



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

RELEVANCIA DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN LA
SUBFUNCIONALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PARÁLOGAS Leu4 Y Leu9 DE
Saccharomyces cerevisiae

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Jaqueline Hersch González

TUTOR PRINCIPAL: Dra. Maria Alicia González Manjarrez
Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular.
UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez. Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Luis Servín González. Instituto de investigaciones Biomédicas. UNAM

Ciudad de México. Diciembre, 2019



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

Esta tesis se elaboró para cumplir con los requerimientos y obtener el grado de Maestra en Ciencias del programa de “Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas” de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la Dra. María Alicia González Manjarrez, en el laboratorio 301-Oriente en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

El comité tutor que asesoró el desarrollo de este proyecto fue conformado por:

Dra. María Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Luis Servín González	Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo CB-2014-239492-B y por la Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No IN204018. Durante el desarrollo de este proyecto se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de becario: 630774. Se reconoce la ayuda del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir y presentar los avances de este trabajo en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

Se reconocen la dedicación y aportes del Dr. Juan Pablo Pardo y el Dr. Luis Servín González que, con su tiempo, paciencia y experiencia, ayudaron a mejorar y hacer crecer este proyecto en cada reunión del comité tutor.

Se reconoce la ayuda y apoyo técnico de la Q.F.B. Beatriz Aguirre López, la M. en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez, la Dra. Martha Calahorra Fuentes y el Dr. Fernando Suaste Olmos en el desarrollo de este trabajo.

Se reconoce la invaluable ayuda, disposición y apoyo secretarial de María del Rocío Romualdo Martínez, del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se utilizaron los servicios de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, y se reconoce la amable ayuda, asesoría, disposición y atención de la Dra. Ruth Rincón Heredia y del Dr. Abraham Rosas Arellano.

Se reconoce a la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta por los servicios de secuenciación, síntesis de oligonucleótidos y la disposición de los equipos de la Unidad de Biología Molecular del instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce al Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder, del Instituto Nacional de Cardiología, por el análisis de concentración de metabolitos intracelulares del del cual surgen datos importantes que enriquecen y complementan este trabajo.

Se reconoce el ejemplar trabajo de Cristina Jardínez Godínez por siempre poner a nuestra disposición lo indispensable para trabajar en el laboratorio.

Se reconoce a los integrantes de la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo y atención brindados, en especial al asistente de procesos Julio Ignacio Palacios Ordoñez por la excelente disposición, atención y paciencia para todos los trámites realizados.

Se reconoce al Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides, personal del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular, por conservar en buen estado todo el equipo del laboratorio, el cual se utilizó para el desarrollo de este trabajo.

Se reconoce a la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por el mantenimiento de la red inalámbrica y los equipos del instituto.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

A tí, querido lector.

ÍNDICE

Resumen	8
Abstract	9
Lista de abreviaturas	10
Lista de figuras y tablas	12
1. Introducción	14
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.1.2. Genoma de <i>S. cerevisiae</i>	15
1.1.3. Metabolismo de la levadura.....	16
1.2. Duplicación de genes y evolución.....	17
2. Antecedentes	19
2.1. Leu4 y Leu9.....	19
2.2. α -Isoropil malato como corregulador.....	20
2.3. Mutantes de Leu4 o Leu9.....	20
2.2.1. Expresión de genes.....	22
3. Planteamiento del problema	24
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos particulares.....	25
5. Materiales y métodos	26
5.1. Lista de cepas y plásmidos.....	26
5.2. Elección de secuencia de translocación mitocondrial.....	27
5.3. Modelado de proteínas.....	27
5.4. Construcción de cepas.....	28
5.5. Observación de cepas al microscopio.....	29
5.6. Cinéticas de crecimiento.....	29
5.7. Extracción de metabolitos intracelulares.....	30
6. Resultados y discusión	31
6.1. Modelado y localización de secuencia de translocación mitocondrial.....	31
6.2. Cepas con proteínas citosólicas.....	32
6.2.1. Microscopía.....	32
6.2.2. Cinéticas de crecimiento.....	33
6.2.2.1. Glucosa como fuente de carbono.....	34
6.2.2.2. Etanol como fuente de	

carbono.....	36
6.2.2.3. Comparación entre glucosa y etanol.....	39
6.2.3. Acumulación de leucina.....	40
6.3. Formación de dímeros en cepas con proteínas citosólicas	41
7. Conclusiones	43
8. Perspectivas	44
9. Anexos	45
10. Apéndices	53

RESUMEN

La duplicación génica se ha propuesto como una ventaja adaptativa para *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la retención de genes duplicados ha dado como resultado el desarrollo de un metabolismo facultativo y la capacidad de metabolizar tanto glucosa como etanol como fuentes de carbono. Después de la aloploidización este organismo conservó muchos pares de genes duplicados. *LEU4* y *LEU9* son un par de genes parálogos que codifican para las isoenzimas α -isopropil malato sintasas que llevan a cabo el primer paso de biosíntesis de leucina. Estas enzimas se encuentran en la mitocondria, pueden organizarse como homo o heterodímeros (Leu4-Leu4, Leu9-Leu9 o Leu4-Leu9) y se regulan negativamente en presencia de distintas concentraciones de leucina. El objetivo principal de este trabajo es constatar la importancia de la localización subcelular así como su impacto en la fisiología de la levadura. Para estudiar los efectos fisiológicos de esta compartimentación se construyeron cepas con distintas combinaciones de localización mitocondrial y citosólica de Leu4 y Leu9 en presencia o ausencia de su paróloga. Se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento y en la acumulación de leucina intracelular de las cepas tanto en glucosa como el etanol como fuentes de carbono. Se concluye que la localización de estas enzimas en la mitocondria tiene un papel importante en la fisiología de la levadura y se proponen una serie de experimentos para entender de manera más detallada la importancia de su ubicación intracelular.

ABSTRACT

Gene duplication has been proposed as an adaptive advantage for *Saccharomyces cerevisiae* since selective retention of duplicated genes has resulted in the development of a facultative metabolism and the acquisition of the capacity to metabolize both glucose and ethanol as carbon sources. This organism has retained several duplicated genes that were generated after an allopolyploidization event. *Saccharomyces cerevisiae* has two α -isopropylmalate synthases codified by *LEU4* and *LEU9* paralogous genes that carry out the first reaction of leucine's biosynthesis pathway. Both enzymes are found in mitochondria and can be organized as Leu4-Leu9 heterodimers, or Leu4-Leu4 and Leu9-Leu9 homodimers. The three dimers are differentially regulated by a leucine negative feedback mechanism: Leu9-Leu9 homodimer is highly resistant to leucine inhibition, Leu4-Leu4 homodimer is hypersensitive, while the heterodimer displays an intermediate sensitivity. The main purpose of this work is to study the effects of compartmentalization on Leu4 and Leu9 on this yeast's physiology. For this purpose, we constructed different combination strains with mitochondrial or cytosolic Leu4 or Leu9 with or without the presence of its paralogous protein. These strains showed differences in their growth and intracellular leucine accumulation, in both glucose or ethanol as carbon sources. We conclude that the mitochondrial localization of these enzymes is important regarding yeast's physiology and propose several experiments that will lead to a better understanding of these enzymes' subcellular localization relevance.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATG	Codón de inicio de traducción, codifica para el aminoácido metionina
Δ-IPM	Δ -isopropil malato
Δ-IPMS	Δ -isopropil malato sintasa
Δ-KIV	Δ -ceto isovalerato
BAT1	Gen que codifica para la proteína Bat1
pb	Pares de bases
cit	Citosólica
CoA	Coenzima A
DO	Densidad óptica
Δ	Símbolo que refiere una delección
GDH1	Gen que codifica para la proteína Gdh1
hphMX6	Gen que codifica para la proteína de resistencia a higromicina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IC₅₀	Índice de concentración media inhibitoria
ILV2	Gen que codifica para la proteína Ilv2
ILV5	Gen que codifica para la proteína Ilv5
kanMX4	Gen que codifica para la proteína de resistencia a geneticina
L4 L9	Cepa <i>LEU4LEU9</i>
I4Δ L9	Cepa <i>leu4ΔLEU9</i>
L4 I9Δ	Cepa <i>LEU4leu9Δ</i>
I4Δ I9Δ	Cepa <i>leu4Δleu9Δ</i>
L4-c L9	Cepa <i>LEU4citLEU9</i>
L4 L9-c	Cepa <i>LEU4LEU9cit</i>
I4Δ L9-c	Cepa <i>leu4ΔLEU9cit</i>
L4-c I9Δ	Cepa <i>LEU4citΔleu9Δ</i>
LEU1	Gen que codifica para la proteína Leu1
LEU2	Gen que codifica para la proteína Leu2
LEU4	Gen que codifica para la proteína Leu4
LEU9	Gen que codifica para la proteína Leu9
LEUA	Gen que codifica para la proteína LeuA
min	Minutos
MM	Medio mínimo
MTS	Secuencia de translocación mitocondrial (del inglés <i>Mitochondrial Targeting Signal</i>)
μ	Velocidad de crecimiento

ORF	Marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de datos de proteínas (del inglés <i>Protein Data Bank</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i> (del inglés <i>Saccharomyces Genome Database</i>)
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
<i>URA1</i>	Gen que codifica para la proteína Ura1
<i>URA3</i>	Gen que codifica para la proteína Ura3
UTR	Región no traducida de un gen (del inglés <i>UnTranslated Region</i>)
WGD	Duplicación completa del genoma (del inglés <i>Whole Genome Duplication</i>)
WT	Tipo silvestre (del inglés <i>Wild Type</i>)
YPAD	Medio rico con adenina (del inglés <i>Yeast Peptone Adenine Dextrose</i>)
YPD	Medio rico (del inglés <i>Yeast Peptone Dextrose</i>)
~	Símbolo que se refiere a una aproximación
::	Símbolo que se refiere a una inserción

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Gráfica de crecimiento diáuxico de la levadura.

Figura 2. Posibles destinos de un par de genes después de la duplicación.

Figura 3. Compartimentación y ruta de metabolitos y enzimas relacionados con la síntesis de α -IPM y leucina.

Figura 4. Localización de Leu4 y Leu9.

Figura 5. Comparación de concentración intracelular de leucina de las cepas *LEU4LEU9*, *leu4 Δ LEU9*, *LEU4leu9 Δ* y *leu4 Δ LEU9* complementada con el plásmido pRS416-*LEU4*.

Figura 6. Curvas de crecimiento de las cepas en glucosa o etanol como fuente de carbono.

Figura 7. Análisis de expresión en glucosa y etanol de los genes *LEU4* y *LEU9* por Northern Blot.

Figura 8. Predicción de estructura de las proteínas Leu4 y Leu9.

Figura 9. Localización citosólica de las proteínas Leu4 y Leu9 marcadas con la proteína fluorescente yECitrine.

Figura 10. Curva de crecimiento de cepas con la proteína yECitrine fusionada a Leu4 o Leu9.

Figura 11. Curvas de crecimiento en medio mínimo-glucosa de las cepas con α -IPMS citosólicas.

Figura 12. Curvas de crecimiento en medio mínimo-glucosa con leucina de las cepas con α -IPMS citosólicas.

Figura 13. Curvas de crecimiento en medio mínimo-etanol de las cepas con α -IPMS citosólicas.

Figura 14. Curvas de crecimiento en medio mínimo-etanol con leucina de las cepas con Δ -IPMS citosólicas.

Figura 15. Comparación de curvas de crecimiento de las mutantes con proteínas citosólicas en glucosa o etanol como fuente de carbono.

Figura 16. Concentración intracelular de leucina.

Figura 17. Alineamiento de los primeros 300 aminoácidos de la secuencia primaria de las proteínas Leu4 y Leu9.

Figura 18. Mapa del plásmido pBS4.

Figura 19. Esquema de posicionamiento de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los módulos con los que se generaron las cepas con proteínas citosólicas.

Figura 20. Localización de oligonucleótidos de comprobación sobre los genes *LEU4* y *LEU9*.

Figura 21. Gel de productos de la PCR de comprobación.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Tabla 3. Densidad óptica a las que se les extrajeron metabolitos intracelulares.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido un organismo de gran importancia para el ser humano a nivel cultural, económico y científico. Este hongo unicelular está clasificado en el Phylum Ascomycota dentro del reino Fungi. Su reproducción puede ser de manera sexual, formando cuatro ascosporas a partir de células diploides, o asexual, por medio de gemación cuando las células son haploides (Duina *et al.*, 2014).

El primero en observar este organismo unicelular fue Leeuwenhoek en 1680 al mirar preparaciones de gotas de cerveza con uno de sus microscopios. Posteriormente, en 1789, Antoine Lavoisier realizó los primeros experimentos en relación a los cambios químicos que ocurren durante la fermentación del vino, en los que se transforma azúcar en alcohol y CO₂. Finalmente, después de pasar por varios nombres que clasificaban a las levaduras dependiendo de la bebida alcohólica de la que se aislaron, en 1838 el biólogo alemán Franz Meyen le dió el nombre que utilizamos hasta la fecha: *Saccharomyces cerevisiae* (Compagno *et al.*, 2014; Money, 2018).

En la historia de la levadura como modelo de estudio es relevante mencionar a Eduard Buchner, ganador de un premio Nobel. En 1897 él logró demostrar que la fermentación se producía por moléculas dentro de las células de *S. cerevisiae* y no se necesitaba que la levadura estuviera viva para llevar a cabo esta reacción a partir de azúcar. La demostración la hizo al romper las levaduras y extraer su contenido para después mezclarlo con azúcar, pudiendo observar que se llevaba a cabo un proceso de fermentación (Gomez-Puyou, 2019).

Los primeros experimentos de genética en la levadura se realizaron en la década de 1930, cuando el biólogo danés Øjvind Winge demostró la existencia de células haploides y diploides. Simultáneamente Carl Lindegren realizó las primeras cruces con las células haploides de la levadura. La cepa S288C, la más utilizada para estudiar a este organismo, la construyó el biólogo estadounidense Robert Mortimer a partir de la cepa EM93 aislada por Emil Mraek, uno de sus colegas (Mortimer *et al.*, 1986; Roman, 1986; Duina *et al.*, 2014). Finalmente, uno de los experimentos más importantes lo realizaron Albert Hinnen y Gerald Fink en 1978, quienes describen la primera transformación exitosa de *Saccharomyces cerevisiae* al introducir un plásmido con el gen *LEU2* en una cepa *leu2*⁻ (Hinnen *et al.*, 1978).

1.1.1. Genoma de la levadura

El primer genoma secuenciado de un organismo eucarionte fue el de *Saccharomyces cerevisiae* en 1996. A partir de su secuenciación se conoció que el genoma de una célula haploide está constituido por ~12,000 kb organizadas en 16 cromosomas y que estos tienen una gran cantidad de bloques de genes duplicados. También se reportó que el genoma tiene ~6,000 genes de los cuales aproximadamente el 73% no son esenciales (Goffeau, 1996; Kellis *et al.*, 2004; Yan-Tong *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que la duplicación génica es uno de los mecanismos principales para la evolución de los genes a partir de su relación con sus sustratos y productos. La gran cantidad de genes duplicados en el genoma de *S. cerevisiae* se ha explicado por medio de una teoría de duplicación total de su genoma (WGD), la cual se ha enriquecido con estudios que sugieren dos posibles escenarios en los que sucede un evento de hibridación. Marcet-Houben y Gabaldón (2015) obtuvieron evidencia de esta hibridación mediante diversos estudios filogenómicos y propusieron dos escenarios: el primero sugiere que ocurrió una hibridación de dos organismos haploides que posteriormente dieron origen a la levadura que hoy conocemos, mientras que en el segundo se propone que hibridaron dos organismos haploides que posteriormente sufrieron la duplicación de su genoma.

El proceso de hibridación da origen a un linaje nuevo en el que los genes ortólogos de los dos genomas parentales aparentan ser parálogos debido a su homología y, una vez que se encuentran en el mismo genoma, estos genes son clasificados como homeólogos (Wolfe, 2001; Marcet-Houben *et al.*, 2015).

Con el uso de herramientas de genómica comparativa se pudieron obtener datos para entender mejor la evolución del genoma de *S. cerevisiae* y su metabolismo. Algunos eventos importantes fueron la pérdida del complejo respiratorio I, la transferencia del gen *URA1* de las bacterias, el re-acomodo del metabolismo de carbono y que aproximadamente el 20% de los genes son indispensables para el crecimiento de la levadura en medio rico (Hagman *et al.*, 2013; Ortiz-Merino, 2013; Dashko *et al.*, 2014; Escalera-Fanjul *et al.*, 2019; Winzeler *et al.*, 1999).

1.1.2. Metabolismo de la levadura

La duplicación de genes tuvo como consecuencia que *S. cerevisiae* tenga la habilidad de fermentar azúcares aún en presencia de oxígeno, obteniendo como producto final etanol, el cual puede fungir como fuente de energía cuando en el medio se agota su fuente de carbono principal (Wolfe *et al.*, 1997; Piskur *et al.*, 2006). En la naturaleza la producción de alcohol es poco común, aparte de ser producida por las levaduras, únicamente se produce por semillas en germinación y por algunas bacterias (Money, 2018).

Saccharomyces cerevisiae tiene preferencia por fermentar glucosa a etanol mientras haya altas concentraciones de ésta, lo que se conoce como efecto Crabtree. Existen tres grupos de levaduras clasificadas como Crabtree positivos: *S. cerevisiae* y *Dekkera bruxellensis*, que pueden catabolizar de manera eficiente el etanol, y *Schizosaccharomyces pombe* que lo hace de manera muy pobre (Hagman *et al.*, 2013). Por esta razón, la levadura lleva a cabo la estrategia de “make-accumulate-consume” en la que presenta un crecimiento diáuxico (figura 1). Durante la fermentación, la energía para crecer la proveen la glicólisis y la fermentación, mas no la respiración. Esta estrategia reduce la producción de biomasa, pero le confiere una herramienta de competencia contra otros microorganismos: el etanol (Compagno *et al.*, 2014).

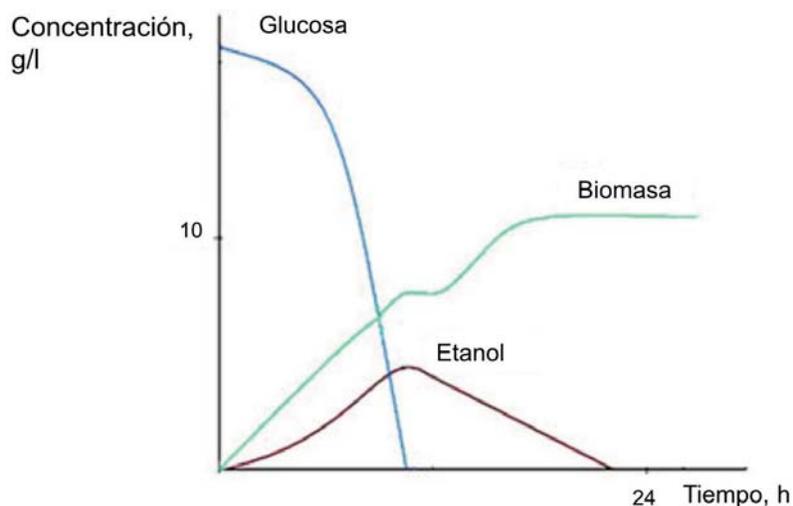


Figura 1. Crecimiento diáuxico de la levadura (Modificado a partir de Compagno *et al.*, 2014).

Durante el crecimiento anaeróbico de *S. cerevisiae* el ciclo de Krebs, en lugar de funcionar como un ciclo, funciona como dos ramificaciones, lo que hace que no haya

conexión del 2-oxoglutarato al fumarato. Esta característica es esencial para que la levadura pueda crecer en glucosa, ya que esta ruptura del ciclo es la única manera de tener Acetil-CoA en el citosol (van den Berg *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1997).

1.2. Duplicación de genes y evolución

En la década de 1970 Susumu Ohno propuso que la duplicación de genes es uno de los principales mecanismos de innovación y evolución de genes. Posteriormente, en 2006, se comenzó a tener evidencia de genes que no provenían de genes previos, los llamados genes *de novo* (Levy, 2019).

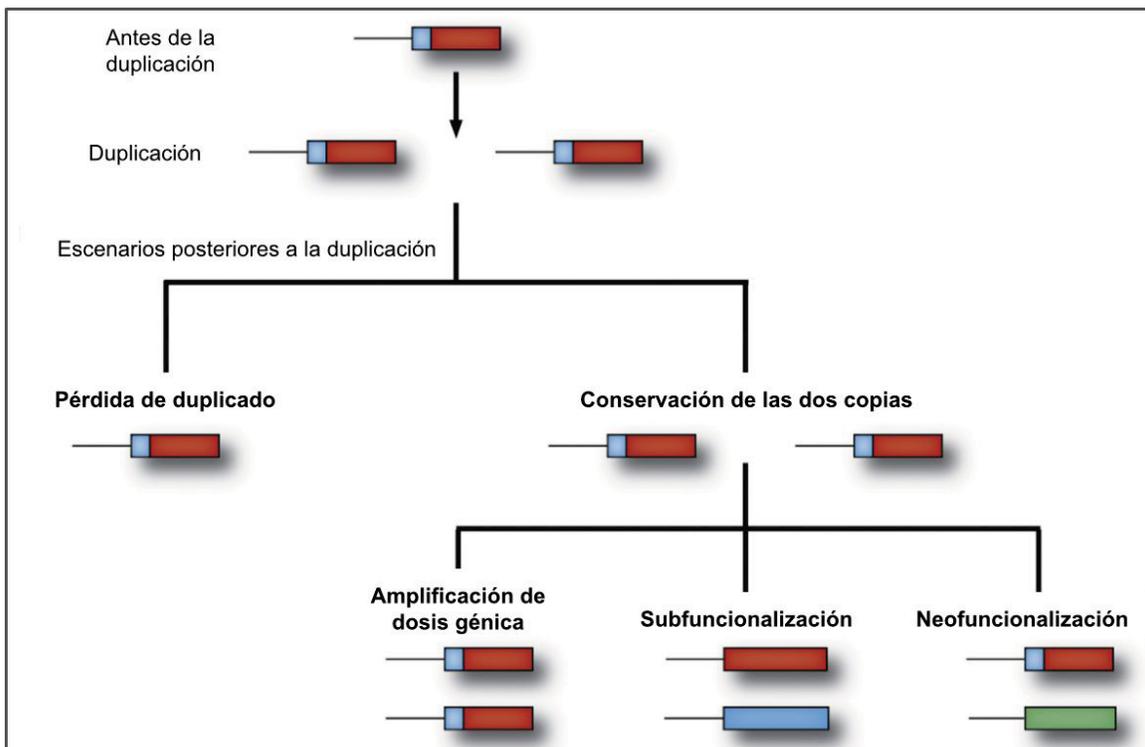


Figura 2. Posibles destinos de un par de genes después de la duplicación (Modificada a partir de Voordeckers *et al.*, 2015).

Los genes duplicados se pueden modificar por diferentes fuerzas evolutivas dando como resultado que se pierda alguna de las copias o que se fije para quedar ambas disponibles en el genoma (Wolfe *et al.*, 1997; Voordeckers *et al.*, 2015). Factores como la conversión génica, la mutación y la selección influyen en la tasa de divergencia de la secuencia de un par de genes duplicados. En la evolución funcional de los genes

duplicados el destino más común es la pérdida de la función, pero cuando la función se preserva, lo hace mediante conservación de la misma función (redundancia génica), la neofuncionalización o la subfuncionalización (figura 2) (Zhang, 2003).

2. ANTECEDENTES

2.1. Leu4 y Leu9

Los genes *LEU4* y *LEU9* codifican las dos isoenzimas α -isopropil malato sintasas (α -IPMS) que catalizan el primer paso de la biosíntesis de leucina al utilizar como sustratos α -cetoisovalerato (α -KIV) y Acetil-CoA (figura 3). Estas enzimas parálogas son esenciales para la levadura, ya que la única ruta de síntesis de leucina es a partir del α -isopropil malato (α -IPM) (Chang *et al.*, 1984; Chang *et al.*, 1985; Casalone *et al.*, 2000).

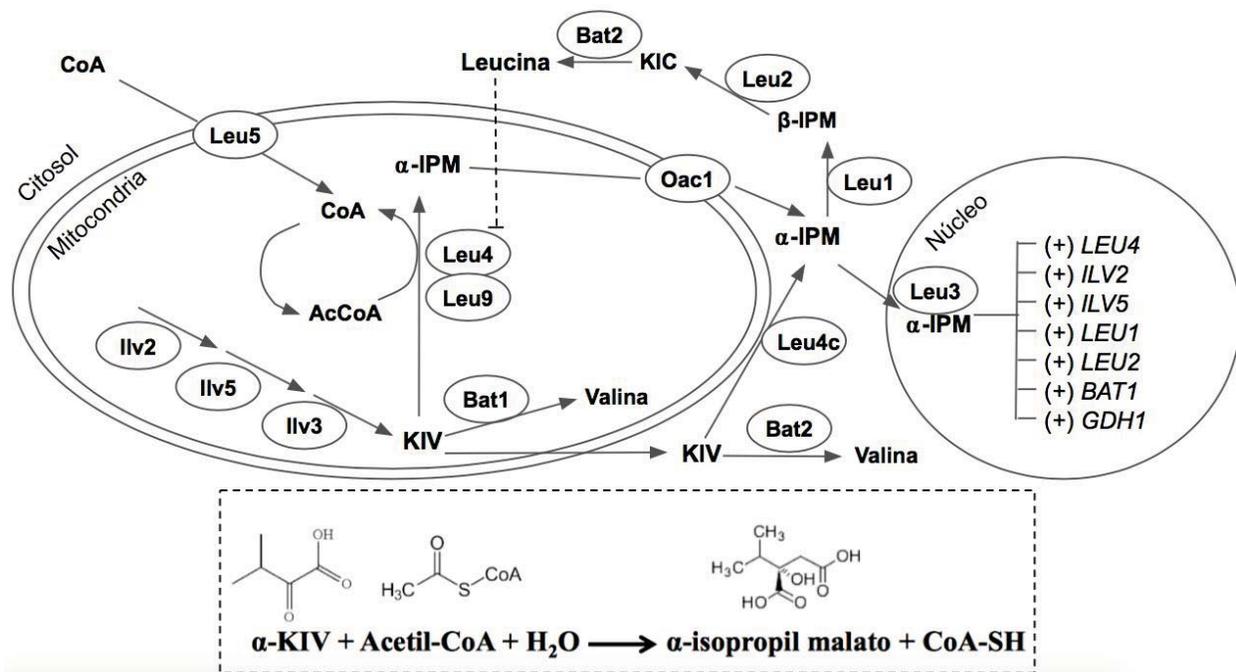


Figura 3. Compartimentación de la ruta de metabolitos y enzimas relacionados con la síntesis de α -IPM y leucina.

Las proteínas Leu4 y Leu9 tienen una identidad de 82.7% y se encuentran localizadas en las mitocondrias (figura 4), aunque se sabe que hay una pequeña proporción de Leu4 en el citosol (Beltzer *et al.*, 1988). Estas proteínas parálogas se organizan como homo o heterodímeros y presentan diferente sensibilidad a la inhibición por leucina. El índice de concentración media de inhibición (IC_{50}) por leucina es distinta para cada dímero: Leu4-Leu4 se inhibe con 0.13 mM; Leu4-Leu9 con 0.51 mM; y Leu9-Leu9 con 1.78 mM de leucina (López *et al.*, 2015).

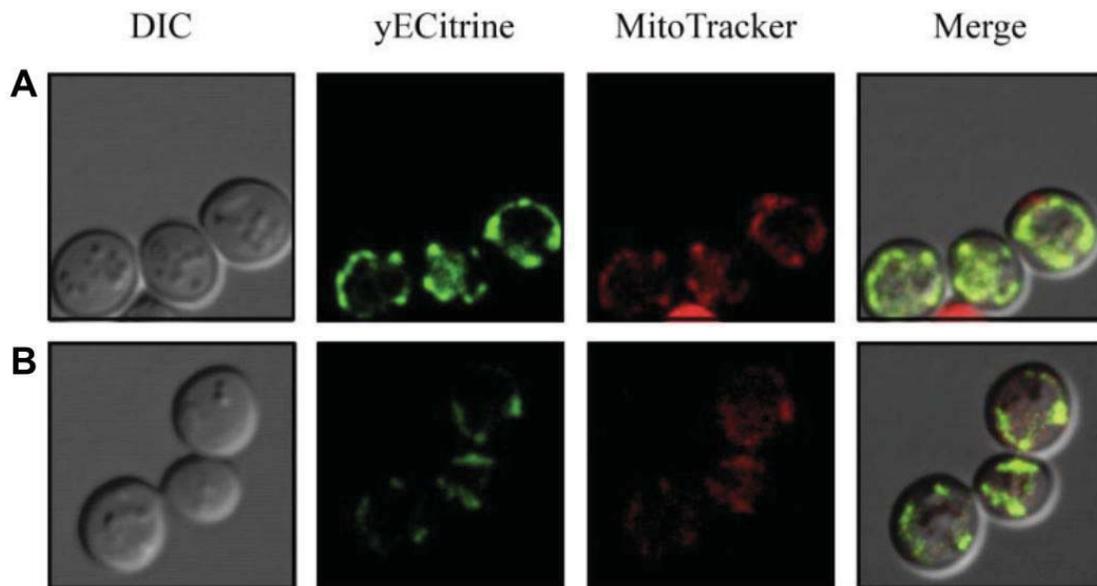


Figura 4. Localización de Leu4 (A) y Leu9 (B). Se fusionó la proteína verde fluorescente (yECitrine) a Leu4 y Leu9. Las mitocondrias se tiñeron con Mitotracker y se observan en rojo. En el último cuadro se observa la colocalización (López *et al.*, 2015).

2.2. α -Isopropil malato como corregulador

El heterodímero contribuye a una mayor versatilidad enzimática asociada a la producción del α -IPM, el cual presenta una función dual: la primera en la biosíntesis de leucina y la segunda asociada a la proteína Leu3 como regulador transcripcional. El complejo Leu3- α IPM activa a los genes *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *GDH1*, mientras que en ausencia de α -IPM, Leu3 los reprime (Kohlhaw, 2003; González *et al.*, 2017).

2.3. Mutantes de Leu4 o Leu9

Las cepas mutantes *leu4* Δ *LEU9*, *LEU4**leu9* Δ y *leu4* Δ *leu9* Δ , se construyeron y caracterizaron por López *et al.* (2015) y se determinó que a diferencia de la cepa silvestre, la mutante *leu4* Δ presenta una poza intracelular de leucina elevada (figura 5), particularmente cuando se cultiva en etanol como fuente de carbono (metabolismo respiratorio) y una velocidad de crecimiento menor que la de la cepa silvestre *LEU4LEU9* (figura 6).

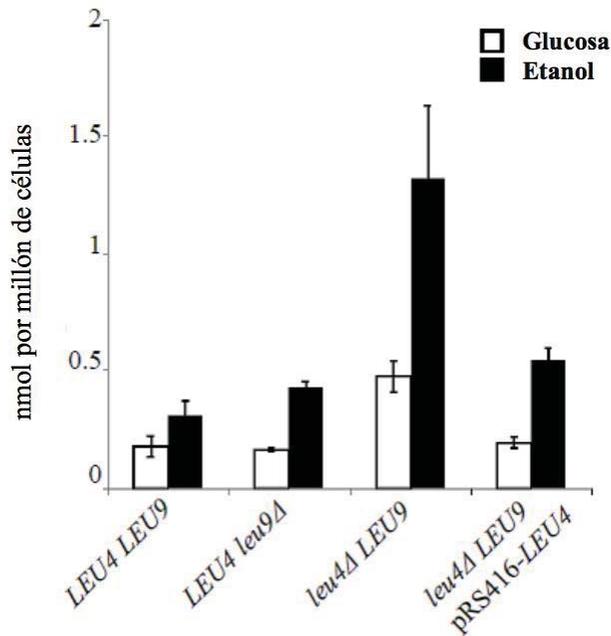


Figura 5. Concentración intracelular de leucina. Comparación entre las cepas *LEU4LEU9*, *leu4ΔLEU9*, *LEU4leu9Δ* y *leu4ΔLEU9* complementada con el plásmido pRS416-*LEU4*. Se muestra la concentración diferencial entre glucosa y etanol como fuente de carbono (Tomada de López *et al.*, 2015).

Considerando que el homodímero Leu9-Leu9 es el único que se puede formar en la mutante *leu4ΔLEU9* y es resistente a la inhibición por leucina, este homodímero desvía el flujo de metabolitos hacia la síntesis de leucina, provocando disminución en el aporte de los mismos al ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA). Por lo tanto, la diversificación por inhibición de leucina de Leu4 y Leu9 perturba el flujo de metabolitos hacia la biosíntesis de leucina y tiene un impacto negativo sobre el crecimiento de *leu4ΔLEU9* (López, 2015).

En la figura 6 se observa que el fenotipo de crecimiento en glucosa y etanol como fuente de carbono es distinto en las cuatro mutantes y todas mejoran su crecimiento al ser complementadas con leucina (López *et al.*, 2015).

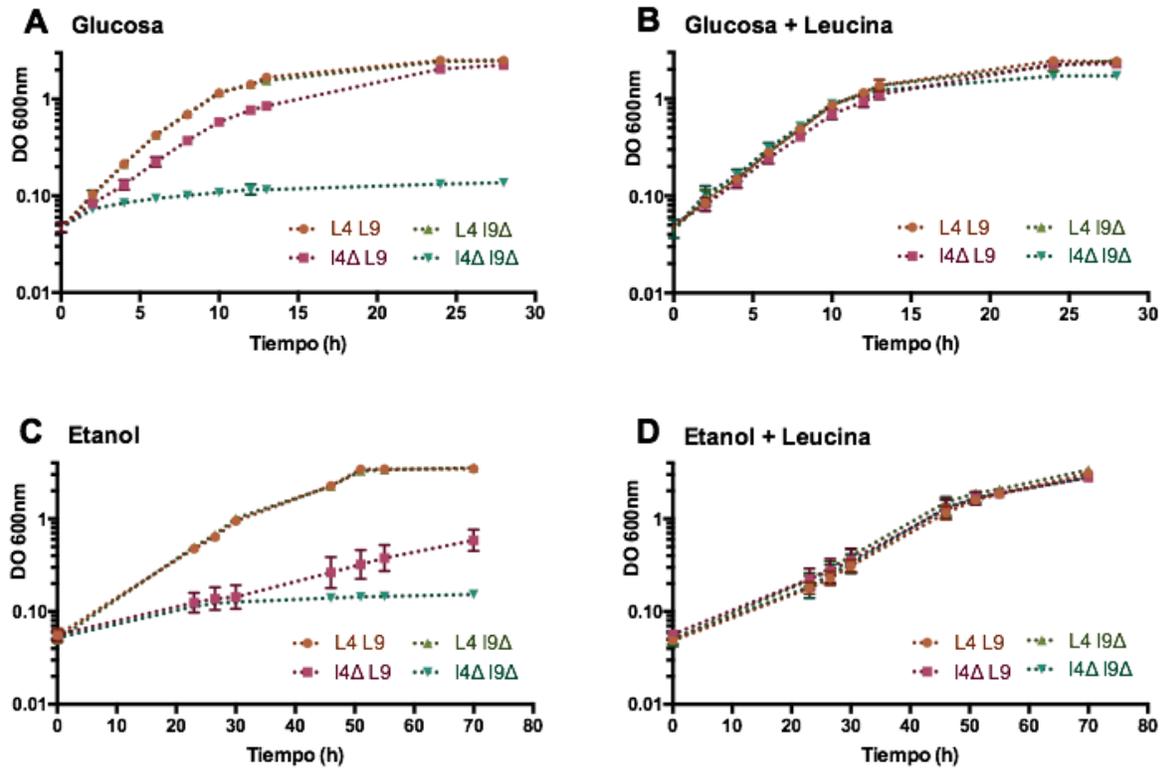


Figura 6. Curvas de crecimiento de las cepas en medio mínimo glucosa (A,B) o etanol (C,D) como fuente de carbono, suplementadas con leucina (B,D).

2.3.1. Expresión de genes

Los genes parálogos *LEU4* y *LEU9* diversificaron en su patrón de expresión. En la figura 7 se puede observar que en una cepa WT la expresión de *LEU4* es significativamente mayor en etanol que en glucosa y que tiene una mayor expresión que su parálogo *LEU9*. En el caso de la cepa *leu4ΔLEU9*, la expresión de *LEU9* aumenta de manera notable tanto en glucosa como en etanol. Por lo que es evidente que la expresión de *LEU4* se induce en condiciones respiratorias, mientras que *LEU9* se induce en ausencia de *LEU4* (López *et al.*, 2015). También se sabe que existe una diversificación en la regulación transcripcional a la que están sujetos estos genes dada por la secuencia particular de cada promotor. Los factores transcripcionales involucrados en el incremento de expresión de *LEU9* en ausencia de *LEU4* varían con la fuente de carbono disponible (Jara-Servín 2019).

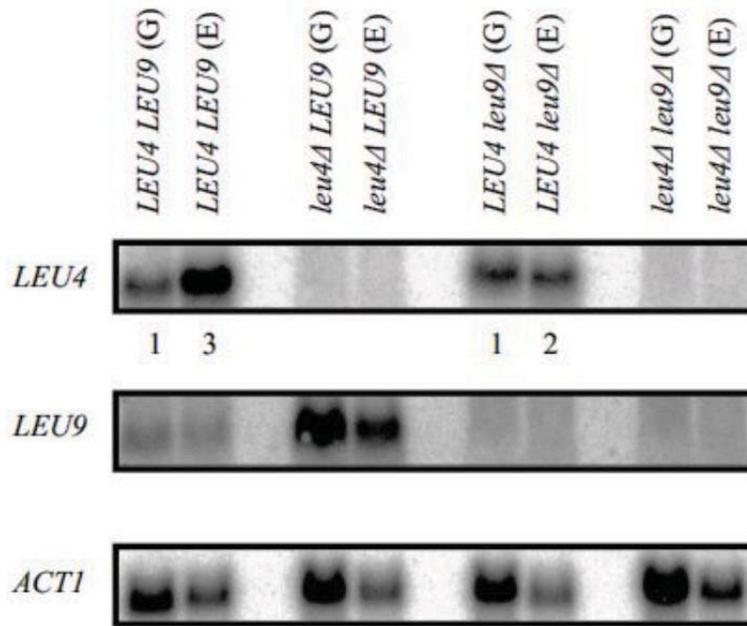


Figura 7. Análisis de expresión de los genes *LEU4* y *LEU9* por Northern Blot. Comparación de expresión de los genes en glucosa (G) o etanol (E) como fuente de carbono (Tomada de López *et al.*, 2015).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a estudiar la regulación, expresión, propiedades cinéticas, divergencia y evolución de los genes y proteínas parálogas del metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Escalera-Fanjul *et al.*, 2019). En este estudio, por primera vez, nos enfocamos en revelar la importancia que tiene la compartimentación subcelular de un par de proteínas parálogas, Leu4 y Leu9, localizadas en las mitocondrias. Estas isoenzimas trabajan como dímeros y sintetizan α -isopropil malato (α -IPM), el cual es necesario para la síntesis de leucina y actúa como corregulador de la proteína Leu3. La red de genes regulados por el complejo Leu3- α IPM están relacionados con la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada y asimilación de amonio primordialmente (Kohlhaw, 2003).

Leu4 y Leu9 se organizan como homo y heterodímeros, prevaleciendo la formación del heterodímero (Leu4-Leu9). Ambas proteínas difieren notablemente en su perfil de expresión así como en su sensibilidad a la inhibición por leucina. Se sabe que en una mutante nula *leu4 Δ LEU9* hay un incremento en la expresión de *LEU9*, aumenta la leucina intracelular y se ve afectado su crecimiento, el cual se restablece al adicionar leucina al medio (López *et al.*, 2015).

Con este estudio se pretende conocer si la reubicación citosólica de las proteínas Leu4 y/o Leu9 afectará la síntesis de α -IPM y leucina, así como el crecimiento de la célula. De igual manera, es relevante conocer si el perfil de expresión de los genes *LEU4* y *LEU9* se ve afectado cuando hay cambios en la localización subcelular de sus productos.

Por último también es de interés conocer si las enzimas conservan la misma actividad enzimática y la capacidad de formar heterodímeros fuera de la mitocondria, ya que hay factores que son distintos con respecto al citosol. En la matriz mitocondrial el pH es más alto y por su tamaño hay mayor concentración de los sustratos que utilizan las enzimas, lo que favorece reacciones más rápidas y mayor productividad (Avalos *et al.*, 2013).

4. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Demostrar la importancia de la compartimentación mitocondrial de las proteínas parálogas Leu4 y Leu9 tanto en la ruta de síntesis de leucina, como en relación a su producto inmediato, α -Isopropil malato, corregulador de la proteína Leu3.

5.2. Objetivos particulares

- Identificar la secuencia de aminoácidos que realiza la translocación de los monómeros Leu4 y Leu9 al interior de la mitocondria.
- Construir las cepas con las proteínas Leu4 y/o Leu9 relocalizadas al citosol.
- Observar cómo es el fenotipo de crecimiento de las cepas con proteínas citosólicas.
- Determinar la capacidad de síntesis de leucina mediante el análisis de pozas de metabolitos intracelulares.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Lista de cepas de y plásmidos

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Genotipo	Fuente
BY4741-701	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 LEU4-yECitrine-CaURA3 LEU9</i>	López <i>et al.</i> , 2015
BY4741-702	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 LEU4 LEU9-yECitrine-CaURA3</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA1-700	<i>MATa LEU4 LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA1-701	<i>MATa leu4Δ::kanMX4 LEU9 leu2::LEU2 ura3</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA1-702	<i>MATa LEU4 leu9Δ::kanMX4 leu2::LEU2 ura3</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA1-703	<i>MATa leu4Δ::URA3 leu9::Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	López <i>et al.</i> , 2015
CLA1-700-2	<i>MATa LEU4-yECitrine-CaURA3 LEU9 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA1-700-3	<i>MATa LEU4 LEU9-yECitrine-CaURA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA1-707	<i>MATa LEU4cit-yECitrine-CaURA3 LEU9 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA1-708	<i>MATa LEU4cit-yECitrine-CaURA3 leu9Δ::kanMX4 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA1-710	<i>MATa LEU4 LEU9cit-yECitrine-CaURA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
CLA1-711	<i>MATa leu4Δ::hphMX6 LEU9cit-yECitrine-CaURA3 leu2::LEU2</i>	Este estudio
Plásmido	Descripción	Fuente
pBS4	Etiqueta de proteína cyan (CFP) con marcador de selección de higromicina B (<i>hphMX6</i>).	Hailey <i>et al.</i> , 2002

5.2. Elección de secuencia de translocación mitocondrial

Las secuencias de translocación a la mitocondria (MTS) suelen encontrarse en el extremo amino terminal de la estructura primaria de las proteínas, tener una longitud de 15-50 aminoácidos y formar α -hélices cargadas positivamente (Chacinska, 2009).

Beltzer *et al.* (1988) encontraron que la proteína citosólica Leu4 es codificada a partir del mismo gen que Leu4 mitocondrial, la diferencia entre ambas proteínas son 30 residuos de aminoácidos. En el gen *LEU4* hay un segundo ATG en marco de lectura 90 pares de bases río abajo del codón de inicio, desde el cual se codifica Leu4 citosólica. En 2016 Yuan y su grupo de trabajo lograron localizar Leu9 en el citosol al insertar un plásmido con el gen *LEU9* sin las primeras 87 pares de bases, lo cual también coincide con un segundo ATG (en marco de lectura) en la secuencia codificante (anexo A).

Otros grupos de trabajo han relocalizado proteínas mitocondriales al citosol y aseguran la expresión de sus genes al posicionar un ATG al inicio de la secuencia codificante a la cual le removieron las bases correspondientes a la MTS (Omura, 2008; Brat *et al.*, 2012).

5.3. Modelado de proteínas

Se utilizó el servidor en línea *I-Tasser* de la Universidad de Michigan, con el cual se pueden realizar predicciones estructurales de proteínas a partir de su secuencia de residuos de aminoácidos. Este servidor funciona comparando la estructura primaria de una proteína con los registros de proteínas cristalizadas del PDB (Protein Data Bank) (Yang *et al.*, 2015).

Se realizaron dos modelos, el primero utilizando las secuencias completas de los aminoácidos de las proteínas y el segundo quitando los aminoácidos que corresponden a la MTS: 30 y 29 residuos de aminoácidos en Leu4 y Leu9, respectivamente. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos de *Saccharomyces* de la Universidad de Stanford (SGD, <https://www.yeastgenome.org>) y se utilizó el programa SnapGene® Viewer software (de GSL Biotech; disponible en snapgene.com) para el análisis de secuencias.

5.4. Construcción de cepas

Las colección de cepas necesarias para este estudio se detalla en la tabla 2. Todas las cepas se construyeron siguiendo el protocolo de transformación de acetato de litio (apéndice C) con módulos de ADN obtenidos por PCR utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). En todas las PCR los oligonucleótidos de la tabla 4 se utilizaron a una concentración de 0.5µM, con excepción de JH6 y JH8, que se utilizaron a 0.2µM.

Para las cepas CLA1-700-2 y 700-3 se obtuvieron los módulos usando como molde el ADN genómico de las cepas BY4741-701 y BY4741-702. Los oligonucleótidos utilizados fueron JH1/JH2 y JH3/JH4, y el programa: 98°C 2min, (98°C 20s, 55°C 30s, 72°C 3min) x 35, 72°C 3min. Se transformó la cepa CLA1-700, se seleccionaron las mutantes por su prototrofia a uracilo y se comprobaron las construcciones por PCR y fluorescencia en el microscopio.

Tabla 2. Colección de cepas necesarias para este estudio.

Cepa	Descripción
<i>LEU4cit LEU9</i>	Leu4 citosólica (yECitrine), Leu9 mitocondrial
<i>LEU4 LEU9cit</i>	Leu4 mitocondrial, Leu9 citosólica (yECitrine)
<i>leu4Δ LEU9cit</i>	Leu9 citosólica (yECitrine), fondo <i>leu4Δ</i>
<i>LEU4cit leu9Δ</i>	Leu4 citosólica (yECitrine), fondo <i>leu9Δ</i>
<i>LEU4cit LEU9cit</i>	Leu4 citosólica (Cyan FP), Leu9 citosólica (yECitrine)

Las cepas CLA1-707 (*LEU4citLEU*) y 710 (*LEU4LEU9cit*) se construyeron al transformar las cepas CLA1-701 y 702 (*leu4ΔLEU9* y *LEU4leu9Δ*), respectivamente, con módulos generados por dos reacciones consecutivas de PCR. En la primera se obtuvo un módulo de 4,321pb (para *LEU4*) y de 4,243pb (para *LEU9*) al utilizar como molde el ADN genómico de las cepas CLA1-700-2 y 700-3. Los oligonucleótidos utilizados fueron JH5/JH2 (para *Leu4*) y JH7/JH2 (para *Leu9*), y el programa 98°C 30s, (98°C 15s, 63°C 30s, 72°C 2:30min) x 35, 72°C 10min.

El módulo obtenido de cada reacción se purificó y se utilizó como molde para la segunda PCR, en la que se generaron módulos de 4,391pb (*LEU4*) y 4,313pb (*LEU9*) al utilizar los oligonucleótidos JH6/JH2 y JH8/JH2, respectivamente, y el mismo programa de PCR. La segunda PCR se realizó con el fin de obtener regiones de

recombinación homóloga a los promotores de cada uno de los genes (anexo D). Las cepas se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos JH9/JH10 y JH11/JH12 (anexo E), microscopía y secuenciación.

La cepa CLA1-708 (*LEU4cit~~leu9~~*) se obtuvo al transformar la cepa 707 (*LEU4citLEU9*) con un módulo compuesto por el gen de resistencia al antibiótico G418 (*kanMX4*) flanqueado por 259pb de las UTR del gen *LEU9*. La cepa CLA1-711 (*leu4~~Δ~~LEU9cit*) se generó al transformar la cepa 710 (*LEU4LEU9cit*) con un módulo con el gen de resistencia a higromicina (*hphMX6*) del plásmido pBS4, flanqueado por 50pb de las UTR del gen *LEU4*. Las cepas construidas se comprobaron por PCR con los oligonucleótidos JH9/JH10 y JH11/JH12 (anexo E), microscopía y secuenciación.

5.5. Observación de cepas al microscopio

Todas las muestras de las cepas con la proteína yECitrine fusionada a Leu4 o Leu9 se prepararon como se describe en el apéndice D. Para la observación de las células y la fluorescencia se utilizó el microscopio LSM800 con el láser de 488nm para la proteína verde y el láser de 640nm para el MitoTracker Red Fm Invitrogen. Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el programa Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

5.6. Cinéticas de crecimiento

La determinación del crecimiento de las cepas se realizó por duplicado en medio mínimo con glucosa (2%) o etanol (2%) como fuente de carbono, sulfato de amonio (40 mM) como fuente de nitrógeno y suplementando con leucina (100 mg/mL) o uracilo (20 mg/L) de ser necesario (apéndice A). Los matraces se inocularon a partir de un botón celular que creció en medio rico (YPD) durante ~12 horas. Los datos de crecimiento se obtuvieron al medir la densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) a lo largo de ~25 o ~72 horas en glucosa o etanol, respectivamente.

Para obtener la velocidad de crecimiento se tomaron los datos registrados y se utilizaron las siguientes fórmulas para su cálculo:

$$B = \frac{[\log_{10}(\text{último valor}) - (\log_{10}(\text{primer valor}))]}{(\text{última hora de registro} - \text{primera hora de registro})}$$

$$td = \frac{\log_{10}(2)}{B}$$

$$\mu = \frac{\ln(2)}{td}$$

B = pendiente

td = tiempo de duplicación

μ = velocidad de crecimiento

5.7. Extracción de metabolitos intracelulares

Para el análisis de concentración de metabolitos intracelulares las cepas se crecieron en medio mínimo glucosa-amonio o etanol-amonio hasta la DO_{600nm} registrada en la tabla 3. El protocolo y el análisis de datos que se utilizó es el mismo previamente descrito por Quezada *et al.*, 2011 (apéndice E).

Tabla 3. Densidad óptica a las que se les extrajeron metabolitos intracelulares.

DO Pozas de Leucina		
Cepa	Glucosa	Etanol
LEU4 LEU9	0.710	0.586
<i>leu4</i> Δ LEU9	0.723	0.276
LEU4 <i>leu9</i> Δ	0.588	0.578
LEU4 <i>cit</i> LEU9	0.652	0.625
LEU4 LEU9 <i>cit</i>	0.567	0.594
<i>leu4</i> Δ LEU9 <i>cit</i>	0.091	0.064
LEU4 <i>cit leu9</i> Δ	0.699	0.787

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Modelado y localización de secuencia de translocación mitocondrial

Las predicciones estructurales de las α -IPMS obtenidas mediante el uso del servidor *I-TASSER* muestran que los aminoácidos del extremo amino-terminal de Leu4 y Leu9 no tienen una conformación definida, se encuentran alejados de la estructura secundaria más cercana, y no afectan la arquitectura del sitio activo. También podemos observar que remover la secuencia de translocación mitocondrial de cada una de las proteínas no afecta su estructura predicha (figura 8).

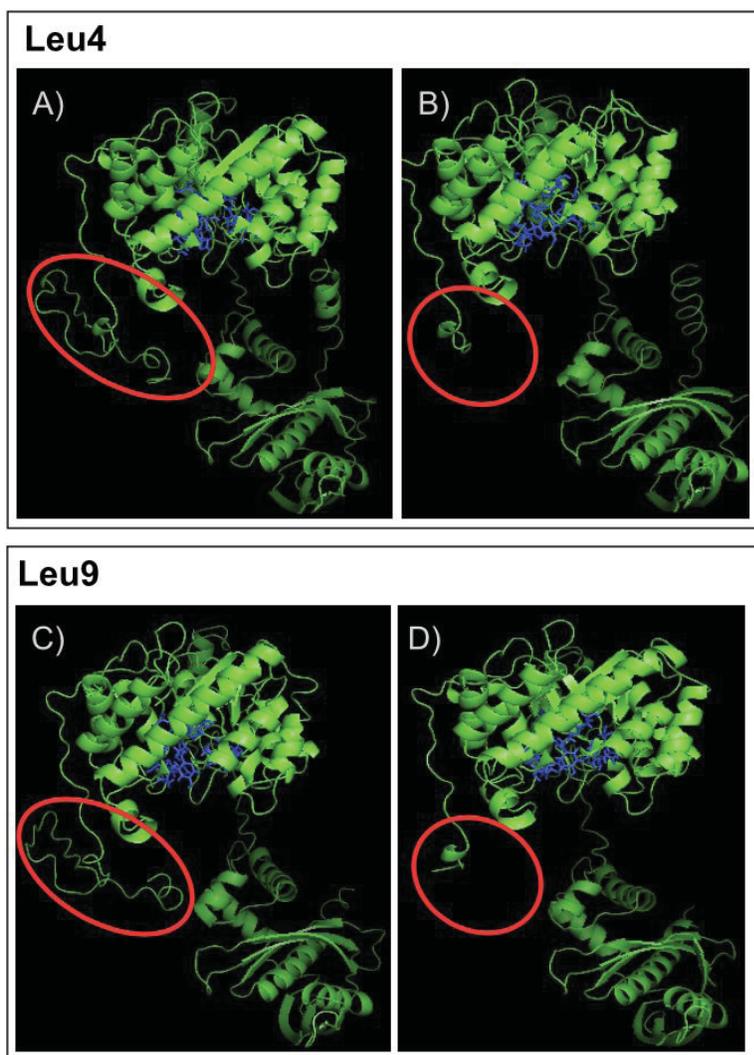


Figura 8. Predicción de estructura de las proteínas Leu4 y Leu9. Modelos con las secuencias completas de aminoácidos: Leu4 con 620 aminoácidos (A) y Leu9 con 605 aminoácidos (C). Modelos sin 30 aminoácidos del extremo amino terminal de Leu4 (B) y 29 aminoácidos del extremo amino terminal de Leu9 (D). La secuencia de translocación mitocondrial se muestra en los círculos rojos. En todos los casos se muestra en azul el sitio activo.

El programa de modelado de proteínas tomó como modelo a la α -IPMS, codificada por el gen *LEUA*, de *Mycobacterium tuberculosis*. Leu4 y Leu9 tienen aproximadamente un 45% de identidad con LeuA, la cual trabaja como dímero, al igual que sus ortólogos.

6.2. Cepas con proteínas citosólicas

6.2.1. Microscopía

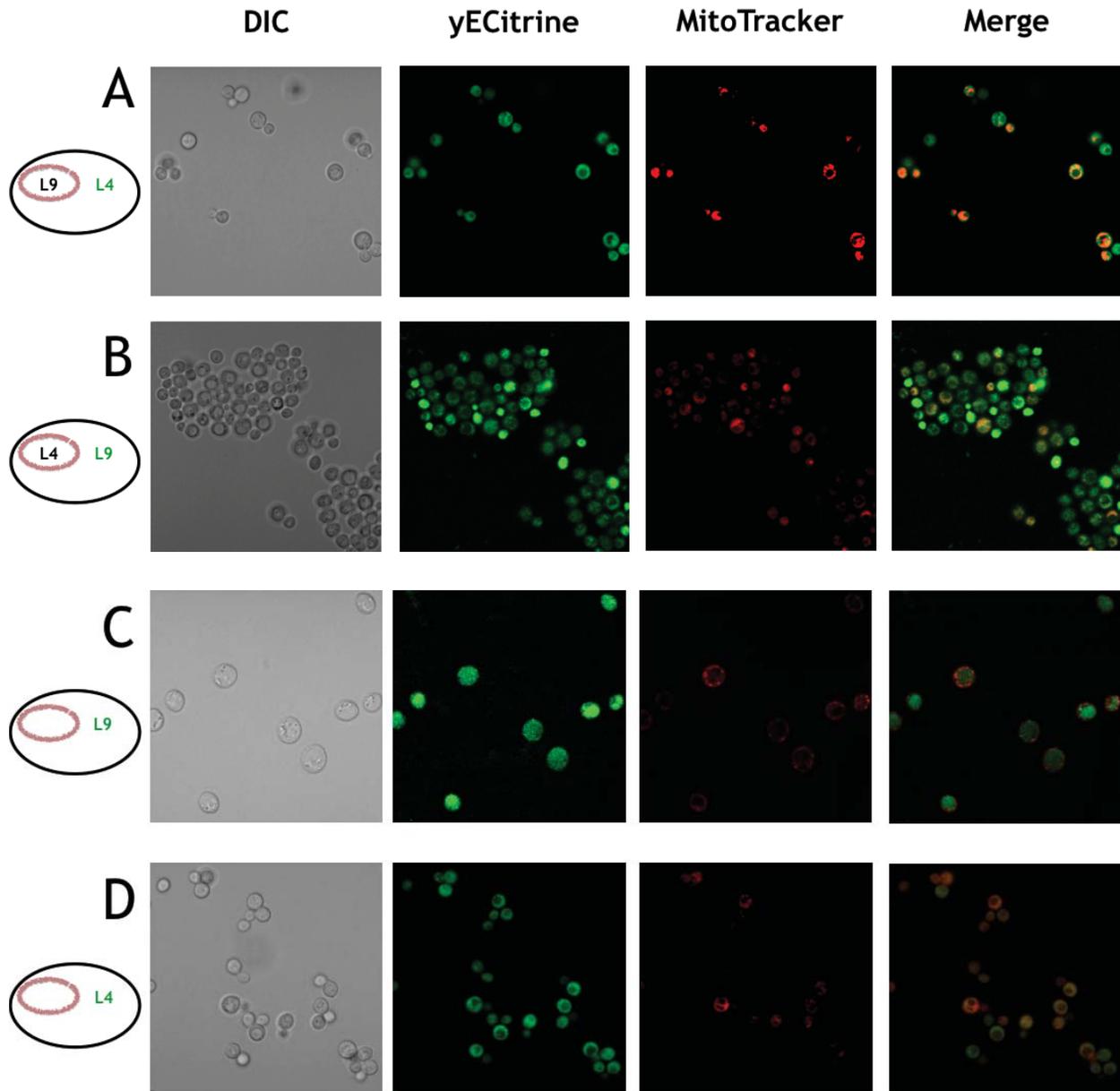


Figura 9. Localización citosólica de las proteínas Leu4 y Leu9 marcadas con la proteína fluorescente yECitrine. Se observan las cepas *LEU4cit-yECitrine LEU9* (A), *LEU4 LEU9cit-yECitrine* (B), *leu4Δ LEU9cit-yECitrine* (C) y *LEU4cit-yECitrine leu9Δ* (D). De izquierda a derecha se puede observar la microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), la proteína yECitrine fusionada a la α -IPMS correspondiente, las mitocondrias marcadas con MitoTracker, y la superposición de las imágenes.

A diferencia de la figura 4, en las imágenes obtenidas en este estudio se puede observar la localización citosólica de la proteína yECitrine fusionada a las proteínas Leu4 y Leu9 sin la MTS (figura 9).

6.2.2. Cinéticas de crecimiento

Las cepas construidas en este estudio se crecieron utilizando siempre como cepas control a las cepas CLA publicadas por López *et al.* (2015) (tabla 1) con el fin de realizar una comparación entre cepas con proteínas deletadas y cepas con proteínas relocalizadas. Las cepas control se graficaron con líneas punteadas para poder diferenciarlas de las cepas con proteínas relocalizadas (figuras 11, 12, 13, 14 y 15).

Se registró el crecimiento de las cepas *LEU4-yECitrine LEU9* y *LEU4 LEU9-yECitrine* para observar si la fusión de la proteína yECitrine alteraba de alguna manera su crecimiento. Se observó que ambas cepas tienen una cinética y velocidad de crecimiento similares a la cepa WT (*LEU4LEU9*), por lo que se concluyó que la fusión de la proteína fluorescente no afecta el crecimiento de las cepas (figura 10).

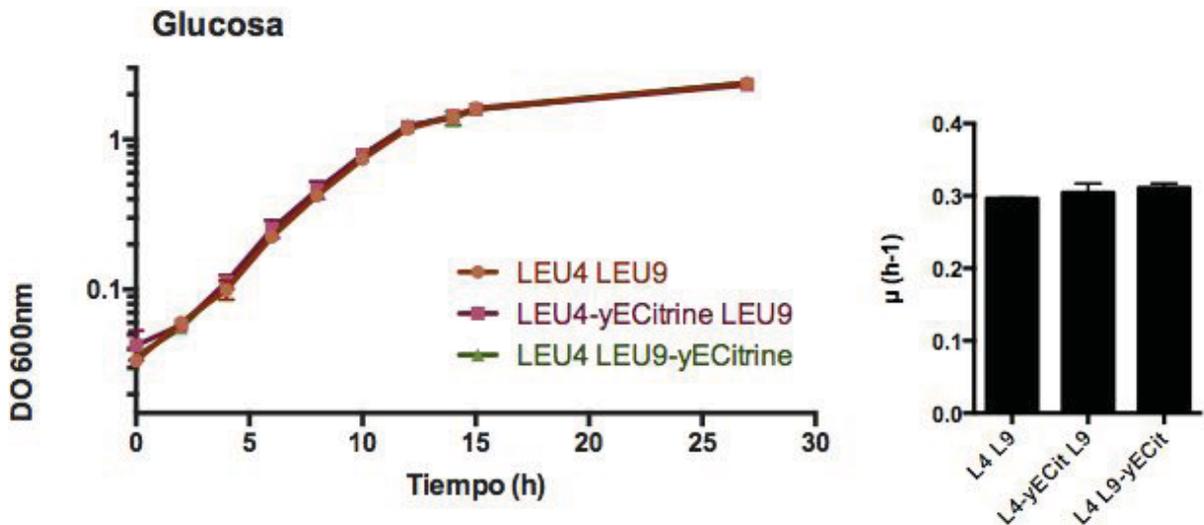


Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa WT y las cepas con la proteína yECitrine fusionada a Leu4 o Leu9.

6.2.2.1. Glucosa como fuente de carbono

En la figura 11 se puede observar el registro de crecimiento de las 8 cepas utilizadas. Las 4 cepas control tiene el mismo fenotipo registrado anteriormente (líneas punteadas). Es notorio que si la proteína Leu4 se encuentra en la mitocondria la cepa tiene un fenotipo de crecimiento idéntico a una WT y no hay diferencia de crecimiento si Leu9 está localizada en citosol o ausente.

En cuanto a la cepa Leu4-cit Leu9 se pueden realizar varias observaciones. Si a una cepa WT le modificamos la localización de Leu4 colocándola en el citosol, se observa una pequeña disminución en su velocidad de crecimiento ($\mu_{LEU4LEU9} = 0.332h^{-1}$, $\mu_{LEU4citLEU9} = 0.321h^{-1}$). Por el contrario, si a una cepa *leu4* Δ *LEU9* ($\mu = 0.266h^{-1}$) le regresamos a la proteína Leu4 en citosol, ésta mejora su crecimiento.

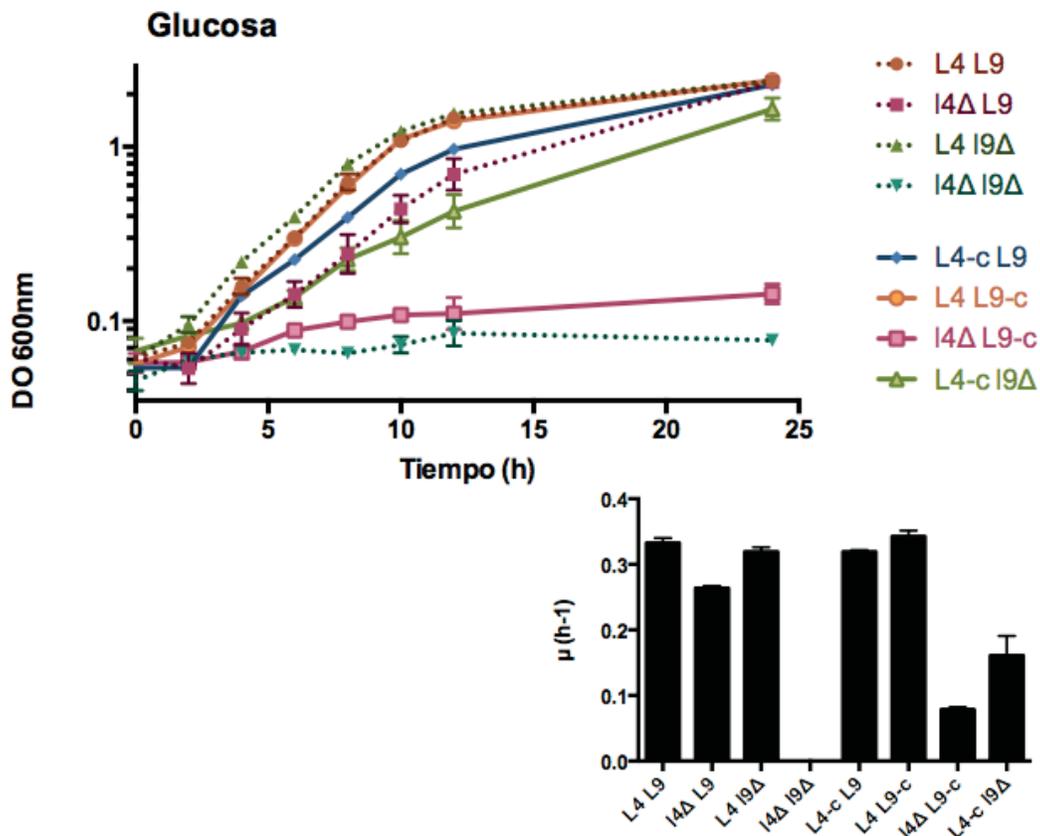


Figura 11. Curvas de crecimiento en medio mínimo-glucosa de las cepas con Δ -IPMS relocadas al citosol. Las cepas control se muestran en líneas punteadas. En la gráfica inferior se presentan las velocidades de crecimiento.

La cepa *leu4ΔLEU9cit* es la que muestra una menor velocidad de crecimiento ($\mu = 0.078\text{h}^{-1}$) de las 4 cepas construidas. Tomando como referencia a las cepas control, si le regresamos la proteína Leu9 en el citosol a la cepa *leu4Δleu9Δ* ($\mu = 0\text{h}^{-1}$), se observa que la velocidad de crecimiento aumenta muy poco. Por el contrario, si en una cepa *leu4ΔLEU9* ($\mu = 0.263\text{h}^{-1}$) cambiamos la localización de la única α -IPMS (Leu9) al citosol, la disminución en su velocidad de crecimiento es drástica.

Por último podemos comparar el nulo crecimiento de la cepa *leu4Δleu9Δ* con la cepa *LEU4cit**leu9Δ* ($\mu = 0.161\text{h}^{-1}$). Si a una cepa que carece de ambas α -IPMS le regresamos Leu4 en citosol, la cepa recupera a la mitad su velocidad de crecimiento. Viéndolo de otra manera, si a una cepa *LEU4leu9Δ* ($\mu = 0.319\text{h}^{-1}$) le modificamos la localización de Leu4, la cepa disminuye a la mitad su velocidad de crecimiento.

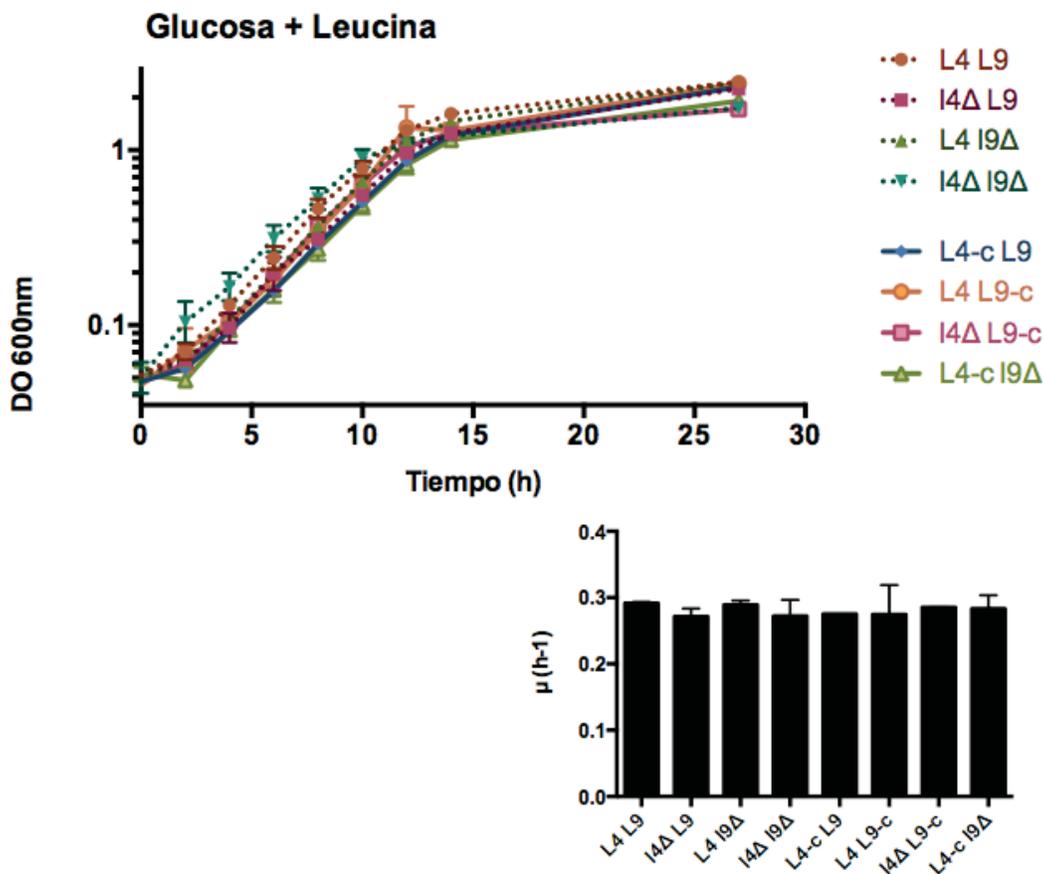


Figura 12. Curvas de crecimiento en medio mínimo-glucosa suplementado con leucina de las cepas con α -IPMS relocalizadas al citosol. Las cepas control se muestran en líneas punteadas. En la gráfica inferior se presentan las velocidades de crecimiento.

Las 4 cepas construidas en este estudio con proteínas relocalizadas al citosol recuperan su velocidad de crecimiento ($\mu = \sim 0.280\text{h}^{-1}$) al añadir leucina al medio de cultivo al igual que las cepas descritas por López *et al.* (2015), lo que indica que la disminución o falta de crecimiento de las cepas se debe a los cambios de localización de las α -IPMS (figura 12).

6.2.2.2. Etanol como fuente de carbono

Teniendo etanol como única fuente de carbono, las cepas que tienen una de las enzimas en mitocondria y la otra en citosol (*LEU4citLEU9* y *LEU4LEU9cit*) crecen a la misma velocidad que una cepa WT ($\mu = \sim 0.070\text{h}^{-1}$) (figura 13).

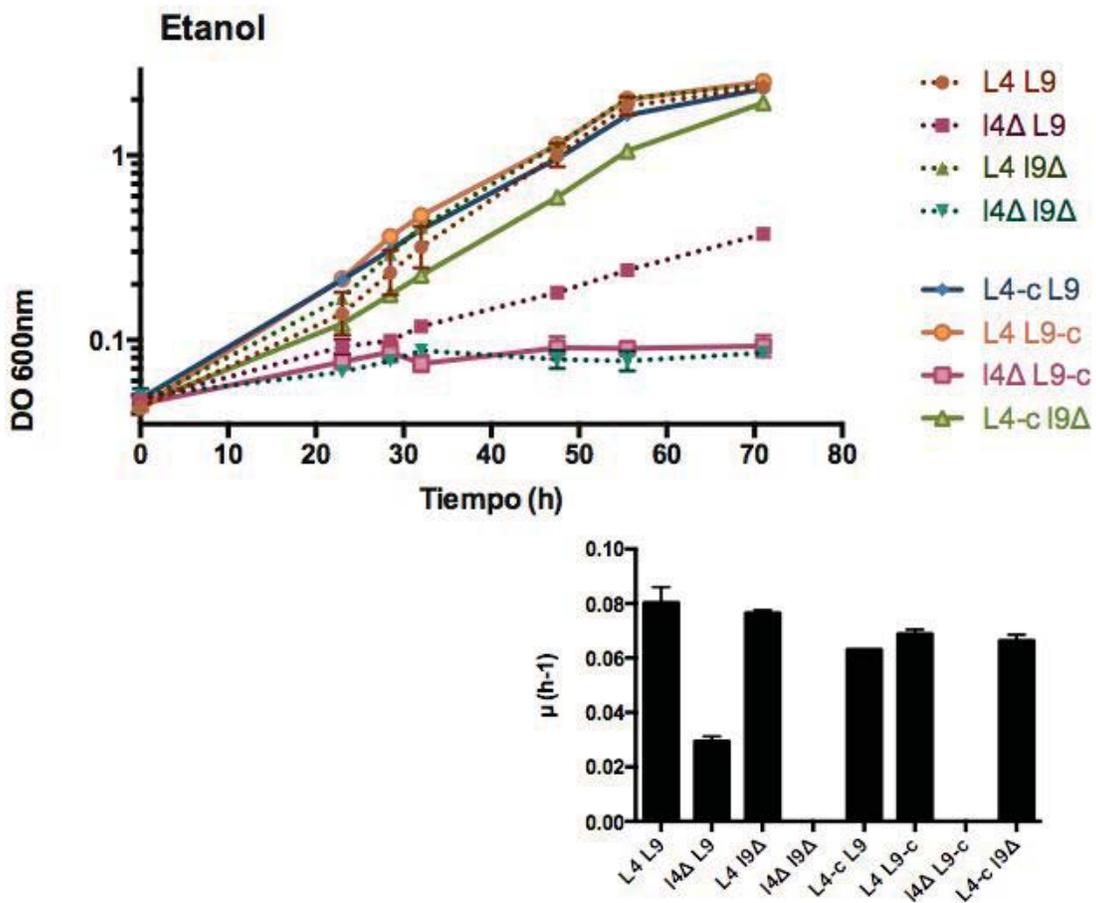


Figura 13. Curvas de crecimiento en medio mínimo-etanol de las cepas con α -IPMS relocalizadas al citosol. Las cepas control se muestran en líneas punteadas. En la gráfica inferior se presentan las velocidades de crecimiento.

La cepa *leu4ΔLEU9^{cit}* presenta una pérdida total de crecimiento. Si se compara con una cepa *leu4Δleu9Δ*, con o sin leucina, ambas se comportan de la misma manera. Esto nos indica que la proteína Leu9 en el citosol es incapaz de sintetizar α -isopropil malato cuando la célula está respirando. Por otra parte, se puede comparar con una cepa *leu4ΔLEU9* ($\mu = 0.029\text{h}^{-1}$), que crece lento en esta fuente de carbono. Si a *leu4ΔLEU9* se le cambia Leu9 de la mitocondria al citosol, esta pierde por completo la capacidad de crecer. Es importante notar que la velocidad se restablece completamente al añadir leucina al medio, con lo que se infiere que la falta de crecimiento únicamente se debe a la ausencia del metabolito α -IPM y a la incapacidad de la célula de producir leucina.

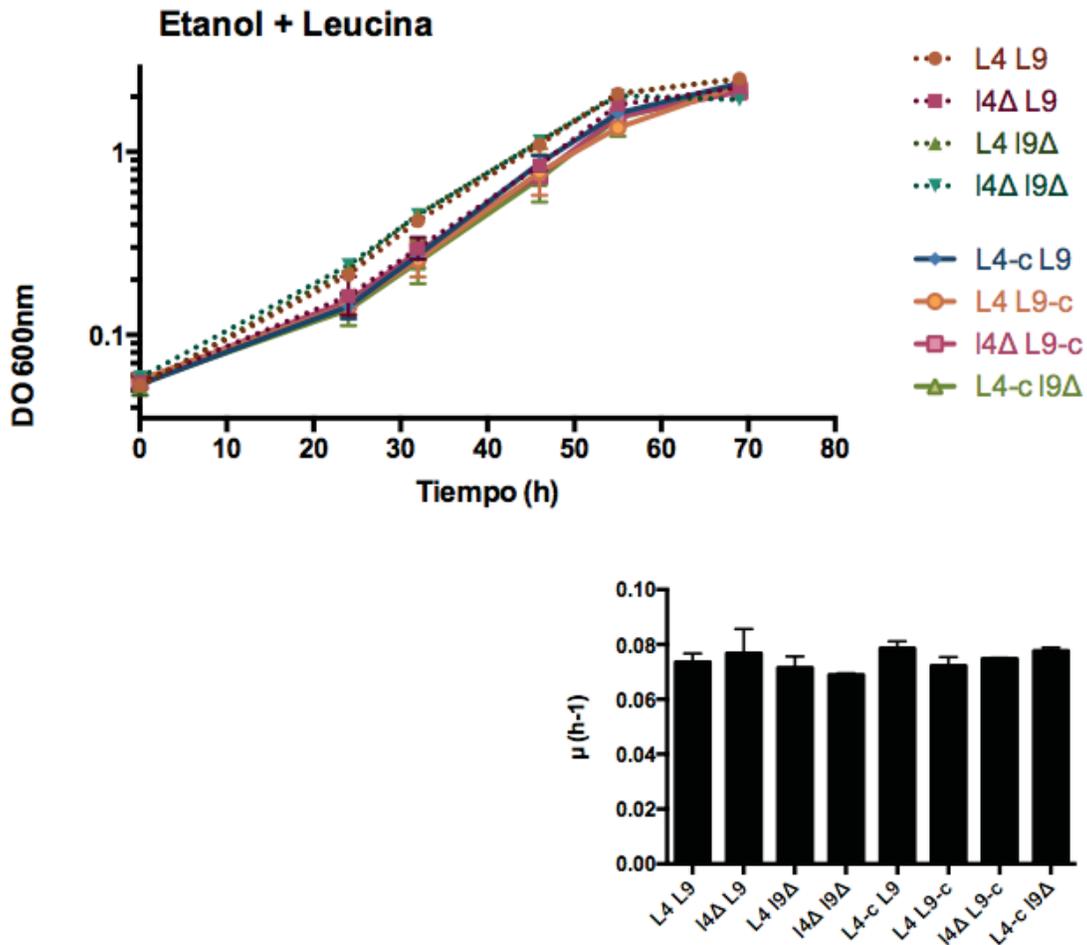


Figura 14. Curvas de crecimiento en medio mínimo-etanol suplementado con leucina de las cepas con α -IPMS relocalizadas al citosol. Las cepas control se muestran en líneas punteadas. En la gráfica inferior se presentan las velocidades de crecimiento.

Por último, si a una cepa *leu4Δleu9Δ* le regresamos a Leu4 en el citosol ($\mu = 0.066\text{h}^{-1}$), ésta crece a una velocidad muy cercana a la cepa WT e inclusive crece más rápido que una cepa *leu4ΔLEU9* ($\mu = 0.029\text{h}^{-1}$). La mutante *leu4ΔLEU9* crece aproximadamente tres veces más lento que una *LEU4LEU9* ($\mu = 0.080\text{h}^{-1}$). Observando la curva de crecimiento de esta cepa, podemos hacer la comparación con una cepa *LEU4leu9Δ* ($\mu = 0.076\text{h}^{-1}$) y destacar que si en esta cepa movemos a Leu4 al citosol hay una pérdida de crecimiento que, aunque es pequeña, es notoria (figura 13).

Todas las cepas con las que se trabajó en este estudio tienen una velocidad de crecimiento idéntica cuando se suplementa el medio etanol-amonio con leucina ($\mu \sim 0.074\text{h}^{-1}$), lo que indica que las diferencias de crecimiento de las cepas se deben a la falta de alguna o ambas proteínas en la mitocondria (figura 14).

6.2.2.3. Comparación entre glucosa y etanol

Al realizar la comparación de crecimiento entre glucosa y etanol como fuente de carbono la cepa *LEU4LEU9cit* se comporta con la misma tendencia; en ambos casos crece a la misma velocidad que una *LEU4LEU9*. Por el contrario, la cepa *LEU4citLEU9*, que en glucosa crece un poco más lento que una cepa WT, en etanol mejora notablemente su crecimiento (figura 15A).

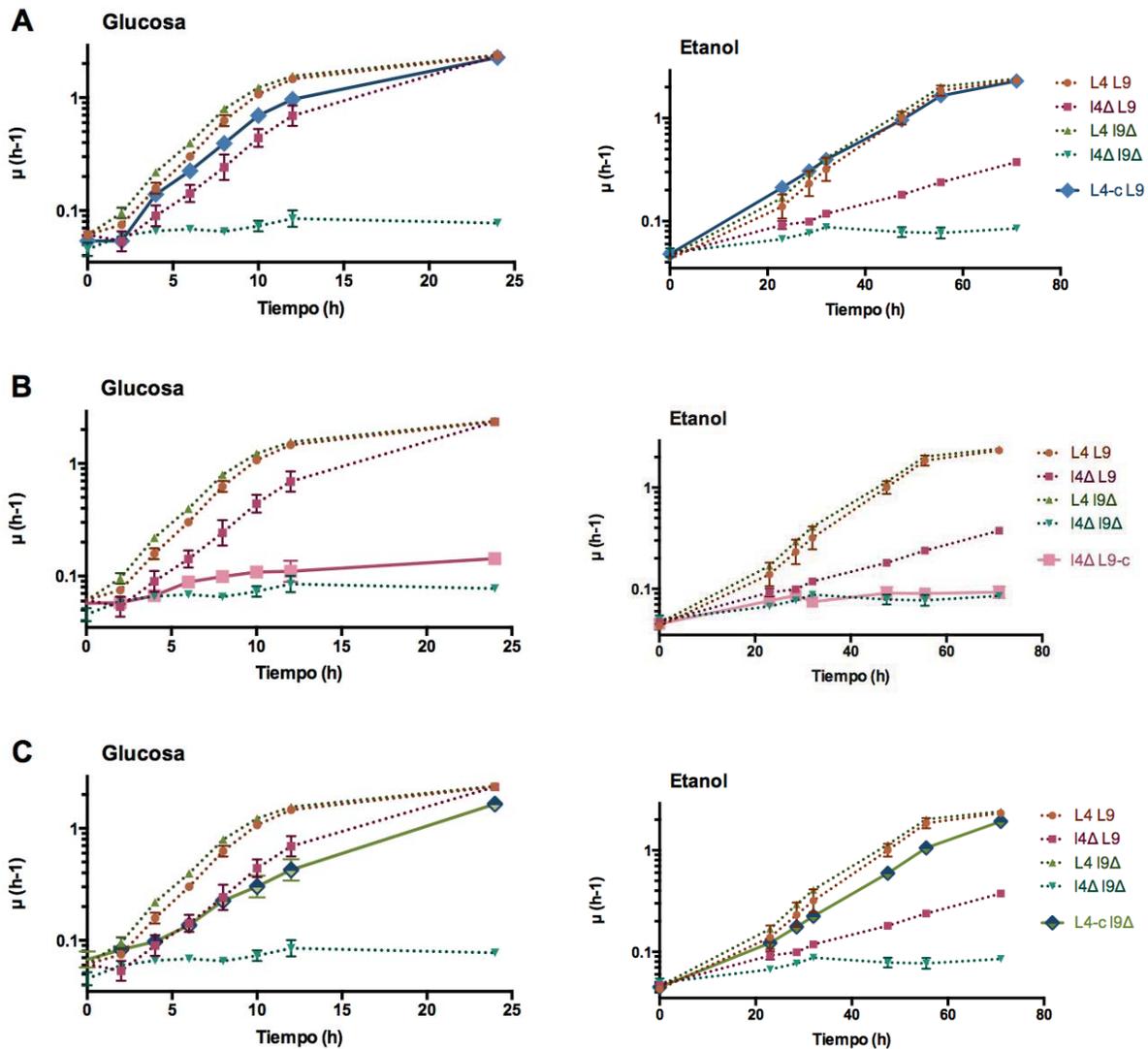


Figura 15. Comparación de curvas de crecimiento de las mutantes con proteínas citosólicas en glucosa o etanol como fuente de carbono. En todas las curvas las cepas control se graficaron con líneas punteadas y la cepa a comparar se muestra con línea continua: (A) Cepa *LEU4citLEU9*, (B) *leu4ΔLEU9cit* y (C) *LEU4citleu9Δ*.

Las cepas con una sola de las α -IPMS en citosol y que no tienen a su paróloga en la mitocondria (*leu4 Δ LEU9cit* y *LEU4citleu9 Δ*) tienen un cambio en la velocidad de crecimiento más drástico en etanol que en glucosa. En glucosa la cepa *leu4 Δ LEU9cit* presenta muy poco crecimiento, mientras que pierde por completo la capacidad de crecer cuando la fuente de carbono disponible es etanol (figura 15B). Por último, la cepa *LEU4citleu9 Δ* , que al compararla con *leu4 Δ LEU9* crece más lento en glucosa, presenta una mejora notable en comparación con la misma cepa cuando el medio tiene etanol como fuente de carbono (figura 15C).

6.2.3. Acumulación de leucina

La concentración de leucina intracelular de las cepas construidas en este trabajo fue analizada utilizando como controles a las cepas *LEU4LEU9*, *leu4 Δ LEU9* y *LEU4leu9 Δ* . El cálculo de leucina intracelular obtenido de las 3 cepas control muestra la misma tendencia reportada previamente por López *et al.* (2015) y Jara-Servín (2019).

La acumulación de leucina de la cepa *LEU4LEU9cit* observada en ambas fuentes de carbono es mínima y coincide en que su velocidad de crecimiento es idéntica a la de una cepa WT.

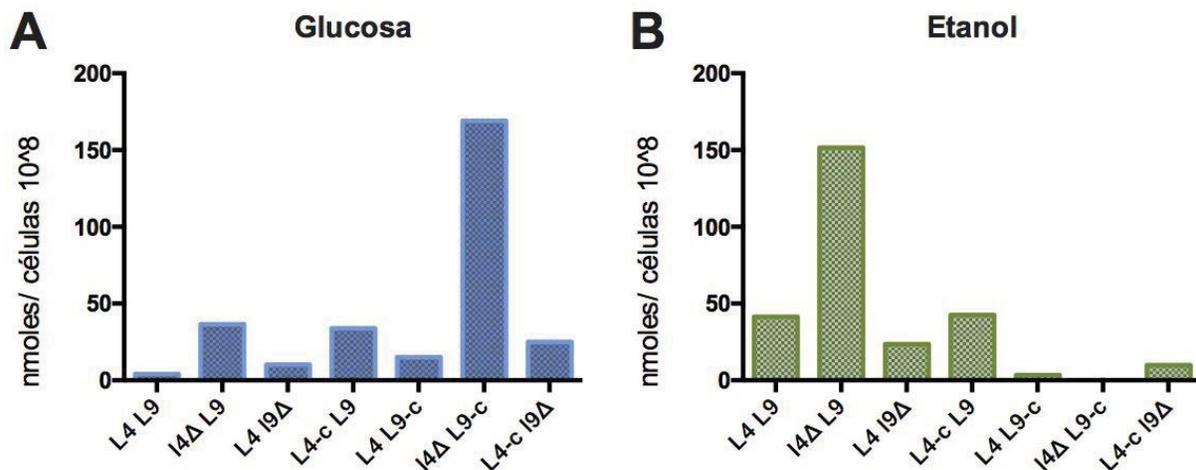


Figura 16. Concentración intracelular de leucina. Las tres primeras barras de las gráficas de (A) glucosa y de (B) etanol corresponden a las cepas control. Las últimas cuatro barras refieren la concentración de las cepas con proteínas citosólicas.

Las cepas *LEU4citLEU9* y *leu4 Δ LEU9* tienen una concentración de leucina intracelular

y una velocidad de crecimiento similar en glucosa como fuente de carbono (figuras 15A y 16A). Por el contrario, en etanol tiene una acumulación de leucina idéntica a una WT, al igual que su velocidad de crecimiento (figuras 15A y 16B).

La cepa *LEU4cit**leu9* Δ (última columna de la figura 16) crece más lento en glucosa que en etanol, lo que coincide en su acumulación de leucina. En glucosa como fuente de carbono tiene casi cinco veces más leucina que la cepa WT, mientras que en etanol tiene muy poca concentración de este metabolito (figuras 15C y 16).

Por último, la acumulación de leucina de la cepa que tiene únicamente Leu9 en citosol (*leu4* Δ *LEU9cit*) es más de tres veces mayor que la cepa control *leu4* Δ *LEU9* en glucosa. El crecimiento de esta cepa en glucosa es casi nulo, mientras que en etanol no hay crecimiento y, en consecuencia, no hay acumulación de leucina (figuras 15B y 16).

6.3. Formación de dímeros en cepas con proteínas citosólicas

Observando los datos obtenidos y tomando en cuenta los datos publicados por López *et al.*, (2015) sobre la relación entre la disminución de velocidad de crecimiento, la formación de homodímeros de distinta resistencia a la retroinhibición por leucina y la acumulación intracelular de este metabolito, es posible realizar un análisis a nivel metabólico de lo que ocurre en las cepas utilizadas en este trabajo.

LEU4citLEU9

Es muy poco probable que pueda ocurrir la formación de heterodímeros cuando ambas proteínas se encuentran en compartimentos celulares distintos. Se puede inferir que en el citosol hay formación de dímeros Leu4-Leu4 mientras que en la mitocondria hay formación del homodímero Leu9-Leu9. Si analizamos el patrón de expresión de los genes en una cepa WT (figura 7), podemos inferir que en la cepa evaluada hay muy poca proteína Leu9, por lo que los pocos homodímeros al interior de la mitocondria pueden tener un efecto despreciable en el flujo de metabolitos y repercutir muy poco en la disminución de crecimiento de la cepa.

LEU4LEU9cit

Al igual que se propone para la cepa anterior, la formación de heterodímeros es poco probable para *LEU4LEU9cit*, pero tomando en cuenta que de manera natural hay presencia, aunque poca, de Leu4 en el citosol (Beltzer *et al.*, 1988), es probable que haya dímeros Leu4-Leu9 en citosol. De ser así, los monómeros de la proteína Leu9 estarían titulados por Leu4. Tomando en cuenta el patrón de expresión de estas

proteínas (figura 7), se puede suponer que hay muy poca Leu9 y, por lo tanto, si se llegan a formar dímeros Leu9-Leu9, estos no podrían causar la misma perturbación que en una cepa *leu4ΔLEU9*, en donde la expresión de *LEU9* aumenta notablemente.

leu4ΔLEU9cit

En este caso únicamente va a ocurrir la formación de dímeros Leu9-Leu9 en el citosol, los cuales son muy resistentes a la retroinhibición por leucina. Si nos guiamos por el patrón de expresión de los genes *LEU4* y *LEU9*, podemos suponer que hay un aumento significativo en la expresión de *LEU9*. Es notable que la velocidad de crecimiento disminuye en ambas fuentes de carbono y, por lo tanto, se puede sugerir que esto sucede por razones distintas en glucosa y en etanol. En glucosa la velocidad de crecimiento es muy baja y presenta una poza de leucina intracelular tres veces mayor que una mutante *leu4ΔLEU9*, lo que sugiere que el dímero Leu9-Leu9 es capaz de sintetizar α -IPM y por lo tanto también de leucina aunque no la suficiente para que se inhiba la actividad de este homodímero. Por otra parte, en etanol la célula es incapaz de crecer y como consecuencia no hay acumulación de leucina. Esto invita a pensar en dos posibilidades: que en esta fuente de carbono Leu9-Leu9 no tenga actividad enzimática o que en esta fuente de carbono sea más evidente la importancia que tiene para la célula la producción de α -IPM dentro de las mitocondrias.

LEU4citleu9Δ

Por último, en esta cepa se puede considerar que únicamente tenemos homodímeros de Leu4 en el citosol. La acumulación de leucina en glucosa es similar a la de una cepa *leu4ΔLEU9*, al igual que su velocidad de crecimiento. En etanol la cepa no acumula leucina pero también se observa una disminución en su crecimiento. Se podría suponer que Leu4-Leu4 tiene una buena actividad en citosol y que la velocidad de crecimiento se ve perjudicada por no tener producción de α -IPM en mitocondrias.

7. CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos se puede concluir de manera concreta que la localización de las proteínas Leu4 y Leu9 en las mitocondrias es relevante para el óptimo crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, así como para la producción de leucina.
- Se identificó la secuencia de aminoácidos que realiza la translocación a la mitocondria (MTS) de las enzimas α -isopropil malato sintasas de la levadura. Para Leu4 la secuencia corresponde a los primeros 30 residuos de aminoácidos (90 pb) y para Leu9 son 29 residuos de aminoácidos (87 pb), en ambos casos del extremo amino terminal. La MTS se definió mediante la comparación de la estructura primaria y el análisis de la estructura de las proteínas.
- La eliminación de la MTS únicamente afecta la localización de las proteínas, ya que se puede inferir que fuera de la mitocondria mantienen su actividad enzimática.
- La reubicación de Leu4 o Leu9 al citosol no tiene una consecuencia relevante en el crecimiento de la célula, siempre que se encuentre su paróloga en la mitocondria.
- La cepa que tiene Leu4 en citosol presenta una reducción en la velocidad de crecimiento cuando se encuentra en un fondo *leu9* Δ . De la misma manera, cuando la cepa tiene a Leu9 en citosol en un fondo *leu4* Δ , disminuye significativamente su capacidad de crecer.
- Los resultados de crecimiento obtenidos de las cepas que no tienen ninguna α -IPMS en mitocondrias sugieren que para la célula es importante que alguna de las dos isoenzimas sintetice α -IPMS en la matriz mitocondrial.
- Todas las cepas presentan una velocidad de crecimiento similar a una cepa WT cuando se suplementa el medio con leucina, ya sea glucosa o etanol la fuente de carbono.
- La concentración de leucina intracelular de las cuatro cepas con proteínas citosólicas muestran que tanto Leu4 como Leu9 en el citosol son capaces de realizar la síntesis de leucina.

8. PERSPECTIVAS

Para completar este trabajo y entender mejor la importancia de la localización de este par de enzimas mitocondriales, debe completarse la colección de cepas con enzimas citosólicas mediante la construcción de la cepa Leu4cit Leu9cit. Dicha mutante se construyó para este estudio pero no fue posible utilizarla ya que la cepa de la cual se partió tenía un problema de crecimiento (anexo F).

Una vez que se tengan todas las cepas es necesario medir la actividad de las enzimas citosólicas. Es importante saber de manera certera que las proteínas citosólicas son capaces de plegarse y llevar a cabo la reacción de síntesis de α -IPM, independientemente de los residuos de aminoácidos eliminados.

También se sugiere estudiar el perfil de expresión de los genes que codifican para estas enzimas parálogas y así poder compararlo con las cepas descritas por López *et al.* (2015). El estudio de la expresión de los genes *ILV2*, *ILV5*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *GDH1*, bajo la influencia del complejo regulador Leu3- α -IPM también es conveniente. Asimismo, puede realizarse un Western Blot para estudiar de manera más directa la presencia de las proteínas.

Realizar un estudio de concentración de otros metabolitos, tales como α -IPM, valina, isoleucina, Acetil-CoA y KIV, podría ayudarnos a esclarecer a qué se deben las diferencias en velocidades de crecimiento. De igual manera sería de importancia saber si existe la acumulación de algún metabolito que esté drenando otras rutas de síntesis.

Finalmente, es necesario demostrar si fuera de la mitocondria las proteínas son capaces de formar heterodímeros. Esto puede analizarse por medio de un gel nativo de agarosa (López *et al.*, 2015) una vez que se tenga la cepa con las dos proteínas localizadas en el citosol.

9. ANEXOS

A. Identidad de proteínas Leu4 y Leu9

Las proteínas Leu4 y Leu9 de *Saccharomyces cerevisiae* tienen una identidad del 82.7% en su secuencia de residuos de aminoácidos.

82.7% identity in 601 residues overlap; Score: 2620.0; Gap frequency: 0.3%

```
Leu4p      1  MVKESIALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSKYKPFNAPKLSNRKWPDNRIIRA
Leu9p      1  MVKHSFIALAEHA-SKLRRSIPPVKLTYKNMLRDPSVKYRAFAPPKMKRIWPKTIQKA
          *** * ***** * * ***** ***** ** * ** * ** * *

Leu4p     61  PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKEYFHKLNVNIGFKEIEVSFSPASQTDFFDFTRYAVEN
Leu9p     60  PRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVAQKEYFHKLINIGFKEIEVSFSPASQTDFFDFTRYAVEN
          *****

Leu4p    121  APDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHITYLATSDFREIVFNMSREEAISKAV
Leu9p    120  APDDVGIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRATIHITYLATSDFREIVFNMSREEAISKAV
          *****

Leu4p    181  EATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSPKCFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTEENPIIFN
Leu9p    180  EATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSPKCFSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTEENPIIFN
          *****

Leu4p    241  LEATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG
Leu9p    240  LEATVEVASPNVYADQIEYFSTHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADRVEG
          *****
```

Figura 17. Alineamiento de los primeros 300 aminoácidos de la secuencia primaria de las proteínas Leu4 y Leu9. El cuadro rojo muestra la MTS e inmediatamente se observa la segunda metionina (ATG) en marco de lectura. Los 12 aminoácidos marcados en morado corresponden al sitio activo.

B. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Aplicación
JH 1	TGCCACCATTAACAATATTATCCATT	Fw Secuencia para amplificar 94pb del extremo 3' de <i>LEU4</i> , yECitrine y <i>URA3</i> de la cepa BY4741-701.
JH 2	ATTTAGACATCCGTGCTTCTAGTAA	Rv Secuencia para amplificar 113pb de la UTR 3' de <i>LEU4</i> , yECitrine y <i>URA3</i> de la cepa BY4741-701.
JH 3	AATCTTTCCTACATAAAGGACATCAA	Fw Secuencia para amplificar 150pb del extremo 3' de <i>LEU9</i> , yECitrine y <i>URA3</i> de la cepa BY4741-702.
JH 4	AATAAGTTACTTTTCTGTGCCATTT	Rv Secuencia para amplificar 80pb de la UTR 3' de <i>LEU9</i> , yECitrine y <i>URA3</i> de la cepa BY4741-702.
JH 5	ATGCTTAAGGACCCTTCTCCAAGT	Fw Secuencia que amplifica 90pb río abajo del codón de inicio de <i>LEU4</i> . Junto con JH2 se amplifica el módulo del gen sin la MTS, con yECitrine y <i>URA3</i> a partir de la cepa BY4741-701.
JH 6	agaaaaaaaaaggattctcacactagaagttagtag acttttcttacaaaaagacaaggaacaatc ATGCT TAAGGACCCTTCTCCAAGT	Fw Letras minúsculas corresponden a 70pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> ; mayúsculas al oligonucleótido JH5; negritas al codón de inicio. Se agregan 70pb al módulo obtenido con JH5 y JH2.
JH 7	CTACGGGACCCATCGGTAAATATA	Fw Secuencia que amplifica 87pb río abajo del codón de inicio de <i>LEU9</i> . Junto con JH4 se amplifica el módulo del gen sin la MTS, con yECitrine y <i>URA3</i> a partir de la cepa BY4741-702.
JH 8	ctgttttcggcttataagggtcttctccttaggataatactat cggcacattatcatttagccgtagcc ATGCTACG GGACCCATCGGTAAATATA	Fw Letras minúsculas corresponden a 70pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU9</i> ; mayúsculas al oligonucleótido JH7; negritas al codón de inicio. Se agregan 70pb al módulo obtenido con JH7 y JH4.
JH 9	AAAAAAGGATTCTCACACTAGAAGT	Fw Amplifica 66pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> . Confirmar la eliminación de la MTS.
JH 10	GGCAGAGATTGGTTACCATCT	Rv Amplifica 227pb río abajo del codón de inicio de <i>LEU4</i> . Confirmar la eliminación de la MTS.
JH 11	TGTTTTCGGCTTATAAGGGTCT	Fw Amplifica 70pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU9</i> . Confirmar la eliminación de la MTS.

JH 12	AAGTCAGTAGACAGCCAACG	Rv Amplifica 200pb río abajo del codón de inicio de <i>LEU9</i> . Confirmar la eliminación de la MTS.
JH 13	CTCACACTAGAAGTTTACTGTAGACTT TTT	Fw Amplifica 55pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> . Secuenciar el gen completo con JH14.
JH 14	AATTGGGACAACACCAGTGAATAATT	Rv Amplifica 42pb río abajo de yECitrine. Secuenciar el gen completo de las cepas fusionadas con yECitrine.
JH 15	TGTTTTCGGCTTATAAGGGTCT	Fw Amplifica 110pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU9</i> . Secuenciar el gen completo con JH14.
JH 16	TGAGTTGAATGTGTGTCATACTTGG	Fw Amplifica 370pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> .
JH 17	TTTGTTC AATTCGTC ACTA A CCG	Rv Amplifica 249pb río abajo del codón de paro de <i>LEU4</i> .
JH 18	TCATATTTTTCCATCTCTTTTCGGCC	Fw Amplifica 253pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU9</i> .
JH 19	ATTCGGATTCAGTTAAGATTATGCG	Rv Amplifica 259pb río abajo del codón de paro de <i>LEU9</i> .
JH 20	ACTAGAAGTTTACTGTAGACTTTTTCT TACAAAAAGACAAGGAACAATCgacatgg aggcccagaataaccctcc	Fw Mayúsculas corresponden a 50pb río arriba del codón de inicio de <i>LEU4</i> , minúsculas amplifican el inicio del gen <i>hphMX6</i> del plásmido pBS4.
JH 21	AAGTATAGAAATAAATAGAAGCGAATA AGTCCTGAAATACAGAAAAGTTCcagtat agcgaccagcattcacata	Rv Mayúsculas corresponden a 50pb río abajo del codón de paro de <i>LEU4</i> , minúsculas amplifican el término del gen de <i>hphMX6</i> del plásmido pBS4.
JH 22	CATCTTTGGCCGAGGTCTGAAGGTAAG AATGCTGCGGCATCTGGCTCTGCagac ggatccccgggtaattaa	Fw Mayúsculas 50pb río arriba del codón de término (sin el codón de término) de <i>LEU4</i> , minúsculas 23pb río arriba del inicio del gen CFP del plásmido pBS4.
JH 23	AGGAAAGGAAGTAAATAAATAAGTATA GAAATAAATAGAAGCGAATAAGTCCTG AAATACAGAAAAGTTCagtatcgaatcgacag cagtat	Rv Mayúsculas 50pb río abajo del codón de término de <i>LEU4</i> , minúsculas 22pb río arriba del codón de término del gen <i>hphMX6</i> del plásmido pBS4.
JH 24	CTTGGGTAGAGAACTAAAATCAGATGA G	Fw 502pb río arriba del codón de término de <i>LEU4</i> .
JH 25	GCGCGCGCGGCCGCTTATGCAGAGC CAGATGCCG	Rv 3' del gen <i>LEU4</i> .
JH 26	CAATTAGCTGACCATTATCAACAAAAT ACTC	Fw 189pb río arriba del codón de término de yECitrine

JH 27	TCTTTGGATAAGGCAGATTGATAGGAT A	Rv 116pb río arriba del codón de término de yECitrine
JH 28	AAGACCTATAGTGAGAGAGCAGAAAC	FW 41pb río abajo del codón de inicio de <i>URA3</i> de pKT175.
JH 29	GATGTTTACGTGAAAGTTCTAATAATG GTTC	Rv 259 río abajo del codón de inicio de <i>URA3</i> del plásmido pKT175.
JH 30	GGTCAGACTAAACTGGCTGAC	FW 565pb río abajo del codón de inicio de <i>kanMX4</i> del plásmido pFA6A.
JH 31	TGAAGGAGAAAACACCGAGGC	Rv 316pb río arriba del codón de término del gen <i>kanMX4</i> del plásmido pFA6A.

C. Plásmidos utilizados en este trabajo

El plásmido pBS4 se utilizó para obtener el gen de resistencia a higromicina para la construcción de la cepa *leu4Δ::hphMX6 LEU9cit-yECitrine*.

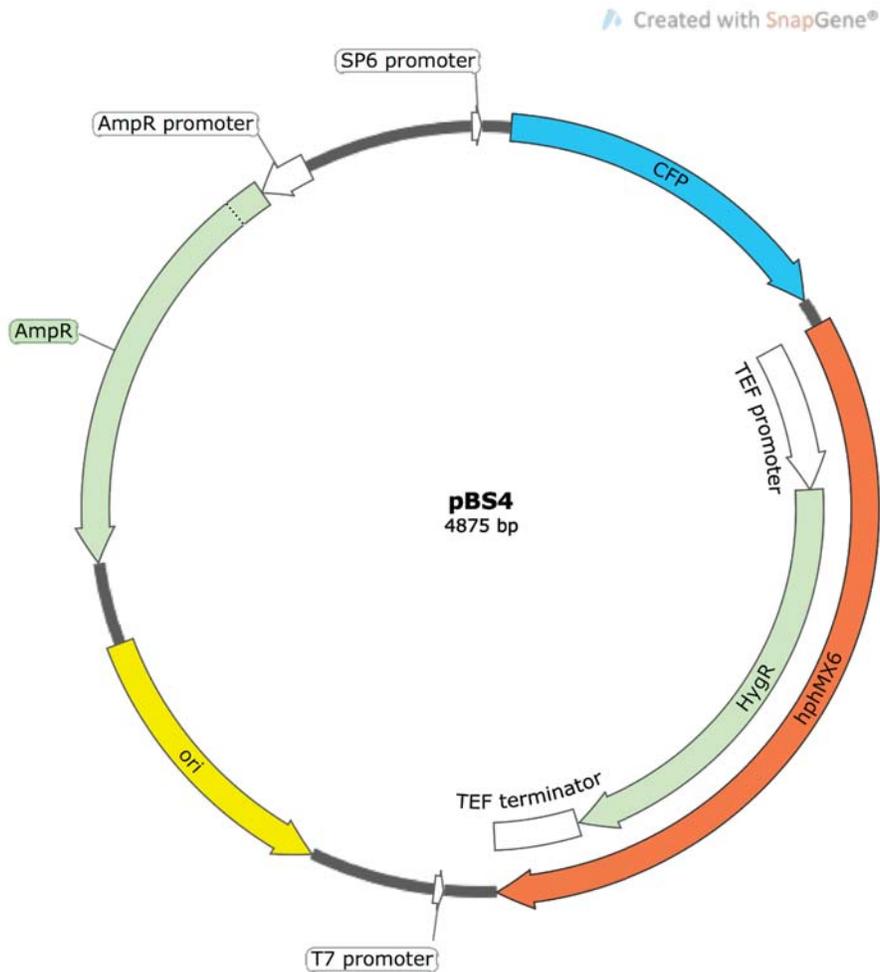


Figura 18. Plásmido pBS4. Tiene la proteína fluorescente cian (CFP) y el marcador de selección que le confiere resistencia a higromicina (*hphMX6*). El plásmido se puede replicar en *Escherichia coli* y seleccionar con ampicilina en este organismo.

D. Estrategia de eliminación de MTS

Para la obtención de los módulos con los que se transformaron las cepas *leu4Δ* y *leu9Δ* se siguió la estrategia mostrada en el esquema de la figura 19. Los oligonucleótidos JH5 y JH7 corresponden al OligoA, JH2 y JH4 corresponden al OligoB mientras que JH6 y JH8 corresponden al OligoC. Estos últimos se utilizaron a una concentración de 0.2μM debido a su longitud.

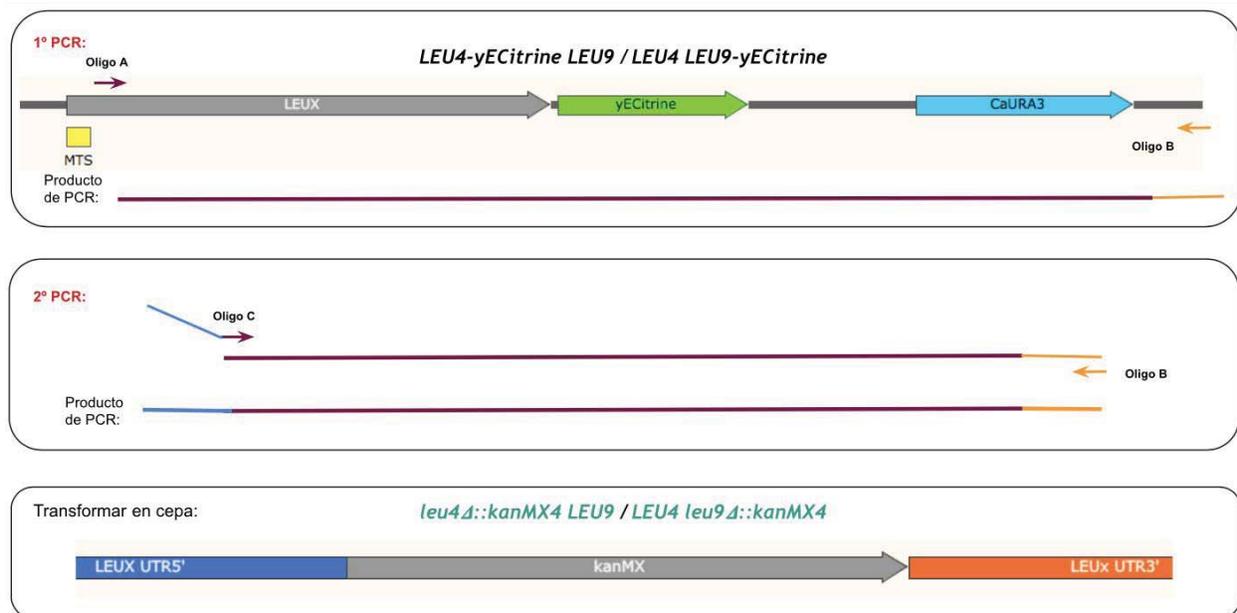


Figura 19. Esquema de posicionamiento de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los módulos con los que se generaron las cepas con proteínas citosólicas.

E. Comprobación de mutantes por PCR

Las mutantes con las proteínas citosólicas *LEU4^{cit}*, *LEU9*, *LEU4 LEU9^{cit}*, *leu4Δ*, *LEU9^{cit}* y *LEU4^{cit} leu9Δ* se comprobaron al comparar productos de PCR de la región 5' del ORF de cada gen con los de la cepa *LEU4 LEU9* (WT). La diferencia es de 90 y 87 pares de bases para *LEU4* y *LEU9* respectivamente.

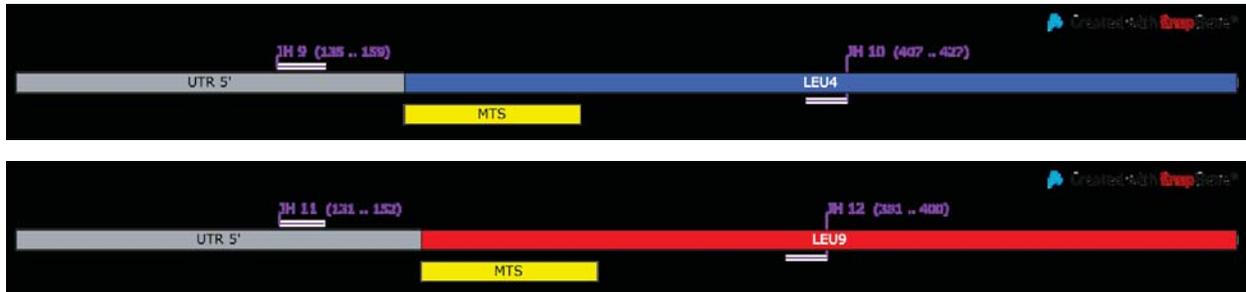


Figura 20. Localización de oligonucleótidos de comprobación sobre los genes *LEU4* y *LEU9*.

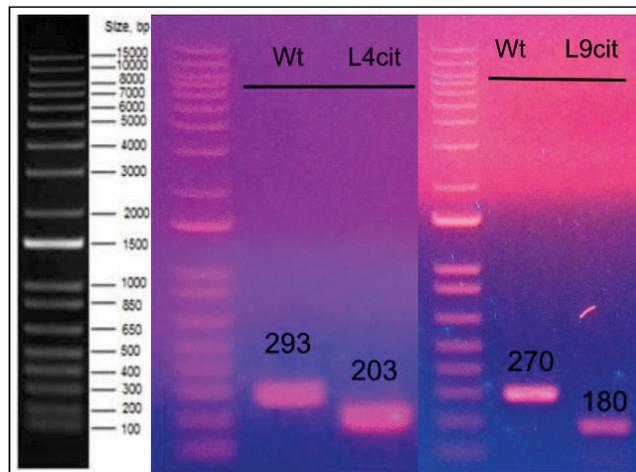


Figura 21. Gel de productos de PCR de comprobación.

F. Construcción de cepa *Leu4cit-CFP Leu9cit-yECitrine*

Se construyeron las cepas: 1) *LEU4cit-yECitrine leu9Δ::kanMX4*, 2) *leu4Δ::natMX6 LEU9cit-yECitrine* y 3) *LEU4cit-CFP LEU9cit-yECitrine* a partir de la cepa *leu4Δ::natMX6 leu9Δ::kanMX4* que se encontraba previamente en el laboratorio. Una vez que se realizaron las pruebas de velocidad de crecimiento se observó que la cepa que se utilizó para transformar (*leu4Δ::natMX6 leu9Δ::kanMX4*) y dar origen a las tres cepas mencionadas no presentaba el mismo fenotipo que la cepa *leu4Δleu9Δ* reportada por López *et al.* (2015), por lo que se decidió construir nuevamente las 3 cepas por distintas estrategias. Como consecuencia, la cepa que tiene las dos enzimas (Δ -IPMs) en el citosol (*LEU4cit LEU9cit*) aún está en proceso de construcción.

10. APÉNDICES

A. Medios de cultivo

YPD (medio de cultivo rico)

		[final]
Extracto de levadura	10 g	1 %
Peptona de caseína	20 g	2 %
Dextrosa anhidra	20 g	2 %
Agar (sólo medio sólido)	20 g	2 %
Agua bidestilada	Aforar a 1 L	

YPAD glicerol (medio para crioconservación)

		[final]
Extracto de levadura	10 g	1 %
Peptona de caseína	20 g	2 %
Dextrosa anhidra	20 g	2 %
Adenina	0.8 g	0.008 %
Glicerol	300 mL	30 %
Agua bidestilada	Aforar a 1 L	

MM

		[final]
Stock vitaminas 1000x	1 mL	1x
Stock trazas 1000x	1 mL	1x
Stock sales 50x	20 mL	1x
Dextrosa anhidra o etanol	20 g o mL	2 %
Sulfato de amonio	5 g	0.5 %
Agar (sólo medio sólido)	25 g	2.5 %
Agua bidestilada	Aforar a 1 L	

B. Obtención de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

- Inocular 10 mL de YPD con una asada de la cepa. Incubar a 30°C, 250 rpm toda la noche.
- Centrifugar a 3,000 rpm por 2-5 min a temperatura ambiente (t.a.) para coleccionar las células. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 1 mL de H₂O bidestilada que haya sido estéril y transferir a un tubo de 1.5 mL (que haya sido estéril).
- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 s. Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 200 µL de una solución de: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na-EDTA (romper membranas).
- Agregar 300 µL de Fenol (pH 8):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), ésta debe ser preparada al momento (limpiar ADN).
- Agregar 0.3 g de perlas de vidrio a cada muestra.
- Mezclar con vórtex (máxima velocidad) por 5 min. Adicionar 200 µL de TE pH 8.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL.
- Agregar 400 µL de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5 mL. Repetir pasos 10 y 11.
- Agregar 1 mL de etanol al 100% + 10 µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante con pipeta hasta dejar completamente seco.
- Resuspender el pellet en 400 µL de TE + 10 µL de RNasa A (10 mg/mL). Incubar a 37°C por 30 min.
- Agregar 1 mL de etanol al 100% + 10 µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14,000 rpm por 2 min. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 200 µL de etanol al 70% frío y dejar secar el pellet a t.a. por 30 min (o hasta que esté completamente seco).
- Resuspender en un volumen adecuado (50-100 µL) de H₂O bidestilada que haya sido estéril.
- Cuantificar y mantener a -20 °C.

C. Transformación de *S. cerevisiae* con acetato de litio

* Todo en esterilidad

- Inocular 10 mL de YPD con una colonia de la cepa a transformar. Incubar a 30°C, 250 rpm toda la noche.
- Inocular 50 mL de YPD a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.2 - 0.25.
- Incubar a 30°C, 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5 - 0.6.
- Colectar las células en un tubo de 50 mL y centrifugar a 3,000 rpm por 2-3 min a t.a.. Resuspender en 40 mL de H₂O estéril, vortexear y volver a centrifugar para colectar.
- Resuspender en 1 mL de H₂O estéril y transferir a un tubo de 1.5 mL.
- Recuperar células (14,000 rpm por 15 s) y descartar el sobrenadante.
- Lavar con 1 mL de TE/LiOAc recién preparado. Recuperar células y descartar sobrenadante.
- Resuspender las células en 200 μ L de TE/LiOAc (Resuspender con pipeta y 3 s en vórtex).
- Colocar 70 μ L de células en 3 tubos de 1.5 mL (células a transformar + 2 controles).
- Agregar 1 μ g del producto de purificado de PCR y 100 μ g de ADN acarreador.
 - ADN acarreador: ADN de esperma de salmón, previamente sonicado. Hervir por 5 min e incubar en hielo por 5 min antes de utilizar.
- Mezclar con vórtex.
- Adicionar 300 μ L de PEG/TE/LiOAc al 50% recién preparado y mezclar con vórtex.
- Incubar a 30°C, 250-300 rpm, 30 min.
- Someter a choque térmico a 42°C por 15 min (sin agitación).
- Para selección por auxotrofia:
 - Colectar las células y resuspender en 200 μ L de H₂O estéril.
 - Plaquear 100 μ L de células en las cajas con medio (suplementado si es el caso).
 - Poner aproximadamente 20 perlas de vidrio estériles para dispersar las células. Removerlas cuando se haya secado la caja.
 - Incubar a 30°C.
- Para selección por antibiótico:
 - Preparar tubos falcon de 50 mL con 3 mL de YPD.
 - Centrifugar células a 14,000 rpm, 30 s. Eliminar el sobrenadante con pipeta.
 - Resuspender el botón celular en 1 mL de YPD y transferir al tubo con 3 mL de YPD.
 - Incubar a 30°C por 3 horas a 250 rpm.
 - Colectar células por centrifugación y resuspender en 400 μ L de YPD.
 - Plaquear 100 μ L de células en las cajas con medio (suplementado si es el caso).

- Poner aproximadamente 20 perlas de vidrio estériles para dispersar las células. Removerlas cuando se haya secado la caja.
- Incubar a 30°C.

Reactivos:

TE/LiOAc	Vol.	[Concentración final]
H ₂ O	1.8 mL	-
LiOAc 1 M pH 7.5	200 µL	100 mM
Tris-HCl 1 M pH 7.5	20 µL	10 mM
EDTA 0.5 M	4 µL	1 mM

PEG/TE/LiOAc	Vol.	[Concentración final]
PEG 50%	1.8 mL	-
LiOAc 1 M pH 7.5	200 µL	100 mM
Tris-HCl 1 M pH 7.5	20 µL	10 mM
EDTA 0.5 M	4 µL	1 mM

D. Preparación de muestras para observar en microscopio

- Inocular con una colonia de cada cepa 10 mL de medio YPD. Incubar a 30 °C, 250 rpm toda la noche.
- Inocular un matraz con 50 mL de medio mínimo con glucosa o etanol como fuente de carbono a una DO_{600nm} de 0.05 - 0.3.
- Incubar a 30 °C, 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.7 - 1.
- Preparar agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1.5%.
- En un tubo estéril colocar 1 mL de cultivo y añadir 1 μ L de MitoTracker (Stock 1 mM), cubrir de la luz e incubar a 30°C en agitación por 15 min.
- Centrifugar las células a 12,000 rpm por 3 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender en 1 mL de agua estéril y centrifugar a 12,000 rpm por 3 minutos. Repetir este paso una vez más.
- Preparar porta y cubreobjetos (limpios y marcados).
- Resuspender en 200 μ L de agua.
- Montar en los portaobjetos 2 μ L de células + 30 μ L de agarosa 1.5%.

E. Extracción de metabolitos intracelulares

- Inocular 10 mL de YPD con una colonia de la cepa a usar. Incubar a 30 °C, 250 rpm toda la noche.
- Inocular un matraz de 50 mL con medio mínimo (glucosa o etanol) a la DO_{600nm} calculada para que llegue a las DO_{600nm} deseada en el tiempo establecido.
- Colocar en tubos estériles de 50 mL y centrifugar a 3,000 rpm por 5 min. *Si se requiere, puede guardarse el pellet a -70 °C overnight.
- Resuspender el pellet en 2 mL de amortiguador HEPES 0.1 M pH 8 frío. Mantener en hielo.
- Poner en baño María 5 min.
- Transferir el contenido a 2 tubos de 1.5 mL. Centrifugar a 4 °C, 14,000 rpm, 15 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5 mL midiendo con la pipeta el volumen total. Registrar el volumen.
- Centrifugar a 13,000 rpm, 1 min.
- Transferir 500 μ L del sobrenadante a otro tubo limpio y agregar 200 μ L de $HClO_4$ al 71% para precipitar proteínas.
- Centrifugar a 13,000 rpm, 2 min. No separar el sobrenadante. *Si se requiere, puede guardarse el tubo a -70 °C.
- Neutralizar agregando 100 μ L de KOH 22 M y posteriormente gotas de 10 μ L hasta alcanzar un pH 7 - 7.5. Mantener en hielo durante este paso.
- Centrifugar a 14,000 rpm, 2 min.
- Tomar el sobrenadante midiendo el volumen con la pipeta (registrar). Desechar el precipitado (sales de $KClO_4$).
- Guardar a -20 °C para su análisis por HPLC.

REFERENCIAS

- Avalos JL, GR Fink, G Stephanopoulos (2013) Compartmentalization of metabolic pathways in yeast mitochondria improves production of branched chain alcohols. *Nat Biotechnol* **31**(4):335-341
- Beltzer JP, SR Morris, GB Kohlhaw (1988) Yeast *LEU4* encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of α -isopropylmalate synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **263**(1):368-374
- Brat D, C Weber, W Lorenzen, HB Bode, E Boles (2012) Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **5**:65.
- Casalone E, C Barberio, D Cavalieri, M Polsinelli (2000) Identification by functional analysis of the gene encoding α -isopropylmalate synthase II (*LEU9*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**:539-545
- Chacinska A, CM Koehler, D Milenkovic, T Lithgow, N Pfanner (2009) Importing mitochondrial proteins: Machineries and mechanisms. *Cell* **138**:628-644.
- Chang LL, TS Cunningham, PR Gatzek, WJ Chen, GB Kohlhaw (1984) Cloning and characterization of yeast *LEU4*, one of the two genes responsible for α -isopropylmalate synthesis. *Genetics* **108**(1):91-106
- Chang LL, PR Gatzek, GB Kohlhaw (1985) Total deletion of yeast *LEU4*: Further evidence for a second α -isopropylmalate synthase and evidence for tight *LEU4-MET4* linkage. *Gene* **33**:333-339
- Compagno C, S Dashko, J Piskur (2014) Introduction to carbon metabolism in yeast. In *Molecular Mechanism in Yeast Carbon Metabolism*, pp.1-19 Springer
- Dashko S, N Zhou, C Compagno, J Piskur (2014) Why, when and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* **14**:826-832
- Duina AA, ME Miller, JB Keeney (2014) Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* **197**:33-48
- Escalera-Fanjul X, H Quezada, L Riego-Ruiz, A González (2019) Whole-genome duplication and yeast's fruitful way of life. *Trends in Genetics* **1510**:1-13
- Goffeau (1996) Life with 6000 genes, *Science* **274**(5287):546-567
- Gómez-Puyou A (2019) *Conociendo las moléculas de la vida: un viaje inesperado*, Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México
- González J, G López, S Argueta, X Escalera-Fanjul, M El Hafidi, C Campero-Basaldúa, J Strauss, L Riego Ruiz, A González (2017) Diversification of transcriptional regulation determines subfunctionalization of paralogous branched chain aminotransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **207**(3):975-991
- Hagman A, T Säll, C Compagno, J Piskur (2013) Yeast "make-accumulate-consume" life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS ONE* **8**(7):e68734
- Hailey DW, Davis TN, Muller EG (2002) Fluorescence resonance energy transfer using color variants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **351**:34-49

Hinnen A, JB Hicks, GR Fink (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci* **75**(4):1929-1933

Jara-Servín AM (2019) Identificación de los elementos regulatorios involucrados en el control de la expresión del gen *LEU9* por su parálogo *LEU4* en la levadura *S. cerevisiae*: Implicaciones fisiológicas de la interrelación *LEU4/LEU9* (Tesis de maestría) UNAM, CDMX

Kellis M, BW Birren, ES Lander (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **8**:617-624

Kohlhaw GB (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(1):1.15

Levy A (2019) Genes from the junkyard. *Nature* **574**:314-316

López G, H Quezada, M Duhne, J González, M Lezama, M El-Hafidi, M Colón, X Escalera-Fanjul, MC Flores-Villegas, C Scazzocchio, A DeLuna, A González (2015) Diversification of paralogous α -isopropylmalate synthases by modulation of feedback control and hetero-oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **14**:564–577.

Marcet-Houben M, T Gabaldón (2015) Beyond the whole-genome duplication: phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *PLoS Biol* **13**(8): e1002220. doi:10.1371/journal.pbio.1002220.

Money NP (2018) *The rise of yeast: how the sugar fungus shaped civilization*, New York, United States of America: Oxford University Press

Mortimer RK, JR Johnston (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**:35-43

Nissen TL, U Schulze, J Nielsen, J Villadsen (1997) Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**:203-218

Omura F (2008) Targeting of mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* Ilv5p to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**:503-513.

Ortiz-Merino RA (2013) Interactoma en la red metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*. Análisis de centralidad y evaluación funcional de las enzimas indispensables para el crecimiento (Tesis de maestría) UNAM, CDMX

Piskur J, E Rozpedowska, S Polakova, A Merico, C Compagno (2006) How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics* **22**(4):183-186

Quezada H, A Marín-Hernández, D Aguilar, G López, JC Gallardo-Pérez, R Jasso-CHávez, A González, E Saavedra, R Moreno-Sánchez (2011) The Lys20 homocitrate synthase isoform exerts most of the flux control over the lysine synthesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology* **82**(3):578-590

Roman H (1986) The early days of yeast genetics: a personal narrative. *Ann Rev Genet* **20**:1-12

Schindelin J, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, JY Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak, A Cardona (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**(7):676-682

van den Berg MA, HY de Steensma (1995) ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur. J. Biochem* **231**:704-713

Voordeckers K, KJ Verstrepen (2015) Experimental evolution of the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology* **28**:1-9

Winzeler EA, DD Shoemaker, A Astromoff, H Liang, K Anderson, B ANDre, R Bangham, R Benito, JD Boeke, H Bussey, AM Chu, C Connelly, K Davis, F Dietrich, SW Dow, M El-Bakkoury, F Foury, SH Friend, E Gentalen, G Giaever, JH Hegemann, T Jones, M Laub, H Liao, N Liebundguth, DJ Lockhart, A Lucau-Danila, M Lussier, N M'Rabet, P Menard, M Mittmann, C Pai, C Rebischung, JL Revuelta, L Riles, CJ Roberts, P Ross-MacDonald, B Scherens, M Snyder, S Sookhai-Mahadeo, RK Storms, S Véronneau, M Voet, G Volckaert, TR Ward, R Wysocki, GS Yen, K Yu, K Zimmermann, P Philippsen, M Johnston, RW Davis (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**:901-906

Wolfe KH (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* **2**:333-341

Wolfe KH, DC Shields (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**:708-713

Yan-Tong AH, G Lesage, GD Bader, H Ding, H Xu, X Xin, J Young, GF Berriz, RL Brost, M Chang, Y Chen, X Cheng, G Chua, H Friesen, DS Goldberg, J Haynes, C Humphries, G He, S Hussein, L Ke, N Krogan, Z Li, JN Levinson, H Lu, P Ménard, C Munyana, AB Parsons, O Ryan, R Tonikian, T Roberts, AM Sdicu, J Shapiro, B Sheikh, B Suter, SL Wong, LV Zhang, H Zhu, CG Burd, S Munro, C Sander, J Rine, J Greenblatt, M Peter, A Bretscher, G Bell, FP Roth, GW Brown, B Andrews, H Bussey, C Boone (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**(5659):808-813

Yang J, R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* **12**:7-8

Yang J, Y Zhang (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research* **43**:W174-W181

Yuan J, P Mishra, CB Ching (2016) Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **44**(1):107-117.

Zhang J (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:292-298