



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTUDIO BIOQUÍMICO Y FISIOLÓGICO DE
LAS HOMOCITRATO SINTASAS DE
Saccharomyces cerevisiae DURANTE EL
METABOLISMO RESPIRATORIO Y
FERMENTATIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

HÉCTOR QUEZADA PABLO



Tutor: DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

MÉXICO, D. F.

Mayo 2008



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.

ESTUDIO BIOQUÍMICO Y FISIOLÓGICO DE LAS HOMOCITRATO SINTASAS DE *Saccharomyces cerevisiae* DURANTE EL METABOLISMO RESPIRATORIO Y FERMENTATIVO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Alicia González Manjarrez en el laboratorio 301-orientado del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Mario Luis Calcagno Montáns del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de cinética enzimática.

Esta investigación fue financiada por los siguientes proyectos: i) IN210706-3 de la Dirección de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); ii) 49970 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y iii) por el Macroproyecto de Tecnologías de la Información y la Computación, Universidad Nacional Autónoma de México. Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Mario Luis Calcagno Montáns	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Laura por enseñarme lo que es el amor y a disfrutar la vida.

Gracias a David por que eres lo mejor que me ha pasado, me haces muy feliz.

Gracias a mis padres por que siempre me han apoyado y me enseñaron a tratar de comprender cómo funciona la naturaleza y a trabajar con empeño para conseguir lo que me propongo.

Gracias a mis hermanos por que me llenan de alegría y compañía.

Agradezco a Alicia por enseñarme el oficio del científico y por su apoyo profesional y personal.

Agradezco a Mario por su ayuda y amistad.

Gracias a Cristina por su ayuda en los experimentos, sus consejos y por sus pláticas vespertinas en el laboratorio.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio 301-oriente por su compañerismo y su amistad.

CONTENIDO

Carátula

Reconocimientos

Agradecimientos

Índice

Resumen

Abstract

Introducción

Planteamiento del Problema

Hipótesis

Objetivos

Estrategia experimental

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

Anexo: Artículo publicado

RESUMEN

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el primer paso de la biosíntesis de lisina lo realizan las isoformas de la homocitrato sintasa: Lys20p y Lys21p, las cuales catalizan la condensación de α -cetoglutarato y acetil coenzima A. Estos sustratos también son intermediarios en el metabolismo central del carbono y tienen un papel importante en las vías de la generación de energía durante el metabolismo respiratorio pero no durante el fermentativo. La actividad de las homocitrato sintasas es un importante punto de control de la biosíntesis de lisina y su regulación es diferente durante el crecimiento en condiciones fermentativas o respiratorias. Estas isoformas están codificadas por los genes *LYS20* y *LYS21*, los cuales se originaron a partir de una duplicación completa del genoma, ocurrida hace aproximadamente 100 millones de años en el linaje de *S. cerevisiae*. Se ha propuesto que este evento evolutivo facilitó la adquisición del metabolismo facultativo. Pocos pares de genes que surgieron en aquella duplicación se conservan actualmente en el genoma de la levadura. El objetivo de este trabajo fue entender si la preservación de los genes *LYS20* y *LYS21* representa una adaptación de la biosíntesis de lisina al metabolismo facultativo. Encontramos que Lys20p y Lys21p poseen propiedades cinéticas muy diferentes, siendo Lys21p mucho más sensible a la retroinhibición por lisina. Además, Lys21p presenta cooperatividad para la unión del α -cetoglutarato en presencia de lisina lo cual no ocurre con la proteína Lys20p. Por otra parte, se encontró que la isoforma predominante durante el crecimiento en condiciones respiratorias es Lys21p y que la ausencia de esta proteína provoca una reducción en la velocidad de crecimiento en esas condiciones. Estas propiedades cinéticas y regulatorias hacen de Lys21p la isoforma más apta para producir homocitrato durante el metabolismo respiratorio ya que es capaz de balancear el uso del α -cetoglutarato entre la biosíntesis de la lisina y otras vías metabólicas. Las propiedades de Lys20p la hacen una enzima con alta capacidad de producción de homocitrato. Nuestros resultados indican que la preservación de los genes *LYS20* y *LYS21* se debe a que solamente con la presencia de ambos, la levadura puede producir un exceso de lisina y al mismo tiempo regular la biosíntesis de este aminoácido tanto en condiciones fermentativas como en respiratorias.

ABSTRACT

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* the first committed step in the lysine biosynthetic pathway involves the action of two homocitrate synthases encoded by the genes *LYS20* and *LYS21*. These isoforms catalyze the synthesis of homocitrate from α -ketoglutarate and acetyl CoA, substrates that also are intermediates in the central carbon metabolism and play an important role in energy producing pathways during respiratory but not during fermentative conditions. The homocitrate synthase activity exerts a significant control over the rate of lysine biosynthesis. The duplicated genes *LYS20* and *LYS21* arose about 10^8 years in the *S. cerevisiae* lineage during a whole genome duplication event. It has been proposed that this event enabled the acquisition of facultative metabolism. The present work undertook the study of the *LYS20-LYS21* paralogs to analyze whether their retention and possible subfunctionalization affected the efficiency of lysine biosynthesis and α -ketoglutarate differential utilization under fermentative versus respiratory conditions. Our results show that lysine is a strong allosteric inhibitor of Lys21p (K_I of 0.053 mM), which induces positive cooperativity with respect to α -ketoglutarate. Conversely, Lys20p is barely inhibited by lysine and is not a cooperative enzyme. Besides the kinetic properties, the regulation of the intracellular concentrations of the isoforms is different. During growth on ethanol, homocitrate is mainly synthesized through Lys21p, while under fermentative metabolism Lys20p and Lys21p play redundant roles. Thus, under respiratory conditions, Lys21p would be a more fitted enzyme for lysine biosynthesis that could act as a pacemaker, modulating the rate at which α -ketoglutarate is channeled to either lysine biosynthesis or to intermediate and energy generation pathways. On the other hand, Lys20p has higher homocitrate production capacity than Lys21p. It can thus be concluded that retention and further biochemical specialization of the *LYS20*- and *LYS21*-encoded enzymes with partial overlapping roles contributed to the establishment of facultative metabolism.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Ruta de biosíntesis de lisina en hongos.	14
Figura 2.	Alineamiento de las secuencias primarias de Lys20p y Lys21p.	16
Figura 3.	Estabilización con trehalosa de Lys21p.	34
Figura 4.	Lys21p en ausencia de lisina presenta una cinética Michaeliana.	35
Figura 5.	Efecto de la lisina sobre los parámetros cinéticos de Lys21p cuando el sustrato variable es α -KG.	37
Figura 6.	Comparación del efecto inhibitor de la lisina sobre las isoformas Lys20p y Lys21p.	40
Figura 7.	Efecto de la lisina sobre los parámetros cinéticos de Lys21p cuando el sustrato variable es AcCoA.	42
Figura 8.	Contenido intracelular de lisina.	50
Figura 9.	Contenido intracelular de α -cetoglutarato.	52
Figura 10.	Determinación de las cantidades intracelulares de Lys20p y Lys21p mediante hibridaciones tipo Western Blot.	54
Figura 11.	Actividad específica de homocitrato sintasa.	56
Figura 12.	Niveles de transcritos de los genes <i>LYS20</i> y <i>LYS21</i> .	59
Tabla 1.	Propiedades reportadas de las isoformas Lys20p y Lys21p.	17
Tabla 2.	Cepas utilizadas en este trabajo.	23
Tabla 3.	Comparación de diferentes homocitrato sintasas.	45
Tabla 4.	Velocidad específica de crecimiento.	48

ABREVIATURAS

YPD	Medio de cultivo rico en nutrientes
DCIP	2,6-dicloroindofenol
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
pb	Pares de bases
AAA	Ruta del α -amino adipato
AcCoA	Acetil coenzima A
CoA	Coenzima A
α KG	α -cetoglutarato
α -AASA	α -aminoadipato semialdehido
OD ₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nanómetros
TOR	Vía de señalización activada por rapamicina
<i>LYS20</i>	Gen que codifica para la isoforma de homocitrato sintasa Lys20p.
<i>LYS21</i>	Gen que codifica para la isoforma de homocitrato sintasa Lys21p
<i>LYS14</i>	Gen que codifica para el activador transcripcional Lys14p.
<i>LYS4</i>	Gen que codifica para la homoaconitasa (Lys4p).
<i>LYS12</i>	Gen que codifica para la homoisocitrato deshidrogenasa (Lys12p).
<i>ODC1</i>	Gen que codifica para el transportador de α -ceto adipato (Odc1p).
<i>LYS2</i>	Gen que codifica para la α -aminoadipato reductasa (Lys2p).
<i>LYS5</i>	Gen que codifica para la fosfopantotenil-transferasa (Lys5p).
<i>LYS9</i>	Gen que codifica para la sacaropina reductasa (Lys9).
<i>LYS1</i>	Gen que codifica para la sacaropina deshidrogenasa (Lys1p).
Gcn4p	Activador transcripcional de genes de la biosíntesis de aminoácidos.
<i>URA3</i>	Gen que codifica para la orotidina 5-fosfato descarboxilasa (Ura3p).
<i>LEU2</i>	Gen que codifica para la β -isopropilmalato deshidrogenasa (Leu2p).
<i>kanMX4</i>	Gen que confiere resistencia al antibiótico geneticina.
<i>ARSH4</i>	Secuencia de replicación autónoma para plásmidos monocopia.
2 μ	Origen de replicación 2-micrones para plásmidos multicopia.
<i>CEN6</i>	Secuencia de centrómero contenida en los plásmidos monocopia

INTRODUCCIÓN

1. La levadura Saccharomyces cerevisiae

Esta levadura ha sido un organismo modelo para diversos estudios bioquímicos y genéticos desde hace muchos años (1-12). Es un microorganismo no patógeno de fácil cultivo y que puede mantenerse en estado haploide o diploide. Fue el primer eucarionte del que se secuenció el genoma completo (13 y 14). La levadura haploide tiene 12068 kb contenidas en 16 cromosomas, con aproximadamente 6275 genes. Existen pocos intrones y las regiones intergénicas son pequeñas, aproximadamente el 75% del genoma corresponde a secuencias codificantes (13).

S. cerevisiae es un microorganismo anaerobio facultativo que puede usar como fuente de carbono diversos carbohidratos y compuestos como etanol, acetato o lactato (15). La fuente de carbono preferida es la glucosa. En presencia de este monosacárido, se reprimen muchos genes para la utilización de otras fuentes de carbono y genes que participan en rutas de oxidación aerobia de las fuentes de carbono como el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa o el ciclo del glioxilato (16 y 17). Esto hace muy peculiar el metabolismo de esta levadura, ya que de manera independiente a la concentración del oxígeno, si se encuentra en un medio con alto contenido de glucosa, la producción de ATP se realiza fundamentalmente por glucólisis con etanol como producto final. Una de las características principales de esta levadura es su alta capacidad fermentativa (18).

Para el uso de fuentes de carbono no fermentables como el etanol, acetato y lactato, la levadura necesita condiciones aerobias. El metabolismo del etanol se realiza mediante su conversión a acetaldehído, a acetato y finalmente a acetil coenzima A (AcCoA), la cual entra al metabolismo central de carbono mediante su incorporación al ciclo del glioxilato y al ciclo de Krebs (15).

2. Genes duplicados en S. cerevisiae

La creación de nuevos genes en los genomas se realiza básicamente a partir de los genes preexistentes por duplicación o por recombinación, aunque también pueden aparecer nuevos

genes en un genoma debido a la transferencia horizontal (19). La duplicación de genes, puede ocurrir por procesos como entrecruzamiento no equivalente, errores en la replicación del DNA o amplificación génica, además pueden ocurrir eventos de duplicación de fragmentos de cromosomas, cromosomas enteros o incluso el genoma completo (19). Todos estos procesos resultan en genes repetidos que pueden aportar ventajas a los organismos que los poseen ya que puede dar lugar a funciones nuevas o especializadas de los genes duplicados. A la duplicación del genoma entero o de gran parte de éste se le llama duplicación genómica. Se han documentado este tipo de eventos en la evolución de los vertebrados (20), de *Arabidopsis thaliana* (21) y de *S. cerevisiae* (22). Se calcula que la duplicación genómica en el linaje de *S. cerevisiae* ocurrió hace aproximadamente 10^8 años, este evento coincide con la aparición de las plantas con flores y frutos. Dado que el hábitat natural de esta levadura es primordialmente en los frutos en donde abundan los azúcares, se cree que el aumento abrupto de genes debido a la duplicación genómica, permitió la adaptación a ese nicho (18).

Cerca del 28 % de los genes de *S. cerevisiae* tienen al menos un gen parálogo en el genoma (23) ello es resultado de la duplicación genómica y de eventos independientes de duplicación y recombinación (22). Gran parte de esos genes tienen funciones relacionadas con el metabolismo central del carbono y la generación de energía (23), por lo que se ha propuesto que las duplicaciones permitieron a esta levadura adquirir su metabolismo facultativo y su gran capacidad fermentativa (24).

Después de un evento de duplicación, los genes resultantes tienen la misma función. La mayoría de las veces una de las copias se pierde, sin embargo hay ocasiones en las que se conservan ambas copias (25). Se han propuesto tres razones por las cuales se pueden mantener los genes duplicados:

- Los genes resultantes de una duplicación se conservan porque uno de ellos adquirió durante la evolución una nueva función benéfica para el organismo. A esto se le ha llamado neofuncionalización (25), y es un fenómeno poco frecuente.
- Las dos copias se mantienen porque ambas han acumulado mutaciones degenerativas que reducen su capacidad para realizar las funciones que realizaba el gen original, de modo que ambas copias son necesarias para cumplir la función completa. A este proceso

se le ha llamado subfuncionalización (26). Por ejemplo puede ocurrir que los genes acumulen mutaciones en las regiones regulatorias y como resultado, uno se exprese en tejidos o etapas del desarrollo en los que el otro no lo hace, esto resulta en la necesidad de ambos genes. Puede ocurrir también que mutaciones acumuladas en las regiones codificantes provoquen cambios en las proteínas que reduzcan su capacidad para realizar la función del gen parental, de modo que sólo manteniendo ambos genes duplicados se cumple con la función completa. Se han identificado varios casos en los que la divergencia de genes duplicados ha resultado en la especialización de las copias a diferentes condiciones metabólicas (27-36).

- La tercer explicación que se ha propuesto para mantener los genes resultantes de una duplicación es que un aumento en el número de genes resulta en un aumento del producto de esos genes y ello representa una ventaja para el organismo. A este proceso se le conoce como conservación por dosis génica (22, 24 y 37). El mantenimiento de muchas copias de genes de rRNA es un ejemplo de este proceso (22)

Los genes *LYS20* y *LYS21* pertenecen al grupo de genes duplicados que surgieron en el evento de duplicación genómica que ocurrió en el linaje de *S. cerevisiae* (23). Ambos genes se localizan en el cromosoma IV y tienen 88% de identidad en su secuencia de nucleótidos. La identidad de las proteínas Lys20p y Lys21p es de 92%. En el presente trabajo se estudió la posibilidad de que este par de genes se haya mantenido debido a un proceso de subfuncionalización relacionado con el metabolismo facultativo de esta levadura.

3. Biosíntesis de lisina en *S. cerevisiae*

El aminoácido L-lisina es el único aminoácido, constituyente de las proteínas, del que se conocen dos rutas biosintéticas: la ruta del diaminopimelato en las plantas, bacterias y algunos eucariontes y la ruta del α -aminoadipato (AAA) en los hongos (38 y 39). Las rutas biosintéticas de los otros aminoácidos son iguales en las bacterias y los hongos. Este es un aminoácido esencial para los humanos por lo que su biosíntesis es objeto de estudios biotecnológicos para desarrollar organismos que lo produzcan con altos rendimientos (40-45). El hecho de que los hongos produzcan lisina por esta vía, ha propiciado su estudio para el diseño de fármacos antifúngicos

(46). Las enzimas de esta vía también se encuentran en animales y plantas pero no funcionan en la biosíntesis sino en el catabolismo de lisina (38). Se ha reportado que algunas arqueas también producen lisina mediante la vía del AAA (47). Sin embargo, sólo la primera mitad de la ruta es igual a la de los hongos, los pasos posteriores a la formación de α -aminoadipato y hasta la formación de L-lisina son diferentes.

Los precursores de la vía son α -cetoglutarato (α -KG) y AcCoA, en la figura 1 se presenta un esquema de esta ruta basado en la revisión de Xu *et al* (38), las siete enzimas que integran la vía se encuentran distribuidas en 3 compartimientos diferentes, el núcleo, la mitocondria y el citosol (48 y 49). La primera enzima de la vía es la homocitrato sintasa. En el presente trabajo se estudiaron las isoformas de esta enzima las cuales son los productos de los genes duplicados *LYS20* y *LYS21*. La actividad de estas enzimas es modulada por retroinhibición por lisina (50), activación por cationes monovalentes y por la poza de α -KG (51 y 52). Este control es necesario para balancear el uso de los sustratos y la producción de lisina ya que tanto el α -KG como la AcCoA son intermediarios en múltiples vías metabólicas, entre ellas el metabolismo central de carbono y por lo tanto la producción de energía. Se ha sugerido que las homocitrato sintasas ejercen parte significativa del control del flujo de intermediarios a través de la ruta (38).

La segunda reacción de la vía es catalizada por la enzima homoaconitasa, es el producto del gen *LYS4* y cataliza la conversión de homocitrato en homoisocitrato, esta es la primera enzima de la parte mitocondrial de la vía, el transportador que introduce el homocitrato a la mitocondria no se conoce. La siguiente enzima es la homoisocitrato deshidrogenasa, es el producto del gen *LYS12* y cataliza la descarboxilación y oxidación del homoisocitrato para producir α -cetoadipato con el uso de NAD^+ . El α -cetoadipato resultante sale de la mitocondria por los transportadores Odc1p y Odc2p que se localizan en la membrana interna mitocondrial, éstos realizan el antiporte con ácidos dicarboxílicos como el α -KG, malato u otro intermediario del ciclo de Krebs, dicho intercambio permite la continuación de la biosíntesis de lisina en el citosol y además cumple un papel anaplerótico (27).

En el citosol, el α -cetoadipato es transaminado por una aminotransferasa dependiente de piridoxal-5' fosfato y L-glutamato para producir α -aminoadipato. El gen que produce la

aminotransferasa no se ha identificado aún. El siguiente paso lo realiza la enzima α -aminoadipato reductasa, esta enzima reduce el α -aminoadipato a α -aminoadipato- δ -semialdehído mediante un proceso que involucra la adenilación y reducción con el uso de ATP y $\text{NADPH}+\text{H}^+$, este tipo de reacción sólo se encuentra en hongos, es catalizada por el producto del gen *LYS2* pero también requiere la presencia del producto del gen *LYS5*, la proteína Lys5p activa a Lys2p uniéndole covalentemente un grupo fosfopantoténil proveniente de la coenzima A (CoA). Lys2p y Lys5p forman en la célula un heterodímero. En *Candida albicans*, la actividad de la α -aminoadipato reductasa es retroinhibida por lisina por lo que éste puede ser otro punto de control de la vía (53). Este paso es considerado como el que permitió la evolución de la ruta del AAA en hongos (54). El α -aminoadipato- δ -semialdehído (α -AASA) es un intermediario de la vía que también funciona como coactivador transcripcional de la proteína Lys14p, el complejo activador Lys14p- α -AASA regula la transcripción de los genes de la vía de biosíntesis de lisina: cuando en la célula hay poca lisina, las homocitrato sintasas están poco inhibidas y hay un flujo de intermediarios a lo largo de la vía que mantiene cierto nivel de α -AASA y por lo tanto de complejo activador Lys14p- α -AASA y los genes *LYS* se transcriben activamente. Cuando en la célula hay un exceso de lisina, la retroinhibición de las homocitrato sintasas reduce el flujo de intermediarios a través de la vía con lo que también la cantidad de complejo activador disminuye y por lo tanto también la transcripción de los genes *LYS* (50).

Para terminar la biosíntesis de L-lisina a partir del α -aminoadipato- δ -semialdehído, sólo es necesaria un tipo de transaminación que involucra la condensación de glutamato y que se realiza en dos pasos. El primero es catalizado por la sacaropina reductasa que es el producto del gen *LYS9* con el uso de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, esta enzima une covalentemente el grupo amino del glutámico en el carbono 6 del semialdehído. Finalmente, la enzima sacaropina deshidrogenasa rompe dicho enlace y libera L-lisina y α -KG con la reducción de NAD^+ .

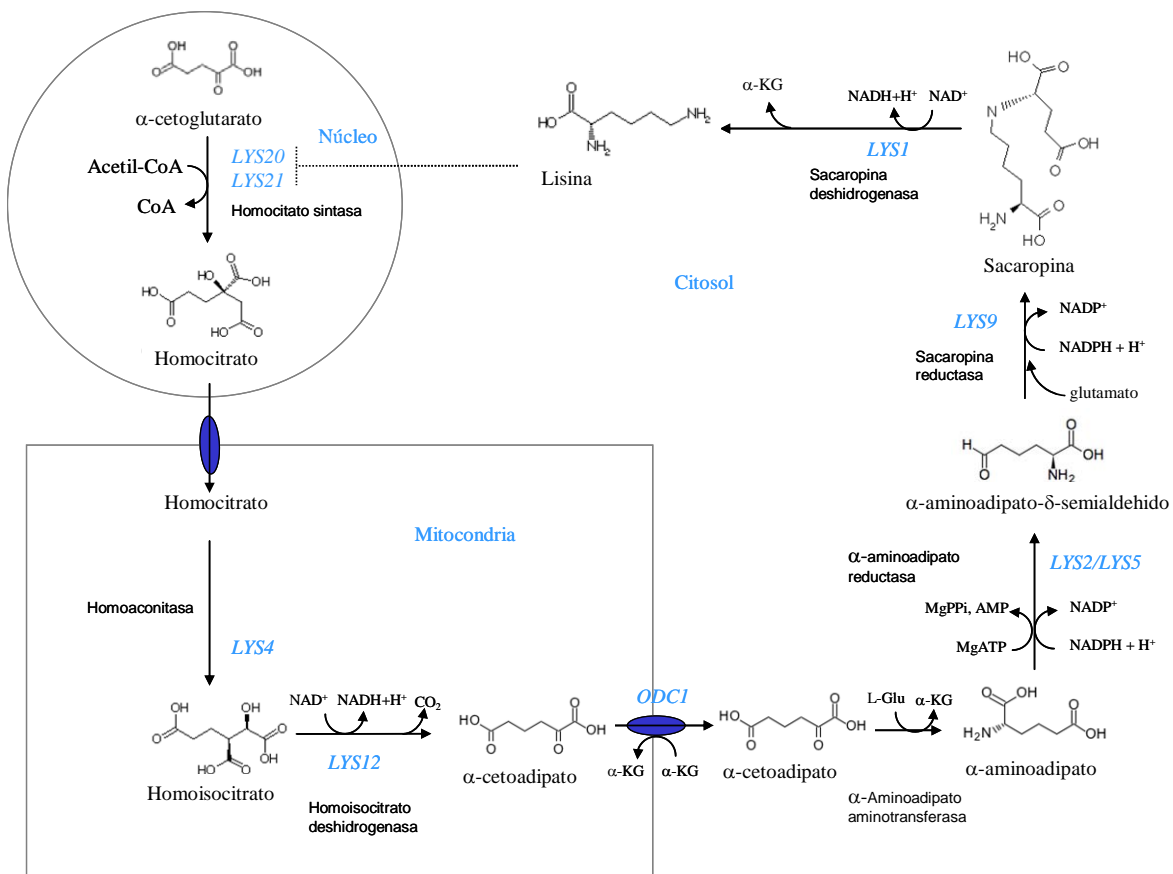


Figura 1. Ruta de biosíntesis de lisina en hongos. Los compartimentos intracelulares y los genes se muestran en azul. La línea que va de lisina hacia la homocitrato sintasa representa retroinhibición. Los transportadores se muestran como óvalos azules.

La lisina es utilizada para la biosíntesis de proteínas y es almacenada en la vacuola, cerca del 83% de la lisina total se encuentra en la vacuola (55). *S. cerevisiae* no es capaz de usar este aminoácido como fuente de nitrógeno ni de carbono (56). Sin embargo la lisina está relacionada con procesos de resistencia a estrés oxidativo, crioprotección y en la prevención de apoptosis inducida por limitación de aminoácidos (57-59).

El catabolismo de la lisina se realiza por varias rutas en diferentes grupos de organismos (38), los animales y plantas usan la vía del AAA en dirección contraria para utilizar los dos grupos amino (lisina \rightarrow sacaropina \rightarrow α -amino adipato- δ -semialdehído \rightarrow α -amino adipato \rightarrow α -ceto adipato).

En estos organismos la sacaropina deshidrogenasa es una enzima bifuncional que cataliza las reacciones correspondientes a la sacaropina deshidrogenasa y la sacaropina reductasa de *S. cerevisiae* (38 y 60).

4. Las homocitrato sintasas de *S. cerevisiae*

Las isoformas Lys20p y Lys21p son 92 % idénticas en su secuencia de aminoácidos, el monómero de Lys20p tiene un peso molecular de 47 kDa y el de Lys21p de 49 kDa. En la figura 2 se muestra un alineamiento de las secuencias primarias, las diferencias se marcan en rojo y se localizan principalmente en los extremos amino y carboxilo terminales. Como se discutirá en la sección de resultados, a pesar de ser muy similares en su secuencia de aminoácidos, las isoformas son muy diferentes en sus propiedades cinéticas y en la capacidad de producción de homocitrato.

No hay reportadas estructuras de cristales de homocitrato sintasas, sin embargo las isoformas de *S. cerevisiae* tienen 27 % de identidad con la isopropilmalato sintasa de *Mycobacterium tuberculosis* cuya estructura cristalina ha sido resuelta (61). Los monómeros de esta enzima contienen un dominio llamado barril ($\beta\alpha$)₈ en el extremo amino terminal, el sitio activo se encuentra en el extremo carboxilo de este barril. Esta estructura es común en diferentes grupos de enzimas y frecuentemente contiene al sitio activo. En el extremo carboxilo terminal de la proteína se encuentra un dominio regulatorio responsable de la retroinhibición por leucina. Es una metaloenzima que contiene Zn^{+2} .

Por análisis de las secuencias se pueden identificar tres dominios en las enzimas Lys20p y Lys21p, el dominio de homocitrato sintasa, el de barril TIM (también llamado barril ($\beta\alpha$)₈) y el de carboxil transferasa. Se han identificado algunos residuos que están involucrados en la retroinhibición por lisina (50 y 43) los cuales se han marcado en azul en la figura 2, su identificación se efectuó mediante el aislamiento de mutantes insensibles a esta inhibición.

Las dos isoformas de homocitrato sintasa de *S. cerevisiae* se encuentran localizadas en el núcleo (48), no se conoce la razón por la cual están en este compartimento, se ha especulado si realizan

localización nuclear, las isoformas responden a las pozas citosólicas de los sustratos y de lisina, asumiendo que estos metabolitos difunden por los poros nucleares. Se ha reportado que el principal modulador de la actividad *in vivo* es la poza de α -KG (51 y 52). También se ha reportado la inhibición por CoA *in vitro* (62), la cual se interpretó como un mecanismo para coordinar la biosíntesis de lisina y la actividad del ciclo de Krebs.

Los genes *LYS20* y *LYS21* fueron identificados por primera vez por el grupo de Ramos (50), ellos también estudiaron la fisiología de mutantes en estos genes, sus resultados fueron obtenidos en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y se resumen en la tabla 1. Las mutantes sencillas presentan actividades específicas similares pero la producción de lisina de la mutante *lys21* Δ es mayor que la de la mutante *lys20* Δ . Además, la menor sensibilidad a la inhibición por lisina de la isoforma Lys20p (medida como $I_{0.5}$), indica que esta isoforma es capaz de producir más homocitrato lo cual se ve reflejado en una mayor producción de lisina. La alta capacidad de Lys20p es evidente en la doble mutante que sobreexpresa al gen *LYS20*, en la cual la actividad específica y la poza de lisina se incrementan notoriamente. Ambas mutantes sencillas presentaron la misma velocidad de crecimiento que la cepa silvestre, por lo que la menor poza de lisina producida en la mutante *lys20* Δ , le es suficiente a la célula. La doble mutante *lys20* Δ , *lys21* Δ no presenta actividad de homocitrato sintasa y es auxótrofa de lisina. Hasta antes del presente trabajo, los estudios de Ramos habían sido los únicos que abordaban a la proteína Lys21p (50), su conclusión acerca del papel fisiológico de esta enzima fue que actuaba solamente bajo condiciones de extrema demanda de lisina.

Cepa	Actividad específica de homocitrato sintasa ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Lisina intracelular (nmol mg peso seco $^{-1}$)	$I_{0.5}$ por lisina (mM)
Silvestre	1.4	26.5	
<i>LYS20</i> , <i>lys21</i> Δ	0.56	37	1
<i>LYS21</i> , <i>lys20</i> Δ	0.4	6	0.15
<i>lys20</i> Δ , <i>lys21</i> Δ , <i>LYS20</i> 2 μ	10	134	

Tabla 1. Propiedades reportadas de las isoformas Lys20p y Lys21p. Los datos fueron tomados de la referencia 50. El ultimo renglón corresponde a una doble mutante transformada con un plásmido multicopia que tiene clonado al gen *LYS20*.

Cuatro de las cinco homocitrato sintasas que se han estudiado son inestables (63-65), la única estable ha sido la del procarionte *Termus termophilus* (66). La isoforma Lys20p fue estabilizada y caracterizada cinéticamente por Andi *et al* (65, 67 y 51), en esos estudios se utilizó una proteína recombinante unida a seis histidinas en el extremo carboxilo terminal. Esta enzima tiene una cinética hiperbólica para ambos sustratos, su mecanismo es secuencial ordenado en el que el α -KG se une antes que la AcCoA y la CoA es liberada antes que el homocitrato. Para esta isoforma, la lisina es un inhibidor lineal que se comporta como competitivo aunque el sitio de unión del inhibidor es diferente al sitio activo (51). Lys20p es activada por cationes monovalentes como Na^+ , K^+ , Li^+ y NH_4^+ . El ión Na^+ es un activador a bajas concentraciones y un inhibidor a altas concentraciones (51).

La regulación transcripcional de los genes *LYS20* y *LYS21* depende de tres mecanismos de regulación positiva: uno de ellos es mediante el activador Gcn4p el cual es un activador global de las rutas de biosíntesis de aminoácidos así como de otras rutas biosintéticas (68); otro mecanismo lo constituye el complejo activador Lys14p- α -AASA, el cual activa genes sólo de la vía de biosíntesis de lisina, los blancos identificados para este complejo activador son: *LYS20*, *LYS21*, *LYS12*, *LYS2*, *LYS4*, *LYS9* y *LYS1* (69); el tercer mecanismo es dependiente de la vía de señalización sensible a rapamicina (TOR) y de la proteína kinasa A, esta instancia regulatoria responde a privación de nutrientes y provoca cambios transcripcionales en diferentes grupos de genes incluyendo la reducción en la transcripción de los genes *LYS20*, *LYS21*, *LYS12*, *LYS4* y *LYS9* (70).

La represión de los genes de la biosíntesis de lisina debida a la presencia de niveles altos de este aminoácido se realiza mediante la retroinhibición de las homocitrato sintasas, lo cual reduce el flujo de intermediarios a través de la ruta y por lo tanto, también reduce la poza intracelular de α -AASA y con ello, la cantidad de complejo activador Lys14p- α -AASA con la consiguiente disminución en la transcripción de los genes de la vía (50).

El presente trabajo se realizó para entender si la conservación de los genes *LYS20* y *LYS21* constituyó un mecanismo para adaptar la biosíntesis de lisina al metabolismo facultativo de *S. cerevisiae*. Nuestros resultados indican que las mutaciones que han acumulado estos genes brindan a sus productos propiedades cinéticas y regulatorias diferentes. Si bien ambas isoformas son necesarias durante el metabolismo fermentativo y respiratorio para producir los niveles silvestres de lisina, la participación de Lys20p en la producción de homocitrato, relativa a la de Lys21p, es menor durante el metabolismo respiratorio debido a que la enzima Lys21p es la isoforma predominante y la más apta para producir homocitrato en esas condiciones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cerca del 16 % de los genes de *S. cerevisiae* se encuentran en dos copias originadas a partir de un evento de duplicación genómica ocurrido hace proximadamente 10^8 años. Se ha propuesto que algunos de estos genes duplicados se mantuvieron en el genoma debido a que facilitaron la adquisición del metabolismo facultativo y la alta capacidad fermentativa de esta levadura (71, 18 y 24). El par de genes *LYS20* y *LYS21* surgió en dicho evento de duplicación (23). También se ha reportado que, durante el crecimiento fermentativo, la isoforma Lys20p es la principal responsable de la biosíntesis de homocitrato y que el papel fisiológico de Lys21p se limita a condiciones de extrema demanda de lisina (50). Sin embargo, no se habían estudiado los papeles de las homocitrato sintasas en condiciones respiratorias, en las cuales los sustratos de estas enzimas son intermediarios importantes en las vías de generación de energía.

El presente trabajo se realizó para explorar si los genes *LYS20* y *LYS21* se encuentran especializados en la producción de homocitrato bajo condiciones metabólicas distintas relacionadas con el metabolismo facultativo de esta levadura, lo cual podría explicar la conservación evolutiva de ambos genes.

HIPÓTESIS

Si los genes duplicados *LYS20* y *LYS21* se mantuvieron en el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue porque estos genes sufrieron un proceso de subfuncionalización que llevó a que las proteínas codificadas por estos genes cumplan diferente papel fisiológico durante el metabolismo fermentativo y respiratorio.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Determinar las propiedades cinéticas de la isoforma Lys21p y compararlas con las propiedades reportadas para la isoforma Lys20p.
2. Comparar la fisiología de la cepa silvestre con la de mutantes en los genes *LYS20* y *LYS21* durante los metabolismos fermentativo y respiratorio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se estudiaron los papeles fisiológicos de los genes *LYS20* y *LYS21* así como las propiedades cinéticas de sus productos en busca de diferencias que pudieran explicar la conservación de dos isoformas de homocitrato sintasa en la levadura *S. cerevisiae*.

La estrategia experimental general consistió en:

- 1. Caracterización de mutantes bajo diferentes condiciones metabólicas.** Se generaron mutantes con los genes *LYS20* y *LYS21* inactivados así como mutantes con múltiples copias de estos genes. Se cultivaron en condiciones fermentativas y respiratorias durante las cuales se determinó la velocidad de crecimiento, las pozas intracelulares de lisina y α -cetoglutarato, la expresión de los genes y las cantidades de homocitrato sintasa medidas como actividad específica y mediante inmunodetección.
- 2. Estudio de las propiedades cinéticas de Lys21p.** Esta enzima se estabilizó para determinar sus propiedades cinéticas variando las concentraciones de sustratos y del inhibidor lisina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

En la tabla 2 se presentan los genotipos de las cepas que se utilizaron en el presente trabajo. Se usó la cepa silvestre CLA1 la cual tiene como marcadores de selección los alelos *ura3* y *leu2*. Para evitar complementar los medios con leucina, se insertó el gen funcional *LEU2*, para ello, se transformó la cepa CLA1 con un producto de PCR de 1989 pb el cual se amplificó con los oligonucleótidos Leu2Fo (5'-GAC CGC AGT TAA CTG TGG-3') y Leu2Re (5'-CGA CTA CGT CGT TAA GGC-3'), se usó DNA genómico de la cepa S288C y se seleccionaron las colonias prototróficas a leucina. Esta cepa se usó durante el presente trabajo como cepa silvestre y se le dio el nombre de CLA1-2.

Cepa	Genotipo
CLA1-2	<i>MATα LYS21 LYS20 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-21	<i>MATα LYS21 lys20Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-20	<i>MATα lys21Δ::kanMX4 LYS20 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2C	CLA1-2/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-20C1	CLA1-2-20/pMON21 (<i>LYS21</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-D	<i>MATα lys21Δ::LEU2 lys20Δ::kanMX4 leu2 ura3</i>
CLA1-2M	CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-DM	CLA1-D/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-21M	CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-20M	CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-Q10	CLA1-D/pMULQ10 (5' <i>LYS21-LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo. Los marcadores *ura3* y *leu2* son alelos inactivos de los genes *URA3* y *LEU2* las células que los contienen son auxótrofas de uracilo y de leucina respectivamente. Las interrupciones se representan con cuatro puntos (::) y los genes inactivos se escriben con minúsculas cursivas seguidos de la letra delta (Δ), por ejemplo: *lys20 Δ ::kanMX4*, indica que el gen *LYS20* es inactivo por que se sustituyó su región codificante con el cassette de resistencia al antibiótico geneticina (*kanMX4*). Los nombres de los plásmidos empiezan con la letra p minúscula y pueden contener a los

genes *LYS20* o *LYS21*, todos los plásmidos utilizados contenían el gen *URA3* funcional para asegurar su mantenimiento en la célula. Los plásmidos derivados del pRS316 contienen el origen de replicación *ARSH4* y la secuencia centromérica *CEN6*, lo que los mantiene en aproximadamente 3 copias en el núcleo (73). Los plásmidos derivados del pRS426 contienen el origen de replicación 2μ por lo que se mantienen aproximadamente 15 copias en el núcleo (74). El plásmido pMULQ10 contiene al gen *LYS20* bajo el control del promotor de *LYS21*.

Para generar la mutante CLA1-2-21, la cepa CLA1-2 se transformó con un producto de PCR de 2675 pb el cual contenía al gen *LYS20* inactivado mediante la interrupción con un cassette de resistencia al antibiótico geneticina (*kanMX4*). El producto de PCR también contenía 987 pb antes del codón de inicio y 182 pb después del codón de término. Como templado se usó DNA genómico de la cepa Y33880 de la colección Euroscarf y se usaron los siguientes oligonucleótidos: LYS20Fo (5'-TAC TGC GTG CGC TTG AGA TTC AG-3') y LYS20Re (5'-TCC CCT TAT TCT GCC GCG AAT G-3'). El programa de PCR que se usó consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, después 35 ciclos de: 30 seg a 95 °C, 1 min de alineamiento a 59 °C y 2 min de extensión a 72 °C. El programa terminó con un ciclo final de 10 min a 72 °C.

La mutante CLA1-2-20 se generó de manera similar a la CLA1-2-21, como templado se usó DNA genómico de la cepa Y33828 de la colección y los oligos L1F2 (5'-CAT CTT TGA AGG CTT GTG CTG ATC-3') y L1R2 (5'-CTC CGT GAG AGT ATA ATA GCG TG-3') rindieron un producto de 2395 pb el cual incluyó 640 pb antes del codón de inicio y 249 pb después del codón de término.

Las transformantes se seleccionaron por su resistencia a geneticina (200 mg/L) en medio YPD sólido. Las interrupciones se verificaron amplificando los cassettes y digiriéndolos con *BamHI* y *HindIII*, estas enzimas digieren los genes interrumpidos pero no los genes silvestres.

La mutante doble CLA1-D se generó interrumpiendo el gen *LYS20* con el cassette *kanMX4* y el gen *LYS21* con *LEU2*. Para inactivar el gen *LYS21* se hizo una construcción en la que el gen *LEU2* con su propio promotor se insertó en una región interna del gen *LYS21*, de este modo, al transformar dicha construcción en la cepa CLA1, fue posible seleccionar por prototrofia a

leucina en medio mínimo. *LEU2* se amplificó flanqueado con secuencias de corte para *BclI*, con los oligonucleótidos LYS21LEU2Fo (5'- GCG CGC **TGA TCA** GAC CGC AGT TAA CTG TGG-3') y LYS21LEU2Re (5'- GCG CGC **TGA TCA** CGA CTA CGT CGT TAA GGC-3'), los sitios de reconocimiento para *BclI* se indican en negritas. El templado fue DNA genómico de la cepa S288C. El programa de PCR que se usó consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 95°C, después 6 ciclos de: 30 seg a 95 °C, 1 min de alineamiento a 50°C y 2 min de extensión a 72 °C. Después de esta primera fase, el programa continuó con 30 ciclos de: 30 seg a 95 °C, 1 min de alineamiento a 63 °C y 2 min de extensión a 72 °C. El programa terminó con un ciclo final de 10 min a 72 °C. El producto de PCR que se obtuvo se digirió con *BclI*, así como también se digirió el plásmido pGEM-T Easy que contenía a *LYS21* clonado, *BclI* corta en una región interna del gen *LYS21* y no corta en el vector pGEM-T Easy, de modo que la ligación de estos fragmentos generó la construcción con *LYS21* inactivado con *LEU2* la cual fue amplificada con los oligonucleótidos L1F2 y L1R2 y transformada en la cepa CLA1. Las transformantes se seleccionaron por prototrofia a leucina y para verificar la interrupción, se les extrajo el DNA genómico y se les amplificó la región comprendida entre los oligonucleótidos L1F2 y L1R2. Si este producto de PCR se cortaba con *KpnI*, la interrupción era correcta ya que esta enzima digiere el cassette de interrupción *lys21Δ::LEU2* y no corta el gen *LYS21* silvestre. Para interrumpir el gen *LYS20* se usó la misma estrategia que para generar la cepa CLA1-2-21: las colonias positivas para la interrupción *lys21Δ::LEU2* fueron transformadas con el cassette *lys20Δ::kanMX4*, el cual fue amplificado de la cepa Y33880 de la colección Euroscarf, las transformantes se seleccionaron por su resistencia a geneticina y verificadas como para la mutante sencilla. Las transformaciones se realizaron por el método de Ito *et al* (72).

El plásmido pRS316 se utilizó para complementar a la mutante CLA1-2-20 con el gen *LYS21* y de este modo generar la cepa CLA1-2-20C1. El gen *LYS21* se amplificó con los oligonucleótidos L1F2 y L1R2, el producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy y se subclonó en el pRS316 mediante la digestión con *NotI* y *XhoI*; al plásmido centromérico resultante se le llamó pMON21, el cual fue transformado en la cepa CLA1-2-20 para construir la cepa CLA1-2-20C1. En este trabajo al plásmido pRS316 se le llamará plásmido “monocopia” por el hecho de que se mantiene en pocas copias en la célula (en realidad no se mantiene en una sola copia, su número es variable en diferentes células pero se estima que en promedio se mantienen en 3 copias por

célula). En los experimentos en los que se usó la cepa CLA1-2-20C1 se compararon los resultados con la cepa silvestre transformada con el vector pRS316 sin ningún gen clonado, esta cepa control es la CLA1-2C.

El plásmido pRS426 se utilizó para mantener de 15 a 20 copias de los genes en el núcleo de las levaduras, esto es debido a que este vector posee la secuencia 2μ (74). En el presente trabajo las cepas que sobreexpresan los genes *LYS21* o *LYS20*, contienen dichos genes clonados en pRS416 y se dice que contienen esos genes en multicopia. Para clonar el gen *LYS21* en el vector pRS426, el gen *LYS21* se amplificó con los oligonucleótidos L1F2 y L1R2, el templado fue DNA genómico de la cepa CLA1, el producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy y se subclonó en el pRS426 mediante la digestión con *NotI*. Al plásmido resultante se le llamó pMUL21 (*LYS21* 2μ *URA3*). La cepa CLA1-D-21M se obtuvo transformando a la mutante doble CLA1-D con el plásmido pMUL21. Para clonar el gen *LYS20* en pRS426 se siguió la misma estrategia, se usaron los oligonucleótidos LYS20Fo y LYS20Re y al plásmido resultante se llamó pMUL20. La cepa CLA1-D-20M se obtuvo transformando a la mutante doble con el plásmido pMUL20. En los experimentos en los que se usaron las cepas con los genes en multicopia, se usaron las cepas CLA1-2M (CLA1-2 transformada con pRS426) y CLA1-DM (CLA1-D transformada con pRS426) como cepas controles. Todas las transformantes se seleccionaron por la prototrofia a uracilo.

La cepa CLA1-D-Q10 es la mutante doble transformada con un plásmido multicopia que tiene clonada una construcción con la región codificante de *LYS20* bajo el control del promotor de *LYS21*. Esta construcción se obtuvo mediante la amplificación del producto resultante del traslape del promotor de *LYS21* con la región codificante de *LYS20*. La amplificación del promotor se realizó con los oligonucleótidos Q110PFo (5'-GAA CGA AGC AAA TCC TAC GAG TAA ATA CAT AAG-3') y Q110PURE (5'-**ATT TGG TTT AGC AGC AGT CAT GGT TTG TTA AAG TAT ACA ATT ACT**-3'). El producto de 637 pb contenía las primeras 21 bases de la región codificante de *LYS21* (marcadas en letras negritas), el templado fue el plásmido pMUL21 y la temperatura de alineamiento fue de 50 °C. La amplificación de la región codificante de *LYS20* se realizó con los oligonucleótidos Q110CFo (5'-GAC TGC TGC TAA ACC AAA TCC ATA TGC T-3') y LYS20Re. El templado fue el plásmido pMUL20 y el

alineamiento fue a 59 °C. El PCR traslapado se realizó a 50 °C y primero fue clonado en el vector pGEM-T Easy y después fue subclonado mediante la digestión con *NotI* en el pRS426. El plásmido resultante se llamó pMULQ10 (5'LYS21-LYS20 2μ URA3).

Condiciones de cultivo.

Todos los experimentos del presente trabajo se realizaron con células cultivadas en medio mínimo a 30°C. Los experimentos en condiciones microaerófilas se hicieron en condiciones estáticas en frascos de 250 ml llenos en su totalidad. Los demás experimentos se realizaron con cultivo agitados a 250 rpm. en matraces con un volumen de medio equivalente a una quinta parte del volumen total. La fuente de carbono fue glucosa (2% peso/volumen) o etanol (2% volumen/volumen), la de nitrógeno fue sulfato de amonio (40 mM) además, el medio contenía vitaminas, sales y oligoelementos. Los cultivos se hicieron en matraces con tapones de algodón. Para medir las velocidades de crecimiento, las hibridaciones tipo Western y las pozas de lisina intracelular, los cultivos se hicieron en 50 ml de medio; para las actividades específicas de homocitrato sintasa, las hibridaciones tipo Northern y las pozas intracelulares de α -KG, las células fueron cultivadas en 200 ml de medio. Los cultivos que se usaron para obtener la enzima Lys21p para su caracterización cinética primero se cultivaron en 200 ml de medio en un matraz de 1L y cuando alcanzaban una D.O.₆₀₀ de 0.7, se centrifugaba el cultivo y todas las células se pasaban a 1L de medio en matraces de 3L. Después de una duplicación en este matraz grande, las células se colectaban y rompían. Cuando era necesario, el medio se suplementó con uracilo (20 mg/L) o lisina (30 mg/L). El medio rico YPD se usó para los precultivos (50 ml de medio).

Medición de la actividad específica de homocitrato sintasa.

Se usaron cultivos de 200 ml en medio mínimo en fase exponencial (O.D.₆₀₀ 0.4-0.6), las células se colectaron por centrifugación y se lavaron con 50 ml de agua fría. El extracto crudo se preparó en base a lo reportado por Ramos *et al* (75): el pellet de células se resuspendió en Hepes 50 mM pH 7.2 frío, el volumen de amortiguador fue el equivalente en mililitros a la mitad del peso del pellet en gramos. Se agregaron perlas de vidrio en una cantidad aproximadamente igual al volumen de la suspensión celular. Posteriormente se dieron seis ciclos de 1 min vortex y 1 min

hielo, después se centrifugó la suspensión 15 min a 13000 rpm a 4°C. El sobrenadante se dializó en una columna empacada con la resina Sephadex G25 equilibrada con Hepes 50 mM pH 7.2. Las fracciones con mayor cantidad de proteína se utilizaron para medir la actividad específica. Se utilizó el método colorimétrico reportado por Andi *et al* (65): el ensayo se realizó midiendo la tasa de cambio en la absorbancia a 600 nm en una celda con 500 µl de volumen final que contenía 50 mM Hepes, pH 7.2, 0.1 mM DCIP, 0.5 mM AcCoA y 40 mM α-KG. Los ensayos se realizaron a 30 °C en un espectrofotómetro de doble haz Cary 400 (Varian). Como control se usó una celda que no contenía α-KG. Antes de iniciar el ensayo se dejaba la celda en el espectro 5 min para que se equilibrara la temperatura y la CoA libre (contaminante de la AcCoA comercial) reaccionara con el DCIP. El ensayo se inició con una cantidad de extracto crudo equivalente a 0.2 mg de proteína total. La cantidad de proteína se midió por el método de Lowry (76).

Estabilización de Lys21p.

Para obtener la enzima Lys21p con la que se realizaron los estudios de cinética enzimática, se obtuvo un extracto crudo el cual se sometió a una cromatografía de exclusión molecular por HPLC, las fracciones con actividad de Lys21p se estabilizaron en trehalosa. Se usaron cultivos de 1L de medio mínimo a D.O.₆₀₀ 1.4 de la cepa CLA1-D-21M. Las células se colectaron por centrifugación 5 min a 3000 rpm a 4°C, se lavaron con amortiguador Hepes 50 mM pH 7.2 frío y se rompieron como se describió para la preparación del extracto crudo. Se utilizaron 500 µl de extracto crudo no dializado filtrado por membranas de 0.22 µm de tamaño de poro para inyectar un sistema de HPLC con una columna de 15x300 mm empacada con la resina Superdex S-200. Como fase móvil se usó Hepes 50 mM a pH 7.2 fluyendo a 0.5 ml/min. Inmediatamente después de eluir, las fracciones con mayor actividad de Lys21p se mezclaron con el mismo volumen de una solución de trehalosa 2M para que la concentración final de trehalosa fuera de 1M. Si se mantenía en hielo, esa preparación mantenía la actividad de Lys21p constante por 24 hrs. En la preparación estabilizada, la cantidad de proteína total era de aproximadamente 4 mg/ml.

Determinación de los parámetros cinéticos de Lys21p.

Para medir las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de sustratos y del inhibidor lisina, se realizaron ensayos colorimétricos como se describió para la medición de actividades específicas, la mezcla de reacción contenía 100 mM de trehalosa y concentraciones variables de α -KG, AcCoA y Lys. Cuando el sustrato variable fue α -KG, la AcCoA se mantuvo a 0.2 mM, cuando la AcCoA fue el sustrato variable, el α -KG se mantuvo a 50 mM. Los datos se analizaron con el programa Origin 7.0.

Hibridación tipo Northern.

Para estudiar cambios en los niveles relativos de transcritos de los genes *LYS20* y *LYS21*, se usaron cultivos con 200 ml de medio mínimo y células en fase exponencial de crecimiento (O.D.₆₀₀ 0.4-0.6). Se utilizó la técnica reportada por Valenzuela *et al* (77). El RNA se extrajo por el método de fenol ácido como lo describen Struhl y Davis (78). Con el objeto de reducir la hibridación cruzada se usaron sondas complementarias a las regiones cercanas al codón de término. Para hibridar con los transcritos de *LYS20* se usó como sonda el producto de PCR de 108 pb amplificado con los oligonucleótidos NLYS20Fo2 (5'-GGT CAG CAC TCC TCA AGT AC-3') y NLYS20Re2 (5'-TAG GCG GAT GGC TTA GTC C-3'). La hibridación con los transcritos de *LYS21* se realizó con el producto de PCR de 107 pb para el cual se usaron los oligonucleótidos NLYS21Fo2 (5'-ATT GAG CAC CCC ACT TTT AAA ACC-3') y NLYS21Re2 (5'-GAA ACT ATT TGG TGA CCT TTG CC-3'). Como control de cargado se usó un fragmento del gen *ACT1* de 1599 pb. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageQuant 5.2

Hibridación tipo Western.

Para estudiar cambios en las cantidades de Lys21p y de Lys20p se realizaron inmuno-detecciones tipo Western Blot, se usaron cultivos con 50 ml de medio mínimo y células en fase exponencial de crecimiento (O.D.₆₀₀ 0.4-0.6). Se obtuvieron extractos crudos, los cuales se cargaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida, posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La incubación con anticuerpos se realizó como lo describe Towbin (79), como anticuerpo primario se usó el anticuerpo monoclonal comercial

31F5 obtenido de ratón comprado a la compañía EnCor Biotechnology Inc., para obtener señales claras (especialmente de Lys20p la cual es muy escasa), se usó el anticuerpo primario a la dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se usó un anti-ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:1000.

Extracción y medición de metabolitos intracelulares.

Los extractos para la medición de lisina y α -KG intracelulares se realizaron siguiendo el protocolo reportado por González *et al* (80). Para determinar la cantidad total de lisina intracelular se usaron 15 ml de cultivo en fase exponencial (O.D.₆₀₀ 0.4-0.6) en medio mínimo, los cuales se mezclaron con 15 ml de metanol al 60 % amortiguado con Hepes 70 mM pH 7.5 pre-enfriado a -70°C. La temperatura final de la mezcla fue de -20°C. Este procedimiento permitió detener las reacciones metabólicas rápidamente para que no cambiaran las pozas de metabolitos durante el procedimiento de recolección de las células. La mezcla cultivo-metanol se mantuvo a -70°C durante 10 minutos después de los cuales se centrifugó 5 min a 3000 rpm a 2°C. La temperatura final después de la centrifugación fue de -13°C. El sobrenadante fue deshechado y el pellet se guardó a -70°C hasta el momento de la extracción. Las muestras para medir las pozas de α -KG fueron de 100 ml de cultivo los cuales se mezclaron con 130 ml de metanol amortiguado frío. La extracción se efectuó mezclando el pellet con 5 ml de etanol al 75% amortiguado con Hepes 250 mM, la suspensión celular se mantuvo en baño maría por 4 min y después de enfriarse en hielo, se secó en vacío a 45 °C por 4 hrs. El residuo se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se centrifugó 15 min a 13000 rpm y 4°C, el sobrenadante se usó para la determinación de metabolitos.

Las muestras para determinar lisina intracelular fueron desproteinizadas con ácido perclórico. La lisina se midió mediante HPLC con una columna Ultrasphere ODS C18 column (Beckman Coulter). Mediante fluorescencia se detectaron los derivados de los aminoácidos con OPA. La fase móvil fue 75 % metanol y 25 % un amortiguador de acetato de potasio 0.1M pH 5.5, esta mezcla fluía a 1.5 ml/min.

La determinación de α -KG se realizó con la técnica reportada por González *et al* (80). Los datos

se normalizaron dividiéndolos entre los mg de peso seco que correspondían a las muestras de acuerdo a una curva de calibración que relacionaba D.O.₆₀₀ con peso seco. Este procedimiento de extracción no degrada la Lys ni el α -KG, soluciones de estos metabolitos sometidas a este procedimiento de extracción indicaron que la pérdida de lisina es menor al 2% y la de α -KG es menor al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización cinética de la proteína Lys21p.

El principal objetivo de este estudio fue determinar las razones por las cuales se mantuvieron en el genoma de *S. cerevisiae* dos genes que codifican para isoformas de homocitrato sintasa. Nuestra hipótesis es que se han mantenido debido a que después de que se duplicó el gen ancestral, las dos nuevas copias acumularon mutaciones al grado que perdieron ciertas características del gen original y para cumplir la función completa son necesarios ambos genes duplicados. Para conocer cuáles son esas funciones que mantuvieron los genes *LYS20* y *LYS21*, se comparó la fisiología de mutantes con la de la cepa silvestre y también se compararon las propiedades cinéticas de las isoformas. En este primer apartado de resultados se muestra que las homocitrato sintasas de *S. cerevisiae* son muy diferentes en sus propiedades cinéticas: Lys21p es más sensible a la inhibición por lisina que Lys20p, además, Lys21p presenta cooperatividad por la unión de α -KG en presencia de concentraciones de lisina menores a 0.5 mM, mientras que Lys20p no es una enzima cooperativa. Debido a estas diferencias, la capacidad de producción de homocitrato de Lys20p en la célula es mayor que la de Lys21p. En este trabajo sólo determinamos las propiedades cinéticas de la isoforma Lys21p ya que la isoforma Lys20p es muy inestable y no logramos estabilizarla. Las comparaciones del comportamiento cinético de las isoformas se hicieron usando los parámetros cinéticos y la ecuación de velocidad reportados para Lys20p (51). En el segundo apartado de resultados se muestra que la regulación de la actividad de las isoformas es diferente durante el metabolismo fermentativo y el respiratorio, en esta última condición, la isoforma predominante es Lys21p, lo cual permite balancear el uso de sustratos entre la biosíntesis de lisina y otros procesos metabólicos.

Estabilización de Lys21p.

Ambas isoformas de homocitrato sintasa son inestables. En extractos crudos la actividad específica de homocitrato sintasa es constante por lo menos 4 horas si se mantienen los tubos en hielo. Sin embargo cuando se intentó purificarlas por HPLC mediante una cromatografía de exclusión molecular (usando la resina Superdex S-200 empacada en una columna de

15X300mm), se separaron las homocitrato sintasas de los metabolitos y de otras proteínas y se observó que las actividades de Lys20p y Lys21p disminuían en el tiempo. Este efecto fue mas drástico para la isoforma Lys20p, al inyectar al HPLC extractos crudos obtenidos de la cepa que sobreexpresa al gen *LYS20* cultivada en glucosa, las fracciones en las que eluyó esta proteína tenían una actividad apenas detectable, la cual desaparecía en menos de una hora aunque los tubos se mantuvieran en hielo. Esta alta labilidad de la proteína Lys20p nos impidió su caracterización. Cuando se realizó la cromatografía con extractos de la cepa que sobreexpresa al gen *LYS21* cultivada en glucosa, las fracciones en las que eluía esta proteína tenían mucho más actividad que aquellas correspondientes a la proteína Lys20p, pero también reducían su actividad con el tiempo.

Si se congelaban los extractos crudos por 24 horas, las isoformas Lys20p y Lys21p reducían su actividad en un 40% aproximadamente comparada con la actividad de los extractos antes de ser congelados. Esto también ocurría en las fracciones con la proteína Lys21p obtenidas por la cromatografía de exclusión molecular.

Está reportada la estabilización de la isoforma Lys20p con una mezcla de 100mM de α -ciclodextrina, 100 mM de cloruro de guanidino y 600 mM de sulfato de amonio (65). Esta preparación no estabilizó a Lys21p en las fracciones obtenidas por la cromatografía de exclusión molecular. Es interesante mencionar que esta isoforma fue activada por la mezcla estabilizadora reportada por Andi *et al.* (65); probablemente el ión amonio funciona como activador como lo es para la proteína Lys20p (51). Intentamos estabilizar la isoforma Lys21p con diferentes porcentajes de glicerol, trehalosa y de albúmina de suero bovino, sólo si se mantenía en trehalosa a una concentración final de 1M se lograba mantener constante la actividad. En la figura 3 se muestra la comparación de las actividades a lo largo del tiempo con y sin trehalosa 1M.

Debido a que en ausencia de trehalosa se perdía la actividad de Lys21p, no se realizó otro paso de purificación. Con la filtración en gel por HPLC se separó la proteína Lys21p de los metabolitos presentes en el extracto crudo y de algunas proteínas. Esta preparación permitió caracterizar cinéticamente a la isoforma Lys21p ya su actividad no era influenciada por las otras

proteínas presentes ni por algún sustrato o efector alostérico. La razón de purificación de la enzima Lys21p fue de 5 veces.

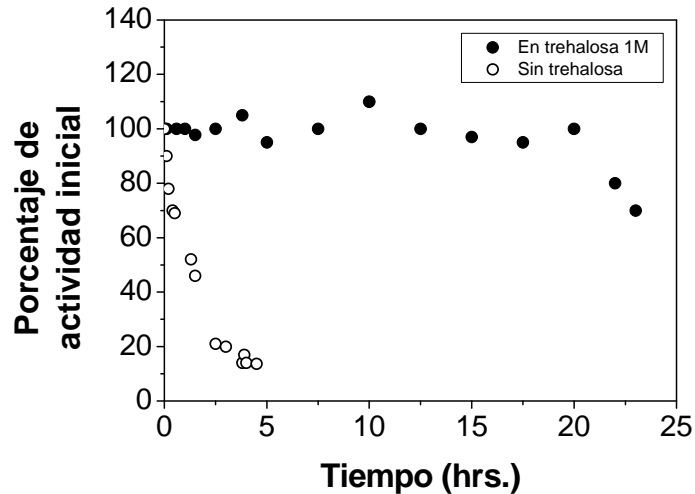


Figura 3. Estabilización con trehalosa de Lys21p. El extracto crudo de la cepa CLA1-D-21M cultivada en glucosa fue inyectado a una columna de separación por exclusión molecular mediante HPLC. La fase móvil fue HEPES 50 mM pH 7.3, las fracciones con mayor actividad de Lys21p fueron separadas en dos alícuotas, una se estabilizó mezclándola con una solución de trehalosa 2M en relación 1:1 para que la concentración final de trehalosa fuera de 1M (●), la otra alícuota solo se mantuvo en hielo (○).

Caracterización cinética de Lys21p en ausencia de lisina.

Con la preparación estabilizada de Lys21p se realizaron ensayos en los que se midió la velocidad inicial de reacción. En ausencia de lisina la isoforma Lys21p presenta una cinética Michaeliana para ambos sustratos. En el panel A de la figura 4 se muestran las hipérbolas que se obtuvieron al variar α -KG a diferentes concentraciones fijas de AcCoA. Al variar AcCoA a diferentes concentraciones fijas de α KG se obtuvieron las hipérbolas que se muestran en el panel B. El valor de $K_m \alpha KG$ fue independiente de la concentración de AcCoA y viceversa, por ello las rectas de la gráfica de dobles recíprocos se intersectan en el mismo punto sobre el eje de las abscisas (gráficas pequeñas insertadas). La $K_m \alpha KG$ fue de 3 mM y la $K_m AcCoA$ fue de 0.019 mM.

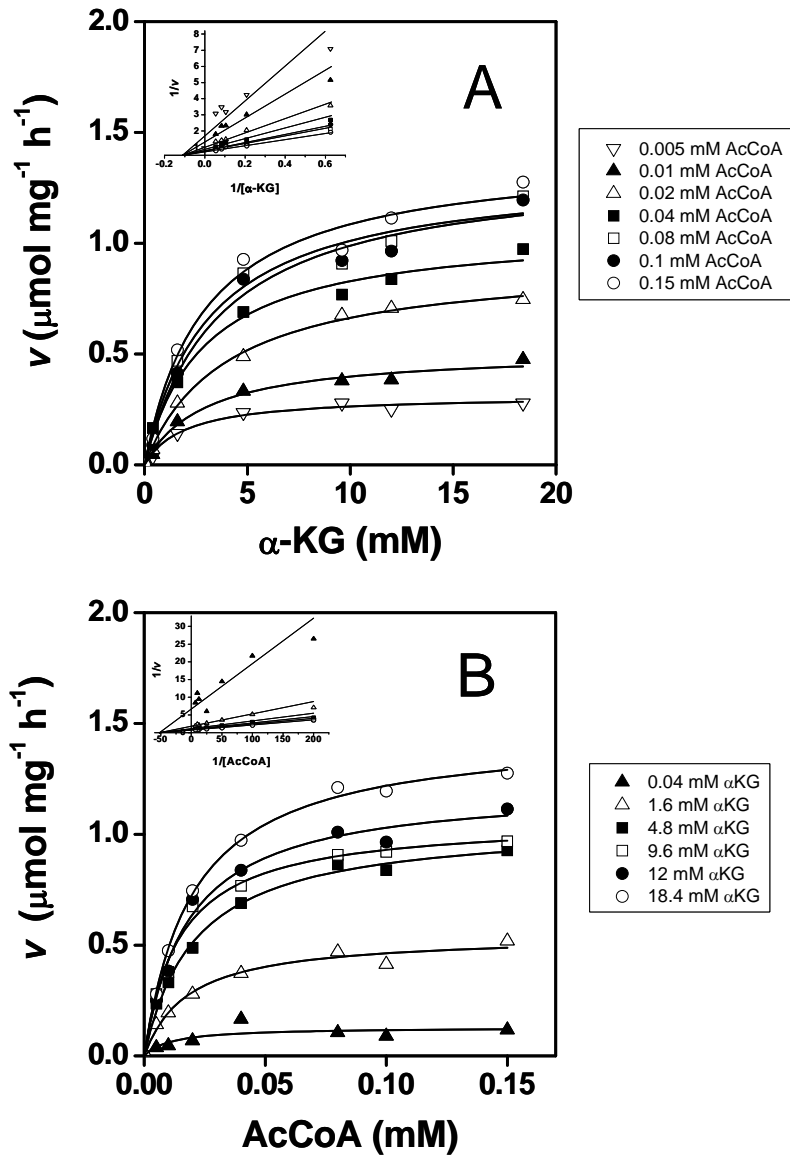


Figura 4. Lys21p en ausencia de lisina presenta una cinética Michaeliana. Panel A, velocidades iniciales que se obtuvieron al variar α -KG a concentraciones fijas de AcCoA. Panel B, velocidades iniciales obtenidas al variar AcCoA a concentraciones fijas de α -KG. Las gráficas insertadas representan los dobles recíprocos de los datos mostrados en las hipérbolas.

La enzima Lys21p no estabilizada en trehalosa también presentó una cinética hiperbólica para ambos sustratos. Los ensayos enzimáticos en los que se utilizó la enzima estabilizada se realizaron a una concentración final de 100 mM de trehalosa, esta concentración tiene un leve

efecto inhibitorio a bajas concentraciones de α -KG. Para la enzima estabilizada, los parámetros cinéticos fueron: $K_m \alpha\text{-KG}$ 9 mM, $K_m \text{AcCoA}$ 0.019 mM y V_{\max} 1.5 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Para la enzima sin estabilizar, los valores fueron: $K_m \alpha\text{-KG}$ 3.7 mM, $K_m \text{AcCoA}$ 0.017 mM y V_{\max} 1.4 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Las mediciones de actividad de la enzima sin estabilizar se hicieron inmediatamente después de que la enzima eluyó de la cromatografía de exclusión molecular. Las diferencias en los parámetros cinéticos son pequeñas por lo que se consideró que la enzima estabilizada podía ser caracterizada cinéticamente con más detalle como se describe en el siguiente inciso.

Efecto de la lisina sobre la actividad de Lys21p cuando se varía la concentración de α -KG.

El efecto inhibitorio de la lisina sobre Lys21p y Lys20p fue comparado por Feller *et al* (50), estos autores determinaron que la isoforma Lys21p era mas sensible a la inhibición que Lys20p, sin embargo su estudio del efecto inhibitorio se limitó a determinar la $I_{0.5}$ en extractos crudos, la cual para Lys21p fue de 0.15 mM y para Lys20p de 1.0 mM. El valor $I_{0.5}$ por si solo no es un buen parámetro para comparar la sensibilidad a la inhibición ya que este valor cambia con la concentración de sustrato dependiendo del tipo de inhibición (81). El parámetro correcto para comparar la sensibilidad a un inhibidor es K_i . La lisina es un inhibidor competitivo por la unión de α -KG que no induce cooperatividad para la isoforma Lys20p (51) con una K_i de 0.55 mM, ésta enzima es hiperbólica y su afinidad por los sustratos en ausencia de lisina es similar a la de Lys21p. Los valores de K_m para Lys20p son: $K_m \alpha\text{-KG}$ 4.6 mM y $K_m \text{AcCoA}$ 0.008 mM (51).

Utilizando la preparación estabilizada de Lys21p se determinó que la lisina es un inhibidor alostérico que induce cooperatividad por la unión de α -KG. La constante de inhibición (K_i) es de 0.05 mM. El efecto inhibitorio de la lisina consiste en la reducción de la velocidad máxima y de la afinidad de la enzima por α -KG, además de la inducción de cooperatividad positiva. En el panel A de la figura 5 se muestran mediciones de velocidades iniciales con concentraciones variables de α -KG y lisina a una concentración fija de AcCoA equivalente a 10 $K_m \text{AcCoA}$. Las líneas fueron trazadas con ajustes a la ecuación de Hill (81) para cada concentración de lisina. De dichos ajustes se obtuvieron los parámetros velocidad máxima (V_{\max}), el valor $S_{0.5}$ (el cual es un valor inversamente proporcional a la afinidad aparente de la enzima por el sustrato) y el número de Hill (h) el cual es un índice de cooperatividad. En el panel B de la figura 5 se muestran los

regráficos para la V_{\max} y la $S_{0.5}$ en función de la concentración de lisina, para efectos de claridad en esta figura los valores fueron normalizados dividiéndolos entre los obtenidos en ausencia de inhibidor (V'_{\max} y $S'_{0.5}$). Es evidente que el inhibidor reduce la V_{\max} y que este parámetro tiende a un valor mínimo diferente de cero por lo que el tipo de inhibición es una inhibición parcial, también conocida como hiperbólica (81). El inhibidor también disminuye la afinidad de la enzima por el α -KG, lo cual se ve reflejado en el incremento de la $S_{0.5}$. La inducción de cooperatividad por la unión de α -KG se ve reflejada en valores de h mayores a 1 en presencia de lisina (panel C de la figura 5). Sin inhibidor no se observa cooperatividad, el valor de h es de 1. En presencia de lisina aparece cooperatividad la cual alcanza un máximo a 0.12 mM, a concentraciones mayores se reduce para finalmente desaparecer a concentraciones saturantes (mayores a 0.6 mM).

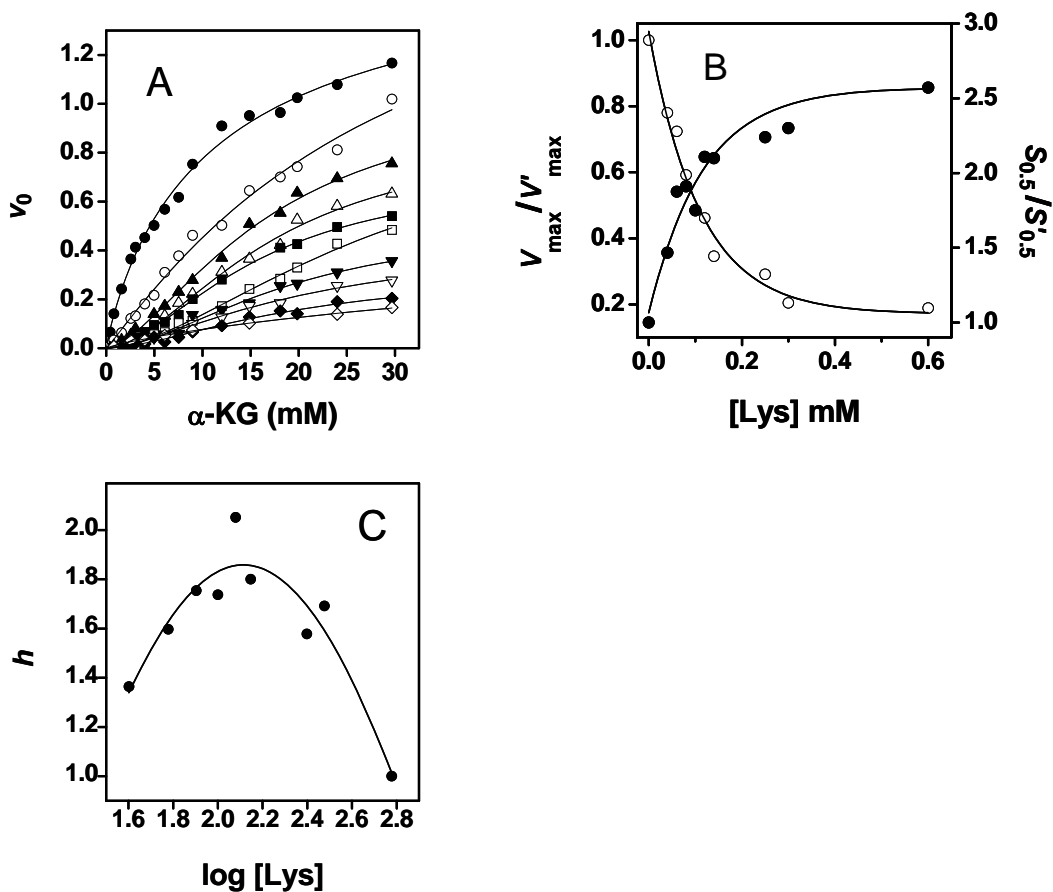


Figura 5. Efecto de la lisina sobre los parámetros cinéticos de Lys21p cuando el sustrato variable es α -KG. Panel A, ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Hill. v_0 , velocidad inicial en $\mu\text{mol h}^{-1}$

mg⁻¹. Las concentraciones de lisina en mM fueron 0.0, (●); 0.04, (○); 0.06, (▲); 0.08, (△); 0.1 (■); 0.12, (□); 0.14, (▼); 0.25, (▽); 0.30, (◆) y 0.6, (◇). Panel B, gráficos de los valores normalizados de velocidad máxima (V_{\max}) (○) y $S_{0.5}$ (●) en función de la concentración de lisina, (V'_{\max} y $S'_{0.5}$ representan los valores obtenidos en ausencia de inhibidor). Panel C, gráfico del número de Hill (h). En el panel C los logaritmos se calcularon con la lisina en μM .

Los valores de h más altos fueron cercanos a 2, ello sugiere que la estructura cuaternaria de Lys21p es de un oligómero con al menos dos subunidades, quizás Lys21p sea un tetrámero.

Análisis de la inhibición por lisina de Lys21p mediante el Modelo de Monod-Wyman-Changeux.

Para entender mejor el comportamiento cinético de Lys21p se utilizó el modelo alostérico de Monod, Wyman y Changeux (82). Con este análisis se obtuvo una constante microscópica de disociación para la lisina (K_I) lo cual permitió caracterizar de una manera cuantitativa el grado de inhibición. Además, se describió a Lys21p como una enzima con dos conformaciones en equilibrio, cada una con propiedades cinéticas distintas, una conformación llamada R, es la que presenta la enzima en ausencia del inhibidor. Esta forma tiene alta afinidad por α -KG y el número de eventos catalíticos que realiza por unidad de tiempo (k_{cat}) es mayor que los de la enzima en la conformación T. La forma T tiene menor afinidad por α -KG. Estas formas de la enzima existen en un equilibrio y en ausencia de ligandos (sustratos o efectores alostéricos) este equilibrio se describe con la constante L_0 , $L_0=T_0/R_0$, donde T_0 y R_0 son las concentraciones de enzima en las formas T y R respectivamente. La lisina desplaza este equilibrio hacia la forma T de modo que en ausencia de lisina, Lys21p se encuentra predominantemente en la forma R, y a concentraciones saturantes del inhibidor, la enzima está predominantemente en la conformación T. Si se asume que la lisina se une solamente a la conformación T, se logra un buen ajuste global de los datos experimentales a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V \left[L_0 \left(1 + \frac{[Lys]}{K_I} \right)^n g c \frac{[\alpha KG]}{K_R} \left(1 + c \frac{[\alpha KG]}{K_R} \right)^{n-1} + \frac{[\alpha KG]}{K_R} \left(1 + \frac{[\alpha KG]}{K_R} \right)^{n-1} \right]}{L_0 \left(1 + \frac{[Lys]}{K_I} \right)^n \left(1 + c \frac{[\alpha KG]}{K_R} \right)^n + \left(1 + \frac{[\alpha KG]}{K_R} \right)^n} \quad \text{Ecuación 1.}$$

En esta ecuación K_R es la constante de disociación del α -KG de la forma R. K_I es la constante de disociación de la lisina de la forma T. El valor c es el cociente de las constantes de disociación de α -KG de la forma R y T ($c = K_R / K_T$). El valor g es el cociente de las constantes catalíticas de la forma T y R ($g = k_{cat}^T / k_{cat}^R$). L_0 es la constante de equilibrio de la conversión de las formas R y T cuando no tienen unidos sustratos ni lisina ($L_0 = T_0 / R_0$) y n es el número de subunidades de Lys21p. El ajuste de los datos experimentales se logró con los siguientes valores: $L_0 = 0.8 \pm 0.2$, $K_R = 7.8 \pm 0.4$ mM, $K_I = 0.053 \pm 0.005$ mM, $g = 0.24 \pm 0.02$, $c = 0.28 \pm 0.01$ y $n = 4$.

Los valores obtenidos del ajuste nos proporcionan información acerca de la proteína Lys21p. El valor de L_0 es cercano a 1, lo cual indica que en ausencia de ligandos existen en equilibrio cantidades aproximadamente iguales de los dos conformeros T_0 y R_0 , pero con un ligero predominio de la forma R. El valor de K_R es muy parecido al obtenido por el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten de la enzima estabilizada en ausencia de lisina (9 mM). Como se esperaba, la constante de disociación de la lisina fue menor que la K_I reportada para Lys20p (51), de hecho ésta última tiene un valor un orden de magnitud mayor, esto coincide con el hecho de que Lys21p es más sensible a la inhibición por lisina que Lys20p. La constante de disociación determinada para Lys21p corresponde a una inhibición alostérica y la de Lys20p a una inhibición competitiva; dada la diferente naturaleza de estas constantes, no pueden compararse directamente; sin embargo, el hecho de que sus valores sean tan diferentes indica que la lisina inhibe más fuertemente a Lys21p. El valor de g muestra que la capacidad catalítica de la forma T es 4 veces menor que la de la forma R, lo cual es similar a la reducción en la V_{max} de 5 veces que resulta de los ajustes a la ecuación de Hill. El valor de c indica que la afinidad por α -KG de la forma R es 3.5 veces mayor que la de la forma T ($K_T = 27.8$ mM), este valor también es cercano al obtenido por los ajustes a la ecuación de Hill en donde se obtuvo un incremento de $S_{0.5}$ de 2.5 veces.

En el panel A de la figura 6 se muestran las velocidades iniciales de Lys21p a concentraciones variables de α -KG y lisina a una concentración fija de AcCoA equivalente a 10 veces la K_{mAcCoA} . Las líneas fueron trazadas mediante el ajuste global de los datos a la ecuación 1. Para efectos de

comparación, las velocidades iniciales (v) se muestran como fracciones de la velocidad máxima que se alcanza en ausencia del inhibidor (V'_{\max}).

Para comparar el efecto inhibitor de la lisina sobre la actividad de las isoformas de homocitrato sintasa se simuló el comportamiento de Lys20p a las mismas concentraciones de sustratos e inhibidor que las que se usaron para Lys21p en el experimento del panel A de la figura 6. Dicha simulación se muestra en el panel B. Se utilizó la ecuación 2 con los siguientes parámetros: $V_{\max} = 3.37 \mu\text{M}/\text{min}$, $K_{\text{AcCoA}} = 0.008 \text{ mM}$, $K_{\alpha\text{-KG}} = 4.6 \text{ mM}$, $K_{i\alpha\text{-KG}} = 10.3 \text{ mM}$ y $K_{\text{Lys}} = 0.55 \text{ mM}$. La ecuación 2 y los parámetros cinéticos para Lys20p son los reportados por Andi *et al* (51). Resulta evidente que la isoforma Lys20p es menos sensible a la inhibición por lisina.

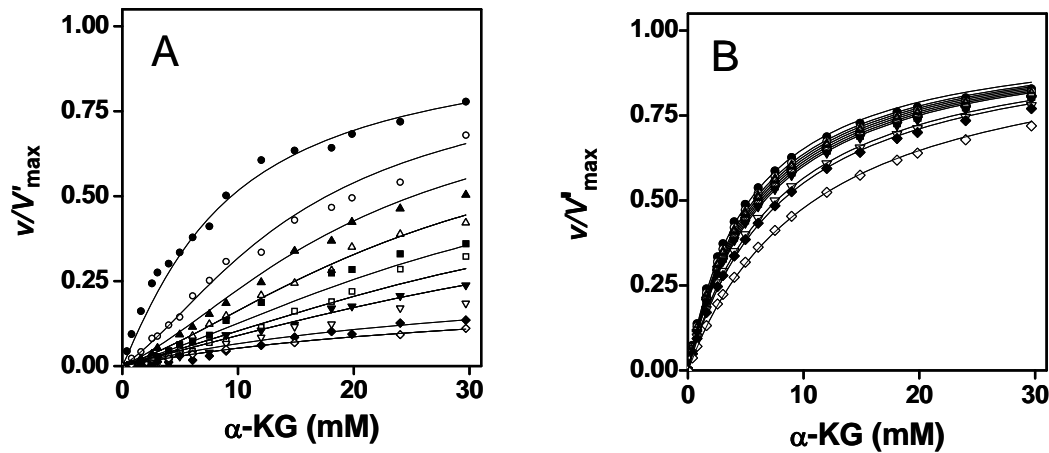


Figura 6. Comparación del efecto inhibitor de la lisina sobre las isoformas Lys21p y Lys20p. Las gráficas muestran las curvas de saturación de α -KG para Lys21p (A) y Lys20p (B). Las líneas en A fueron trazadas mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. Las líneas y puntos en B fueron simulados usando la ecuación 2. Para fines de comparación, las velocidades iniciales (v) se dividieron entre la velocidad máxima alcanzada en ausencia de inhibidor (V'_{\max}). Las concentraciones de lisina en mM fueron: 0.0, (\bullet); 0.04, (\circ); 0.06, (\blacktriangle); 0.08, (\triangle); 0.1 (\blacksquare); 0.12, (\square); 0.14, (\blacktriangledown); 0.25, (\triangledown); 0.30, (\blacklozenge) y 0.6, (\lozenge).

$$v = \frac{V_{\max} \alpha\text{-KG} \text{ AcCoA}}{\left[(K_{i\alpha\text{-KG}} K_{\text{AcCoA}} + K_{\alpha\text{-KG}} \text{ AcCoA}) \left(1 + \frac{\text{Lys}}{K_{\text{Lys}}} \right) \right] + [K_{\text{AcCoA}} \alpha\text{-KG}] + [\alpha\text{-KG} \text{ AcCoA}]} \quad \text{Ecuación 2}$$

En la ecuación 2, v es la velocidad inicial; V_{\max} , es la velocidad máxima; α -KG, es la concentración de α -KG; AcCoA, es la concentración de AcCoA; $K_{i\alpha\text{-KG}}$, es la constante de inhibición por α -KG; K_{AcCoA} , es la constante de afinidad por AcCoA; $K_{\alpha\text{-KG}}$, es la constante de afinidad por α -KG; Lys, es la concentración de lisina y K_{Lys} , es la constante de inhibición por lisina.

Efecto de la lisina sobre la actividad de Lys21p cuando se varía la concentración de AcCoA.

Si la concentración de α -KG se mantiene fija y se varían las concentraciones de AcCoA y lisina, Lys21p se comporta como una enzima Michaeliana y la lisina como un inhibidor que reduce la V_{\max} y la $K_{\text{m AcCoA}}$. En el panel A de la figura 7 se muestran las curvas de saturación de AcCoA a diferentes concentraciones de lisina. Para efectos de comparación, las velocidades iniciales (v) se dividieron entre la velocidad máxima que alcanza la enzima en ausencia del inhibidor (V'_{\max}). Los parámetros cinéticos en ausencia de lisina fueron: $K_{\text{m AcCoA}}$ 0.0192 mM y V'_{\max} 1.9 $\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. En el panel B de la figura 7 se muestran los regráficos de V_{\max} y $K_{\text{m AcCoA}}$ como función de las concentraciones de lisina. Los valores fueron normalizados a los obtenidos en ausencia de inhibidor. Se observa que el efecto de la lisina consiste en reducir ambos parámetros, por lo que la lisina se comporta como un inhibidor mixto de predominio incompetitivo (81). En el panel C de la figura 7 se muestra la simulación de las velocidades iniciales para Lys20p, para crear esta figura se usó la ecuación 2, los parámetros cinéticos reportados (51) y las mismas concentraciones de sustratos e inhibidor que las que se usaron para Lys21p en el experimento del panel A. Comparando los paneles A y C resulta claro que Lys21p es mas sensible a la inhibición por lisina que Lys20p.

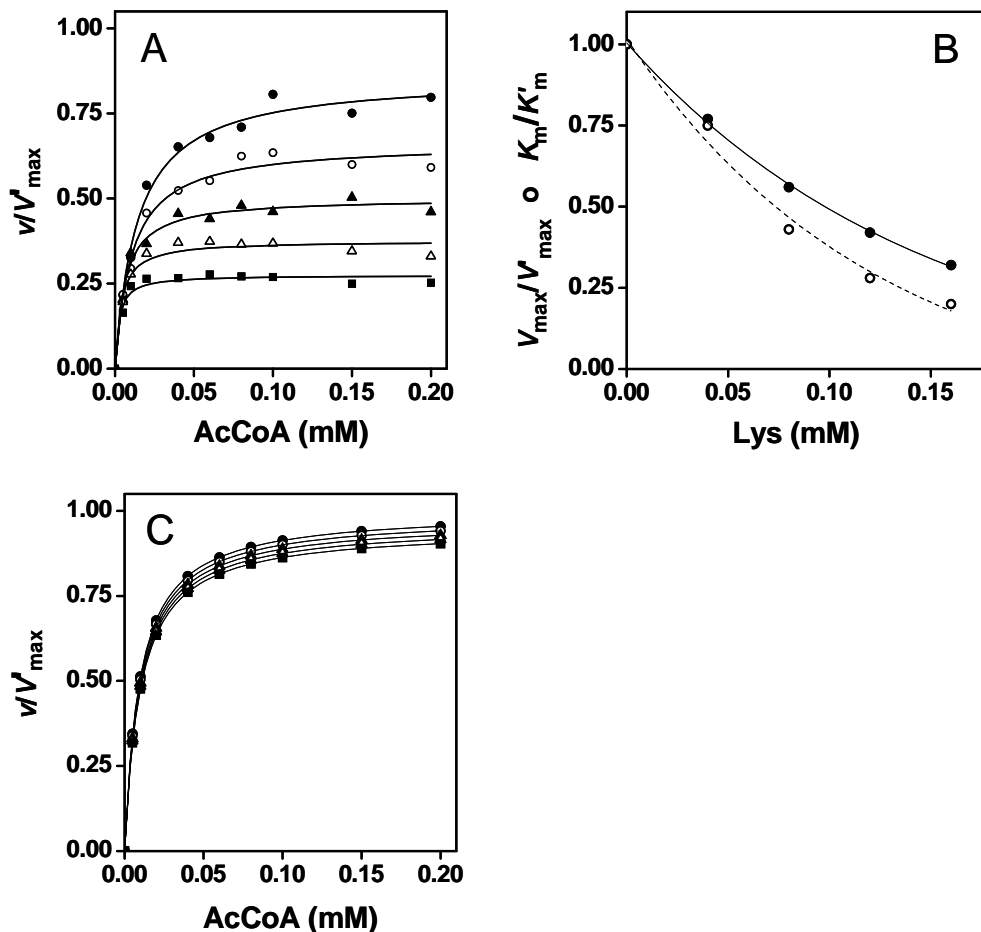


Figura 7. Efecto de la lisina sobre los parámetros cinéticos de Lys21p cuando el sustrato variable es AcCoA. Panel A, curvas de saturación de Lys21p a diferentes concentraciones de lisina, las líneas fueron trazadas mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten. Panel B, regráficos de V_{\max} (●) y K_m AcCoA (○) en función de la concentración de lisina, los valores se muestran como fracciones del valor obtenido en ausencia de inhibidor (V'_{\max} y K'_m). Panel C, curvas de saturación de Lys20p, las líneas y puntos fueron simulados usando la ecuación 2. En los paneles A y C las velocidades iniciales (v) se dividieron entre la velocidad máxima alcanzada en ausencia de inhibidor (V'_{\max}) y las concentraciones de lisina en mM fueron: 0.0 (●); 0.04 (○); 0.08 (▲); 0.12 (△) y 0.16 (■).

Ventajas de la cooperatividad en el control por retroinhibición.

La retroinhibición permite controlar el flujo a través de una vía metabólica cuando ya no es necesario sintetizar más del producto final. Frecuentemente las enzimas que son blanco de esta

inhibición son las primeras de la vía y las primeras enzimas después de una ramificación que conduce al producto inhibidor. Muchas veces la inhibición es alostérica ya que el producto final tiene poca similitud estructural con los sustratos por lo que no podría realizar una inhibición competitiva típica. Es común que las enzimas sensibles a inhibidores alostéricos presenten cooperatividad por la unión de alguno de los sustratos (83 y 84). La ventaja de que el inhibidor induzca cooperatividad es que a concentraciones bajas de sustrato y en presencia del inhibidor, la enzima es muy poco activa y deja los sustratos disponibles para otros procesos metabólicos. En el panel A de la figura 6, se puede apreciar que en presencia de lisina, Lys21p es muy poco activa a concentraciones menores a 4 mM de α -KG, en la célula esta inhibición puede ser un mecanismo para permitir que este intermediario sea usado por otros procesos como el ciclo de Krebs. Si la cinética de Lys21p no fuese sigmoideal sino hiperbólica y la inhibición por lisina fuese competitiva con el mismo valor de K_I , a concentraciones menores a 4mM de α -KG la enzima tendría mayor actividad.

Durante el crecimiento de la levadura en fuentes de carbono no fermentables, el ciclo de Krebs es muy activo; el α -KG es un intermediario de esta vía y su utilización en rutas biosintéticas debe ser cuidadosamente controlado. En la biosíntesis de lisina este control lo realiza Lys21p ya que es la isoforma predominante (ver mas adelante). Su fuerte inhibición por lisina y la inducción de cooperatividad reducen el uso de α -KG cuando este metabolito es escaso y hay suficiente lisina; en el caso de que la célula se viera expuesta a una limitación de este aminoácido, la actividad de Lys21p se incrementaría ya que se comportaría como una enzima hiperbólica y usaría ávidamente el α -KG para producir homocitrato. Dada la baja sensibilidad a inhibición por lisina de Lys20p, en condiciones respiratorias, una alta actividad de esta isoforma produciría mucho homocitrato y el alto consumo de α -KG podría comprometer la disponibilidad de este intermediario para otros procesos metabólicos.

Control de la biosíntesis de lisina en Saccharomyces cerevisiae.

Se ha reportado que la biosíntesis de lisina es modulada in vivo por la poza intracelular de α -KG (51 y 52) y se considera que las homocitrato sintasas son la etapa limitante en la vía de producción de lisina (38). Por lo anterior y por nuestros resultados podemos decir que la

biosíntesis de lisina esta controlada por la cantidad de homocitrato sintasas activas y por las pozas citosólicas de α -KG y de Lisina. La concentración de AcCoA es poco probable que module la actividad de estas enzimas ya que en la célula se encuentra en concentraciones saturantes (85). La activación por cationes monovalentes se ha reportado para Lys20p (51), es probable que en la célula también la actividad de Lys21p sea activada, especialmente por potasio ya que la concentración de este ión es mayor que la del sodio (86). Durante las pruebas de estabilización de Lys21p, se probó una preparación que contenía 60 mM de sulfato de amonio la cual tuvo un efecto activador; pero la modulación de esta isoforma por cationes monovalentes no ha sido estudiada aún.

Si bien las homocitrato sintasas ejercen buena parte del control metabólico de la vía en esta levadura, es posible que otras enzimas también tengan control sobre el flujo de intermediarios, como ocurre en *Penicillium chrysogenum* (87).

Otras homocitrato sintasas

Además de Lys20p, se han reportado las propiedades cinéticas de dos homocitrato sintasas fúngicas: la de *Yarrowia lipolitica* (63) y una de las isoformas de *Penicillium chrysogenum* (64). Ambas enzimas son cooperativas. La de *Y. lipolitica* presenta cooperatividad por la unión de α -KG en presencia de lisina al igual que Lys21p, además su curva de saturación de AcCoA es sigmoideal en ausencia de lisina. La isoforma citosólica de *P.chrysogenum* presenta cooperatividad con respecto a la AcCoA y también se inhibe fuertemente por lisina de manera competitiva con respecto al α -KG ($K_I = 0.008$).

Sensibilidad a la retroinhibición por lisina de otras homocitrato sintasas.

En la tabla 3 se comparan las propiedades de las homocitrato sintasas para las que existen datos reportados. Si comparamos las K_I o las $I_{0.5}$ se puede ver que la sensibilidad a lisina es similar o mayor a la de Lys21p. Llama la atención la extremadamente baja sensibilidad de Lys20p a la lisina. Esto nos lleva a preguntarnos ¿Cuál es la función de una enzima tan insensible a su modulador? probablemente la respuesta sea precisamente la alta capacidad de producción de

homocitrato que resulta de esa baja sensibilidad. Probablemente la función de Lys20p sea la de permitir una alta producción de lisina bajo ciertas condiciones. Dado que la actividad de Lys20p no se puede controlar por retroinhibición y, como veremos mas adelante, tampoco se controla modulando la transcripción del gen *LYS20*, la célula utiliza un mecanismo post-transcripcional para limitar la cantidad de esta isoforma.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i> Citosólica	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
	Lys20p	Lys21p			
$K_m \alpha\text{KG}$ (mM)	4.6	7.8	2.2	1.7	0.044
$K_m \text{AcCoA}$ (mM)	0.08	0.019	Sigmoidal $h=2.6$ $S_{0.5}=0.041$ mM	Sigmoidal $h=1.6$ $S_{0.5}=0.13$ mM	0.032
k_{cat} min^{-1}	37				92
K_{ILys} (mM)	0.55	0.053	0.008		0.0094
$I_{0.5 \text{Lys}}$ (mM)	1	0.15	0.053	0.3	
Inhibición por lisina	Competitiva con αKG	Alostérica de tipo mixto $K-V$. Lys induce cooperatividad	Competitiva con αKG	Competitiva con αKG . Lys induce cooperatividad	Competitiva con αKG
M_r del monómero (KDa)	47	48.6	54		46
Forma multimerica	Monómero, dímero, tetramero y otras mayores	Probablemente tetramero	Probablemente tetramero.		Monómero

Tabla 3. Comparación de diferentes homocitrato sintasas. Los datos de Lys21p se tomaron del presente trabajo, excepto la $I_{0.5}$ que se tomó de la referencia 50. Los datos de las otras enzimas se tomaron de las siguientes referencias: para Lys20p, 50 y 51, para *P.chrysogenum*, 64, para *Y. lipolytica*, 63 y para *T. thermophilus*, 66.

2. Caracterización fenotípica de las mutantes.

En este apartado de resultados se compararan algunas características de la fisiología de mutantes en los genes *LYS20* y *LYS21* con la cepa silvestre, estos resultados indican que: i) la ausencia de Lys21p provoca una reducción en la velocidad de crecimiento durante el metabolismo respiratorio pero no durante el fermentativo, ii) Lys20p está sujeta a un mecanismo de regulación

postranscripcional que reduce su concentración en la célula en condiciones respiratorias, ello provoca que Lys21p sea la isoforma predominante en estas condiciones de crecimiento y iii) ambas isoformas son necesarias para alcanzar los niveles silvestres de lisina intracelular tanto en condiciones respiratorias como fermentativas.

*Velocidad de crecimiento de las mutantes *lys20Δ* y *lys21Δ*.*

Para buscar datos que apoyaran la hipótesis de la subfuncionalización de los genes *LYS20* y *LYS21*, se midió la velocidad de crecimiento de las mutantes sencillas en medio mínimo. Se utilizó glucosa como fuente de carbono para estudiar los genes *LYS20* y *LYS21*, así como sus productos durante un metabolismo predominantemente fermentativo y también se utilizó etanol como fuente de carbono para realizar el estudio durante el metabolismo respiratorio.

En la tabla 4 se observa que, en medios con glucosa, las mutantes sencillas crecen a la misma velocidad que la cepa silvestre. Sin embargo, durante el crecimiento en medios con etanol como fuente de carbono, la mutante *lys21Δ* tuvo un decremento en la velocidad de crecimiento, esto indica que durante el metabolismo respiratorio es necesaria la presencia del gen *LYS21*. La reducción en la velocidad de crecimiento es del 16 %, si bien no es muy grande, sí es estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Cuando se adicionó lisina al medio (30 mg/L), la mutante *lys21Δ* creció a la misma velocidad que la cepa silvestre. La reducción en la velocidad de crecimiento se debe a la ausencia de *LYS21* como demuestra el hecho de que la complementación de la mutante *lys21Δ* con el gen *LYS21* a través de un plásmido monocopia crece a la misma velocidad que la cepa silvestre (ver cepas CLA1-2-20C1 y CLA1-2C en la tabla 4).

Si bien la reducción en la velocidad de crecimiento de la mutante *lys21Δ* en medio con etanol es tan solo del 16 % comparada con la silvestre, es significativo que la inactivación de uno de los genes de una pareja de duplicados tenga un fenotipo ya que esto indica que la otra copia no puede suplir la función por sí sola y por lo tanto es una señal de posible subfuncionalización. El hecho de que se recupere el crecimiento silvestre cuando se adiciona el medio con lisina sugiere

que la mutante *lys21Δ* no puede producir suficiente lisina y que, en estas condiciones, Lys20p no es suficientemente activa.

La doble mutante *lys20Δ lys21Δ* es auxótrofa de lisina como ya se había reportado (50), lo que indica que Lys20p y Lys21p son las únicas enzimas responsables de la producción de homocitrato y que no hay otra vía para sintetizar lisina.

Velocidad de crecimiento de la mutante doble lys20Δ lys21Δ transformada con plásmidos multicopia que contienen a los genes LYS20 o LYS21.

La cepa CLA1-D-21M contiene al gen *LYS21* en multicopia bajo el control de su propio promotor. La cepa CLA1-D-20M contiene al gen *LYS20* en multicopia bajo el control de su propio promotor y la cepa CLA1-D-Q10 contiene al gen *LYS20* en multicopia bajo el control del promotor del gen *LYS21*. La presencia de un mayor número de copias de los genes *LYS20* o *LYS21* provoca que los transcritos aumenten, por lo que se dice que estos genes se sobreexpresan.

En la tabla 4 se ve que la sobreexpresión de *LYS20* o de *LYS21* durante el crecimiento en glucosa no reduce la velocidad de crecimiento comparada con la cepa silvestre que contiene un plásmido multicopia sin gen de homocitrato sintasa clonado (CLA1-2M). Esto indica que un exceso de actividad de homocitrato sintasa durante el metabolismo fermentativo no es perjudicial.

En los cultivos con etanol como fuente de carbono, la sobreexpresión de ambos genes produjo una reducción en la velocidad de crecimiento y este efecto fue más intenso con la sobreexpresión de *LYS20* ya sea bajo el control de su propio promotor o con el promotor del gen *LYS21*. Este dato sugiere que bajo condiciones respiratorias la alta actividad de homocitrato sintasa tiene efectos adversos, estos efectos se eliminan cuando el medio de cultivo es adicionado con lisina (30 mg/L). Como se describirá mas adelante, la cantidad de lisina intracelular de las cepas que sobreexpresan a los genes *LYS20* o *LYS21* es mayor que las de la cepa silvestre (figura 8), de modo que su reducción en la velocidad de crecimiento no se debe a falta de lisina. El hecho de que con la adición de este aminoácido al medio se recupere la velocidad de crecimiento silvestre,

sugiere que la retroinhibición de las isoformas y/o la reducción en la transcripción de los genes limitan la actividad de homocitrato sintasa, permitiendo así que la velocidad de crecimiento se recupere y sea igual a la de la cepa silvestre.

Cepa	μ (h ⁻¹)	
	Glucosa	Etanol
CLA1-2 (<i>LYS21 LYS20</i>)	0.305 ±0.019	0.071 ±0.002
CLA1-2-21 (<i>LYS21 lys20 Δ</i>)	0.289 ±0.003	0.069 ±0.003
CLA1-2-20 (<i>lys21 Δ LYS20</i>)	0.284 ±0.007	0.060 ±0.003
CLA1-2-20 (<i>lys21 Δ LYS20</i>) + Lys ^a	0.310 ±0.012	0.073 ±0.002
CLA1-2C (CLA1-2/pRS316 (CEN <i>URA3</i>))	0.229 ±0.008	0.075 ±0.004
CLA1-2-20C1 (CLA1-2-20/pMON21 (<i>LYS21</i> CEN <i>URA3</i>))	0.238 ±0.004	0.071 ±0.005
CLA1-D (<i>lys21 Δ lys20 Δ</i>)	0.000	0.000
CLA1-D (<i>lys21 Δ lys20 Δ</i>) + Lys ^a	0.296 ±0.008	0.071 ±0.003
CLA1-2M (CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>))	0.233 ±0.001	0.068 ±0.003
CLA1-D-21M (CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>))	0.235 ±0.003	0.059 ±0.004
CLA1-D-20M (CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>))	0.221 ±0.002	0.049 ±0.004
CLA1-D-21M (CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)) +Lys ^a	0.239 ±0.004	0.069 ±0.007
CLA1-D20M (CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)) + Lys ^a	0.245 ±0.004	0.066 ±0.003
CLA1-D-Q10 (CLA1-D/pMULQ10 (5' <i>LYS21-LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>))	0.219 ±0.006	0.050 ±0.002

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento. Las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono indicada en la tabla. La velocidad de crecimiento se determinó durante la fase de crecimiento exponencial. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Lys^a indica que el medio fue adicionado con 30 mg/L de lisina.

La diferencia en los efectos de la sobreexpresión de las homocitrato sintasas durante los metabolismos respiratorio y fermentativo sugiere que un uso excesivo de los sustratos puede ser la causa de la reducción en la velocidad de crecimiento ya que tanto el α -KG como la AcCoA son intermediarios del ciclo de Krebs del cual depende la producción de energía durante el metabolismo respiratorio y no durante el fermentativo. Otra diferencia interesante es que la sobreexpresión de *LYS20* produjo una reducción en la velocidad de crecimiento mayor que la que produjo la sobreexpresión de *LYS21*, esto sugiere que Lys20p es mas activa que Lys21p y que probablemente esté consumiendo más sustratos para la producción de lisina y limitando de

manera más severa el abastecimiento de alguno de los sustratos hacia el metabolismo de generación de energía o hacia otros procesos metabólicos.

Contenido de lisina intracelular de las mutantes lys20Δ y lys21Δ.

Para comprobar que la deficiencia en crecimiento de la mutante *lys21Δ* durante el metabolismo respiratorio se debía a falta de lisina, se determinaron las pozas intracelulares de este aminoácido, los resultados se muestran en la figura 8. Se observa que las dos mutantes sencillas tienen menos lisina que la cepa silvestre en ambas fuentes de carbono, por lo tanto, ambas isoformas son activas y necesarias durante el metabolismo fermentativo y el respiratorio. A pesar de tener menor poza de lisina que la cepa silvestre, las mutantes sencillas no ven reducida su velocidad de crecimiento durante el cultivo en glucosa, esto indica que los niveles de lisina que alcanzan las mutantes son suficientes para suplir la demanda de este aminoácido y además que la cepa silvestre produce un exceso de lisina. La mutante *lys20Δ* cultivada en etanol tiene un comportamiento similar, produce menor cantidad de lisina que la cepa silvestre pero no presenta reducción en la velocidad de crecimiento, la lisina que produce es suficiente.

Los datos de la figura 8 indican que en ambas fuentes de carbono, la cepa silvestre produce un exceso de lisina. Es interesante que las células de levadura almacenen una reserva de lisina en la vacuola (55) aunque no puedan utilizar este aminoácido como fuente de carbono ni de nitrógeno (56), probablemente la lisina acumulada resulte útil bajo condiciones de estrés (57-59).

La mutante *lys21Δ* cultivada en etanol presenta la menor poza de lisina, lo que apoya la idea de que su deficiencia en crecimiento se debe a la capacidad insuficiente de biosintetizar este aminoácido. El contenido de lisina de esta mutante durante el cultivo en etanol, apenas es menor que el que presenta durante el cultivo en glucosa y sin embargo, en glucosa no hay reducción en el crecimiento. Probablemente exista un nivel mínimo de lisina necesaria para mantener una velocidad de crecimiento como la de la cepa silvestre, la mutante *lys21Δ* cultivada en etanol, probablemente esté por debajo de ese valor. La poza de lisina de la mutante *lys21Δ* cultivada en etanol es significativamente menor que la que tiene esta cepa cultivada en glucosa ($p=0.001$).

El grupo de investigación que identificó a los genes de las homocitrato sintasas, caracterizó las mutantes *lys20Δ* y *lys21Δ* durante el crecimiento en medios con glucosa (50). En su fondo genético, sus resultados de cantidades intracelulares de lisina son diferentes a los nuestros (tabla 1), su mutante *lys21Δ* produce pozas un poco mayores que la cepa silvestre y la *lys20Δ* reduce la poza intracelular de lisina comparada con la cepa silvestre. Como veremos mas adelante, en nuestro fondo genético la isoforma Lys20p está sujeta a un mecanismo de control post-transcripcional el cual limita la cantidad de esta proteína, probablemente este mecanismo no esté presente en el fondo genético usado por Feller (50).

Contenido de lisina intracelular de la mutante doble lys20Δ lys21Δ transformada con plásmidos multicopia que contienen a los genes LYS20 o LYS21.

Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de los genes *LYS20* o *LYS21* provoca un aumento en los niveles de lisina intracelular comparados con los niveles de la cepa silvestre. Este resultado descarta la posibilidad de que la reducción en la velocidad de crecimiento de las cepas con los genes en multicopia durante el cultivo en etanol se deba a la falta de este aminoácido y apoya la idea de que este efecto se deba algún desbalance provocado por alto consumo de sustratos.

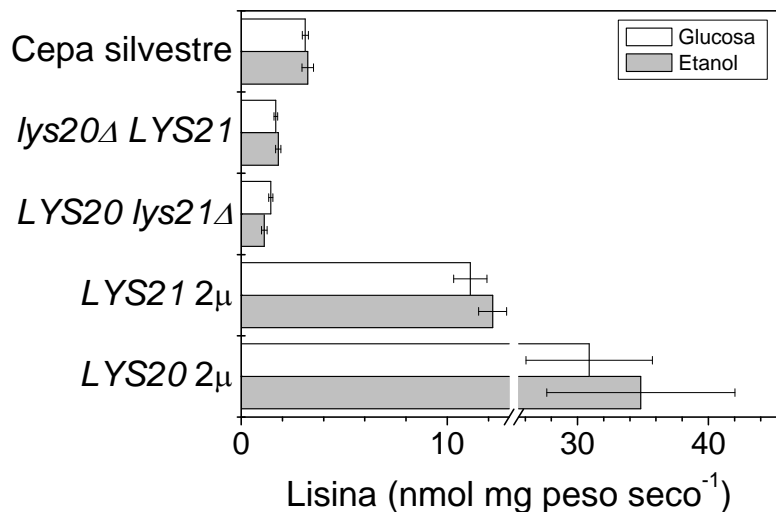


Figura 8. Contenido intracelular de lisina. Las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono indicada y se colectaron en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.4-0.6$). Los valores son el

promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las cepas utilizadas fueron: CLA1-2 (Cepa silvestre), CLA1-2-21 (*LYS21 lys20* Δ), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21* Δ), CLA1-D-21M (*LYS21* 2 μ) y CLA1-D-20M (*LYS20* 2 μ)

La cepa CLA1-D-20M, que contiene al gen *LYS20* en multicopia es la mayor productora de lisina (figura 8), lo que indica que Lys20p tiene mayor capacidad de producir homocitrato lo cual se ve reflejado en mayor producción de lisina. Esta mayor capacidad la reportó Feller (50) y está relacionada con la menor inhibición por lisina de Lys20p comparada con Lys21p, sin embargo, en nuestras mutantes sencillas, la proteína Lys20p en la mutante *lys21* Δ no produce mayor cantidad de lisina que la que produce Lys21p en la mutante *lys20* Δ ; lo que sugiere que en nuestro fondo genético, hay un nivel de regulación que limita la actividad de Lys20p y que es incapaz de hacerlo cuando ésta proteína se produce en exceso.

Se ha propuesto que las homocitrato sintasas ejercen parte importante del control metabólico de la vía de biosíntesis de lisina (38), nuestros datos apoyan esta idea ya que el aumento en la cantidad de las isoformas se ve reflejado en un incremento en la producción de lisina.

Contenido de intracelular de α -cetoglutarato.

En los apartados anteriores se describió la disminución en la velocidad de crecimiento durante el metabolismo respiratorio debida a la sobreexpresión de los genes *LYS20* o *LYS21*. Este efecto se atribuyó a un consumo excesivo de sustratos por las homocitrato sintasas lo que limitaría de α -KG o AcCoA a otros procesos celulares. Se ha reportado que la concentración intracelular de acetil-CoA es saturante para Lys20p y Lys21p, por lo que es poco probable que variaciones en la concentración de este intermediario modulen la actividad de las homocitrato sintasas in vivo (85). Por otro lado se ha demostrado que la concentración intracelular de α -cetoglutarato modula la actividad estas enzimas (52), en la figura 9 se muestran las pozas intracelulares de este intermediario.

Se observa que durante el crecimiento en medios con glucosa el contenido intracelular de α -KG aumenta en las cepas con plásmidos multicopias y que el incremento es mayor en la cepa que

sobreexpresa al gen *LYS20*, el mismo patrón se observa en el contenido intracelular de lisina (figura 8). Estos resultados sugieren que durante el metabolismo fermentativo, la célula puede responder a la mayor biosíntesis de lisina aumentando los flujos de intermediarios para abastecer de sustratos a las homocitrato sintasas, de modo que las pozas de α -cetoglutarato también aumentan. En cambio, durante el crecimiento en etanol, las pozas de α -cetoglutarato de las cepas que sobreexpresan a los genes *LYS20* o *LYS21*, no siguen el patrón de incremento de las pozas de lisina, lo que indica que los flujos de intermediarios a través de las rutas que producen α -cetoglutarato a partir de etanol se encuentran a su máxima capacidad y la producción excesiva de lisina podría estar limitando a otros procesos metabólicos de α -cetoglutarato y de este modo provocaría la reducción en la velocidad de crecimiento de estas cepas durante el metabolismo respiratorio.

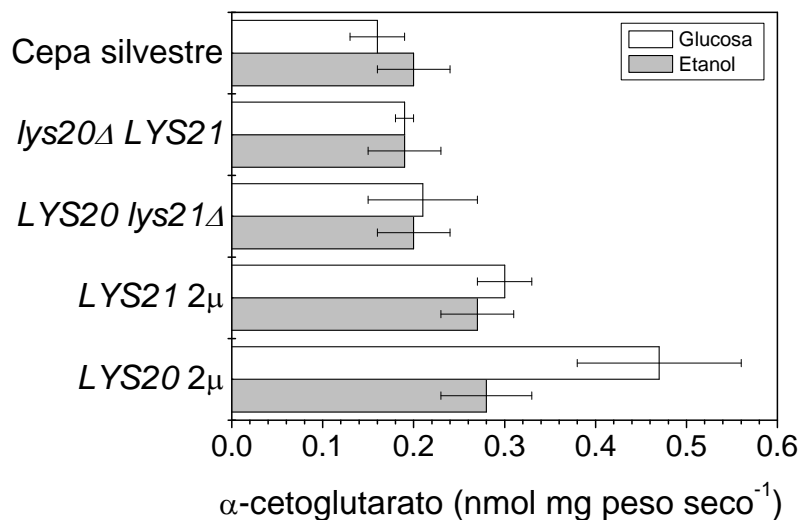


Figura 9. Contenido intracelular de α -cetoglutarato. Las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono indicada y se colectaron en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.4-0.6$). Los valores son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las cepas utilizadas fueron: CLA1-2 (Cepa silvestre), CLA1-2-21 (*LYS21 lys20*Δ), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21*Δ), CLA1-D-21M (*LYS21* 2μ) y CLA1-D-20M (*LYS20* 2μ)

Cantidades intracelulares de Lys20p y Lys21p.

Los resultados de velocidad de crecimiento y de pozas intracelulares de lisina indican que la isoforma Lys20p durante el metabolismo respiratorio en la mutante *lys21Δ* no es capaz de producir suficiente homocitrato, lo que provoca una deficiencia de lisina y por lo tanto menor crecimiento que la cepa silvestre. En cambio la isoforma Lys21p si puede producir suficiente homocitrato en estas condiciones. ¿Por qué, en la mutante *lys21Δ* cultivada en etanol, Lys20p no es suficientemente activa? para responder a esta pregunta se determinaron las cantidades intracelulares de las isoenzimas mediante hibridaciones tipo Western blot.

En la figura 10 se presentan las inmunodetecciones de Lys20p y de Lys21p con el anticuerpo monoclonal 31F5 el cual reconoce a ambas isoformas (48). En el panel A, el carril correspondiente a la mutante *LYS20 lys21Δ* se cargó con 6 veces más proteína total que los otros carriles, esta diferencia de cargado hace evidente que la cantidad de Lys20p es mucho menor que la cantidad de Lys21p en ambas fuentes de carbono, además la banda de detección más tenue corresponde a Lys20p cuando la mutante *lys21Δ* se cultivó en medios con etanol, es decir que la cantidad de la isoforma Lys20p disminuye durante el metabolismo respiratorio, este dato apoya la idea de que la reducción en crecimiento de la mutante *lys21Δ* durante el crecimiento respiratorio se debe a baja actividad de homocitrato sintasa y por ende a baja producción de lisina. Es interesante que durante el crecimiento en glucosa, la poca proteína Lys20p que está presente en la célula es capaz de abastecer de homocitrato suficiente para que la velocidad de crecimiento no se vea afectada, esto indica que ésta proteína tiene alta capacidad de catálisis ya que con poca proteína produce suficiente homocitrato. En relación a Lys21p, las cantidades de esta proteína son similares en ambas fuentes de carbono.

En el panel B de la figura 10 se muestran las inmunodetecciones de Lys20p y Lys21p en las cepas que sobreexpresan a los genes *LYS20* y *LYS21*, se observa que las cantidades de homocitrato sintasa aumentan comparadas con la cepa silvestre y que este aumento es más intenso para Lys21p, a pesar de que hay más proteína Lys21p que Lys20p, la poza de lisina es mayor en la cepa con el gen *LYS20* en multicopia (figura 8), este dato también indica que la enzima Lys20p tiene mayor capacidad de producción de homocitrato que Lys21p.

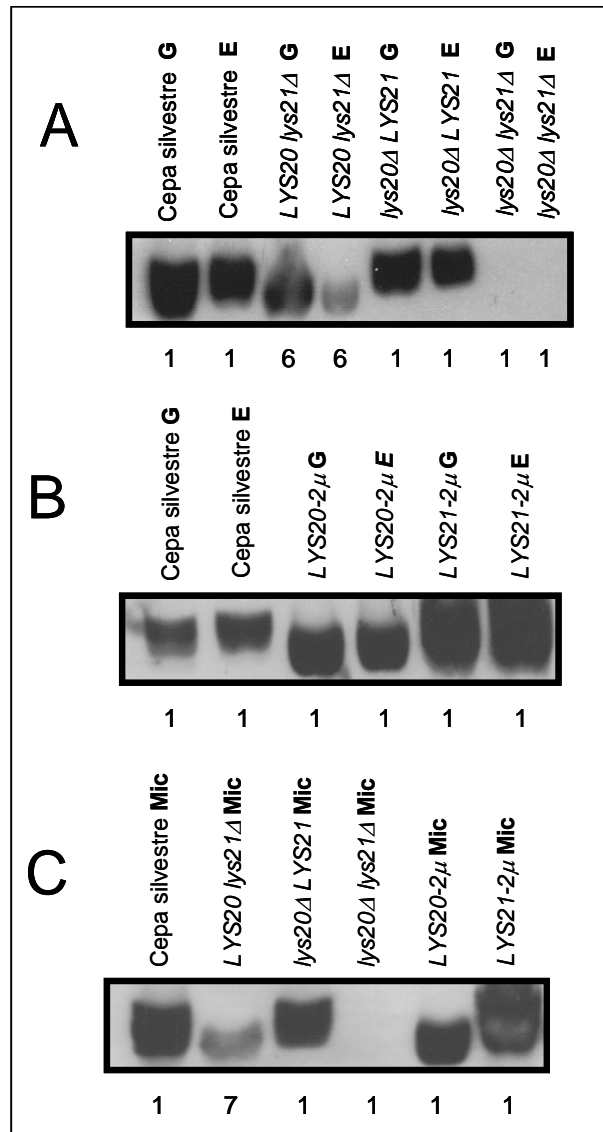


Figura 10. Determinación de las cantidades intracelulares de Lys20p y Lys21p mediante hibridaciones tipo Western Blot. Los extractos celulares de las cepas indicadas abajo se hibridaron con un anticuerpo monoclonal que reconoce a ambas isoformas. Panel **A**, inmunodetecciones de la cepa silvestre y de las mutantes sencillas. Panel **B**, inmunodetecciones de la cepa silvestre y de las mutantes que sobreexpresan los genes *LYS20* y *LYS21*. Panel **C**, inmunodetecciones bajo condiciones de crecimiento microaerófilas. Las fuentes de carbono de los medios de crecimiento se indican como **G**, para glucosa y **E** para etanol. Las cepas que se usaron fueron: CLA1-2 (Cepa silvestre), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21Δ*), CLA1-2-21 (*lys20Δ LYS21*), CLA1-D (*lys20Δ lys21Δ*), CLA1-D-20M (*LYS20- 2μ*) y CLA1-D-21M (*LYS21- 2μ*). Los números indican las cantidades relativas de proteína total que se

cargaron en cada carril, los carriles correspondientes a la mutante CLA1-2-20 (*LYS20*, *lys21Δ*) fueron cargados con 6 y 7 veces más proteína total que los otros carriles en los paneles A y C respectivamente.

La disminución en la cantidad de la proteína Lys20p durante el metabolismo respiratorio se debe a un mecanismo de control post-transcripcional como discutiremos más adelante. En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* la homocitrato sintasa es degradada durante estrés oxidativo (88), para reducir la probabilidad de que las células se enfrenten a este tipo de estrés, las cultivamos en condiciones microaerofílicas y determinamos las cantidades de homocitrato sintasas con la esperanza de que, en esta condición, Lys20p no sea afectada por el mecanismo de control que disminuye su concentración. En el panel C de la figura 10 se muestran las inmunodetecciones de Lys20p y Lys21p en estas condiciones, se observa que también en presencia de bajas cantidades de oxígeno disuelto hay menos proteína Lys20p que Lys21p, el carril correspondiente a la mutante *LYS20 lys21Δ* se cargó con siete veces más proteína total que los demás carriles.

Las inmunodetecciones indican que en ambas fuentes de carbono hay mayor cantidad de Lys21p que de Lys20p, esta diferencia es mayor en condiciones respiratorias, la reducción en la cantidad intracelular de Lys20p en estas condiciones provoca que la mayor parte de la actividad de homocitrato sintasa esté a cargo de Lys21p. Durante la descripción de las propiedades cinéticas de Lys21p se señalaron las peculiaridades que hacen de Lys21p la isoenzima más apta para producir homocitrato durante el crecimiento en medios con fuentes de carbono no fermentables.

Actividad de las homocitrato sintasas en extractos crudos.

Las cantidades intracelulares de enzimas pueden estimarse por inmunodetección o por ensayos enzimáticos en extractos crudos, la diferencia entre estas determinaciones es que la primera indica la cantidad de enzima total mientras que la segunda indica la cantidad de enzima activa, esto es importante cuando existen mecanismos de regulación post-traducciona. Para conocer las cantidades de homocitrato sintasas activas, se determinaron las actividades enzimáticas en extractos crudos obtenidos de células cultivadas en medios con etanol o glucosa como fuente de carbono. Los resultados se muestran en la figura 11.

Al comparar las actividades específicas de la cepa silvestre con las de las mutantes sencillas se observa una disminución en ambas mutantes, lo cual indica que se requieren las dos isoformas para alcanzar los niveles silvestres en ambas fuentes de carbono. La mutante *lys21Δ* presenta las actividades mas bajas, pero si se complementa con el gen *LYS21* a través de un plásmido monocopia (cepa CLA1-2-20C1 (*LYS20 lys21Δ/pMON21*)), recupera los niveles silvestres de actividad específica. Como era de esperar, la doble mutante *lys21Δ lys20Δ* no tiene actividad detectable de homocitrato sintasa.

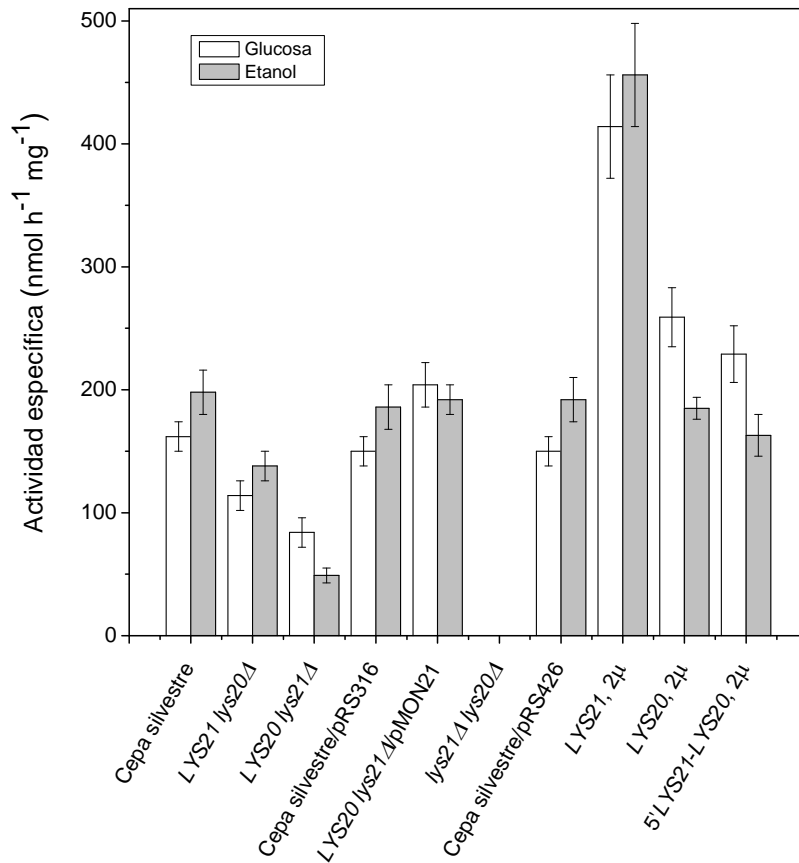


Figura 11. Actividad específica de homocitrato sintasa. Las células se cultivaron en medio mínimo con la fuente de carbono indicada y se colectaron en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.4-0.6$). Los valores son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Las cepas utilizadas fueron: CLA1-2 (Cepa silvestre), CLA1-2-21 (*LYS21 lys20Δ*), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21Δ*), CLA1-2C, (Cepa silvestre/pRS316), CLA1-2-20C1 (*LYS20, lys21Δ/pMON21*), CLA1-D (*lys21Δ lys20Δ*),

CLA1-2M (Cepa silvestre/pRS426), CLA1-D-21M (*LYS21*, 2 μ), CLA1-D-20M (*LYS20*, 2 μ) y CLA1-D-Q10 (5'*LYS21-LYS20*, 2 μ).

La mutante *lys21Δ* cultivada en medio con etanol como fuente de carbono tiene la menor actividad específica, precisamente esta mutante en esta condición es la que presenta menor velocidad de crecimiento que la cepa silvestre, la menor poza de lisina y la menor cantidad de homocitrato sintasa determinada por inmunodetección. Estos datos en conjunto indican que durante el metabolismo respiratorio las células reducen la cantidad de la proteína Lys20p y dependen de la actividad de Lys21p para producir homocitrato.

En la figura 10 se observa que la cantidad de la proteína Lys20p en la mutante *lys21Δ* en ambas fuentes de carbono es muy pequeña (considerar las diferencias de cargado de proteína total en los carriles correspondientes a esta mutante), esas cantidades tan pequeñas producen actividades específicas de la mitad de la cepa silvestre en glucosa y de la cuarta parte de la cepa silvestre en etanol. Esto apoya la idea de que la isoforma Lys20p tiene alta capacidad de producción de homocitrato ya que con muy poca proteína alcanza actividades específicas cercanas a las que presentan la cepa silvestre y la mutante *lys20Δ*.

Al comparar las actividades de las mutantes que sobreexpresan los genes con las actividades de las mutantes sencillas, se observa un incremento de 3 a 4 veces. La cepa que sobreexpresa el gen *LYS21* tiene actividades mayores que la que sobreexpresa al gen *LYS20*, esta diferencia en cantidad de proteína activa, coincide con la cantidad de proteína detectada en la inmunodetección, este dato también indica que Lys20p tiene mayor capacidad de producción de homocitrato comparada con la de Lys21p ya que con menor cantidad de enzima activa, la mutante que sobreexpresa a *LYS20* produce mas lisina. Dada la alta capacidad de catálisis de Lys20p, resulta imperativo controlar su actividad durante el metabolismo respiratorio para evitar el consumo excesivo de α -KG y la reducción de la velocidad de crecimiento como ocurre en las cepas que sobreexpresan los genes de las homocitrato sintasas.

Las cepas que tienen a ambas isoformas o solamente a Lys21p, presentan actividades específicas similares en ambas fuentes de carbono. Sin embargo en las cepas en las que Lys20p es la única

isoforma presente, invariablemente ocurre una reducción en la actividad específica durante el crecimiento en etanol como fuente de carbono. Este hecho apoya la idea de que la cantidad de proteína Lys20p disminuye durante el metabolismo respiratorio comparado con el fermentativo y además indica que esta reducción es independiente de la transcripción ya que la doble mutante transformada con un plásmido multicopia que tiene clonada una construcción con el promotor del gen *LYS21* y la región codificante del gen *LYS20* (CLA1-D-Q10 (5'*LYS21-LYS20*, 2 μ)), presenta el mismo comportamiento que la cepa que sobreexpresa al gen *LYS20*.

Expresión de los genes LYS20 y LYS21 durante el metabolismo fermentativo y respiratorio.

Los resultados de los incisos anteriores indican que la isoforma predominante durante el metabolismo respiratorio es Lys21p ya que la cantidad de Lys20p es reducida en estas condiciones. Para conocer el papel de la transcripción en la modulación de las cantidades de las isoenzimas, realizamos la determinación de los niveles de transcritos de los genes *LYS20* y *LYS21* durante el crecimiento fermentativo y respiratorio mediante hibridaciones tipo Northern blot. En la figura 12 se muestran los resultados.

En el panel A de la figura 12 se observa que los niveles de transcripción del gen *LYS21* son similares durante el crecimiento en medios con glucosa y con etanol, esto concuerda con los niveles detectados de la proteína Lys21p mediante inmunodetección y mediciones de la actividad específica en extractos crudos. En cambio, el gen *LYS20* se induce durante el cultivo en medios con etanol como fuente de carbono, sin embargo, en estas condiciones disminuye la cantidad de proteína Lys20p, lo cual indica que esta isoforma está sujeta a un mecanismo de regulación post-transcripcional.

Se han descrito diferentes instancias regulatorias de la transcripción de los genes *LYS20* y *LYS21*: bajo condiciones de limitación de aminoácidos, el activador Gcn4p es un regulador positivo (68). En condiciones de limitación de lisina el complejo activador Lys14p- α AASA también es un regulador positivo (69), α AASA es la abreviación de alfa amino adipato semialdehído, el cual es un intermediario en la ruta de biosíntesis de lisina (figura 1). Durante limitación de nutrientes

simulada por rapamicina los genes se reprimen mediante un mecanismo relacionado con la vía de señalización TOR y la proteína quinasa A (70).

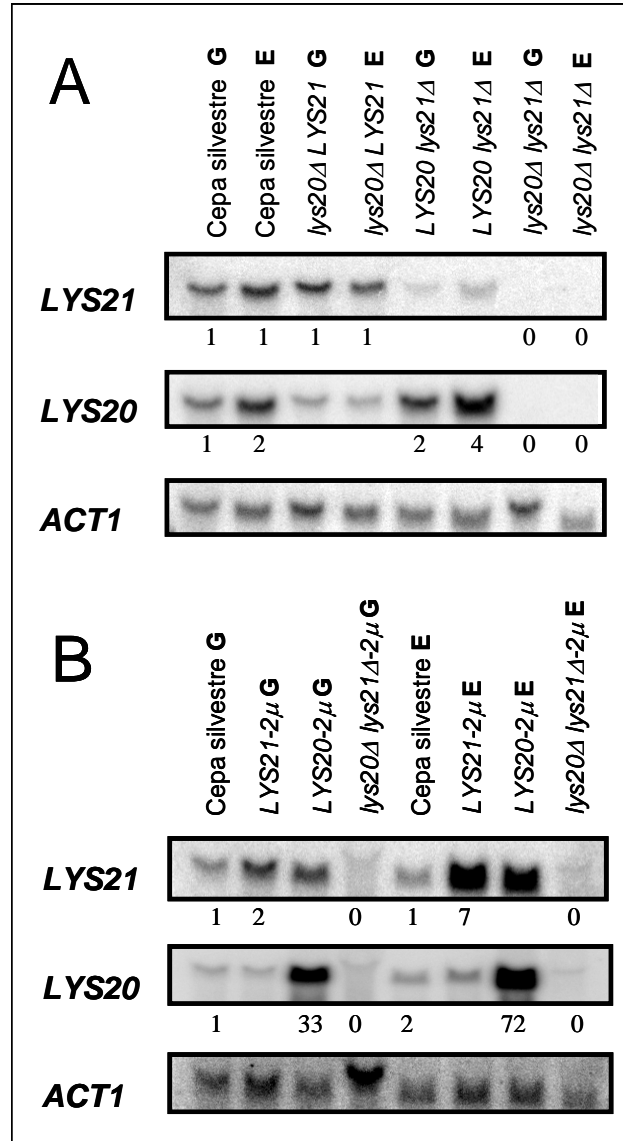


Figura 12. Niveles de transcritos de los genes *LYS20* y *LYS21*. El RNA se extrajo de células en crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.4-0.6$). Las hibridaciones correspondientes a la cepa silvestre, a las mutantes sencillas y a la doble mutante se muestran en el panel **A**. Las hibridaciones de las cepas que sobreexpresan a los genes *LYS20* o *LYS21*, se muestran en el panel **B**. Las fuentes de carbono de los medios de crecimiento se indican como **G**, para glucosa y **E** para etanol. Las cepas que se usaron fueron: CLA1-2 (Cepa silvestre), CLA1-2-21 (*lys20Δ* *LYS21*), CLA1-2-20 (*LYS20* *lys21Δ*), CLA1-D (*lys20Δ*

lys21Δ), CLA1-D-21M (*LYS21*- 2μ), CLA1-D-20M (*LYS20*- 2μ) y CLA1-DM (*lys20Δ lys21Δ*-2μ). Los números indican las expresiones relativas comparadas con la cepa silvestre cultivada en glucosa. Una sonda radiactiva del gen *ACT1* se utilizó como control de cargado.

Nuestros resultados indican que en la cepa silvestre la inducción del gen *LYS20* durante el crecimiento en medios con etanol es de 2 veces, considerando que en estas condiciones no hay limitación de lisina (figura 8), probablemente el activador responsable de esa inducción sea Gcn4p el cual se ha reportado que es más activo en medios con etanol (89), esta inducción también se observa en la cepa *lys21Δ*. Al parecer, en la célula de levadura evolucionó un mecanismo que incrementa la transcripción del gen *LYS20* para contrarrestar en cierta medida la inactivación de la proteína Lys20p y asegurar cierta cantidad de enzima activa la cual contribuye a producir los niveles silvestres de lisina.

Los resultados de detección de la proteína Lys20p (figuras 10 y 11) indican que la inducción del gen *LYS20* durante el metabolismo respiratorio no se ve reflejada en un incremento de la proteína debido a la acción de un mecanismo post-transcripcional. Es interesante notar que en ambas fuentes de carbono, la isoforma Lys21p es suficientemente activa en la mutante *lys20Δ* para tener un crecimiento igual que el de la cepa silvestre, parecería que la proteína Lys20p es dispensable durante el crecimiento en fase logarítmica, entonces surge la pregunta ¿Por qué la célula de levadura tiene mecanismos de inducción del gen *LYS20* y con ello mantiene presente a la proteína Lys20p? probablemente esta isoforma sea importante en la respuesta a ciertos tipos de estrés.

En la cepa silvestre se produce lisina en exceso, la cual es acumulada en la vacuola, una vez que se alcanza cierta poza vacuolar, la poza citosólica alcanza un nivel tal que retroinhibe a las homocitrato sintasas y disminuye la producción de homocitrato, con ello disminuye también la producción de los otros intermediarios de la vía de biosíntesis de lisina incluido el αAASA, de modo que la cantidad de complejo activador Lys14p-αAASA también se ve reducida y la transcripción de los genes *LYS* deja de ser activada (69). Este mecanismo de regulación de la transcripción es inoperante si hay un exceso de actividad de homocitrato sintasa ya que la alta producción de homocitrato, provocaría una alta poza de αAASA, lo cual activaría la

transcripción de los genes LYS incluidos *LYS20* y *LYS21* y el ciclo se repite, el efecto final sería una alta producción de lisina y la activación permanente de los genes de la vía. Por ello la actividad de homocitrato sintasa debe ser controlada de manera precisa, especialmente la isoforma Lys20p la cual como ya vimos tiene alta capacidad de producción de homocitrato y es poco sensible a la retroinhibición por lisina.

La sobreexpresión del gen *LYS21* provoca un incremento en los niveles de transcrito de 2 veces en glucosa y 7 veces en etanol comparados con la cepa silvestre, estos datos indican que también el gen *LYS21* está bajo el control de un mecanismo que induce al gen bajo condiciones respiratorias, sin embargo, dicha activación es menor que para el gen *LYS20* ya que el efecto en *LYS21* solo se observa con muchas copias del gen. Esta inducción no se ve reflejada en un aumento en los niveles de la proteína Lys21p en cultivos en etanol como fuente de carbono, lo que sugiere que Lys21p también está sujeta a un mecanismo de regulación post-transcripcional que limita su cantidad durante el metabolismo respiratorio.

La sobreexpresión del gen *LYS20* tiene un efecto dramático sobre los niveles de transcrito, la inducción es de 33 veces durante el crecimiento en medios con glucosa y 72 veces durante el crecimiento en medios con etanol, si bien la inducción en etanol se mantiene, al parecer el principal mecanismo activador responsable de estas inducciones tan altas es a través de Lys14p- α AASA ya que la superior capacidad de producción de homocitrato que tiene Lys20p aunada a la presencia de muchas copias del gen *LYS20*, estarían provocando altos niveles de α AASA lo cual a su vez provoca altos niveles de complejo Lys14p- α AASA y la activación permanente de los genes LYS. El efecto final es la sobreproducción de lisina, el alto consumo de α -cetoglutarato y la reducción en la velocidad de crecimiento en condiciones respiratorias.

El estudio de la fisiología de las mutantes con los genes *LYS20* o *LYS21* inactivados así como de las que los sobreexpresan arrojó datos que apoyan la hipótesis de que este par de genes duplicados se ha mantenido en el genoma de *S. cerevisiae* debido a que ha ocurrido un evento de subfuncionalización, en el que ambas isoformas han divergido a tal grado que han adquirido funciones diferentes. El gen *LYS21* produce una proteína apta para abastecer de homocitrato para la producción de lisina durante el crecimiento exponencial tanto en condiciones respiratorias

como en fermentativas, aunque no es capaz de producir cantidades de homocitrato tales que se reflejen en la producción de un exceso de lisina como ocurre en la cepa silvestre. En cambio la isoforma Lys20p ha adquirido la capacidad de producir altas cantidades de homocitrato, su función parece ser la de contribuir a la formación de un exceso de lisina. Es interesante que este aminoácido sea útil en la respuesta a ciertos tipos de estrés (57-59), probablemente el exceso de lisina almacenada en la vacuola ayude a la célula cuando se vea expuesta a determinadas condiciones desfavorables. Si el mecanismo post-transcripcional que limita la cantidad intracelular de Lys20p tiene una regulación tal que, bajo ciertas condiciones, permitiera que aumente la actividad de esta isoforma, habría un incremento rápido de lisina intracelular, sería interesante que dichas condiciones fueran un tipo de estrés en el que la lisina jugara un papel protector.

CONCLUSIONES

- 1. Los genes *LYS20* y *LYS21* no tienen funciones redundantes.** La conservación de este par de genes es consistente con un proceso de subfuncionalización. La presencia de ambos genes en la levadura permite producir un exceso de lisina y al mismo tiempo regular la biosíntesis de este aminoácido sin comprometer la disponibilidad de α -cetoglutarato para otros procesos metabólicos durante el metabolismo respiratorio.
- 2. A pesar de su alto porcentaje de identidad, las isoformas Lys21p y Lys20p poseen diferentes propiedades cinéticas.** La isoforma Lys21p es mucho más sensible a la inhibición por lisina que la isoforma Lys20p. Este inhibidor induce cooperatividad positiva por la unión de α -cetoglutarato en la proteína Lys21p, mientras que Lys20p no es una enzima cooperativa. Como resultado de estas diferencias, Lys20p tiene mayor capacidad de producción de homocitrato.
- 3. Los mecanismos de regulación de la actividad de las homocitrato sintasas son diferentes.** La actividad de Lys21p es modulada principalmente por las pozas intracelulares de lisina y α -cetoglutarato, mientras que la actividad de Lys20p es controlada por un mecanismo post-transcripcional que reduce la concentración de esta enzima en la célula.

PERSPECTIVAS

1. Nuestros resultados son consistentes con la idea de que el papel fisiológico de la isoforma Lys21p es el de producir homocitrato utilizando cuidadosamente sus sustratos para no limitar de éstos a otros procesos metabólicos y al mismo tiempo permitir la producción de lisina, esto es especialmente importante durante el metabolismo respiratorio. El papel fisiológico de la isoforma Lys20p no es tan claro. Nuestros resultados indican que esta isoforma tiene mayor capacidad de producción de homocitrato que Lys21p. Sin embargo, la falta del gen *LYS20* no produjo deficiencia en el crecimiento en las condiciones estudiadas. Si bien este gen es necesario para alcanzar los niveles silvestres de lisina, también lo es *LYS21*. Al parecer el papel de Lys20p es asegurar la producción de un exceso de lisina. ¿Cuál es el papel de dicho exceso?. Dado que este aminoácido no puede ser usado como fuente de nitrógeno ni de carbono, parecería que la lisina acumulada en la vacuola se usa para biosíntesis de proteínas en condiciones de limitación de nutrientes. Sin embargo, la participación de este aminoácido en la respuesta a algunos tipos de estrés nos lleva a preguntarnos si el exceso de lisina favorece esas respuestas y si Lys20p es más activa en esas condiciones. Sería interesante explorar la relación entre la poza de lisina y la respuesta a diferentes tipos de estrés.
2. El principal mecanismo para controlar la actividad de Lys20p es un tipo de regulación post-transcripcional que reduce la concentración intracelular de esta proteína. Este mecanismo está presente tanto en condiciones fermentativas como en respiratorias y evita la producción de un exceso de homocitrato por parte de Lys20p lo que podría provocar desbalances metabólicos. ¿Cuál es la naturaleza de este mecanismo de regulación?, ¿Es a nivel de estabilidad del mRNA?, ¿Se degrada la proteína? Sería interesante conocer los mecanismos moleculares de este proceso.
3. Es probable que las isoformas Lys20p y Lys21p interaccionen entre sí en la célula. Sería interesante determinar si estas proteínas pueden formar heteromultímeros, de ser así, ¿Cuáles serían sus propiedades cinéticas? ¿Serían mas abundantes durante el metabolismo fermentativo que durante el respiratorio?

4. Además del interés evolutivo, el estudio de la biosíntesis de lisina tiene interés biotecnológico. Sería interesante entender la distribución del control metabólico de la ruta de biosíntesis de lisina para realizar estudios de ingeniería metabólica encaminados a sobreproducir este aminoácido y para el diseño de fármacos antifúngicos aprovechando que esta vía es exclusiva de los hongos.

REFERENCIAS

1. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics(1). *Yeast.* 2007 Jul 18;24(10):799-845.
2. **Barnett JA, Entian KD.** A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005 Aug;22(11):835-94.
3. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast.* 2004 Oct 30;21(14):1141-93.
4. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 7: enzymic adaptation and regulation. *Yeast.* 2004 Jul 15;21(9):703-46.
5. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 6: the main respiratory pathway. *Yeast.* 2003 Sep;20(12):1015-44.
6. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast.* 2003 Apr 30;20(6):509-43.
7. **Barnett JA.** Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology.* 2003 Mar;149(Pt 3):557-67.
8. **Barnett JA, Robinow CF.** A history of research on yeasts 4: cytology part II, 1950-1990. *Yeast.* 2002 Jun 30;19(9):745-72.
9. **Barnett JA, Robinow CF.** A history of research on yeasts 4: cytology part I, 1890-1950. *Yeast.* 2002 Jan 30;19(2):151-82.
10. **Barnett JA, Lichtenthaler FW.** A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast.* 2001 Mar 15;18(4):363-88.
11. **Barnett JA.** A history of research on yeasts. 1: Work by chemists and biologists 1789-1850. *Yeast.* 1998 Dec;14(16):1439-51.
12. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast.* 2000 Jun 15;16(8):755-71.
13. **Goffeau A.** Four years of post-genomic life with 6,000 yeast genes. *FEBS Lett.* 2000 Aug 25;480(1):37-41.
14. **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen**

- P, Tettelin H, Oliver SG.** Life with 6000 genes. *Science*. 1996 Oct 25;274(5287):546, 563-7.
15. **Dickinson J.R.** (1999) Carbon metabolism. In *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson J.R., and Schweiser M., eds.) Taylor and Francis, London, pp. 57-58.
 16. **Gancedo JM.** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Jun;62(2):334-61.
 17. **Frick O, Wittmann C.** Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb Cell Fact*. 2005 Nov 3;4:30.
 18. **Merico A, Sulo P, Piskur J, Compagno C.** Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J*. 2007 Feb;274(4):976-89.
 19. **Brown T.A.** (1999) *Genomes*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 372-83.
 20. **Panopoulou G, Poustka AJ.** Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends Genet*. 2005 Oct;21(10):559-67.
 21. **Sterck L, Rombauts S, Vandepoele K, Rouze P, Van de Peer Y.** How many genes are there in plants (... and why are they there)?. *Curr Opin Plant Biol*. 2007 Apr;10(2):199-203.
 22. **Wolfe KH, Shields DC.** Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):708-13.
 23. **Seoighe C, Wolfe KH.** Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene*. 1999 Sep 30;238(1):253-61.
 24. **Conant GC, Wolfe KH.** Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol Syst Biol*. 2007;3:129.
 25. **Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J.** Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. 1999 Apr;151(4):1531-45.
 26. **Lynch M, Force A.** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*. 2000 Jan;154(1):459-73.
 27. **Palmieri L, Agrimi G, Runswick MJ, Fearnley IM, Palmieri F, Walker JE.** Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial

transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate. *J Biol Chem*. 2001 Jan 19;276(3):1916-22.

28. **van den Berg MA, de Jong-Gubbels P, Kortland CJ, van Dijken JP, Pronk JT, Steensma HY.** The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):28953-9.
29. **Contreras-Shannon V, Lin AP, McCammon MT, McAlister-Henn L.** Kinetic properties and metabolic contributions of yeast mitochondrial and cytosolic NADP+-specific isocitrate dehydrogenases. *J Biol Chem*. 2005 Feb 11;280(6):4469-75.
30. **White WH, Skatrud PL, Xue Z, Toyn JH.** Specialization of function among aldehyde dehydrogenases: the ALD2 and ALD3 genes are required for beta-alanine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2003 Jan;163(1):69-77.
31. **Huet C, Menendez J, Gancedo C, Francois JM.** Regulation of *pyc1* encoding pyruvate carboxylase isozyme I by nitrogen sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 2000 Dec;267(23):6817-23.
32. **Albers E, Laize V, Blomberg A, Hohmann S, Gustafsson L.** Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate Dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2003 Mar 21;278(12):10264-72.
33. **Farkas I, Hardy TA, Goebel MG, Roach PJ.** Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *J Biol Chem*. 1991 Aug 25;266(24):15602-7.
34. **Pahlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L.** The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2001 Feb 2;276(5):3555-63.
35. **Tibbetts AS, Appling DR.** Characterization of two 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase isozymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20920-7. Erratum in: *J Biol Chem* 2002 Jul 19;277(29):26708.

36. **DeLuna A, Avendano A, Riego L, Gonzalez A.** NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43775-83.
37. **Kuepfer L, Sauer U, Blank LM.** Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res*. 2005 Oct;15(10):1421-30.
38. **Xu H, Andi B, Qian J, West AH, Cook PF.** The alpha-aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochem Biophys*. 2006;46(1):43-64.
39. **Bhattacharjee JK.** alpha-Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. *Crit Rev Microbiol*. 1985;12(2):131-51.
40. **Cahyanto MN, Kawasaki H, Nagashio M, Fujiyama K, Seki T.** Construction of *Lactobacillus plantarum* strain with enhanced L-lysine yield. *J Appl Microbiol*. 2007 Mar;102(3):674-9.
41. **Imaizumi A, Kojima H, Matsui K.** The effect of intracellular ppGpp levels on glutamate and lysine overproduction in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2006 Sep 18;125(3):328-37.
42. **Barrett E, Stanton C, Zelder O, Fitzgerald G, Ross RP.** Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey. *Appl Environ Microbiol*. 2004 May;70(5):2861-6.
43. **Gasent-Ramirez JM, Benitez T.** Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Dec;63(12):4800-6.
44. **Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Ward RT, Webber P.** Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology (N Y)*. 1995 Jun;13(6):577-82.
45. **Pfefferle W, Mockel B, Bathe B, Marx A.** Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2003;79:59-112.
46. **Palmer DR, Balogh H, Ma G, Zhou X, Marko M, Kaminskyj SG.** Synthesis and antifungal properties of compounds which target the alpha-aminoadipate pathway. *Pharmazie*. 2004 Feb;59(2):93-8. Erratum in: *Pharmazie*. 2004 Apr;59(4):336. Kaminskyj, S G [corrected to Kaminskyj, S G J].

47. **Nishida H, Nishiyama M, Kobashi N, Kosuge T, Hoshino T, Yamane H.** A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Res.* 1999 Dec;9(12):1175-83.
48. **Chen S, Brockenbrough JS, Dove JE, Aris JP.** Homocitrate synthase is located in the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10839-46.
49. **Betterton H, Fjellstedt T, Matsuda M, Ogur M, Tate R.** Localization of the homocitrate pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1968 Dec 23;170(2):459-61.
50. **Feller A, Ramos F, Pierard A, Dubois E.** In *Saccharomyces cerevisiae*, feedback inhibition of homocitrate synthase isoenzymes by lysine modulates the activation of LYS gene expression by Lys14p. *Eur J Biochem.* 1999 Apr;261(1):163-70.
51. **Andi B, West AH, Cook PF.** Regulatory mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. I. Kinetic studies. *J Biol Chem.* 2005 Sep 9;280(36):31624-32.
52. **Feller A, Ramos F, Pierard A, Dubois E.** Lys80p of *Saccharomyces cerevisiae*, previously proposed as a specific repressor of LYS genes, is a pleiotropic regulatory factor identical to Mks1p. *Yeast.* 1997 Nov;13(14):1337-46.
53. **Suvarna K, Seah L, Bhattacharjee V, Bhattacharjee JK.** Molecular analysis of the LYS2 gene of *Candida albicans*: homology to peptide antibiotic synthetases and the regulation of the alpha-amino adipate reductase. *Curr Genet.* 1998 Apr;33(4):268-75.
54. **Nishida, H., and Nishiyama, M.** What is characteristic of fungal lysine synthesis through the alpha-amino adipate pathway?. *J Mol Evol.* 2000 **51**: 299-302
55. **Kitamoto K, Yoshizawa K, Ohsumi Y, Anraku Y.** Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1988 Jun;170(6):2683-6.
56. **Watson, T. G.** Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *J Gen Microbiol.* 1976 **96**: 263-268.
57. **Stephen DW, Jamieson DJ.** Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* GSH1 gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol.* 1997 Jan;23(2):203-10.

58. **Takagi H, Iwamoto F, Nakamori S.** Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997 Apr;47(4):405-11.
59. **Eisler H, Frohlich KU, Heidenreich E.** Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp Cell Res.* 2004 Nov 1;300(2):345-53.
60. **Zhu X, Tang G, Galili G.** The catabolic function of the alpha-amino adipic acid pathway in plants is associated with unidirectional activity of lysine-oxoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase. *Biochem J.* 2000 Oct 1;351(1):215-20.
61. **Koon N, Squire CJ, Baker EN.** Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 1;101(22):8295-300.
62. **Tracy JW, Kohlhaw GB.** Reversible, coenzyme-A-mediated inactivation of biosynthetic condensing enzymes in yeast: a possible regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 May;72(5):1802-6.
63. **Gaillardin CM, Poirier L, Heslot H.** A kinetic study of homocitrate synthetase activity in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochim Biophys Acta.* 1976 Feb 13;422(2):390-406.
64. **Jaklitsch WM, Kubicek CP.** Homocitrate synthase from *Penicillium chrysogenum*. Localization, purification of the cytosolic isoenzyme, and sensitivity to lysine. *Biochem J.* 1990 Jul 1;269(1):247-53.
65. **Andi B, West AH, Cook PF.** Stabilization and characterization of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Jan 15;421(2):243-54.
66. **Wulandari AP, Miyazaki J, Kobashi N, Nishiyama M, Hoshino T, Yamane H.** Characterization of bacterial homocitrate synthase involved in lysine biosynthesis. *FEBS Lett.* 2002 Jul 3;522(1-3):35-40.
67. **Andi B, West AH, Cook PF.** Kinetic mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 2004 Sep 21;43(37):11790-5.
68. **Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ.** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(13):4347-68.

69. **Becker B, Feller A, el Alami M, Dubois E, Pierard A.** A nonameric core sequence is required upstream of the LYS genes of *Saccharomyces cerevisiae* for Lys14p-mediated activation and apparent repression by lysine. *Mol Microbiol.* 1998 Jul;29(1):151-63.
70. **Chen JC, Powers T.** Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr Genet.* 2006 May;49(5):281-93.
71. **Piskur J.** Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* 2001 Jun;17(6):302-3.
72. **Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A.** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 1983 Jan;153(1):163-8.
73. **Sikorski RS, Hieter P.** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989 May;122(1):19-27.
74. **Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P.** Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 1992 Jan 2;110(1):119-22.
75. **Ramos F, Wiame JM.** Mutation affecting the specific regulatory control of lysine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 1985;200(2):291-4.
76. **Lowry OH, Rosebough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
77. **Valenzuela L, Aranda C, Gonzalez A.** TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol.* 2001 Apr;183(7):2331-4.
78. **Struhl K, Davis RW.** Transcription of the his3 gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 1981 Nov 5;152(3):535-52.
79. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
80. **Gonzalez B, Francois J, Renaud M.** A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast.* 1997 Nov;13(14):1347-55.
81. **Segel, I.H.** (1975) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems.* Wiley, New York. pp. 346-462.

82. **Monod J, Wyman J, Changeaux JP.** On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol.* 1965 May;12:88-118.
83. **Helmstaedt K, Krappmann S, Braus GH.** Allosteric regulation of catalytic activity: *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase versus yeast chorismate mutase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Sep;65(3):404-21.
84. **Wales ME, Madison LL, Glaser SS, Wild JR.** Divergent allosteric patterns verify the regulatory paradigm for aspartate transcarbamylase. *J Mol Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1387-400.
85. **Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J.** Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J Bacteriol.* 2001 Feb;183(4):1441-51.
86. **Ohsumi Y, Kitamoto K, Anraku Y.** Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol.* 1988 Jun;170(6):2676-82.
87. **Banuelos O, Casqueiro J, Gutierrez S, Martin JF.** Overexpression of the *lys1* gene in *Penicillium chrysogenum*: homocitrate synthase levels, alpha-aminoadipic acid pool and penicillin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000 Jul;54(1):69-77.
88. **Kwon ES, Jeong JH, Roe JH.** Inactivation of homocitrate synthase causes lysine auxotrophy in copper/zinc-containing superoxide dismutase-deficient yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 2006 Jan 20;281(3):1345-51.
89. **Riego L, Avendano A, DeLuna A, Rodriguez E, Gonzalez A.** *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Apr 26;293(1):79-85.

Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*

Héctor Quezada,¹ Cristina Aranda,¹ Alexander DeLuna,¹
Hugo Hernández,¹ Mario L. Calcagno,² Álvaro Marín-Hernández³
and Alicia González¹

Correspondence

Alicia González

amanjarr@ifc.unam.mx

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México DF 04510, México

²Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

³Instituto Nacional de Cardiología, Departamento de Bioquímica, Tlalpan, México DF, México

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the first committed step of the lysine biosynthetic pathway is catalysed by two homocitrate synthases encoded by *LYS20* and *LYS21*. We undertook a study of the duplicate homocitrate synthases to analyse whether their retention and presumable specialization have affected the efficiency of lysine biosynthesis in yeast. Our results show that during growth on ethanol, homocitrate is mainly synthesized through Lys21p, while under fermentative metabolism, Lys20p and Lys21p play redundant roles. Furthermore, results presented in this paper indicate that, in contrast to that which had been found for Lys20p, lysine is a strong allosteric inhibitor of Lys21p (K_i 0.053 mM), which, in addition, induces positive cooperativity for α -ketoglutarate (α -KG) binding. Differential lysine inhibition and modulation by α -KG of the two isozymes, and the regulation of the intracellular amount of the two isoforms, give rise to an exquisite regulatory system, which balances the rate at which α -KG is diverted to lysine biosynthesis or to other metabolic pathways. It can thus be concluded that retention and further biochemical specialization of the *LYS20*- and *LYS21*-encoded enzymes with partially overlapping roles contributed to the acquisition of facultative metabolism.

Received 24 January 2008

Revised 3 March 2008

Accepted 7 March 2008

INTRODUCTION

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, lysine is synthesized through the α -amino adipate (AAA) pathway (Nishida & Nishiyama, 2000). Although the first steps of this pathway are fairly widely distributed among different phylogenetic groups of microorganisms (Kosuge & Hoshino, 1998; Nishida *et al.*, 1999), the *LYS2*-encoded AAA reductase is exclusive to fungi and is considered to be the hallmark enzyme of fungal lysine biosynthesis (Nishida & Nishiyama, 2000). Seven enzymes, eight steps, and more than 12 unlinked genes are responsible for the biosynthesis of lysine in *S. cerevisiae*. This amino acid, which is preferentially located in the vacuole, and cannot be used as nitrogen or carbon source (Watson, 1976), plays an important physiological role, contributing to the build-up of the stress response provoked by H₂O₂ treatment (Stephen & Jamieson, 1997), prevention of amino acid

starvation-induced apoptosis (Eisler *et al.*, 2004), and cryoprotection (Takagi *et al.*, 1997).

The first committed step in lysine biosynthesis takes place in the nucleus (Chen *et al.*, 1997) and is catalysed by the homocitrate synthase (formerly EC 4.1.3.21, now EC 2.3.3.14), which condenses acetyl CoA (AcCoA) with α -ketoglutarate (α -KG) to yield homocitrate and CoA. Subsequent steps of the pathway are localized in the mitochondrion and the cytosol (Betterton *et al.*, 1968). This reaction is highly regulated and is thought to be the rate-limiting step of the pathway (Xu *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae*, two homocitrate synthase isozymes encoded by *LYS20* and *LYS21*, 92% identical in amino acid sequence, are responsible for this activity (Feller *et al.*, 1999). These genes are located on different regions of chromosome IV and belong to the group of gene pairs that were selectively conserved after the entire duplication of the yeast genome (Wolfe & Shields, 1997).

Upon amino acid deprivation, expression of both *LYS20* and *LYS21* is induced through the action of Gcn4p

Abbreviations: AAA, α -amino adipate pathway; α -AASA, 2-amino adipate semialdehyde; AcCoA, acetyl coenzyme A; DCIP, 2,6-dichloroindophenol; α -KG, α -ketoglutarate.

(Natarajan *et al.*, 2001). Positive regulation of both genes is also achieved by Lys14p, a transcriptional activator of the Zn–Cys cluster family, which requires 2-aminoadipate semialdehyde (α -AASA) as a co-inducer (Ramos *et al.*, 1988). In addition, *LYS20* and *LYS21* are positively co-regulated by the target of rapamycin (TOR) signalling pathway coupled with protein kinase A, through a *LYS14*–*GCN4*-independent pathway (Chen & Powers, 2006). Lysine repression occurs as this amino acid counteracts expression activation through Lys14p and α -AASA (Feller *et al.*, 1994); repression is simultaneously abolished in mutant strains impaired in lysine-mediated feedback inhibition (Feller *et al.*, 1999).

S. cerevisiae is able to grow under fermentative and respiratory conditions using a variety of carbon sources. Interestingly, the whole genome-duplication event shows a strong correlation with the appearance of fermentative lifestyles in the *Saccharomyces* lineage (Merico *et al.*, 2007). It has been proposed that the selective conservation of certain duplicates could have enhanced the acquisition of facultative metabolic properties (Piskur, 2001). In particular, it has been proposed that the conservation of the paralogous pair *GDH1* and *GDH3* contributes to the mechanisms allowing α -KG utilization without impairing the integrity of the tricarboxylic acid cycle as an energy-providing system. It has been shown that the existence of two NADP-glutamate dehydrogenase isozymes allows the functioning of a regulatory system in which the relative abundance of each isoform modulates the rate at which α -KG is channelled to glutamate biosynthesis (Avendaño *et al.*, 2005; DeLuna *et al.*, 2001). Considering that the *LYS20*- and *LYS21*-encoded isozymes are involved in α -KG and AcCoA utilization, specialization of these genes could have led to the acquisition of kinetic properties that endow Lys20p and Lys21p with a relevant regulatory role in the differential utilization of carbon intermediates under fermentative or respiratory metabolism.

Results presented in this paper show that *LYS20* and *LYS21* have been retained to increase gene dosage under fermentative conditions, and that biochemical specialization of these isozymes has led to modulation of the homocitrate synthase activity, allowing balanced lysine biosynthesis and α -KG utilization during growth by respiration of less favourable carbon sources.

METHODS

Strains. Table 1 describes the characteristics of the strains used in the present work. All strains constructed for this study were *LEU2* derivatives of CLA1 (*ura3 leu2*), and thus suited for *URA3* selection. To obtain strain CLA1-2 (*ura3 leu2::LEU2*), CLA1 was transformed with the 1989 bp PCR product of primers Leu2Fo (5'-GAC CGC AGT TAA CTG TGG-3') and Leu2Re (5'-CGA CTA CGT CGT TAA GGC-3'), which contains the *LEU2* gene under the control of its native promoter. Genomic DNA from strain S288C was used as a template, and transformants were selected for leucine prototrophy. To obtain a *lys20* Δ mutant strain (CLA1-2-21), CLA1-2 was transformed with a 2675 bp PCR product containing the *kanMX4*

Table 1. Strains used in this study

Strain	Genotype
CLA1-2	<i>MATα LYS20 LYS21 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-21	<i>MATα lys20Δ::kanMX4 LYS21 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2-20	<i>MATα LYS20 lys21Δ::kanMX4 ura3 leu2::LEU2</i>
CLA1-2C	CLA1-2/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)
CLA1-2-20C1	CLA1-2-20/pMON21(<i>LYS21</i> CEN <i>URA3</i>)
CLA1-D	<i>MATα lys20Δ::kanMX4 lys21Δ::LEU2 leu2 ura3</i>
CLA1-2M	CLA1-2/pRS426(2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-DM	CLA1-D/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-21M	CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-20M	CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)
CLA1-D-Q10	CLA1-D/pMULQ10 (5' <i>LYS21</i> - <i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)

cassette, and *LYS20* upstream (987 bp) and downstream (182 bp) nucleotide sequences amplified from genomic DNA of the Euroscarf collection strain Y33880 using the deoxyoligonucleotides *LYS20*Fo (5'-TAC TGC GTG CGC TTG AGA TTC AG-3') and *LYS20*Re (5'-TCC CCT TAT TCT GCC GCG AAT G-3') and selecting for G418 (200 mg l⁻¹; Life Technologies) resistance. To obtain a *lys21* Δ mutant, CLA1-2 was transformed with a 2395 bp PCR product containing the *kanMX4* cassette, and *LYS21* upstream (640 bp) and downstream (249 bp) nucleotide sequences amplified from genomic DNA of the Euroscarf collection strain Y33828, using deoxyoligonucleotides L1F2 (5'-CAT CTT TGA AGG CTT GTG CTG ATC-3') and L1R2 (5'-CTC CGT GAG AGT ATA ATA GCG TG-3'), generating the strain CLA1-2-20. Single mutants were verified by amplifying the *kanMX4* cassette with the flanking regions and digesting it with *Bam*HI, which digests the *kanMX4* cassette but not the wild-type genes; genomic DNA from the G418-resistant colonies was used as a template using the deoxyoligonucleotides described above. The double mutant CLA1-D was constructed by interrupting the *LYS20* gene with *kanMX4* and *LYS21* with *LEU2* as follows: the *LEU2* gene was PCR-amplified using the deoxyoligonucleotides *LYS21**LEU2*Fo (5'-GCG CGC TGA TCA GAC CGC AGT TAA CTG TGG-3') and *LYS21**LEU2*Re (5'-GCG CGC TGA TCA CGA CTA CGT CGT TAA GGC-3'). Genomic DNA from the S288C wild-type strain was used as a template. Cohesive ends were generated by digesting with *Bcl*II at the recognition site indicated in bold type; once purified, this DNA was ligated to the gel-purified 4731 bp product from *Bcl*II digestion of *LYS21* cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega). The *lys21* Δ ::*LEU2* construct was then PCR-amplified with the L1F2 and L1R2 deoxyoligonucleotides, producing a 3720 bp DNA fragment which was transformed into the CLA1 strain. Transformants were selected for leucine prototrophy and the interruption was verified by PCR; a 3720 bp product susceptible to *Kpn*I digestion indicated correct interruption. These strains were transformed with the *lys20* Δ ::*kanMX4* cassette obtained from strain Y33880 as described above, and then selected for G418 resistance; the insertion was verified as described for the CLA 1-2-21 strain.

Yeast was transformed following the method described by Ito *et al.* (1983). Transformants were selected for either leucine prototrophy on minimal medium (MM), or G418 (200 mg l⁻¹; Life Technologies) resistance on yeast extract-peptone-glucose (YPD) rich medium.

Growth conditions. Strains were routinely grown on MM containing salts, trace elements and vitamins, following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter-sterilized glucose (2%, w/v) or ethanol (2%, v/v) was used as carbon source, and 40 mM ammonium sulfate was used as a nitrogen source. The volume of flasks was five times that of the medium. Supplements needed to satisfy auxotrophic require-

ments were added at 20 mg l⁻¹ for uracil and 30 mg l⁻¹ for lysine. Cells were incubated at 30 °C with shaking (250 r.p.m.).

Construction of low-copy-number and high-copy-number plasmids bearing *LYS20* or *LYS21* genes. All standard molecular biology techniques were followed as described by Sambrook *et al.* (1989). *LYS20* or *LYS21* was PCR-amplified together with the respective 5' promoter sequence and cloned into either the pRS316 (*CEN6 ARSH4 URA3*) low-copy-number or pRS426 (2 μ ori *URA3*) high-copy-number plasmid (Sikorski & Hieter, 1989; Christianson *et al.*, 1992). For *LYS20*, a 2457 bp fragment was PCR-amplified using deoxyoligonucleotides *LYS20Fo* and *LYS20Re* with genomic DNA from strain BY4743. This DNA was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and subcloned into *NotI*-digested pRS426, generating plasmid pMUL20 (*LYS20* 2 μ *URA3*), which was used to transform the double mutant *CLA1-D*, thus generating the *LYS20*-overexpressing strain *CLA1-D-20M*. For *LYS21*, a 2212 bp fragment was PCR-amplified with the deoxyoligonucleotides *L1F2* and *L1R2* described above; this fragment was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and subcloned into *NotI*-digested pRS426, generating plasmid pMUL21 (*LYS21* 2 μ *URA3*), or into *XhoI-NotI*-digested pRS316, generating plasmid pMON21 (*LYS21* *CEN URA3*). The *LYS21*-overexpressing strain *CLA1-D-21M* was obtained by transforming the double mutant *CLA1-D* with pMUL21. The *LYS21*-complemented strain *CLA1-2-20C1* was obtained by transforming the *lys21* Δ single mutant (*CLA1-2-20*) with pMON21. Control strains *CLA1-2M* and *CLA1-DM* were constructed by transforming the wild-type *CLA1-2* and the double mutant *CLA1-D* with pRS426; the *CLA1-2C* control strain was constructed by transforming wild-type *CLA1-2* with plasmid pRS316. All transformants were selected for uracil prototrophy.

Construction of *LYS21* and *LYS20* chimerical fusion plasmids.

To obtain the fusion containing the promoter sequence of *LYS21* and the coding sequence of *LYS20*, an overlapping PCR amplification was performed. The *LYS21* promoter was amplified with primers Q110PFo (5'-GAA CGA AGC AAA TCC TAC GAG TAA ATA CAT AAG-3') and Q110PRe (5'-ATT TGG TTT AGC AGC AGT CAT GGT TTG TTA AAG TAT ACA ATT ACT-3'); the 637 bp product contained the 5' cognate sequence and the first 21 bp of the *LYS20* coding sequence (indicated in bold type), and plasmid pMUL21 was used as a template. The 1469 bp PCR product of primers Q110CFo (5'-GAC TGC TGC TAA ACC AAA TCC ATA TGC T-3') and *LYS20Re* comprised the *LYS20* coding region and 182 bp after the stop codon; the annealing temperature was 59 °C, and plasmid pMUL20 was used as template. The overlapped amplification produced the 2085 bp fusion and the reaction was carried out at an annealing temperature of 50 °C. This PCR product was cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and subcloned into *NotI*-digested pRS426, generating plasmid pMULQ10 (5'*LYS21-LYS20* 2 μ *URA3*), which was transformed into the double mutant *CLA1-D* to obtain strain *CLA1-D-Q10*.

Cell extract preparation and enzyme assay. Cells were cultured to exponential growth phase [OD₆₀₀ 0.4–0.6 in a spectrophotometer (LKB Ultrospec III; Pharmacia) with 1 cm path length], harvested by centrifugation and washed with cold water. Extract preparation was performed following the protocol described by Ramos & Wiame (1985). Enzymic activity was determined by the 2,6-dichloroindophenol (DCIP) colorimetric method described by Andi *et al.* (2004b), in a final volume of 0.5 ml; 50 mM HEPES, pH 7.2, 0.1 mM DCIP, 0.5 mM AcCoA and 40 mM α -KG. All assays were performed at 30 °C in a Varian Cary 400 spectrophotometer with a 1 cm path length. After 5 min thermal equilibration and completion of the reaction provoked by the contaminant CoA present in the commercial AcCoA preparation with DCIP, the assay was started with dialysed cell-free extract (0.2 mg protein), and the initial

reaction rate was obtained from the change in OD₆₀₀. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) and BSA as a standard.

Preparation of a chromatographic fraction and stabilization of *Lys21p*.

Lys21p was obtained from MM-glucose-grown cultures of strain *CLA1-D-21M*. Cells were harvested by centrifugation when cultures reached an OD₆₀₀ of 1.2–1.4; the cells were disrupted with glass beads. A 0.5 ml volume of non-dialysed extract was used for gel filtration on a Superdex S-200 column (15 × 300 mm; GE Healthcare Life Sciences) equilibrated with HEPES (50 mM, pH 7.2, flowing at 0.5 ml min⁻¹). Fractions with *Lys21p* activity were mixed with an equal volume of 2 M trehalose prepared in HEPES (50 mM, pH 7.2). In this solution, *Lys21p* activity was constant for 24 h if maintained on ice; the protein concentration was 4 mg ml⁻¹. Stabilization procedures described elsewhere for *Lys20*, based on the use of a combination of 100 mM α -cyclodextrin, 600 mM ammonium sulfate and 100 mM guanidinium chloride as stabilizing agents (Andi *et al.*, 2004b), did not allow *Lys21p* stabilization; this was achieved in the presence of 1 M trehalose.

Enzyme kinetics and analysis of kinetic data. Homocitrate synthase activity was assayed using DCIP as an oxidant of the CoA produced in the reaction, as described by Andi *et al.* (2004b). The final volume of the assay was 0.5 ml containing 50 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM trehalose, 0.1 mM DCIP, and variable concentrations of α -KG, AcCoA and lysine. All assays were carried out at 30 °C in a Varian Cary 400 spectrophotometer with a 1 cm path length. The assay was started with 0.2 mg protein. Initial velocity measurements, when α -KG was the varied substrate, were done at an AcCoA concentration of 0.2 mM. When AcCoA concentration was varied, α -KG was maintained at 50 mM. Kinetic data were analysed by non-linear regression using the program Origin 7.0 (OriginLab).

Northern blot analysis. Northern analysis was carried out as described previously (Valenzuela *et al.*, 2001). Total yeast RNA was prepared as described by Struhl & Davis (1981) from exponentially grown cells (OD₆₀₀ 0.4–0.6) in 100 ml cultures. Given the high identity of *LYS20* and *LYS21*, small radioactive PCR products near the stop codon were used as probes to reduce cross-hybridization. For *LYS20*, a 108 bp product was amplified with primers NLYS20Fo2 (5'-GGT CAG CAC TCC TCA AGT AC-3') and NLYS20Re2 (5'-TAG GCG GAT GGC TTA GTC C-3'). For *LYS21*, a 107 bp PCR product was amplified with NLYS21Fo2 (5'-ATT GAG CAC CCC ACT TTT AAA ACC-3') and NLYS21Re2 (5'-GAA ACT ATT TGG TGA CCT TTG CC-3'). A *BamHI-HindIII* 1599 bp restriction fragment of *ACT1* was used as an internal loading standard. Blots were scanned using the program ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

Gel electrophoresis and immunoblotting. Protein extracts obtained from the pertinent strains were subjected to SDS-PAGE, performed with 10% slab gels, and transferred to nitrocellulose membranes. Incubation with antibodies was done as described elsewhere (Towbin *et al.*, 1979). Mouse anti-yeast homocitrate synthase mAbs 31F5 from EnCor Biotechnology were used at a dilution of 1:200. Peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies were diluted 1:1000. Immunoblot signalling was optimized by analysing a number of combinations of antigen and antibody concentrations in the linear range of detectability.

Metabolite extraction and analysis. Cell-free extracts were prepared by quenching the cells in cold methanol, as described previously (González *et al.*, 1997). Samples for intracellular lysine determination were deproteinized with perchloric acid. Intracellular lysine was determined by HPLC with an Ultrasphere ODS C18 column (Beckman Coulter) with *ortho*-phthalaldehyde (OPA) derivatization and a mobile phase of 75% methanol and 25% 0.1M

potassium acetate buffer (pH 5.5) flowing at 1.5 ml min⁻¹. Intracellular α -KG was determined following the method described previously (González *et al.*, 1997). For biomass determination, a dry weight calibration curve was produced for different optical densities.

RESULTS

Under respiratory conditions, lack of *LYS21* results in lysine bradytrophy

To analyse the physiological role of Lys20p and Lys21p, single and double *lys20Δ* and *lys21Δ* mutants were constructed. As Table 2 shows, a double *lys20Δ lys21Δ* mutant displayed full lysine auxotrophy on both glucose- and ethanol-supplemented media. Both of the two single mutants (*lys20* or *lys21*) showed wild-type growth when grown on MM supplemented with glucose as the carbon source (Table 2). Determination of the intracellular lysine pool showed that single mutant strains had a lysine content which was half that found in the wild-type strain (Fig. 1a). These results indicated that a wild-type growth rate on glucose could be maintained through the action of a single homocitrate synthase isozyme, although lysine biosynthesis was reduced. When single mutants were incubated with ethanol as the carbon source, growth of the *lys20Δ* mutant was similar to that of the wild-type strain; however, a lack of *LYS21* resulted in a diminished growth rate (Table 2). This effect was alleviated when lysine was added to the medium or when the *lys21Δ* mutant harboured a centromeric plasmid bearing *LYS21* (Table 2). When growth rates of the wild-type and *lys21Δ* mutant were analysed using Student's *t* test, a *P* value of 1.3×10^{-5} was obtained, indicating that the growth difference between the

two strains was significant. Accordingly, the *lys21Δ* mutant showed an almost threefold lower lysine pool as compared with that found in the wild-type strain, while the lysine pool present in the *lys20Δ* mutant was only twofold lower than that found in the reference strain (Fig. 1a). Student's *t* test performed on the lysine pool values for the *lys20Δ* and *lys21Δ* mutants confirmed that the difference in lysine pools between these two strains was significant (*P*=0.001). It could thus be concluded that lack of Lys21p resulted in lysine bradytrophy under respiratory conditions, which could not be compensated for by *LYS20*, suggesting that Lys21p is the main contributor to the lysine pool under respiratory conditions.

LYS21 expression is not induced under respiratory conditions

To determine whether the role of Lys21p in ethanol-grown cultures was related to increased *LYS21* expression under these conditions, its transcriptional regulation was analysed under fermentative and respiratory conditions. Northern blot analysis was carried out on total RNA extracted from exponentially grown cells on MM with glucose or ethanol as carbon sources. As Fig. 2(a) shows, *LYS21* expression was similar on samples obtained from both glucose- and ethanol-grown cultures, in the wild-type and in the *lys20Δ* mutant strain background. Conversely, *LYS20* expression was increased twofold when the wild-type strain was grown on ethanol as carbon source as compared with that found on glucose. In a *lys21Δ* background, *LYS20* expression showed an additional increase, suggesting that expression of Lys21p represses *LYS20* transcriptional activation. *LYS20* expression showed a 33-fold increase when RNA was

Table 2. Growth rates

Cells were grown on minimal media with the indicated carbon source. Specific growth rate was determined during exponential phase. Values are presented as means \pm SD from three independent experiments.

Strain	Specific growth rate (h ⁻¹)	
	Glucose	Ethanol
CLA1-2 (<i>LYS20 LYS21</i>)	0.305 \pm 0.019	0.071 \pm 0.002
CLA1-2-21 (<i>lys20Δ LYS21</i>)	0.289 \pm 0.003	0.069 \pm 0.003
CLA1-2-20 (<i>LYS20 lys21Δ</i>)	0.284 \pm 0.007	0.060 \pm 0.003
CLA1-2-20 (<i>LYS20 lys21Δ</i>) + Lys*	0.310 \pm 0.012	0.073 \pm 0.002
CLA1-D (<i>lys20Δ lys21Δ</i>)	0	0
CLA1-D (<i>lys20Δ lys21Δ</i>) + Lys*	0.296 \pm 0.008	0.071 \pm 0.003
CLA1-2C [CLA1-2/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)]	0.229 \pm 0.008	0.075 \pm 0.004
CLA1-2-20C1 [CLA1-2-20/pMON21 (<i>LYS21</i> CEN <i>URA3</i>)]	0.238 \pm 0.004	0.071 \pm 0.005
CLA1-2M [CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	0.233 \pm 0.001	0.068 \pm 0.003
CLA1-D-21M [CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.235 \pm 0.003	0.059 \pm 0.004
CLA1-D-20M [CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.221 \pm 0.002	0.049 \pm 0.004
CLA1-D-21M [CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)] + Lys*	0.239 \pm 0.004	0.069 \pm 0.007
CLA1-D-20M [CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)] + Lys*	0.245 \pm 0.004	0.066 \pm 0.003
CLA1-D-Q10 [CLA1-D/pMULQ10 (5' <i>LYS21</i> - <i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	0.219 \pm 0.006	0.050 \pm 0.002

*The medium was supplemented with 30 mg lysine l⁻¹.

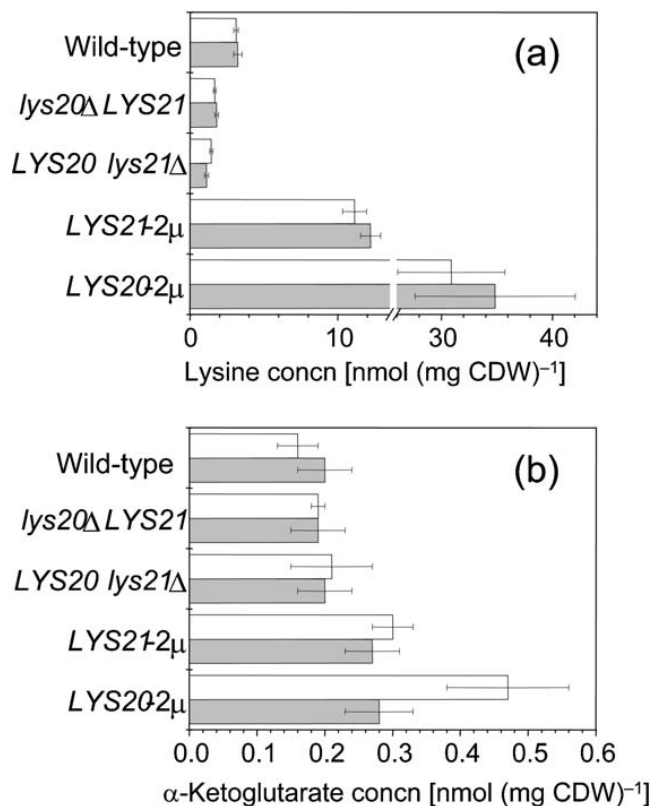


Fig. 1. Intracellular concentration of lysine and α -KG in extracts obtained from glucose- or ethanol-grown cells. Yeast cells were grown on MM supplemented with glucose (white bars) or ethanol (grey bars) and harvested during exponential growth. Cell-free extracts were prepared as described in Methods. (a) Lysine concentration; (b) α -KG concentration. Values for intracellular metabolites are relative to cell dry weight (CDW) and are presented as mean \pm SD of three independent experiments. Strains used were: CLA1-2 (wild-type), CLA1-2-21 (*lys20Δ LYS21*), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21Δ*), CLA1-D-21M (*LYS21-2μ*) and CLA1-D-20M (*LYS20-2μ*).

prepared from glucose-grown cells harbouring *LYS20* on a multicopy plasmid, as compared with expression in a wild-type strain (Fig. 2b), suggesting that when *LYS20* is overexpressed, the increased lysine pool would depend on the production of a high α -AASA pool that could result in Lys14p-mediated transcriptional activation. When RNA was prepared from ethanol-grown cells, *LYS20* expression was 72-fold higher as compared with that found in the glucose-grown wild-type strain (Fig. 2b), confirming that *LYS20* expression is induced under respiratory conditions. Overexpression of *LYS21* resulted in only a twofold increase in transcript content on glucose, in agreement with the fact that Lys21p sensitivity to lysine would prevent excessive α -AASA accumulation and Lys14p-dependent transcriptional activation. When RNA was extracted from ethanol-grown cultures, *LYS21* expression attained sevenfold derepression as compared with that found in the

wild-type strain grown on glucose or ethanol. Thus, increased expression of *LYS21* in ethanol was only observed when this gene was present on a multicopy plasmid, suggesting that ethanol-dependent induction of *LYS21* was small and was only amplified when the gene was present at a higher dose. It can thus be concluded that *LYS21* expression is not significantly affected by the nature of the carbon source, while that of *LYS20* is upregulated when ethanol is used as the sole carbon source. These results apparently contradict the observations presented above that indicate that Lys21p plays a major role in lysine biosynthesis under respiratory conditions, and hence that increased *LYS21* expression could be expected under respiratory conditions. To further analyse this matter, homocitrate synthase activity in extracts obtained from the pertinent strains grown under fermentative or respiratory conditions was determined.

Lys21p is the predominant isoform under respiratory conditions

Homocitrate synthase enzymic activity was assayed in extracts obtained from exponentially grown cultures incubated on either glucose or ethanol as carbon source. As Table 3 shows, extracts from the wild-type strain obtained from either glucose- or ethanol-grown cells displayed similar specific activity, indicating that increased *LYS20* expression on ethanol did not correspond to increased activity in the wild-type strain. Determination of homocitrate synthase activity in extracts obtained from glucose-grown cells showed that lack of either Lys21p or Lys20p resulted in a similar decrease in homocitrate synthase specific activity as compared with that found in the wild-type strain. The differential contribution of Lys20p and Lys21p to homocitrate synthase activity was evidenced when activity was determined in extracts obtained from ethanol-grown cells, showing that a *lys21Δ* mutant only retained 25% of the wild-type activity, while a *lys20Δ* mutant retained 70%. This indicates that under respiratory conditions Lys21p constitutes the major isoform, suggesting that this enzyme could play a critical role in lysine biosynthesis under respiratory conditions (Table 3).

LYS21 overexpression resulted in a 2.5-fold increased enzymic activity on both glucose and ethanol as compared with the wild-type strain, thus the sevenfold increased transcription of *LYS21* on ethanol did not result in a correspondingly increased enzymic activity. Similarly, overexpression of *LYS20* from either its own promoter or the *LYS21* promoter region resulted in a three- to fourfold increase in activity in extracts obtained from cultures grown on either glucose- or ethanol-supplemented media as compared with that found in the *lys21Δ* mutant, which could suggest a gene dose effect. However, the 33- and 72-fold increase in *LYS20* expression observed on glucose and ethanol, respectively, as compared with that of the wild-type strain grown on glucose, was not correlated with a

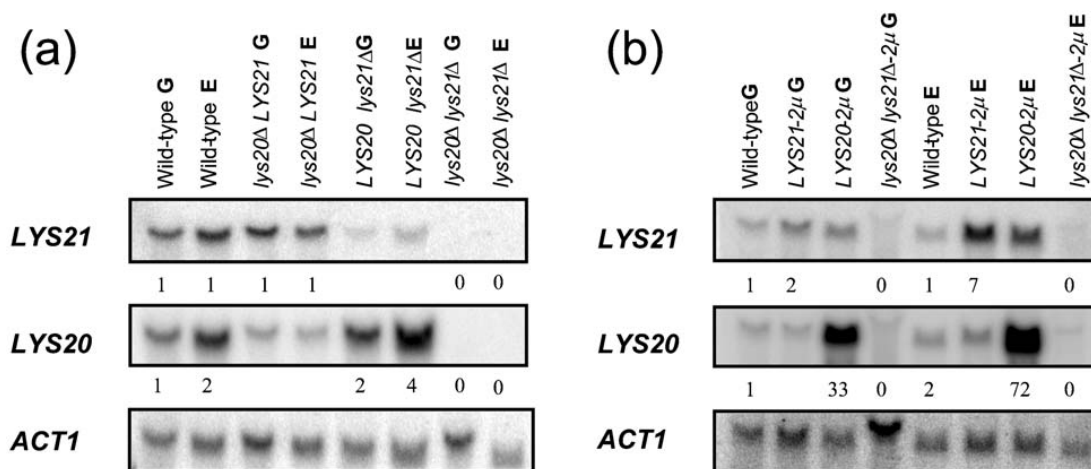


Fig. 2. *LYS20* expression is induced under respiratory conditions. Northern analysis was carried out on total RNA obtained from the wild-type and mutant strains carrying single or double *lys20* or *lys21* mutations (a), and from the double mutant *lys20Δ lys21Δ* carrying the 2 μ plasmid pRS426, harbouring either *LYS20* or *LYS21* (b). Cells were grown on glucose (G) or ethanol (E). Strains used were: CLA1-2 (wild-type), CLA1-2-21 (*lys20Δ LYS21*), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21Δ*), CLA1-D (*lys20Δ lys21Δ*), CLA1-D-21M (*LYS21-2μ*), CLA1-D-20M (*LYS20-2μ*) and CLA1-DM (*lys20Δ lys21Δ-2μ*). Numbers indicate relative expression, as compared with the wild-type strain grown on glucose. Lanes without numbers indicate cross-hybridization. Filters were sequentially probed with the *LYS20*- or *LYS21*-specific PCR products described in Methods. A *Bam*HI–*Hind*III 1500 bp *ACT1* DNA fragment was used as a loading control. Four biological replicates were performed, and the results of representative experiments are shown.

corresponding increment in enzymic activity, suggesting that a post-transcriptional control limited *LYS20* mRNA translation or Lys20p activity. Ethanol-induced expression of *LYS21* did not result in increased enzymic activity, suggesting that Lys21p could also be modulated by a post-transcriptional mechanism, but to a lesser extent than Lys20p, since Lys21p specific activity on glucose was similar to that found on ethanol, while that of Lys20p invariably decreased on ethanol.

To determine the relative abundance of Lys20p and Lys21p, Western blot analysis was carried out. As shown in Fig. 3(a), lanes carrying extracts from the *LYS20 lys21Δ* mutant were loaded with an amount of protein that was sixfold higher than that used for the wild-type and *lys20Δ LYS21* mutant strains. A similar amount of Lys21p was detected when extracts were prepared from the *lys20Δ* mutant grown on either glucose or ethanol (Fig. 3a). However, a smaller amount of Lys20p antigen as compared with that

Table 3. Homocitrate synthase specific activities

Cells were grown on minimal medium with the indicated carbon source and harvested during exponential growth (OD₆₀₀=0.4–0.6). Values are presented as means \pm SD from three independent experiments. ND, Not detected.

Strain	Specific activity (nmol h ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
	Glucose	Ethanol
CLA1-2 (<i>LYS20 LYS21</i>)	162 \pm 12	198 \pm 18
CLA1-2-21 (<i>lys20Δ LYS21</i>)	114 \pm 12	138 \pm 12
CLA1-2-20 (<i>LYS20 lys21Δ</i>)	84 \pm 12	49 \pm 6
CLA1-2C [CLA1-2/pRS316 (CEN <i>URA3</i>)]	150 \pm 12	186 \pm 18
CLA1-2-20C1 [CLA1-2-20/pMON21 (<i>LYS21</i> CEN <i>URA3</i>)]	204 \pm 18	192 \pm 12
CLA1-D (<i>lys20Δ lys21Δ</i>)	ND	ND
CLA1-2M [CLA1-2/pRS426 (2 μ <i>URA3</i>)]	150 \pm 12	192 \pm 18
CLA1-D-21M [CLA1-D/pMUL21 (<i>LYS21</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	414 \pm 42	456 \pm 42
CLA1-D-20M [CLA1-D/pMUL20 (<i>LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	259 \pm 24	185 \pm 9
CLA1-D-Q10 [CLA1-D/pMULQ10 (5' <i>LYS21-LYS20</i> 2 μ <i>URA3</i>)]	229 \pm 23	163 \pm 17

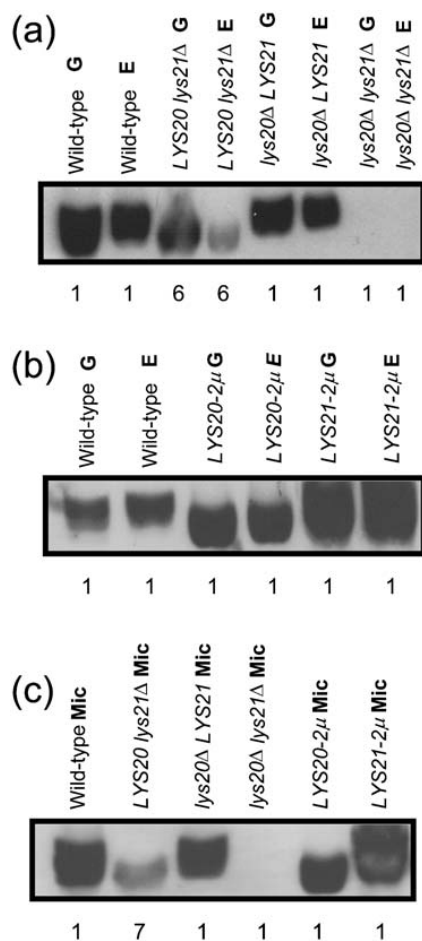


Fig. 3. Lys20p concentration is reduced under respiratory conditions. Cell-free extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using an anti-homocitrate synthase mAb. (a) Wild-type and mutant strains carrying single or double *lys20Δ* or *lys21Δ* mutations. (b) Double mutant *lys20Δ lys21Δ* carrying the 2μ plasmid pRS426, harbouring either *LYS20* or *LYS21*. In (a) and (b), cells were grown with shaking at 250 r.p.m. on either 2% glucose (G) or 2% ethanol (E). (c) Strains were grown in static cultures with 2% glucose as the sole carbon source; Mic, microaerophilic conditions. Numbers represent the relative amount of total protein loaded in each lane; in panels (a) and (b) the number 1 corresponds to 30 μg and in panel (c) to 15 μg. Lanes corresponding to the CLA1-2-20 strain (*LYS20 lys21Δ*) were loaded with sixfold more total protein than the lanes shown in panel (a) and sevenfold more total protein than the other lanes in panel (c). Strains used were: CLA1-2 (wild-type), CLA1-2-20 (*LYS20 lys21Δ*), CLA1-2-21 (*lys20Δ LYS21*), CLA1-D (*lys20Δ lys21Δ*), CLA1-D-20M (*LYS20-2μ*) and CLA1-D-21M (*LYS21-2μ*).

detected for Lys21p was found in extracts obtained from the *lys21Δ* mutant, grown on either glucose or ethanol, indicating that the Lys20p concentration was lower than that of Lys21p; this was particularly evident in extracts obtained from ethanol-grown cells. Furthermore, extracts obtained from the glucose-grown wild-type strain showed

a higher amount of antigen than those prepared from ethanol-grown cells, again showing that under these conditions Lys20p was less abundant than Lys21p. No signal was detected when extracts were prepared from the double mutant *lys20Δ lys21Δ*. Immunoblotting of extracts prepared from *lys20Δ lys21Δ* double mutants carrying *LYS20* or *LYS21* on multicopy plasmids showed that a smaller amount of Lys20p was detectable under either fermentative or respiratory conditions than that found for Lys21p (Fig. 3b).

Since it has been shown elsewhere that homocitrate synthase from *Schizosaccharomyces pombe* is a labile target of oxidative stress (Kwon *et al.*, 2006), we decided to analyse whether Lys20p post-transcriptional modification could be prevented under microaerophilic conditions. The various strains were grown as static cultures on MM with 2% glucose. As Fig. 3(c) shows, the amount of signal detected when extracts were prepared from the *lys21Δ* mutant was lower than those observed in extracts either from the wild-type strain or the *lys20Δ* mutant, even though a sevenfold higher amount of extract was used for the *lys21Δ* mutant. A similar result was found for extracts of the double mutant *lys20Δ lys21Δ* carrying *LYS20* or *LYS21* on multicopy plasmids (Fig. 3c). These results show that Lys20p concentration is negatively regulated by a post-transcriptional control that is more stringent when yeasts are grown on ethanol as carbon source and is independent of the aeration conditions. These results indicate that Lys20p has a higher capacity than Lys21p to synthesize lysine, since the lower homocitrate synthase activity detected in the presence of *LYS20* on a multicopy plasmid allowed a threefold higher lysine accumulation, as compared with that found when *LYS21* was carried on a multicopy plasmid (Fig. 1a, Table 3).

The results presented above suggest that Lys20p activity is controlled through mechanisms that constrain its capacity to biosynthesize lysine, and that under respiratory conditions Lys21p is the predominant isoform. To better understand the properties of Lys21p that enable it to play a major role under respiratory conditions, we decided to analyse its kinetic properties.

Lysine inhibition of Lys21p induces co-operativity towards α-KG

To obtain a stabilized Lys21p preparation, crude extracts obtained from a glucose-grown *lys20Δ lys21Δ* double mutant harbouring *LYS21* on a multicopy plasmid were filtered through a Superdex S-200 column; fractions showing homocitrate synthase activity were mixed with a trehalose solution to reach a 1 M final concentration immediately after elution. Specific activity was increased fourfold, metabolites present in the crude extract were eliminated and Lys21p was eluted with proteins that did not interfere with the enzyme assay, since the pertinent controls did not show non-specific DCIP reduction.

In the absence of lysine, the Lys21p preparation displayed Michaelian kinetics, and the corresponding initial velocity patterns revealed that $K_m \alpha\text{-KG}$ values were independent of AcCoA concentrations and vice versa (data not shown). This implies that $K_m \alpha\text{-KG}$ is a valid parameter, even if it was not obtained at saturating substrate concentration. The K_m values were 9.0 ± 0.1 and 0.019 ± 0.002 mM for $\alpha\text{-KG}$ and AcCoA, respectively. These values were similar to those reported for the Lys20p isoform (Andi *et al.*, 2005). The specific activity of a typical preparation was $1.50 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$. In order to compare these values with those displayed by the non-stabilized enzyme, assays were performed immediately after elution from the gel filtration column. For this preparation, the K_m values were 4.5 mM for $\alpha\text{-KG}$ and 0.017 mM for AcCoA; specific activity was $1.4 \mu\text{mole h}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Earlier work at other laboratories had indicated that Lys20p displays hyperbolic kinetics, that lysine behaves as a competitive inhibitor with respect to $\alpha\text{-KG}$ binding, and that this isoform is less sensitive to lysine inhibition than Lys21p (Andi *et al.*, 2004a, b, 2005; Feller *et al.*, 1999). Using the above described preparation of Lys21p, it was found that the inhibitory effect of lysine, resulted in: (i) induction of positive co-operativity with respect to $\alpha\text{-KG}$ utilization; (ii) a decrease in V_{max} , which reached a minimum value at saturating concentrations of lysine; and (iii) a reduction of Lys21p affinity towards $\alpha\text{-KG}$ (Fig. 4a, b). The observed co-operativity varied with lysine concentration, disappearing at zero and at saturating concentrations of this ligand; at both extremes the enzyme displayed hyperbolic kinetics. Co-operativity was maximal at 0.12 mM lysine. The dependence of co-operativity upon lysine concentration was analysed by fitting the kinetic data to the Hill equation (Segel, 1975) and by plotting the corresponding Hill coefficients as a function of the log of inhibitor concentration (Fig. 4b). This semi-log plot shows the characteristic bell-shaped curve of a typical allosteric

inhibitor. The K_i of allosteric inhibition for Lys21p was 0.053 mM, which is 10-fold lower than that reported for Lys20p competitive inhibition (Andi *et al.*, 2005). This value was calculated using the Monod, Wyman and Changeux symmetry model considering a mixed K and V system in which the inhibitor binds exclusively to the T state of the enzyme (Monod *et al.*, 1965).

The observed co-operativity could not be attributed to other components of the Lys21p stabilized preparation that was used for the kinetic studies, since it was only induced when lysine was added. When the AcCoA concentration was varied in the presence of lysine, Lys21p displayed Michaelian kinetics, and both V_{max} and $K_m \text{AcCoA}$ were reduced (data not shown). Modulation of homocitrate synthase activity by AcCoA is not likely to occur *in vivo*, since the intracellular concentration of this substrate is considered to be at saturation (Andi *et al.*, 2005). The fact that the $\alpha\text{-KG}$ intracellular concentration is similar to the $K_m \alpha\text{-KG}$ for both Lys20p (Andi *et al.*, 2005) and Lys21p suggests that this substrate and not AcCoA modulates the catalytic activity of these enzymes.

The results presented above indicate that despite their high sequence identity, homocitrate synthase isozymes show significant differences in their kinetic behaviour, which could result in a differential response to the concentration of substrates *in vivo*, and thus in distinct physiological roles. The low lysine sensitivity of Lys20p allows high homocitrate production, whereas the high lysine sensitivity and induced co-operativity of Lys21p allow this isoform to balance $\alpha\text{-KG}$ utilization for lysine biosynthesis and other metabolic processes.

In order to analyse whether increased lysine biosynthesis could have detrimental effects, growth rate and metabolite intracellular concentration were determined in strains overexpressing either *LYS20* or *LYS21*.

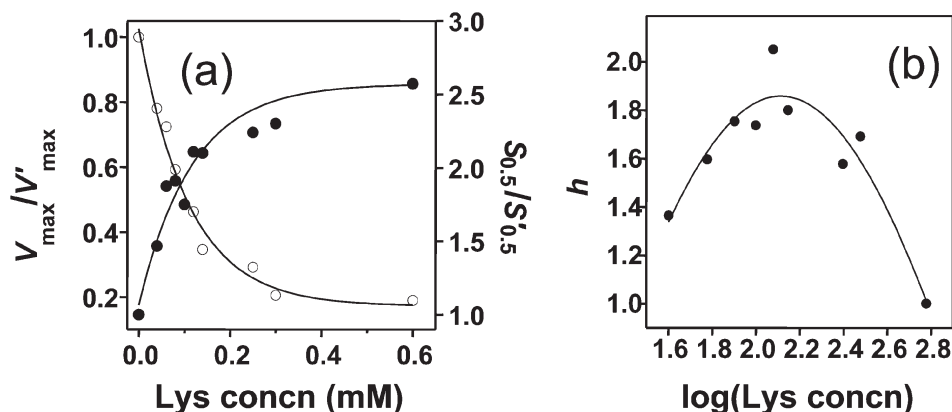


Fig. 4. Effect of lysine on the kinetic parameters of Lys21p. In (a) and (b), the experimental data were fitted to the Hill equation and the resulting parameters were plotted as a function of lysine concentration. (a) Graph of the normalized apparent V_{max} values (\circ) and $S_{0.5}$ (\bullet) as a function of lysine concentration. V'_{max} and $S'_{0.5}$ are the values obtained in the absence of lysine. (b) Plot of the Hill coefficient (h) values versus log of lysine concentration (in μM).

Overexpression of either *LYS20* or *LYS21* decreases the growth rate under respiratory conditions

When a *lys20Δ lys21Δ* double mutant carrying *LYS20* on a multicopy plasmid was grown on either glucose or ethanol, it accumulated a 10-fold higher lysine pool than that of the wild-type strain, and threefold higher than that displayed by the double mutant carrying *LYS21* on a multicopy plasmid (Fig. 1a). As Table 2 shows, high lysine accumulation is accompanied by a diminution of growth rate on ethanol, while this effect was not observed with glucose as the carbon source. These results suggest that high lysine biosynthesis could result in a decreased growth rate when ethanol is provided as the carbon source, probably due to unbalanced utilization of tricarboxylic cycle intermediates. Determination of α -KG pools showed that the wild-type strain and single mutants displayed an equivalent α -KG pool when grown on either glucose or ethanol, since these strains did not overproduce lysine. However, strains carrying *LYS20* or *LYS21* on a multicopy plasmid showed a higher α -KG pool than the wild-type strain when these were grown on glucose (Fig. 1b). This suggests that increased lysine biosynthesis and its consequent accumulation in the vacuole could operate as a driving force, increasing production of metabolites from glucose to α -KG with a concomitant increase the α -KG pool (Fig. 1a, b). This was more evident when *LYS20* was overexpressed, confirming that Lys20p had a higher capacity to synthesize lysine than Lys21p. In the presence of ethanol as carbon source, the α -KG pool detected in strains carrying either *LYS20* or *LYS21* on multicopy plasmids showed a very slight increment as compared with the wild-type, suggesting that flux of intermediates through the α -KG-producing pathways cannot be increased further. Nonetheless, lysine pools show similar levels to those found on glucose. It could thus be considered that under respiratory conditions, overexpression of either *LYS20* or *LYS21* could result in a metabolic imbalance, affecting growth rate. This effect was abolished after addition of lysine to the media (Table 2), suggesting that lysine counteracts the above-described phenotype by repressing expression of the paralogous genes or by directly inhibiting the isozymes.

DISCUSSION

This study addresses the question of whether Lys20p and Lys21p play overlapping or distinct physiological roles and whether these roles are involved in the inherent capacity of *S. cerevisiae* to grow under fermentative and respiratory conditions. Results presented in this paper show: (i) that lysine is a strong inhibitor of Lys21p and induces cooperativity towards α -KG; (ii) that Lys21p is needed to sustain wild-type growth under respiratory conditions; and (iii) that Lys20p has a higher capacity to synthesize lysine, and its intracellular concentration is reduced under respiratory conditions.

Under fermentative conditions, *LYS20*- and *LYS21*-encoded enzymes play redundant roles

Under fermentative conditions, single mutants devoid of Lys20p or Lys21p produce a lysine pool which is approximately half that detected in the wild-type strain, however, wild-type growth is supported by any of these mutant strains. Even when *LYS21* or *LYS20* is overexpressed four- to tenfold in glucose or lysine pools, respectively, the growth rate is not reduced; the selective use of α -KG for lysine biosynthesis appears not to be critical for growth under fermentative conditions. These results are in agreement with previous observations that α -KG drainage to glutamate biosynthesis is not deleterious to fermentative growth (DeLuna *et al.*, 2001). Thus under fermentative conditions, *LYS20* and *LYS21* play redundant roles and the simultaneous activity of both Lys20p and Lys21p has an additive effect, which is required to attain wild-type lysine pools.

S. cerevisiae is unable to utilize lysine as a nitrogen or carbon source (Watson, 1976); thus, it could be considered that this amino acid plays a distinct metabolic role. In this regard, evidence has begun to appear that suggests that lysine contributes to the build-up of the stress response due to H₂O₂ treatment (Stephen & Jamieson, 1997) or to the prevention of the apoptotic response provoked by amino acid starvation (Eisler *et al.*, 2004). These considerations are further supported by the fact that *LYS20* and *LYS21* expression is equivalent in glucose-grown cells, in contrast to what happens with the duplicate pair *GDH1* and *GDH3*, whereby expression of *GDH3* is completely repressed under fermentative conditions (Avenidaño *et al.*, 2005; DeLuna *et al.*, 2001). It would thus seem that the evolution of the regulatory system that determines *LYS20* and *LYS21* transcriptional regulation has maintained the expression of both genes, which probably means that high lysine biosynthesis takes precedence if cells are exposed to particular stressful conditions.

Biochemical specialization of Lys20p and Lys21p results in distinct kinetic properties, which are critical to sustaining wild-type growth under respiratory conditions

Kinetic characterization of Lys21p showed that its activity is strongly inhibited by lysine, which in addition induces cooperativity for α -KG binding. The fact that *Yarrowia lipolytica* homocitrate synthase has also been found to display a cooperative kinetic behaviour similar to the one described herein for Lys21p (Gaillardin *et al.*, 1976) is worthy of mention. Conversely, *LYS20*-encoded homocitrate synthase does not display co-operative kinetics and is much less sensitive to lysine inhibition (Andi *et al.*, 2005). Hence, differential lysine sensitivity and induced co-operativity of Lys20p and Lys21p constitute key mechanisms modulating homocitrate synthase activity and thus lysine biosynthesis.

The kinetic behaviour of Lys21p is particularly relevant to sustaining respiratory metabolism. Single mutants devoid

of Lys21p show reduced growth on ethanol, while *lys20Δ* mutants grow as well as the wild-type. In addition, Lys20p activity is threefold lower than that displayed by Lys21p. Therefore, Lys20p is unable to compensate for a lack of *LYS21*, revealing a key role for Lys21p under non-fermentative conditions. Under fermentative or respiratory conditions, both Lys20p and Lys21p enzymic activities are needed to achieve wild-type lysine pools. Increased *LYS20* expression in ethanol-grown cultures could constitute an element counterbalancing Lys20p inactivation, assuring the presence of a certain amount of biologically active Lys20p, again emphasizing the fact that high lysine synthesis must be maintained, although only to a certain level, since excessive homocitrate synthase activity during respiratory growth is deleterious. When *LYS21* or *LYS20* is over-expressed, regulatory mechanisms restraining Lys20p and Lys21p activities are overwhelmed; thus, lysine is over-produced, although α -KG pools remain nearly equivalent to those found in the wild-type strain. This suggests that α -KG producing pathways are near their maximum capacity, and that uncontrolled lysine biosynthesis and its further transport into the vacuole could enhance the flow of intermediates from ethanol to lysine, limiting the amount of α -KG available to other pathways. In this regard it has been shown that specialization of the NADP-dependent glutamate dehydrogenases Gdh1p and Gdh3p results in a more relaxed distribution of α -KG to either glutamate biosynthesis or energy-yielding metabolism when cells are grown on a non-fermentable or limiting carbon source (DeLuna *et al.*, 2001).

Earlier studies have led to the proposition that Lys20p is responsible for most of the lysine produced under fermentative metabolism, while Lys21p is only important under extreme lysine limitation (Feller *et al.*, 1999). This is supported by the fact that *LYS20* disruption resulted in a 75% diminution of the intracellular lysine pool, as compared with the wild-type strain, and a concomitant decrease in enzymic activity, while a *lys21Δ* mutant showed lysine levels equivalent to those found in the wild-type strain. In addition, the fact that Lys21p was severely inhibited by lysine further supports a role for Lys21p under lysine limitation only. Our results agree with those reported by Feller *et al.* (1999) in the sense that strains that lack either *LYS20* or *LYS21* show a wild-type growth phenotype under fermentative conditions; however, the additive effect, reflected in lysine accumulation and homocitrate synthase enzymic activity, does not seem to be possible in the genetic background used by Feller *et al.* (1999). It could thus be considered that the particular strain used by those authors does not have the post-transcriptional regulatory system of our strain, and thus in this genetic background, Lys20p has no constraints and develops full activity. Feller *et al.* (1999) did not address the role of these enzymes under respiratory conditions; thus, it is not possible to definitively conclude whether the Lys20p post-transcriptional regulation herein described is absent in that particular genetic background. There are various

examples to document the fact that genetic background can result in striking physiological differences. Most outstanding have been the results obtained by Tate *et al.* (2006), which show that the role of Sit4p in the nuclear localization of the *GLN3*-encoded transcriptional activator is strain-dependent.

Concluding remarks

Genetic redundancy is a major feature of virtually all species; duplication of functional genes constitutes a source of new or specialized functions of the proteins. Duplicate genes that are retained either provide an increased dosage of the same product or go through a process of subfunctionalization, during which both copies of the gene lose a subset of their ancestral functions, while acquiring new properties (Force *et al.*, 1999; Lynch & Force, 2000). A similar example in amino acid biosynthesis is the specialization of the *GDH1*- and *GDH3*-encoded NADP-dependent glutamate dehydrogenases, whereby both genes are required for glutamate biosynthesis under fermentative and respiratory growth. For *GDH1* and *GDH3*, simultaneous changes in the kinetic properties and transcriptional regulation of both enzymes have resulted in a regulatory mechanism that supports facultative metabolism (Avendaño *et al.*, 2005; DeLuna *et al.*, 2001). Nonetheless, the case of *LYS20* and *LYS21* offers interesting differences compared with that of the glutamate biosynthesis isozymes. The analysis of *LYS20* and *LYS21* indicates that for growth under fermentative metabolism, both genes have been retained to increase gene dosage, meaning that the additive effect of both genes is needed to attain wild-type lysine pools. However, Lys21p–Lys20p diversification is essential for respiratory metabolism; here the amount and activity of Lys20p are strictly controlled to avoid increased carbon flux being channelled to produce lysine (Fig. 5). Under these conditions, Lys21p plays a determining role and can sustain wild-type growth by itself. It is noteworthy that both *LYS20* and *LYS21* are expressed under fermentative and respiratory conditions; thus, the evolution of the *cis*-acting elements has not led, as might be expected, to complete *LYS20* repression, again suggesting that the expression of this gene is required to allow high lysine pools.

This study confirms that nitrogen and carbon metabolism are co-ordinately modulated and that the genetic and metabolic regulation of the genes involved in nitrogen metabolism can be influenced by the nature of the carbon source. The diversification of Lys20p and Lys21p described adds to the growing list of yeast isozymes whose function has undergone modifications that enable facultative metabolism.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to L. Ongay, G. Codiz, and M. Sosa [Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad

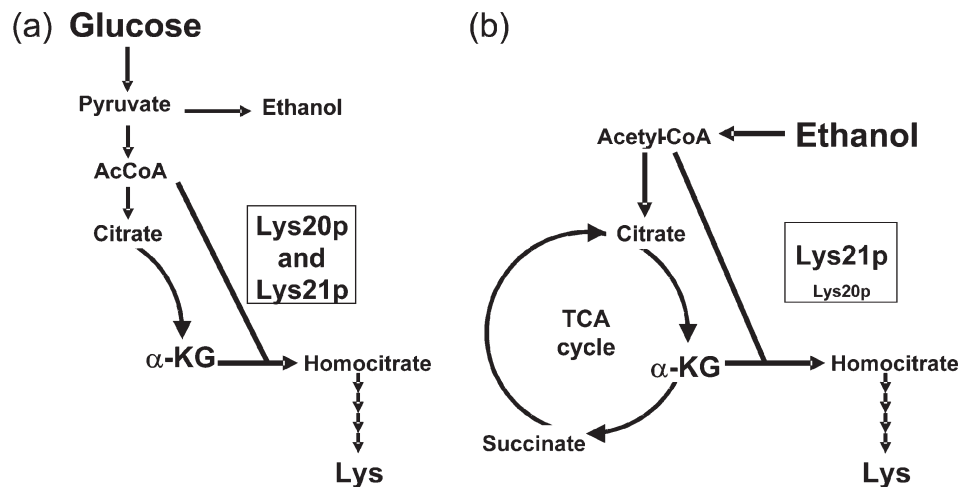


Fig. 5. Model depicting the importance of Lys20p or Lys21p for fermentative and respiratory growth. (a) During growth on glucose, homocitrate is produced by Lys20p and Lys21p; the Lys20p contribution is higher than under respiratory conditions. (b) During growth with ethanol as the carbon source, homocitrate is produced mainly by Lys21p; its strong lysine inhibition and co-operative properties allow this isoform to balance the use of α -KG for lysine biosynthesis and energy-yielding metabolism.

Nacional Autónoma de México (UNAM)] for DNA sequencing and synthesis of oligonucleotides; to A. Lucumi-Moreno for help during Lys21p partial purification; and to Z. SAVEDRA, P. SALAZAR, A. M. ESTRADA and G. X. AYALA for their help during amino acid determinations. We are indebted to D. GONZÁLEZ-HALPHEN for helpful discussions and critical review of the manuscript. This work was supported in part by the Dirección de Asuntos del Personal Académico, UNAM grant IN210706-3, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant 49970 and by the Macroproyecto de Tecnologías de la Información y la Computación, UNAM. H. Q. is the recipient of CONACYT fellowship 167247 and a grant (PAEP-Doctoral) from the Dirección General de Posgrado, UNAM.

REFERENCES

- Andi, B., West, A. H. & Cook, P. F. (2004a). Kinetic mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **43**, 11790–11795.
- Andi, B., West, A. H. & Cook, P. F. (2004b). Stabilization and characterization of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **421**, 243–254.
- Andi, B., West, A. H. & Cook, P. F. (2005). Regulatory mechanism of histidine-tagged homocitrate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. I. Kinetic studies. *J Biol Chem* **280**, 31624–31632.
- Avendaño, A., Riego, L., DeLuna, A., Aranda, C., Romero, G., Ishida, C., Vázquez-Acevedo, M., Rodarte, B., Recillas-Targa, F. & other authors (2005). Swi/SNF–GCN5–dependent chromatin remodelling determines induced expression of *GDH3*, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **57**, 291–305.
- Betterton, H., Fjellstedt, T., Matsuda, M., Ogur, M. & Tate, R. (1968). Localization of the homocitrate pathway. *Biochim Biophys Acta* **170**, 459–461.
- Chen, J. C. Y. & Powers, T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr Genet* **49**, 281–293.
- Chen, S., Brockenbrough, J. S., Dove, J. E. & Aris, J. P. (1997). Homocitrate synthase is located in the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**, 10839–10846.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. & Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119–122.
- DeLuna, A., Avendaño, A., Riego, L. & González, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* **276**, 43775–43783.
- Eisler, H., Frohlich, K. & Heidenreich, E. (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp Cell Res* **300**, 345–353.
- Feller, A., Dubois, E., Ramos, F. & Pierard, A. (1994). Repression of the genes for lysine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is caused by limitation of Lys14-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **14**, 6411–6418.
- Feller, A., Ramos, F., Pierard, A. & Dubois, E. (1999). In *Saccharomyces cerevisiae*, feedback inhibition of homocitrate synthase isoenzymes by lysine modulates the activation of *LYS* gene expression by Lys14p. *Eur J Biochem* **261**, 163–170.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. & Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531–1545.
- Gaillardin, C. M., Poirier, L. & Heslot, H. (1976). A kinetic study of homocitrate synthetase activity in the yeast *Saccharomyces lipolytica*. *Biochim Biophys Acta* **422**, 390–406.
- González, B., Francois, J. & Renaud, M. (1997). A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**, 1347–1356.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163–168.
- Kosuge, T. & Hoshino, T. (1998). Lysine is synthesized through the α -amino adipate pathway in *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 361–367.

- Kwon, E. S., Jeong, J. H. & Roe, J. H. (2006).** Inactivation of homocitrate synthase causes lysine auxotrophy in copper/zinc-containing superoxide dismutase-deficient yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**, 1345–1351.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- Lynch, M. & Force, A. (2000).** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**, 459–473.
- Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. & Compagno, C. (2007).** Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* **274**, 976–989.
- Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. (1965).** On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**, 88–118.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. & Marton, M. J. (2001).** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**, 4347–4368.
- Nishida, H. & Nishiyama, M. (2000).** What is characteristic of fungal lysine synthesis through the α -amino adipate pathway? *J Mol Evol* **51**, 299–302.
- Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T. & Yamane, H. (1999).** A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Res* **9**, 1175–1183.
- Piskur, J. (2001).** Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet* **17**, 302–303.
- Ramos, F. & Wiame, J. M. (1985).** Mutation affecting the specific regulatory control of lysine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **200**, 291–294.
- Ramos, F., Dubois, E. & Pierard, A. (1988).** Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a regulatory role of gene *LYS14*. *Eur J Biochem* **171**, 171–176.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Segel, I. H. (1975).** *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*, pp. 346–462. New York: Wiley.
- Sikorski, R. S. & Hieter, P. (1989).** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19–27.
- Stephen, D. W. S. & Jamieson, D. J. (1997).** Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSH1* gene by hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* **23**, 203–210.
- Struhl, K. & Davis, R. W. (1981).** Transcription of the *his3* gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **152**, 535–552.
- Takagi, H., Iwamoto, F. & Nakamori, S. (1997).** Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 405–411.
- Tate, J. J., Feller, A., Dubois, E. & Cooper, T. G. (2006).** *Saccharomyces cerevisiae* Sit4 phosphatase is active irrespective of the nitrogen source provided, and Gln3 phosphorylation levels become nitrogen source-responsive in a *sit4*-deleted strain. *J Biol Chem* **281**, 37980–37992.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.
- Valenzuela, L., Aranda, C. & González, A. (2001).** TOR modulates GCN4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**, 2331–2334.
- Watson, T. G. (1976).** Amino-acid pool composition of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth rate and amino-acid nitrogen source. *J Gen Microbiol* **96**, 263–268.
- Wolfe, K. H. & Shields, D. C. (1997).** Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708–713.
- Xu, H., Andi, B., Qian, J., West, A. H. & Cook, P. F. (2006).** The α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochem Biophys* **46**, 43–64.

Edited by: M. Tien

