



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización de los parámetros cinéticos de las proteínas parálogas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Liliana Guadalupe Vigueras Meneses

TUTOR PRINCIPAL

Dra. María Alicia González Manjarrez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Servín González
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Mario Soberón Chávez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Octubre, 2020



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.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
La duplicación genética en la evolución.....	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>).....	10
Levaduras “tipo ancestral”.....	14
ANTECEDENTES	18
<i>Lachancea kluyveri</i> (<i>L. kluyveri</i>).....	18
La biosíntesis de leucina en <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. kluyveri</i> , y <i>K. lactis</i>	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
Caracterización Fenotípica	31
Extracción de ADN genómico de levadura.....	31
Construcción de doble mutante <i>Lkleu4ΔLkleu4bisΔ</i>	32
Cultivo de levaduras y caracterización fenotípica.....	36
Caracterización de los Parámetros Cinéticos	38
Clonación de <i>LkLEU4</i> y <i>LkLEU4BIS</i>	38
Expresión de las proteínas recombinantes <i>LkLeu4</i> y <i>LkLeu4Bis</i>	40
Purificación de las proteínas recombinantes <i>LkLeu4</i> y <i>LkLeu4Bis</i>	40
Determinación de la concentración de proteína.....	41
Determinación de la Actividad Específica de las α -IPMSs.....	41
Cálculo de los parámetros cinéticos de las enzimas <i>LkLeu4</i> y <i>LkLeu4Bis</i> ..	43
Cinéticas de Inhibición por leucina.....	44
Cálculo de la concentración inhibitoria media (IC ₅₀)	45
RESULTADOS	46
Caracterización Fenotípica	46
Comprobación de las mutantes sencillas.....	46
Construcción de la doble mutante <i>Lkleu4ΔLkleu4bisΔ</i>	49
Análisis fisiológico de las mutantes <i>Lkleu4Δ</i> , <i>Lkleu4bisΔ</i> y.....	53
<i>Lkleu4ΔLkleu4bisΔ</i> .	

Caracterización de los Parámetros Cinéticos.....	56
Expresión de las proteínas <i>LkLeu4</i> y <i>LkLeu4Bis</i>	60
Cálculo de los parámetros cinéticos de las enzimas <i>LkLeu4</i> y.....	62
<i>LkLeu4Bis</i>	
DISCUSIÓN.....	67
Análisis fisiológico de las mutantes <i>Lkleu4Δ</i> , <i>Lkleu4bisΔ</i> y.....	67
<i>Lkleu4ΔLkleu4bisΔ</i> .	
Caracterización de los parámetros cinéticos de <i>LkLeu4</i>	69
y <i>LkLeu4Bis</i>	
Otros datos relevantes obtenidos en nuestro grupo de trabajo.....	72
CONCLUSIONES.....	75
ANEXOS.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

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. Alicia González Manjarrez Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Mario Soberón Chávez Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Luis Servín González Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce a la QFB Cristina Aranda Frausto y a la QFB Beatriz Aguirre López, por su importante labor para el funcionamiento del laboratorio.

Se reconoce la amable ayuda y el invaluable apoyo secretarial brindado por María del Rocío Romualdo Martínez, secretaria del Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, de la cual es responsable la Dra. Laura Ongay Larios, por los servicios de secuenciación y síntesis de oligonucleótidos.

Se reconoce a los integrantes de la Unidad de Computo y del Taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular, por su trabajo para mantener el buen funcionamiento de los equipos del laboratorio y del instituto.

Se reconoce a los integrantes de la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo y atención brindados, especialmente a la secretaria técnica, M. en C. Norma Trejo Medina por su disposición, guía y paciencia.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del donativo CB-2014-239492-B y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, donativo PAPIIT número: IN204018.

Durante los estudios de maestría conté con una beca para estudios del posgrado otorgada por CONACyT, número de becario: 245713. Se reconoce el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP), por la ayuda proporcionada.

Se reconoce a la Asociación Mexicana de Bioquímica (SMB), por el apoyo brindado para asistir al Quinto Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas, en 2015, para presentar los avances de este proyecto.

Se reconoce el apoyo proporcionado por la Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXID), a través del proyecto MX14MO08, para participar en una estancia de investigación en la Universidad de Roma “La Sapienza”, Italia, en junio-julio de 2016.

El jurado de examen de maestría que participó en las correcciones finales del presente trabajo fue conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Roberto Coria Ortega Instituto de Fisiología Celular, UNAM
VOCAL	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco Facultad de Medicina, UNAM
VOCAL	Dra. Gloria Soberón Chávez Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
VOCAL	Dra. Lina Raquel Riego Ruiz Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.
SECRETARIO	Dr. Jesús Aguirre Linares Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Alicia González por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí, por su asesoría y enseñanza, por ser un ejemplo de entusiasmo y perseverancia. Gracias por ayudarme a cerrar este ciclo.

Agradezco al Dr. Mario Soberón Chavez y al Dr. Luis Servín González, miembros del comité tutorial, por sus consejos y guía recibidos durante los exámenes tutorales.

Agradezco a los miembros del jurado por su tiempo y por las pertinentes sugerencias sobre este manuscrito.

Agradezco a la Dra. Lina Riego Ruiz por la donación de cepas y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

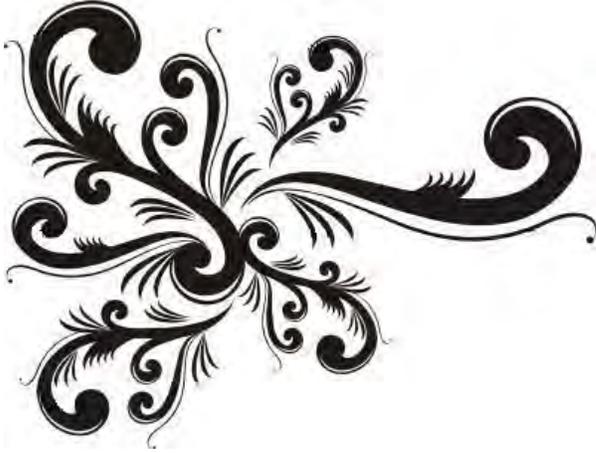
A mi mamá(†), a mi papá y a mi hermano, porque siempre estuvieron en las buenas y en las malas y por hacerme saber que puedo contar con ellos. Gracias.

A Ricardo, por ser mi amor, mi amigo, mi cómplice y mi refugio. Por estar siempre de mi lado y ser mi equipo. A Minerva, mi nenita hermosa, por hacerme mejor persona y llenarme todos los días de tu luz. Los amo infinitamente.

DEDICATORIA

Inicié esta maestría en el año 2010. Ha sido un camino inusualmente largo, donde ha habido algunas despedidas y muchas bienvenidas. Y es por eso que al escribir estas líneas, se me vienen a la mente una cantidad enorme de nombres. Junto a esa vorágine que me llena la cabeza con rostros, el corazón se me va inundando con cariño y agradecimiento infinito. Sirva pues, este párrafo para dedicarles a tan maravillosas personas este trabajo, ya que su calidez, fuerza, paciencia, apoyo, ánimo y compañía, han sido pilares en mi vida.

A ustedes: Familia que son amigos y amigos que son familia.



No te rindas
(Autor desconocido)

No te rindas, aún estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.

No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.

Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.

Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos,

No te rindas por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero.



ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
α -KIV	Alfa-cetoisovalerato
α -IPM	Alfa-isopropilmalato
α -IPMs	Alfa-isopropilmalato sintasa
aa	Aminoácidos
AcCoA	Acetil Coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Actividad específica
CoA	Coenzima A
DTT	Ditiotreitol
ε	Coefficiente de extinción molar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G418	Geneticina
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria media
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosidosido
K _a	Constante de Michaelis para el sustrato A (K _m para AcCoA)
K _b	Constante de Michaelis para el sustrato B (K _m para α -KIV)
K _{ia}	Constante de disociación del AcCoA del complejo enzima-sustratos
K _{ib}	Constante de disociación del α -KIV del complejo enzima-sustratos
K _{is}	Constante de disociación del inhibidor y la enzima libre
K _{ij}	Constante de disociación del inhibidor y el complejo enzima-sustratos
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
k _{cat}	Constante de velocidad catalítica
KDa	Kilodaltones
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>L. kluyveri</i>	<i>Lachancea kluyveri</i>
<i>Lkleu4</i> Δ	Mutante de <i>L. kluyveri</i> con una deleción en el gen <i>LkLEU4</i>
<i>Lkleu4bis</i> Δ	Mutante de <i>L. kluyveri</i> con una deleción en el gen <i>LkLEU4BIS</i>
<i>Lkleu4</i> Δ <i>Lkleu4bis</i> Δ	Mutante de <i>L. kluyveri</i> con deleciones en los genes <i>LkLEU4</i> y <i>LkLEU4BIS</i>
MM	Medio Mínimo
M	Molar

mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ	Velocidad específica de crecimiento
min	Minutos
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
Nat	Nourseotricina
NH ₄	Sulfato de amonio
nm	Nanómetros
OD _{600nm}	Densidad óptica leída a 600 nanómetros
ORF	Marco de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSD	Duplicación a pequeña escala (<i>Small-Scale Duplication</i>)
td	Tiempo de duplicación
UTR	Region no traducida de un gen (<i>Untranslated Region</i>)
<i>V</i>	Velocidad Inicial
<i>V</i> _{max}	Velocidad máxima
WGD	Duplicación completa del genoma (<i>Whole Genome Duplication</i>)
WT	Se refiere a una cepa silvestre (<i>Wild Type</i>)
YNB	Base para preparar medio mínimo (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPD	Medio rico en nutrientes
YPD-Leu	Medio rico en nutrientes, suplementado con leucina al 1%
Δ	Símbolo que representa una delección
::	Símbolo que representa una inserción
\approx	Símbolo que representa una aproximación

RESUMEN

La duplicación génica constituye una fuente primaria de material para generar innovaciones evolutivas. En *Saccharomyces cerevisiae*, los genes duplicados *LEU4* y *LEU9* codifican para las isoenzimas α -isopropilmalato sintasas Leu4 y Leu9, las cuales catalizan el primer paso en la ruta de biosíntesis de la leucina. El producto de esta reacción es el α -isopropilmalato, molécula que además funciona como co-activador del regulador transcripcional codificado por el gen *LEU3*.

En nuestro grupo de trabajo se demostró que las proteínas parálogas Leu4 y Leu9 son homodímeros que poseen una sensibilidad diferencial a leucina, siendo el primero sensible y el segundo resistente a inhibición por el producto final de la vía biosintética. *In vivo* se observa la formación del heterodímero Leu4-Leu9, el cual presenta una sensibilidad a leucina intermedia en comparación a la de los homodímeros; lo que regularía la homeostasis de la biosíntesis de este aminoácido en la célula (López *et al.*, 2015).

La levadura *Lachancea kluyveri* divergió del linaje de *S. cerevisiae* antes del evento de duplicación completa del genoma, por lo que la consideramos como una levadura “tipo ancestral”. En *L. kluyveri* se encuentran duplicados los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*, que codifican para α -isopropilmalato sintasas, las cuales presentan una alta identidad con sus ortólogas de *S. cerevisiae*.

El objetivo de este estudio fue analizar la diversificación funcional de las enzimas parálogas de la levadura *Lachancea kluyveri*, las cuales poseen un origen evolutivo distinto al de *S. cerevisiae*. Para lo cual se estudió el crecimiento en etanol y glucosa de mutantes sencillas y dobles en los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* con el fin de analizar su papel fisiológico. Así mismo, se determinaron los parámetros cinéticos y la sensibilidad a leucina de las isoenzimas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*.

Nuestros resultados demuestran que la delección de ambos genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* provoca auxotrofia por leucina en *L. kluyveri*, lo que evidencia que son los únicos genes que codifican para la α -isopropilmalato sintasa. También se observó que la delección de *LkLEU4* provocó braditrofia por leucina cuando la cepa creció tanto en glucosa como en etanol, lo cual no sucedió al deletar *LkLEU4BIS*, lo que sugiere que ambas isoformas no son completamente redundantes.

En lo concerniente a la caracterización de los parámetros cinéticos, observamos que la constante catalítica de *LkLeu4* es el doble de la de *LkLeu4Bis*, lo que indica que la primera es más rápida para llevar a cabo la conversión de sustratos en producto. El resto de los parámetros determinados son muy similares para ambas enzimas, por lo que a diferencia de sus ortólogos de *S. cerevisiae*, su diversificación funcional no ocurrió en relación a sensibilidad para inhibirse por producto final leucina.

Se requiere realizar ensayos de localización subcelular, expresión génica y actividad enzimática, en extractos obtenidos de células cultivadas en etanol o glucosa, para conocer la posible diversificación funcional respecto a estos parámetros.

ABSTRACT

Gene duplication is the primary source providing evolutionary innovations. In *Saccharomyces cerevisiae*, duplicated genes *LEU4* y *LEU9* encode the isoenzymes α -isopropylmalate synthases Leu4 and Leu9, these enzymes catalyze the first step in the pathway of leucine biosynthesis. The product of this reaction, α -isopropylmalate, also acts as a co-activator of the transcriptional regulator codified by the gen *LEU3*.

In our group, it has been demonstrated that the paralogous proteins Leu4 and Leu9 form homodimers with differential leucine sensitivity. The first one is highly sensitive, while the second is extremely resistant to inhibition by leucine, wich is the last product of the biosynthetic pathway. Using *In vivo* experiments, it has been shown that Leu4 and Leu9 form an heterodimeric isoenzyme Leu4-Leu9, which has an intermediate sensitivity to leucine in comparison to that displayed by the homodimers (Leu4-Leu4, Leu9-Leu9); this differential sensitivity could regulate the homeostasis of leucine biosynthesis (López *et al.*, 2015).

Lachancea kluyveri (*L. kluyveri*) is a yeast that diverged from *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) lineage before the Whole Genome Duplication (WGD) event, this is why we consider it as a “ancestral type” yeast. In *L. kluyveri*, the genes *LkLEU4* and *LkLEU4BIS* are duplicated genes, both encode for α -isopropylmalate synthases which have a high identity with their orthologues in *S. cerevisiae*.

The aim of this work was to analyze the functional diversification of the paralogues enzymes *LkLeu4* and *LkLeu4Bis* from *L. kluyveri* which have a different evolutionary origin to that of *S. cerevisiae*. We determined the growth of *LkLEU4* and *LkLEU4BIS* single and double mutants, using either ethanol or glucose as sole carbon sources in order to determine the physiological role of these genes. Also, the kinetic parameters were calculated, as well as the leucine sensitivity of the isoenzymes *LkLeu4* and *LkLeu4Bis*.

Our results demonstrate that in *L. kluyveri* the deletion of both genes *LkLEU4* and *LkLEU4BIS* induces leucine auxotrophy, these results indicate that these are the only genes codifying α -isopropylmalate synthase. Deletion of *LkLEU4* induces leucine bradytrophie using either glucose or ethanol as sole carbon sources in the culture, these results suggest that the function of both isoenzymes is not completely redundant.

Concerning to the kinetic parameters characterization, we observed that the value of the catalytic efficiency of *LkLeu4* is twice as the catalytic efficiency of that displayed by *LkLeu4Bis*, indicating that with *LkLeu4* the conversion of substrates into products occurs faster than with *LkLeu4Bis*. The rest of the kinetic parameters calculated are very similar for both enzymes. These results indicate that, unlike the *S. cerevisiae* orthologues, functional diversification of *L. kluyveri* enzymes it is not related to their sensitivity to inhibition by leucine, the final product of the biosynthetic pathway.

To elucidate the possible functional diversification of these *LkLEU4* and *LkLEU4BIS* and their encoded products, experiments analyzing subcellular location, enzymatic activity and, gene expression while the cells are growing in ethanol and glucose are required.

INTRODUCCIÓN

La duplicación genética en la evolución

Es generalmente aceptado que los genes son continuamente creados mediante duplicación y destruidos por acumulación de mutaciones (Wolfe, 2001); sin embargo, hay estudios que sugieren que los genes no siempre evolucionan desde los ya existentes, algunos son modelados desde tramos del genoma que no codifican para moléculas funcionales, frecuentemente llamados “ADN basura”. A este proceso se le conoce como formación de genes *de novo*. Es probable que los genes *de novo* produzcan moléculas marcadamente diferentes a las ya existentes en el organismo del que forman parte, las cuales pueden resultar adecuadas para realizar funciones novedosas (Levy, 2019).

Por otra parte, la duplicación génica es una fuente primaria de material para el origen de innovaciones evolutivas, las cuales incluyen nuevas funciones de los genes y cambios en los patrones de expresión. Estas innovaciones son consideradas como elementos clave en la generación de la diversidad biológica (Ohno, 1970; Wapinski, *et al.*, 2007). Los genes duplicados en un mismo genoma son referidos como genes parálogos. Los miembros de las familias de parálogos comparten un ancestro en común y a menudo presentan divergencia de función. Por otra parte, los genes ortólogos son genes que se encuentran en dos genomas diferentes, que derivan de un ancestro en común por un evento de especiación (Van de Peer *et al.*, 2009; Hurles, 2004; Zhang, 2003).

Las duplicaciones génicas pueden involucrar genes individuales, segmentos genómicos o genomas completos, y se han presentado en los tres dominios de la vida (*Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*) (Zhang, 2003). Li y colaboradores han estimado que los genes duplicados constituyen un 15 % del genoma humano (Li *et al.*, 2001). De la misma forma, se ha encontrado que las secuencias duplicadas representan el 8 % del genoma de *Drosophila melanogaster*, el 20 % en *Caenorhabditis elegans* y el 25 % en *Arabidopsis thaliana*. Aunque las proporciones calculadas se encuentran subestimadas, pues muchos genes duplicados han presentado una diversificación tan intensa, que prácticamente no se ha conservado similitud entre sus secuencias y

las secuencias de los genes parentales. En organismos eucariontes, se ha estimado que los genes duplicados tienen una vida media de 3 a 7 millones de años, esto es el tiempo que transcurre antes de convertirse en pseudogenes por acumulación de mutaciones (Wolfe, 2001; Lynch y Conery, 2000; Zhang, 2003).

De manera general, las duplicaciones génicas se dividen en dos clases: duplicaciones a pequeña escala (*Small Scale Duplications*), en las cuales se duplican sólo fragmentos del genoma que pueden ir desde unos cuantos nucleótidos, genes, fragmentos de cromosomas, hasta cromosomas completos; y duplicaciones completas del genoma (*Whole Genome Duplications*), en las cuales, como su nombre lo indica, todo el genoma pasa por una duplicación (Hurles, 2004).

Las duplicaciones a pequeña escala (SSD) del genoma pueden generarse por mecanismos que incluyen: repetición en tándem, duplicación de un cromosoma, retrotransposición, entre otros; siendo los errores en la recombinación el mecanismo más común que lleva a este tipo de duplicaciones (Zhang, 2003).

Las duplicaciones completas del genoma (WGD) son eventos evolutivos que tienen consecuencias profundas. Son resultado de fenómenos de poliploidización y duplican el contenido genético de un organismo creando inmediatamente una barrera reproductiva entre la nueva especie y sus ancestros (Wolfe, 2015). Las WGD pueden ser resultado de aloploidización, en cuyo caso la duplicación se da vía hibridación, uniéndose el contenido genómico de dos especies para dar origen a una nueva; o por autoploidización, que es la duplicación de un mismo genoma (Glover, *et al.*, 2016). Las WGD provocan inestabilidad genómica, por lo cual son seguidas de pérdida masiva de genes y rearrreglos en el material genético (Kellis *et al.*, 2004). Hay evidencia que indica que la mayor parte de los organismos, ha pasado por eventos de WGD a partir de los cuales se han diversificado genes parálogos cuya retención y posterior subfuncionalización ha permitido la adaptación a nuevos nichos ecológicos (Van de Peer *et al.*, 2009).

La mayor parte de los genes duplicados no se conservarán como tal en el genoma. En muchos de los casos los genes duplicados acumularán mutaciones en un proceso llamado pseudogenización (**Figura 1a**). Los pseudogenes son

secuencias de DNA derivadas de un gen funcional que se convierten en no funcionales por mutaciones. Después de un largo tiempo (evolutivamente hablando), los pseudogenes son borrados del genoma o divergen tanto de los genes parentales que ya no son identificables. Pseudogenes relativamente jóvenes pueden ser reconocidos por su similitud con la secuencia de los genes parentales (Zhang, 2003). En cerca del 95 % de los casos de duplicación, sólo uno de los parálogos muestra una evolución acelerada; mientras un gen mantiene la función original, el otro es libre de acumular cambios (Kellis *et al.*, 2004). Los genes derivados tienden a ser especializados en función, expresión y localización y además pierden aspectos esenciales de su función ancestral. Si el organismo no se encuentra bajo alguna presión selectiva, el proceso por el cual un gen funcional se convierte en pseudogen usualmente ocurre en los primeros millones de años después de la duplicación. Algunos genes duplicados se mantienen en el genoma por un tiempo largo para desarrollar funciones específicas; sin embargo, debido a la relajación de las restricciones funcionales, posteriormente se convierten en pseudogenes y eventualmente son eliminados del genoma. Por ejemplo, el tamaño de la familia de receptores olfatorios es similar en humanos y en ratones, sin embargo el porcentaje de pseudogenes es aproximadamente del 60 % en el caso de humanos y solamente del 20 % en ratones. Muchos genes de receptores olfatorios se convirtieron en pseudogenes con el origen de los homínidos, lo cual podría estar relacionado con el uso reducido del olfato en los homínidos que pudiera ser compensado con otros mecanismos sensitivos como una mejor visión (Kellis *et al.*, 2004; Zhang, 2003).

Los cambios en la expresión génica después de la duplicación parecen ser una regla general más que una excepción, y estos cambios ocurren con frecuencia y rápidamente después de la duplicación génica. Una de las consecuencias más importantes de este tipo de eventos es el origen de nuevas funciones o neofuncionalización (**Figura 1b**) (Zhang, 2003).

No siempre una duplicación de genes puede conferir una nueva función ya que ambas copias se pueden ver parcialmente comprometidas por acumulación de mutaciones puntuales, entonces cada gen hijo adoptaría parte de las funciones del

gen progenitor, lo cual resultaría en la retención de ambos genes. Esto es conocido como subfuncionalización (**Figura 1b**) (Wapinski, *et al.*, 2007; Wolfe 2001).

Cuando hay una WGD la dosis génica aumenta en todos los genes, por lo que no existe un desbalance estequiométrico para el organismo. Este desbalance si es observado cuando se trata de una SSD. Por lo anterior se espera que ambos tipos de duplicación tengan diferentes consecuencias (Papp, *et al.*, 2003). Para mantener el balance de la dosis génica tras una WGD, los genes serían sometidos a mayores constricciones evolutivas, siendo el destino más observado que entre ambos genes lleven a cabo la función ancestral, es decir, que se subfuncionalicen. Existe evidencia de que los genes provenientes de una SSD presentan menores constricciones evolutivas, lo cual permitiría grandes cambios en la secuencia, requisito de la neofuncionalización. Se ha observado que los genes generados por una WGD presentan menor divergencia funcional que aquellos provenientes de una SSD. (Fares, *et al.*, 2013).

A menos que la presencia de una cantidad extra de producto génico sea ventajosa, no es probable que dos genes con funciones idénticas sean mantenidos en el genoma. La duplicación génica genera redundancia funcional, por lo que comúnmente, uno de los dos genes sufre mutaciones que desorganizan su estructura y función. La duplicación puede ser fijada o perdida, siendo la pérdida de una de las copias el fenómeno más común. Sin embargo, si ambas copias son conservadas sin que exista una diferencia funcional, el organismo presenta un aumento en la dosis génica (**Figura 1c**), lo cual puede representar una ventaja adaptativa y una protección contra mutaciones dañinas (por ejemplo, algunos genes que codifican para proteínas ribosomales en levaduras están duplicados y codifican proteínas idénticas) (Conrad y Antonarakis 2007; Wolfe, 2001; Zhang, 2003).

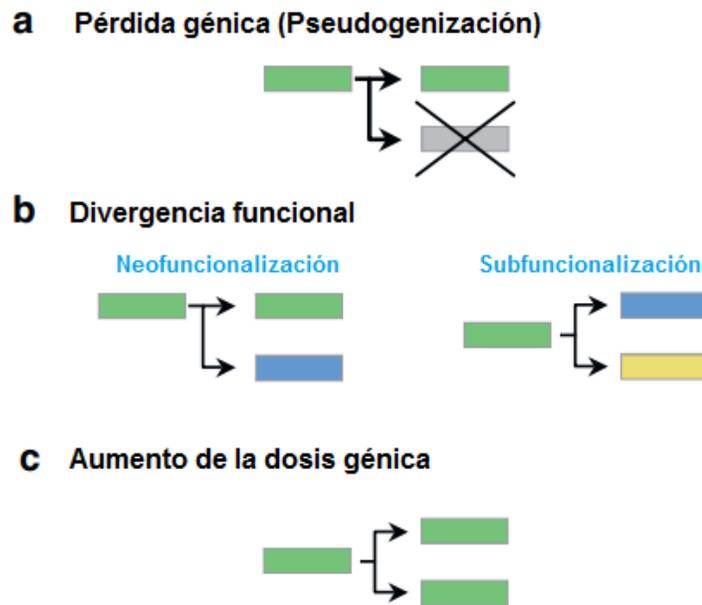


Figura 1. Destino de los genes duplicados.
 (Modificado de Conrad y Antonarakis, 2007).

¿Cómo pueden dos genes parálogos mantener la misma función después de la duplicación? Una vía es por la conversión génica (en la cual una sección de material genético se copia de un cromosoma a otro dejando al cromosoma donante sin cambios), bajo la cual dos genes parálogos tendrán secuencias y funciones muy similares. Este tipo de evolución es comúnmente referido como evolución concertada. Además, una fuerte selección purificadora sobre las mutaciones que modifican la función génica puede prevenir que los genes duplicados diverjan (Zhang, 2003).

La selección positiva y la relajación de la selección purificante son necesarias en la divergencia funcional de genes duplicados. Sin la duplicación génica, la plasticidad de un genoma o de las especies adaptándose a ambientes cambiantes estaría severamente limitada (Zhang, 2003).

***Saccharomyces cerevisiae* (S. cerevisiae)**

Las levaduras son hongos unicelulares caracterizados por su capacidad de reproducción clonal por gemación o por división celular. Son fácilmente manejables por técnicas microbiológicas y de biología molecular, es por eso que algunas especies son utilizadas como microorganismos modelo en la investigación científica (Dujon, 2010).

S. cerevisiae es uno de los modelos más utilizados en el ámbito de la evolución, biología y genética de eucariontes. Las características que hacen de esta levadura un buen modelo son: a) alta densidad génica (72 % de su genoma codifica para proteínas); b) baja cantidad de intrones; c) más del 80 % de sus 5774 genes que codifican para proteínas han sido funcionalmente caracterizados; d) pocas secuencias repetidas (lo cual ha permitido una rápida secuenciación y ensamblaje de su genoma); y e) se cuenta con las secuencias genómicas de un buen número de hemiascomicetos relacionados, con las cuales se pueden realizar estudios comparativos (Dujon, 2010; Wolfe *et al.*, 2006).

La levadura *S. cerevisiae* se caracteriza por su habilidad de degradar glucosa o fructosa hasta etanol y CO₂, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (efecto Crabtree o efecto glucosa), crecer en ausencia de oxígeno y generar mutantes con deleciones importantes en el ADN mitocondrial, las cuales son deficientes en la respiración y que son conocidas como mutantes *petite*, término que hace referencia a que estas mutantes crecen en colonias de tamaño reducido en medio sólido que contenga una fuente de carbono no fermentable (como glicerol o etanol) y baja concentración de glucosa, en comparación con las colonias de las células que no tienen mutaciones en el ADN mitocondrial (Fekete *et al.*, 2007; Merico *et al.*, 2007; Hagman y Piskur, 2015). *S. cerevisiae* es generalmente considerada como capaz de crecer en condiciones anaerobias, pero no es absolutamente independiente de oxígeno. Al menos una de las reacciones metabólicas esenciales es la generación *de novo* de desoxiribonucleótidos, catalizada por la ribonucleótido reductasa, que es dependiente de la presencia de microconcentraciones de oxígeno (Møller *et al.*, 2001).

La secuenciación de *S. cerevisiae* se llevó a cabo entre 1990 y 1996 por un consorcio internacional y fue el primer eucarionte en ser secuenciado. Cuando la secuencia del genoma completo fue publicada, se pudo identificar la presencia de 55 bloques conservados de parálogos con el mismo orden y orientación respecto al centrómero (sintenia), lo cual sugirió una duplicación ancestral del genoma, seguida por una delección extensiva de genes, y rearrreglo genómico mediante translocación recíproca entre cromosomas. Wolfe y Shields estiman que hace alrededor de 100 millones de años *Saccharomyces cerevisiae* duplicó su genoma completamente y de los 5774 genes que codifican para proteínas, 551 pares de genes duplicados sobrevivieron al rearrreglo evolutivo. Estudios filogenéticos han evidenciado que dicha duplicación fue resultado de una hibridación interespecies. (Dujon, 2010; Marcet-Houben y Gabaldón, 2015; Wolfe y Shields, 1997; Wolfe, 2015).

Marcet-Houben y Gabaldón (2015) proponen dos posibles escenarios que explican los patrones observados en los análisis filogenéticos que realizaron (**Figura 2**). En el primer escenario, dos células diploides de diferentes especies formaron un alotetraploide. En el escenario alternativo, dos células haploides de diferentes especies forman un alodiploide, el cual era altamente inestable y no podía reproducirse por vía sexual. Una duplicación completa del genoma mediante autoploidización estabilizaría el híbrido y daría lugar al alotetraploide.

Las recombinaciones y pérdida masiva de genes, posteriores a la hibridación, darían como resultado un linaje en el cual el número de cromosomas sería el doble y se retendrían algunos pares de genes. Si estos pares provienen de la misma especie parental se les denomina Ohnólogos, mientras que si fueron originados mediante especiación, y fueron reunidos en un mismo genoma mediante alopoliploidización, se les denomina homeólogos. Considerando esto, una fracción de los genes duplicados retenidos se originaría desde diferentes especies que ya habían divergido, y por tanto se esperarían diferencias en sus secuencias y en sus funciones (Glover, *et al.*, 2016; Marcet-Houben y Gabaldón, 2015; Van De Peer, 2017).

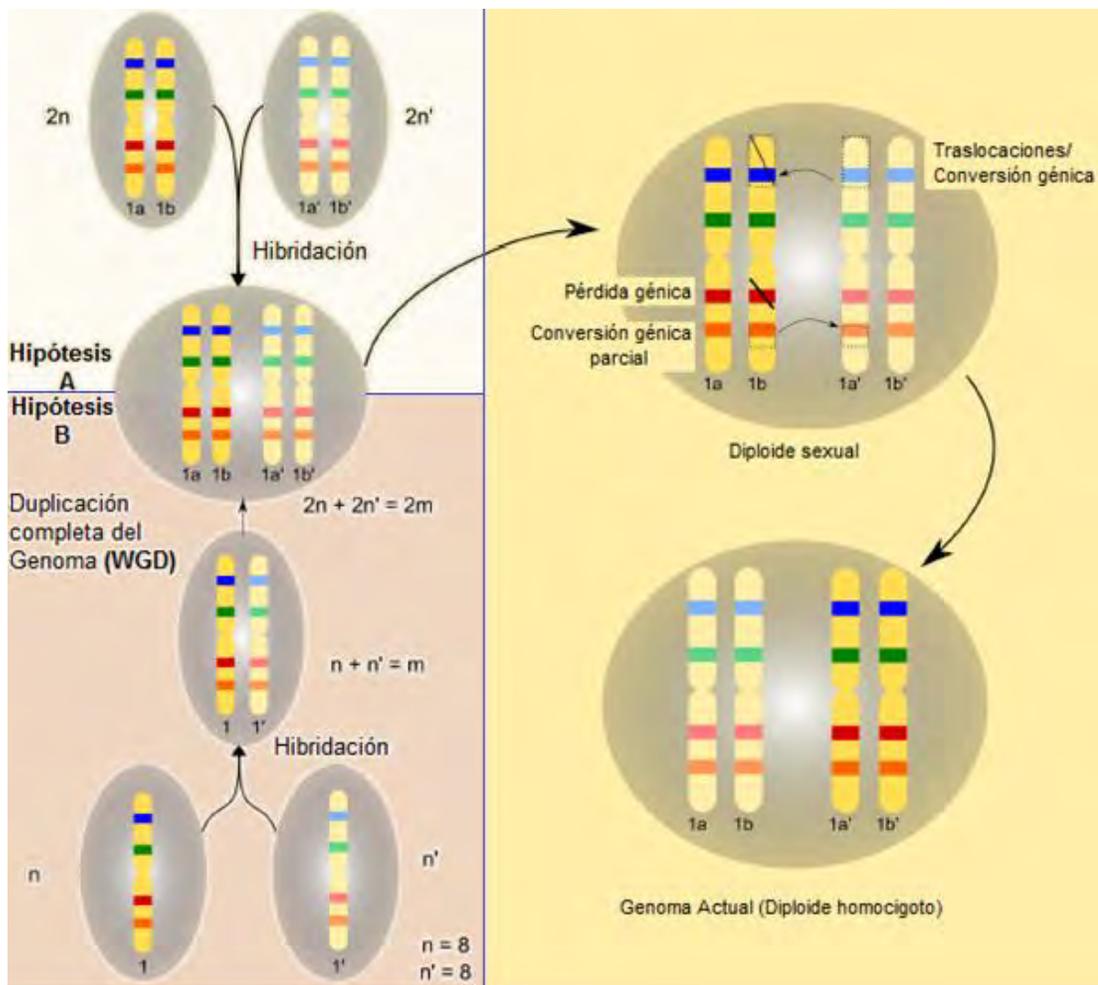


Figura 2. Esquema que representa los dos posibles escenarios de la hibridaci3n. La hip3tesis A muestra la fusi3n de dos diploides y la formaci3n del alotetraploide. La hip3tesis B muestra el apareamiento de dos aploides y su posterior WGD que lleva a la formaci3n del alotetraploide, el cual se estabiliza a trav3s de diversos procesos que incluyen p3rdida de genes, conversi3n g3nica y traslocaciones.

(Modificado de Marcet-Houben y Gabald3n, 2015).

Las especies cercanas, pero no necesariamente dentro de los clados KLE (*Kluyveromyces*, *Lachancea* y *Eremothecium*) y ZT (*Zygosaccharomyces* y *Torulaspota*), serían los principales candidatos para formar las potenciales parejas en la hibridaci3n ancestral que se propone (**Figura 3**) (Marcet-Houben y Gabald3n, 2015).

Los an3lisis filogen3ticos proponen un pico de duplicaciones en la rama que precede la divergencia entre *Saccharomyces* y el clado KLE; se le denomina pico

pre-KLE (**Figura 3**). Como resultado de este pico surge un subconjunto de duplicaciones de pares de ohnólogos que se conservaron. Estas duplicaciones ancestrales se encuentran relacionadas con los bloques de parálogos encontrados en especies post-duplicación completa del genoma. La fracción de genes duplicados que se mapearon en el nodo WGD es menor al 15 %, mientras que las duplicaciones más ancestrales aportaron alrededor del 50 % de los parálogos. Esto evidencia que los bloques de duplicados encontrados en especies post-WGD están compuestos de genes que divergieron en tiempos evolutivos distintos, la mayoría de ellos antes de la WGD (Marcet-Houben y Gabaldón, 2015).

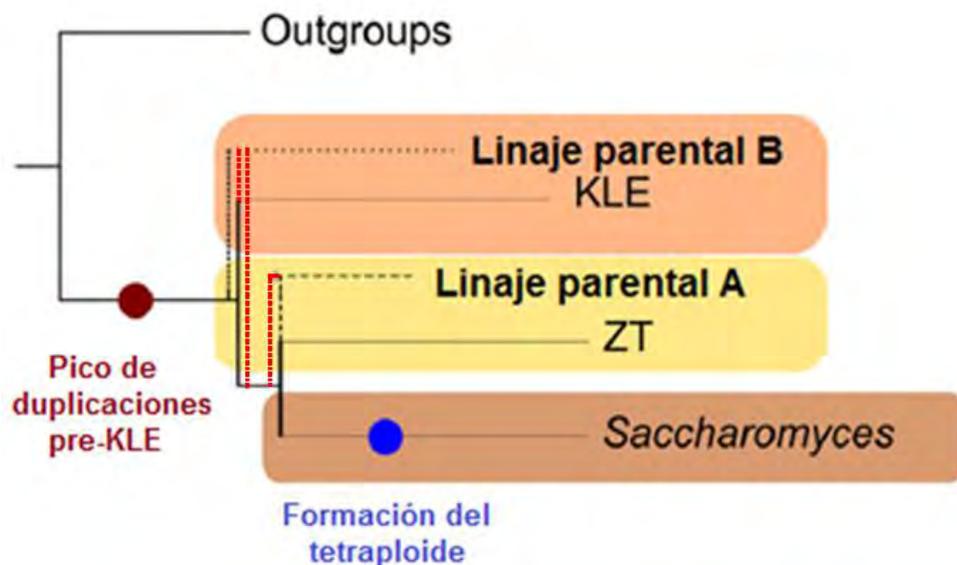


Figura 3. Representación esquemática de las posiciones inferidas, dentro del árbol filogenético, de los ancestros presuntivos del híbrido que daría lugar a *Saccharomyces*. Las posiciones más probables de los ancestros están marcadas con las líneas punteadas negras, mientras que la segunda posición más probable está marcada con las líneas punteadas rojas (Modificado de Marcet-Houben y Gabaldón, 2015).

Levaduras “tipo ancestral”

Se conoce como protoploides a las levaduras que divergieron del linaje de *S. cerevisiae* antes del evento de WGD. Por ejemplo *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea kluyveri*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Kluyveromyces lactis*, y *Eremothecium gossypii*. Estos 5 protoploides, representan distintos clados de la familia Saccharomycetaceae, comparten 3300 familias de proteínas y tienen un grado de sintenia muy conservado, es decir, presentan bloques sinténicos a través de los cuales se pueden inferir ancestros (Souciet, 2009).

En los protoploides, un total de 30-34 % de genes que codifican para proteínas son parálogos, comparado con el 44 % de *S. cerevisiae*. Entonces se entiende, que duplicaciones ancestrales de varios tipos contribuyeron a formar la tercera parte de los genomas de la familia Saccharomycetaceae, mientras que la duplicación completa del genoma, contribuyó sólo al 10 % del genoma de *S. cerevisiae* (Souciet, 2009).

La **Figura 4** ilustra el árbol filogenético de la familia Saccharomycetaceae. Se identifican eventos evolutivos que son rastreables en 12 de sus géneros. Todas las especies de levaduras estudiadas pertenecientes a esta familia carecen del complejo respiratorio I de la cadena respiratoria; este complejo está involucrado en el primer paso de la oxidación del NADH para producir ATP. También se puede observar que las especies que divergieron después de la transferencia horizontal del gen *URA1* poseen la capacidad de crecer en condiciones anaerobias. El gen *URA1* codifica para la enzima citoplasmática dihidroorato deshidrogenasa, la cual cataliza una reacción redox en la vía de biosíntesis de pirimidinas. Durante ésta reacción, la enzima utiliza al fumarato como un aceptor de electrones alternativo, reduciéndolo a succinato, y confiriendo la capacidad de crecimiento anaerobio (Shi y Jeffries, 1998; Hagman *et al.*, 2013).

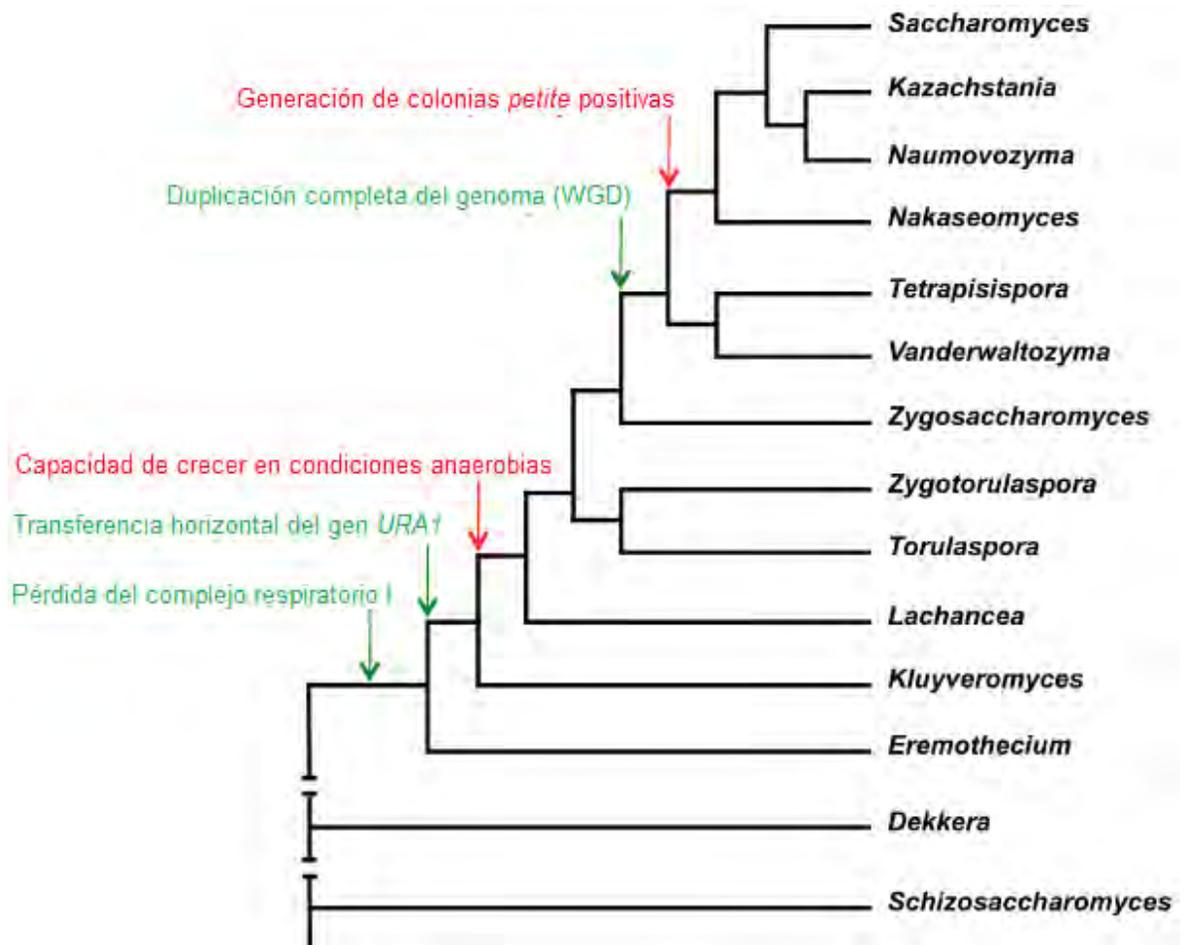


Figura 4. Relación filogenética entre levaduras pertenecientes a la familia Saccharomycetaceae. En verde se marcan los eventos de los cuales hay una huella clara en los genomas modernos. En rojo se muestran eventos cuyo fechado puede ser menos preciso.

(Modificado de Hagman *et al.*, 2013).

El evento de WGD duplicó el número de cromosomas en el linaje de *Saccharomyces*. Pero la pérdida masiva de genes dio lugar a su genoma actual, el cual es solamente 13 % más grande que el de *Kluyveromyces waltii*, y contiene únicamente 10 % más genes. El genoma poliploide volvió a su ploidía funcional mediante un gran número de deleciones de segmentos con un tamaño promedio de dos genes, seguidas de varios rearrreglos que distribuyeron los duplicados en diversos cromosomas (Kellis *et al.*, 2004).

La preservación de algunos pares de genes duplicados creados por la WGD se relaciona con su contribución a un elevado flujo glucolítico, lo cual habría conferido una ventaja selectiva al ancestro de *S. cerevisiae*, permitiendo que las levaduras post-WGD crecieran a través de una fermentación rápida de glucosa. Una capacidad fermentativa aumentada es una gran ventaja cuando las fuentes de glucosa son accesibles, lo cual ocurrió al final del periodo Cretácico, ya que en ese momento surgieron las angiospermas (plantas con flores y frutos ricos en azúcares), las cuales rápidamente se convirtieron en un nuevo nicho ecológico (Conant y Wolfe, 2007). Se cree que estas levaduras lograron conquistar dicho nicho al adquirir el metabolismo facultativo y poseer la capacidad de fermentar en presencia de oxígeno. Esta característica “egoísta” representa una manera eficiente de depletar las fuentes ricas en carbono de alta energía en un corto periodo de tiempo, maximizando la energía que se destina a reacciones anabólicas y de proliferación celular. Cuando el oxígeno está ausente (anaerobiosis), el acetaldehído es el último aceptor de electrones y es convertido a etanol bajo crecimiento puramente fermentativo. Las levaduras Crabtree positivas no solo producen etanol, el cual inhibe el crecimiento de microorganismos competidores, sino que lo acumulan para posteriormente cambiar rápidamente de un metabolismo fermentador de glucosa a utilizar el etanol en un metabolismo respiratorio (respiración oxidativa) para así convertir de manera eficiente el etanol en ATP y biomasa (estrategia “hacer-acumular-consumir”; MAC por sus siglas en inglés). (Conant y Wolfe, 2007; Hangman y Piskur, 2015; Merico *et al.*, 2007; Piskur *et al.*, 2006; Zhou, *et al.*, 2017).

Se ha propuesto que la conservación selectiva de genes duplicados en *S. cerevisiae* ha sido esencial para la adquisición de su estilo de vida predominantemente fermentativo, ya que se ha encontrado que existen genes duplicados provenientes tanto de WGD como de SSD, que se encuentran involucrados en el metabolismo central del carbono y en el transporte de hexosas (Escalera-Fanjul, *et al.*, 2019). Las levaduras que no pasaron por una WGD, en su mayoría presentan un efecto Crabtree reducido, no generan mutantes *petite* (en consecuencia no toleran la pérdida de ADN mitocondrial), y necesitan oxígeno para su crecimiento. *Kluyveromyces lactis* posee un metabolismo estrictamente aerobio y

la respiración no se reprime en presencia de glucosa, éste fenómeno constituye una diferencia fisiológica importante entre *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Kellis *et al.*, 2004; Merico *et al.*, 2007).

Lachancea kluyveri es un ejemplo de levadura fermento-respiratoria; puede crecer en condiciones anaeróbicas; presenta efecto Crabtree reducido, y generalmente favorece la respiración por sobre la fermentación; sin embargo, bajo ciertas condiciones puede llevar a cabo la fermentación en presencia de oxígeno y no es capaz de generar mutantes *petite* (Fekete *et al.*, 2007; Hagman y Piskur, 2015; Merico *et al.*, 2007; Zhou, *et al.*, 2017). Desde el punto de vista filogenético, *L. kluyveri* está aparentemente más cercanamente relacionada a *S. cerevisiae* que *K. lactis*, lo cual sugiere que el ancestro de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* así como de otros géneros relacionados, fue una levadura aerobia “*petite*-negativa” (**Figura 4**) (Hagman *et al.*, 2013; Møller *et al.*, 2001).

Los géneros *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovia*, *Nakaseomyces*, *Tetrapisispora* y *Vanderwaltozyma* que son géneros post-duplicación de genoma, muestran una clara habilidad para crecer en condiciones anaerobias. Mientras que los géneros pre-duplicación del genoma: *Zygosaccharomyces*, *Zygorulaspora*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, y *Eremothecium*, muestran un mosaico de fenotipos en donde algunas especies son capaces y otras no de crecer en ausencia de oxígeno. Esta distribución mosaico de crecimiento en ausencia de oxígeno refleja adaptaciones independientes a cambios en las condiciones medioambientales ocurridos hace millones de años, sumado a transferencia horizontal de genes y otras estrategias evolutivas. La activación de la glucólisis anaerobia parece haber evolucionado justo antes de la divergencia de los linajes *Lachancea* y *Saccharomyces* (Hagman y Piskur, 2015; Merico *et al.*, 2007).

ANTECEDENTES

Lachancea kluyveri (*L. kluyveri*)

Lachancea kluyveri es una levadura aislada inicialmente de la microbiota intestinal de *Drosophila pinicola*, en la región de Yosemite en California. Fue descrita por Phaff *et al.*, como *Saccharomyces kluyveri* en 1956 y reclasificada en el género *Lachancea* por Kurtzman en 2003. El hábitat de *L. kluyveri* no ha sido caracterizado extensamente; sin embargo, parece encontrarse de forma generalizada en el medio ambiente. Ha sido aislada del tracto intestinal de *Drosophila* en Norteamérica, del suelo en Europa y de varias especies de árboles en la India y Norteamérica (Kurtzman, 2003; Phaff, *et al.*, 1956; Souciet, 2009).

Esta levadura posee 8 cromosomas. Su genoma mide 11.3 Mb y contiene 5321 genes que codifican para proteínas. Muestra una cercanía filogenética con otros géneros, incluyendo *Torulaspora*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*. Se ha establecido como organismo modelo para estudiar una variedad de procesos biológicos tales como la degradación de pirimidinas, el flujo metabólico, y la regioselectividad de las desaturasas de los ácidos grasos $\Delta 12$ y $\omega 3$. A diferencia de la mayoría de los miembros de la familia Saccharomycetaceae, es capaz de usar pirimidinas y sus productos de degradación como única fuente de nitrógeno. Aparentemente, el ancestro de *S. cerevisiae* perdió la capacidad de degradar pirimidinas tras el evento de WGD (Beck *et al.*, 2008; Gojkovic, *et al.*, 1998; Neuvéglise, *et al.*, 2000; Oura y Kajiwara, 2008; Payen, *et al.*, 2009; Souciet, 2009).

En un cultivo en lote, en presencia de glucosa y oxígeno, el ciclo de Krebs en *L. kluyveri* trabaja como ciclo con un flujo metabólico considerable; en contraste con lo observado en *S. cerevisiae*, ya que bajo estas mismas condiciones el ciclo de Krebs funciona en dos ramas, principalmente debido a que el complejo succinato deshidrogenasa no opera durante la fermentación. Esto indica que el sistema respiratorio de *L. kluyveri* no se reprime significativamente al cultivarla en presencia de glucosa (Escalera-Fanjul, *et al.*, 2019; Møller, *et al.*, 2002).

En *L. kluyveri*, la glucosa es principalmente dirigida hacia reacciones anabólicas, manteniendo bajo el flujo catabólico. Se observa una alta producción de biomasa ya que se maximiza la velocidad de crecimiento. Este uso eficiente la glucosa ha convertido a *L. kluyveri* en un organismo modelo para aplicaciones industriales, como la producción de proteínas heterólogas bajo condiciones aerobias y limitadas de glucosa (Herwig y Von Stockar, 2003; Møller, *et al.*, 2004).

Aún cuando *L. kluyveri* no es resultado de una duplicación completa del genoma de un *Saccharomyces* ancestral, se encuentran genes duplicados en su genoma tan frecuentemente como en *S. cerevisiae*, por lo que se intuye que estos genes provienen de eventos de duplicaciones a pequeña escala.

La biosíntesis de leucina en *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis*

La biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada consiste en una ruta común, que parte de piruvato hasta valina, leucina e isoleucina. Esta vía metabólica opera en bacterias, arqueas, hongos y plantas verdes; no se ha encontrado en mamíferos (Kohlhaw, 2003).

La ruta de biosíntesis de leucina pudo tener un papel importante en la evolución. Se ha postulado que esta vía pudo ser el precursor del ciclo de Krebs; cuya primera versión era usada para la biosíntesis de aminoácidos. Se asume que el homólogo de la α -isopropilmalato sintasa (α -IPMS), actuaría como citrato sintasa en este precursor del ciclo de Krebs (Kohlhaw, 2003; Keefe, *et al.*, 1995).

En la biosíntesis de leucina participan tres enzimas específicas para esta vía. La primera de ellas, la α -isopropilmalato sintasa (α -IPMS; EC 4.1.3.12), realiza la condensación aldólica entre α -cetoisovalerato (α -KIV) y acetil-CoA (AcCoA) para generar α -isopropilmalato (α -IPM), el primer precursor de esta vía metabólica. La α -IPMS es una metaloenzima que posee 4 iones Zn^{2+} por dímero, los cuales se encargan de posicionar correctamente al α -KIV en el sitio catalítico y de polarizar un grupo carbonilo haciendo que el carbono sea susceptible a un ataque nucleofílico; posteriormente hay una interacción entre agua y Zn^{2+} que hace posible el ataque hidrolítico hacia el intermediario AcCoA/ α -KIV, lo cual da como resultado la

formación del α -isopropilmalato y liberación de coenzima A (Koon, *et al.*, 2004; Roeder y Kohlhaw, 1980; Ulm *et al.*, 1972).

Existe evidencia de que la expresión de los genes *LEU1* y *LEU2*, que codifican para las siguientes dos enzimas de esta ruta biosintética (una isomerasa y una deshidrogenasa), se inducen en presencia de α -IPM. Este precursor participa de manera importante en el control de la biosíntesis de aminoácidos al internalizarse al núcleo para formar un complejo con la proteína Leu3, cuyo papel se explicará más adelante. Altas concentraciones de α -IPM vuelven a Leu3 un activador transcripcional, mientras que cuando α -IPM se encuentra ausente o en bajas concentraciones, Leu3 se comporta como un represor (**Figura 5**) (Boer, *et al.*, 2005; Hsu, *et al.*, 1982; Kohlhaw, 2003).

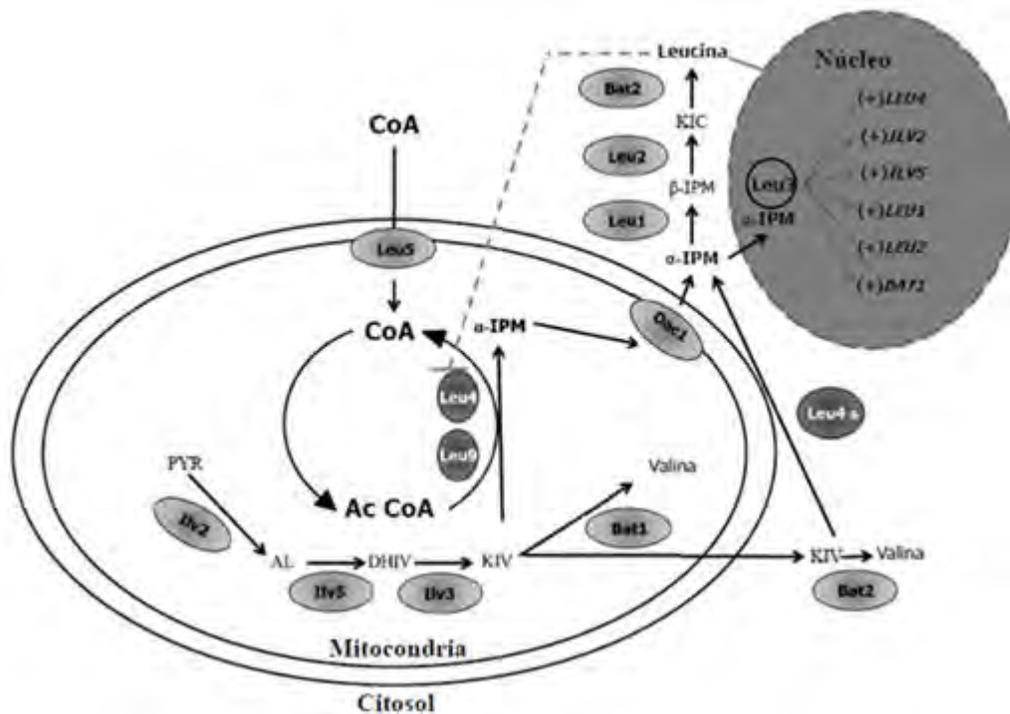


Figura 5. Esquema de la compartimentalización de las enzimas involucradas en la biosíntesis de leucina en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tomado de la tesis doctoral de López, 2015.

En *Saccharomyces cerevisiae* los genes parálogos *LEU4* (YNL104C) y *LEU9* (YOR108W), codifican para dos enzimas α -isopropilmalato sintasas independientes,

las cuales muestran un 84% de identidad en su secuencia de aminoácidos, y cuyo sitio catalítico está completamente conservado. Leu4 participa con el 80 % de la actividad de α -IPMS y el 20 % residual corresponde a la acción de Leu9. Leu4 es una enzima que se encuentra mayoritariamente en la mitocondria, sin embargo, un 10 % de la misma se localiza en el citoplasma, mientras que Leu9 se encuentra localizada únicamente en la mitocondria. Los dos sustratos de la α -IPMS: AcCoA y α -KIV se encuentran principalmente en la matriz mitocondrial. Mientras que la síntesis de α -IPM se lleva a cabo en la mitocondria, la conversión a leucina, por medio de la acción de Leu1 y Leu2 se lleva a cabo en el citoplasma. El transportador de oxalacetato y sulfato (Oac1) cataliza el exporte de α -IPM de la mitocondria hacia el citoplasma (**Figura 5**) (Casalone, *et al.*, 2010; Kohlhaw, 2003; Marobbio, *et al.*, 2008).

Tanto en *K. lactis* como en *L. kluyveri* existen genes parálogos que codifican para dos α -IPMSs. A nivel de proteína se observa que las enzimas α -IPMSs de *L. kluyveri* y de *K. lactis* presentan una identidad mayor al 58 % con sus ortólogos de *S. cerevisiae* (**Figura 6**). Un valor de identidad de aminoácidos de aproximadamente 27 % corresponde a proteínas que han divergido ampliamente, mientras que una identidad mayor (~35-75 %) representa duplicaciones más recientes o restricciones funcionales más fuertes (Souciet, 2009), las identidades mostradas en la figura 6 indican que este es el caso para las enzimas de este estudio.

Experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo, indican que en el caso de *K. lactis*, *KlLeu4* (*KIA0F23529g*) (sinténica) se localiza en la mitocondria, mientras que *KlLeu4Bis* (*KIA0D1421g*) se encuentra en el citoplasma (Aguirre-López *et al.*, 2020). Para *L. kluyveri*, Estefany Granados en su proyecto de maestría (datos no publicados y tesis aún no presentada) demostró, por medio de estudios de localización por microscopía, que *LkLeu4* (*SAKLOE10472g*) (sinténica) se localiza en un compartimiento subcelular que puede estar relacionado con la vía endocítica y no en la mitocondria como sugería un análisis *in silico*, este mismo análisis indica que *LkLeu4Bis* (*SAKL0F05170g*) se localiza en el citoplasma. Actualmente se realizan experimentos para preparar una cepa en la que *LkLeu4Bis* se fusione con

la proteína verde fluorescente, que permita llevar a cabo ensayos de microscopía para conocer su localización subcelular.

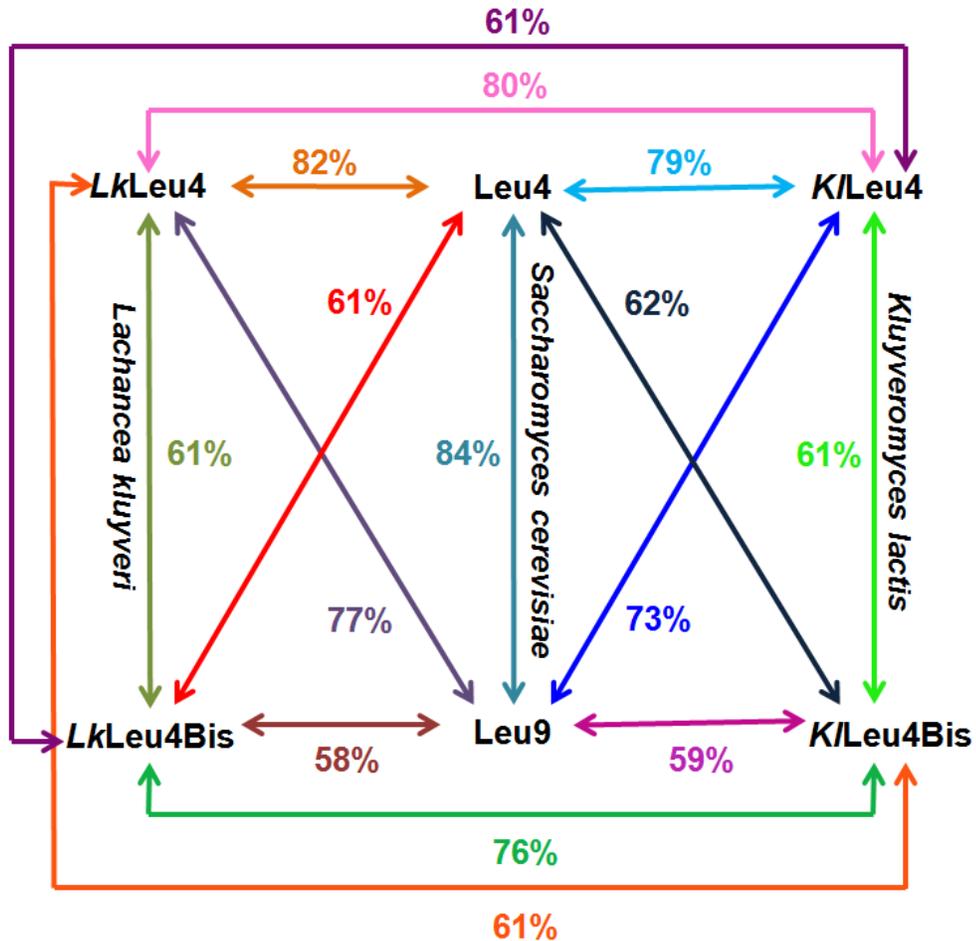


Figura 6. Porcentaje de identidad que muestra cada α -IPMS de *S. cerevisiae*, *L. kluyveri* y *K. lactis* a nivel de aminoácidos, cuando se comparan entre sí. Este análisis se realizó a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las α -IPMSs de las tres levaduras estudiadas en el laboratorio, en el Software *Clustal2.1* (Ver Anexo 4).

La actividad enzimática de las α -isopropilmalato sintasas de *S. cerevisiae*, está sujeta a dos controles. Ulm *et al.*, (1972) reportaron que estas isoenzimas exhiben una pronunciada especificidad por L-leucina como inhibidor por producto final. El segundo tipo de regulación está dado por la inactivación por CoA, dependiente de Zn^{2+} . Mientras que la CoA es un producto de la reacción catalizada por esta enzima, no se trata de una simple inhibición por producto, ya que requiere un segundo sitio de unión a CoA que se abre solamente en presencia de iones de

zinc. La acetil-CoA ni previene ni revierte este tipo de inactivación. La presencia de ATP es capaz de proteger a las α -IPM sintasas contra la inactivación por CoA. Ambos controles deben servir para prevenir la sobreproducción de leucina. Cuando la relación CoA/acetilCoA intramitocondrial es alta, debido a bajos niveles de acetil-CoA, el acetil-CoA remanente será canalizado al ciclo de Krebs limitando su consumo para rutas biosintéticas. Ya que la poza de leucina en *S. cerevisiae* corresponde al 10% de los aminoácidos totales, el control de la biosíntesis de la leucina puede ser importante en casos de depleción de las fuentes de carbono (Cavaliere *et al.*, 1999; Kohlhaw, 2003).

De acuerdo con López y colaboradores (2015), Leu4-Leu4 y Leu9-Leu9 son homodímeros sensibles y resistentes a la inhibición por leucina, respectivamente, mientras que la isoforma heterodimérica Leu4-Leu9 muestra una sensibilidad intermedia (**Figura 7**). La formación del heterodímero prevendría la sobresíntesis de α -IPM y de leucina mediante una distribución más balanceada de piruvato y de AcCoA hacia otros intermediarios de biosíntesis.

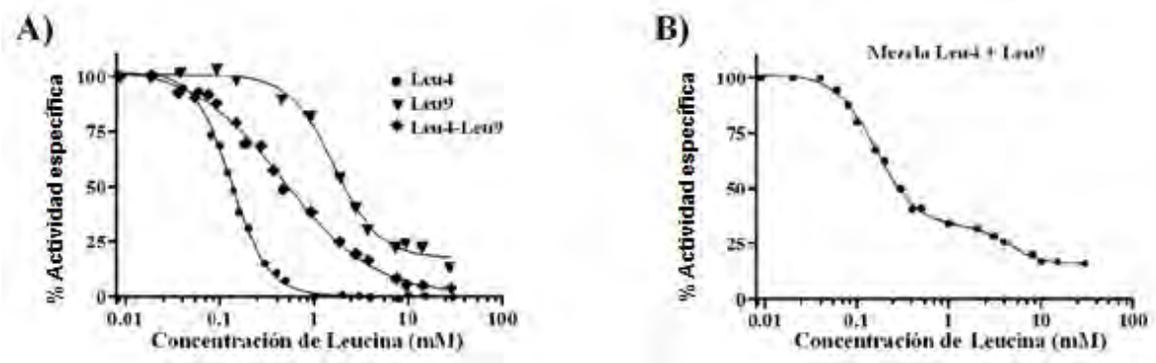


Figura 7. Análisis de sensibilidad a leucina (IC₅₀) en extractos crudos de las cepas en donde las enzimas α -IPMS de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran sobreexpresadas desde el promotor *ENO2*. A. ● Homodímero de Leu4 (IC₅₀ 0.13mM). ▼ Homodímero de Leu9 (IC₅₀ 1.78mM). ◆ Heterodímero Leu4-Leu9. B. Mezcla de cantidades equimolares de los homodímeros Leu4 y Leu9. Tomado de la tesis doctoral de López, 2015

Se ha observado que la formación del heterodímero Leu4-Leu9 se prefiere sobre la de los homodímeros, posiblemente como resultado de una mayor afinidad entre diferentes monómeros que entre monómeros iguales (López, *et al.*, 2015). La expresión exclusiva de Leu9 en un fondo genético *leu4Δ*, resulta en un crecimiento lento tanto en etanol como en glucosa como fuentes de carbono, lo cual indica que la resistencia a la leucina de Leu9-Leu9 inhibe la retroalimentación y daña el control de flujo hacia la ruta biosintética. En resumen, la sensibilidad diferencial a leucina que tienen estas enzimas juega un papel crucial en la homeostasis de la biosíntesis de leucina y en el crecimiento de la levadura. La formación de isoenzimas homo- y hetero-oligoméricas, con propiedades cinéticas peculiares, da como resultado diversificación funcional proporcionando un medio para controlar diferencialmente los flujos metabólicos bajo condiciones respiratorias y fermentativas (Escalera-Fanjul, *et al.*, 2019).

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo el análisis de IC_{50} de las α -IPMSs de *Kluyveromyces lactis* (Aguirre-López, *et al.*, 2020), y se encontró que ambas enzimas son sensibles a la inhibición por leucina, mostrando un patrón de inhibición similar al del homodímero Leu4-Leu4 de *S. cerevisiae* (Figura 8).

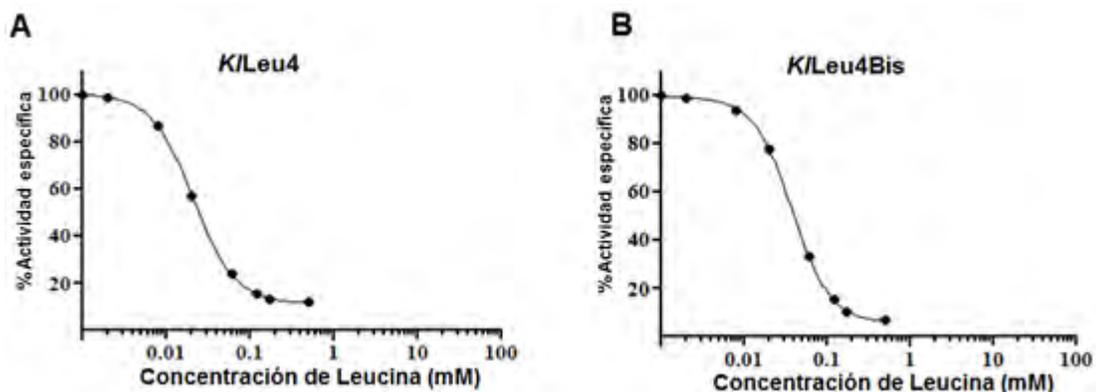


Figura 8. Análisis de sensibilidad a leucina (IC_{50}) de las enzimas α -IPMSs de *Kluyveromyces lactis*. Ensayos realizados en extractos crudos de las levaduras. A. *K/Leu4* (IC_{50} 0.020mM). B. *K/Leu4Bis* (IC_{50} 0.037mM). Tomado de Aguirre-López, *et al.*, 2020

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los genes parálogos *LEU4* y *LEU9* de la levadura *S. cerevisiae*, originados como resultado de la duplicación completa del genoma, codifican para enzimas α -isopropilmalato sintasas parálogas. Estas enzimas diméricas, catalizan el primer paso de la biosíntesis de leucina. El producto de la acción de estas isoenzimas es el α -isopropilmalato (α -IPM). Este compuesto, además de constituir un intermediario de la biosíntesis de leucina, constituye el co-activador del regulador transcripcional codificado por *LEU3*. En ausencia de α -IPM se generan interacciones intramoleculares dentro de Leu3, de tal suerte que se enmascara el dominio de activación y Leu3 pierde su capacidad para regular la transcripción. Leu3 es un regulador maestro que determina la transcripción de un número importante de genes entre los que destacan: *ILV2*, *ILV5*, *LEU4*, *LEU1*, *LEU2*, *BAT1* y *GDH1* (Figura 9).

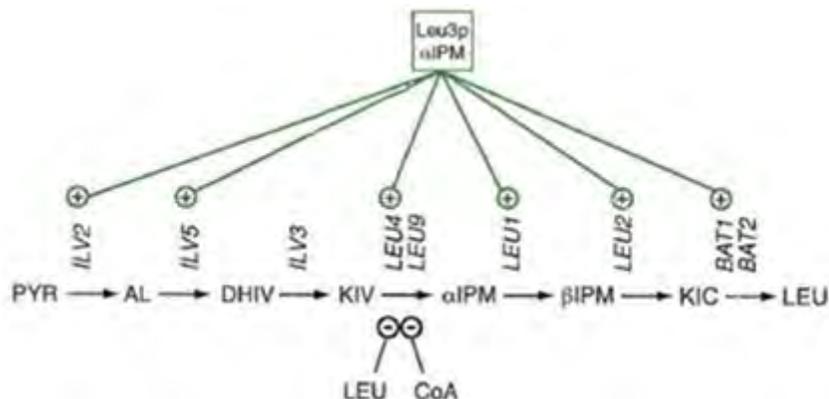


Figura 9. Regulación de la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de la leucina por el complejo Leu3- α IPM. Los genes involucrados están escritos en cursivas; *ILV2* (acetohidroxiácido sintasa); *ILV5* (acetohidroxiácido reductoisomerasa); *ILV3* (dihidroxiácido deshidratasa); *LEU4/LEU9* (α -isopropilmalato sintasas); *LEU1* (isopropilmalato isomerasa); *LEU2* (β -isopropilmalato deshidrogenasa); *BAT1/BAT2* (aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada). Los intermediarios de la ruta biosintética son los siguientes: *PYR* (piruvato); *AL* (acetolactato); *DHIV* (α - β -dihidroxiivalerato); *KIV* (α -cetoisovalerato); α IPM (α -isopropilmalato); β IPM (β -isopropilmalato); *KIC* (α -cetoisocaproato); *LEU* (leucina) (Modificado de Kohlhaw, 2003).

En nuestro laboratorio, se han purificado tanto Leu4 como Leu9 y se ha encontrado que Leu4 es sensible a leucina, en tanto que Leu9 es resistente (**Figura 7**) (López, *et al.*, 2015). Otro hallazgo muy importante fue encontrar que Leu4 y Leu9 pueden formar heterodímeros que poseen propiedades cinéticas peculiares, particularmente la sensibilidad a leucina del heterodímero Leu4-Leu9, la cual es intermedia entre las que presentan los homodímeros de Leu4 y de Leu9. La sensibilidad a leucina de estas enzimas permite que este paso sea un punto de control de flujo hacia la producción de leucina y juega un papel crucial en la homeostasis de la biosíntesis de este aminoácido (López, *et al.*, 2015).

La levadura *L. kluyveri* pertenece al linaje de levaduras que divergió de la rama antes de la duplicación completa del genoma, y por tanto se considera una levadura “tipo ancestral”. El genoma de esta levadura, presenta una duplicación de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*, que codifican para las enzimas α -isopropilmalato sintasas ortólogas de las de *S. cerevisiae*. Se realizó un análisis *in silico* del contexto de los genes *LEU4* y *LEU9* utilizando el programa “Yeast Gene Order Browser” (YGOB <http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>) (Byrne y Wolfe, 2005) (**Figura 10**). En la **figura 10A** se observa que el gen *LkLEU4* (E10472) es ortólogo sinténico a los genes *LEU4* y *LEU9* de *Saccharomyces cerevisiae*.

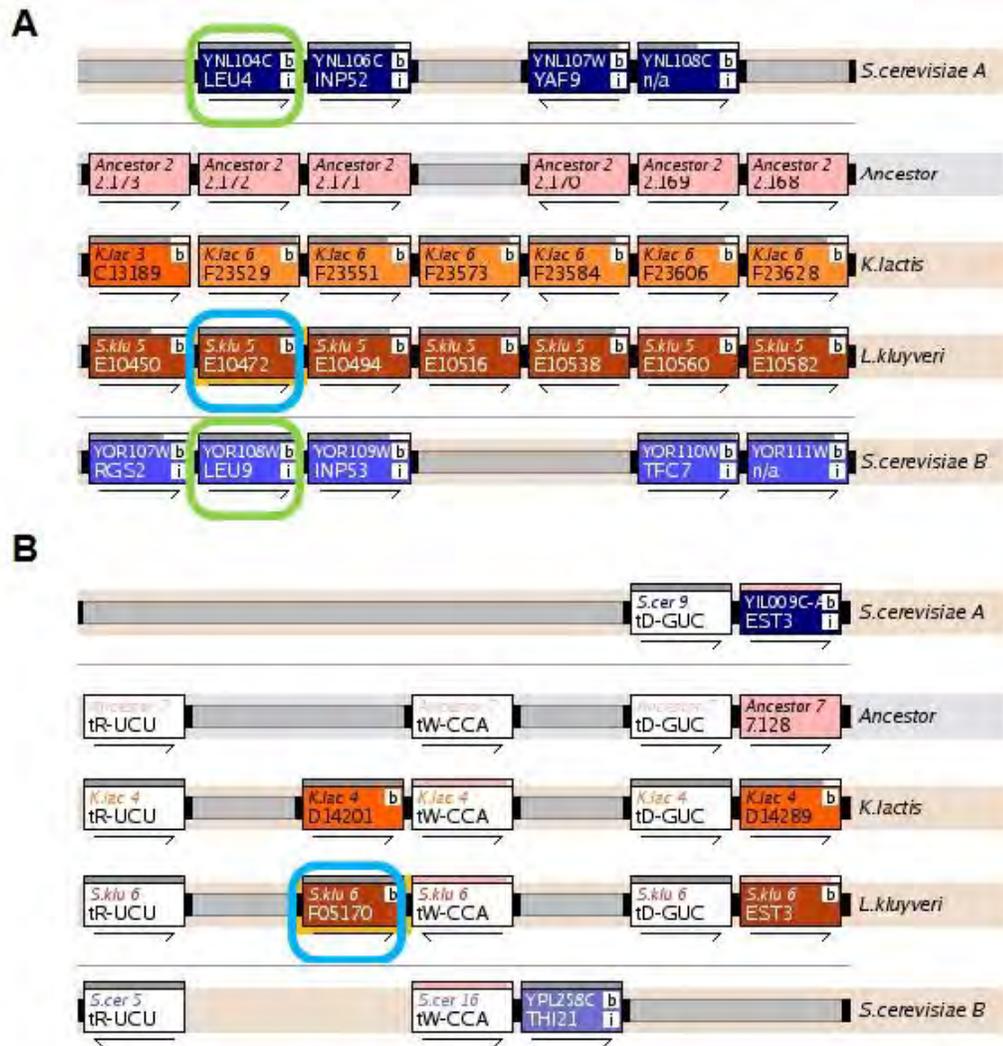


Figura 10. Análisis del contexto sinténico de los genes A. *LkLEU4* (E10472) y B. *LkLEU4BIS* (F05170) de *L. kluyveri*. *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* se muestran resaltados en recuadros azules. *LEU4* y *LEU9* de *S. cerevisiae* se encuentran resaltados en recuadros verdes, Las flechas negras indican la orientación de los genes con respecto al centrómero. Obtenido utilizando el programa “Yeast Gene Order Browser” (Byrne y Wolfe, 2005)

OBJETIVOS

Analizar la diversificación funcional de las enzimas parálogas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* de la levadura *Lachancea kluyveri*, las cuales poseen un origen evolutivo diferente a sus ortólogas de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la caracterización del fenotipo de mutantes sencillas y doble en los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*, y determinar las propiedades cinéticas de ambas enzimas puras y su sensibilidad a inhibición por leucina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas de levadura usadas en este trabajo

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
<i>L. kluyveri</i> Y156	Mat α <i>ura</i> 3 ⁻ <i>LkLEU4/LkLEU4BIS</i>	Weinstock y Strathern, 1993
<i>L. kluyveri</i> <i>Lkleu4</i> Δ	Mat α <i>ura</i> 3 ⁻ <i>Lkleu4</i> : : <i>NatMX</i>	Dra. Lina Riego Ruíz
<i>L. kluyveri</i> <i>Lkleu4Bis</i> Δ	Mat α <i>ura</i> 3 ⁻ <i>Lkleu4bis</i> : : <i>KanMX</i>	Dra. Lina Riego Ruíz
<i>L. kluyveri</i> <i>Lkleu4</i> Δ <i>Lkleu4bis</i> Δ	Mat α <i>ura</i> 3 ⁻ <i>Lkleu4</i> : : <i>NatMX</i> <i>Lkleu4bis</i> : : <i>KanMX</i>	Desarrollada en este trabajo

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli* usadas en este trabajo

Cepa	Descripción
<i>Escherichia coli</i> <i>DH5</i> α	Cepa de clonación. Sus múltiples mutaciones permiten su alta eficiencia de transformación. La mutación en una endonucleasa intracelular previene que el DNA plasmídico se degrade
<i>Escherichia coli</i> <i>BL21</i> (<i>DE3</i>)	Cepa de expresión. Ideal para su uso con sistemas de expresión basados en el promotor T7 del bacteriófago λ DE3, ya que produce la RNA polimerasa del este fago.

Tabla 3. Plásmido utilizado en este trabajo

Plásmido	Descripción
pET28a+	Este vector permite expresar proteínas con una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal o C-terminal. Confiere resistencia a kanamicina.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótido	Descripción	Secuencia 5' \rightarrow 3'
E10472 Fw	Amplificación del gen <i>SAKLOE10472</i> (<i>LkLEU4</i>) añadiendo un sitio de corte para <i>Nde</i> I en el extremo 5'	GCG CGC CAT ATG TTC AAG AGA ACT TTG GCC GTC
E10472 Rv	Amplificación del gen <i>SAKLOE10472</i> (<i>LkLEU4</i>) añadiendo un sitio de corte para <i>Xho</i> I en el extremo 3'	GCG CGC CTC GAG TTA AGC TGA GCC AGA TGC CTT TG
E10472 Int Fw	Oligonucleótido interno en la secuencia del gen <i>SAKLOE10472</i> (<i>LkLEU4</i>) para secuenciar y verificar el inserto para la construcción	CCA ATT GTT TTC AAC TTA CCA GC

F05170 Fw	Amplificación del gen <i>SAKLOF05170</i> (<i>LkLEU4BIS</i>) añadiendo un sitio de corte para <i>SacI</i> en el extremo 5'	GCG CGC GAG CTC ATG CCT TAC TAC AAA GAT CCA TC
F05170 Rv	Amplificación del gen <i>SAKLOF05170</i> (<i>LkLEU4BIS</i>) añadiendo un sitio de corte para <i>XhoI</i> en el extremo 3'	GCG CGC CTC GAG TTA AAA GTT ACC GGA CCT TTT TAA TC
F05170 Int Fw	Oligonucleótido interno en la secuencia del gen <i>SAKLOF05170</i> (<i>LkLEU4BIS</i>) para secuenciar y verificar el inserto para la construcción	CCG TAG AGA TGT CCA CTC C
181	Amplificación del fragmento 5', 1000 pb río arriba del ATG de inicio, para amplificar el módulo de recombinación 5' <i>LkLEU4-NAT-3'LkLEU4</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	CAT GCC TTT CGA CTG TTT GC
182	Amplificación del fragmento 5' para verificar la correcta inserción del módulo 5' <i>LkLEU4-NAT-3'LkLEU4</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	GCA ATA TTC TGG GCA CAG ACG
186	Amplificación del fragmento 3', 1000 pb río abajo del codón de término, para amplificar el módulo de recombinación 5' <i>LkLEU4-NAT-3'LkLEU4</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	TCG CGT TAT CAT CAA GTC TGT CC
187	Amplificación del fragmento 3' para verificar la correcta inserción del módulo 5' <i>LkLEU4-NAT-3'LkLEU4</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	TGT CCT GCT CCC AAA ATA CTG G
191	Amplificación del fragmento 5', 1000 pb río arriba del ATG de inicio, para amplificar el módulo de recombinación 5' <i>LkLEUBIS-NAT-3'LkLEU4BIS</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	TTC ACC TTC TAG TTC CCA ATC G
192	Amplificación del fragmento 5' para verificar la correcta inserción del módulo 5' <i>LkLEU4BIS-KAN-3'LkLEU4BIS</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	GAA ACC ATC GAA AGC TCA CAG C
196	Amplificación del fragmento 5', 1000 pb río abajo del codón de término, para amplificar el módulo de recombinación 5' <i>LkLEU4BIS-NAT-3'LkLEU4BIS</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	AGA TAC GAC TAT CGA CCA TCG AC
197	Amplificación del fragmento 3' para verificar la correcta inserción del módulo 5' <i>LkLEU4BIS-KAN-3'LkLEU4BIS</i> en el genoma de <i>L. kluyveri</i>	CCT GAT AGT AGT TCC AGT GAG G
Nat Re	Oligonucleótido Reverso interno en la secuencia del gen <i>NAT</i> para comprobar que esté insertado correctamente	GGT ACC GTT AAG CCG TGT CGT CAA GAG TGG TAC CCA T
Kan B Rv	Oligonucleótido Reverso interno en la secuencia del gen <i>KAN</i> para comprobar que esté insertado correctamente	CTG CAG CGA GGA GCC GTA AT

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Extracción de ADN genómico de levadura

Se inoculó en 10 mL de medio YPD o YPD-Leu, una colonia aislada de la cepa de la cual se deseaba extraer el ADN. Se incubó a 30 °C en agitación orbital constante durante aproximadamente 16 horas.

Se centrifugó a 2000 xg a temperatura ambiente durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y la pastilla de células se resuspendió en 500 µL de agua bidestilada estéril para transferir las células a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. La suspensión se centrifugó a 4 °C a una velocidad de 21000 xg durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 200 µL de una solución compuesta por Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8. Se agregó a la suspensión 200 µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 preparado al momento. Se adicionaron 0.3 g de perlas de vidrio y se mezcló con el vórtex a máxima velocidad por 3 a 4 minutos. Se añadieron 200 µL de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH8) y se centrifugó a una velocidad de 21000 xg a 4 °C durante 5 minutos.

La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio, se le agregaron 400 µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión de 5 a 6 veces. Se centrifugó a 4 °C, 21000 xg, durante 5 minutos y nuevamente se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Esta extracción orgánica se repitió una vez más.

A la última fase acuosa recuperada se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar los ácidos nucleicos, se mezcló por inversión de 5 a 6 veces. Se centrifugó a 4 °C, 21000 xg durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla resultante se resuspendió en 400 µL de amortiguador TE y se agregaron 10 µL de RNAasa A (10 mg/mL). La solución se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

Transcurrida la incubación, se precipitó el ADN añadiendo 1 mL de etanol absoluto frío y 10 µL de acetato de amonio 4 M y mezclando por inversión. Se centrifugó el tubo a 4 °C, 21000 xg durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla se dejó secar con la finalidad de que se evaporara el etanol residual. Posteriormente se resuspendió en 50 µL de agua estéril.

Para conocer la concentración y calidad del ADN extraído, se cuantificó en el nanodrop. La relación 260/280 es utilizada para evaluar la pureza del ADN, una relación de ~1.8 es generalmente aceptada para ADN de buena calidad, si es menor puede indicar presencia de contaminantes. La relación 260/230 se espera en el intervalo de 2.0-2.2, una baja relación puede indicar residuos de fenol en la muestra.

El ADN en solución se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Construcción de doble mutante *Lkleu4ΔLkleu4bisΔ*

Las secuencias de *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* en su contexto genómico (1000 pares de bases de la región 5'UTR y 1000 de la región 3'UTR) fueron proporcionadas por la Dra. Lina Riego Ruíz del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Su grupo de trabajo llevó a cabo la secuenciación de ambos genes y los comparó con lo reportado en bases de datos. La secuencia de *LkLEU4* y su contexto genómico correspondieron con lo reportado en la base de datos GENOLEVURES (<http://genolevures.org/>); por otro lado, observaron que una parte de la secuencia del contexto genómico reportada de *LkLEU4BIS* no correspondía con el resultado de la secuenciación. La Dra. Riego Ruíz nos proporcionó los oligonucleótidos diseñados con base a las secuencias que se obtuvieron en su grupo de trabajo (181, 182, 186, 186, 191, 192, 196 y 197; **Tabla 4**).

Las mutantes nulas *L. kluyveri Lkleu4Δ* y *L. kluyveri Lkleu4bisΔ*, también nos fueron facilitadas por la Dra. Lina Riego Ruíz, ambas fueron obtenidas por su grupo de trabajo mediante reemplazo por recombinación homóloga. Se verificó el genotipo de las mutantes recibidas a través de PCR haciendo uso de oligonucleótidos externos a los módulos de recombinación e internos a los genes de resistencia,

generando fragmentos con patrones de peso molecular diferenciables de una cepa silvestre.

La mutante *L.kluyveri* *Lkleu4* Δ (*Lkleu4*: :*NatMX*) se obtuvo tras sustituir el ORF *LkLEU4* por el marcador de selección *NatMX*. Se transformó la cepa silvestre con un módulo de recombinación que contenía el marcador flanqueado por secuencias de aproximadamente 1000 pb de la secuencia 5'UTR y 1000 pb de la secuencia 3'UTR de *LkLEU4*. Este módulo se obtuvo usando la técnica PCR *double joint*. Las mutantes fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico nourseotricina (100 μ g/mL). Para comprobar su genotipo se utilizaron los oligonucleótidos 182, 187 y *NatRe*, los cuales se posicionan en el contexto genómico del *LkLEU4* aproximadamente 1300 pb río arriba del ATG de inicio del gen, 1300 pb río abajo del codón de paro y sobre el gen del marcador de selección *NatMX* respectivamente (Figura 11).

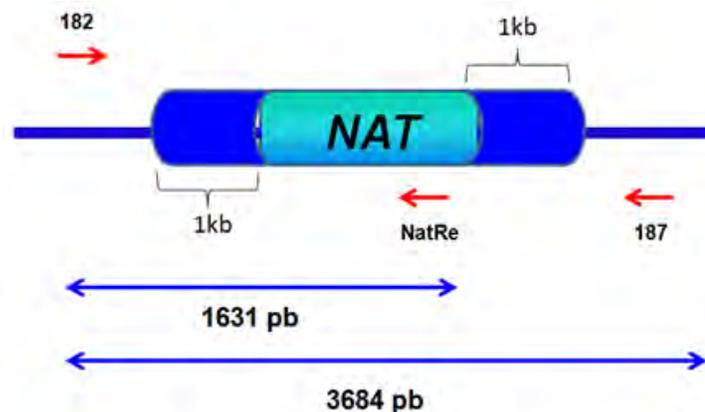


Figura 11. Comprobación del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina en el contexto genómico del gen *LkLEU4*.

De igual manera, la mutante *L.kluyveri* *Lkleu4Bis* Δ (*Lkleu4bis*: :*KanMX*) se obtuvo al transformar la cepa silvestre con un módulo de recombinación que contenía el marcador de selección *KanMX* flanqueado por secuencias de aproximadamente 1000 pb de la secuencia 5'UTR y 1000 pb de la secuencia 3'UTR de *LkLEU4BIS*. Las mutantes fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en un medio con el antibiótico geneticina, también conocido como G418 (282 μ g/mL). Para la comprobación del genotipo se utilizaron los oligonucleótidos 192, 197 y

KanB Rv; los cuales se posicionan sobre el contexto genómico de *LkLEU4BIS* aproximadamente 1300 pb río arriba del ATG de inicio del gen, 1300 pb de bases río abajo del codón de paro y sobre el gen marcador de selección *KanMX* respectivamente (**Figura 12**).

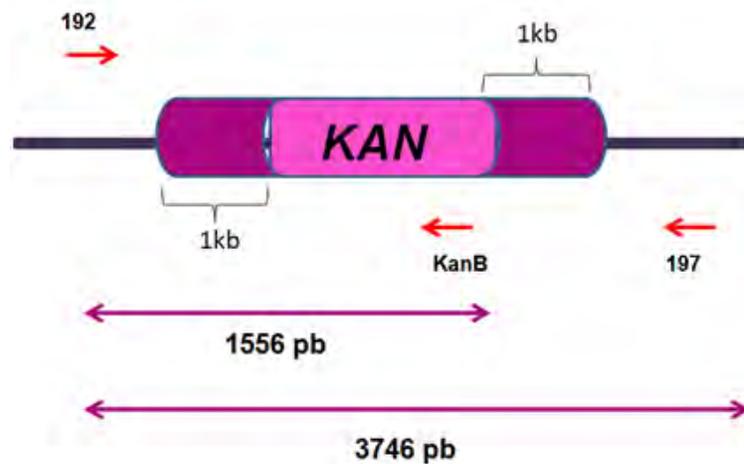


Figura 12. Comprobación del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico geneticina en el contexto genómico del gen *LkLEU4BIS*.

Una vez comprobado el genotipo de las mutantes sencillas, se generó la doble mutante *L. kluyveri Lkleu4ΔLkleu4BisΔ* (*Lkleu4*: : *NatMX*; *Lkleu4bis*: : *KanMX*). Para ello se utilizó como molde el ADN genómico de *L.kluyveri Lkleu4Δ*. Por medio de PCR se amplificó el módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia *NatMX* en el contexto genómico de *LkLEU4* (**Figura 13**) usando los oligonucleótidos 181/186. Se utilizó la enzima *Phusion High Fidelity®* (New England Biolabs). El producto de PCR se purificó utilizando el *kit Wizard Gel and PCR Clean-up System de Promega®*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

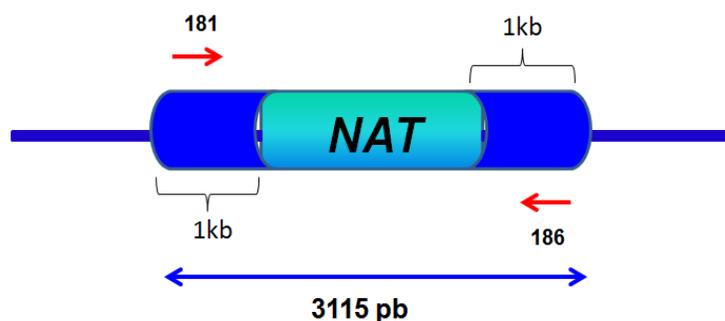


Figura 13. Módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia a nourseotricina, en medio de 1000 pb de la secuencia 5'UTR y 1000 pb de la secuencia 3'UTR del contexto genómico de *LkLEU4*.

El módulo de recombinación fue transformado por electroporación en la cepa *L. kluyveri Lkleu4BisΔ*. Para lo cual se cultivó durante toda la noche dicha cepa en medio líquido YPD-Leu con geneticina (282 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al día siguiente se inoculó un matraz con 25 mL de medio fresco YPD-Leu a una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de 0.25 y se dejó crecer hasta que alcanzó una DO_{600} entre 0.8-1.0, lo cual demoró alrededor de 4 horas.

Las células se recuperaron por centrifugación a una velocidad de 4000 xg durante 10 minutos y fueron resuspendidas en 5 mL de una solución estéril compuesta por amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 y ditioneitol (DTT) 25 mM; se incubaron 15 minutos a 37 °C en agitación constante (200 rpm). Después de esta incubación todo se trabajó en frío. Se centrifugó la suspensión (4000 xg, 10 minutos, 4 °C) y las células se lavaron dos veces en amortiguador de electroporación (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y MgCl_2 1mM), el primer lavado se llevó a cabo con 25 mL del amortiguador y el segundo con 12.5 mL. Se recuperaron las levaduras y se resuspendieron en 190 μL de este mismo amortiguador. 60 μL de la suspensión de células fueron transferidas a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se adicionó 1 μg del módulo de recombinación. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación pre-enfriada (*Gene Pulser Cuvette* de Biorad® Número de catálogo 165-2086) que tiene un espacio de 0.2 cm entre los electrodos y se dio un pulso eléctrico de 1.5 kV en el electroporador "*Micropulser*TM de Biorad®" (programa Fungi SC2).

A las células electroporadas se les agregó 1 mL de YPD-Leu y fueron incubadas durante 1.5 horas a 30 °C en agitación constante a 200 rpm. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación y resuspendidas en 100 µL de agua miliQ estéril, esta suspensión se plaqueó en medio YPD-Leu suplementado con nourseotricina (100 µg/mL) y geneticina (282 µg/mL). Las primeras colonias de las mutantes aparecieron en 6 días. Posteriormente se utilizaron los oligonucleótidos 192, KanB, 197, 182, 187 y Nat Re para verificar que ambos módulos estuvieran insertados.

Cultivo de levaduras y caracterización fenotípica

Para cultivar a *Lachancea kluyveri* WT se utilizó medio YPD, el cual es un medio rico compuesto por extracto de levadura 1 % m/v, peptona de caseína 2 % m/v y dextrosa 2 % m/v. Para cultivar las mutantes a las cuales se les deletaron uno o ambos genes codificantes para la α -Isopropilmalato sintasa se suplementó el YPD con L-leucina a una concentración de 100 mg/L.

Para las curvas de crecimiento se utilizó medio mínimo (MM) compuesto por base de nitrógeno para levadura (YNB: *Yeast Nitrogen Base*) sin aminoácidos (DIFCO) al cual se le agregó sulfato de amonio 40 mM como fuente de nitrógeno y de acuerdo al experimento, glucosa 2 % (m/v) o etanol al 2 % (v/v) como fuente de carbono. Para satisfacer las auxotrofías se suplementó el medio con uracilo 20 mg/L y L-leucina 100 mg/L en los casos que se requiriera.

Preinóculos de las cepas estudiadas se cultivaron por 12 horas en medio rico. Las células se lavaron dos veces con agua estéril y se tomó una alícuota para inocular por triplicado matraces con 50 mL de MM suplementado con la fuente de carbono a estudiar. La DO_{600} a la cual se inició el experimento fue 0.05, los cultivos se incubaron en agitación orbital constante a una velocidad de 250 rpm a 30 °C.

El crecimiento de los cultivos fue monitoreado midiendo la DO_{600} en un espectrofotómetro *Genesys 20 Modelo 4001/4, Thermo Fischer Scientific* cada 2 horas en el caso de que la fuente de carbono fuera glucosa y cada 3 horas cuando

la fuente de carbono era etanol. El crecimiento se monitoreó hasta la fase estacionaria.

Las curvas de crecimiento se graficaron en el programa *GraphPad Prism 5*. Para calcular la velocidad específica de crecimiento se obtuvo la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento a través de un ajuste por mínimos cuadrados de la recta. A partir de ese valor se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$td = \frac{\log 2}{m} \qquad \mu = \frac{\ln 2}{td}$$

En donde:

td: Tiempo de duplicación (h)

m: Pendiente en la fase exponencial de la curva de crecimiento

μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Clonación de *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*

Para obtener las proteínas recombinantes purificadas se empleó el método de cromatografía de afinidad en resina de níquel Ni-NTA de QIAGEN[®], es por eso que se decidió clonar los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* en el plásmido pET-28a(+) el cual añade una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de las proteínas (**Figura 14**).

Los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* fueron amplificados mediante PCR, usando los pares de oligonucleótidos E10472Fw/E10472Rv y F05170Fw/F05170Rv respectivamente. Se utilizó como templado el ADN genómico de la cepa *Lachancea kluyveri* Y156 WT. Fue empleada la enzima ADN polimerasa *Phusion High Fidelity*. Los productos de PCR obtenidos y el plásmido pET-28a(+) fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI/XhoI* para clonar el gen *LkLEU4* y con *SacI/XhoI* para clonar *LkLEU4BIS*. Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 1 % y se purificaron utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* de Promega[®], siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ligaron los plásmidos e insertos utilizando ligasa T4 de Invitrogen[®]. Células de *Escherichia coli* DH5 α químicamente competentes fueron transformadas mediante choque térmico con las reacciones de ligación. Esta cepa de clonación fue utilizada, ya que la mutación endA1 permite que haya poca actividad de endonucleasa, lo cual asegura que el plásmido no se degrade y que se produzca en una alta cantidad. Además, la mutación recA1 reduce la recombinación homóloga, lo que resulta en mayor estabilidad del inserto. El plásmido pET-28a(+) confiere resistencia a kanamicina, por lo que se utilizó este antibiótico para seleccionar las bacterias que fueron transformadas. Se comprobó que las colonias que crecieron en el medio con antibiótico tuvieran el plásmido con el inserto mediante PCR y dobles digestiones.

Los plásmidos fueron purificados utilizando el kit de QIAGEN[®] *Plasmid Maxi* siguiendo las indicaciones del fabricante y se enviaron a secuenciar a la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las secuencias

obtenidas se compararon con las reportadas en la base de datos *genolevures* (<http://genolevures.org/>).

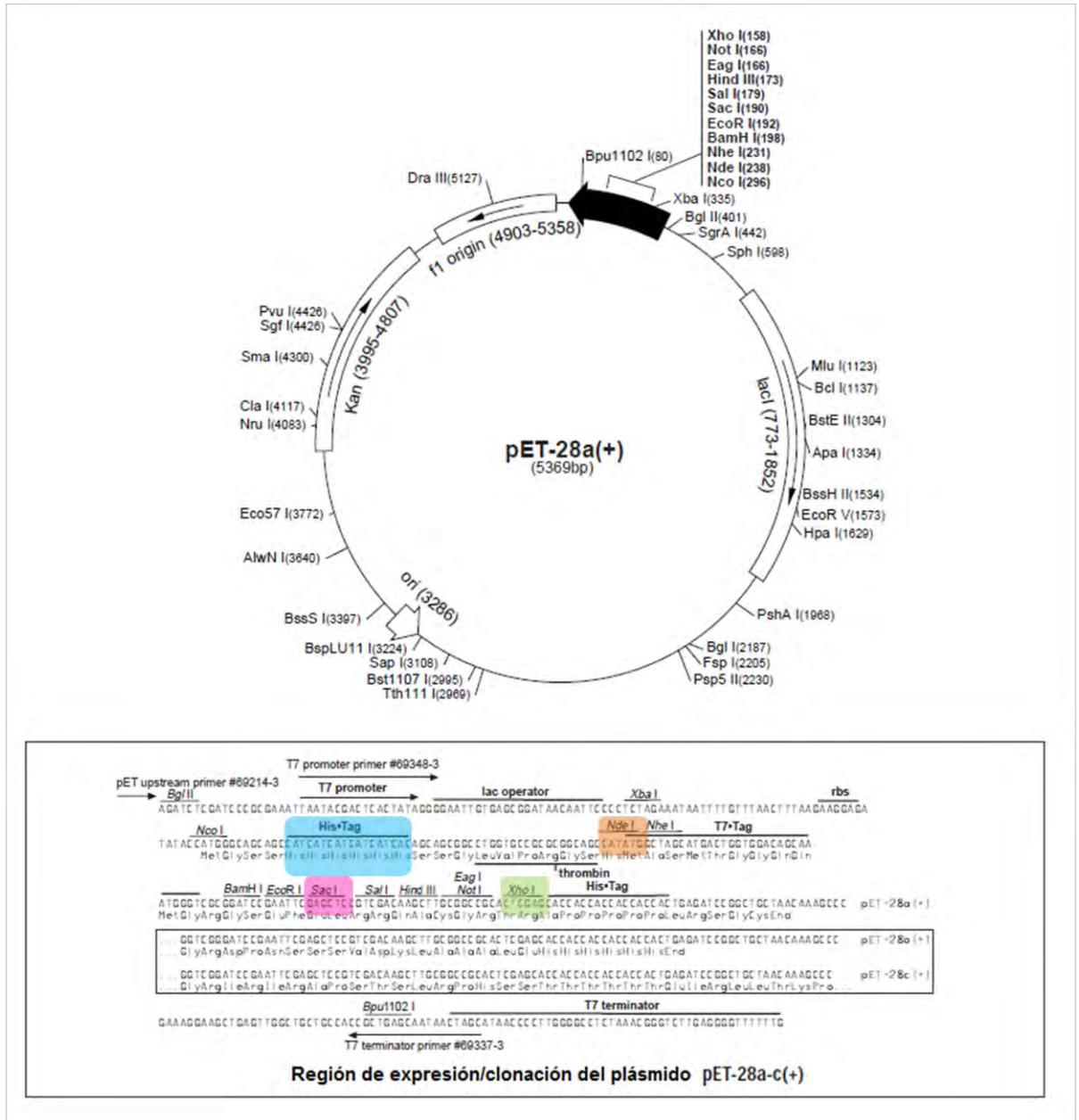


Figura 14. Representación gráfica del plásmido pET-28a(+) de Novagen, con su **región de expresión/clonación**. En el recuadro azul se encuentra la etiqueta de 6 histidinas. Los recuadros naranja, rosa y verde, encierran los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI*, *SacI* y *XhoI*, utilizadas en este proyecto.

Expresión de las proteínas recombinantes *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Para la expresión de las proteínas, las construcciones ya comprobadas se transformaron mediante choque térmico en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual fue tratada para hacerla químicamente competente. Esta cepa se utiliza para expresar proteínas, usando un sistema de inducción T7 ARN polimerasa-IPTG. Las transformantes seleccionadas se cultivaron en caldo LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, se incubaron a 37 °C en agitación orbital constante a 250 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.6 se indujo la expresión de las proteínas añadiendo IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final en el cultivo de 100 µM, se incubó el cultivo en agitación constante a 250 rpm a 22 °C durante al menos 4 horas. Transcurrido el tiempo de inducción las células se cosecharon centrifugando el cultivo a 5500 xg durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se conservó en ultracongelación a -80 °C hasta su uso.

Purificación de las proteínas recombinantes *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

La pastilla celular correspondiente a 1 L de cultivo se resuspendió en 10 mL de amortiguador de lisis (imidazol 10 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, y PMSF 1mM). Las células se rompieron usando ondas de alta frecuencia utilizando un sonicador de punta (*Ultrasonic Processor VCX130*), el proceso se llevó a cabo manteniendo los tubos con la suspensión bacteriana en hielo. Se realizaron 4 ciclos de sonicación (70 % de amplitud, un segundo de encendido y uno de apagado durante 45 segundos) alternando con 1 minuto de incubación en hielo entre cada ciclo. Para obtener la fracción soluble del extracto, se centrifugó el lisado celular a 35000 xg durante 30 minutos a 4 °C. El resto de la purificación se llevó a cabo a 4 °C en un cuarto frío.

Se recuperó el sobrenadante y fue cargado por gravedad en una columna de vidrio empacada con 2 mL de resina Ni-NTA QIAGEN®, la cual se equilibró con 10 mL de amortiguador de lisis. Se lavó la columna con 50 volúmenes de amortiguador con imidazol 10 mM (imidazol 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y

PMSF 1 mM) y con 25 volúmenes de imidazol 20 mM (imidazol 20 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y PMSF 1 mM). La proteína se eluyó con 5 mL de amortiguador con imidazol 100 mM (imidazol 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y PMSF 1 mM).

La proteína eluída fue cargada en una columna con 1 mL de *Sephadex G-50* equilibrada con solución de fosfatos (amortiguador de fosfatos $[H_2PO_4^-]/[HPO_4^{2-}]$ pH 7.5, 50 mM, $MgCl_2$ 4 mM, KCl 50 mM) y concentrada usando centricones con un corte de membrana de 10 kDa.

Se cuantificó la proteína obtenida mediante el método de Lowry, y se almacenó en glicerol al 50 % a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso

La pureza y homogeneidad de las proteínas fue verificada por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10 % teñidos con azul de Coomassie G250.

Determinación de la concentración de proteína

La concentración de las enzimas purificadas fue determinada por el método de Lowry (1951). Se trata de una reacción colorimétrica que se lleva a cabo en medio básico, en donde los nitrógenos del enlace peptídico reaccionan con Cu^{2+} formando complejos coloridos y desdoblado a la proteína. Posteriormente el reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotugstenato) es reducido por las tirosinas presentes en la proteína. El resultado de la reacción se lee en el espectrofotómetro a 600 nm. Para cada muestra se hizo la determinación por triplicado. El valor obtenido es interpolado en una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) para determinar la concentración de proteínas en la muestra.

Determinación de la Actividad Específica de las α -IPMSs

Las enzimas α -isopropilmalato sintasas (α -IPMSs) catalizan la condensación aldólica del α -cetoisovalerato (α -KIV) con el acetilCoA (AcCoA) para producir α -isopropilmalato (α -IPM) y coenzima A (Ulm y Kohlhaw, 1972).

El reactivo de Ellman (DTNB; ácido 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzónico) es usado para cuantificar la concentración de grupos tioles en una muestra. Es una reacción rápida y estequiométrica. En este ensayo (**Figura 15**) un mol de Coenzima A reacciona con un mol de DTNB para generar un mol de TNB²⁻ (2-nitro-tiobenzoato), el cual se ioniza a TNB²⁻ que es un compuesto de color amarillo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm. Para relacionar la absorbancia con la concentración de tioles en la muestra se utiliza el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) del DTNB a 412 nm, cuyo valor es $14.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

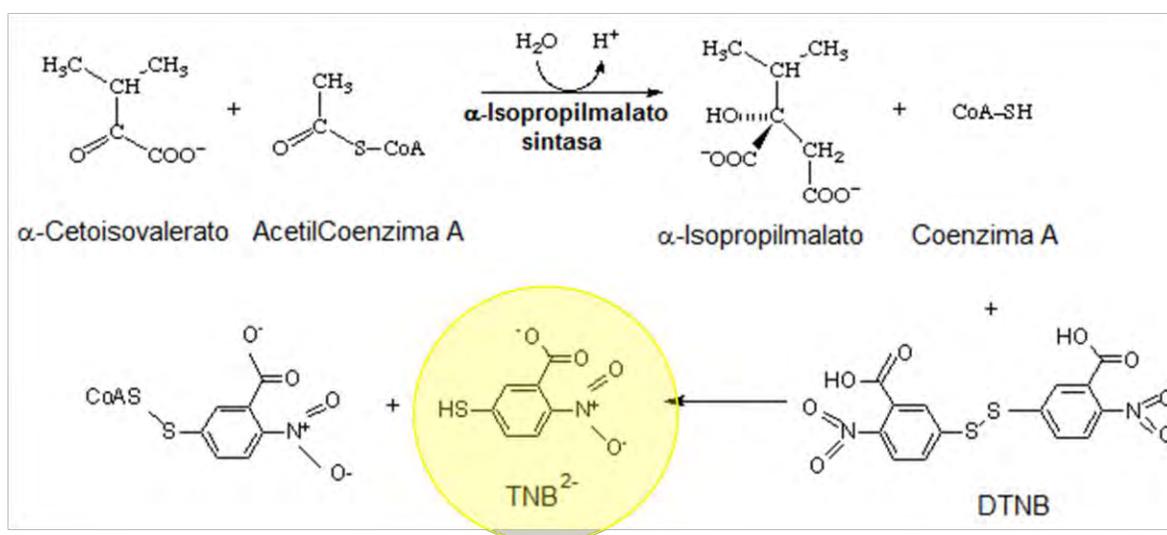


Figura 15. Determinación de actividad enzimática. Ensayo cinético acoplado con la reacción colorimétrica de Ellman. TNB²⁻ es un compuesto color amarillo cuya aparición se cuantifica espectrofotométricamente.

La actividad enzimática fue determinada a 30 °C en 1 mL de mezcla de reacción que contenía: amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 4 mM, KCl 50 mM, AcCoA 0.25 mM, αKIV 10 mM y DTNB 0.1 mM. Las celdas fueron equilibradas durante 5 minutos a 30 °C para que completara la reacción del DTNB con la posible coenzima A contaminante presente en el AcCoA comercial.

El ensayo se inicia al adicionar la enzima pura a la mezcla de reacción y la actividad específica se obtiene a través del cambio en la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro *Varian Cary 50 UV-Visible*. Se

utilizaron celdas de 1 cm de longitud de paso de luz. La actividad específica se calculó con la **ecuación 1**:

$$AE = \frac{m * \left(1000 \frac{\text{nmol}}{\mu\text{mol}}\right)}{\varepsilon * \text{proteína} * l} = \text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$$

Ecuación 1. Fórmula para calcular la Actividad específica de una enzima

En donde:

- AE= Actividad Específica
- m= cambio de la absorbancia por minuto a 412 nm
- ε = coeficiente de extinción molar de TNB²⁻ = 14.15 mM⁻¹ cm⁻¹.
- Proteína usada en el ensayo (mg)
- l= longitud de la celda= 1 cm

Cálculo de los parámetros cinéticos de las enzimas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Para caracterizar la cinética de ambas enzimas se realizaron mediciones de velocidad inicial variando ambos sustratos (AcCoA y α -KIV) simultáneamente. Para *LkLeu4* el AcCoA se varió de 0.005 mM a 0.5 mM y el α -KIV de 0.025 mM a 0.15 mM. Para *LkLeu4Bis* se varió el AcCoA de 0.003 mM a 0.125 mM y el α -KIV de 0.025 mM a 0.5 mM. Los resultados se ajustaron por regresión no lineal con un ajuste global a la **ecuación 2** usando el programa *GraphPad Prism 5*. Esta ecuación describe un mecanismo enzimático Bi-Bi en condiciones de estado estacionario.

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

Ecuación 2. Mecanismo enzimático Bi-Bi en condiciones de estado estacionario

En donde:

- v = Velocidad inicial
- V_{\max} = Velocidad Máxima

- [A]= Concentración de AcCoA
- [B]= Concentración de α -KIV
- $K_a = K_m$ para AcCoA: Concentración de AcCoA en la cual $v = \frac{1}{2}V_{max}$ cuando α -KIV se encuentra en concentración saturante.
- $K_b = K_m$ para α -KIV: Concentración de α -KIV en la cual $v = \frac{1}{2}V_{max}$ cuando AcCoA se encuentra en concentración saturante.
- K_{ia} = Constante de disociación del AcCoA del complejo enzima-sustratos

Cinéticas de Inhibición por leucina

Para estudiar la inhibición por leucina de *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* se realizaron mediciones de velocidad inicial variando la concentración del inhibidor mientras se variaba la concentración de uno de los sustratos y la concentración del otro sustrato se mantenía constante en condiciones saturantes. Los datos fueron ajustados usando el *software GraphPad Prism 5* al modelo de inhibición no competitiva mixta, descrito por las **ecuaciones 3 y 4**.

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

Ecuación 3. Modelo de inhibición no competitiva mixta cuando se varía AcCoA y el inhibidor

En donde:

- v = Velocidad inicial
- V_{max} = Velocidad Máxima
- [A]= Concentración de AcCoA (variable)
- B= Concentración saturante de α -KIV (constante)
- I= Concentración del Inhibidor (leucina)
- $K_a = K_m$ para AcCoA.
- K_{ib} = Constante de disociación del α -KIV del complejo enzima-sustratos
- K_{is} = Constante de disociación del inhibidor y la enzima libre

- K_{ii} = Constante de disociación del inhibidor y el complejo enzima-sustratos

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

Ecuación 4. Modelo de Inhibición no competitiva mixta cuando se varía α -KIV y el inhibidor

En donde:

- v = Velocidad inicial
- V_{\max} = Velocidad Máxima
- $[B]$ = Concentración de α -KIV (variable)
- A = Concentración saturante de AcCoA (constante)
- I = Concentración del Inhibidor (leucina)
- $K_b = K_m$ para α -KIV: Concentración de α -KIV en la cual $v = \frac{1}{2}V_{\max}$ cuando AcCoA se encuentra en concentración saturante.
- K_{ia} = Constante de disociación del AcCoA del complejo enzima-sustratos
- K_{is} = Constante de disociación del inhibidor y la enzima libre
- K_{ii} = Constante de disociación del inhibidor y el complejo enzima-sustratos

Cálculo de la concentración inhibitoria media (IC_{50})

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) es la concentración del inhibidor a la cual una enzima presenta la mitad de su actividad. La IC_{50} de ambas enzimas fue calculada para conocer cuál es el perfil de sensibilidad que presentan ante el producto final. Para ello se midió la velocidad inicial por duplicado de cada una de las enzimas variando la concentración de leucina y manteniendo constante la concentración de los sustratos (AcCoA 0.25 mM y α -KIV 2.5 mM). Los datos fueron graficados en *GraphPad Prism 5*.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Comprobación de las mutantes sencillas

La Dra. Lina Riego Ruíz nos facilitó cuatro clonas de cada una de las mutantes nulas *Lkleu4* Δ (*Lkleu4*: :*NatMX*) y *Lkleu4bis* Δ (*Lkleu4bis*: :*KanMX*), las cuales fueron obtenidas por su grupo de trabajo mediante reemplazo por recombinación homóloga. Se verificó el genotipo de las mutantes recibidas a través de PCR.

Para determinar la ausencia del gen mutado y la presencia del gen parálogo, se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican a los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*. Se utilizó como molde ADN genómico extraído de las cepas. En la **figura 16 C**, se observa que las cuatro clonas de la cepa *Lkleu4* Δ no poseen el gen *LkLEU4*, mientras que las cuatro clonas de la cepa *Lkleu4bis* Δ si lo poseen. En la **figura 16D**, se observan bandas de amplificación que demuestran que en la cepa *Lkleu4* Δ está presente el gen *LEU4BIS*, mientras que en las cuatro clonas de la cepa *Lkleu4bis* Δ no está presente. Como control positivo se utilizó como molde el ADN genómico de la cepa *L. kluyveri* Y156 WT y se observa la presencia de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*.

También se comprobó que las cepas contaran con los módulos de recombinación en el contexto de cada uno de los genes deletados. Se hizo uso de oligonucleótidos externos a los módulos de recombinación e internos a los genes de resistencia, generando fragmentos con patrones de peso molecular diferenciables de una cepa silvestre, según lo descrito en las **figuras 17A y 17B**.

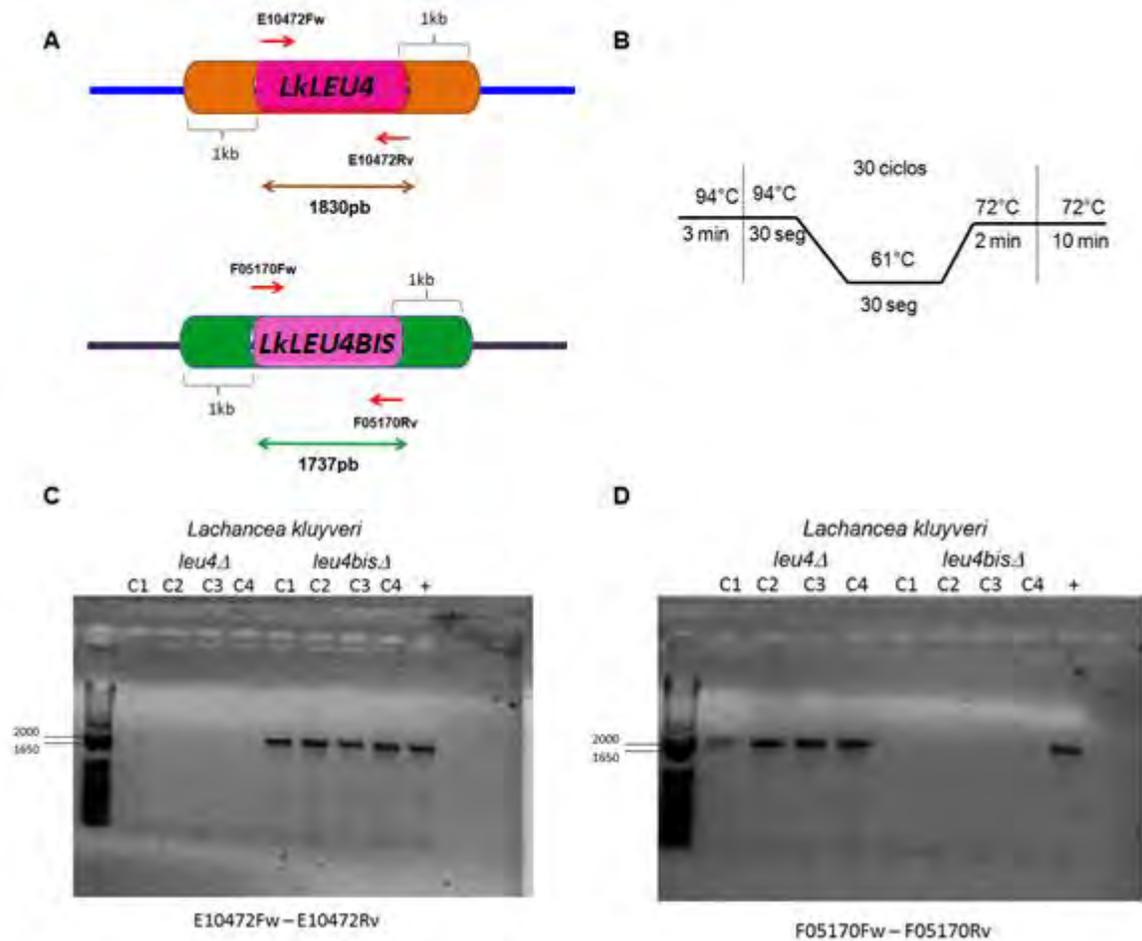


Figura 16. Comprobación de las mutantes *Lkleu4Δ* y *Lkleu4bisΔ*.

A. Representación de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*. En flechas rojas se esquematiza la posición de los oligonucleótidos utilizados. Se muestran los pesos esperados para los amplicones. **B.** Condiciones de la PCR usando *Taq* polimerasa purificada en el laboratorio.

C. En las cuatro clonas de *Lkleu4bisΔ* se observan bandas que demuestran que el gen *LkLEU4* está presente. **D.** En las cuatro clonas de *Lkleu4Δ* se observan bandas que demuestran que el gen *LkLEU4BIS* está presente.

Geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen.

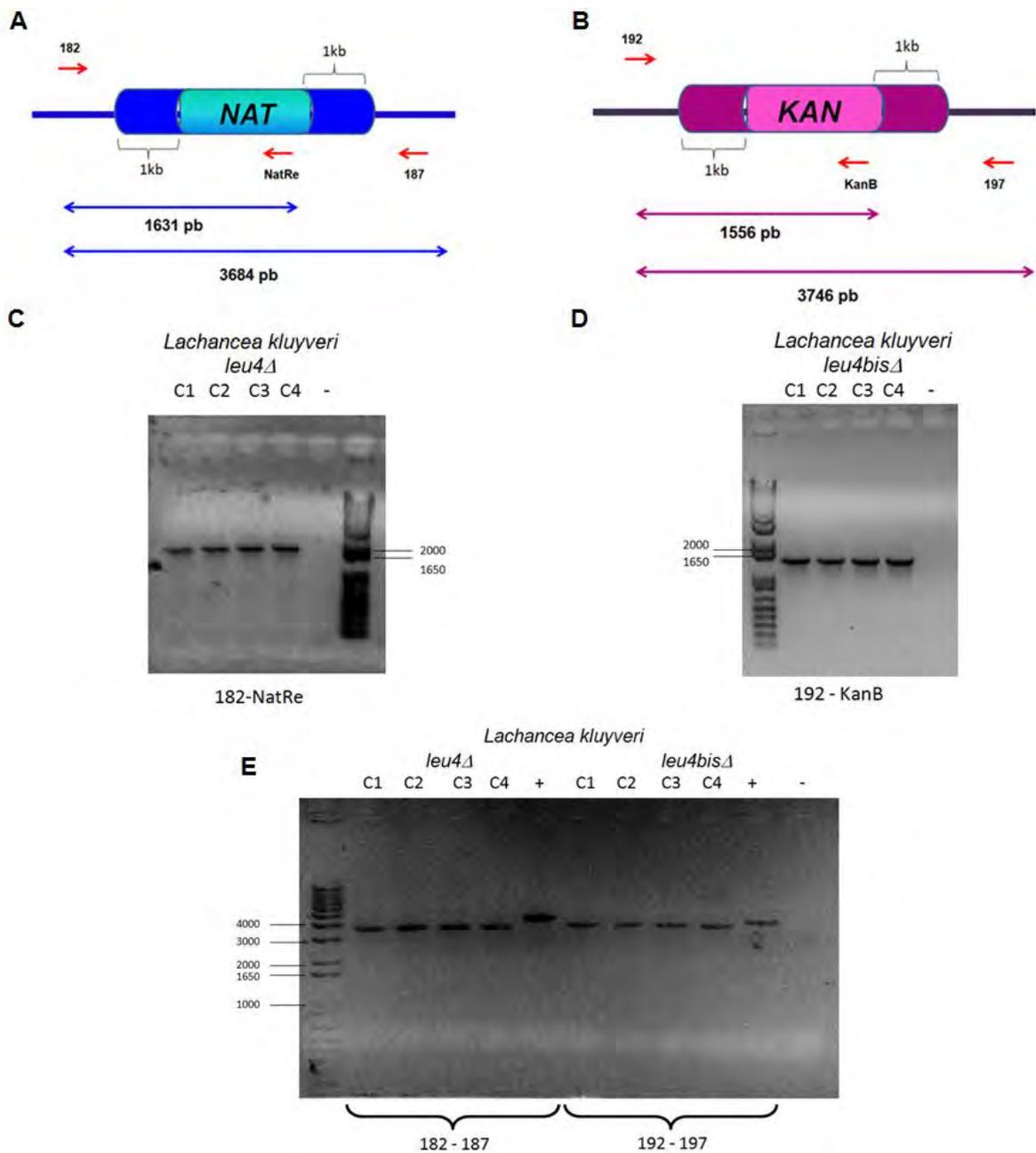


Figura 17. Verificación de los módulos de recombinación.

A. Representación del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina en el contexto genómico del gen *LkLEU4*. **B.** Representación del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico geneticina en el contexto genómico del gen *LkLEU4BIS*. **C.** ADN amplificado por los oligonucleótidos 182-NatRe (1631 pb). **D.** ADN amplificado por los oligonucleótidos 192-KanB (1556 pb). **E.** ADN amplificado por los oligonucleótidos 182-187 (3684 pb) y 192-197 (3746 pb).

Geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen.

En las **figuras 17C y 17E** se observan bandas de amplificación en los pesos esperados, que confirman que las cuatro clonas de la cepa *Lkleu4*Δ tienen el módulo de recombinación con el marcador de selección *NatMX* en el contexto genómico del gen *LkLEU4*. En las **figuras 17D y 17E** se encuentran presentes las bandas en los pesos esperados, lo que demuestra que las cuatro clonas de la cepa *Lkleu4bis*Δ poseen el módulo *KanMX* en el contexto genómico del gen *LkLEU4BIS*. Como control positivo se utilizó el ADN genómico de la cepa WT, se observan bandas de amplificación que corresponden a los genes *LkLEU4* (4370 pb) y *LkLEU4BIS* (4120 pb) en su propio contexto genómico.

Construcción de la doble mutante *Lkleu4*Δ *Lkleu4bis*Δ

Una vez comprobado el genotipo de las mutantes sencillas, se generó la doble mutante *L. kluyveri Lkleu4*Δ *Lkleu4bis*Δ (*Lkleu4*::*NatMX*; *Lkleu4bis*::*KanMX*). Mediante PCR se amplificó el módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia *NatMX* en el contexto genómico de *LkLEU4*. Se utilizó como molde el ADN genómico de la mutante *Lkleu4*Δ (**Figura 18**).

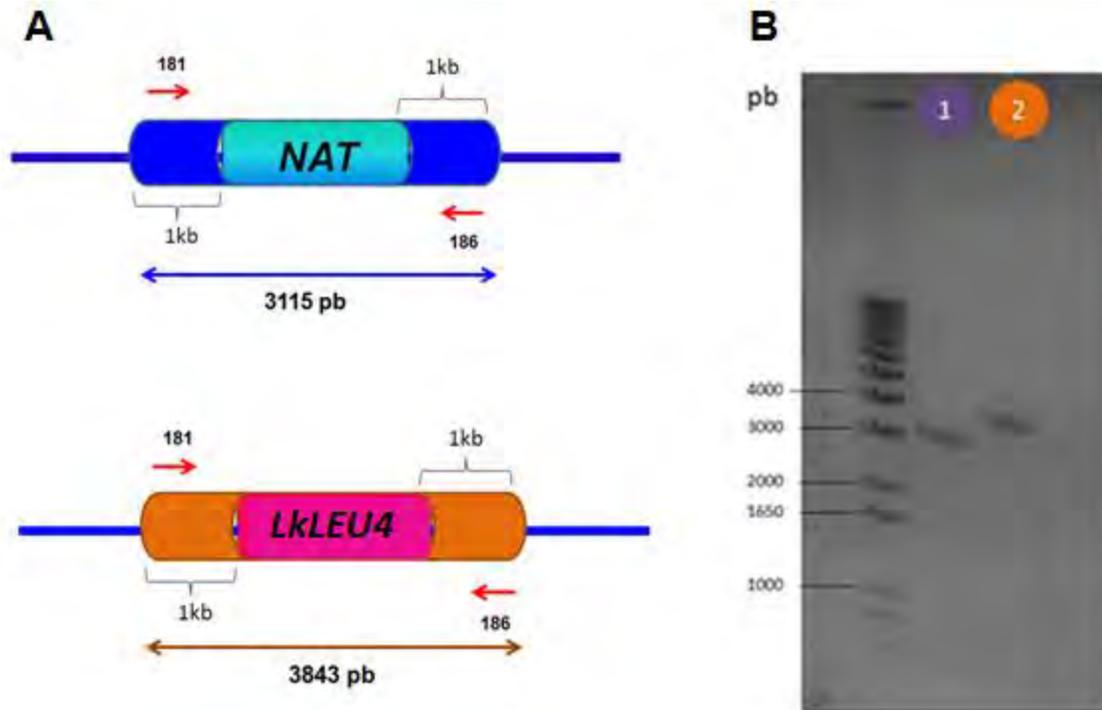


Figura 18. Amplificación del módulo de recombinación *NatMX*.

A. Representación del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico nourseotricina en el contexto genómico del gen *LkLEU4*. Y representación del gen *LkLEU4*. En rojo se indican los oligonucleótidos utilizados. **B.** Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, CARRIL 1: Amplificación del módulo de recombinación *NATMX*; CARRIL 2: Control positivo, *LEU4* en su contexto genómico, 1000 pb río arriba del inicio del gen y 1000 pb río abajo fin del gen. Se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen

Se purificó el módulo amplificado y se transformó en la cepa *Lkleu4bisΔ* mediante electroporación. Mediante PCR se comprobó que las colonias que crecieron bajo presión selectiva de los antibióticos nourseotricina y geneticina tuvieran insertados los marcadores. Inicialmente, se probaron 8 clonas utilizando los oligonucleótidos 192-Kan B para identificar al marcador *KanMX* y 182- Nat Re para identificar al marcador *NatMX* (**Figura 19**).

Lachancea kluyveri
Lkleu4ΔLkleu4bisΔ

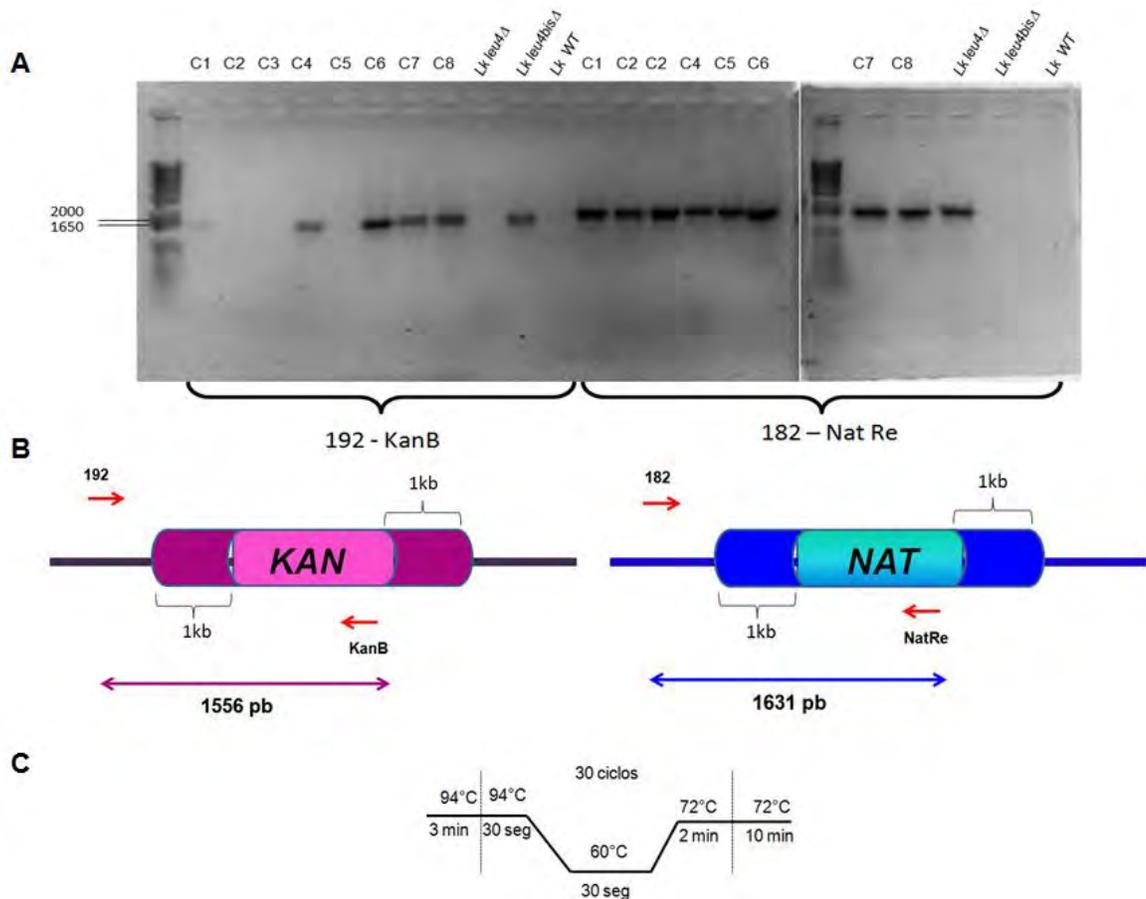


Figura 19. Comprobación de los módulos de recombinación en la doble mutante. **A.** Geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio, Se observa que las clonas C4, C6, C7 y C8 contienen ambos módulos de recombinación. **B.** Representación de los módulos de recombinación. En rojo se indican los oligonucleótidos utilizados. **C.** Condiciones en las cuales se realizó la PCR. Se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen

En la **Figura 19** se observa que hay bandas de amplificación en los pesos esperados, en los carriles correspondientes a las clonas C4, C6, C7 y C8. Para completar la verificación, se utilizaron los pares de oligonucleótidos 182-187 y 192-197 (**Figura 20**). En los controles positivos se amplificaron los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* en sus contextos genómicos (4370 pb y 4120 pb respectivamente). Se observan bandas en los pesos esperados. Las cuatro clonas probadas corresponden a la doble mutante.

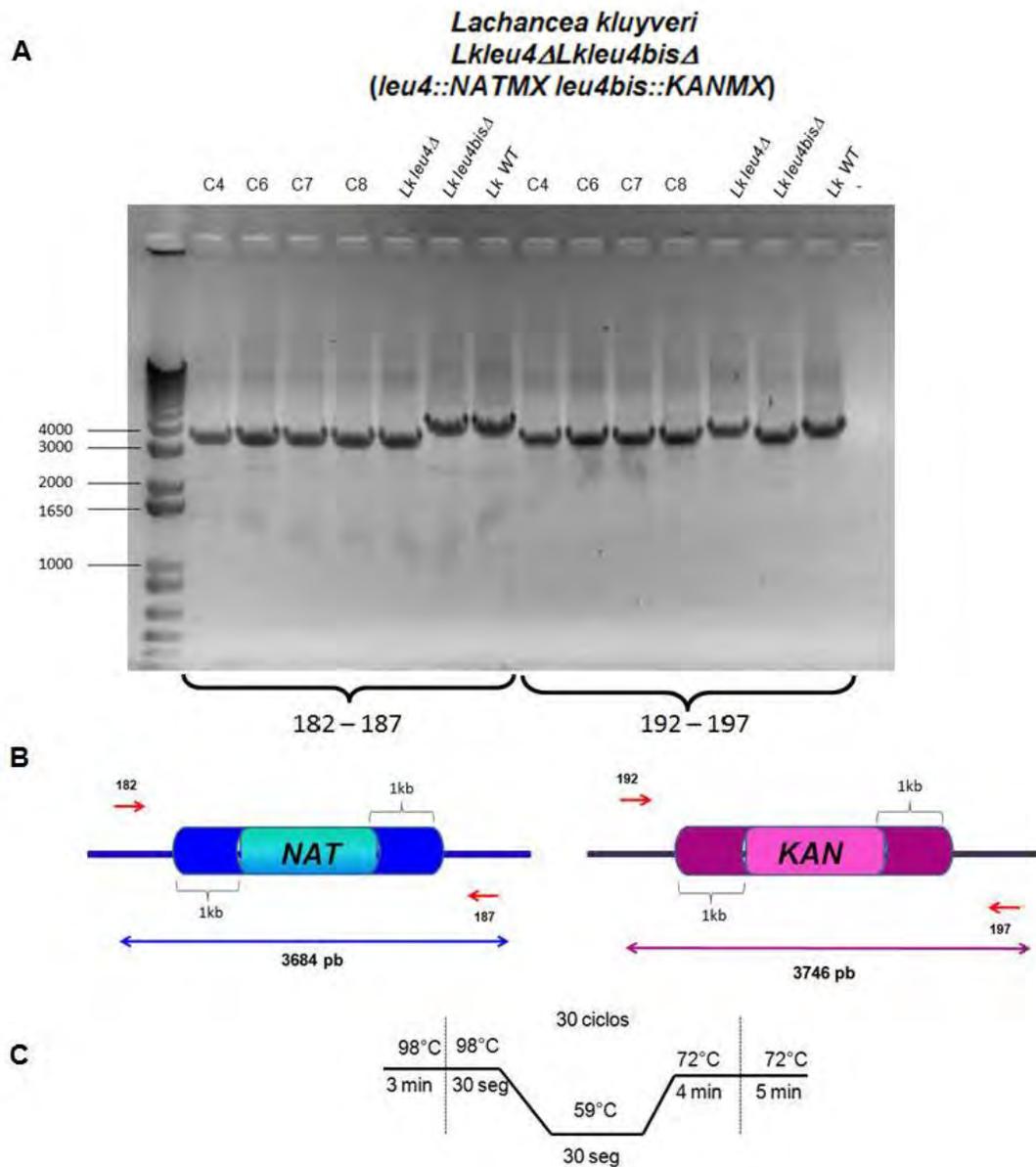


Figura 20. Comprobación de los módulos de recombinación en los contextos genómicos de *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*. **A.** Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, **B.** Representación de los módulos de recombinación. En rojo se indican los oligonucleótidos utilizados. **C.** Condiciones en las cuales se realizó la PCR. Se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen.

Análisis fisiológico de las mutantes *Lkleu4* Δ , *Lkleu4bis* Δ y *Lkleu4* Δ *Lkleu4bis* Δ

Para analizar el papel fisiológico de las enzimas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* se realizaron curvas de crecimiento de la cepa silvestre de *Lachancea kluyveri* Y156, y de las mutantes *Lkleu4* Δ , *Lkleu4bis* Δ y *Lkleu4* Δ *Lkleu4bis* Δ . Para ello se utilizó medio mínimo con glucosa o etanol al 2 % como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno.

En cultivos tanto con glucosa como con etanol como fuente de carbono, y en ausencia de leucina, se determinó que la doble mutante es auxótrofa a este aminoácido ya que no presenta crecimiento (**Figuras 21A y 22A**) lo cual quiere decir que *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* son las únicas proteínas involucradas en la producción de α -isopropilmalato y que en su ausencia esta levadura es incapaz de sintetizar leucina. En estas mismas figuras se observa que la mutante *Lkleu4* Δ es auxótrofa parcial a la leucina ya que en ausencia de este aminoácido la velocidad de crecimiento es menor respecto a la cepa silvestre. Cuando la fuente de carbono es glucosa, la velocidad de crecimiento se restituye al agregar leucina (**Figura 21C y 21D**), lo cual no ocurre cuando la fuente de carbono es etanol (**Figura 22C y 22D**). En presencia de cualquiera de estas fuentes de carbono la mutante *Lkleu4bis* Δ no presentó cambio en el fenotipo con relación a la cepa silvestre.

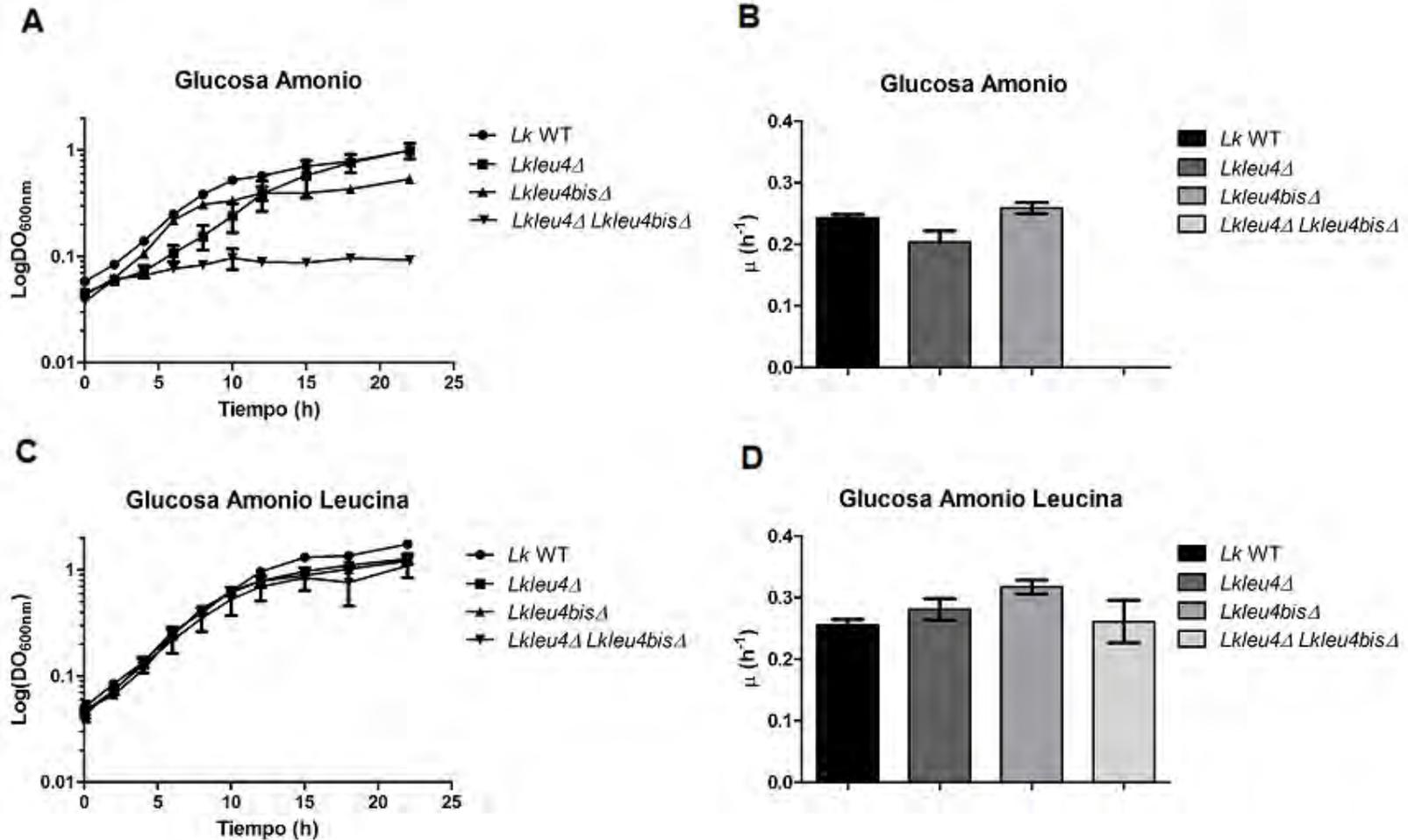


Figura 21. Curvas de crecimiento y velocidad específica de crecimiento μ (h⁻¹) de las cepas de *L. kluyveri* (*Lk*WT, *Lkleu4*Δ, *Lkleu4bis*Δ y *Lkleu4*Δ *Lkleu4bis*Δ). Cultivos realizados en medio mínimo YNB suplementado con 2% de glucosa, 40 mM de sulfato de amonio, 20 mg/L de uracilo, y dependiendo el caso 100 mg/L de L-leucina. **A y B. Glucosa-amonio-uracilo **C y D.** Glucosa-amonio-uracilo-leucina. Se graficó la media de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar correspondiente**

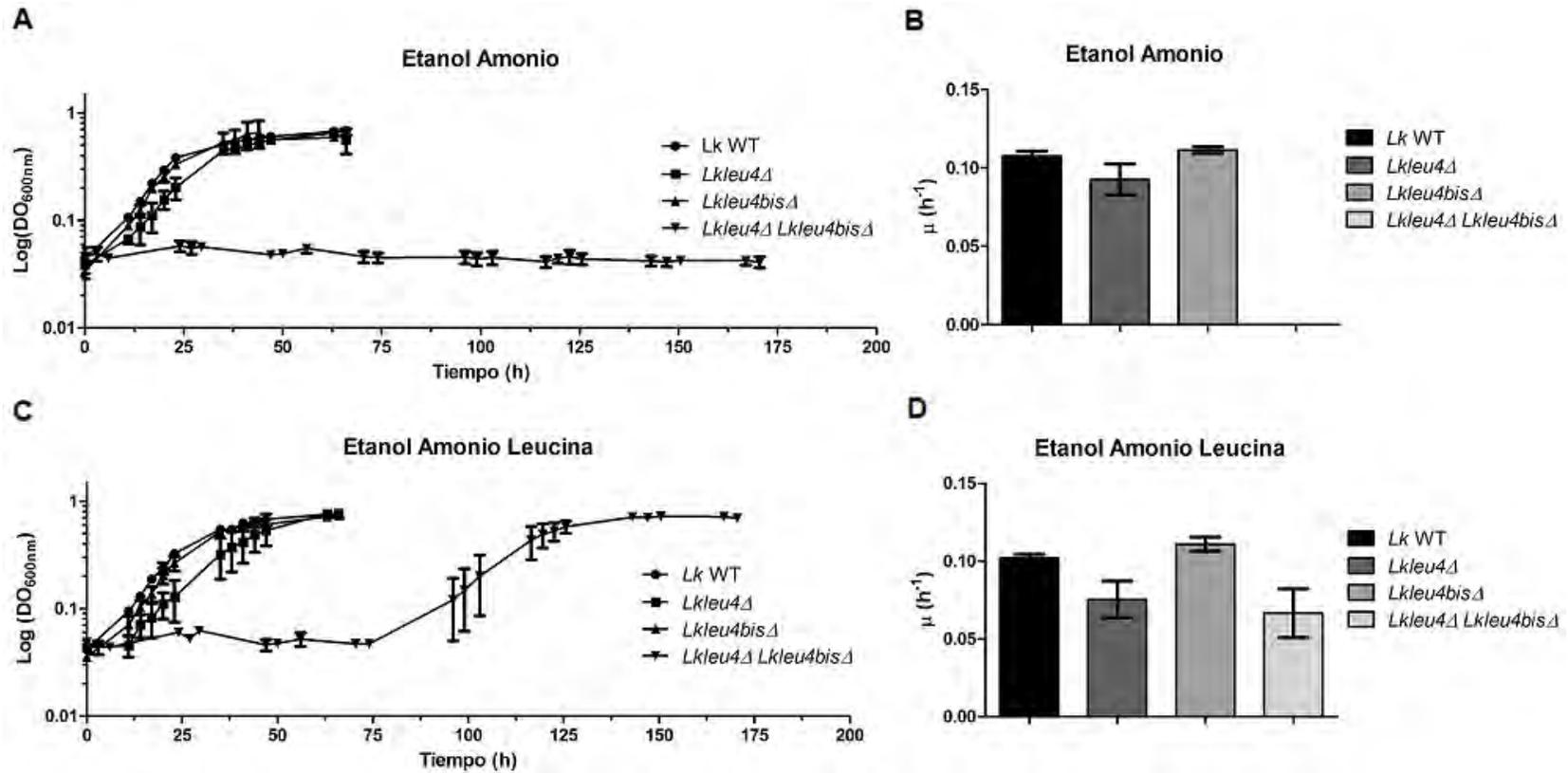


Figura 22. Curvas de crecimiento y Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) de las cepas de *L. kluyveri* (*LkWT*, *Lkleu4Δ*, *Lkleu4bisΔ* y *Lkleu4Δ Lkleu4bisΔ*). Cultivos realizados en medio mínimo YNB suplementado con 2% de etanol 40 mM de sulfato de amonio, 20 mg/L de uracilo, y dependiendo el caso 100 mg/L de L-leucina. **A y B. Etanol-amonio-uracilo **C y D.** Etanol-amonio-uracilo-leucina. Se graficó la media de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar correspondiente**

CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Uno de los objetivos de este trabajo fue caracterizar a *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* para conocer sus parámetros cinéticos, esto con el fin de establecer si existe divergencia funcional de ambas proteínas relacionada con la afinidad a sustratos o sensibilidad a leucina. Para realizar los análisis cinéticos se utilizaron las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} . Para lo cual, se requirió de clonar los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* en el plásmido pET28a+. Los fragmentos a clonar se obtuvieron mediante PCR, utilizando como molde el ADN genómico de la cepa *L. kluyveri* Y156 WT. Se usó la enzima *Phusion High Fidelity DNA polymerase*. En la **figura 23D** se observan los fragmentos amplificados en un gel de agarosa al 1 %, ambos fragmentos tienen el peso esperado.

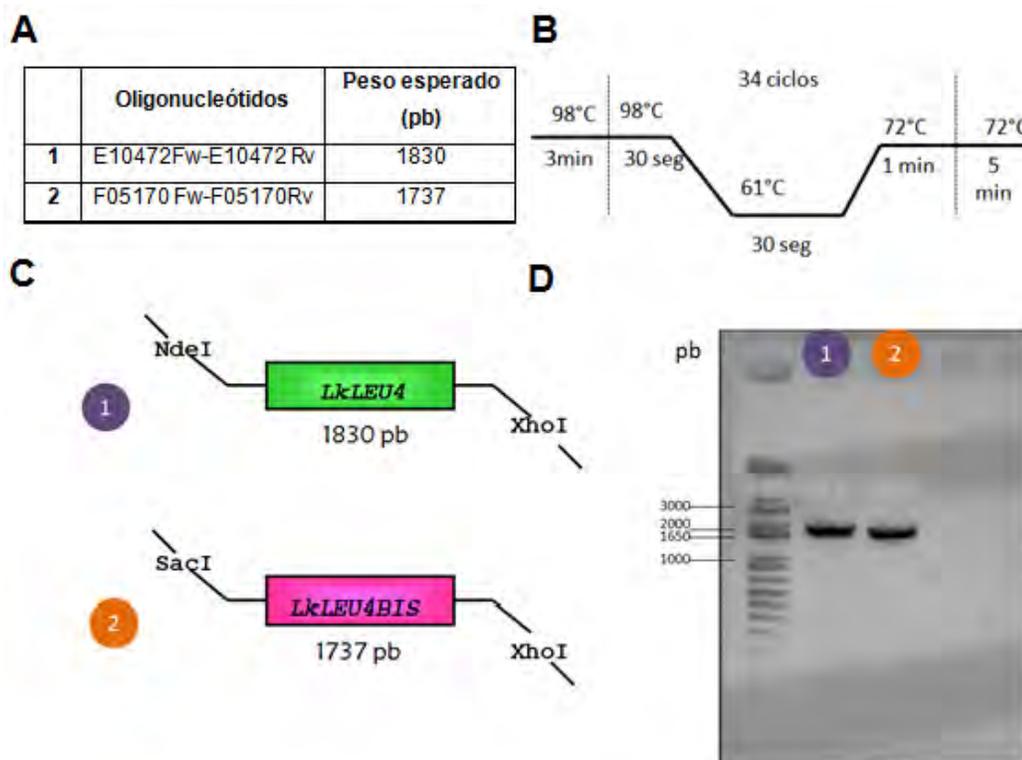


Figura 23. Amplificación de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* con sitios de restricción.
A. Tabla con los oligonucleótidos usados en cada una de las PCR para amplificar los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*. **B.** Condiciones de la PCR. **C.** Representación gráfica de los fragmentos amplificados, ambos con los sitios de corte de las enzimas que se usaron para la clonación. **D.** Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, se utilizó el marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen.

Se purificaron los productos de PCR de acuerdo a lo descrito en la sección de material y métodos y se hicieron las siguientes dobles digestiones:

DNA a digerir	Enzimas de digestión usadas (New England Biolabs)
pET28a+	<i>NdeI/XhoI</i>
<i>LkLEU4</i>	<i>NdeI/XhoI</i>
pET28a+	<i>SacI/XhoI</i>
<i>LkLEU4BIS</i>	<i>SacI/XhoI</i>

El material digerido fue purificado y posteriormente se realizaron las siguientes reacciones de ligación utilizando ligasa T4 de Invitrogen®:

- pET28a+ *NdeI/XhoI* con *LkLEU4 NdeI/XhoI*
- pET28a+ *SacI/XhoI* con *LkLEU4BIS SacI/XhoI*

Las reacciones de ligación fueron transformadas en células de *Escherichia coli* DH5 α químicamente competentes mediante choque térmico y se plaquearon en medio LB con kanamicina (50 μ g/mL). Se utilizó esta cepa ya que maximiza la eficiencia de transformación al contar con las mutaciones *recA1* y *endA1*. La mutación *recA1* elimina la actividad de las recombinasas de la cepa, evitando la recombinación homóloga. La mutación *endA1* inactiva las endonucleasas intracelulares, lo cual previene la degradación del plásmido insertado.

Para verificar que las colonias que crecieron en el medio, bajo la presión selectiva de la kanamicina, tuvieran los plásmidos con los genes clonados, se realizó PCR de colonia (**Figura 24**). En la **figura 24C** se muestra el gel correspondiente al PCR de las colonias obtenidas de la transformación con el plásmido pET28a+*LkLEU4*, se observa que la colonia 1 posee el inserto, ya que la banda obtenida coincide con la del control positivo. En la **figura 24D**, que corresponde a las colonias obtenidas de la transformación con el plásmido pET28a+*LkLEU4BIS*, se observan bandas de amplificación en las colonias 2 a 6 en el peso esperado, y que además coinciden con el control positivo, lo cual indica que el plásmido con el inserto está presente.

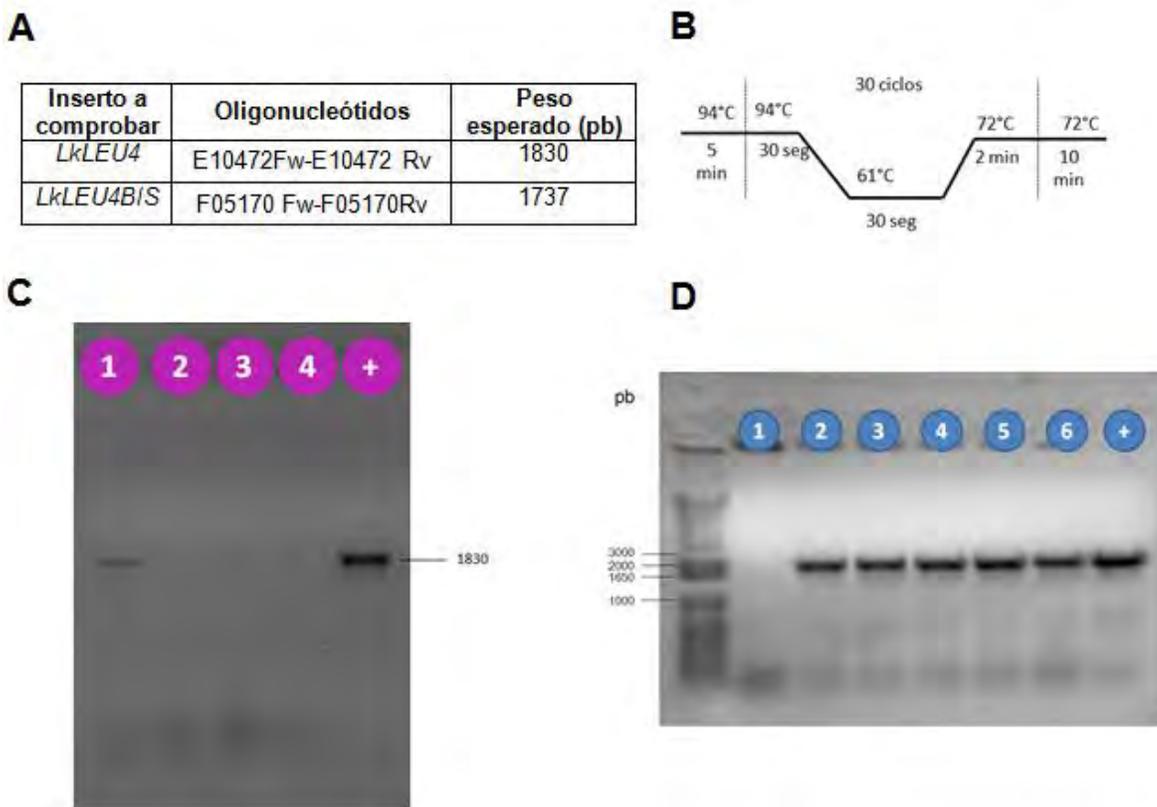


Figura 24. Presencia de los plásmidos con los genes clonados en la cepa *E. coli* DH5 α .

A. Tabla con los oligonucleótidos usados en para cada fragmento a comprobar. **B.**

Condiciones de la PCR. **C.** Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

Comprobación por PCR de la construcción pET28a+ *LkLEU4*. Control positivo: *LkLEU4*

amplificado a partir del DNA genómico. **D.** Gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de

etidio. Comprobación por PCR de la construcción pET28a+ *LkLEU4BIS*. Control positivo: *LkLEU4BIS* amplificado a partir del DNA genómico. Marcador de peso molecular: *1 Kb Plus DNA Ladder* de Invitrogen.

Se purificó el ADN plasmídico y se comprobaron las construcciones mediante dobles digestiones. En la **figura 25**, se observan las construcciones digeridas y sin digerir. Los carriles 1 y 3 corresponden a los plásmidos sin digerir, las bandas observadas corresponden a los diferentes estados de superenrollamiento. En el carril 2 se encuentra el plásmido pET28a+*LkLEU4* digerido con *NdeI/XhoI*; se observa el plásmido linealizado en 5290 pb y el gen *LEU4* en 1830 pb. El carril 4 corresponde a la construcción pET28a+*LkLEU4BIS* digerida con *SacI/XhoI*; Se observa el plásmido linealizado en 5360pb y el gen *LkLEU4BIS* en 1737pb.

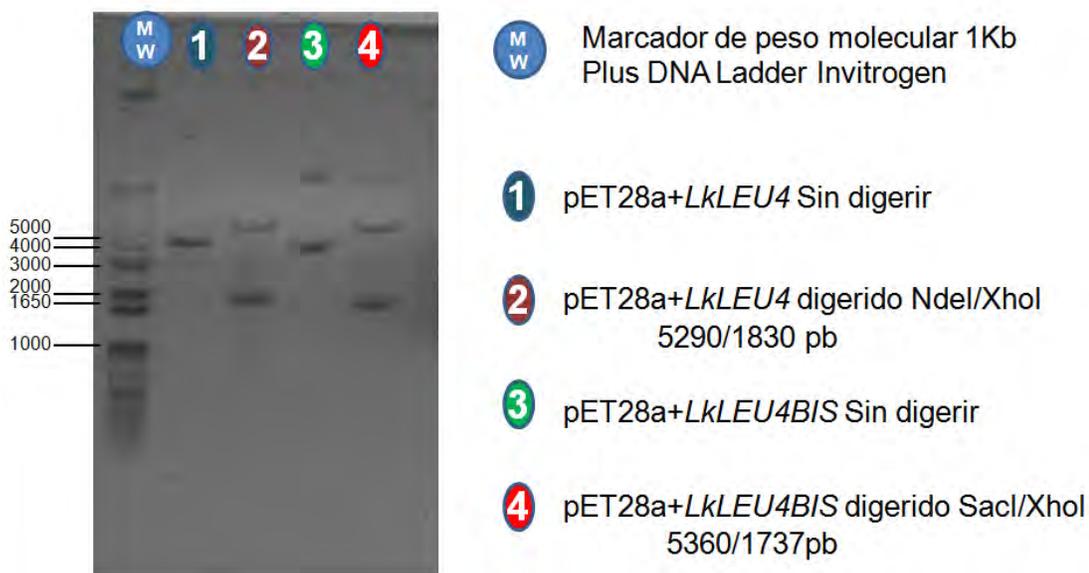


Figura 25. Comprobación por doble digestión de los plásmidos construidos. Los carriles 1 y 3 corresponden a los plásmidos sin digerir. Los carriles 2 y 4 corresponden a los plásmidos digeridos. Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Marcador de peso molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen.

Se secuenciaron los genes clonados en los plásmidos para verificar que la PCR no hubiera introducido ninguna mutación. La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Con el resultado se realizó un alineamiento en el software bioinformático *Geneious* para comparar la secuencia obtenida con la reportada en la base de datos *Genolevures* (<http://www.genolevures.org/sakl.html>). En los resultados del alineamiento de *LkLEU4* se encontró un cambio de base con respecto a la secuencia reportada en la base de datos. Se realizó nuevamente el PCR y la secuenciación, y al hacer el alineamiento notamos que el cambio persistió. Con respecto a la secuencia reportada, en la cepa con que contamos (*L. kluyveri* Y156), la proteína *LkLeu4* tiene una valina en lugar de una fenilalanina en la posición 422 (F422V). Se midió la actividad del extracto crudo y se observó que la enzima contaba con actividad, por lo que el cambio de base debe ser propio de la cepa y no afecta su capacidad catalítica. Los resultados del alineamiento de la secuenciación de *LkLEU4Bis* coinciden con la secuencia reportada en *Genolevures*.

Expresión de las proteínas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Las construcciones ya comprobadas se transformaron mediante choque térmico en *E. coli* BL21(DE3) químicamente competentes. Se utilizó esta cepa para expresar las proteínas, ya que las mutaciones con las que cuenta mejoran el rendimiento en la producción de algunas proteínas recombinantes. Las mutaciones *amp^r* y *lon* son mutaciones de proteasas, lo cual evita la degradación de las proteínas heterólogas sobreexpresadas. Además, a esta cepa se le ha introducido el profago λ DE3 que contiene el gen de la ARN polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Para inducir la expresión de esta polimerasa, se requiere añadir IPTG (un inductor gratuito del operón *lac*) al medio. Como ya se ha descrito, se utilizó el plásmido pET28a+ para la expresión de las proteínas de interés; dicho vector tiene el promotor T7, por lo que requiere de la presencia de la ARN polimerasa de T7 (y no la ARN polimerasa propia de la bacteria) para transcribir el ADN clonado dentro del plásmido. Debido a que el promotor T7 es de origen viral, el gen clonado se transcribe rápida y abundantemente mientras la ARN polimerasa de T7 se encuentre presente. La transcripción de los genes clonados en pET28a+ se encuentra bajo la regulación del operador *lac* (**Figura 14**), al añadir IPTG al medio, este se une al represor *LacI* provocando un cambio conformacional y haciendo que se despegue del operador, permitiendo que la ARN polimerasa de T7 sea capaz de iniciar la transcripción.

Se probaron tres diferentes temperaturas de inducción de los cultivos para la producción de las proteínas heterólogas: 22 °C, 30 °C y 37 °C. Las células obtenidas fueron lisadas y se centrifugó el extracto crudo para separar las fracciones soluble e insoluble y así conocer cuáles serían las mejores condiciones para obtener *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* puras para continuar con los ensayos.

En la **figura 26** se observa que induciendo con una concentración final de IPTG 100 μ M, a cualquiera de las tres temperaturas probadas, *LkLeu4* se encuentra presente en las fracciones soluble e insoluble. Mientras que para el caso de *LkLeu4Bis*, se puede notar en la **figura 27** que la mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción insoluble; sin embargo, cuando el cultivo se induce a 22 °C, hay suficiente proteína en la fracción soluble para ser purificada.

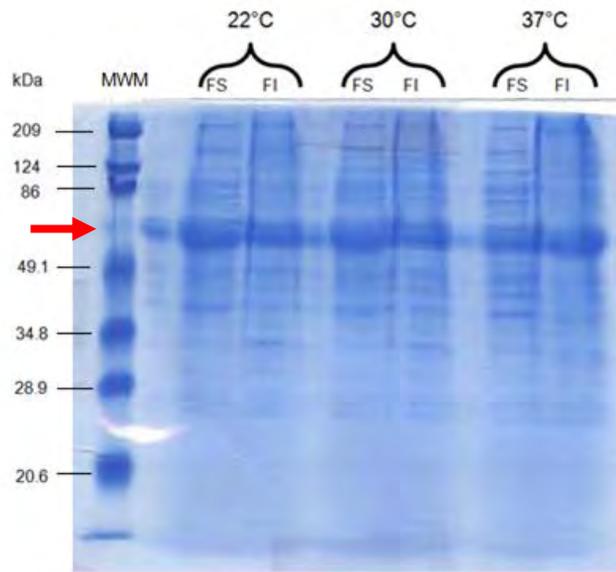


Figura 26. Ensayo de solubilidad de *LkLeu4*. Peso esperado: 69.5 kDa (Flecha roja). Los cultivos fueron inducidos a 22 °C, 30 °C y 37 °C. Se indica la fracción soluble (FS) y la fracción insoluble (FI) para cada temperatura probada. SDS-PAGE 10 %. Marcador de peso molecular Broad Range Bio-Rad®

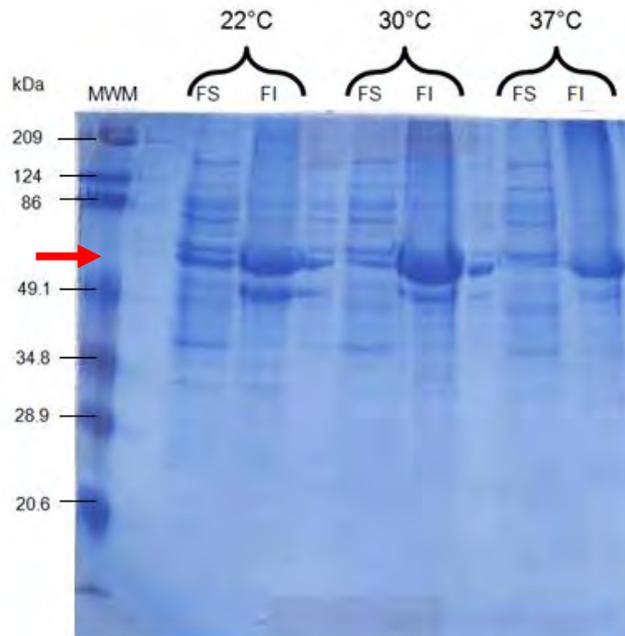


Figura 27. Ensayo de solubilidad de *LkLeu4BIS*. Peso esperado: 68.2 kDa (Flecha roja). Los cultivos fueron inducidos a 22 °C, 30 °C y 37 °C. Se indica la fracción soluble (FS) y la fracción insoluble (FI) para cada temperatura probada. SDS-PAGE 10 %. Marcador de peso molecular Broad Range Bio-Rad®

Ambas proteínas, expresadas en el sistema pET, tienen una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, la cual les confiere la capacidad de ser purificadas por cromatografía de afinidad usando la resina de níquel Ni-NTA de Qiagen®. Se siguió lo descrito en el apartado de materiales y métodos, induciendo los cultivos a 22 °C durante toda la noche (*O.N.: Over Night*). En la **figura 28** se muestran los geles de purificación de las proteínas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*.

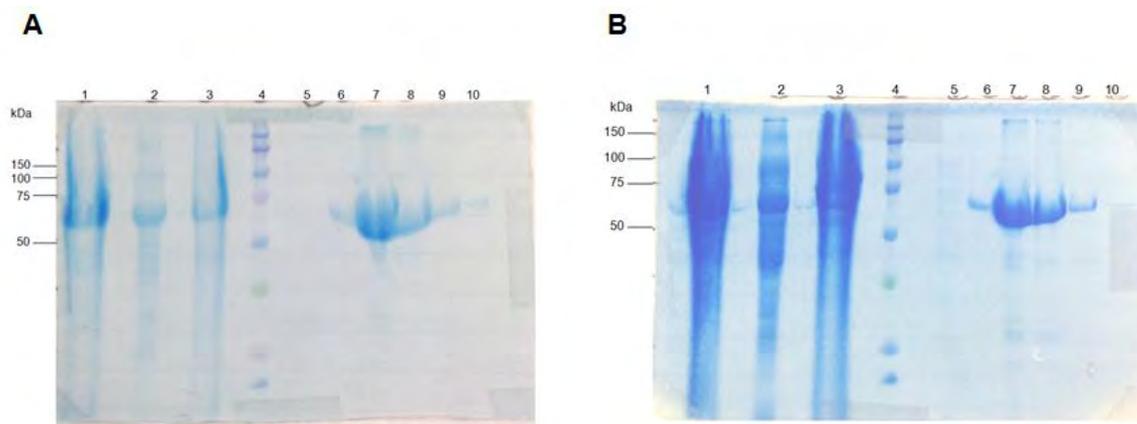


Figura 28. Geles de purificación de las proteínas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

A. Purificación de *LkLeu4* (69.5 kDa). **B.** Purificación de *LkLeu4Bis* (68.2 kDa). SDS-PAGE 10 %. Para ambas proteínas: Inducción con 100 μ M de IPTG a 22 °C, *O.N.* **1.** Proteína total.

2. Fracción soluble. **3.** Fracción insoluble **4.** Marcador de peso molecular: Kaleidoscope prestained Standard Bio-Rad® **5.** Proteína no pegada a la resina tras lavarla con imidazol 10 mM., **6-10.** Fracciones al eluir con imidazol 100 mM

Se colectaron las fracciones y se concentraron usando centricones. Se utilizó el método de Lowry para cuantificar su concentración.

Cálculo de los parámetros cinéticos de las enzimas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Se realizaron mediciones de velocidad inicial variando ambos sustratos (AcCoA y α -KIV). En ausencia de leucina, ambas enzimas presentan cinética de tipo hiperbólica y se ajustan a un mecanismo enzimático Bi-Bi bajo el estado estacionario (**Figura 29**).

Los datos fueron ajustados a la **ecuación 1** y los parámetros obtenidos a partir de este análisis se presentan en la **Tabla 5**. Todas las propiedades cinéticas de ambas enzimas se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.

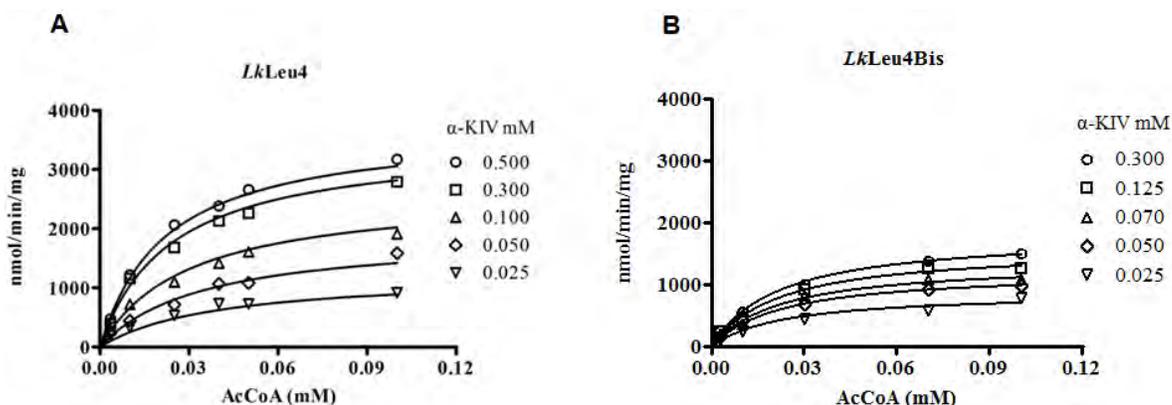


Figura 29. Curvas de velocidad inicial de las enzimas purificadas, al variar las concentraciones de ambos sustratos. A. *LkLeu4* ($R^2 = 0.991$) B. *LkLeu4Bis*. ($R^2 = 0.990$)

Se realizaron curvas de inhibición por leucina (**Figuras 30 y 31**) manteniendo un sustrato constante y variando el otro, a la vez que se aumentaba la concentración del inhibidor. Los datos se ajustaron a la **ecuación 3** cuando se varió la AcCoA y a la **ecuación 4** cuando el sustrato variable fue α -KIV. A través de los gráficos de Lineweaver-Burk se determinó que la leucina presenta una inhibición no competitiva de tipo mixta, lo cual significa que al agregar el inhibidor se modifica tanto la velocidad máxima como la afinidad por los sustratos. Además de que el inhibidor se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato.

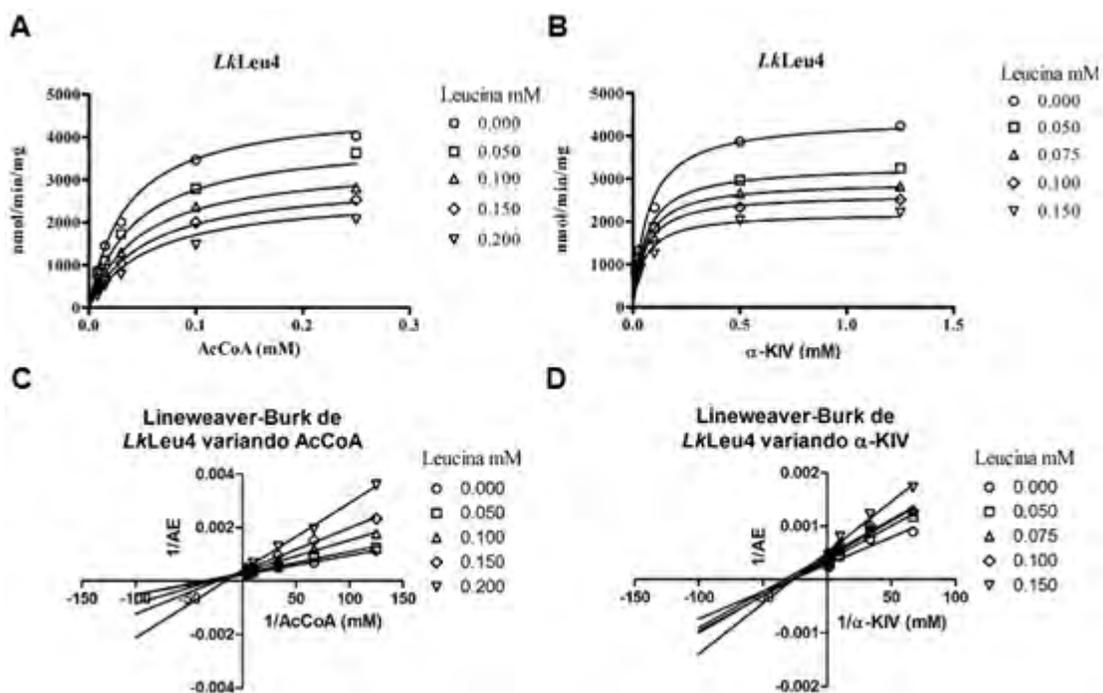


Figura 30. Curvas de velocidad inicial de *LkLeu4* en presencia del inhibidor (leucina).

A. α -KIV constante (2.5 mM), AcCoA variable ($R^2= 0.990$). **B.** α -KIV variable, AcCoA constante (0.25 mM) ($R^2= 0.980$). **C y D.** Gráficos de Lineweaver-Burk (doble recíproco) cuando se varía AcCoA y α -KIV respectivamente.

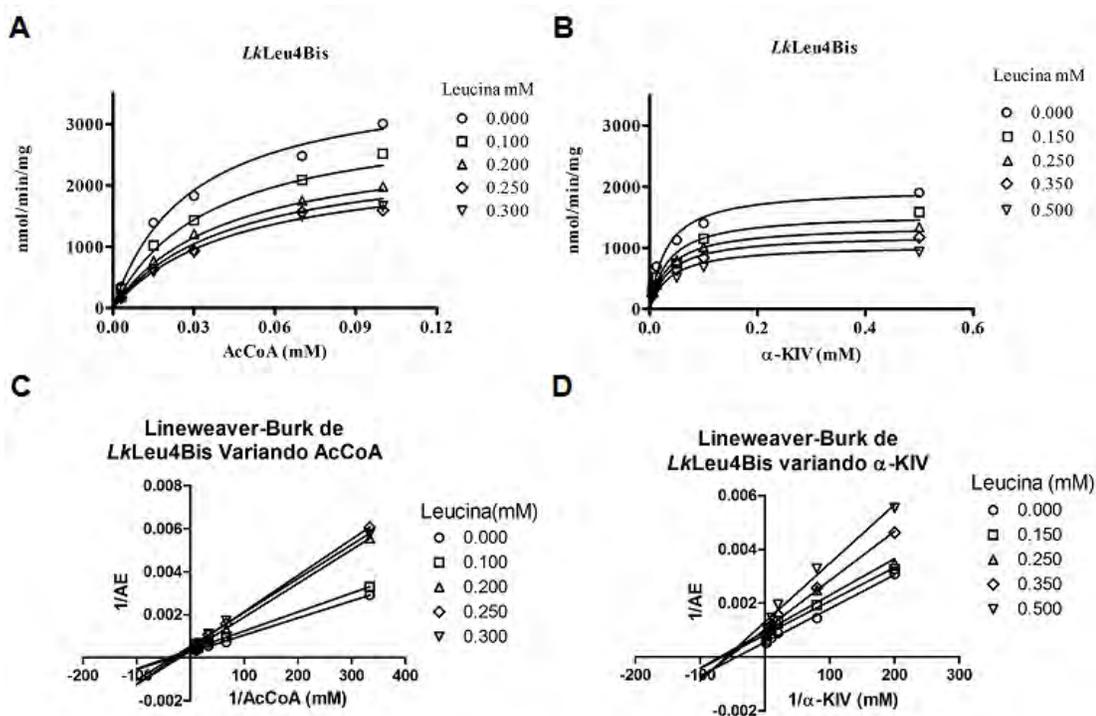


Figura 31. Curvas de velocidad inicial de LkLeu4Bis en presencia del inhibidor (leucina). A. α -KIV constante (2.5 mM), AcCoA variable ($R^2= 0.989$). **B.** α -KIV variable, AcCoA constante (0.25 mM) ($R^2= 0.967$). **C y D.** Gráficos de Lineweaver-Burk (doble recíproco) cuando se varía AcCoA y α -KIV respectivamente.

Los parámetros obtenidos a partir del ajuste de las curvas en presencia de inhibidor se observan en la **tabla 5**. Los parámetros catalíticos de ambas enzimas se encuentran en el mismo orden de magnitud, por lo que no se aprecia diferencia en sus propiedades cinéticas.

Se investigó la concentración inhibitoria media del inhibidor para ambas enzimas puras para conocer la sensibilidad que presentan hacia el producto final de la ruta biosintética de que forman parte (**Figura 32**). Para ello se midió la velocidad inicial de las enzimas variando la concentración del inhibidor y manteniendo constante la concentración de los sustratos (AcCoA 0.25 mM y α -KIV 2.5 mM). Se observaron valores muy similares de IC_{50} para ambos parálogos. El dato se presenta en la **tabla 5**.

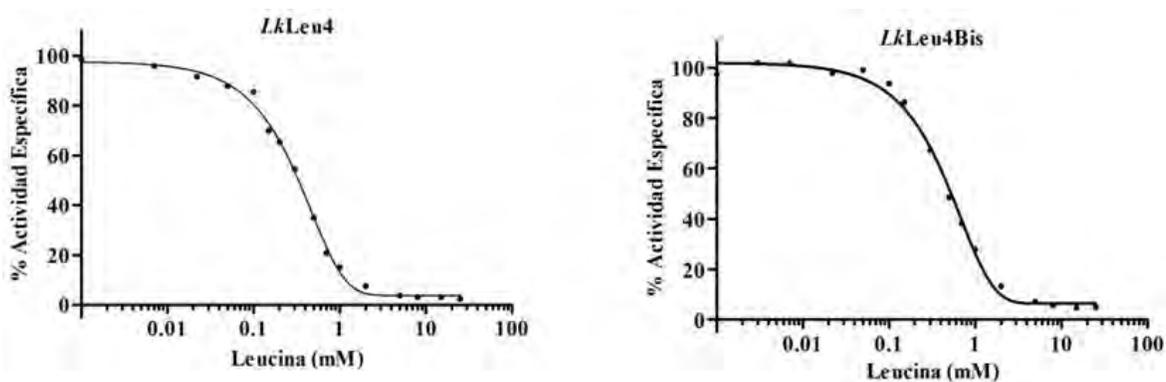


Figura 32. Análisis de sensibilidad a leucina (IC_{50}) de las enzimas α -IPMS de *Lachancea kluyveri*. Ensayos realizados en proteínas puras. A. *LkLeu4* (IC_{50} 0.323mM). B. *LkLeu4Bis* (IC_{50} 0.461mM).

Tabla 5. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste global a las ecuaciones 2, 3 y 4. Se presenta el valor \pm el error estándar correspondiente.

	<i>LkLeu4</i>	<i>LkLeu4Bis</i>
V_{max} (nmol/min/mg)	4171 \pm 190.6	2086 \pm 56.7
k_{cat} (s^{-1})	9.65	4.56
K_{ia} (mM)	0.060 \pm 0.011	0.034 \pm 0.004
K_a (mM) AcCoA	0.019 \pm 0.003	0.019 \pm 0.002
K_b (mM) (α-KIV)	0.060 \pm 0.011	0.034 \pm 0.004
K_{ii} (mM)	0.262 \pm 0.051	0.531 \pm 0.165
K_{is} (mM)	0.108 \pm 0.021	0.201 \pm 0.054
IC_{50} (mM)	0.323	0.461

DISCUSIÓN

Análisis fisiológico de las mutantes *Lkleu4* Δ , *Lkleu4bis* Δ y *Lkleu4* Δ *Lkleu4bis* Δ

Los resultados de este estudio demuestran que en *L. kluyveri*, la delección simultánea de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* provoca auxotrofia a leucina (**Figuras 21 y 22**), lo cual significa que las enzimas que codifican son las únicas responsables en llevar a cabo el primer paso de la biosíntesis de la leucina en este organismo.

La mutante sencilla *Lkleu4* Δ y la doble mutante *Lkleu4* Δ *Lkleu4bis* Δ crecen lentamente en medio rico (YPD), por lo cual es necesario añadirle leucina para tener un crecimiento óptimo.

La delección de *LkLEU4* causa braditrofia, una cepa mutante *Lkleu4* Δ presenta una disminución en la velocidad de crecimiento en medios mínimos con glucosa o etanol como fuente de carbono. En medio mínimo con glucosa, al añadir leucina al medio esta cepa crece con la misma velocidad que la cepa silvestre, lo cual no ocurre cuando la fuente de carbono es etanol. La delección de *LkLEU4BIS* no genera un fenotipo de crecimiento cuando la cepa se cultiva en medio mínimo con cualquiera de estas dos fuentes de carbono, lo cual sugiere que no hay redundancia funcional entre las isoformas.

Cuando la cepa WT crece en etanol se observa que su velocidad de crecimiento es la mitad que cuando crece en glucosa. Marobbio *et al.*, en 2008 realizaron inmunoensayos en *S. cerevisiae*, mediante los cuales observaron que la concentración de Oac1, el transportador mitocondrial que usa la α -IPM para salir al citosol y continuar la biosíntesis de la leucina, es menor en etanol que en glucosa. La menor cantidad de este transportador cuando la cepa crece en etanol podría ser la causa de que las cepas crezcan a menor velocidad, ya que el α -IPM no se transportaría eficientemente para continuar la biosíntesis de leucina y llevar a cabo sus otras funciones. Esta explicación queda bajo reserva de la localización intracelular de las α -IPMSs de *L. kluyveri*, pues Estefany Granados en su tesis de

maestría, demostró que *LkLeu4* no se encuentra en la mitocondria, y aún se desconoce la localización subcelular de *LkLeu4Bis*.

Cuando las cepas crecen bajo una fuente de carbono no fermentativa (etanol), se observa que la velocidad de crecimiento de *Lkleu4Δ* es menor que la de la cepa WT. El fenotipo no se restablece al añadir leucina al medio. Ya que la vía biosintética de la leucina no es reversible (**Figura 33**), al añadir leucina al medio la mutante es incapaz de obtener α -IPM, por lo cual, en metabolismo estrictamente respiratorio, la α -IPM proveniente de *LkLEU4* podría estar involucrada con alguna otra función dentro de la célula, posiblemente relacionada con su papel como coregulador de la transcripción junto con Leu3.

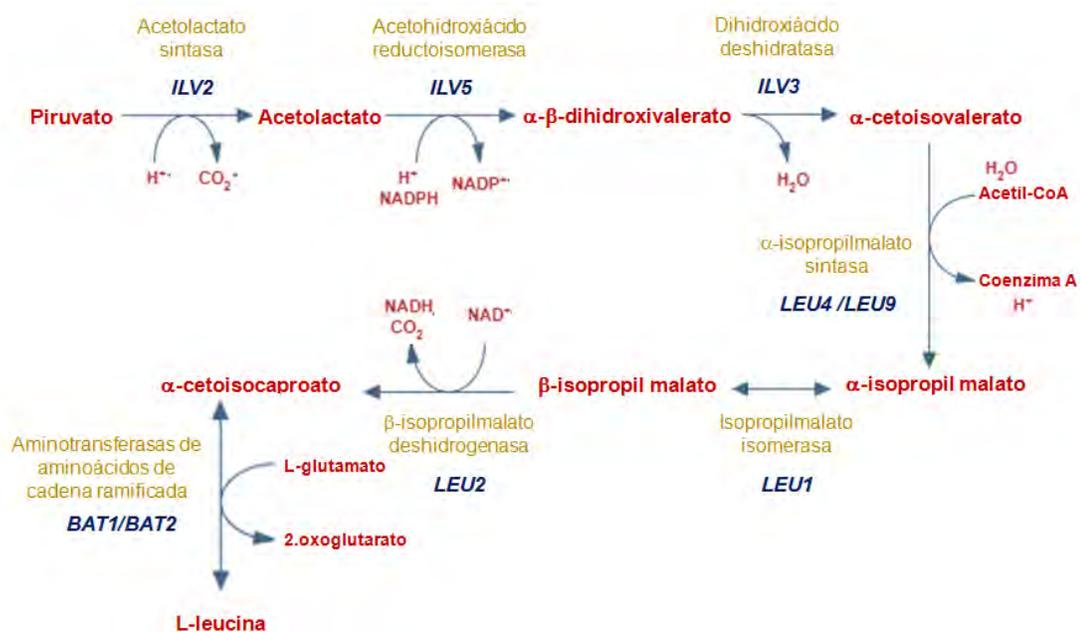


Figura 33. Ruta metabólica de biosíntesis de leucina en *S. cerevisiae*.

Las flechas indican la dirección de la reacción; flechas de doble punta significan que la reacción es reversible.

Modificado de *Saccharomyces Genome Database*

<https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2&detail-level=3&detail-level>

La doble mutante *Lkleu4ΔLkleu4bisΔ*, al crecer en etanol como fuente de carbono, presentó una fase lag muy extendida, lo cual no ocurre cuando hay

glucosa en el medio. Cuando se deleta sólo uno de estos genes no hay una extensión en la fase lag en comparación con lo observado en la doble mutante. En la doble mutante no hay producción de α -IPM, por tanto no se une a Leu3 y la expresión de los genes que es activada por el complejo de ambas proteínas se vería disminuída, esto considerando que *LkLeu3* funcione igual que su ortólogo de *S. cerevisiae* (**Figura 9**).

Caracterización de los parámetros cinéticos de *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Se obtuvieron los parámetros cinéticos de las α -IPMs de *L. kluyveri* (**Tabla 5**). La velocidad máxima y por tanto la constante catalítica (k_{cat}) son el doble en el caso de *LkLeu4* con respecto a *LkLeu4Bis*. La k_{cat} o número de recambio, representa el número de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo. Los datos obtenidos sugieren que *LkLeu4* es más rápida para convertir sustrato en producto que *LkLeu4Bis*.

Las constantes de afinidad K_a , correspondientes al sustrato acetil coenzima A, son iguales para ambas enzimas, lo que quiere decir que este sustrato se une con igual fuerza a ambas α -IPM. La constante de afinidad K_b , correspondiente al sustrato a-cetoisovalerato, es ligeramente menor para *LkLeu4Bis*, lo que indica que este sustrato presenta una ligera mayor afinidad a *LkLeu4Bis* que a *LkLeu4*.

Tampoco hay diferencia en los parámetros relacionados con la sensibilidad a la leucina. Tratándose de una inhibición mixta, existe la constante que representa la disociación del inhibidor y el complejo enzima-sustrato (K_{ii}), y la constante que representa la disociación del inhibidor y la enzima libre (K_{is}), el que los valores de ambas constantes se encuentren dentro del mismo orden de magnitud indica que las afinidades de la enzima libre y de la enzima unida a sustratos, por el inhibidor L-leucina son muy similares (De Carvalho, *et al.*, 2005)

Podemos observar que K_{ii} y K_{is} son ligeramente menores para *LkLeu4*, lo cual indica que la leucina inhibe un poco más a *LkLeu4* que a *LkLeu4Bis*; lo cual corresponde con los valores de IC_{50} . Se requiere una concentración de 0.323 mM de

leucina para reducir en la mitad la velocidad de reacción catalizada por *LkLeu4*, mientras que para lograr el mismo efecto en *LkLeu4Bis* se requiere 0.461 mM de leucina.

Observamos que ambas enzimas cuentan con parámetros que se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, por lo que no existe diferencia significativa entre ellas. Esto indica que la divergencia de estas enzimas no está dada en relación a sus parámetros cinéticos o a su sensibilidad para inhibirse por producto final. No conocemos si los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS* han divergido en sus patrones de expresión, será necesario realizar estudios de expresión para conocer este dato, así mismo, se requiere realizar ensayos de actividad de ambas enzimas cuando crecen en glucosa y etanol como fuente de carbono.

L. kluyveri es una levadura fermento-respiratoria, que usualmente favorece la respiración por sobre la fermentación. Cuando crece en medio con glucosa su flujo metabólico está dirigido hacia el anabolismo, manteniendo bajo el flujo catabólico (Herwig y Von Stockar, 2003). Esto explica que las α -IPMs no sean estrictamente reguladas por inhibición por producto final, ya que se requiere activa la producción de α -IPM, la cual, al unirse a Leu3 mantiene activa la expresión de un gen involucrado en la asimilación de nitrógeno (*GDH1*), y de genes que forman parte de la vía de biosíntesis de leucina (*LEU1*, *LEU2*, *LEU4*, *ILV2* e *ILV5*), que además proveen a la célula de intermediarios para la producción de moléculas más complejas y obtención de energía.

K. lactis es una levadura aerobia estricta que cuando crece en una fuente de carbono fermentable, dirige la mayor parte del flujo metabólico hacia el ciclo de Krebs. Esto hace necesario que existan concentraciones suficientes de AcCoA para obtener energía. Esta levadura cuenta con un estricto control de la actividad de α -IPMSs, dado por su sensibilidad a su producto final. La utilización de grandes concentraciones de AcCoA para producción de leucina, comprometería su uso en el ciclo de Krebs y por tanto la obtención de energía; es por eso que *K/Leu4* y *K/Leu4Bis* se inhiben a bajas concentraciones de leucina (**Tabla 6**).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de α -Isopropilmalato sintasas de las levaduras estudiadas en nuestro laboratorio. Para *Lachancea kluyveri* (*LkLeu4* y *LkLeu4Bis*), datos obtenidos en este trabajo, ° *Kluyveromyces lactis* (*K/Leu4* y *K/Leu4Bis*) (Aguirre-López, *et al.*, 2020) y * *Saccharomyces cerevisiae* (Homodímeros *Leu4-Leu4*, *Leu9-Leu9*, y heterodímero *Leu4-Leu9*) (López, *et al.*, 2015).

	<i>LkLeu4</i>	<i>LkLeu4Bis</i>	<i>K/Leu4</i> °	<i>K/Leu4Bis</i> °	<i>Leu4-Leu4</i> *	<i>Leu9-Leu9</i> *	<i>Leu4-Leu9</i> *
Vmax (nmol/min/mg)	4171±190.6	2068±56.7	3864±147	2580±241	6049±219	3254±120	4831±181
kcat (s ⁻¹)	9.65	4.7	8.6	5.6	13.79	7.28	10.91
Kia (mM)	0.048±0.014	0.029±0.007	0.017±0.005	0.012±0.007	0.047±0.017	0.0207±0.078	0.047±0.016
Kb (α-KIV) (mM)	0.060±0.011	0.034±0.004	0.025±0.003	0.055±0.013	0.011±0.002	0.009±0.002	0.014±0.003
Ka (AcCoA) (mM)	0.019±0.003	0.019±0.002	0.026±0.003	0.019±0.005	0.014±0.002	0.009±0.002	0.013±0.002
Kii (mM)	0.262±0.051	0.531±0.165	0.073±0.012	0.090±0.015	0.226±0.045	5.448±0.668	0.703±0.047
Kis (mM)	0.108±0.021	0.201±0.054	0.034±0.011	0.031±0.008	0.048±0.009	1.379±0.202	0.207±0.025
IC₅₀ (mM)	0.323	0.461	0.020	0.037	0.03	1.10	0.16

Otros datos relevantes obtenidos en nuestro grupo de trabajo

James González, en su tesis de doctorado realizó ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) de los promotores de *KIBAT1* de *Kluyveromyces lactis*, y *LkBAT1* de *Lachancea kluyveri*, para averiguar si la estructura de la cromatina se encuentra involucrada en la expresión de ambos genes cuando los organismos crecen en glutamina o VIL (valina, isoleucina y leucina) como únicas fuentes de nitrógeno (**Figura 34**).

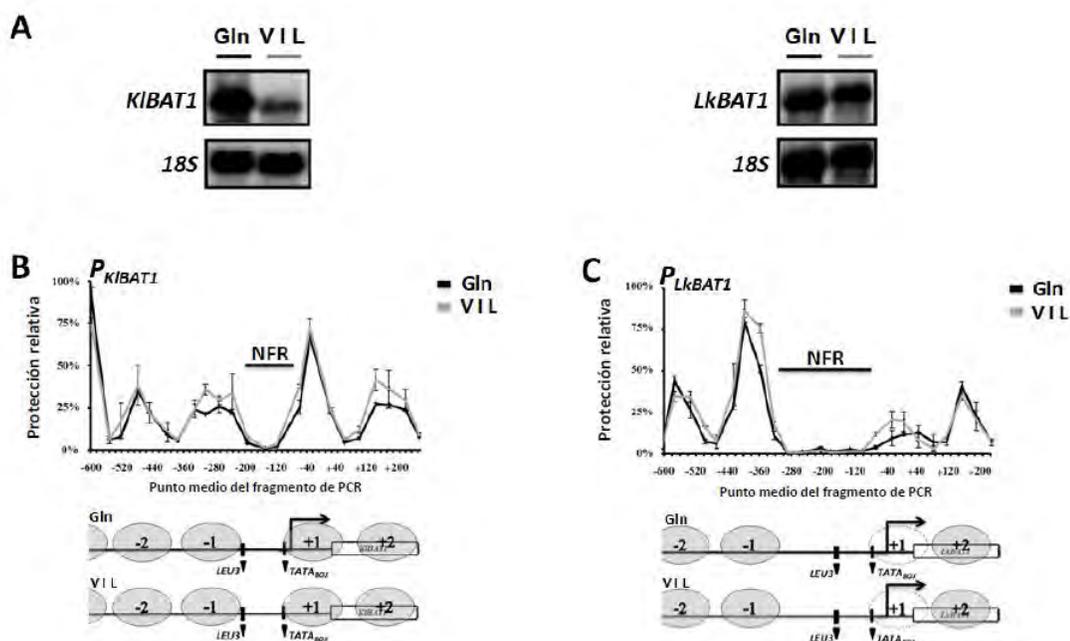


Figura 34. Estudio de la expresión de los genes *KIBAT1* y *LkBAT1* y de la posición de nucleosomas en sus respectivos promotores

A. Analisis de Northern Blot llevado a cabo con cepas WT de *Kluyveromyces lactis* y *Lachancea kluyveri* creciendo en glucosa al 2% como fuente de carbono y glutamina (Gln, 7 mM) o valina, isoleucina y leucina (VIL, 150 mg/L; 30 mg/L; 100 mg/L) como fuentes de nitrógeno. Se utilizó el gen 18S como control de carga. **B y C.** Ensayos de escaneo de nucleosomas (NuSA) de *K. lactis* y *L. kluyveri*. Se añaden representaciones graficas de las regiones analizadas. Los óvalos grises indican el posicionamiento de los nucleosomas. La región libre de nucleosomas está indicada como NFR, **Tomado de la tesis doctoral de González, 2017.**

En la **figura 34** se observa que el gen *KIBAT1* se reprime en presencia de leucina, mientras que *LkBAT1* se expresa constitutivamente. Y en ninguna de las condiciones estudiadas, los perfiles de expresión de estos genes dependen de la

remodelación de la cromatina. También se puede advertir que en ambos promotores hay una región libre de nucleosomas (NFR), en donde existe un sitio de unión a Leu3, lo cual sugiere que esta molécula puede desempeñar un papel importante en la regulación transcripcional de *KIBAT1* y *LkBAT1*.

En *S. cerevisiae* ha sido ampliamente descrito que el α -IPM, además de ser el primer intermediario en la ruta biosintética de la leucina, es co-activador del regulador transcripcional codificado por *LEU3* (**Figura 9**). Cuando no hay α -IPM en la célula, hay interacciones intramoleculares dentro de Leu3 que enmascaran su dominio de activación y por tanto es incapaz de regular la transcripción de varios genes entre los que se encuentra *BAT1*. Para *KIBAT1*, el que *KLeu4* y *KLeu4Bis* sean muy sensibles a leucina, evitaría la producción de α -IPM y por tanto Leu3 no sería capaz de activar la transcripción; en tanto que para *LkBAT1*, la expresión de este gen sería constitutiva, ya que las enzimas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis* son resistentes a la inhibición por leucina, de manera que siempre existen concentraciones suficientes de α -IPM para que Leu3 estuviera activo y por ende induciendo la expresión de *LkBAT1* (**Figura 34A**).

De acuerdo a la **figura 8**, el resultado del ensayo para determinar la sensibilidad a la leucina (IC_{50} ; Concentración Inhibitoria media) de las α -isopropilmalato sintasas en extractos crudos de *K. lactis*; *KLeu4* (IC_{50} = 0.020) y *KLeu4Bis* (IC_{50} = 0.037), demuestra que ambas enzimas son muy sensibles a presentar inhibición por el producto final. Por lo que, al aumentar la concentración intracelular de leucina, ambas enzimas se inactivarían disminuyendo así la concentración de α -IPM, lo cual daría como resultado que no se forme el complejo activador Leu3- α -IPM, y no se active la expresión de *KIBAT1*.

En la **figura 32** se presenta el resultado del ensayo para determinar la sensibilidad a la leucina de las α -isopropilmalato sintasas de *L. kluyveri*. Los resultados de IC_{50} de las enzimas puras; *LkLeu4* (IC_{50} = 0.323) y *LkLeu4Bis* (IC_{50} = 0.461), son del mismo orden de magnitud de la IC_{50} del heterodímero Leu4-Leu9 de *S. cerevisiae* (**Tabla 6**). Lo cual sugiere que estas enzimas no son tan sensibles a sufrir inhibición por producto final, lo cual permitiría que aún en presencia de leucina,

la producción de α -IPM se mantenga estable dentro de la célula, de esta manera es factible la formación del complejo activador Leu3- α -IPM en el núcleo, lo cual resulta en la expresión constitutiva de *LkBAT1*.

Con el fin de analizar esta hipótesis, se sugiere transformar las cepas dobles mutantes *Klleu4 Δ Klleu4bis Δ* y *Lkleu4 Δ Lkleu4bis Δ* , alternativamente, con los plásmidos *ScLEU4* y *ScLEU9*, en los cuales están clonados, respectivamente, los genes que codifican para las enzimas Leu4 y Leu9 de *Saccharomyces cerevisiae*. Leu4 es sensible a la inhibición por leucina, por lo que *KIBAT1* o *LkBAT1* disminuirían su expresión al no haber suficiente activador α -IPM-Leu3 para mantenerla encendida. Al ser la enzima Leu9 resistente a la inhibición por leucina, se espera que existan altas concentraciones de α -IPM que mantengan activos los niveles de transcrito de los genes *KIBAT1* y *LkBAT1*.

CONCLUSIONES

- El estudio de la doble mutante *Lkleu4ΔLkleu4bisΔ* demostró que *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*, son los únicos genes involucrados en la producción de α -isopropilmalato en *L. kluyveri*.
- La delección de *LkLEU4* causa braditrofia cuando la cepa crece en medio mínimo con glucosa o etanol como fuentes de carbono. La delección del gen parálogo *LkLEU4BIS* no genera un fenotipo diferente al de la cepa WT. Esto sugiere que no hay redundancia funcional entre estas dos isoformas.
- Cuando *Lkleu4Δ* crece en etanol como fuente de carbono, lo hace con menor velocidad con respecto a la cepa WT. No basta añadir leucina al medio para restablecer el crecimiento. Este fenotipo podría ser resultado de que *LkLeu4* tenga una función desconocida, o estar dado por su localización subcelular. *LkLeu4* parece encontrarse dentro de un compartimento subcelular que puede estar relacionado con la vía endocítica (Tesis de maestría de Estefany Granados).
- Las proteínas parálogas de *L. kluyveri*: *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*, muestran parámetros cinéticos que, comparados entre cepas, se encuentran dentro del mismo orden de magnitud; lo que significa que a diferencia de sus ortólogos en *S. cerevisiae* *Leu4* y *Leu9*, estos no diversificaron en sus parámetros cinéticos, particularmente en la sensibilidad al producto final de la vía metabólica (leucina).
- Las α -isopropilmalato sintasas de *L. kluyveri*, a diferencia de las de *K. lactis*, no se encuentran estrictamente reguladas por inhibición por producto final. Esto puede deberse a que la primera es una levadura fermento-respiratoria y la segunda es aerobia estricta.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias codificantes de los genes *LkLEU4* y *LkLEU4BIS*.
Obtenidas de <http://www.genolevures.org/sakl.html>

Secuencia codificante de *LkLEU4*

>SAKL0E10472g.cds

```
ATGTTCAAGAGAACTTTGGCCGTCTTTGCCCAAATGTTGGCAAGACCATTCTCCTGTT
AAACTAGGCTATAAGAATATGTTAAAAGATCCATCGATCAAGTACAAAGCAGCTAGAACT
GTCGACCTCCCTAACAGGCAATGGCCCAACAGAACCATTACTAAAGCCCCACGTTGGTTG
TCTACTGACTTGAGAGACGGTAACCAATCCTTGCCAGATCCAATGTCCTGTTGAACAAAAG
AAGGAATACTTCCATAAACTGGTTGATATAGGTTTTAAAGAAATCGAAGTATCTTTTCCA
TCTGCATCCCAAACGACTTTGATTTTACTAGATATGCTGTCGAGAACGCTCCAGAAGAT
GTTACCATCCAGTGTGGTACAATCTCGTGAACACTTGATCAAGCGTACCCTAGAGGCC
TTGACCGGTGCTAAGCGTGCCAGTATCCATACTTATCTAGCAACCAGTGATCTATCCGT
GAAGTTGTTTTCAACATGTCCTCCAAAGAAGAAGCTATATCCAAGGCCGTCGCAGCCACAAA
TTGGTTAGAAAAGTTGACCAAAGACGACCCAGCACAGCAAGCCACCCGTTGGACCTACCAG
TTCTCCCCAGAATGTTTCAGTGATACTCCGGTAGAATTCGCCGTCGAAATCTGTGAAGCT
GTCAAGGCTGCGTGGGAACCAACCGAAGAAAACCCAATTGTTTTCAACTTACCAGCTACC
GTTGAAGTCTCTACTCCAAACGTCTACGCTGATCAAATCGAATACTTCTCCACCCATATC
AGCGAGCGTGAAAAGGTCTGTATCTCTACTCATGCTCACAATGACCGTGGTTGTGGTGT
GCCGCTTCTGAACTAGGTATGTTGGCTGGTGCCGACCGTGTGAAGGTTGTTGTTCGGT
AACGGTGAACGTACCGGTAACGTTGACTTGGTTACTGTTGCTTTGAACATGTACTACAA
GGTGTCTCTCCAAACCTGGACTTTTCTGACATCAACTCTGTCATCGAGGTTGTTGAACGT
TGTAACAAGATCCCCGTTTCTCAAAGAGCTCCATACGGTGGTGACTTGGTCTGTTGTGCT
TTCTCCGGTTCTCACCAAGATGCTATCAAGAAGGGTTTCAACTTGCAAGACAAAAGACGT
GCTAACGGCGACAACCTATGGAAAATCCCATACTTGCCTTTGGATCCAAAGGACATCGGT
AGAGATTACGAAGCTGTTATCAGAGTCAACTCTCAATCTGGTAAAGGTGGTGCCGCTTGG
GTTTTCTTGAGATCTTTAGGTTTGGACTTGCCAAGAAACATGCAGATCGAATTCTCCACT
TTGGTTCAAAGCAAGGCCGACTCTGTCCGTAGAGAATTGAAGGGTGATGAAATCACCAC
CTTTTCAAGGACACTTACAACATAACAACCAGTACAAGACCATCGAGTTGGTTCGACTAC
GAAATTAGTAAGCAAGATAAAGGACCGCAGAACCTTAACTGGTCAAGTCAAGTTAACGGT
AAGCTTGTGATATAGAAGGACACGGTAACGGTCCAATTTCTTCTTTGGTTGATGCCATG
TCCAACCTGTTCAACGTTAAATTCGAAGTTGCCAACTACACTGAGCATTCCTTGGGCTCT
GGTTCTTCTACGCAAGCCGCTTCTTTCATCCACTTGGGCTACAGATGTGATGCTAACAA
GAGAAGGCTTACCAATGGGGTGTCCGGTGTTCGGAAGATGTTGGTGAAGCTTCCATCAAG
TCTATTATCTCTACTGTGAACAACATTGTCCAAAGAGGTGGTGTGTAGTACCAGAATCT
CCTTCAAAGGCATCTGGCTCAGCTTAA
```

Secuencia codificante de *LkLEU4BIS*

>SAKL0F05170g.cds

```
ATGCCTTACTACAAAGATCCATCAGTCAAATACAAGCGATTTGTAAACCCTGTGAAGTTG
AGCAATCGTCAATGGCCATCTAAGGCTTTAGAAAAGGCACCTCGTTGGCTGGCCACCGAT
TTAAGAGATGGTAACCAGTCAATACCGGATCCAATGTCCTTTTGGAGAAAAAAAATCATG
TTGAGTAAGCTCTGTGAAATAGGTTTCAAAGAAATTGAAGTTGCCTTTTCTAGTGCTTCT
ACTGTTGATTTTGAATTCACACAACATGCTGTAAAAACTGTACCGGATGATGTCTACATT
CAGGTTCTGTGCCTTGTAGAGAAGAATTAATAACCAAAACAGTTCGATCCTTGAAGGGG
GCTAAAAATGCCATAGTTACATATATTTAGCCACTTCTCCGTGCTTCAGAAACATTGTG
TTCAGCAAGATGACACATGAACAATGCATTTCAAAGGCTGTGAAGTGTACGGAGCTGGTT
CGTAAATTGACCAAGGACGATTTGCAACAGCAATCGACAACTGGACTTTTGAATTCTCA
CCAGAACTTTTTCGGATTCTGAACCCGAATTTGTCATCGAGATCTGTGAGGCTGTCAA
```

AAGGCTTGGGAGCCTTCCGTTGAAAATCCGATTATCTTTAACCTACCCGCTACCGTAGAG
ATGTCCACTCCTAATATATATGCGGATCAGATCGAATACTTTTCGACAAACATATCTGAA
CGTGAGAAAGTATGCATATCCTTACATCCTCACAATGACCGTGGTTGTGCCGTAGCTGCA
GCAGAATTGGCCCAGATGGCAGGCGCGGATCGTGTTGAGGGCTGTTTGTGGAAATGGT
GAGCGTACCGGTAACGTTGACCTGGTGACTTTGGCCTTGAATTTATACACCCAGGGTATT
CCGCCAATTTGGATTTCAAAGATATATCCTCTATCATCGATGTGGTTGAGAAATGTAAC
AAAATTCCAGTTCACCCAAGGGCCCCATATGGTGGCCAACCTGGTTGTCTGTGCCTTTAGT
GGATCTCATCAGGATGCAATTAATAAAGGCTTTGACCAGTACGAACAGCAAGTTGCCAG
GCGCAAAAAGAACAAGGTCCAGACGCCGTGGTTCCTTGGAAAGTTGCCATACTTGCCCTTG
GATCCCCAGGATATGGTGAACATATGAAGCCATCATTAGAGTTAACTCTCAATCTGGT
AAGGGTGGGTCTTCGTGGGTATTTTAAAGAACTTGAATTAGATTTACCGAGGGGATG
CAGATTTTCGTTTTCTAAAGTCGTGCAACATGAAACTGAAATGGTCGGCAGAGAATGAAA
TCCAAAGAATGGTTGAATTTTGAACACACAGTATTTTCGTTGGTAGCAAACTCGGATGCT
GGAGTTTTCAAATTAGTGAACACGATTTTAAACAGATCTCAAGCATCTGTTCCCTTAAAC
GTCATTTTATCCTCTGAAGGTACCCAGAGGGAGATTACTGGTACCGGCAATGGTCCAATT
TCTTGTGGTAAATGCGATAAACTTTGCATTTGACTCGGACATTGATGTCCAAGACTAT
CACGAACATTTTGGGTAAGGATTCGAACTCCAAGGCTGCTACTTACATCTCCGTTTCG
AGAGGCAACTTTTTGCAGTGGGGTGTCCGATTCACGAAGATGTAACCGAGGCTTCTTTC
TTATCATTAATTTTCGTGCATTAATGGATTAATAAAGGTCCGGTAACTTTTAA

Anexo 2. Secuencias de las proteínas *LkLeu4* y *LkLeu4Bis*

Secuencia de aminoácidos de *LkLeu4*

Obtenida de <http://www.genolevures.org/sakl.html>

>SAKL0E10472g . aa

MFKRTLAVFAQNVGKTI PPVKLGYKNMLKDPSIKYKAARTVDLPNRQWPNRITTKAPRWL
STDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVDIGFKEIEVSFPSASQTD^{DF}DFTRYAVENAPED
VTIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRASIH^{TY}LATS^{DL}FREVVFNMSQEEAISKAVAATK
LVRKLT^{KDD}PAQQA^{TR}W^{TY}QFSPEC^{SD}TPVEFAVEICEAVKAAWE^{PTE}ENPIVFNLPAT
VEVSTPNVYADQIEYFSTHISEREKVCISTHAHND^{RG}CGVAASELGLLAGADRVEGCLFG
NGERTGNVDLVTVALNMYTQGVSPNLD^{FS}SDINSVIEVVERCNKIPVSQRAPYGGDLVCA
FSGSHQDAIKKGFNLQDKRRANGDNLW^{KI}PYLPLDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKGGAAW
VFLRSLGLDLPRNMQIEFSTLVQSKADSVGRELKGDEITNLFKDTYNNYK^YKTIELVDY
EISKQDKDRRTLTGQVEVNGKLV^{DI}EGHNGPISSLVDAMSNL^{FN}VKFEVANYTEHSLGS
GSSTQAASFIHLGYRCDANNEKAYQWGVGVSE^{DV}GEASIKSIIISTVNNIVQRGGVVVPES
PSKASGSA*

NOTA: AL secuenciar el gen de la cepa con que contamos en el laboratorio, encontramos un cambio de base que genera la proteína F422V

>SAKL0E10472 F422V

MFKRTLAVFAQNVGKTI PPVKLGYKNMLKDPSIKYKAARTVDLPNRQWPNRITTKAPRWL
STDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVDIGFKEIEVSFPSASQTD^{DF}DFTRYAVENAPED
VTIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRASIH^{TY}LATS^{DL}FREVVFNMSQEEAISKAVAATK
LVRKLT^{KDD}PAQQA^{TR}W^{TY}QFSPEC^{SD}TPVEFAVEICEAVKAAWE^{PTE}ENPIVFNLPAT
VEVSTPNVYADQIEYFSTHISEREKVCISTHAHND^{RG}CGVAASELGLLAGADRVEGCLFG
NGERTGNVDLVTVALNMYTQGVSPNLD^{FS}SDINSVIEVVERCNKIPVSQRAPYGGDLVCA
FSGSHQDAIKKGFNLQDKRRANGDNLW^{KI}PYLPLDPKDIGRDYEAVIRVNSQSGKGGAAW
VVLRSLGLDLPRNMQIEFSTLVQSKADSVGRELKGDEITNLFKDTYNNYK^YKTIELVDY
EISKQDKDRRTLTGQVEVNGKLV^{DI}EGHNGPISSLVDAMSNL^{FN}VKFEVANYTEHSLGS
GSSTQAASFIHLGYRCDANNEKAYQWGVGVSE^{DV}GEASIKSIIISTVNNIVQRGGVVVPES
PSKASGSA*

Secuencia de aminoácidos de *LkLeu4Bis*

Obtenida de <http://www.genolevures.org/sakl.html>

>SAKL0F05170g.aa

```
MPYYKDPSVKYKRFVNPVKLSNRQWPSKALEKAPRWLATDLRDGNQSLPDPMSFEEKKIM
LSKLCEIGFKEIEVAFPSASTVDFEFTQHAVKTVPDDVYIQVLSPCREELITKTVESLKG
AKNAIVHIYLATSPCFRNIVFSKMTHEQCISKAVKCTELVRKLTKDDLQQQSTNWTFEFS
PETFSDSEPEFVIEICEAVKKAWEPSVENPIIFNLPATVEMSTPNIYADQIEYFSTNISE
REKVCISLHPHNDRGCAVAAAELAQMAGADRVEGCLFGNGERTGNVDLVTALNLTYQGI
PPNLDFKDISSIIDVVEKCNKIPVHPRAPYGGQLVVCFAFSGSHQDAIKKGFQYEQQVAQ
AQKEQGPDAVVPWKLPLYLPLDPQDIGRTEYAIIRVNSQSGKGGSSWVILKNLELDLPRGL
QISFSKVVQHETEMVGRELKSKELVELFETQYFVGSKSDAGVFKLVNYDFNRSQASCSLN
VILSSEGTQREITGTGNGPIISCFVNAINFAFSDSIDVQDYHEHSLGKDSNSKAATYISVS
RGNFLQWGVGIHEDVTEASFLSLISCINGLKRSGNF*
```

Anexo 3. Alineamiento de las secuencias de las proteínas α -isopropilmalato sintasas de *Lachancea kluyveri*. Obtenido mediante el programa Clustal Omega. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

```
LkLeu4      MFKRTLAVFAQNVGKTI PPVKLGYKNMLKDPSIKYKA-ARTVDLPNRQWPNTITKAPRW
LkLeu4Bis  -----MPYYKDPSVKYKRFVNPVKLSNRQWPSKALEKAPRW
                ****:* ** .. *.* *****.:.: *****

LkLeu4      LSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVDIGFKEIEVSFPSASQTDDFDFTRYAVENAPE
LkLeu4Bis  LATDLRDGNQSLPDPMSFEEKKIMLSKLCEIGFKEIEVAFPSASTVDFEFTQHAVKTVPD
*:*****:****:* ** :*****:***** .**:*:***:..*:

LkLeu4      DVTIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRASIHLYLATSDFREVVFVN-MSQEEAISKAVAA
LkLeu4Bis  DVYIQVLSPCREELITKTVESLKGAKNAIVHIYLATSPCFRNIVFSKMTHEQCISKAVKC
** ** * .**.*.:***:*.*.*.* :* ***** **:***. *:::*****.

LkLeu4      TKLVRKLTKDDPAQQATRWTYQFSPECFSPTVEFAVEICEAVKAAWEPTENPIVFNLP
LkLeu4Bis  TELVRKLTKDDLQQQSTNWTFEFSPEFSDSEPEFVIEICEAVKKAWEPSVENPIIFNL
*:***** **:*.*.:**** ***: **.:***** ***: *****:****

LkLeu4      ATVEVSTPNVYADQIEYFSTHISEREKVCISTHAHNDRGCGVAASELGMLAGADRVEGCL
LkLeu4Bis  ATVEMSTPNIYADQIEYFSTNISEREKVCISLHPHNDRGCAVAAAELAQMAGADRVEGCL
****:****:*****:***** * *****.***:*.. :*****

LkLeu4      FNGERTGNVDLVTALNMYTQGVSPNLDFSDINSVIEVVERCNKIPVSQRAPYGGDLVV
LkLeu4Bis  FNGERTGNVDLVTALNLTYQGI PPNLDFKDISSIIDVVEKCNKIPVHPRAPYGGQLV
*****:***:****: *****.*.*:*.*.*:***** *****:***

LkLeu4      CAFSGSHQDAIKKGFNLQDKRR-----ANGDNLWKIPYLPLDPKDIGRDEYAVIRVN
LkLeu4Bis  CAFSGSHQDAIKKGFQYEQQVAQAQKEQGPDAVVPWKLPLYLPLDPQDIGRTEYAIIRVN
*****: :.: .: **.******:*** ***:***

LkLeu4      SQSGKGAAWVLRSLGLDLPNMQIEFSTLVQSKADSVGRELKGEITNLFKDTYNNN
LkLeu4Bis  SQSGKGGSSWVILKNLELDLPRGLQISFSKVVQHETEMVGRELKSKELVELFETQYFVGS
*****:***:*.* *****:***.*.:** :.: *****.*.:***: * ..

LkLeu4      QY--KTIELVDYEISKQDKDRRTLTGQVEVNGKLVLDIEGHGNGPISSLVDAMSNLNVKFE
LkLeu4Bis  KSDAGVFKLVNYDFNRSQA-SCSLNVILSSEGTQREITGTGNGPIISCFVNAINFAFSDI
: .:***:*:~.:~: :*. .: .: * * *****:~*~: * :.
```

```

LkLeu4      EVANYTEHSLGSGSSTQAASFIHLGYRCDANNEKAYQWGVGVSEDEVGEASIKSIISTVNN
LkLeu4Bis  DVQDYHEHSLGKDSNSKAATYISVS-----RGNFLQWGVGIHEDVTEASFLSLISCING
           :*  :*  *****..*.:**:*:  :.      .  :  *****:  ***  ***:  *:*  :*.

LkLeu4      IVQRRGGVVVPEPSPKASGSA*
LkLeu4Bis  LKRSGNF*-----
           :  :  *..

```

Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de las proteínas α -isopropilmalato sintasas de las tres levaduras estudiadas en el laboratorio. Leu4 y Leu9 de *Saccharomyces cerevisiae*, LkLeu4 y LkLeu4Bis de *Lacchancea kluyveri* y KlLeu4 y KlLeu4Bis de *Kluyceromyces lactis*. Obtenido mediante el programa Clustal Omega. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. En verde se resalta la región regulatoria (región R), la cual contiene sitios de unión a leucina y CoA-Zn²⁺, moléculas involucradas en el control de función de estas proteínas para prevenir la sobreproducción de leucina (Cavalieri, *et al.*, 1999).

```

Leu4      -MVKESI IALAEHAASRASRVIPPVKLAYKNMLKDPSSKYKPFN-APKLSNRKWPDNRIT 58
Leu9      -MVKHSFIALAEHA-SKLRRSIPPVKLTYKNMLRDPVSKYRAFA-PPKMVKRIWPKDTIQ 57
LkLeu4    -MFKRTLAVF----AQNVGKTIPPVKLGKYNMLKDPSTIKYKAAR-TVDLPNRQWPNRTIT 54
KlLeu4    MIFRNTVVRL----AQAGKKAIPPVKLAYKNMLKDPSTKYRYPY-QINLENRQWPSKTIT 55
LkLeu4Bis -----MPYYKDPVSKYKRFVNPVKLSNRQWPSKALE 31
KlLeu4Bis -----MPFYKDPVSKYKPFVSNVKLQDRKWPSKTLN 31
           :***  ***:      .:  .*  *..  :

Leu4      RAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVDIGFKEIEVSPFASQTDQDFDFTRYAV 118
Leu9      KAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVAQKKEYFHKLINIGFKEIEVSPFASQTDQDFDFTRYAV 117
LkLeu4    KAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLVDIGFKEIEVSPFASQTDQDFDFTRYAV 114
KlLeu4    KAPRWLSTDLRDGNQSLPDPMSVEQKKEYFHKLIEIGFKEIEVSPFASQTDQDFDFTRYAV 115
LkLeu4Bis KAPRWLATDLRDGNQSLPDPMSFEKKIMLSKLCIEIGFKEIEVAFPSASTVDFEFTQHAV 91
KlLeu4Bis KAPRWLATDLRDGNQSLPDPMLNLEKKMLMDKLCCELGFKEIEVAFPSASNIDFQFTQYAV 91
           :*****:*****:*****.. :**  :  **  :*****:*****  **:*:***

Leu4      ENAPDDVSIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKKATIHTYLATSDFREIVFN-MSREEAIS 177
Leu9      ENAPDDVGIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRATIHTYLATSDFREIVFN-MSREEAIS 176
LkLeu4    ENAPEDVTIQCLVQSREHLIKRTVEALTGAKRAS IHTYLATSDFREVVFN-MSQEEAIS 173
KlLeu4    ENAPEDVSIQCLVQSREHLIRRTVEALHGAKKATIHTYLATSDFRDIIVFN-MSQEEAIA 174
LkLeu4Bis KTVPDDVYIQVLSPCREELITKTVESLKGAKNAIVHIYLATSPCFRNIVFSKMTHEQCIS 151
KlLeu4Bis KNVPEVSIQVLSPCREPLIERTVESLVGAKRAIVHIYLATSPCFREIVFNMSHEESIE 151
           :..*:*  **  *  .**  ** :***:*  ***.*  :*  *****  ***:***.  *:*:*.

Leu4      KAVEATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSPFCSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTENPI 237
Leu9      KAVEATKLVKRLTKDDPSQQATRWSYEFSPFCSDTPGEFAVEICEAVKKAWEPTENPI 236
LkLeu4    KAVAATKLVKRLTKDDPAQQATRWTYQFSPECFSPTVEFAVEICEAVKKAWEPTENPI 233
KlLeu4    KAVEATKLVKRLTKDDPSQSATQWTYQFSPECFSPTVEFAVEICEAVKKAWEPTENPI 234
LkLeu4Bis KAVKCTELVRLTKDLDLQQSTNWTFFSPEFSPEFSSEPEFVIEICEAVKKAWEPSVENPI 211
KlLeu4Bis KAVKCAKLVRSLTKDHPDRQDTHWSFEFSPEFSPEFSDFVLEICEAVKKAWEPTENPI 211
           ***  .:***.*****.  :.  *.:**:*  ***:  :*:.*****  **  *:  :***

Leu4      IFNLPATVEVASPNVYADQIEYFATHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADR 297
Leu9      IFNLPATVEVASPNVYADQIEYFSTHITEREKVCISTHCHNDRGCGVAATELGMLAGADR 296
LkLeu4    VFNLPATVEVSTPNVYADQIEYFSTHISEREKVCISTHCHNDRGCGVAASELGMLAGADR 293
KlLeu4    IFNLPATVEVATPNVYADQIEYFSTHISEREKVCISTHCHNDRGCGVAASELGMLAGADR 294
LkLeu4Bis IFNLPATVEMSTPNVYADQIEYFSTNISEREKVCISLPHNDRGCVAAAAELAQMAGADR 271
KlLeu4Bis IFNLPATVEMATPNVYADQIEYFAQISEREKVCISLPHNDRGCVAAAAELAQMAGADR 271
           :*****:***:*****:  *:******  *  *****.***:*.  :*****

```


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre-López, B., Escalera-Fanjul, X., Hersch.González, J., Rojas-Ortega, E., El-Hafidi, M., Lezama, M., González, J., Bianchi, M. M., López, G., Márquez, D., Scazzochio, C., Riego-Ruiz, L. y González, A. (2020). In *Kluyveromyces lactis* a pair of paralogous isoenzymes catalyze the first committed step of leucine biosynthesis in either the mitochondrion and the cytosol. *Frontiers in Microbiology*. 11:1843.
- Beck, H., Dobritzsch, D. y Piškur J. (2008). *Saccharomyces kluyveri* as a model organism to study pyrimidine degradation. *FEMS Yeast Research*. 8(8), 1209-1213.
- Boer, V. M., Daran, J. M., Almering, M. J., de Winde, J. H. y Pronk, J. T. (2005). Contribution of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulator Leu3p to physiology and gene expression in nitrogen-and carbon-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Research*. 5(10), 885-897.
- Byrne, K. y Wolfe, K. H. (2005). The yeast gene order browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research*. 15(10), 1456-1461.
- Casalone, E., Barberio, C., Cavalieri, D. y Polsinelli, M. (2010). Identification of the gene encoding α -isopropylmalate synthase II (*LEU9*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16(6), 539-545.
- Cavalieri, D., Casalone, E., Bendoni, B., Fia, G., Polsinelli, M. y Barberio, C. (1999). Trifluoroleucine resistance and regulation of α -isopropylmalate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*. 261(1), 152-160.
- Conant, G. C. y Wolfe, K. H. (2007). Increased glycolytic flux as an outcome of Whole-Genome Duplication in yeast. *Molecular Systems Biology*. 3(129), PMC1943425.
- Conrad, B. y Antonarakis, S. E. (2007). Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 8(1), 17-35.
- De Carvalho, L. P. S., Argyrou, A. y Blanchard, J. S. (2005). Slow-onset feedback inhibition: Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* α -isopropylmalate synthase by L-leucine. *Journal of the American Chemical Society*, 127(28), 10004-10005
- Dujon, B. (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*. 11(7), 512-524.

- Escalera-Fanjul, X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L. y González, A. (2019). Whole-Genome Duplication and yeast's fruitful way of life. *Trends in Genetics*. 35(1), 42-54.
- Fares, M.A., Keane, O. M., Toft, C., Carretero-Paulet, L. y Jones, G. W. (2013). The Roles of Whole-Genome and Smaller-Scale Duplications in the functional specialization of *Saccharomyces cerevisiae* genes. *PLOS Genetics*. 9(1), e1003176.
- Fekete, V., Cierna, M., Poláková, S., Piškur, J. y Sulo, P. (2007). Transition of the ability to generate petites in the *Saccharomyces/Kluyveromyces* complex. *FEMS Yeast Research*. 7(8), 1237-1247.
- Glover, N. M., Redestig, H. y Dessimoz, C. (2016). Homeologs: What are they and how do we infer them? *Trends in Plant Science*. 21(7), 609-621.
- Gojkovic, Z., Paracchini, S. y Piškur J. (1998). A new model organism for studying the catabolism of pyrimidines and purines. En: Griesmacher, A., Müller, M. M., Chiba, P. (eds). Purine and pyrimidine metabolism in man IX. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Boston. 431. 475-479.
- González, J. E. (2017). *Regulación Transcripcional: su papel en la diversificación funcional de los parálogos BAT1 y BAT2*. (Tesis Doctoral. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 66-71.
- Hagman, A., Säll, T., Compagno, C. y Piškur, J. (2013). Yeast “make-accumulate-consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the Whole Genome Duplication. *PLoS One*. 8(7), e68734.
- Hagman, A. y Piškur, J. (2015). A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS One*. 10(1), e0116942.
- Herwig, C. y Von Stockar, U. (2003). Quantitative comparison of transient growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, and *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 81(7), 837-847.
- Hurles, M. (2004). Gene duplication: The genomic trade in spare parts. *PLoS Biology*. 2(7), 0900-0904.
- Hsu, Y. P., Kohlhaw, G. y Niederberg, P. (1982). Evidence that α -isopropylmalate synthase of *Saccharomyces cerevisiae* is under the “general” control of amino acid biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. 150(2), 969-972.

- Keffe, A. D., Lazcano, A. y Miller, S. L. (1995). Evolution of the biosynthesis of the branched-chain aminoacids. *Origins of Life and Evolution*. 25(1-3), 99-110.
- Kellis, M., Birren, B. W. y Lander, E. S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 428(6983), 617-624.
- Kohlhaw, G. B. (2003). Leucine biosynthesis in fungi: Entering metabolism through the back door. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(1), 1-15.
- Koon, N., Squire, C. J. y Baker, E. N. (2004). Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(22), 8295-8300.
- Kurtzman, C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research*. 4(3), 233-245.
- Levy, A. (2019). How evolution builds genes from scratch. *Nature*. 574(7778). 314-316.
- Li, W. H., Gu, Z., Wang, H. y Nekrutenko, A. (2001). Evolutionary analyses of the human genome. *Nature*. 409(6822), 847-849.
- López, G., Quezada, H., Duhne, M., González, J., Lezama, M., El-Hafidi, M., Colón, M., Martínez de la Escalera, X., Flores-Villegas, M. C., Scazzocchio, C., DeLuna, A. y González, A. (2015). Diversification of paralogous α -isopropylmalate synthases by modulation of feedback control and hetero-oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 14(6), 1-14.
- López, G. (2015). *Hetero-oligomerización de monómeros codificados por genes duplicados: Leu4 y Leu9 un caso específico*. (Tesis doctoral. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 22.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1), 265-275.
- Lynch, M. y Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*. 290(5494), 1151-1155.

- **Marcet-Houben, M. y Gabaldón, T. (2015).** Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *PLoS Biology*. 13(8), e1002220.
- **Marobbio, C. M., Giannuzzi, G., Paradies, E., Pierri, C.L. y Palmieri, F. (2008).** α -Isopropylmalate, a leucine biosynthesis intermediate in yeast, is transported by the mitochondrial oxalacetate carrier. *Journal of Biological Chemistry*. 283(42), 28445-28453.
- **Merico, A., Sulo, P., Piškur, J. y Compagno, C. (2007).** Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *The FEBS Journal*. 274(4), 976-89.
- **Møller, K., Olsson, L. y Piškur, J. (2001).** Ability for anaerobic growth is not sufficient for development of the petite phenotype in *Saccharomyces kluyveri*. *Journal of Bacteriology*. 183(8), 2485-2489.
- **Møller, K., Christensen, B., Förster, J., Piškur, J., Nielsen, J. y Olsson, L. (2002).** Aerobic glucose metabolism of *Saccharomyces kluyveri*: Growth, metabolite production, and quantification of metabolic fluxes. *Biotechnology and Bioengineering*. 77(2), 186-193.
- **Møller, K., Sharif, M. Z. y Olsson, L. (2004).** Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *Journal of Biotechnology*. 111(3), 311-318.
- **Neuvéglise, C., Bon, E., Lépingle, A., Wincker, P., Artiguenave, F., Gaillardin, C. y Casarégola, S. (2000).** Genomic Exploration of the Hemiascomycetous yeast: 9. *Saccharomyces kluyveri*. *FEBS Letters*. 487(1), 56-60.
- **Ohno, S. (1970).** Evolution by gene duplication. Berlin, New York, *Springer-Verlag*, 59.
- **Oura T. y Kawijara, S. (2008).** Substrate specificity and regioselectivity of $\Delta 12$ and $\omega 3$ fatty acid desaturases from *Saccharomyces kluyveri*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72(12), 3174-3179.
- **Papp, B., Pál, C. y Hurst, L. D. (2003).** Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature*. 424(6945), 194-197.
- **Payen, C., Fischer, G., Marck, C., Proux, C., Sherman, D. J., Coppée, J. Y., Johnston, M., Dujon, B. y Neuvéglise, C. (2009).** Unusual composition of a yeast chromosome arm is associated with its delayed replication. *Genome Research*. 19(10), 1710-1721.
- **Phaff, H. J., Miller, M. W. y Shifrine, M. (1956).** The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie Van*

Leeuwenhoek. 22(2), 145-161.

- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A. y Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetic*. 22(4),183-186.
- Roeder, P. R. y Kohlhaw, G. B. (1980). Alpha-isopropylmalate synthase from yeast. A zinc metalloenzyme. *Biochimica et Biophysica Acta- Enzymology*. 613(2), 482-487.
- Shi, N. Q. y Jeffries, T. W. (1998). Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a *URA1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50(3), 339-345.
- Souciet, J. L., The Génolevures Consortium. (2009). Comparative genomics or protoploid Saccharomycetaceae. *Genome Research*.19(10), 1679-1709.
- Ulm, E. H., Böhme, R. y Kohlhaw G. (1972). α -Isopropilmalate synthase from yeast: purification, kinetic studies and effect of ligands on stability. *Journal of Bacteriology*, 110(3), 1118-1126.
- Van De Peer, Y., Maere, S. y Meyer, A. (2009). The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nature Reviews Genetics*. 10(10), 725-732.
- Van De Peer, Y., Mizrachi, E. y Marchall, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics*. 18(7), 411-424.
- Wapinski, I., Pfefferm A., Friedman, N. y Regev, A. (2007). Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature*. 449(7158), 54-61.
- Weinstock, K. G. y Strathern, J. N. (1993). Molecular genetics in *Saccharomyces kluyveri*: The *HIS3* homolog and its use as a selectable marker gene in *S. kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 9(4), 351-361.
- Wolfe, K. H. y Shields, D. C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*. 387(6634), 708-713.
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Review Genetics*. 2(5), 333-341.
- Wolfe, K. H. (2006). Comparative genomics and genome evolution in yeasts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*. 361(1467), 403-412.
- Wolfe, K. H. (2015). Origin of the yeast-genome duplication. *PLOS Biology*.

13(8), e1002221.

- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18(6), 292-298.
- Zhou, N., Swamy, K. B. S., Leu, J., McDonald, M. J., Galafassi, S., Compagno, C. y Piškur, J. (2017). Coevolution with bacteria drives the evolution of fermentation in *Lachancea kluyveri*. *PLoS One*. 12(3), e0173318.
- <http://www.genolevures.org/sakl.html>
- <http://wolfe.gen.tcd.ie/ygob/>
- <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- <https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2&detail-level=3&detail-level>