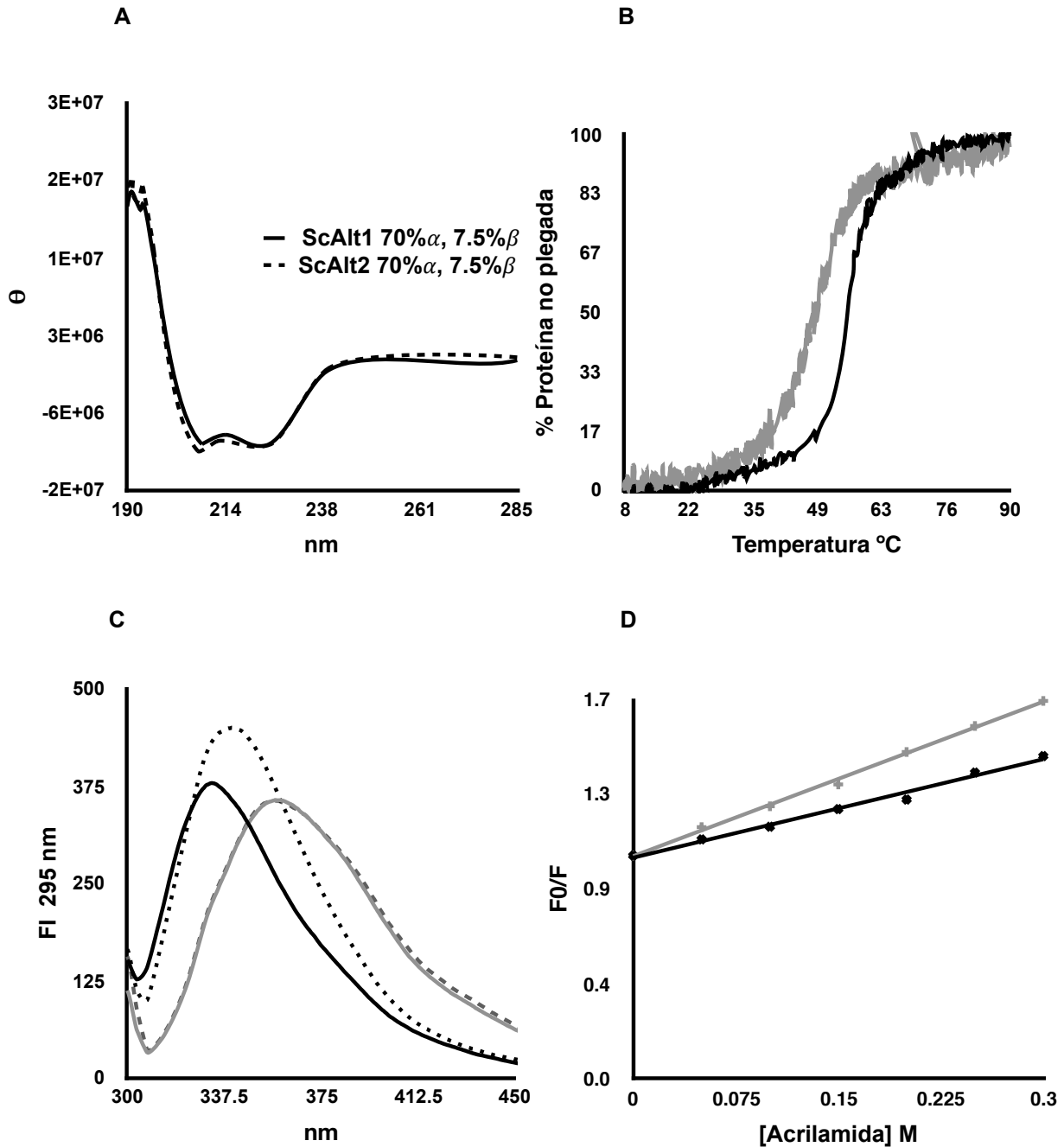


Figura 18. Caracterización estructural de *ScAlt1* y *ScAlt2*. A) DC en el espectro UV lejano. B) Desnaturalización térmica de *ScAlt1* (negro) y *ScAlt2* (gris). C) Fluorescencia intrínseca en condiciones nativas y desnaturalizantes: *ScAlt1* nativa (línea continua negra) *ScAlt1* desnaturalizada (línea continua gris) y *ScAlt2* nativas (línea punteada negra) *ScAlt2* desnaturalizada (línea entrecortada gris). D) Apagamiento con acrilamida de *ScAlt1* y *ScAlt2* (Gráfica Stern-Volmer). Para determinar la constante de apagamiento K_{SV} se realizó una regresión lineal, la K_{SV} de *ScAlt1* línea negra = $1.48 \text{ m}^{-1} R^2 0.99$, y *ScAlt2* línea gris $K_{SV} = 2.96 \text{ M}^{-1} R^2 0.98$.

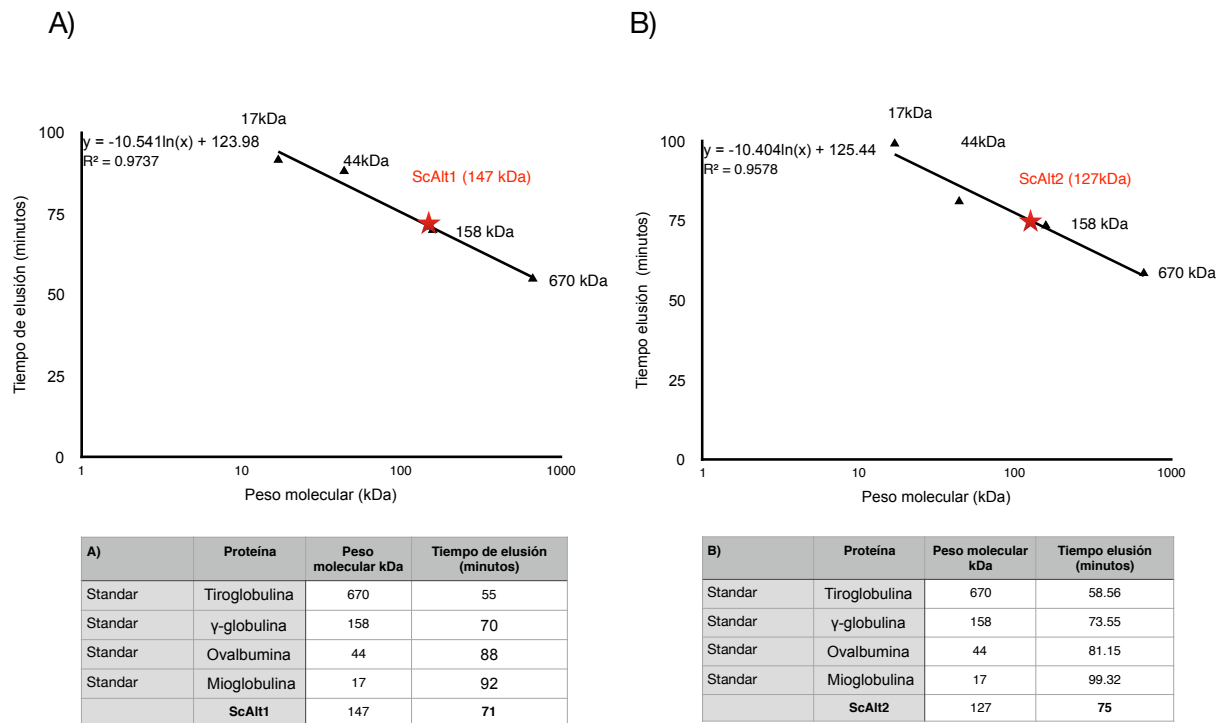


Figura 19. Determinación de estructura oligomérica de *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de cromatografía de exclusión molecular. A) *ScAlt1* y B) *ScAlt2* curvas de calibración: los triángulos negros representan las proteínas estándar, la estrella roja representan las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. Debajo de cada gráfica se encuentran las tablas A y B) en las cuales se muestran los pesos moleculares y los tiempos de elución de las proteínas estándar *ScAlt1* y *ScAlt2*.

5.5 Determinación del diámetro de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de DLS

Se determinó el diámetro de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de DLS. En el caso de la proteína *ScAlt1*, se obtuvieron dos diámetros, el diámetro mayor corresponde a 10.1 nm, mientras el diámetro menor fue de 8.7 nm. Estos valores son ligeramente mayores a los presentes al modelo teórico (9.67 nm y 7.67 nm), a pesar de ello se corrobora que *ScAlt1* tiene como forma oligomérica un dímero (figura 20A). Al medir el tamaño de la proteína *ScAlt2* se obtuvieron dos diámetros, un diámetro mayor correspondiente a 10.4 nm, mientras el diámetro menor fue de 9.6 nm. Los valores teóricos de los diámetros presentes a *ScAlt2* son de 10.6 nm y 8.33 nm, igual que en *ScAlt1*, los diámetros obtenidos en el ensayo fueron mayores a los obtenidos en el modelo, a pesar de ello corrobora que *ScAlt2* tiene como forma oligomérica un dímero (figura 20B).

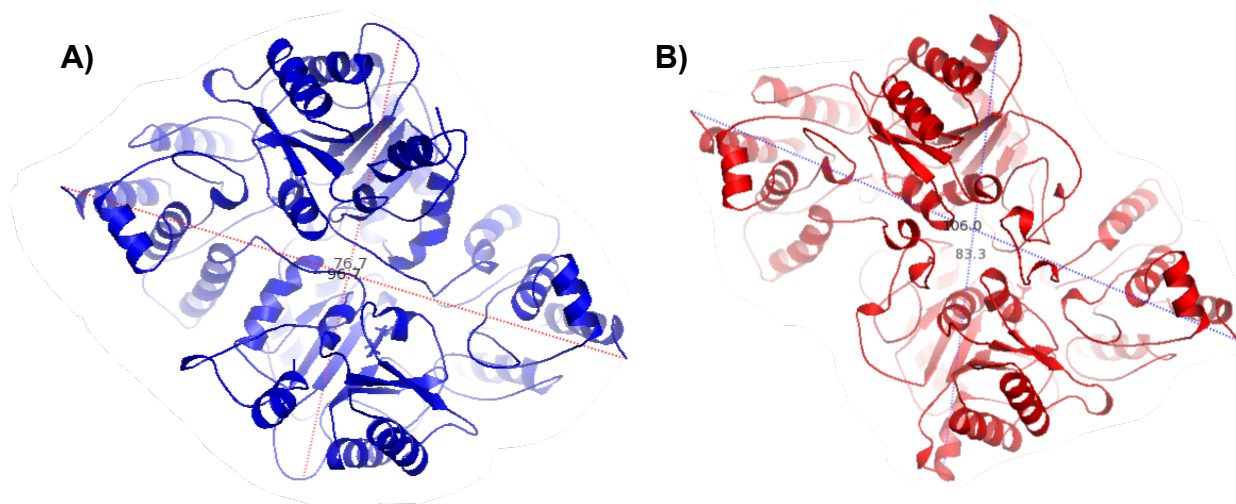


Figura 20. Diámetros teóricos de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. A) Modelo de la proteína *ScAlt1*, en el modelo muestra dos diámetros teóricos, uno de 76.6 Å y otro de 96.7 Å. B) Modelo de la proteína *ScAlt2*, en el que se muestran dos diámetros teóricos, uno de 83.3 Å y otro de 106.0 Å.

5. 6 Ensayos de unión a alanina

Para determinar si *ScAlt2* une alanina, se realizó una titulación observando el cambio de la fluorescencia intrínseca respecto a la adición de alanina. Ambas proteínas cuentan con tres triptofanos, que de acuerdo a la predicción estructural, se encuentran en una posición similar (figura 21). Usamos como control positivo la proteína *ScAlt1*, ya que esta proteína es transaminasa de alanina y, por tanto, une dicho aminoácido. Al ir adicionando de forma progresiva la alanina a *ScAlt1*, se observaron dos fenómenos, la disminución de la fluorescencia en 333 nm y la aparición progresiva de un máximo en 389 nm (figura 22A). El apagamiento de la fluorescencia en 333 nm corresponde a que al interactuar *ScAlt1* con la alanina existe un cambio conformacional que hace que el entorno de los triptofanos cambie, interactuando de forma más cercana con aminoácidos polares (Rawel et al., 2006). La aparición del máximo en 389 nm corresponde al solapamiento de energía de transferencia del cromóforo piridoxal con alguno de los triptófanos (Martínez del Pozo et al., 1989). En el caso de *ScAlt2* no se observó interacción con la alanina (figura 22 B).

Se calculó la constante de disociación de *ScAlt1* para alanina, graficando los ΔFI (fluorescencia intrínseca) a 389 nm vs concentración de alanina; la gráfica que resultó se ajustó a la

ecuación de unión específica de un sitio, con lo cual se obtuvo que la K_d de *ScAlt1* hacia la alanina cuyo valor fue de 1.02 ± 0.1 mM (figura 22C).

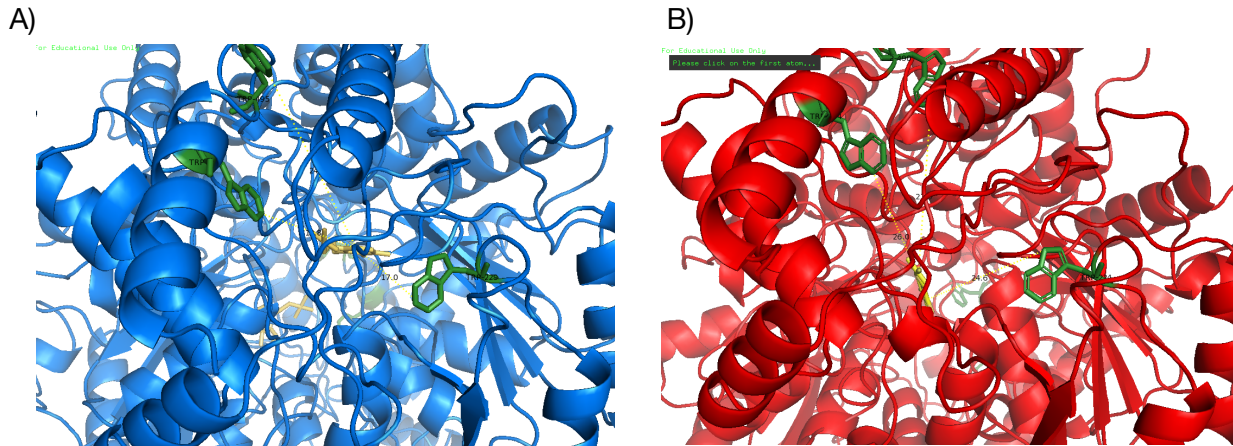


Figura 21. Triptófanos cercanos al sitio catalítico de *ScAlt1* y *ScAlt2*. Se realizó un modelo de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* en estado abierto (sin unión al ligando), en amarillo se muestra el PLP, en verde se muestran los triptófanos de ambas proteínas, sobre las líneas punteadas se muestra la distancia que existe entre el PLP y los diferentes triptófanos. A) *ScAlt1* (azul), los triptófanos cercanos al sitio catalítico son W229, W495, W299, las distancias que existen entre estos triptófanos y el PLP 17 Å, 24.8 Å y 21.8 Å respectivamente. B) *ScAlt2*, los triptófanos cercanos al sitio catalítico son W224, W490, W294, las distancias que existen entre estos triptófanos y el PLP 24.6 Å, 21.6 Å y 26.0 Å respectivamente .

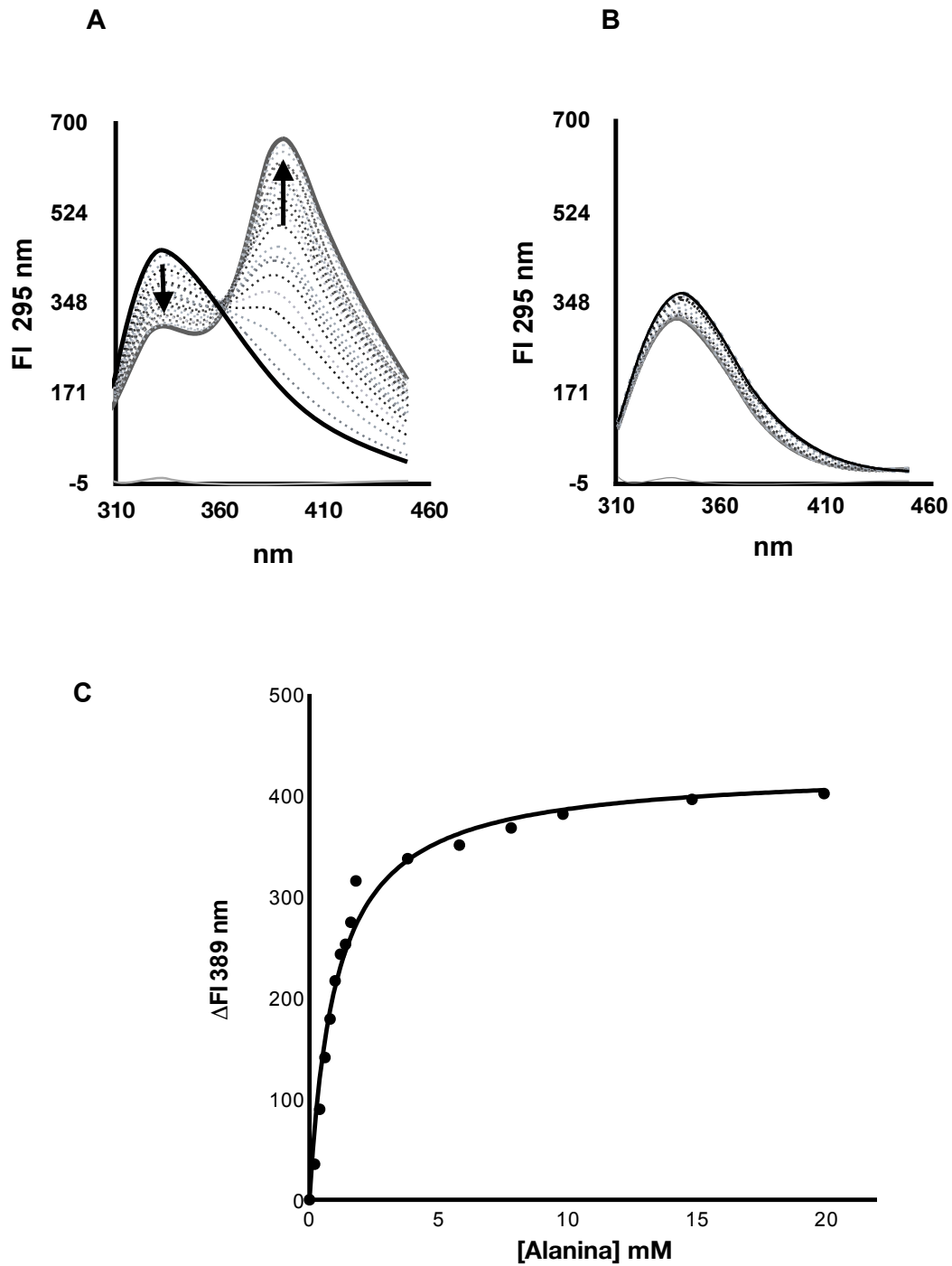


Figura 22. Titulación con alanina de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. A) El espectro de fluorescencia de *ScAlt1* sin alanina se muestra con una línea continua negra. Las líneas punteadas representan cada punto de la titulación con diferentes concentraciones de alanina, el punto final de la titulación se representa con una línea continua gris (50 mM alanina). B) El espectro de fluorescencia de *ScAlt2* sin alanina se muestra con una línea continua negra. Las líneas punteadas representan cada punto de la titulación con diferentes

concentraciones de alanina, el punto final de la titulación se representa con una línea continua gris (50 mM alanina). C) Ajuste a la ecuación de unión a ligando de *ScAlt1*, la constante de disociación $K_d=1.020 \text{ mM} \pm 0.123$ $0.98 R^2$ 0.98 .

5.7 Formación de base de Schiff externa con otros sustratos

Se analizaron los espectros de absorción en el UV-Visible de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, en dos condiciones: sin aminoácido y con aminoácido, debido a que los máximos de absorción de la base de Schiff interna (330-430 nm) son diferentes al máximo de absorción de la base de Schiff externa (325 nm), fue posible determinar si las proteínas llevaban a cabo el paso de transaldiminación, es decir pasar de una base de Schiff interna a una externa (paso común en todas las reacciones PLP dependientes). En el caso de *ScAlt1*, se observó que fue capaz de llevar a cabo la reacción de transaldiminación con los siguientes aminoácidos: alanina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, cisteína, histidina y serina. *ScAlt2* a diferencia de *ScAlt1* no reaccionó con ningún aminoácido, en la figura 23 se muestra el cambio en el espectro cuando se forma la base de Schiff externa.

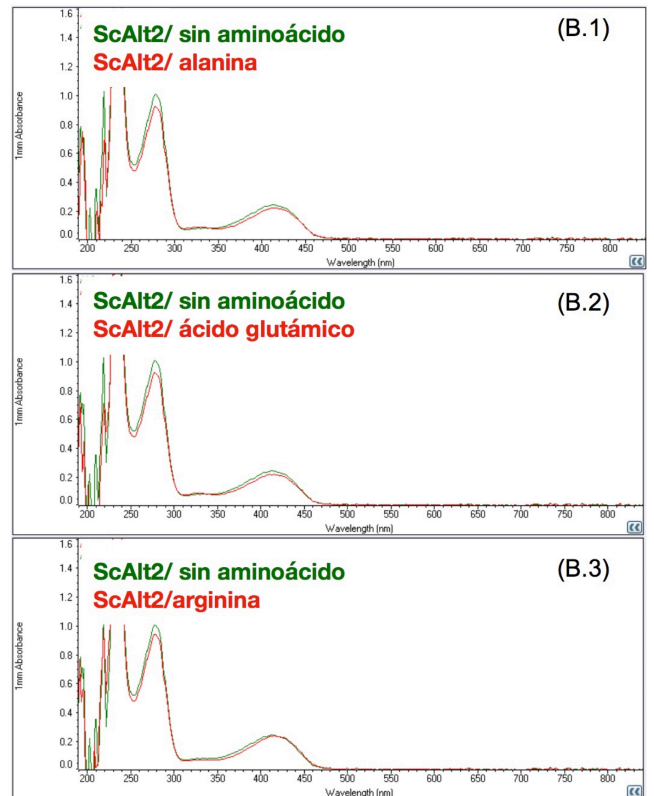
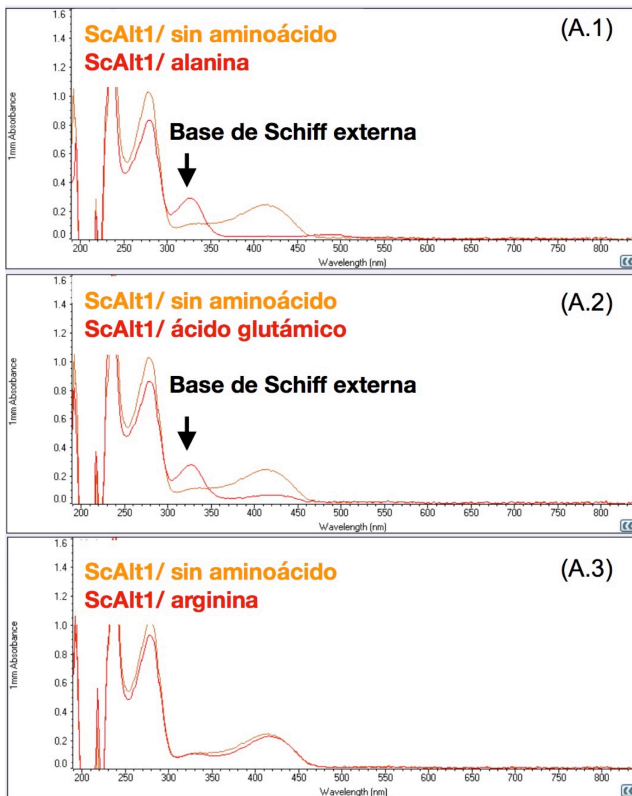


Figura 23. Interacción de ScAlt1 y ScAlt2 con diferentes aminoácidos. Espectros representativos de ScAlt1 (A.1-A.3) y ScAlt2 (B.1-B.3) después de adicionar diferentes aminoácidos. En el caso de ScAlt1 y ScAlt2 exhiben tres máximos de absorción, a 228 nm el cual corresponde al PLP libre, a 280 nm el cual corresponde a la proteína (ScAlt1/ScAlt2 según sea el caso), y un máximo a 390 nm el cual representa el PLP libre. Los espectros en rojo y naranja representan a ScAlt1 con y sin alanina (A.1) y ácido glutámico (A.2) en condiciones de saturación de PLP, la formación de la base de Schiff externa se observa en el cambio en el espectro de absorción en el UV-Visible, ya que aparece un nuevo máximo en 325 nm. (A.3) El espectro en rojo y naranja corresponde a los espectros de absorción en el UV-Visible con y sin arginina en condiciones de saturación de PLP. No existe cambio alguno en el espectro, por tanto, no hay reacción de transaminación. (B.1-3) Los espectros en rojo y verde representan a ScAlt2 en presencia y ausencia de alanina (B.1), ácido glutámico (B.2) y arginina (B.3) en condiciones de saturación de PLP. No se observó cambio en el espectro de absorción, lo cual nos indica que ScAlt2 no forma Base de Schiff con ninguno de estos aminoácidos.

5.8 Determinación de la afinidad de ScAlt1 con diferentes aminoácidos

Se corroboró la interacción de ScAlt1 con alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, glutamina, histidina y serina por medio de ensayos de fluorescencia intrínseca. En todos los casos se observó la aparición de un máximo en 389 nm, el cual corresponde a la energía de transferencia entre el anillo aromático del PLP y el triptófano cercano al sitio catalítico (posiblemente W229 ó W495 ó W299 en ScAlt1 y W224 ó W490 ó W294 en ScAlt2) (figura 24).

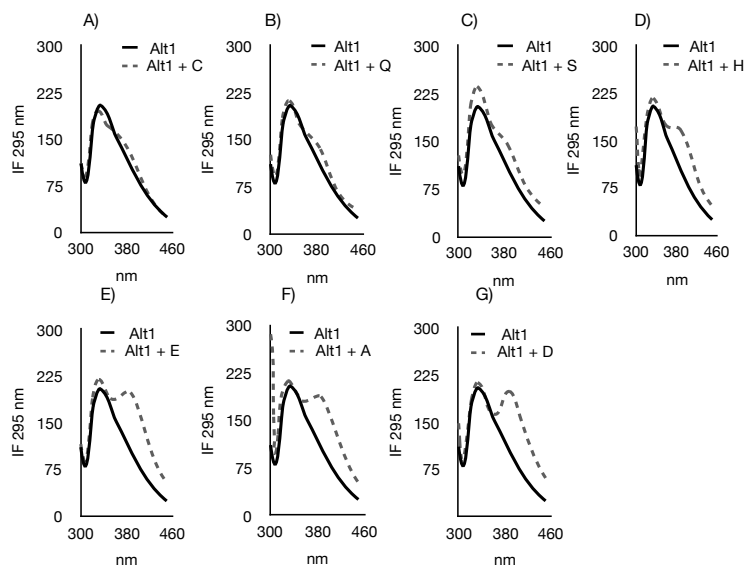


Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia de la proteína ScAlt1 en presencia de diferentes aminoácidos. En negro se muestra el espectro de fluorescencia sin ningún aminoácido, en gris en línea entrecortada se muestra el espectro después de adicionarle el aminoácido correspondiente en los paneles A-G, se realiza la comparación de los espectros de fluorescencia en presencia o en ausencia del aminoácido (10 mM) A) cisteína B) glutamina C) serina D) histidina E) alanina F) ácido glutámico G) ácido aspártico.

Se calculó la constante de afinidad (K_d) de *ScAlt1* hacia la cisteína, glutamina, serina, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, por medio de titulación de la misma forma en la cual se determinó la constante de afinidad hacia la alanina. En el caso de la glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico e histidina, la enzima mostró un comportamiento sigmoideo, lo cual nos sugiere un fenómeno de cooperatividad, por tanto, las curvas de titulación se ajustaron a la ecuación de unión específica con pendiente de Hill. En el caso de las curvas de titulación con cisteína y serina no mostraron cooperatividad, por tanto, se ajustaron a la ecuación de unión específica de un sitio. *ScAlt1* mostró mayor afinidad en orden decreciente al ácido glutámico (1.27 ± 0.40 mM) > ácido aspártico (1.53 ± 0.03 mM) > glutamina (3.86 ± 0.14 mM) > serina (10.78 ± 0.73 mM) > cisteína (13.78 ± 1.19 mM) > histidina (16.57 ± 0.39 mM) (figura 25).

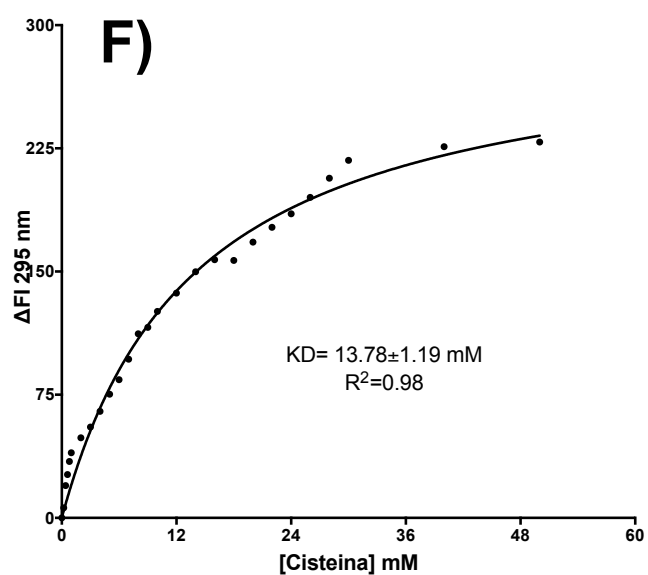
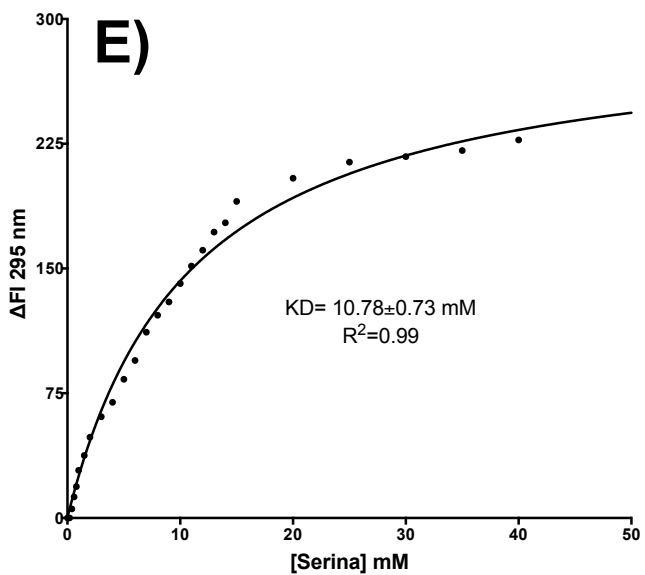
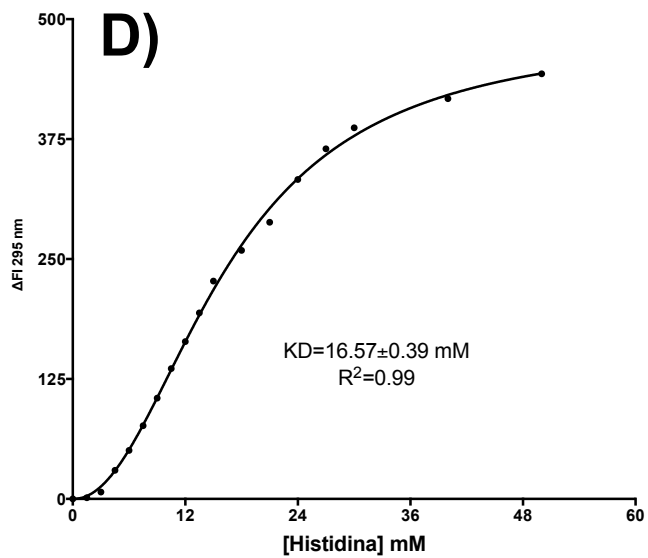
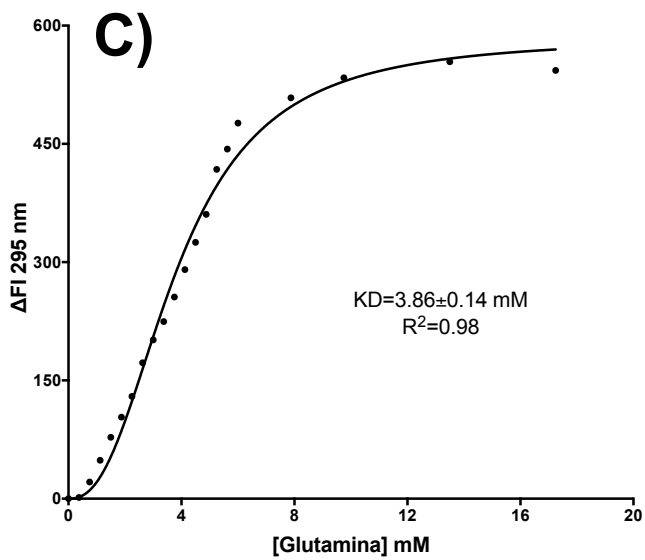
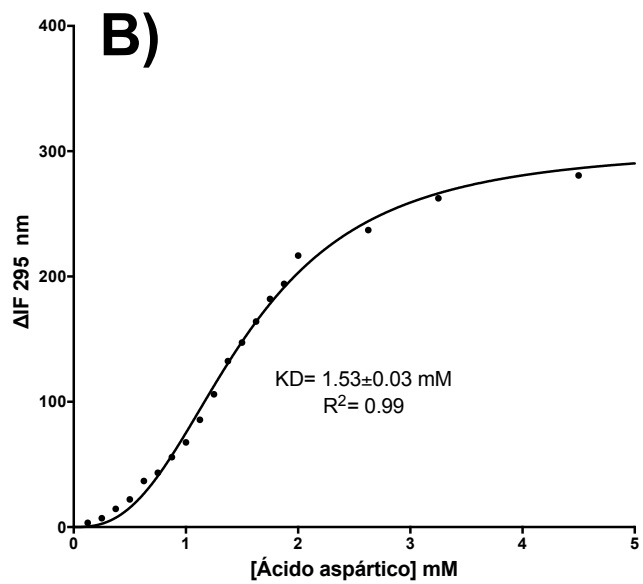
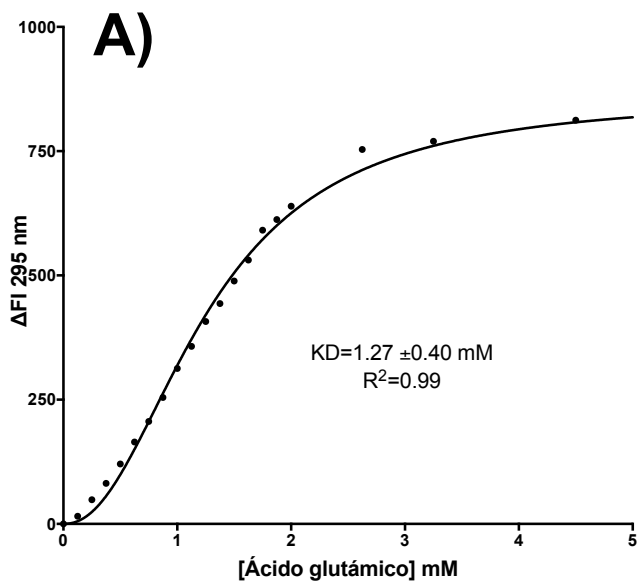


Figura 25. Evaluación de la afinidad de ScAlt1 a diferentes aminoácidos. Las curvas de titulación con A) ácido glutámico, ácido B) aspártico, C) glutamina e D) histidina, se ajustaron a la ecuación de unión específica con pendiente de Hill. Las curvas de titulación de la E) serina y F) cisteína se ajustaron a la ecuación de unión específica de un sitio. Los valores de la constante de afinidad (K_d) se muestran dentro de cada una de las gráficas.

5. 9 Determinación de la formación de la base de Schiff

Una característica peculiar de *ScAlt2* es su color amarillo brillante, contrario a *ScAlt1* la cual al terminar el proceso de purificación es totalmente incolora. Nos preguntamos si la diferencia entre una proteína y otra se debía a una diferencia en la unión con el PLP. Por tanto, decidimos realizar un espectro de absorción de 300-600 nm. En esta región del espectro es posible observar la base de Schiff en sus diferentes estados. Los experimentos se realizaron en dos diferentes condiciones, las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* sin PLP añadido y posteriormente, un espectro después de añadirle PLP. En el caso del espectro de absorción de la proteína *ScAlt1* antes de añadir PLP, no se detectó señal de la base Schiff. Cuando a la proteína *ScAlt1* se le adicionó PLP, fue posible detectar dos máximos de absorción, el principal se encuentra entre 330-335 nm, el cual, al parecer, corresponde a la forma enolimina de la base de Schiff y un segundo máximo menos pronunciado en 420 nm (figura 27A), el cual corresponde a la forma cetoenamina de la base de Schiff (figura 26).

En el caso del espectro de absorción de la proteína *ScAlt2* sin PLP añadido, es posible observar un único máximo en 420 nm, el cual se cree es la forma cetoenamina de la base de Schiff (figura 26). Al añadir PLP a la proteína *ScAlt2*, el máximo de 420 nm tiene mayor intensidad que el presente en la proteína sin PLP (Fig. 27B). Para corroborar que la enzima estuviera unida en forma de base de Schiff en las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, la base de Schiff se redujo por medio de Boro hidruro de sodio (NaBH_4), encontrándose que en ambos casos se dio el cambio espectroscópico reportado, el cual es la aparición de un único máximo en 330 nm (figura 27C-D).

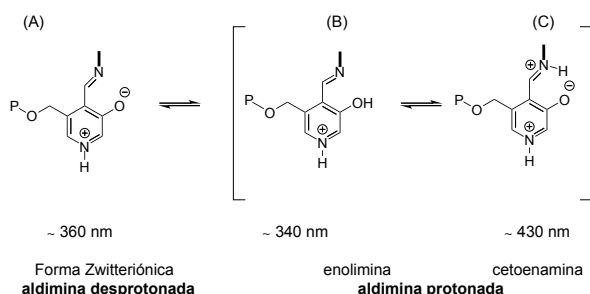


Figura 26. Estructura de la base Schiff del PLP. (A) Aldimina desprotonada, (B, C) representan los tautómeros de aldimina protonada: enolimina y cetoenamina.

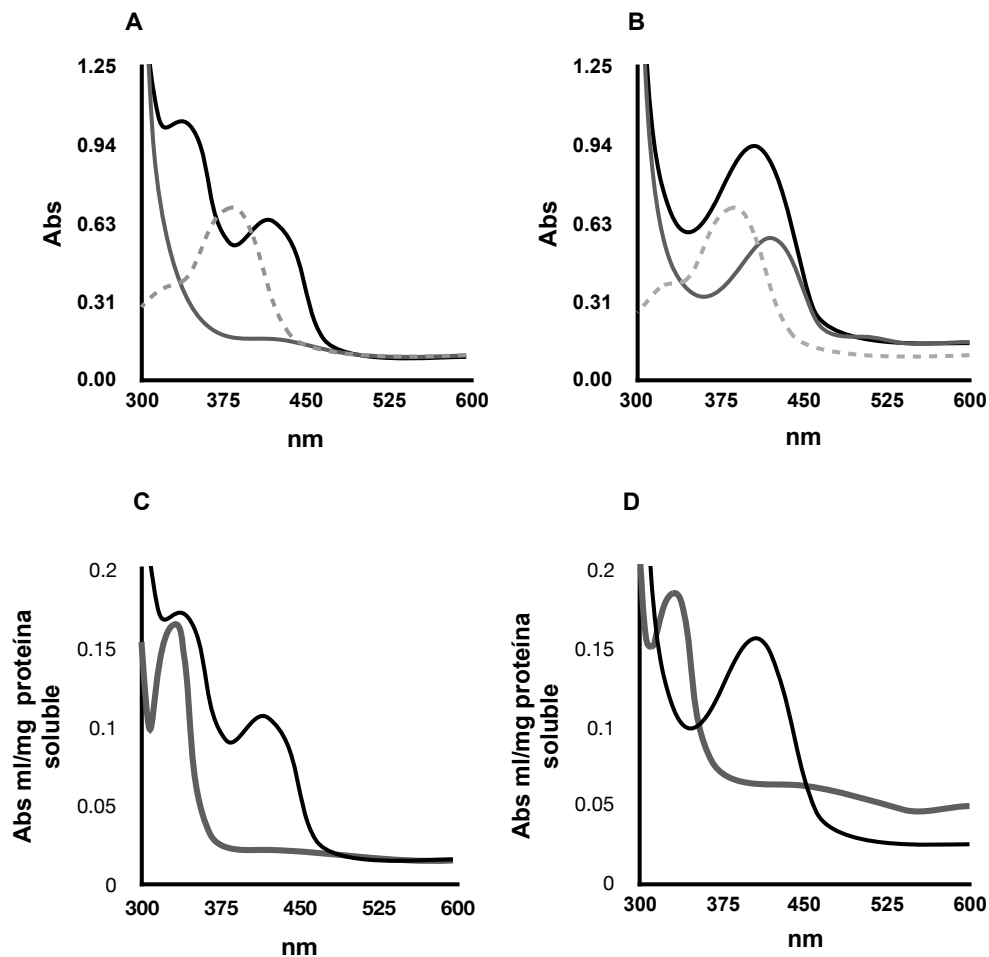


Figura 27. Determinación de la formación de la Base de Schiff en *ScAlt1* y *ScAlt2*. A) El espectro en línea continua gris representa *ScAlt1* sin añadirle PLP, el espectro gris con línea entrecortada representa al PLP libre y en línea continua negra se representa el espectro de *ScAlt1* con PLP. En *ScAlt1* con PLP se observan dos máximos de absorción, el primero en 330-335 nm y el segundo en 420 nm B) El espectro en línea continua gris representa *ScAlt2* sin añadirle PLP, el espectro gris con línea entrecortada representa al PLP libre y en línea continua negra se representa el espectro de *ScAlt2* con PLP. En *ScAlt2* con y sin PLP se observa un único máximo de absorción en 420 nm. C y D) Base de Schiff de *ScAlt1* y *ScAlt2* reducida con NaBH₄, los espectros en estado nativo se muestran en negro, mientras que en gris se muestran los espectros de las proteínas después de añadirles NaBH₄. En ambos casos el espectro se modificó al añadir el agente reductor, mostrando un único máximo en 330 nm.

5.10 Determinación de la reversibilidad de la base de Schiff

A pesar de la versatilidad química del PLP, todas las reacciones químicas catalizadas por este cofactor comienzan con un paso de transaminación. La reacción de transaminación consiste en romper el enlace imino entre el PLP y la proteína (base de Schiff interna) para formar un nuevo

enlace imino entre el PLP y el sustrato (base de Schiff externa), por tanto una base de Schiff funcional es aquella que es reversible. Por esta razón nos planteamos que posiblemente la falta de actividad de *ScAlt2* se debiera a que el enlace entre el PLP y la proteína es irreversible.

Para contestar esta pregunta se decidió saturar las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* con PLP y posteriormente quitar el exceso, todo esto para tener a *ScAlt1* y *ScAlt2* en las mismas condiciones. Se desnaturalizaron las proteínas con 6 M de guanidina incubando 2 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación con el agente desnaturalizante, se realizó un espectro de absorción UV- visible, en el cual se observó un espectro típico del PLP libre, no se observaron los máximos de absorción característicos de la base de Schiff (figura 28B). Cuando se separaron las proteínas del PLP libre, encontramos que tanto en el caso de *ScAlt1* y *ScAlt2*, el PLP se libera casi en su totalidad (94% y 85%, respectivamente). Al hacer un espectro de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* sin PLP libre no se observa señal alguna de la base de Schiff (figura 28D). Que el PLP no se encuentre unido a las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* en estado desnaturalizado, implica que la base de Schiff en las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* es reversible y dependiente del plegamiento.

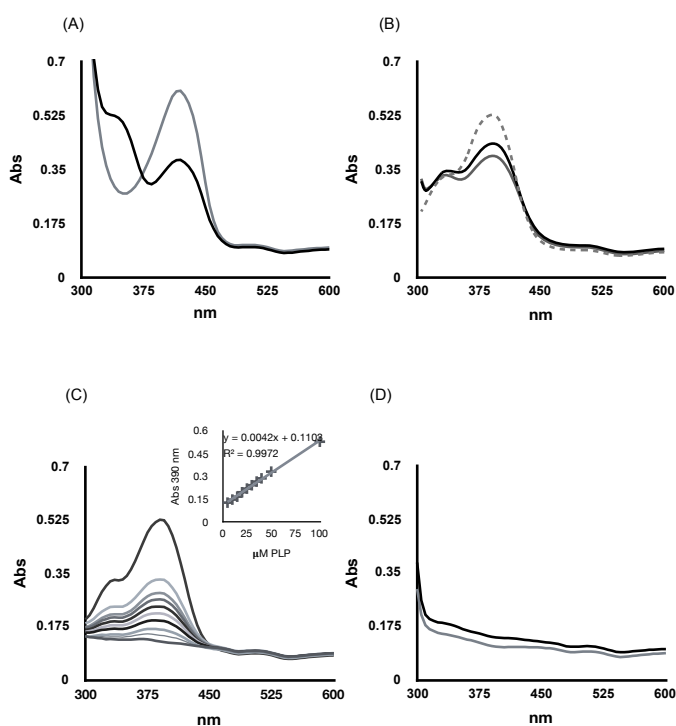


Figura 28. La unión de PLP a *ScAlt1* y *ScAlt2* es reversible en condiciones extremas y dependiente de plegamiento. A) Espectro de absorción en el UV-visible de *ScAlt1* (negro) y *ScAlt2* (gris) en estado nativo. B) *ScAlt1* (negro) y *ScAlt2* (gris) desnaturalizadas, PLP libre (línea entrecortada gris). C) Curva

de calibración. D) *ScAlt1* (negro) y *ScAlt2* (gris) desnaturalizadas y dializadas en buffer sin PLP.

5.11 Inferencia de la historia evolutiva de las proteínas Alts

Se infirió la historia evolutiva de las proteínas Alts por medio del método Maximum Likelihood a partir de secuencias de aminoácidos de diferentes especies representativas de los hemiascomicetos, incluyendo levaduras de los clados ZT y KLE (figura 29). Lo primero que fue posible observar es que *ScAlt1* y *ScAlt2* se agrupan en clados independientes.

ScAlt1 de *S. cerevisiae* se agrupa con levadura “*sensu stricto*” y otras levaduras que atravesaron la WGD que no son “*sensu stricto*” como *Candida nivariensis*, *Candida bracarensis*, *Nakaseomyces delphensis*, etc. Al observar la relación de *ScAlt1* con respecto a los clados ZT y KLE, se observa que *ScAlt1* tiene una relación más cercana con ZT que con el clado KLE. Por su parte *ScAlt2* forma un clado definido únicamente con levaduras “*sensu stricto*”, el cual se posiciona como outgroup de los clados ZT y KLE (figura 29).

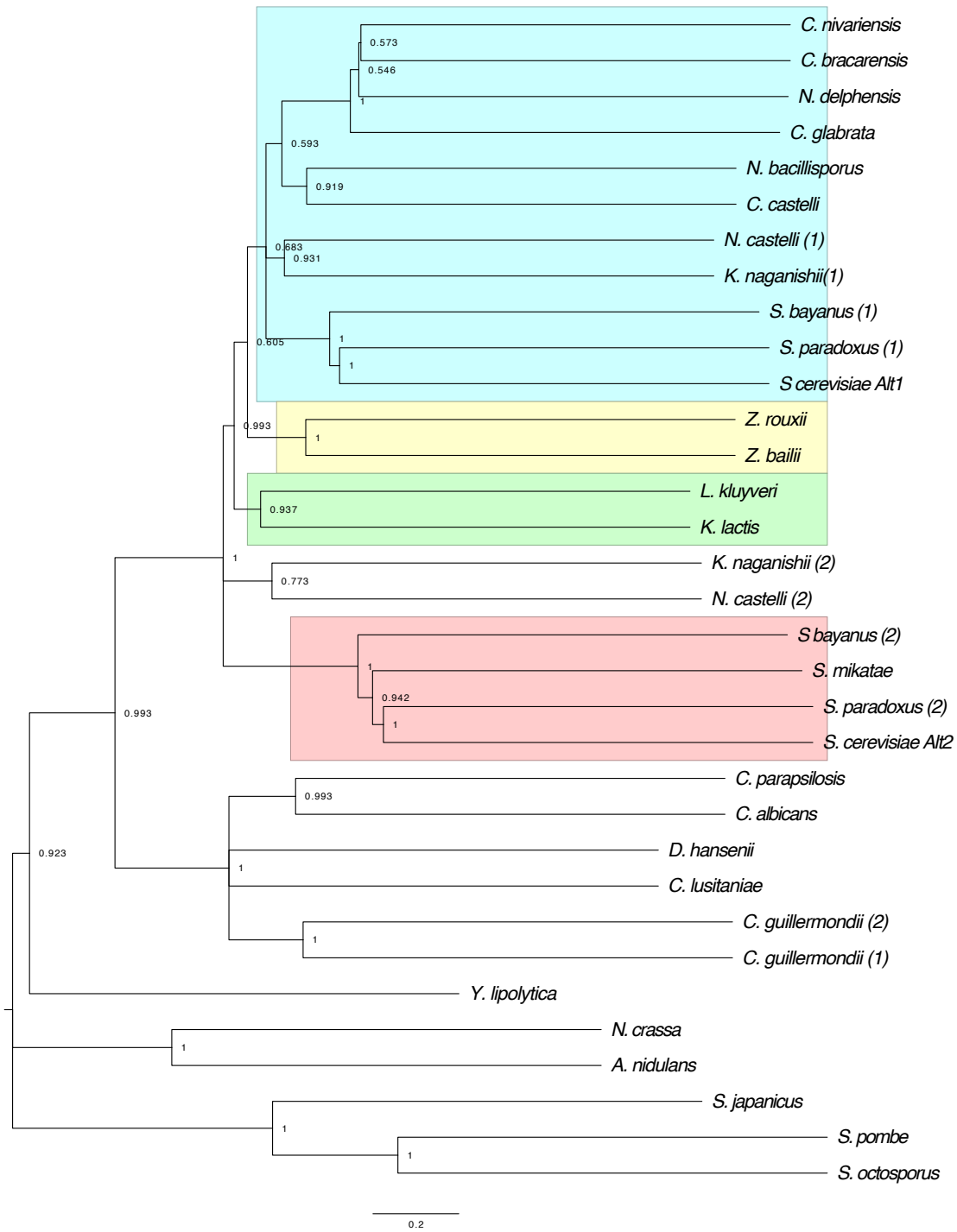


Figura 29. Reconstrucción de historia evolutiva de las proteínas Alts. El recuadro amarillo representa el clado ZT, mientras que el recuadro verde al clado KL. El clado Alt1 está señalado en azul y el clado Alt2 en rojo.

6.0 Discusión de Resultados

El gen *ScALT2* se ha retenido a lo largo de 100 millones de años, lo cual nos indica que posiblemente la proteína *ScAlt2* cuenta con una función que le confirió una ventaja evolutiva a *S. cerevisiae*, esto se debe a que la vida media de los genes duplicados en eucariontes es de alrededor de 4 millones de años (Lynch and Conery, 2000). Se sabe que *ScAlt2* ha diversificado de *ScAlt1* a diferentes niveles: a) En su perfil de expresión, ya que en presencia de alanina *ScALT1* se induce mientras *ScALT2* se reprime (Peñalosa-Ruiz et al., 2012); b) Sublocalización celular, en el caso de *ScAlt1* es una proteína mitocondrial, mientras *ScAlt2* es una proteína citosólica (Peñalosa-Ruiz et al., 2012); c) Funcionalmente, *ScAlt1* es una transaminasa de alanina, *ScAlt2* no posee actividad como transaminasa de alanina (García-Campusano et al., 2009; Peñalosa-Ruiz et al., 2012).

6.1 *ScAlt1* muestra un mecanismo ping-pong característico de las transaminasas

El primer experimento que se realizó con las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* fue la determinación de actividad como transaminasa de alanina. En el caso de *ScAlt1*, como se sabía que anteriormente esta proteína cuenta con dicha actividad, mientras que en el caso de *ScAlt2*, a pesar de intentar cuantificar en diferentes condiciones (pHs, buffers, concentraciones de sustratos) no se pudo determinar su actividad como transaminasa de alanina. Para el caso de *ScAlt1*, al analizar los regígrafos (gráficos de Lineweaver Burk) se observa un patrón de líneas paralelas, lo cual nos indica un mecanismo ping-pong. Al comparar las constantes cinéticas de *ScAlt1* con las constantes cinéticas de transaminasas de alanina de levaduras preWGD como lo son *KlAlt1* y *LkAlt1*, mostraron gran similitud.

6.2 El modelaje molecular de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*, no explica la falta de actividad como transaminasa de alanina de *ScAlt2*

La paradoja que presenta *ScAlt2* es que a pesar de que retuvo los residuos catalíticos para ser una transaminasa de alanina no presenta dicha capacidad catalítica. Se realizaron los modelos estructurales de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*; al comparar ambas estructuras no se encontraron diferencias significativas, lo cual nos recuerda que en ocasiones el modelaje molecular se ve limitado, ya que en ocasiones no es capaz de predecir todos los cambios en la estructura debidos a cambios termodinámicos y/o cinéticos del plegamiento (Pey et al., 2013).

6.3 *ScAlt2* tiene una estructura similar a *ScAlt1*, a pesar de ello *ScAlt2* tiene una estructura más laxa

Debido a que la falta de actividad como transaminasa de alanina de *ScAlt2* no se pudo explicar con modelaje molecular, se decidió realizar una caracterización estructural de *ScAlt1* y *ScAlt2*. Cuando se analizó la estructura secundaria de *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de dicroísmo circular se encontró que ambas proteínas contaban con estructura secundaria muy similar, con lo cual descartamos que la falta de actividad de *ScAlt2* se debiera a que se tratara de una proteína desestructurada. A pesar de ello, con los experimentos de fluorescencia y apagamiento se demostró que *ScAlt2* tenía mayor exposición de sus residuos hidrofóbicos hacia el solvente. Cuando se determinó el tamaño de *ScAlt1* y *ScAlt2* por medio de DLS, se encontró que *ScAlt2* tiene una estructura más expandida, ya que los diámetros de la proteína *ScAlt2* son mayores a los que presenta *ScAlt1*. En el caso de la termoestabilidad, se encontró que *ScAlt2* es menos termoestable que *ScAlt1*. Al analizar la estructura cuaternaria por cromatografía de exclusión molecular, encontramos que tanto *ScAlt1* como *ScAlt2* son dímeros tal como la mayor parte de transaminasas, recordemos que todas las proteínas PLP dependientes en su forma activa se encuentran formando oligómeros $2n$ (Eliot and Kirsch, 2004), con lo cual se descarta la posibilidad de que *ScAlt2* no tenga actividad debido a que se encuentra en un estado oligomérico aberrante (monómero). En conjunto todos los experimentos nos sugieren que *ScAlt2* tiene una estructura tridimensional muy similar a la que presenta *ScAlt1*, a pesar de ello la estructura de *ScAlt2* tiene una conformación más laxa la cual hace que tenga mayor exposición de sus residuos hidrofóbicos y, por tanto, menor estabilidad.

6.4 *ScAlt2* no es una transaminasa de alanina ya que no une alanina

A pesar de que *ScAlt2* cuenta con una estructura más laxa, la estructura tridimensional de *ScAlt2* es similar a la estructura de *ScAlt1*, por tanto, nos preguntamos si *ScAlt2* era capaz de unir alanina, para ese propósito, se realizó un ensayo de unión siguiendo los cambios conformacionales por medio de los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca, debido a que *ScAlt1* y *ScAlt2* pertenecen a las proteínas PLP dependientes con plegamiento tipo I, las cuales al unir sustrato experimentan un cambio conformacional, debido a que pasan de un estado abierto (enzima sin ligando) a un estado cerrado (enzima sustrato) (Eliot and Kirsch, 2004; Ra-

boni et al., 2010). Como control positivo usamos a la proteína *ScAlt1*, al titular la enzima con alanina encontramos un descenso en la fluorescencia a 333 nm y la aparición de un máximo a 389 nm. El descenso de la fluorescencia a 333 nm se debe a la modificación de la estructura terciaria provocando que los triptofanos interactuen con aminoácidos cargados, mientras que la aparición del máximo en 389 nm corresponde a la interacción del grupo indol de un triptófano con el anillo aromático del PLP (Martínez del Pozo et al., 1989). De la misma forma se realizó la titulación con alanina pero con la proteína *ScAlt2*, en este caso no se observó cambio alguno en el espectro de fluorescencia intrínseca, por tanto se concluyó que no existen cambios conformacionales al añadir alanina por lo que no existe unión. Es muy posible que al tener una estructura más laxa *ScAlt2* distorsionó su sitio catalítico y, por lo que no une alanina.

6.5 *ScAlt1* es capaz de utilizar diferentes sustratos

En el caso de *ScAlt1*, esta enzima es capaz de realizar la reacción de tranaldiminación, es decir, puede formar la base de Schiff externa con siete aminoácidos diferentes (alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, glutamina, histidina y serina). Esto no es de sorprendernos ya que *ScAlt1* pertenece a la familia de las proteínas PLP, las cuales se caracterizan por ser altamente promiscuas. En el caso de la transaminasa de alanina de *H. vulgare*, se sabe que puede llevar a cabo la reacción transaminación con alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y glicina (Duff et al., 2012).

Al evaluar la afinidad, por medio de curvas de titulación, siguiendo el cambio en la intensidad de la fluorescencia intrínseca a 389 nm, fue posible determinar que *ScAlt1* tiene mayor afinidad por alanina y ácido glutámico, lo cual nos confirma que su función principal es llevar a cabo la transaminación de alanina. Se piensa que como posible función secundaria, se tiene la transaminación de ácido aspártico, ya que presenta una alta afinidad por este aminoácido, aunque menor al de la alanina, lo cual concuerda con que la transaminasa de alanina de *H. vulgare* tiene como actividad secundaria la transaminación del ácido aspártico (Duff et al., 2012). En el caso del resto de aminoácidos con los que puede formar base de Schiff externa (cisteína, glutamina, histidina y serina), es posible que conserve cierta afinidad residual a estos aminoácidos debido a que de acuerdo a Mehta y Christein, las enzimas PLP dependientes ancestrales se especializaban en un sólo tipo de reacción y a medida que evolucionaron fueron desarrollando cierta especificidad hacia un sustrato (Mehta and Christen, 2000).

6.6 *ScAlt1* y *ScAlt2* unen el PLP en forma de base de Schiff

Se sabe que las proteínas PLP dependientes, en general, requieren que el PLP se encuentre unido en forma de base de Schiff. por tanto, otra posibilidad por la cual *ScAlt2* no cuente con actividad de transaminasa de alanina se puede deber a que no es capaz de unir el PLP en forma de base de Schiff. Se decidió realizar un espectro de absorción entre 300-600 nm, en esta región del espectro de absorción aparecen las diferentes formas de la base de Schiff, adicionalmente se confirmó, por medio de la reducción de la base de Schiff con boro hidruro de sodio (NaBH_4). *ScAlt1* y *ScAlt2* tienen unido el PLP por medio de una Base de Schiff, ya que muestran los máximos de absorción correspondientes y al adicionar NaBH_4 , se observó el cambio espectrofotométrico característico (Hughes et al., 1962).

A pesar de que *ScAlt1* y *ScAlt2* unen el PLP en forma de base de Schiff, una diferencia es la forma tautomérica que presentan, lo cual se ve reflejado en los espectro de absorción en el UV visible. *ScAlt1* presenta dos máximos, los cuales representan la Base de Schiff protonada en sus dos formas tautoméricas, cetoenamina y enolimina, teniendo una mayor presencia de la forma enolimina. En el caso de *ScAlt2* la base de Schiff únicamente se presenta en la forma cetoenamina. Se sabe que en el caso del tautómero enolimina se favorece en entornos apolares, mientras que en entornos polares se favorece el tautómero cetoenamina (Hidalgo et al., 1994). Esta diferencia en las formas tautoméricas de la base de Schiff nos indican que el entorno inmediato del cofactor es más apolar en el caso de *ScAlt1* y polar en el caso de *ScAlt2*.

Una diferencia en el entorno inmediato del PLP podría ser la explicación del porqué *ScAlt2* no cuenta con actividad como transaminasa de alanina, ya que de acuerdo a la teoría estereoelectrónica, propuesta por Dunathan, para que se lleve a cabo una reacción específica, es necesario contar con una geometría específica que permita que el enlace que se romperá se sitúe de forma perpendicular al plano del sistema π (Dunathan, 1971). Por tanto, un cambio en el entorno inmediato al PLP causa una modificación en la geometría específica que requiere la reacción, un ejemplo de este fenómeno es el caso de la subunidad β_2 de la triptofano sintasa, la cual tiene como tautómero activo la forma cetoenamina, al elevar la temperatura se favorece la formación del tautómero enolimina, con lo cual se pierde la actividad catalítica (Ahmed et al.,

1996).

Bajo la perspectiva de la teoría de modulación electrónica, a través de la protonación, las enzimas PLP dependientes son capaces de optimizar reacciones específicas a través de modular los estados electrónicos del PLP mediante cambios en el ambiente del sitio activo. Se ha demostrado que si se modifican las interacciones del PLP con las cadenas laterales ó se modifican los puentes de hidrógeno circundantes al PLP, la actividad enzimática y la catalísis se ve afectada (Dajnowicz et al., 2017). En el caso de *ScAlt2*, se demostró que el solvente tiene mayor acceso a los triptofanos, lo cual nos hace suponer que el solvente tiene mayor acceso al sitio activo. Se sabe que los puentes de hidrógeno, entre los residuos y el solvente, se ven favorecidos en comparación a los puentes de hidrógeno entre residuos (Fleming and Rose, 2005), por lo que es posible que se haya modificado la red de puentes de hidrógeno que rodea al sitio activo, dando como resultado la falta de actividad como transaminasa de alanina en *ScAlt2*.

6.7 La base de Schiff en *ScAlt1* y *ScAlt2* es reversible y dependiente del plegamiento

Quisimos determinar si la unión del PLP en *ScAlt2* era dependiente de plegamiento y también deseábamos conocer si la unión era reversible. Para ello desnaturalizamos *ScAlt1* y *ScAlt2* con guanidina y cuantificamos el PLP libre. En el caso de *ScAlt1* y *ScAlt2* encontramos que la mayor parte del PLP se liberó al desnaturalizar a la proteína, lo cual nos indicó que la unión del PLP es dependiente al plegamiento. Que la unión al PLP dependa de la conformación no es de sorprenderse, ya que anteriormente se había encontrado que todas las proteínas PLP dependientes conservan un dominio estructural de unión al PLP (aunque no se conserva en secuencia) y está conformado por 2 α hélices y 5 láminas β plegadas (Denessiouk et al., 1999).

El segundo paso común en las reacciones catalizadas por las enzimas PLP dependientes, es la transaldiminación, en la cual se libera la lisina que unía al PLP a la proteína, y el PLP forma un nuevo enlace imino con el sustrato, formando la base de Schiff externa (Toney, 2005, 2011). Por tanto es requisito indispensable que la base de Schiff sea reversible. Como se mencionó tanto *ScAlt1* y *ScAlt2* liberan en su mayoría el PLP unido al ser desnaturalizadas. Por tanto, podemos concluir que la unión al PLP a las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* es reversible y cabe la posibilidad que *ScAlt2* pueda tener una actividad catalítica.

6.8 *ScAlt2* se agrupa en un clado independiente a *ScAlt1*

Finalmente se decidió analizar la historia evolutiva de las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2*. Se encontró que *ScAlt1* y *ScAlt2* se agrupan en clados independientes y poseen diferente afiliación. En el caso de *ScAlt1* se agrupa con levaduras que atravesaron la WGD, independientemente de si son levaduras “*sensu stricto*” o “*sensu lato*” (clado Alt1), además de que este clado tiene mayor relación con el clado ZT. Por otra parte *ScAlt2* se agrupa únicamente con levaduras “*sensu stricto*” (clado Alt2) y se posiciona como outgroup de los clados ZT y KLE. De acuerdo al trabajo publicado por Marcet-Houben y Gabaldón en el 2015, la forma en la cual las proteínas se relacionan con los clados ancestrales (clado ZT y KLE), es un reflejo de qué tan similares o diferentes son a las proteínas parentales; bajo esta perspectiva se cree que el clado Alt1 conserva una mayor similitud con el clado ZT, mientras que el clado Alt2 tiene un carácter híbrido, conservando características del clado ZT y clado KLE. En consecuencia, para poder entender mejor la función de *ScAlt2* es necesario estudiar los genes ortólogos en especies relacionadas con los clados tipo ancestro ZT y KLE.

A pesar de que las enzimas PLP dependientes únicamente pueden plegarse en 7 diferentes tipos de plegamiento y se han estudiado por décadas, determinar la función por medio de un criterio de homología es complicado, ya que las características mecánicas de la catálisis del PLP pueden facilitar la evolución convergente, es decir, la aparición de enzimas con actividades idénticas o muy similares a lo largo de linajes independientes y la evolución divergente, es decir, la evolución de enzimas con un mismo ancestro común pueden tener actividades muy diferentes (Raboni et al., 2010). Así que es muy probable que *ScAlt2* haya divergido a través del cambio en su interacción con el PLP, lo cual cambió su especificidad e incluso el tipo de reacción que puede realizar, para determinar su función es necesario explorar diferentes sustratos.

7.0 Conclusiones

Las proteínas *ScAlt1* y *ScAlt2* tienen una estructura similar; sin embargo, *ScAlt2* tiene mayor acceso al solvente a comparación de *ScAlt1*. Un mayor acceso al solvente en *ScAlt2* da como resultado un cambio en la forma en cómo la proteína interactúa con el PLP, lo cual de acuerdo a la teoría de modulación explica la falta de actividad como transaminasa de alanina. El hecho de que *ScAlt2* forme una base de Schiff catalíticamente competente y la retención selectiva del

clado Alt2 a lo largo de las levaduras "*sensu stricto*" durante más de 100 millones de años, nos sugieren que *ScAlt2* se conservó a lo largo de la evolución ya que le confirió a *Saccharomyces* una ventaja evolutiva y por lo cual, cuenta con una actividad no descrita.

8.0 Perspectivas

Una forma de determinar la función de *ScAlt2* es mediante la cristalización de la proteína. A pesar de que la función de las proteínas PLP dependiente no requieren de un plegamiento específico, debido a los fenómenos de divergencia y convergencia evolutiva, las interacciones entre el PLP y la proteína, igual que la geometría del sitio activo, son altamente conservadas a lo largo de proteínas que comparten la misma función (Singh et al., 2013). Por tal razón, sería de vital importancia obtener la estructura cristalográfica del sitio activo de *ScAlt2* y compararlo con los sitios activos de otras enzimas PLP dependientes. Estudios previos en proteínas PLP dependientes han demostrado que el análisis usando software y base de datos de comparación estructural de los sitios activos de proteínas (CPASS por sus siglas en inglés) ayudan a determinar, de una forma más certera, la función de esta clase de proteínas (Catazaro et al., 2014).

Finalmente, si lográramos determinar la función de la proteína *ScAlt2*, sería de gran relevancia si dicha función se conserva tanto en *ScAlt1* como en las proteínas tipo ancestrales de los dos clados que dieron origen a *Saccharomyces*, con lo cual podríamos precisar si *ScAlt2* subfuncionalizó o neofuncionalizó.

9.0 Bibliografía

- Ahmed, S. A., McPhie, P., and Miles, E. W. (1996). A Thermally Induced Reversible Conformational Transition of the Tryptophan Synthase Subunit Probed by the Spectroscopic Properties of Pyridoxal Phosphate and by Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* 271, 8612–8617. doi:10.1074/jbc.271.15.8612.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Binter Alexandra, Oberdorfer Gustav, Hofzumahaus Sebastian, Nerstheimer Stefanie, Altenbacher Georg, Gruber Karl, et al. (2011). Characterization of the PLP - dependent aminotransferase NikK from *Streptomyces tendae* and its putative role in nikkomycin biosynthesis. *FEBS J.* 278, 4122–4135. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08319.x.
- Catazaro, J., Caprez, A., Guru, A., Swanson, D., and Powers, R. (2014). Functional evolution of PLP-dependent enzymes based on active-site structural similarities. *Proteins* 82, 2597–2608. doi:10.1002/prot.24624.
- Christen, P., and Mehta, P. K. (2001). From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec. N. Y. N* 1, 436–447.
- Colón, M., Hernández, F., López, K., Quezada, H., González, J., López, G., et al. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PloS One* 6, e16099. doi:10.1371/journal.pone.0016099.
- Conant, G. C., and Wolfe, K. H. (2007). Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3. doi:10.1038/msb4100170.
- Dajnowicz, S., Parks, J. M., Hu, X., Gesler, K., Kovalevsky, A. Y., and Mueser, T. C. (2017). Direct evidence that an extended hydrogen-bonding network influences activation of pyridoxal 5'-phosphate in aspartate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 292, 5970–5980. doi:10.1074/jbc.M116.774588.
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276, 43775–43783. doi:10.1074/jbc.M107986200.
- Denessiouk, K. A., Denesyuk, A. I., Lehtonen, J. V., Korpela, T., and Johnson, M. S. (1999). Common structural elements in the architecture of the cofactor-binding domains in unrelated families of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Proteins* 35, 250–261.
- Deng, C., Cheng, C.-H. C., Ye, H., He, X., and Chen, L. (2010). Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 21593–21598. doi:10.1073/pnas.1007883107.

- Di Salvo, M.L., Budisa, N., Contestabile R., PLP-dependent Enzymes: a Powerful Tool for Metabolic Synthesis of Non-canonical Amino Acids An Overview on PLP-dependent Enzymes, in: Beilstein Bozen Symp. Mol. Eng. Control, 2012: pp. 27–66.
- Duff, S. M. G., Rydel, T. J., McClerren, A. L., Zhang, W., Li, J. Y., Sturman, E. J., et al. (2012). The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 528, 90–101. doi:10.1016/j.abb.2012.06.006.
- Dunathan, H. C. (1971). Stereochemical aspects of pyridoxal phosphate catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35, 79–134.
- Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry (Mosc.)* 15, 672–680.
- Eliot, A. C., and Kirsch, J. F. (2004). Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 383–415. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021.
- Escalera-Fanjul, X., Campero-Basaldúa, C., Colón, M., González, J., Márquez, D., and González, A. (2017). Evolutionary Diversification of Alanine Transaminases in Yeast: Catabolic Specialization and Biosynthetic Redundancy. *Front. Microbiol.* 8, 1150. doi:10.3389/fmicb.2017.01150.
- Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism.* 22, 179–207.
- Fleming, P. J., and Rose, G. D. (2005). Do all backbone polar groups in proteins form hydrogen bonds? *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 14, 1911–1917. doi:10.1110/ps.051454805.
- Froimowitz, M. (1993). HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *BioTechniques* 14, 1010–1013.
- García-Campusano, F., Anaya, V.-H., Robledo-Arratia, L., Quezada, H., Hernández, H., Riego, L., et al. (2009). ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 55, 368–374. doi:10.1139/w08-150.
- Glover, N. M., Redestig, H., and Dessimoz, C. (2016). Homoeologs: What Are They and How Do We Infer Them? *Trends Plant Sci.* 21, 609–621. doi:10.1016/j.tplants.2016.02.005.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, et al. «Life with 6000 Genes». *Science (New York, N.Y.)* 274, n.º 5287 (25 de octubre de 1996): 546, 563-67.
- González, J., López, G., Argueta, S., Escalera-Fanjul, X., El Hafidi, M., Campero-Basaldúa, C., et al. (2017). Diversification of Transcriptional Regulation Determines Subfunctionalization of Paralogous Branched Chain Aminotransferases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 207, 975–991. doi:10.1534/genetics.117.300290.

- Hakes, L., Pinney, J. W., Lovell, S. C., Oliver, S. G., and Robertson, D. L. (2007). All duplicates are not equal: the difference between small-scale and genome duplication. *Genome Biol.* 8, R209. doi:10.1186/gb-2007-8-10-r209.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1229–1235. doi:10.1093/molbev/mst012.
- Hidalgo, C., Sevilla, J. M., Pineda, T., and Blazquez, M. (1994). Enolimine and geminaldiamine forms in the reaction of pyridoxal phosphate with ethylenediamine. An electrochemical and spectroscopic contribution. *J. Phys. Org. Chem.* 7, 227–233. doi:10.1002/poc.610070503.
- Hittinger, C. T., and Carroll, S. B. (2007). Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449, 677–681. doi:10.1038/nature06151.
- Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272. doi:10.1038/381272a0.
- Huerta-Cepas, J., Capella-Gutiérrez, S., Pryszcz, L. P., Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2014). PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Res.* 42, D897-902. doi:10.1093/nar/gkt1177.
- Hughes, A. L. (2005). Gene duplication and the origin of novel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8791–8792. doi:10.1073/pnas.0503922102.
- Hughes, R. C., Jenkins, W. T., and Fischer, E. H. (1962). The site of binding of pyridoxal-5'-phosphate to heart glutamic-aspartic transaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 1615–1618.
- Ismond, K. P., Dolferus, R., de Pauw, M., Dennis, E. S., and Good, A. G. (2003). Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol.* 132, 1292–1302.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., and Wincker, P. (2009). “Changing by doubling”, the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. *C. R. Biol.* 332, 241–253. doi:10.1016/j.crv.2008.07.007.
- John, R. A. (1995). Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 81–96.
- 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, 617–624. doi:10.1038/nature02424.
- Koonin, E. V. (2005). Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annu. Rev. Genet.* 39, 309–338. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.114725.

- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S. M., Lange, O. F., Thompson, J., Jacak, R., et al. (2011). ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol.* 487, 545–574. doi:10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lüthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83–85. doi:10.1038/356083a0.
- Lynch, M., and Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155.
- 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, e1002220. doi:10.1371/journal.pbio.1002220.
- Martínez del Pozo, A., Merola, M., Ueno, H., Manning, J. M., Tanizawa, K., Nishimura, K., et al. (1989). Activity and spectroscopic properties of bacterial D-amino acid transaminase after multiple site-directed mutagenesis of a single tryptophan residue. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 510–516.
- McGrath, C. L., and Lynch, M. (2012). “Evolutionary Significance of Whole-Genome Duplication,” in *Polyploidy and Genome Evolution* (Springer, Berlin, Heidelberg), 1–20. doi:10.1007/978-3-642-31442-1_1.
- Mehta, P. K., and Christen, P. (2000). The molecular evolution of pyridoxal-5’-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74, 129–184.
- Mehta, P. K., and Christen, P. (2001) From Cofactor to Enzymes . The Molecular Evolution of Pyridoxal-5-Phosphate-Dependent Enzymes, *Chem. Rec.* 1; 436–447.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., and Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J.* 274, 976–989. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05645.x.
- Peer, Y. V. de, Mizrahi, E., and Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* 18, 411–424. doi:10.1038/nrg.2017.26.
- 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, e45702. doi:10.1371/journal.pone.0045702.
- Penefsky, H. S. (1979). A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. *Methods Enzymol.* 56, 527–530.

- Percudani, R., and Peracchi, A. (2003). A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 4, 850–854. doi:10.1038/sj.embor.embor914.
- Pey, A. L., Albert, A., and Salido, E. (2013). Protein homeostasis defects of alanine-glyoxylate aminotransferase: new therapeutic strategies in primary hyperoxaluria type I. *BioMed Res. Int.* 2013, 687658. doi:10.1155/2013/687658.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet. TIG* 22, 183–186. doi:10.1016/j.tig.2006.02.002.
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernández, H., Calcagno, M. L., Marín-Hernández, A., et al. (2008). Specialization of the paralogous LYS21 determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 1656–1667. doi:10.1099/mic.0.2008/017103-0.
- Raboni, S., Spyraakis, F., Campanini, B., Amadasi, A., Bettati, S., Peracchi, A., et al. (2010). “7.10 - Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes: Catalysis, Conformation, and Genomics,” in *Comprehensive Natural Products II* (Oxford: Elsevier), 273–350. doi:10.1016/B978-008045382-8.00140-4.
- Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidner, K., Kroll, J., and Schweigert, F. J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 705–713. doi:10.1002/mnfr.200600013.
- Ricoult, C., Cliquet, J.-B., and Limami, A. M. (2005). Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance. *Physiol. Plant.* 123, 30–39. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00449.x.
- Singh, R., Spyraakis, F., Cozzini, P., Paiardini, A., Pascarella, S., and Mozzarelli, A. (2013). Chemogenomics of pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes. *J. ENZYME Inhib. Med. Chem.* 28, 183–194. doi:10.3109/14756366.2011.643305.
- Smith, M. M. (1987). Molecular evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* histone gene loci. *J. Mol. Evol.* 24, 252–259. doi:10.1007/BF02111238.
- Toney, M. D. (2005). Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 279–287. doi:10.1016/j.abb.2004.09.037.
- Toney, M. D. (2011). Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 1407–1418. doi:10.1016/j.bbapap.2011.05.019.
- Toney M.D. (2014). Aspartate aminotransferase: An old dog teaches new tricks, *Arch. Biochem. Biophys.* 119–127. doi:10.1016/j.abb.2013.10.002.

- Webb, B., and Sali, A. (2017). Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1654, 39–54. doi:10.1007/978-1-4939-7231-9_4.
- Wolfe, K. H., and Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–713. doi:10.1038/42711.
- Yu, S.-L., An, Y. J., Yang, H.-J., Kang, M.-S., Kim, H.-Y., Wen, H., et al. (2013). Alanine-metabolizing enzyme Alt1 is critical in determining yeast life span, as revealed by combined metabolomic and genetic studies. *J. Proteome Res.* 12, 1619–1627. doi:10.1021/pr300979r.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* 18, 292–298. doi:10.1016/S0169-5347(03)00033-8.

10.0 Glosario

Homología es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo.

Ortólogos, son los genes que comparten el último ancestro común y cuya divergencia se debe a la especiación. Es decir los mismos genes en distintas especies.

Parálogos, genes que se originaron a partir de una duplicación.

Ohnólogos, genes provenientes de una WGD.

Homéologos, genes generados a partir de una hibridación.

Autoploidización, es cuando el genoma de un solo organismo se duplica.

Aloplodización, es cuando se genera un organismo a través de hibridación.

Segregación transgresiva, se refiere al patrón hereditario en el cual la progeñe posee una característica que se sale del rango de ambos padres para tal característica.

Sintenia, se ha usado para referirse a la conservación del orden de los genes entre segmentos cromosómicos de uno o más organismos.

Selección positiva, es un tipo de **selección** natural que favorece un solo alelo, y por esto la frecuencia alélica de una población continuamente va en una dirección.

Reguladores en cis son regiones no codificantes del ADN que regulan la transcripción de los genes cercanos.

Selección purificadora o selección normalizadora, es un tipo de selección natural en el que la diversidad genética decae según un valor particular de carácter. Puesto de otra manera, los extremos de una característica son seleccionados en contra, por lo que los organismos con características del rango "promedio" son los que más sobreviven.

Levaduras "sensu stricto", son aquellas que atravesaron por la WGD y tienen ciertas características metabólicas como: son crabtree (+), producen mutantes petit, son facultativas y resisten altas concentraciones de etanol.

Levaduras "sensu lato" Levaduras relacionadas con el linaje Saccharomyces que no atravesaron por la WGD.

Imina, imina es un grupo funcional o compuesto orgánico con estructura general $RR'C=NR$.

Grupo amino ϵ , es el grupo amino de la cadena lateral presente en el aminoácido lisina.

Aldimina, imina que resulta estructuralmente análoga a un aldehído.

Base de Schiff interna, aldimina formada entre la lisina catalítica de la proteína y el PLP.

Base de Schiff externa, aldimina formada entre el aminoácido (sustrato) y el PLP.

Transaldiminación, es el paso de base de Schiff interna a externa.

Transaminación, reacción entre un aminoácido y un alfa-cetoácido, en la que el grupo amino es transferido y consentido de aquel a éste, con la consiguiente conversión del aminoácido en su correspondiente alfa-cetoácido.

Efecto coulombico, es el efecto de atracción electrostáticas.

Tautómeros, se denominan dos isómeros que se diferencian sólo en la posición de un grupo funcional.

Monofilético, se refiere cuando los organismos descienden de un mismo antepasado común incluido en el grupo.

11.0 Artículo resultado del Doctorado



Saccharomyces cerevisiae Differential Functionalization of Presumed ScALT1 and ScALT2 Alanine Transaminases Has Been Driven by Diversification of Pyridoxal Phosphate Interactions

OPEN ACCESS

Edited by:

Hector Mora Montes,
Universidad de Guanajuato, Mexico

Reviewed by:

Everardo López-Romero,
Universidad de Guanajuato, Mexico
Marcos Antonio De Oliveira,
Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho (UNESP), Brazil
Sławomir Milewski,
Gdańsk University of Technology,
Poland

*Correspondence:

Alicia González
amanjarr@ifc.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Fungi and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 01 March 2018

Accepted: 23 April 2018

Published: 14 May 2018

Citation:

Rojas-Ortega E, Aguirre-López B,
Reyes-Vivas H,
González-Andrade M,
Campero-Basaldúa JC, Pardo JP
and González A (2018)
Saccharomyces cerevisiae Differential
Functionalization of Presumed
ScALT1 and ScALT2 Alanine
Transaminases Has Been Driven by
Diversification of Pyridoxal Phosphate
Interactions. *Front. Microbiol.* 9:944.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00944

Erendira Rojas-Ortega¹, Beatriz Aguirre-López¹, Horacio Reyes-Vivas²,
Martín González-Andrade³, Jose C. Campero-Basaldúa¹, Juan P. Pardo³ and
Alicia González^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Laboratorio de Bioquímica-Genética, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Saccharomyces cerevisiae arose from an interspecies hybridization (allopolyploidization), followed by Whole Genome Duplication. Diversification analysis of ScAlt1/ScAlt2 indicated that while ScAlt1 is an alanine transaminase, ScAlt2 lost this activity, constituting an example in which one of the members of the gene pair lacks the apparent ancestral physiological role. This paper analyzes structural organization and pyridoxal phosphate (PLP) binding properties of ScAlt1 and ScAlt2 indicating functional diversification could have determined loss of ScAlt2 alanine transaminase activity and thus its role in alanine metabolism. It was found that ScAlt1 and ScAlt2 are dimeric enzymes harboring 67% identity and intact conservation of the catalytic residues, with very similar structures. However, tertiary structure analysis indicated that ScAlt2 has a more open conformation than that of ScAlt1 so that under physiological conditions, while PLP interaction with ScAlt1 allows the formation of two tautomeric PLP isomers (enolimine and ketoenamine) ScAlt2 preferentially forms the ketoenamine PLP tautomer, indicating a modified polarity of the active sites which affect the interaction of PLP with these proteins, that could result in lack of alanine transaminase activity in ScAlt2. The fact that ScAlt2 forms a catalytically active Schiff base with PLP and its position in an independent clade in “sensu strictu” yeasts suggests this protein has a yet undiscovered physiological function.

Keywords: paralogous genes, pyridoxal phosphate binding, alanine transaminases, functional diversification, structural organization, alanine metabolism, phylogenetic analysis

INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) genome sequence revealed the presence of 26% duplicated genes suggesting that the *S. cerevisiae* lineage arose from a whole genome duplication (WGD), making this organism a suitable model to study diversification of duplicated genes (Gu et al., 2003; Kellis et al., 2004). A recent phylogenomic study found compulsory evidence which allowed the proposition of an alternative origin for the *S. cerevisiae* lineage via an interspecies hybridization between two strains differentially related to the *Kluyveromyces*, *Lachancea* and *Eremothecium* (KLE) clade and the one related to *Zygosaccharomyces rouxii* and *Torulaspora delbrueckii* (ZT). Although it has not been demonstrated if the hybrid resulted from the fusion of two diploid cells, or two haploid cells that underwent a WGD, both possibilities could result in the formation of an organism with two copies of each gene of the *S. cerevisiae* genome. After the allotetraploid was formed, various recombination events, gene conversion, selective gene loss and selection pressures assembled *S. cerevisiae* genome acquiring the organization we observe today, which harbors conserved blocks of duplicated genes (Marcet-Houben and Gabaldón, 2015). Retained paralogous genes, can either provide increased dosage of the same product or subfunctionalize through a process, in which both copies of the gene lose a subset of their ancestral functions, acquiring new properties (Avendaño et al., 1997; DeLuna et al., 2001; Quezada et al., 2008; Colón et al., 2011; López et al., 2015; González et al., 2017). Neofunctionalization, results in the development of a totally new function (Merhej et al., 2015). Several models have been put forward to explain the functional evolution of gene copies. The duplication-degeneration-complementation model has been considered to explain cases in which functional diversification has resulted in the retention of both copies to carry out the function present in the original gene (Avendaño et al., 1997; Force et al., 1999; DeLuna et al., 2001; Quezada et al., 2008; Colón et al., 2011; López et al., 2015; González et al., 2017). The model known as “escape from adaptive conflict” posed by Hughes (1994) proposes that when the original gene performs two functions that cannot not be independently improved, after duplication each copy could be independently driven by positive selection to further develop one of the two functions. Transaminases represent an ideal model to study diversification of ohnologous genes carrying out two functions which are both needed to warrant metabolite synthesis, and which cannot be differentially meliorated (Colón et al., 2011; González et al., 2017). For the branched chain transaminases that determine biosynthesis and catabolism of isoleucine, leucine and valine (ScBat1/ScBat2), functional diversification was acquired through the acquisition of peculiar expression patterns and subcellular localization, resulting in the distribution of the two metabolic roles which are present in the ancestral type yeast *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) (Colón et al., 2011) resulting in ScBat1 specialization for biosynthesis and ScBat2 for catabolism (Colón et al., 2011; González et al., 2017).

Analysis of the role of ScAlt1 and ScAlt2 in alanine metabolism has shown that ScAlt1 is the first alanine aminotransferase found in yeast, which is capable of synthesizing and catabolizing

alanine (García-Campusano et al., 2009), constituting the only known pathway for alanine catabolism, while ScAlt2 has no alanine transaminase activity and thus has completely lost its role in alanine metabolism (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Since *Scalt1Δ* mutants do not require alanine, other alanine biosynthetic pathways must operate furnishing this amino acid. Accordingly, it has been proposed that in *S. cerevisiae*, the action of the glutamine-pyruvate transaminase and the ω -amidase pathway could constitute an alternative alanine biosynthetic route (Soberón et al., 1989), that would not play a catabolic role, since the reaction catalyzed by glutamine transaminase is irreversible (Soberón et al., 1989). In regard to ancestral-type yeasts, previous results from our laboratory (Escalera-Fanjul et al., 2017) have shown that *Lachancea kluyveri* (*L. kluyveri*) and *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*) alanine transaminases; *LkAlt1* and *KlAlt1* are ScAlt1 orthologous counterpart. Additionally, these two yeasts respectively display *LkAlt1* and *KlAlt1* alanine transaminase activity and unidentified alanine biosynthetic and catabolic pathways. In addition, the phenotypic analysis of *Lkalt1Δ* and *Klalt1Δ* null mutants showed that these proteins have a metabolic role, not related to alanine metabolism, since *Lkalt1Δ* does not achieve wild type growth rate. Thus, the ancestral alanine transaminase function (Escalera-Fanjul et al., 2017) was kept by the ScAlt1, which specialized its catabolic character, and lost the alanine independent role observed in the ancestral type enzymes. The fact that ScAlt2 and ScAlt1 conserve high identity with *LkAlt1* and *KlAlt1*, indicates that ScAlt1 and ScAlt2 diversified after the ancestral hybrid was formed. It could be considered, that ScAlt2 diversification resulted in loss of both alanine transaminase activity and the additional alanine-independent *LkAlt1* function. It can thus be concluded that *LkAlt1* and *KlAlt1* functional role as alanine transaminases was delegated to ScAlt1, while ScAlt2 lost this role during diversification, specializing a yet uncovered activity, which does not represent the additional alanine-independent activity observed in *KlAlt1* and *LkAlt1* since ScAlt2 is unable to complement both: *Lkalt1Δ* and *Klalt1Δ* mutants. Results suggest that ScAlt1 and ScAlt2 diversification pattern could fit the specialization or escape from adaptive conflict posed by Hughes (1994), although since ScAlt2 function has not been identified, subfunctionalization or neo-functionalization cannot be ruled out. Identification of ScAlt2 function and determination of whether it is present in ZT and or KLE will be necessary in order to address this matter.

The study presented in this paper has been aimed to carry out the structural characterization of ScAlt1 and ScAlt2 in order to better understand how ScAlt2 functional diversification, led to loss of alanine transaminase activity. Our results show that ScAlt2 has a more expanded structure in comparison to that displayed by ScAlt1. This differential conformation could influence the polarity of the environment surrounding the active site, affecting the interaction of the catalytic site with PLP. Under physiological conditions, PLP interaction with ScAlt1 allows the formation of two tautomeric PLP forms (enolimine and ketoenamine), while ScAlt2 preferentially forms the ketoenamine PLP tautomer, indicating ScAlt2 has different interaction patterns with PLP as compared to those displayed by ScAlt1. However ScAlt2

conserved a PLP binding domain, which allows the formation of a catalytically active Schiff base, suggesting this protein could have a yet undiscovered PLP-dependent activity.

MATERIALS AND METHODS

Phylogenetic Analysis

A total of 33 taxa were used in the analysis, including six ascomycetes as outgroups. Amino acid sequences of alanine transaminases of hemiascomycetes were obtained from the Fungal Orthogroups Repository¹ and Phylome Data Base² (Huerta-Cepas et al., 2014) databases, using ScAlt1 sequence as query. Alignment was performed and phylogenetic tree was constructed with the Muscle method using the MEGA version 5.0 of the UPGMB algorithm³ (Hall, 2013), using the Maximum Likelihood (ML) method. Prior to ML analysis, best-fit models of amino acid substitution were selected with the Bayesian Information Criterion (BIC) as implemented by MEGA version 5.0. Based on the BIC, the model that best-fitted Alts evolution was the LG+G+I model. Robustness of ML tree topologies were tested by bootstrap analyses, with 1000 replicates each.

ScALT1 and ScALT2 Cloning and Overexpression in *E. coli*

Saccharomyces cerevisiae ScALT1 and ScALT2 genes were PCR amplified respectively using the 1/2 deoxyoligonucleotide pair: FrwAlt1 (GCG CGC CAT ATG CAA TCT TCG CTA AAC GAC CTG C) and RvsAlt1 (CGC GCG CTC GAG CCC TTT TAT TCA GTC ACG GTA TTG G), and the 3/4 oligonucleotides FrwAlt2 (GCG CGC GCT AGC ATG ACA ATG ACA CAC CAA CAG G) and RvsAlt2 (CGC GCG CTC GAG TCA ATT ACG ATA CTT GCT GAA GAAGAA ATC) using genomic DNA of the CLA1 WT (*MATa ScALT1 ScALT2 ura3Δleu2Δ*) strain as a template. For ScALT1 amplification, the mitochondrial localization sequence was not included. PCR products and pET-28a (+) plasmids were NdeI/XhoI digested and ligated after gel purification. Ligations were transformed into the DH5α *Escherichia coli* (*E. coli*) strain. Plasmids were purified and, correct cloning was verified by sequencing. For ScALT1 and ScALT2 heterologous expression, the Rosetta 2TM (DE3) *E. coli* strain (Novagen) was transformed. ScALT1 selected clones were grown in LB medium with 50 μg ml⁻¹ of kanamycin and 70 μg ml⁻¹ of chloramphenicol, grown at 37°C with shaking (250 rpm). When cultures reached an OD of 0.6 at 600 nm, expression of the proteins was induced with 200 μmol L⁻¹ of isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), incubated overnight at 30°C with shaking (250 rpm), harvested by centrifugation at 1100 g for 15 min, and the cellular pellet was stored at -70°C until used. To over-express ScAlt2 in soluble form we carried out the modified San-Miguel protocol (San-Miguel et al., 2013),

which allows the induction of the soluble form of proteins which in standard protocols are sequestered in inclusion bodies. Several clones were grown on LB medium with 50 μg ml⁻¹ of kanamycin and 70 μg ml⁻¹ of chloramphenicol and incubated at 30°C with shaking (250 rpm). When cultures reached an OD of 0.2 at 600 nm, protein was induced with 100 μmol L⁻¹ of IPTG, incubated for 1 week at 4°C with shaking (250 rpm) and harvested by centrifugation at 1100 g for 15 min, the cellular pellet was stored at -70°C until used. Over-expression of either ScAlt1 or ScAlt2 was carried out in strains carrying HIS-tags on the amino terminal end of the protein.

Obtention of Whole Cell Soluble Protein Extracts

The cellular pellet of ScAlt1 was suspended in 10 ml of 30 mmol L⁻¹ imidazol, 1 M NaCl, 50 mM K₂HPO₄, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mmol L⁻¹ dithiothreitol, 1 mmol L⁻¹ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 8. Soluble extracts were obtained by sonication (Ultrasonic Processor Model: VCX 130) with a tip sonicator maintaining the tubes on ice; five cycles (70% amplitude, 1 s on and 1 s off for 1 min) with 1 min of incubation on ice between each cycle. After centrifugation at 1100 g for 20 min at 4°C, the supernatant was stored at 4°C. ScAlt2 soluble extract was prepared by resuspending thawed cells in 10 ml of lysis buffer [2 M NaCl, 50 mM K₂HPO₄, plus one Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Inc.) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 8]. Protein extracts were obtained by sonication as above described.

Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

To purify ScAlt1 protein, the supernatant was loaded on an equilibrated nickel column (Ni-NTA Agarose, Quiagen), washed with 50 volumes of 30 mmol L⁻¹ imidazol, 50 volumes of 50 mmol L⁻¹ imidazol, and 10 volumes of 80 mmol L⁻¹ imidazol. The protein was eluted with 300 mmol L⁻¹ imidazol and stored at 4°C until used. To purify ScAlt2 protein, supernatant was also purified through an equilibrated nickel column (Ni-NTA Agarose, Quiagen), washed with 50 volumes of lysis buffer; afterward, the protocol described for ScAlt1 purification was followed. ScAlt1 and ScAlt2 homogeneity of proteins was verified by denaturing with a polyacrylamide gel electrophoresis (12% SDS-PAGE) and the gel stained with Coomassie Blue. Proteins were 10-fold concentrated with Amicon® Ultra-15 10K centrifugal filter devices, and then diluted to the original sample volume with assay buffer (50 mM K₂HPO₄, 4 mM Mg₂Cl, 100 mM PLP, at pH 7.5) three “washing out” cycles were performed.

Alanine Transaminase Enzymatic Assay

Enzymatic assay followed a previously reported protocol (Bergmeyer, 2012). The reaction mixture contained (50 mM K₂HPO₄, 20 mM alanine, 6 mM α-ketoglutarate, 250 μM NADH, 5 U ml⁻¹ of lactate dehydrogenase, and 40 μM

¹<https://portals.broadinstitute.org/regen/orthogroups/>

²<http://phylomedb.org/?q=about>

³<http://www.megasoftware.net/>

PLP pH 7.5). Control, assays were performed without alanine. Specific activity, was determined and the slope of the negative control was subtracted to that obtained with the complete assay. All assays were performed at 25°C in a Varian Cary 50 spectrophotometer, following the absorbance at 340 nm. Protein was determined according to the method described by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard. Initial velocities were obtained at different concentrations of both substrates simultaneously for ScAlt1, alanine was varied from 2.00 to 15.00 mM and α -ketoglutarate from 0.05 to 10.00 mM. The results were globally fitted to the rate equation of a ping-pong mechanism (Segel, 1993), using GraphPad Prism 6.00 (Software, Inc.).

$$V_0 = (V_{max}[A][B]) / (K_{mA}[B] + K_{mB}[A] + [A][B]).$$

Homology Modeling for ScAlt1 and ScAlt2

DNA sequence of *ScALT1* and *ScALT2* were retrieved from *S. cerevisiae* S288c chromosome XII (NCBI Reference Sequence: NC_001144.5) and S288c chromosome IV (NCBI Reference Sequence: NC_001136.10). The two genes, *ScALT1* and *ScALT2* encode proteins of 1024 and 1014 amino acids long, respectively. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST⁴) (Altschul et al., 1997) was used to find homologous protein structures in the Protein Data Bank. The crystal structure of the alanine aminotransferase structure from *Hordeum vulgare* (3TCM.pdb) was selected for the modeling procedure (Duff et al., 2012). The amino acid sequence comparison of *ScAlt1* and *ScAlt2* sequence comparison showed a 46 and 45% identity with a 94 and 96% coverage with the respective targets. ScAlt1 and ScAlt2 models were constructed using MODELLER 9.17 with 3TCM.pdb (Webb and Sali, 2017) file as template structure, models with lower energy were chosen. Finally, a simple structural refinement of full-atom was performed using Rosetta (Leaver-Fay et al., 2011) “relax” application. Models were validated using the Verify-3D (structure evaluation software) (Lüthy et al., 1992) and What check (protein verification tools software) (Hooft et al., 1996) computer programs. Ligand structure was constructed using HyperChem software (Froimowitz, 1993). The structures of the ligands were minimized using Gaussian 09, revision A.02 (Gaussian, Inc., Wallingford, CT, United States) at DTF B3LYP/3-21G level of theory.

Circular Dichroism Analysis

ScAlt1 and ScAlt2 secondary structures were spectroscopically evaluated using circular dichroism (CD) with a spectropolarimeter (Jasco J-810®, Easton, MD, United States) equipped with a Peltier thermostated cell holder in a 1 mm path-length quartz cuvette. Far UV-CD spectra of ScAlt1 and ScAlt2 were obtained from 190 to 280 nm at 1 nm intervals using a protein concentration of 0.25 mg ml⁻¹ in 50 mM K₂HPO₄, 4 mM Mg₂Cl, 100 μ M PLP at pH 7.5. Experiments were performed at 25°C.

⁴<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ScAlt1 and ScAlt2 Thermal Stability

Thermal stability of ScAlt1 and ScAlt2 was determined following the CD signal at 222 nm varying the temperature from 20 to 90°C at an increase at a rate of 1°C/2.5 min, and a protein concentration of 0.250 mg ml⁻¹. Spectra without protein were subtracted from those that contained the recombinant ScAlt1 and ScAlt2 purified proteins, respectively. The fraction at which 50% of the protein was unfolded, corresponds to the melting temperature (T_m) value.

Intrinsic Fluorescence of ScAlt1 and ScAlt2 Proteins

Emission-fluorescence spectra of ScAlt1 and ScAlt2 proteins were recollected from 300 to 450 nm at an excitation wavelength of 295 nm with a Shimadzu RF5-00U spectrofluorometer. Enzyme concentration was 200 μ g ml⁻¹ in 50 mM K₂HPO₄, 4 mM Mg₂Cl, 100 μ M PLP at pH 7.5. Slope observed without protein was recorded and subtracted from samples containing purified ScAlt1 or ScAlt2. For the experiment performed with Gdn/HCl, enzyme was added to a 6 M solution of guanidinium chloride Gdn/HCl, prepared in 50 mM K₂HPO₄, 4 mM Mg₂Cl, at pH 7.5. The emission spectra were recorded after 2 h of incubation with Gdn/HCl.

Fluorescence Quenching

Emission-fluorescence spectra of ScAlt1 and ScAlt2 proteins were recorded from 300 to 450 nm at an excitation wavelength of 295 nm with a Shimadzu RF5-00U spectrofluorometer, using solutions having a protein concentration of 250 μ g ml⁻¹. The fluorescence of proteins monitored at their emission maxima, was quenched by the addition of small aliquots of an 8 M acrylamide solution, as described previously (Eftink and Ghiron, 1976), and analyzed with the Stern–Volmer equation:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q].$$

In this equation, F_0/F is the ratio of the fluorescence intensity in the absence and presence of a given concentration of quencher [Q], and K_{sv} is the quenching constant.

Size Exclusion Chromatography

Molecular exclusion chromatography was performed with a Superose 6 10/300 GL column coupled to an Äkta FPLC system. The mobile phase had 50 mM K₂HPO₄, 4 mM Mg₂Cl, pH 7.5. Protein elution was monitored by following the absorbance at 280 nm. Column was calibrated with Bio-Rad molecular weight standards.

Determination of ScAlt1 and ScAlt2 Alanine Binding Affinity

The emission-fluorescence spectra of ScAlt1 and ScAlt2 were recorded from 300 to 450 nm at an excitation wavelength of 295 nm with a Shimadzu RF5-00U spectrofluorometer. The ScAlt1 and ScAlt2 alanine binding affinity was determined by fluorescence titrations. ScAlt1 and ScAlt2 (250 μ g ml⁻¹)

were titrated by adding increasing alanine concentrations (0–50 mM) suspended in 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM Mg_2Cl_2 , 100 mM PLP pH 7.5, following the changes in fluorescence at 389 nm. Dissociation constant (K_d) values were computed by fitting the data to “One site- Specific binding equation”:

$$Y = (B_{max}X)/(Kd + X).$$

Determination of ScAlt1 and ScAlt2 Catalysis With Different Amino Acids

To analyze the catalysis of ScAlt1 and ScAlt2 with different amino acids we monitored the formation of an external Schiff Base, which is the first step of the catalysis of all PLP dependent enzymes. For this purpose we followed shifts in the UV-visible spectrum on NanoDrop™ and compared the spectrum of the protein with and without amino acids. When PLP forms an external Schiff Base, the appearance of a maximum peak at 325 nm was observed (Binter et al., 2011). ScAlt1 and ScAlt2 were prepared at 12 $\mu g/\mu l$ in 50 mM KH_2PO_4 , 4 mM $MgCl_2$, 500 mM PLP, 10 μl of the protein were mixed with 1 μl of a 10X stock solution of the corresponding amino acid. Amino acid stock solutions were prepared in KH_2PO_4 and 4 mM $MgCl_2$. 10X amino acid stocks were prepared as follows: alanine 162 mM, arginine 60 mM, asparagine 8.2 mM, aspartic acid 81 mM, cysteine 238 mM, glutamic acid 81 mM, glutamine 171 mM, glycine 8 mM, histidine 20 mM, isoleucine 7 mM, leucine 5 mM, lysine 19 mM, methionine 1.6 mM, phenylalanine 5 mM, proline 2.3 mM, serine 23 mM, threonine 22 mM, tryptophan 2 mM, tyrosine 3 mM, and valine 361 mM.

Absorption Spectroscopy

ScAlt1 and ScAlt2 UV-visible spectra were recorded on a Cary 400 UV-visible spectrophotometer (Varian) and analyzed using Cary WinUV software (Varian). Spectra were recorded in samples containing a 6 mg ml^{-1} of protein in 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM Mg_2Cl_2 , pH 7.5 and at room temperature. ScAlt1 and ScAlt2 spectra obtained in the presence of PLP were recorded immediately after the addition of 100 μM PLP.

Reduction of the Schiff Base in the Presence of Sodium Borohydride

To reduce the Schiff base in ScAlt1 and ScAlt2, 6 mg ml^{-1} samples of purified ScAlt1 and ScAlt2 were suspended in 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM Mg_2Cl_2 , 100 μM PLP pH 7.5 and 15 μL of 1 M $NaBH_4$ (dissolved in 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM $MgCl_2$, pH 7.5 buffer) was added to reduce the Schiff base. The reduction reaction was allowed to proceed for 1 h in the dark. UV-visible spectra of ScAlt1 and ScAlt2 were registered (scan range: 300–600 nm) using a Cary 400 UV-visible spectrophotometer (Varian) before reduction to confirm the presence of PLP linked by a Schiff base and after reduction to confirm the presence of a reduced Schiff base (band at 325 nm). The protein was dialyzed against in 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM $MgCl_2$, pH 7.5 buffer.

PLP Quantification

Prior to the absorbance measurement, ScAlt1 and ScAlt2 were converted to the holo-form by adding PLP to a final concentration of 500 μM , and incubated for 1 h at 4°C. PLP excess was removed by purification using a Penefsky column (Penefsky, 1979). To perform UV-visible assays, 6 mg ml^{-1} of recombinant ScAlt1 and ScAlt2, were used after blanking the spectrophotometer with 50 mM K_2HPO_4 , 4 mM $MgCl_2$, pH 7.5 buffer. ScAlt1 and ScAlt2 (6 mg ml^{-1}), were denatured with 6 M Gdn/HCl and incubated for 2 h at room temperature. UV-visible spectra of ScAlt1 and ScAlt2 were obtained (scan range: 300–600 nm) using a Cary 400 UV-visible spectrophotometer (Varian) before and after denaturation to confirm the presence of the Schiff base. To find out if PLP was irreversibly bound to the ScAlt1 and ScAlt2 proteins, the denatured protein was separated from the PLP using an Amicon Ultra-15 device. Then, the UV-visible spectra were obtained from the unbound PLP that went through the filter; PLP quantification was obtained using a calibration curve. To find out whether the protein conserved bound PLP, the initial volume of the protein was reconstituted with 6 M Gdn/HCl and an absorbance scan at 300–600 nm was performed.

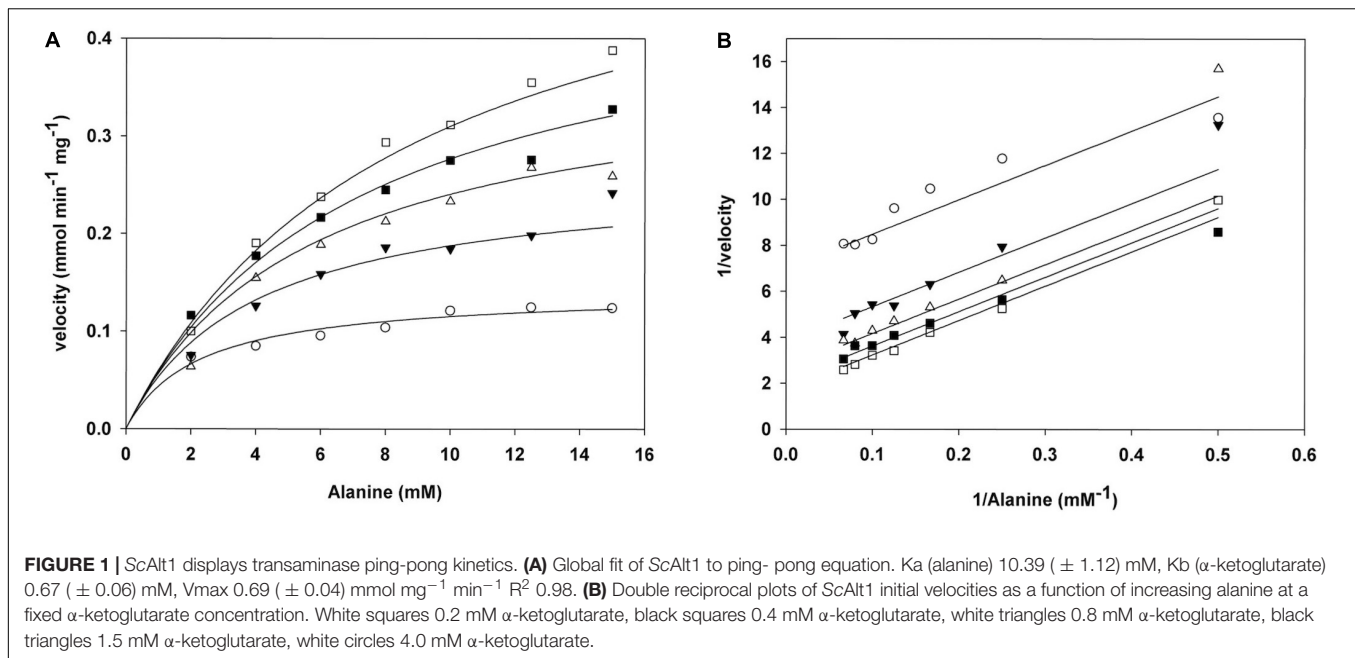
Experimental Reproducibility

Representative results are presented, all the experiments were performed at least two or three times.

RESULTS

ScAlt1 Displays a Kinetic Ping-Pong Mechanism Typical of Transaminases

To investigate the kinetic properties of ScAlt1 from *S. cerevisiae*, amino terminal His-tagged enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by IMAC, after heterologous over-expression in *E. coli*, as described in Section “Materials and Methods.” ScAlt2 protein was also purified (Supplementary Figure S1), and as previously reported, it did not show alanine transaminase activity (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). For ScAlt1, initial velocity measurements were performed varying α -ketoglutarate and alanine concentrations. The resulting double reciprocal plots (Lineweaver–Burk) for both substrates are consistent with a ping-pong mechanism (Figure 1B). The data were globally fitted to the ping-pong equation (Figure 1A). The resulting kinetic parameters are presented in Table 1. In addition, Table 1 shows the kinetic parameters for two ancestral type yeasts: LkAlt1 (*Lacchancea kluyveri*) and K1Alt1 (*Kluyveromyces lactis*) (Escalera-Fanjul et al., 2017). ScAlt1 showed a K_m for alanine and α -ketoglutarate similar to those found for LkAlt1 and K1Alt1, while ScAlt1 k_{cat} was two to threefold higher than the ones found in both of the ancestral-type species, this could be attributed to the fact that for ScAlt1, purification was carried at 4°C, while those of LkAlt1 and K1Alt1 were performed at room temperature (25°C).

**TABLE 1** | Kinetic parameters of Alts of different yeasts.

	K_a alanine (mM)	K_b α -ketoglutarate (mM)	k_{cat} (s^{-1})	
ScAlt1	10.39	0.67	698	This work
LkAlt1	4.88	0.22	355	Escalera-Fanjul et al., 2017
KlAlt1	17.22	0.92	205	Escalera-Fanjul et al., 2017

Although ScAlt1 and ScAlt2 Share Catalytic Sites, ScAlt2 Does Not Display Alanine Transaminase Activity

To determine whether ScAlt2 contained the catalytic residues and the PLP presumed binding site, we performed amino acid sequence alignment with ScAlt1 and *H. vulgare* (barley) alanine transaminases (Figure 2A) (Duff et al., 2012). Barley alanine transaminase is a dimeric PLP-dependent enzyme, which has been purified and kinetically characterized. The enzyme exhibits a ping-pong reaction mechanism, and its main physiological role is to catalyze the forward (alanine-forming) and the reverse (glutamate-forming) reactions. It can synthesize aspartate with 10% efficiency as compared to alanine and its crystallographic structure has been determined (Duff et al., 2012). Amino acid sequence comparison revealed that both, ScAlt1 and ScAlt2 conserve the amino acids which have been found to be involved in alanine and PLP binding (Figure 2A). The analysis showed that ScAlt1 and ScAlt2 conserved approximately 45% amino acid identity with *H. vulgare* whereas the identity between ScAlt2 and ScAlt1 was 67%. Furthermore, potential catalytic residues and the binding site region of the prosthetic group can be recognized in the three proteins (Figure 2A). This result suggests

that ScAlt2 should have transaminase activity. In addition, the alignment of the 3D models of ScAlt1 and ScAlt2 built on the *H. vulgare* (3TCM.pdb) template shows very similar topological orientation of their catalytic residues (Figures 2B–D). These results prompted us to carry out ScAlt1 and ScAlt2 structural analysis.

ScAlt1 and ScAlt2, Display a Similar Structure; However, ScAlt2 Has a More Expanded Organization, Probably Allowing Higher Solvent Accessibility

Considering that the sequence alignment between ScAlt1 and ScAlt2 shows an identity of 67%, we studied the effect of such difference over their native structures. The secondary structure of the recombinant proteins was studied by monitoring the CD signal at far-UV (Figure 3A); the relative values of α -helix and β -sheet determined from the CD data are also depicted (Figure 3A, inset). No significant changes were detected between the CD signals or the secondary structure values of ScAlt1 and ScAlt2. In addition, the thermostability of both proteins in the presence of PLP was measured following the CD signal at 222 nm. ScAlt1 showed a higher stability than that observed for ScAlt2 (55°C ScAlt1 vs. 49°C ScAlt2) (Figure 3B).

We evaluated differences in the tertiary structure of proteins by following their intrinsic fluorescence under native and denaturing conditions (Figure 3C). Under native conditions both proteins are totally folded; the addition of the denaturant agent Gdn/HCl, promoted in ScAlt1 and ScAlt2 a 24 nm and 17 nm red-shift of the wavelength to obtain the maximal fluorescence peaks at 357 nm. Besides, under native conditions, different λ max for ScAlt1 and ScAlt2 were obtained (333 and 340 nm, respectively). These results might suggest differences in the fluorescence contribution of the aromatic residues between both

A CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

3TCM  -----MHHHHHHHHHGGTDDDDKMAATVAVDNLNPKVLKCEAVGGEIVTIAQRLQE
ALT1  QSSLNDLRLNRPHHHTLKTSNNEFYPAEQLTLEDVNVNLKAKAVGAIIPMRAEELKA
ALT2  ----MTMTHQOD-LKGVFTAKDLDFKPAKIKTKDLNTGVTKAEAVGAIPTRADELKE
           :   :   :   :   :   *   :   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  QLKTQPGSLPFDELYCNIIGNPQSLGQQPVVTFREVVALCDHPDLLQREEI----KTLFS
ALT1  QLEKDPQSLPFDRINANIGNPQQLQKPLTYRQVLSLLQYPELLNQNQEQQLVDSKLFK
ALT2  ELKKNPEVLPFDDINANIGNPQQLQKPLTFTRQVLAALLEYPEILRVGHNELASLNLFS
           :   :   :   *   *   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  ADSISRAKQILAMIPGRATGAYSHSQGIHGLRDAIASGSIASRD-GFPANADDIFLTDK
ALT1  LDAIKRAKSLMEDIG-GSVGAYSSSQGVEGIRKSVAEFITKRDEGEISYPEDIFLTDK
ALT2  RDALERAERLLNDIG-GSIGAYSHSQGVPGIRQTVADFITRRDGEPATPEDIYLTT
           *   :   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  PGVHLMQLLIRNEKDGLVPIPCPLYSASIALHGGALVPYYLNSTGWLETSDVKV
ALT1  AAVNYLLSIFRCGPETGVLPIPCPLYTATLALNNSQALPYLDENSGWSTNPPEIETQ
ALT2  SAATSLLSLLCKDSQTGLLIPICPLYTASASLFNAQVLPYLLDESNWSTNSDEIEKV
           :   :   :   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  LEDARSRGINVRALVVINPGPTGQVLAENQYDIVKFCNEGLVLLADEKQENIYVDN
ALT1  VKEAIQNEIKPTVLVINPGPTGAVLSPEIAQIFVEAAKYGTVVIADKQENIFPG-
ALT2  VQDALKKQIRPSVLVINPGPTGAVLSEETIARICLIAAKYGITIISDEKQENIFND-
           :   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  KKFHSFKKIVRSLGYG---EEDLPLVSYQIVGYYGECGKGGYFEITGFSAPVREI
ALT1  TKFHSMKILRLHQRHHPKFDNVQLASLHETIGVSGCEGCGGYMELTGFSEHMRQVI
ALT2  VKFHSMKVLRLKQHLVPGKFDNVQLASLHETIGFMDECGGGMETIIGFSQETRDAL
           *   *   *   :   :   :   *   *   *   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  YKIASVNLCSNITGQILASLVMNPPKASDESASYAKDKGILASLARAKALEHAFNKL
ALT1  LKLASISLCPVVTGQALVDMVRPVEEGESFESDQAERNISIEKLIITRAMLYETFNLSL
ALT2  FKLMSISICSVVTGQAVDVLVMPQPGDESIEYQDHERLKIIFHEMTRANLYETFKEL
           *   :   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  EGITCNEAEGAMVFPQICLPQKAIEAANKAPDAFYALRLLESTGIVVVGSGFGQV
ALT1  EGIECQKPGAMVLPFKIDLFPKAVQEARHLELTPDEFYCKLLESTGICTVPGSGFGQE
ALT2  EGIECQKPGAMVLPFRVLVPPKALCESERLGIPEDEFYCTSLLESTGICTVPGSGFGQR
           *   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
3TCM  PGTWHFCTILPQEDKIPAVISRFTVFEAFMSEYRD
ALT1  PGTYHLTTFLAPGLE--WIKKWESEFKFEFDQYRD
ALT2  PGTYHVTTFLLAPGTK--WIQDWKEFHQDFFSKYRN
           *   *   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

```

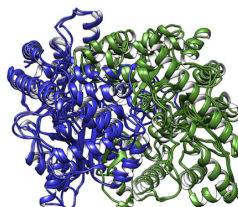
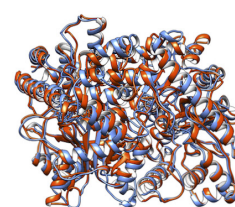
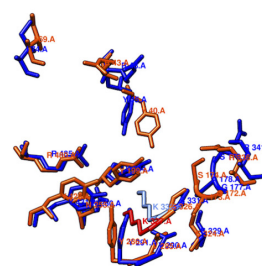
B**C****D**

FIGURE 2 | Sequence and structural alignment of ScAlt1 and ScAlt2. **(A)** Amino acid sequence alignment of ScAlt1, ScAlt2 and *Hordeum vulgare* alanine transaminase (3TCM). The residues involved in the alanine and PLP binding are highlighted in red. **(B)** Structural alignment of ScAlt1 and ScAlt2 protein models. Both models are constituted by dimeric proteins: subunit A in blue, subunit B in green. **(C)** Comparison of ScAlt1 and ScAlt2 protein models, ScAlt1 in blue and ScAlt2 in orange. **(D)** Comparison of catalytic residues, ScAlt1 in blue, and ScAlt2 in red.

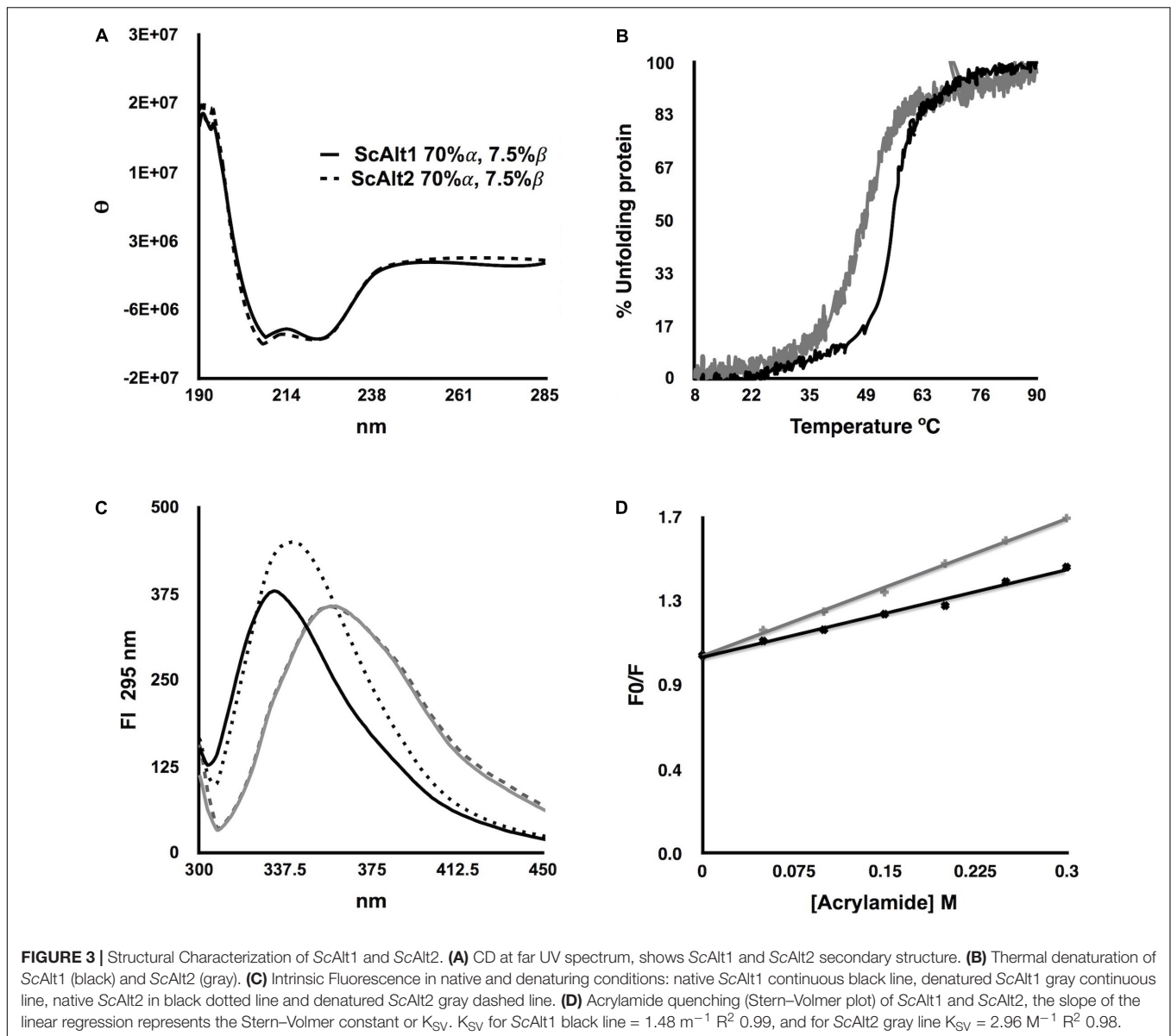
proteins. Alternatively, the data may indicate differences in solvent accessibility in which ScAlt1 showed less accessibility than ScAlt2, explaining the 7 nm red-shift in the ScAlt2 under native conditions.

To assess these assumptions, we performed a Stern–Volmer fluorescence quenching test of ScAlt1 and ScAlt2 by using acrylamide (**Figure 3D**). ScAlt2 showed a higher Stern–Volmer quenching constant value (2.96 M^{-1}) than ScAlt1 (1.48 M^{-1}), confirming that the former has higher solvent accessibility. Finally, to determine the quaternary structure, we performed size exclusion chromatography experiments. The results showed that both proteins elute as dimers. Considering that the theoretical molecular weight for the ScAlt1 monomer is 61 kDa and for that of ScAlt2 is 58 kDa the obtained experimental results, 147 kDa for ScAlt1 and 127 kDa for ScAlt2, indicate a dimeric organization (Supplementary Figure S2). Collectively, the data show that the global structure of ScAlt1 and ScAlt2 are very similar, although ScAlt2 shows higher solvent accessibility.

ScAlt2 Does Not Bind Alanine, Confirming Its Lack of Alanine Transaminase Activity

To analyze whether ScAlt2 could bind alanine, a titration was performed by adding increasing concentrations of alanine and

following the change of intrinsic fluorescence. Both, ScAlt1 and ScAlt2 have three tryptophan molecules, which according to the structural prediction are in equivalent positions. ScAlt1 was used as positive control, since we have clearly established that ScAlt1 binds alanine. Two important findings were observed: (a) the fluorescence obtained at 333 nm decreased, and (b) a progressive increase in fluorescence was detected at 389 nm (**Figure 4A**). Fluorescence quenching at 333 nm can be attributed to a conformational change that increases the interactions of tryptophan residues with polar amino acids (Rawel et al., 2006). The increased fluorescence at 389 nm corresponds to energy transfer of the pyridoxal chromophore with some of the chromophores of tryptophan residues (Martínez del Pozo et al., 1989). Interestingly, these changes in fluorescence were not observed when alanine was added to the ScAlt2 preparation (**Figure 4B**), indicating that this protein does not interact with alanine. To determine the dissociation constant for alanine binding, the intrinsic fluorescence changes (ΔF) of ScAlt1 at 389 nm were plotted against alanine concentration (**Figure 4C**). The data were fitted to the “One site specific binding” equation shown in Section “Determination of ScAlt1 and ScAlt2 Alanine Binding Affinity,” obtaining a dissociation constant of $1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$. In addition to alanine, we determined whether ScAlt1 and ScAlt2 could use the rest of the amino acids



found in proteins as substrates. We found that in addition to alanine, ScAlt1 could form external Schiff base with glutamate, serine, cysteine, histidine, and aspartic acid; however, for the rest of the amino acids no external Schiff base formation was detected. ScAlt2 was unable to form external Schiff base with either one of the 20 amino acids. Representative results are shown in Supplementary Figure S3.

ScAlt2 Forms a Schiff Base With PLP

A peculiar characteristic of ScAlt2 is its brilliant yellow color, which contrasts with the absence of color of ScAlt1. Considering this observation, we posed the question of whether this difference could be due to different PLP interactions. To address this question, we determined the absorption spectrum from 300 to 600 nm, since in this region the Schiff base can be observed in its different states. Experiments were carried out under

two conditions without adding PLP and in the presence of this cofactor. For ScAlt1, no formation of the Schiff base was observed without PLP, however, upon addition of PLP, two maximum absorption peaks were observed being the most prominent the one at 330–335 nm, which should correspond to the enolimine form of the Schiff base, and the less pronounced peak at 420 nm to the ketoenamine derivative of the Schiff base (Figure 5A).

For ScAlt2 a maximum peak is observed at 420 nm without PLP, which could correspond to the ketoenimine form of the Schiff base. Upon PLP addition, the 420 nm peak was increased (Figure 5B), as compared to that found without PLP (Figure 5B). To corroborate the presence of the Schiff base in ScAlt1 and ScAlt2, proteins were incubated with sodium borohydride (NaBH_4), and in both cases the reported spectroscopic modification for the reduction of the Schiff base

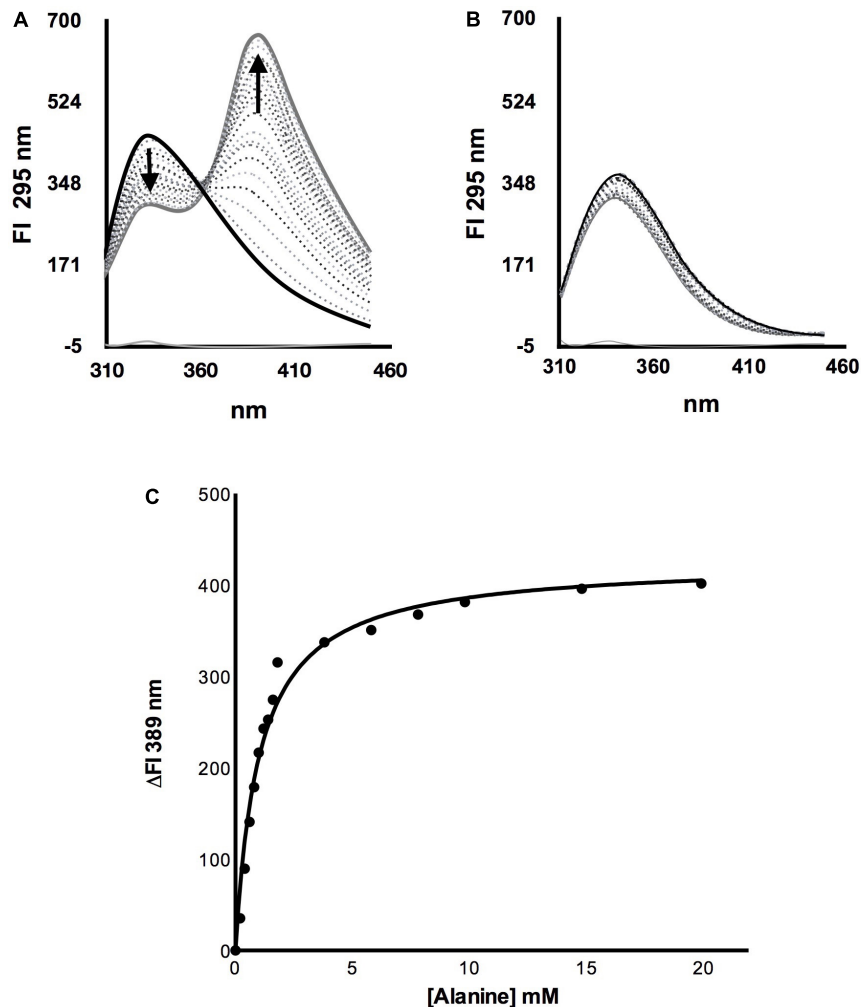


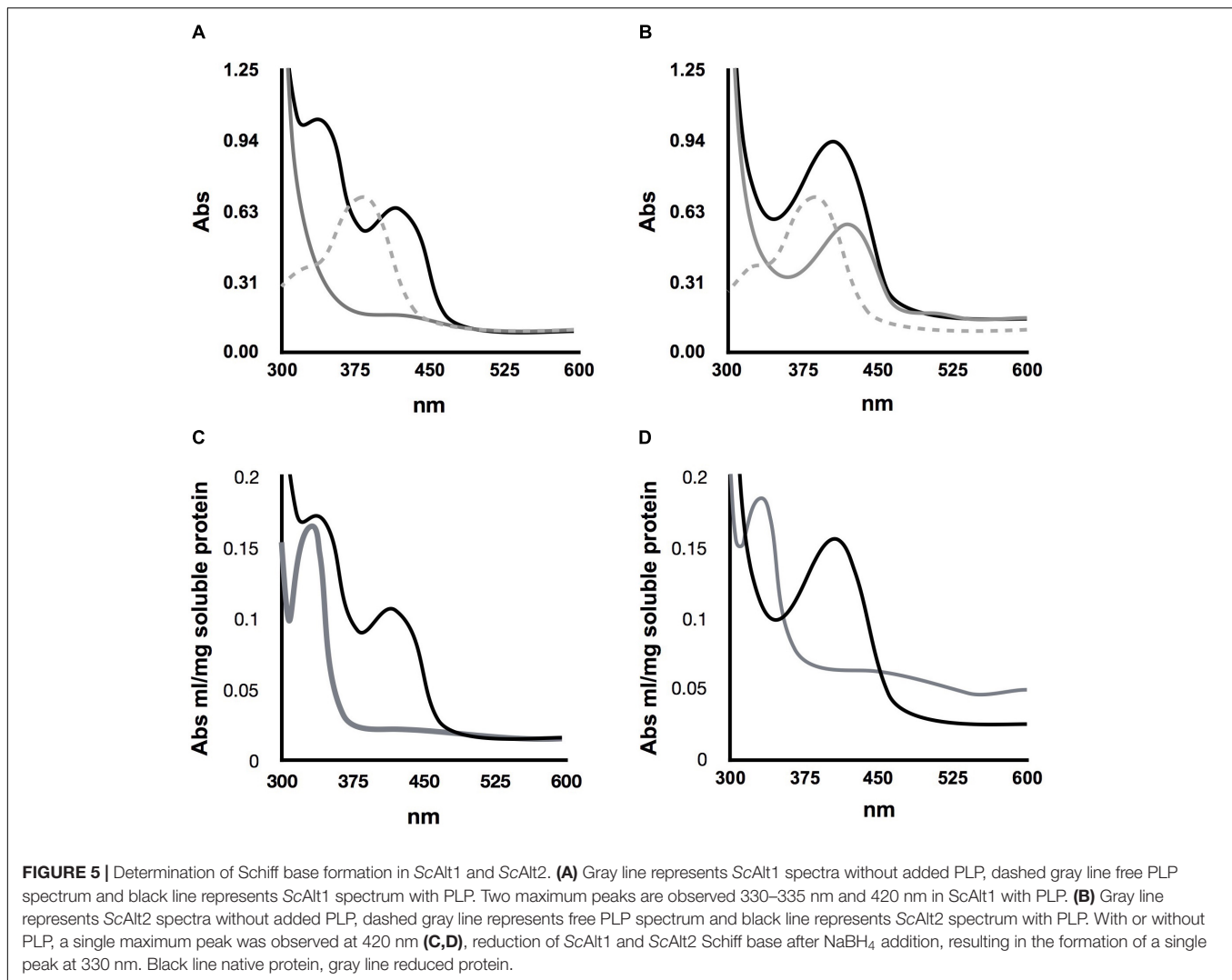
FIGURE 4 | Alanine titration of ScAlt1 and ScAlt2. **(A)** ScAlt1 spectra without alanine is shown in black continuous line. The dotted spectra represent titration with different alanine concentrations, while the gray continuous line follows the spectra obtained with the highest alanine concentration (50 mM). **(B)** In black continuous line ScAlt2 without alanine, dotted spectra represent each one of the various alanine concentrations used for the titration, the gray continuous line follows the spectra obtained with the highest alanine concentration (50 mM). **(C)** Alanine ScAlt1 dissociation constant $K_D = 1.0 \text{ mM} \pm 0.1$ $R^2 = 0.98$.

was observed, resulting in the formation of a single peak at 330 nm (Figures 5C,D).

ScAlt2 Binding to PLP Is Reversible and Depends on ScAlt2 Structure

Pyridoxal phosphate-dependent enzymes represent about 4% of the enzymes reported by the Enzyme Commission, indicating the versatility of action of this cofactor and the important biological role played by PLP (Percudani and Peracchi, 2003). However, all the chemical reactions in which it participates begin with a transamination in which the amino acid substrate displaces the active site lysine residue from the cofactor of the internal Schiff base, to create a new imino linkage between PLP and the substrate, known as external Schiff base (Toney, 2005); thus, a functional Schiff base must allow the transamination reactions. We thus considered the possibility that lack of ScAlt2 alanine

transaminase activity could be attributed to the irreversible binding between PLP and ScAlt2. To address this possibility, ScAlt1 and ScAlt2 were first saturated with PLP, then excess PLP was washed, and proteins were then denatured by incubating for 2 h with 6 M Gdn/HCl, at room temperature. A UV-visible absorption spectrum was registered for this samples, and as shown in Figure 6B, the maximum absorption peaks of the Schiff base were not observed, as compared to those obtained with the native proteins (Figure 6A). When the proteins were separated from the free PLP, it was found that most of the cofactor was liberated from both ScAlt1 and ScAlt2, i.e., 94 and 85%, respectively (Figure 6C). Spectrum of denatured ScAlt1 and ScAlt2, without PLP and after dialysis, showed no Schiff base signal (Figure 6D). The fact that after denaturation of the proteins PLP was not found bound to either ScAlt1 or ScAlt2 indicates that formation of the Schiff base is reversible and dependent on protein folding.



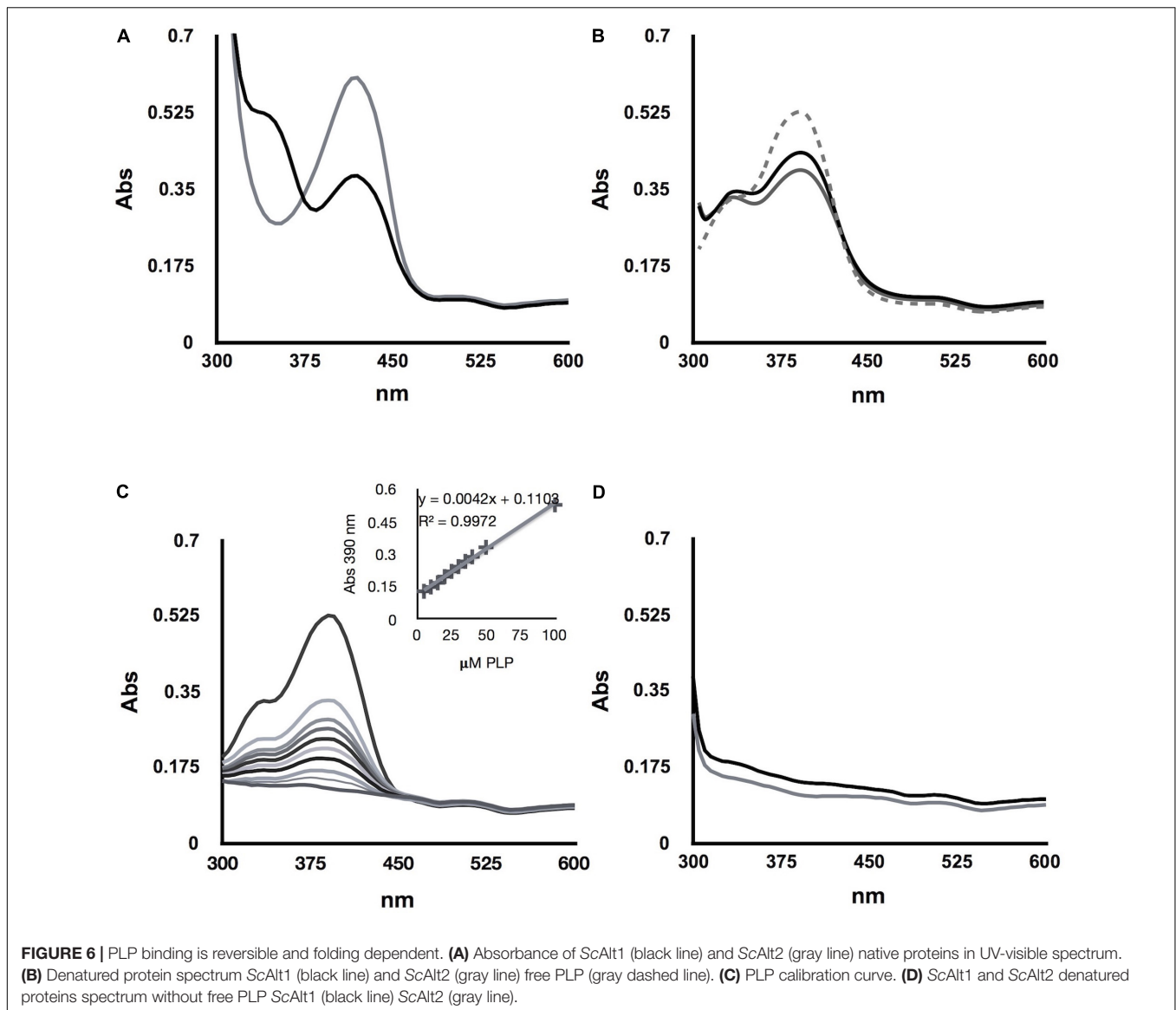
ScAlt1 and ScAlt2 Clades Are Conserved in “Sensu Stricto” *Saccharomyces* Strains Showing a Unique and Differential Topology With KLE and ZT Clades

To analyze the evolutionary history of ScAlt1 and ScAlt2 proteins of *S. cerevisiae*, a phylogenetic tree was constructed with amino acid sequences from representative hemiascomycetes (**Figure 7**). Analysis of the tree revealed three major aspects which should be highlighted: (1) ScAlt1 and ScAlt2 of *S. cerevisiae* were grouped in separate clades with Alt1 and Alt2 of post WGD yeasts. (2) Alts phylogeny supports the hybridization scenarios proposed by Marcet-Houben and Gabaldón (2015), since the Alt1 clade is closer to the parental ZT than to the KLE (**Figure 7**), and it was found grouped with *Saccharomyces sensu stricto* and other yeasts which are not “sensu stricto” but which underwent WGD, such as *Candida nivariensis*, *Candida braccarensis*, *Nakaseomyces delphensis*. Alt2 forms a distinct clade with “sensu stricto” (**Figure 7**), close to the two parental lineages ZT and KLE,

forming an outgroup, and (3) Alt2 is retained in *sensu stricto*, underscoring the relevance of ScAlt2 retention.

DISCUSSION

ScALT2 and ScALT1 genes arose from the combined action of an interspecies hybridization followed by a WGD event (Kellis et al., 2004; Marcet-Houben and Gabaldón, 2015). Although these paralogs have diversified in various ways, both of them have been retained in the yeast *S. cerevisiae* genome for over 100 million years, although it has been observed that the half-life of a duplicated eukaryotic gene is of approximately 4 million years (Lynch and Conery, 2000). ScALT1 encodes an alanine transaminase, which conserved the ancestral capacity to biosynthesize alanine and has specialized its catabolic role, constituting an indispensable enzyme for alanine utilization as sole nitrogen source (Escalera-Fanjul et al., 2017). Conversely, ScAlt2 protein has completely lost its role in alanine metabolism (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Further analysis of ScALT1 and



ScALT2 specialization has shown that transcriptional regulation of these genes has diversified, resulting in opposed expression profiles: in the presence of alanine, *ALT1* expression is induced while that of *ALT2* is repressed (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Additionally, *ScAlt1* and *ScAlt2* sub-cellular localization has also diverged, *ScAlt1* is in the mitochondria, while *ScAlt2* is cytosolic (Peñalosa-Ruiz et al., 2012). Thus, although *ScAlt2* has lost its role in alanine metabolism, its peculiar specialization profile, and the fact that it has been retained in several *Saccharomyces* “*sensu strictu*” genomes suggests it carries out a function that could have been selected due to the acquisition of an evolutionary advantage for these yeasts. To determine the structural modifications that led to *ScAlt2* loss of function as alanine transaminase, we purified and characterized the *ScAlt1* and *ScAlt2* proteins. In the case of the *ScAlt1*, its previously described role as alanine transaminase (Peñalosa-Ruiz et al., 2012) was confirmed, and its kinetic characterization showed that it has the characteristic ping-pong

mechanism displayed by transaminases. It was additionally found that the kinetic parameters of *ScAlt1* are similar to those reported for the orthologous proteins *KlAlt1* and *LkAlt1* (Escalera-Fanjul et al., 2017).

On the other hand, *ScAlt2* structural analysis raised an interesting paradox: it turns out that this protein has retained the catalytic residues that characterize alanine transaminases; however, it does not exhibit this catalytic capacity. In order to find structural differences between *ScAlt1* and *ScAlt2* proteins, models of each one of these proteins were developed and analyzed. Our results show that both proteins display similar structures, indicating that for these proteins, molecular modeling might not allow finding structural modifications that could explain their different enzymatic capacities, which could be due to thermodynamic and kinetic folding variability (Pey et al., 2013).

Since *ScAlt2* lack of activity as alanine transaminase could not be explained using molecular modeling, it was decided to

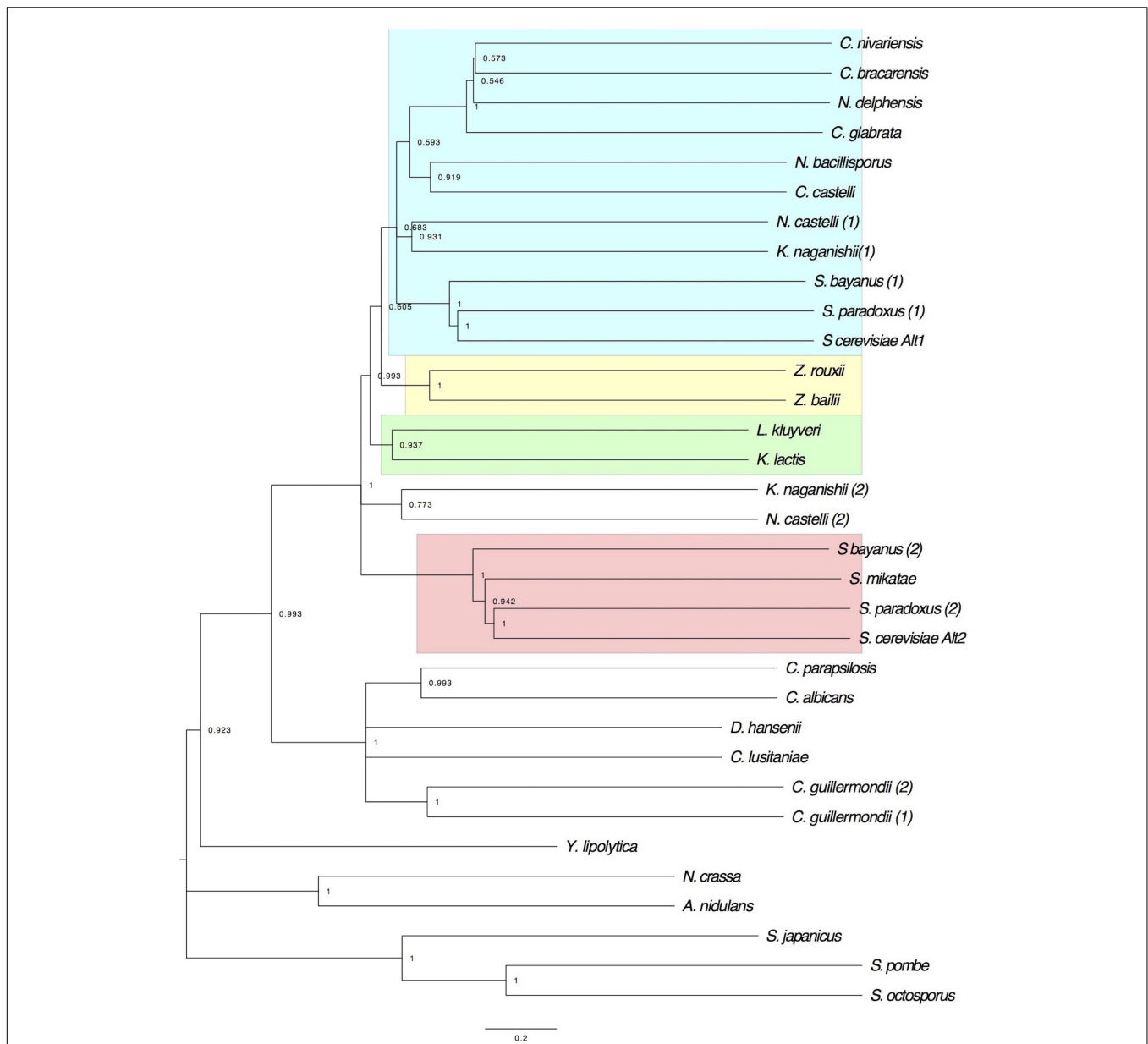


FIGURE 7 | Evolutionary history of Alt proteins: Maximum Likelihood phylogeny of the Alt protein family in yeast. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of Alts. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates), are shown next to the branches. ScAlt1 and ScAlt2 associate in independent clades. The different clusters are depicted in boxes: Alt1 (blue box), Alt2 (red box), KLE (green box), and ZT (yellow box).

perform ScAlt1 and ScAlt2 structural characterization. When analyzing ScAlt1 and ScAlt2 secondary structure by CD, it was found that both proteins had similar secondary structure, ruling out the possibility that ScAlt2 was a destructured protein. In spite of this, fluorescence and quenching experiments showed that when ScAlt2 was compared with ScAlt1, it showed a higher exposure of the hydrophobic residues to the solvent, indicating that ScAlt2 has a more expanded structure as compared to that of ScAlt1, in agreement with the fact that ScAlt2 is more thermolabile than ScAlt1. When analyzing the quaternary

structure by molecular exclusion chromatography, we found that like most transaminases, both ScAlt1 and ScAlt2 are dimeric enzymes (Eliot and Kirsch, 2004).

To further analyze ScAlt2 capacity to participate in alanine metabolism, and considering that ScAlt1 and ScAlt2 belong to the PLP dependent fold type I proteins, which undergo conformational changes from an open state (enzyme without ligand) to a closed state (enzyme with ligand) (Raboni et al., 2010), we asked whether ScAlt2 was able to bind alanine, following the fluorescence spectra as a measure of conformational

changes. When ScAlt1 was titrated with alanine, we found a decrease in fluorescence at 333 nm and the appearance of a maximum at 389 nm. The decrease in fluorescence at 333 nm could be attributed to the modification of the tertiary structure caused by tryptophan interaction with charged amino acids, while the appearance of the maximum at 389 nm should correspond to the interaction of the indole group of a tryptophan with the PLP aromatic ring (Martínez del Pozo et al., 1989). However, in the case of ScAlt2 no change in the intrinsic fluorescence spectrum was observed. It can be thus concluded that there is no conformational change when ScAlt2 is titrated with alanine, indicating that this protein does not bind this amino acid. It is possible that having an expanded structure ScAlt2 distorted its binding site, resulting in the loss of alanine transaminase activity.

It is known that PLP-dependent proteins require that the cofactor binds in the form of a Schiff base (Toney, 2005). Therefore, another possibility that could explain the lack of ScAlt2 transaminase activity could be due to the fact that it is not capable of binding PLP in the form of Schiff base. To analyze this possibility, changes in the absorption spectrum between 300 and 600 nm, were followed, since in this region the different forms of the Schiff base can be observed. Additionally, reduction of the Schiff base with sodium borohydride (NaBH₄) was followed. It was found that both, ScAlt1 and ScAlt2 have PLP attached through a Schiff base, since they show the corresponding absorption maxima, and when adding NaBH₄ the characteristic spectrophotometric modification was observed (Figures 5A–D) (Hughes et al., 1962).

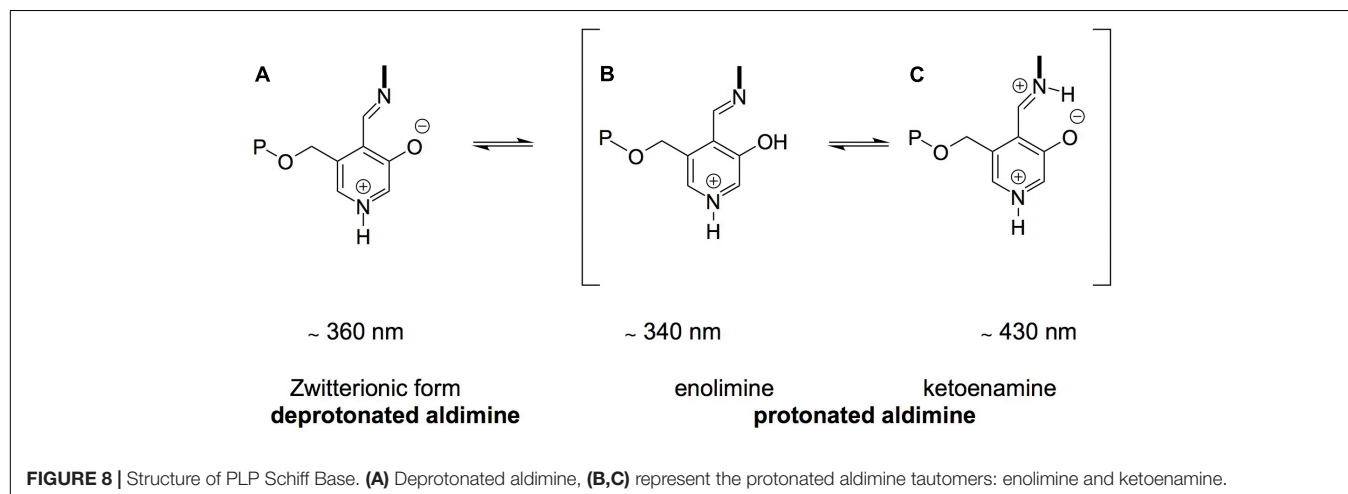
Although ScAlt1 and ScAlt2 bind PLP as a Schiff base, a difference was observed in the tautomeric forms. ScAlt1 presents two maxima in the UV-visible spectra, which represent the protonated Schiff base in its two tautomeric forms, ketoenamine and enolimine, having a more abundant enolimine form (Figure 8). In the case of ScAlt2, the Schiff base only appears in the ketoenimine form. It is known that the formation of the enolimine tautomer is favored in non-polar environments, while in polar environments the formation of ketoenimine tautomer is preferred (Hidalgo et al., 1994).

A difference in the surrounding environment of PLP could explain why ScAlt2 does not have alanine transaminase activity, according to the stereoelectronic theory posed by Dunathan (1971). A specific geometry is necessary for enzyme catalysis that places or orientates the bond to be broken perpendicular to the plane of the π system (Dunathan, 1971). Therefore, a change in PLP immediate environment causes a modification in the specific geometry that inhibits the reaction. An example of this phenomenon is the case of the β_2 subunit of tryptophan synthase, which has the ketoenamine form as an active tautomer. When the temperature is raised, the formation of the enolimine tautomer is favored and the catalytic activity is lost (Ahmed et al., 1996).

The theory of electronic modulation through protonation considers that PLP-dependent enzymes are able to optimize specific reactions by modulating PLP electronic states, through changes in the active site environment. It has been shown that by disturbing the hydrogen bond network that interacts with PLP the catalysis of the enzyme is affected (Dajnowicz et al., 2017). In the case of ScAlt2, it was shown that the solvent has higher access to tryptophan, which led us to propose that the solvent has greater access to the active site. It is known that hydrogen bonds between residues and solvent are favored instead of the formation of hydrogen bonds between residues (Fleming and Rose, 2005); therefore, it is possible that the hydrogen bond network surrounding the ScAlt2 catalytic site is modified resulting in lack of alanine transaminase activity.

To determine whether PLP binding to ScAlt2 was reversible and dependent on folding, ScAlt1 and ScAlt2 purified samples which carry the tightly bound PLP, were denatured with Gdn/HCl and free PLP was quantified. For both proteins, we found that most of the PLP was released by denaturing the protein, indicating that PLP binding is fold-dependent, and that as previously shown, the preservation of the cofactor binding domain is required (Denessiouk et al., 1999).

The obligated common step in reactions catalyzed by PLP-dependent enzymes is transamination, in which the lysine that binds PLP is released, and PLP forms a new imino bond with the substrate, generating the external Schiff base (Toney, 2005). Therefore, a catalytically competent Schiff base must display



reversibility. As previously mentioned, when ScAlt1 and ScAlt2 were denatured, both proteins released the PLP. We can thus conclude that cofactor binding in both enzymes is reversible, allowing the possibility that ScAlt2 could have a PLP-dependent catalytic activity.

Finally, the evolutionary history of ScAlt1 and ScAlt2 proteins was analyzed, finding that they are grouped into different clades and their affiliation with ZT and KLE is also different, as was previously observed (Escalera-Fanjul et al., 2017). In the case of ScAlt1, it has a close relationship with ZT, while ScAlt2 is positioned in the tree as an outgroup of ZT and KLE, constituting a clade with “*sensu strictu*” yeasts. *Saccharomyces “sensu strictu”* is a species complex that includes most of the yeast strains displaying fermentative and respiratory lifestyles. The difference in the relationship between ZT and KLE, according to Marcet-Houben and Gabaldón (2015), is a reflection of their similarity with the parental clades. It can be considered that the ScAlt1 clade, has retained a greater similarity with ZT, while the ScAlt2 clade retained characteristics of both ZT and KLE constituting a hybrid protein. It will be necessary to study the orthologous genes found in species related to ZT and KLE in order to learn more about ScAlt2 physiological role.

Although dependent PLP enzymes can only be organized in around six different folding types and have been studied for decades; determining their function by exclusively using the homology criterion is complicated since the mechanical characteristics of the PLP catalysis can facilitate either convergent or divergent evolution. In the first case, the appearance of enzymes with identical or very similar activities along independent lineages could be observed. In the second case, divergent evolution, from the same common ancestor can lead to the acquisition of very different activities (Christen and Mehta, 2001). It is therefore very likely that ScAlt2 has diverged through the modification of its interaction with PLP, which affected its specificity and even the type of reaction it can perform. To determine its function, it will be necessary to explore different substrates and analyze its crystallographic structure.

CONCLUSION

ScAlt1 and ScAlt2 proteins have a similar structure; however, ScAlt2 has a more expanded conformation as compared to that of ScAlt1, resulting in a different mode of interaction with PLP, which could result in lack of alanine transaminase activity. The fact that ScAlt2 forms a catalytically competent Schiff base, and the selective retention of the Alt2 clade along the “*sensu strictu*” yeasts for more than 100 million years in addition to

the evolutionary patterns observed for PLP-dependent enzymes, make us propose the possibility that Alt2 proteins have a yet undescribed function.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG designed the experiments, wrote the MS, obtained yeasts, contributed reagents and materials. ER-O conceived, designed, performed the experiments, and wrote the MS. BA-L performed and designed the experiments. HR-V designed the experiments and contributed to MS. MG-A performed and designed the experiments. JC-B and JP designed the experiments.

FUNDING

This study was performed in partial fulfillment of the requirements for ER-O Ph.D. degree in Biochemical Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México, which was carried with a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología doctoral fellowship. This project was supported by Dirección de Asuntos del Personal Académico (Grant Nos. IN201015 and IN204018) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant No. CB-2014-239492-B).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Marietta Tuena de Gómez and Dr. Rosario Muñoz Clares, for illuminating discussions during the course of this work. Elizabeth Nallely Cabrera González, Hugo Anibal Santamaria Suárez, and Francisco Pérez Eugenio for technical support. Rocio Romualdo Martínez for helpful secretarial assistance. L. Ongay, G. Codiz, and M. Mora [Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)] for DNA sequencing and oligonucleotide synthesis. To Jose Gallegos Montalvo, for his unconditional support during the development of this work. This paper is dedicated to Armando Gómez-Puyou as a tribute to his lifetime generous dedication to science and teaching.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00944/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ahmed, S. A., McPhie, P., and Miles, E. W. (1996). A thermally induced reversible conformational transition of the tryptophan synthase subunit probed by the spectroscopic properties of pyridoxal phosphate and by enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* 271, 8612–8617. doi: 10.1074/jbc.271.15.8612
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- Avenidaño, A., Deluna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and Gonzalez, A. (1997). GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 5594–5597. doi: 10.1128/jb.179.17.5594-5597.1997
- Bergmeyer, H.-U. (2012). *Methods of Enzymatic analysis*. New York City, NY: Elsevier.
- Binter, A., Oberdorfer, G., Hofzumahaus, S., Nerstheimer, S., Altenbacher, G., Gruber, K., et al. (2011). Characterization of the PLP-dependent aminotransferase NikK from *Streptomyces tendae* and its putative role in

- nikkomycin biosynthesis. *FEBS J.* 278, 4122–4135. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08319.x
- Christen, P., and Mehta, P. K. (2001). From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.* 1, 436–447. doi: 10.1002/tr.10005
- Colón, M., Hernández, F., López, K., Quezada, H., González, J., López, G., et al. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS ONE* 6:e16099. doi: 10.1371/journal.pone.0016099
- Dajnowicz, S., Parks, J. M., Hu, X., Gesler, K., Kovalevsky, A. Y., and Mueser, T. C. (2017). Direct evidence that an extended hydrogen-bonding network influences activation of pyridoxal 5'-phosphate in aspartate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 292, 5970–5980. doi: 10.1074/jbc.M116.774588
- DeLuna, A., Avendano, A., Riego, L., and Gonzalez, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276, 43775–43783. doi: 10.1074/jbc.M107986200
- Denessiouk, K. A., Denesyuk, A. I., Lehtonen, J. V., Korpela, T., and Johnson, M. S. (1999). Common structural elements in the architecture of the cofactor-binding domains in unrelated families of pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Proteins* 35, 250–261. doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(19990501)35:2<250::AID-PROT10>3.0.CO;2-X
- Duff, S. M., Rydel, T. J., McClarren, A. L., Zhang, W., Li, J. Y., Sturman, E. J., et al. (2012). The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 528, 90–101. doi: 10.1016/j.abb.2012.06.006
- Dunathan, H. C. (1971). Stereochemical aspects of pyridoxal phosphate catalysis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 35, 79–134. doi: 10.1002/9780470122808.ch3
- Eftink, M. R., and Ghiron, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 15, 672–680. doi: 10.1021/bi00648a035
- Eliot, A. C., and Kirsch, J. F. (2004). Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 383–415. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021
- Escalera-Fanjul, X., Campero-Basaldúa, C., Colón, M., González, J., Márquez, D., and González, A. (2017). Evolutionary diversification of alanine transaminases in yeast: catabolic specialization and biosynthetic redundancy. *Front. Microbiol.* 8:1150. doi: 10.3389/fmicb.2017.01150
- Fleming, P. J., and Rose, G. D. (2005). Do all backbone polar groups in proteins form hydrogen bonds? *Protein Sci.* 14, 1911–1917. doi: 10.1110/ps.051454805
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., and Postlethwait, J. (1998). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- Froimowitz, M. (1993). HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques* 14, 1010–1013.
- García-Campusano, F., Anaya, V.-H., Robledo-Arratia, L., Quezada, H., Hernández, H., Riego, L., et al. (2009). ALT1-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 55, 368–374. doi: 10.1139/w08-150
- González, J., López, G., Argueta, S., Escalera-Fanjul, X., El Hafidi, M., Campero-Basaldúa, C., et al. (2017). Diversification of transcriptional regulation determines subfunctionalization of paralogous branched chain aminotransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 207, 975–991. doi: 10.1534/genetics.117.300290
- Gu, Z., Steinmetz, L. M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R. W., and Li, W.-H. (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421, 63–66. doi: 10.1038/nature01198
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1229–1235. doi: 10.1093/molbev/mst012
- Hidalgo, C., Sevilla, J. M., Pineda, T., and Blazquez, M. (1994). Enolimine and geminaldiamine forms in the reaction of pyridoxal phosphate with ethylenediamine. An electrochemical and spectroscopic contribution. *J. Phys. Org. Chem.* 7, 227–233. doi: 10.1002/poc.610070503
- Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature* 381:272. doi: 10.1038/381272a0
- Huerta-Cepas, J., Capella-Gutiérrez, S., Pryszcz, L. P., Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2014). PhylomeDB v4: zooming into the plurality of evolutionary histories of a genome. *Nucleic Acids Res.* 42, D897–D902. doi: 10.1093/nar/gkt1177
- Hughes, A. L. (1994). The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 256, 119–124. doi: 10.1098/rspb.1994.0058
- Hughes, R. C., Jenkins, W. T., and Fischer, E. H. (1962). The site of binding of pyridoxal-5'-phosphate to heart glutamic-aspartic transaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1615–1618. doi: 10.1073/pnas.48.9.1615
- 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, 617–624. doi: 10.1038/nature02424
- Leaver-Fay, A., Tyka, M., Lewis, S. M., Lange, O. F., Thompson, J., Jacak, R., et al. (2011). ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol.* 487, 545–574. doi: 10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6
- López, G., Quezada, H., Duhne, M., González, J., Lezama, M., El-Hafidi, M., et al. (2015). Diversification of paralogous α -isopropylmalate synthases by modulation of feedback control and hetero-oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 14, 564–577. doi: 10.1128/EC.00033-15
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lüthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356, 83–85. doi: 10.1038/356083a0
- Lynch, M., and Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155. doi: 10.1126/science.290.5494.1151
- 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:e1002220. doi: 10.1371/journal.pbio.1002220
- Martínez del Pozo, A., Merola, M., Ueno, H., Manning, J. M., Tanizawa, K., Nishimura, K., et al. (1989). Activity and spectroscopic properties of bacterial D-amino acid transaminase after multiple site-directed mutagenesis of a single tryptophan residue. *Biochemistry* 28, 510–516. doi: 10.1021/bi00428a015
- Merhej, J., Delaveau, T., Guitard, J., Palancade, B., Hennequin, C., Garcia, M., et al. (2015). Yap7 is a transcriptional repressor of nitric oxide oxidase in yeasts, which arose from neofunctionalization after whole genome duplication. *Mol. Microbiol.* 96, 951–972. doi: 10.1111/mmi.12983
- Peñalosa-Ruiz, G., Aranda, C., Ongay-Larios, L., Colón, 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:e45702. doi: 10.1371/journal.pone.0045702
- Penefsky, H. S. (1979). A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. *Methods Enzymol.* 56, 527–530. doi: 10.1016/0076-6879(79)56050-9
- Perucchini, R., and Peracchi, A. (2003). A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* 4, 850–854. doi: 10.1038/sj.embor.embor914
- Pey, A. L., Albert, A., and Salido, E. (2013). Protein homeostasis defects of alanine-glyoxylate aminotransferase: new therapeutic strategies in primary hyperoxaluria type I. *Biomed Res. Int.* 2013:687658. doi: 10.1155/2013/687658
- Quezada, H., Aranda, C., DeLuna, A., Hernández, H., Calcagno, M. L., Marín-Hernández, 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
- Raboni, S., Spyraakis, F., Campanini, B., Amadasi, A., Bettati, S., Peracchi, A., et al. (2010). “7.10 - pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes: catalysis, conformation, and genomics,” in *Comprehensive Natural Products II*, eds L. Mander and H.-W. Liu (Oxford: Elsevier), 273–350. doi: 10.1016/B978-008045382-8.00140-4
- Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J., and Schweigert, F. J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 705–713. doi: 10.1002/mnfr.200600013
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., and Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase

- cultures induced at low temperature. *Springerplus* 2:89. doi: 10.1186/2193-1801-2-89
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Soberón, M., Olamendi, J., Rodríguez, L., and González, A. (1989). Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2693–2697. doi: 10.1099/00221287-135-10-2693
- Toney, M. D. (2005). Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 279–287. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.037
- Webb, B., and Sali, A. (2017). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* 1654, 39–54. doi: 10.1007/978-1-4939-7231-9_4

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer EL-R and handling Editor declared their shared affiliation.

Copyright © 2018 Rojas-Ortega, Aguirre-López, Reyes-Vivas, González-Andrade, Campero-Basaldúa, Pardo and González. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.