



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Divergencia funcional de genes duplicados en
Saccharomyces cerevisiae.**

Tesis que presenta

Javier Israel Montalvo Arredondo

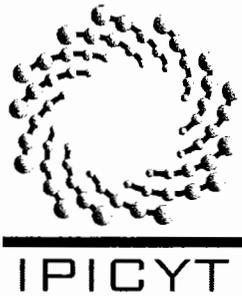
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2008



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Divergencia funcional de genes duplicados en *Saccharomyces cerevisiae***" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Javier Israel Montalvo Arredondo** y aprobada el **07 de 07 de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Lina Raquel Riego Ruiz
(Director)

Dr. Gerardo Argüello Astorga
(Asesor de la tesis)

Dr. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)

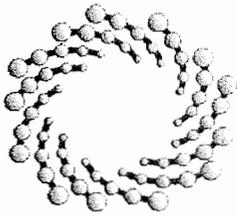


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el **Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**.

Este trabajo se realizó con apoyo del proyecto CONACYT-Fondos Sectoriales-**SEP-2005-49039** y del Macroproyecto **“Tecnologías para la Universidad de la Información y la Computación”**, UNAM

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 209255 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 051 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Javier Israel Montalvo Arredondo

sobre la Tesis intitulada:

Divergencia funcional de genes duplicados en Saccharomyces cerevisiae

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Martín
Secretario Académico



Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xiv
Abstract	xvi

INTRODUCCIÓN	1
La duplicación génica es la principal fuente de nuevo material genético	1
¿Cómo se duplican los genes?	2
El destino de los genes duplicados	2
Comparación del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con especies cercanas	6
Los intermediarios de la glucólisis son precursores en la biosíntesis de aminoácidos.	9
Materiales y métodos.	12
Búsqueda de elementos reguladores consenso conservados	12
Genes duplicados	12
Alineamiento de las secuencias	12
Búsqueda de secuencias consenso.	14
Divergencia funcional de la región codificante	15
Análisis del cambio en la tasa de substitución de aminoácidos en sitios específicos	15
Ensayos de complementación	15
Cepas utilizadas en este estudio	15

Amplificación de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>BAT</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i> y clonación en el vector pRS416. _____	16
Transformación de las levaduras _____	18
Selección de las levaduras transformantes _____	18
Medio mínimo + dextrosa + amonio _____	18
Medio mínimo + dextrosa + aminoácidos (L-valina, L-leucina, L-isoleucina) _____	19
RESULTADOS _____	21
Análisis de la región intergénica de los genes duplicados _____	21
Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina: <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> _____	21
Biosíntesis de glutamato: <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> _____	23
Biosíntesis de leucina: <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> _____	25
Biosíntesis de lisina: <i>LYS20</i> y <i>LYS21</i> _____	27
Biosíntesis de serina: <i>SER3</i> y <i>SER33</i> _____	30
Biosíntesis de metionina: <i>SAM1</i> y <i>SAM2</i> _____	32
Divergencia funcional _____	37
Transaminasa de valina, leucina e isoleucina: <i>Bat1p</i> y <i>Bat2p</i> _____	40
Glutamato deshidrogenasa <i>Gdh1p/Gdh3p</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	43
α -Isopropil-malato sintasa <i>Leu4p/Leu9p</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	46
3-fosfoglicerato deshidrogenasa <i>Ser3p/Ser33p</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	50
S- adenosil-metionin sintetasa <i>Sam1p</i> y <i>Sam2p</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	54
Ensayos de complementación _____	56
Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416 vacío. _____	57
Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416-Sc <i>BAT1</i> que tiene insertado el gen <i>BAT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	58
Crecimiento de las levaduras transformadas con el vector pRS416-Sc <i>BAT2</i> que lleva el gen <i>BAT2</i> de <i>S. cerevisiae</i> _____	59
Crecimiento en medios mínimos de las levaduras transformadas con el vector que tiene el gen <i>BAT</i> de <i>S. kluyveri</i> _____	60
DISCUSIÓN _____	62
Las isoenzimas <i>Bat1p</i> y <i>Bat2p</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> se han especializado. _____	62
El gen <i>GDH3</i> de <i>S. cerevisiae</i> ha perdido elementos reguladores en cis. _____	64
El gen <i>LEU9</i> de <i>S. cerevisiae</i> ha perdido elementos reguladores en cis _____	67
<i>LYS20</i> y <i>LYS21</i> de <i>S. cerevisiae</i> presentan una regulación diferencial que es dependiente de la fuente de carbono. _____	68
<i>SER3</i> y <i>SER33</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> se expresan de manera diferencial bajo las mismas condiciones _____	70

SAM1 y SAM2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	72
El gen <i>BAT</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i> re-establece el fenotipo silvestre de las mutantes <i>bat1</i>Δ en medio mínimo con amonio y la mutante <i>bat2</i>Δ en medio mínimo con aminoácidos (L-valina, L-isoleucina y L-leucina) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
<i>CONCLUSIONES</i>	75
<i>REFERENCIAS.</i>	76

Lista de tablas

Tabla 1.- Características del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y especies cercanas	6
Tabla 2.- Distancia de la región intergénica utilizada para hacer el análisis	14
Tabla 3.- Primers utilizados para amplificar los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>S. cerevisiae</i> y el gen <i>BAT</i> de <i>S. kluyveri</i>	16
Tabla 4.- Actividad específica de Gdh dependiente de NADP ⁺ de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en diferentes fuentes de carbono	66
Tabla 5.- Parámetros de Km para Gdh1p y Gdh3p	66

Lista de figuras

Figura 1.- Genes duplicados en los tres reinos	1
Figura 2.- El destino de los genes duplicados	3
Figura 3.- Bloques duplicados en el genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 4.- Genes duplicados en la glucólisis	8
Figura 5.- Intermediarios de la glucólisis son precursores de la biosíntesis de aminoácidos	10
Figura 6.- Esquema del cromosoma 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Figura 7.- Esquema del vector pRS416	17
Figura 8.- Construcciones con los genes <i>BAT1</i> (<i>pRS416-ScBAT1</i>) y <i>BAT2</i> (<i>pRS416-ScBAT2</i>) de <i>S.cerevisiae</i> y el gen <i>BAT</i> (<i>pRS416-SkBAT</i>) de <i>S. kluyveri</i>	17
Figura 9.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>BAT</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	22
Figura 10.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>BAT1</i> y <i>BAT2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>BAT</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	23
Figura 11.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica de los genes <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>GDH</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	24
Figura 12.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>GDH</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	25
Figura 13.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica de los genes <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>LEU</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	26
Figura 14.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>LEU4</i> y <i>LEU9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>LEU</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	27
Figura 15.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la	29

región intergénica de los genes <i>LYS20</i> y <i>LYS21</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>LYS</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	
Figura 16.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>LYS20</i> y <i>LYS21</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>LYS</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	30
Figura 17.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica de los genes <i>SER3</i> y <i>SER33</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>SER</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	31
Figura 18.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>SER3</i> y <i>SER33</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>SER</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	32
Figura 19.- Resumen de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica de los genes <i>SAM1</i> y <i>SAM2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y del gen <i>SAM</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	33
Figura 20.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en <i>cis</i> encontrados en la región intergénica analizada de los genes <i>SAM1</i> y <i>SAM2</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y el gen <i>SAM</i> de <i>Saccharomyces kluyveri</i>	35
Figura 21.- Procesos celulares en donde se ha visto que los factores transcripcionales están involucrados	36
Figura 22.- Alineamiento hipotético de un conjunto de secuencias de genes ortólogos	38
Figura 23.- Estructura tridimensional de las proteínas (transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada) Bat1p y Bat2p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> modeladas por homología a partir de la estructura inferida por rayos X de las proteínas hBCAT mitocondrial y hBCAT citosólica de humano	40
Figura 24.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las transaminasas de aminoácidos ramificados mitocondrial (1EKF:hBCATm) y citosólica (2COJ:hBCATc) de humano, y Bat1p (Scer_BAT1/YHR208W) y Bat2p (Scer_BAT2/YJR148W) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
Figura 25.- Estructura tridimensional de la proteína glutamato deshidrogenasa de <i>Plasmodium falciparum</i>	44
Figura 26.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las enzimas glutamato deshidrogenasa de <i>Bos taurus</i> , <i>Clostridium symbiosum</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> y Gdh1p/Gdh3p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45

Figura 27.- Estructura tridimensional de la proteína Leu4p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inferida por homología	48
Figura 28.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las proteínas Leu4p/Leu9p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y LeuA de <i>Mycoplasma tuberculosis</i>	49
Figura 29.- Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Ser3p/Ser33p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y SerA de <i>Escherichia coli</i>	52
Figura 30.- Estructura tridimensional de la proteína Ser3p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inferida por homología a partir de las coordenadas reportadas para <i>Escherichia coli</i>	53
Figura 31.- Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Sam1p/Sam2p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y Sam de <i>Escherichia coli</i>	55
Figura 32.- Estructura tridimensional de la proteína Sam1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inferida por homología	56
Figura 33.- Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416 vacío en medios mínimos con amonio o VIL como única fuente de nitrógeno.	57
Figura 34.- Crecimiento de levaduras transformadas con el plásmido pRS416-ScBAT1 que contiene el gen BAT1 de <i>S. cerevisiae</i> en medios mínimos con amonio o VIL	58
Figura 35.- Crecimiento de las levaduras transformadas con pRS416-ScBAT2 que contiene el gen BAT2 de <i>S. cerevisiae</i> en medios con amonio o VIL como fuente de nitrógeno	60
Figura 36.- Crecimiento de levaduras transformadas con el plásmido pRS416-SkBAT que tiene el gen BAT de <i>S. kluyveri</i> en medios mínimos con amonio o VIL como fuente de nitrógeno	61
Figura 37.- Gdh1p y Gdh3p son reguladas diferencialmente por la fuente de carbono	65

Divergencia funcional de genes duplicados en *Saccharomyces cerevisiae*

Se ha propuesto que la duplicación de genes es el proceso principal por el cual se obtiene nuevo material genético en los organismos. Esta duplicación puede llevarse a cabo a diferentes niveles, desde la copia de un solo gen o un grupo de genes por recombinación ilegítima, a la duplicación de fragmentos de cromosomas, cromosomas completos o todo el genoma.

En el grupo de los hongos hemiascomicetos hay evidencia de que una levadura ancestral duplicó su genoma y después, por rearrreglos genéticos y especiación, se dió origen al linaje de *Saccharomyces cerevisiae* y al linaje de *Candida glabrata* entre otras especies.

Muchos de los genes duplicados, producto de la duplicación completa del genoma, que presenta *S. cerevisiae* codifican para proteínas que participan en rutas metabólicas como la glucólisis y el metabolismo del nitrógeno. Se ha propuesto que el aumento en número de los genes de la ruta de la glucólisis incrementó el flujo de glucosa hasta la fermentación, dándole el fenotipo característico a esta levadura de fermentar la glucosa tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.

Por otro lado, en algunos nodos que comunican la glucólisis con el metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos, o la biosíntesis de aminoácidos con el catabolismo de los mismos, las reacciones son catalizadas por isoenzimas que son codificadas por genes duplicados (*BAT1/BAT2*, *GDH1/GDH3*, *LEU4/LEU9*, *LYS20/LYS21*, *SER3/SER33* y *SAM1/SAM2*). Sin embargo, no se sabe con claridad por qué estos genes fueron mantenidos en el genoma aunque se ha observado que algunos de estos parálogos presentan una expresión diferencial dependiente de la fuente de carbono.

Estamos interesados en tratar de entender cuál fue el destino evolutivo de los genes duplicados mencionados anteriormente mediante genómica comparada y experimentos de complementación funcional.

Los análisis *in silico* de la región promotora de los genes, realizados en este trabajo, nos muestran que los elementos en *cis* presentes en la región 5' del gen ortólogo de *S. kluyveri* se encuentran distribuidos de forma asimétrica en los promotores de cada una de las copias de genes duplicados de *S. cerevisiae*. Específicamente se observó que los elementos presentes en los genes *BAT1/BAT2* se han subfuncionalizado, ya que *BAT2* conserva secuencias que indican que podría ser regulado positivamente en un ambiente en donde se utilicen aminoácidos como fuente de carbono, y *BAT1* se regulará cuando se necesite biosintetizar aminoácidos. Por medio de ensayos de complementación funcional observamos que el gen *BAT* de *S. kluyveri* reestablece el fenotipo silvestre de la mutante *bat1Δ* de *S. cerevisiae* que crece en medio mínimo con amonio cuando se necesita biosintetizar aminoácidos. Además reestablece el fenotipo de la mutante *bat2Δ* en medio mínimo con aminoácidos (valina, isoleucina y leucina) cuando se requiere catabolizar aminoácidos. Por otro lado, *GDH3* y *LEU9* han perdido elementos reguladores; sin embargo, *GDH1* y *LEU4* han conservado la mayoría de ellos comparados con las secuencia de su ortólogo en

S. kluyveri. Por último, *LYS20/LYS21*, *SER3/SER33* y *SAM1/SAM2* han perdido de forma complementaria algunos elementos reguladores en *cis*.

Los análisis de divergencia funcional realizados en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos genes duplicados nos permitieron detectar cambios funcionales en donde se une el cofactor para el caso de Gdh1p/Gdh3p y Ser3p/Ser33p y, en el dominio regulador de las isoenzimas en Leu4p/Leu9p y Ser3p/Ser33p.

Functional divergence of duplicated genes in *Saccharomyces cerevisiae*

It has been proposed that gene duplication is the main process by which new genetic material is obtained in the organisms. This duplication can take place at different levels, from a single copy of a gene or several genes due to non homologous recombination, to the duplication of a chromosome fragment, a complete chromosome or whole genome duplication.

In the hemiascomycetes group of fungi, there is evidence that an ancestral yeast duplicate its genome, and then, by genetic rearrangement and especiation events the *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata* groups among others derived.

Several duplicated genes, product of whole genome duplication in *S. cerevisiae*, code for proteins involved in metabolic pathways such as glycolysis and nitrogen metabolism. It has been proposed that the increase in number of genes encoding proteins of the glycolysis pathway also modified the glucose flux throughout fermentation; giving the characteristic fenotype of this yeast to ferment glucose in the presence or absence of oxygen.

On the other hand, some of the nodes that connect the glycolysis pathway with nitrogen metabolism and amino acid biosynthesis, or the amino acid biosynthesis pathway with the catabolism of amino acids, are catalysed by isoenzymes encoded by duplicated genes (*BAT1/BAT2*, *GDH1/GDH3*, *LEU4/LEU9*, *LYS20/LYS21*, *SER3/SER33*, *SAM1/SAM2*). However, it isn't clear why these genes have been maintained in the genome. It has been observed that several of these paralogues have a diferential gene expression which is dependent of the carbon source.

We are interested in understand which was the evolutionary fate of these duplicated genes by a comparative genomics approach and functional complementation assays.

"*In silico*" analysis of the gene promoter regions presented in this work showed that *cis*-regulatory elements present in the 5' region of the *S. kluyveri* ortologous gene are distributed in an assymmetric form at the promoter of each duplicated gene copy of *S. cerevisiae*.

In particular, it was observed that the elements contained in *BAT1/BAT2* genes have been subfunctionalized, since *BAT2* gene share regulatory boxes that indicate that this gene can be up-regulated in the presence of amino acids as nitrogen and carbon source and, the *BAT1* gene will be up-regulated when amino acid biosynthesis is necessary. Interestingly, in *S. cerevisiae* these genes (*BAT1/BAT2*) do not complement the lack of the paralogous gene; however, the *S. kluyveri* *BAT* gene restores the wild type fenotype in the *bat1*Δ mutant strain of *S. cerevisiae* when growth in a media with amonium as nitrogen source. In addition, the *S. kluyveri* *BAT* gene also restores the wild type phenotype in the *bat2*Δ mutant strain in a mediun with valine, isoleucine and leucine as sole nitrogen sources. On the other hand our anlaysis also showed that *GDH3* and *LEU9* had lost regulatory elements; however, *GDH1* and *LEU4* genes had conserved the majority of them when compared with the regulatory sequences present in the ortologue gene of *S. kluyveri*.

Finally, *LYS20/LYS21*, *SER3/SER33* y *SAM1/SAM2* duplicated genes have lost several *cis*-regulatory elements in a complementary fashion.

The functional divergence analysis of the amino acid sequences performed in this work showed specific residues that shifted the substitution rate among species. The detected residues fall on the cofactor binding domain for Gdh1p/Gdh3p and Ser3p/Ser33p enzymes, and on the protein regulatory domain for Leu4p/Leu9p and Ser3p/Ser33p enzymes.

INTRODUCCIÓN.

La duplicación génica es la principal fuente de nuevo material genético

Existen cuatro posibles maneras de crear nuevo material genético durante la evolución: i) la duplicación de un gen existente, ii) el intercambio de partes de diferentes genes, iii) la generación “*de novo*” de un gen a partir de una región no codificante y 4) la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies; sin embargo, la duplicación de genes existentes parece ser el mecanismo principal por el cuál se obtiene nuevo material genético (Wong and Wolfe, 2005)

Desde el siglo pasado, Bridges (1935) y Muller (1936) reconocieron la relevancia de los genes duplicados para la evolución, ya que ofrecen nuevo material genético. Así también Ohno (1970) resaltó la importancia de este fenómeno desde el punto de vista citogenético y bioquímico, proponiendo que el destino de una copia del gen duplicado podría ser adquirir una nueva función si las mutaciones que acumulara resultaran beneficiosas.

Los recientes estudios de genómica han aportado evidencia substancial de genes duplicados que se han conservado como tal y que representan una parte importante del genoma de los organismos estudiados de los tres reinos (Zhang, 2003).

	Total number of genes	Number of duplicate genes (% of duplicate genes)
Bacteria		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	677	298 (44)
<i>Helicobacter pylori</i>	1590	266 (17)
<i>Haemophilus influenzae</i>	1709	284 (17)
Archaea		
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2436	719 (30)
Eukarya		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6241	1858 (30)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	18 424	8971 (49)
<i>Drosophila melanogaster</i>	13 601	5536 (41)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	25 498	16 574 (65)
<i>Homo sapiens</i>	40 580 ^b	15 343 (38)

Figura 1.- Genes duplicados en los tres reinos

Modificado de Zhang (2003)

¿Cómo se duplican los genes?

Los mecanismos propuestos de la duplicación génica son: 1) el entrecruzamiento ilegítimo, que generalmente resulta en la duplicación de genes en tándem como es el caso de los genes de las hemoglobinas de humano. 2) La retroposición, que genera una copia que ha perdido los intrones debido a que el ARNm ya procesado se retro-transcribe y el ADN complementario es insertado en el genoma. Como ha perdido la región reguladora es muy posible que ese nuevo gen incorporado se transforme en un pseudogen. Sin embargo, muchos de los genes duplicados que no se transforman en pseudogenes conservan los intrones del gen original, esto sugiere que la duplicación de esos genes es mediada por ADN en lugar de ARN. Y finalmente, 3) la duplicación cromosómica o del genoma completo. El mecanismo de la duplicación de cromosomas o del genoma completo es incierto, se ha propuesto que se debe a una deficiencia en la segregación después que ha ocurrido la mitosis, esto generará un organismo con el doble de carga genética que normalmente tiene (Long, 2001).

El destino de los genes duplicados

Muchas evidencias experimentales y análisis de secuencias permitieron desarrollar los modelos que se presentan en la figura 2 los cuales tratan de explicar cuál podría ser el destino evolutivo de los genes duplicados. En la figura se representan los marcos abiertos de lectura para cada gen como el rectángulo de mayor área y los elementos reguladores en “*cis*” se esquematizan con los rectángulos de menor tamaño localizados hacia la región 5` del marco de lectura. Los números indican las funciones hipotéticas del gen y de la región 5' no codificante. La equis sobrepuesta en el número indica que el gen ha perdido esa función. En A) se muestra el gen sin duplicar el cual tiene tres funciones (representadas por los números 1, 2 y 3); en B) se observa que el gen original se duplicó y ambas copias se mantuvieron; sin embargo, es probable que una de las copias se transforme en pseudogen como se muestra a continuación. En C) una copia mantiene la función ancestral y la otra pierde todas las funciones y se pseudogeniza. El modelo clásico de divergencia propuesto por (Ohno, 1970) se

ejemplifica en D) en donde una copia o ambas adquieren una función nueva que le da ventaja adaptativa al organismo y por eso son mantenidas. En E) se describe el fenómeno de especialización en donde ambos genes duplicados mantienen las tres funciones ancestrales; sin embargo, una copia se especializa en una función y la otra copia se especializa en otra función. El modelo de subfuncionalización propuesto por (Force, 1999) se presenta en el panel F) en donde después de duplicarse el gen que tiene dos o más funciones, ambas copias acumulan mutaciones haciendo que una copia pierda una o la otra función de tal forma que las dos copias son mantenidas en el genoma para llevar a cabo la función cabal del gen ancestro (Otto and Yong, 2003).

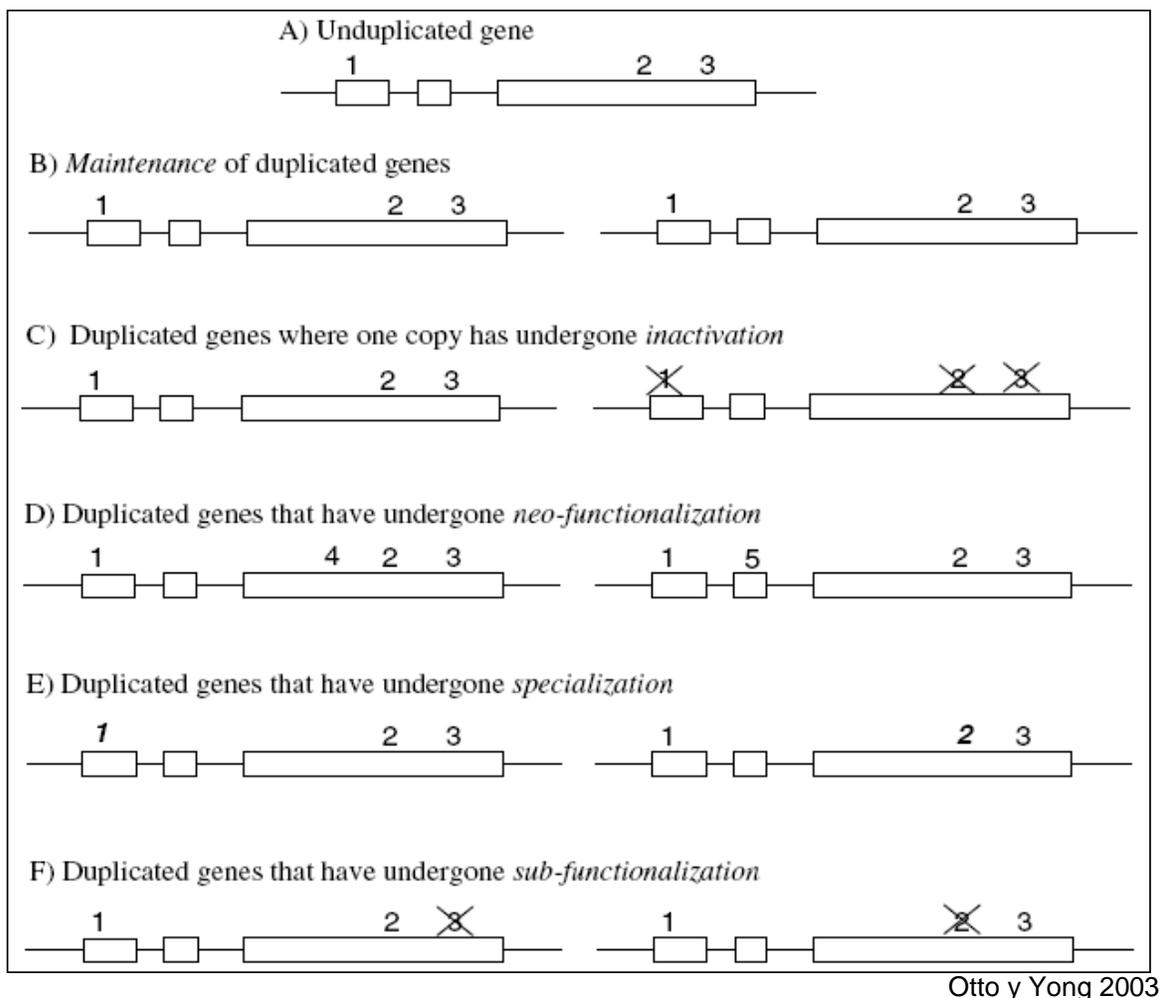


Figura 2.- El destino de los genes duplicados

Modificado de Otto and Yong (2003)

Algunas de las evidencias experimentales y de análisis de secuencias que permitieron proponer los modelos mencionados anteriormente se describen a continuación.

Los tetrápodos tienen dos genes *En1* y *En2*, y el pez zebra tiene cuatro genes homólogos y *eng1/eng1b*, *eng2/eng3* son pares de genes duplicados. Los estudios filogenéticos mostraron que *eng1/eng1b* ambos son ortólogos de *En1* de los tetrápodos y *eng2/eng3* ambos son ortólogos de *En2*. Se sabe que *eng1* es expresado durante el desarrollo en el pectoral del pez zebra y el gen *eng1b* es expresado en un conjunto de neuronas específicas de la espina dorsal. Sin embargo, el gen *En1* de pollo y ratón, que serían considerados como representantes de un grupo externo el cual tiene el gen sin duplicar, se expresa tanto en el pectoral y en la espina dorsal en ambos organismos. En este caso una copia de los genes del pez zebra *eng1* ha perdido la función de expresarse en la espina dorsal, y el gen *eng1b* ha perdido la función de expresarse en el pectoral; sin embargo, las funciones que conservan estos genes del pez zebra se complementan para llevar a cabo la función del gen ancestro (Force et al, 1999). Este es un ejemplo de subfuncionalización.

Otros ejemplos de subfuncionalización son los pares de genes *SIR3/ORC1* en *Saccharomyces cerevisiae*. Sir3p es una proteína involucrada en el silenciamiento de la cromatina cerca del telómero y Orc1p participa en el complejo del origen de replicación del ADN. Ninguno de estos genes puede complementar la falta del otro; sin embargo, en *S. kluyveri*, una levadura que divergió del ancestro de *S. cerevisiae* antes de que duplicara su genoma, tiene un gen que conserva alta similitud con ambos genes de *S. cerevisiae*, y este gen puede complementar las funciones de ambos genes de *S. cerevisiae* (*SIR3/ORC1*) (van Hoof, 2005). De manera adicional también se observó que el par de genes *SNF12/RSC6* en *S. cerevisiae* se ha subfuncionalizado. Ambos son genes que codifican para proteínas que son subunidades de diferentes complejos remodeladores de cromatina. Snf12p participa en el complejo SNF/SWI y Rsc6p en el complejo Rsc que regula la transcripción de proteínas ribosomales. Ninguno puede complementar la delección del otro. *S. kluyveri* tiene un gen que comparte

homología con ambos genes de *S. cerevisiae* y este gen sí puede complementar las funciones que llevan a cabo las dos proteínas Snf12p/Rsc6p en *S. cerevisiae*. Otros pares que tienen el mismo comportamiento arriba descrito son: RNR2/RNR4 que son subunidades R2 de ribonucleótido reductasa, *HBS1/SKI7*, Ski7p está involucrado en la degradación del ARNm, *HBS1* no se sabe bien que función tiene, solo se sabe que tiene un fenotipo de lento crecimiento en temperaturas bajas en una cepa con un fondo genético *rps30AΔ*. (van Hoof, 2005)

Por otra parte, en *S. cerevisiae* hay una arsenato reductasa Acr2p que es homóloga a la fosfatasa CDC25. Acr2p tiene un motivo HCX₅R de fosfatasa, pero no tiene el motivo de unión a fosfato GXGXXG que es característico de las fosfatasas tirosina. La incorporación del motivo GXGXXG en la arsenato reductasa Acr2p de *S. cerevisiae* hizo que adquiriera la función de fosfatasa y perdiera cualquier actividad de arsenato reductasa. Este es un claro ejemplo de neofuncionalización, ya que por la manipulación genética la arsenato reductasa perdió esa función y adquirió una nueva función (Mukhopadhyay et al, 2003).

Otro ejemplo característico de neofuncionalización es el par de genes *ECP/EDN*. *EDN* codifica para una RNasa con alta actividad catalítica y no es neurotóxica; por el contrario, el producto de *ECP* tiene una baja actividad RNasa pero es una potente toxina contra varias bacterias y parásitos patógenos, ya que el producto de *ECP* elimina a los parásitos haciendo poros en las membranas celulares. Los análisis en secuencia de ADN mostraron que *EDP* y *ECP* son producto de una duplicación en tándem de un gen ancestral que se piensa tenía la función *EDN*; además, el gen *ECP* mostró haber estado bajo selección positiva (Jianzhi Zhang, 1998).

También, el hecho de encontrar genes reliquias a través de los genomas es un claro ejemplo de eventos de pseudogenización.

Comparación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* con especies cercanas

Saccharomyces cerevisiae pertenece al *phylum* Ascomycota, y está filogenéticamente relacionada con *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* y *S. castellii* que pertenecen al clado *Saccharomyces sensu stricto*. Estas especies son las más cercanas a *S. cerevisiae* y derivan del linaje del ancestro tetraploide (Fitzpatrick, 2006).

S. cerevisiae tiene un genoma de 12 Mbp y un contenido de G + C de 38.3%, la densidad genética cubre un 70% del genoma y el tamaño promedio de las proteínas es de 398 aminoácidos (Dujon, 2004).

Tabla 1.- Características del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y especies cercanas

Table 2 General characteristics of the yeast genomes and predicted proteomes

Species	Genome size (Mb)	Average G+C content (%)	Total CDS	Total tRNA genes	Average gene density (%)	Average G+C in CDS (%)	Average CDS size (codons)	Median CDS size (codons)	Maximum CDS size (codons)
<i>S. cerevisiae</i>	12.1	38.3	5,807	274	70.3	39.6	485	398	4,911
<i>C. glabrata</i>	12.3	38.8	5,283	207	65.0	41.0	493	409	4,881
<i>K. lactis</i>	10.6	38.7	5,329	162	71.6	40.1	461	381	4,916
<i>D. hansenii</i>	12.2	36.3	6,906	205	79.2	37.5	389	307	4,190
<i>Y. lipolytica</i>	20.5	49.0	6,703	510	46.3	52.9	476	399	6,539

Tomado de Dujon (2004)

En la tabla 1 se muestran las características del genoma de *S. cerevisiae* y de las especies cercanas a ella como son *Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* y *Yarrowia lipolytica*.

Al liberarse y analizarse la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae*, se encontraron segmentos de cromosomas duplicados lo cual permitió hipotetizar que el ancestro de esta levadura duplicó su genoma y después de eventos de rearrreglos genómicos y de especiación se dió lugar a las especies del clado *Saccharomyces sensu stricto* (mencionadas anteriormente) y *sensu lato* (*S. kudriavzevii*, *S. castellii*, *C. glabrata*). En *S. cerevisiae* se encontraron 55 bloques de genes duplicados que se comparten a lo largo del genoma (Fig. 3) (Wolfe and Shields, 1997).

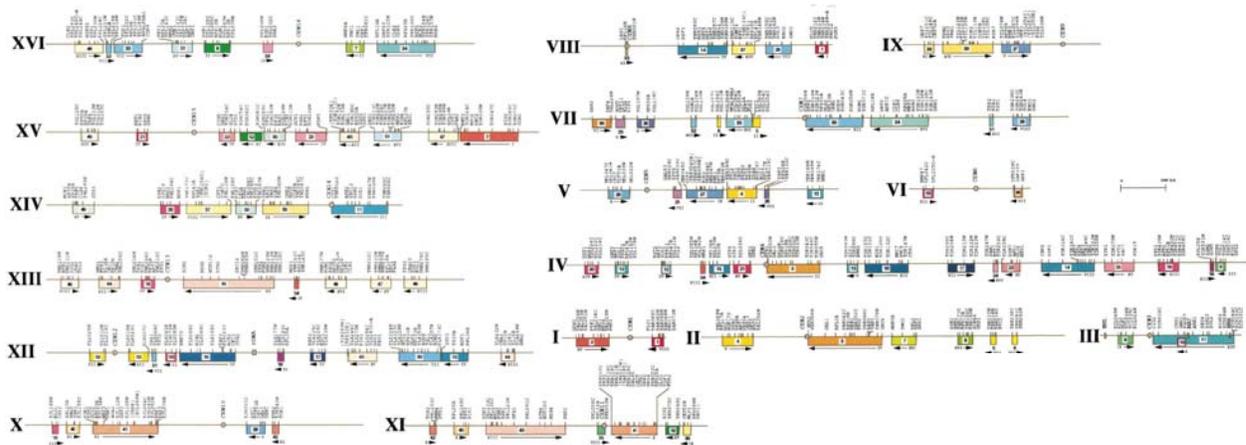


Figura 3.- Bloques duplicados en el genoma de *S. cerevisiae*
Tomado de Wolfe (1997)

Se observó que muchos de estos genes duplicados se encuentran distribuidos en las rutas metabólicas y que, la duplicación completa del genoma de *S. cerevisiae*, le confirió una ventaja adaptativa a este organismo ya que incrementó el flujo de glucosa a través de la glucólisis hasta la fermentación. Este incremento le confirió ventaja frente a otros organismos por el consumo rápido de la glucosa dándole a esta levadura el fenotipo característico de fermentar la glucosa en presencia de oxígeno que no presenta *S. kluyveri*, una levadura que divergió antes de que el ancestro de *S. cerevisiae* duplicara su genoma (Conant and Wolfe, 2007).

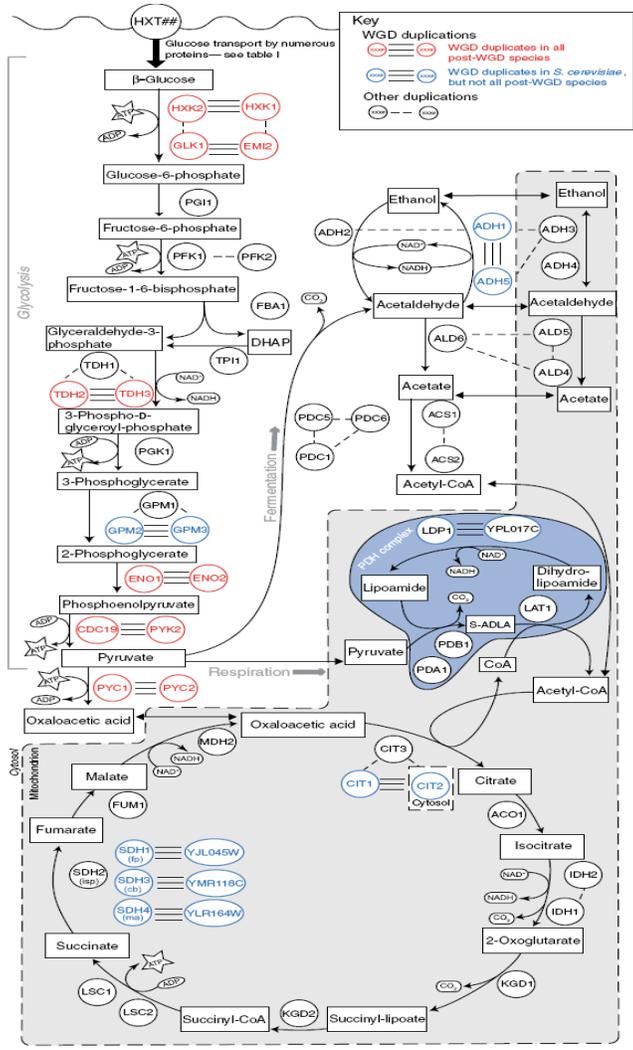


Figura 4.- Genes duplicados en la glucólisis
 Tomado de Conant and Wolfe (2007)

Este incremento en el flujo de glucosa se debe a la conservación de muchos genes duplicados implicados en el catabolismo de este azúcar y en la fermentación (*HXT*, *HXK*, *PFK*, *TDH*, *GPM*, *ENO*, *PYK*, *PYC*, *PDC*, *ADH*). De manera tal que este incremento en el flujo sobrepasó la tasa de actividad enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) haciendo que el flujo de la glucosa termine en el metabolismo fermentativo aún en presencia de oxígeno (Fig. 4) (Conant and Wolfe, 2007).

El hecho de que una mutante de *S. cerevisiae*, que presenta una muy baja afinidad por incorporar la glucosa del medio, tenga un metabolismo respiratorio en presencia de oxígeno apoya la hipótesis de que el incremento en el flujo de glucosa le confirió a esta levadura el fenotipo de fermentar glucosa en presencia de oxígeno. Además esto sugiere que el mecanismo por el cuál se detecta la glucosa esta principalmente dentro de la célula (Otterstedt et al, 2004).

Por otro lado, *S. cerevisiae* puede detectar cuando los niveles de glucosa son bajos o cuando se cambia la fuente de carbono por una fuente completamente respirable, y cuando esto pasa, cambia su metabolismo de fermentativo a respiratorio para poder obtener un buen rendimiento energético (Otterstedt, 2004).

Los intermediarios de la glucólisis son precursores en la biosíntesis de aminoácidos.

Al igual que en la glucólisis, el metabolismo del nitrógeno y la biosíntesis de aminoácidos conservan genes duplicados que codifican isoenzimas involucradas en reacciones en nodos que comunican a la glucólisis con, la biosíntesis y el catabolismo de aminoácidos, y el ciclo de Krebs (Fig. 5). Por ejemplo, *BAT1/BAT2*, codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada; *LEU4/LEU9*, los productos de *LSY20/LYS21*, son liasas; *SER3/SER33*, *GDH1/GDH3* codifican para enzimas con actividad de deshidrogenadas y el par *SAM1/SAM2* codifica para metionin-adenosiltransferasas (Eden et al, 1996; Moye et al, 1985; Casalone et al, 2000; Li-Fen et al, 1984; Cherest and Surdin-Kerjan, 1978).

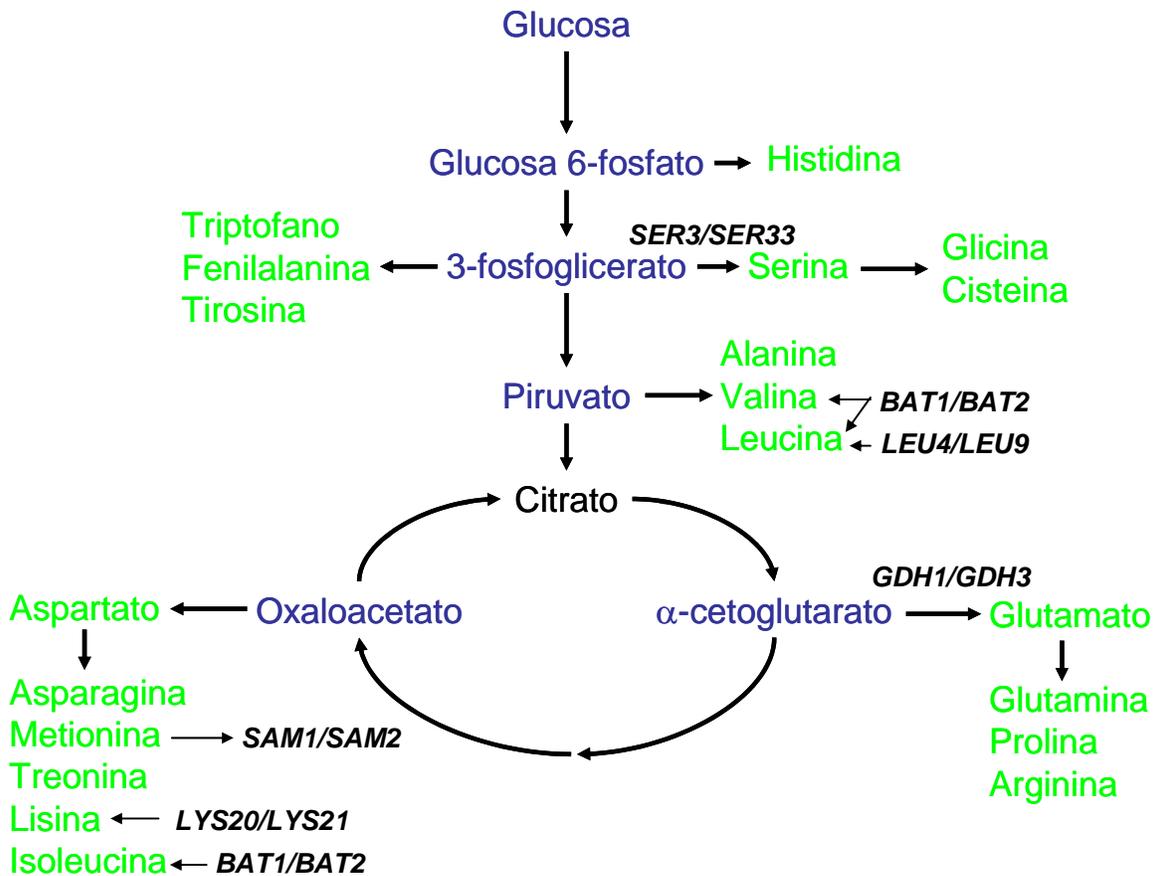


Figura 5.- Intermediarios de la glucólisis son precursores de la biosíntesis de aminoácidos

Los genes *BAT1/BAT2* son transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada como valina, leucina e isoleucina. Estas transaminasas son dependientes de piridoxal 5-fosfato (PLP) y transfieren los grupos aminos donados por el glutamato a sus correspondientes α -cetoácidos; sin embargo, esta reacción es reversible. Esto es, que las enzimas les quitan el grupo amino a los aminoácidos para catabolizarlos y producir el α -cetoácido que posteriormente servirá para retroalimentar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Eden, 1996). Sin embargo, el hecho de observar un defecto en el crecimiento de una cepa doble mutante *bat1* Δ y *bat2* Δ de *S. cerevisiae* aún adicionando los aminoácidos valina, isoleucina y leucina al medio, sugiere que estas enzimas podrían tener otro papel

ya que la carencia de estos aminoácidos no explica completamente los defectos del crecimiento observados (Kispal, 1996).

GDH1/GDH3 son genes de *S. cerevisiae* que codifican para dos isoenzimas con actividad de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺. Estas enzimas transfieren un grupo amino al esqueleto de carbono del α -cetoglutarato para sintetizar glutamato que es el principal donador de grupos amino en el metabolismo del nitrógeno para la biosíntesis de otros aminoácidos (Moye, 1985, Morais, 2003, DeLuna, 2001).

Los genes *LEU4/LEU9* y *LYS20/LYS21* codifican para enzimas que tienen actividad liasa; sin embargo, los productos codificados por el primer par de genes duplicados están involucrados en la biosíntesis de leucina mientras que las isoenzimas Lys20p/Lys21p participan en la biosíntesis de lisina (Chang, 1984, Peters, 1990, Casalone, 2000).

Leu4p/Leu9p sintetizan α -isopropil-malato a partir de la condensación de acetil-CoA y α -cetoisovalerato que es también el precursor de la valina. El α -isopropil-malato es un intermediario en la biosíntesis de leucina (Peters et al, 1990, Casalone et al, 2000).

Por otro lado Lys20p y Lys21p son dos isoenzimas que participan en el primer paso de la biosíntesis de lisina, el cual es la síntesis de homocitrato a partir de la reacción de condensación de acetil-CoA y α -cetoglutarato (Ramos et al, 1988).

Los genes *SER3/SER33* de *S. cerevisiae* codifican para dos isoenzimas que tienen la actividad catalítica de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺. Estas isoenzimas catalizan la síntesis de 3-fosfohidroxipiruvato a partir del intermediario de la glucólisis 3-fosfoglicerato. Este es el primer paso en la biosíntesis de serina y glicina en crecimiento en glucosa. Cuando la levadura crece en una fuente de carbono completamente respirable utiliza la vía del glioxalato para sintetizar glicina y serina (Albers et al, 2003).

Dado que estos genes se han mantenido por duplicado en el genoma nos interesa saber ¿porqué fueron mantenidos?, ¿acaso le confirieron una ventaja adaptativa al ancestro de *S. cerevisiae*?, ¿cómo evolucionaron estos genes?.

Materiales y métodos.

Búsqueda de elementos reguladores consenso conservados

Genes duplicados

Los genes duplicados de *S. cerevisiae* con los cuales se trabajó se enlistan a continuación usando para cada par de genes duplicados una línea y nombrándolos de acuerdo al nombre común del gen y su nombre sistemático.

<i>GDH1</i> :YOR375C	<i>GDH3</i> :YAL062W
<i>BAT1</i> :YHR208W	<i>BAT2</i> :YJR148W
<i>LYS20</i> :YDL182W	<i>LYS21</i> :YDL131W
<i>LEU4</i> :YNL104C	<i>LEU9</i> :YOR108W
<i>SAM1</i> :YLR180W	<i>SAM2</i> :YDR502C
<i>SER3</i> :YER081W	<i>SER33</i> :YIL074C

Alineamiento de las secuencias

Para hacer el análisis se utilizó la región 5' intergénica de cada gen, esta región fue delimitada de acuerdo al gen vecino más próximo río arriba del primer codón de inicio. Por lo tanto, la secuencia utilizada para el análisis se encuentra entre el codón de inicio del gen de interés y el codón de término ó inicio del gen vecino. Para secuencias mayores a 1 kbp sólo se tomaron en cuenta los primeras 1000 pb río arriba del codón de inicio del gen de interés (Fig. 6).

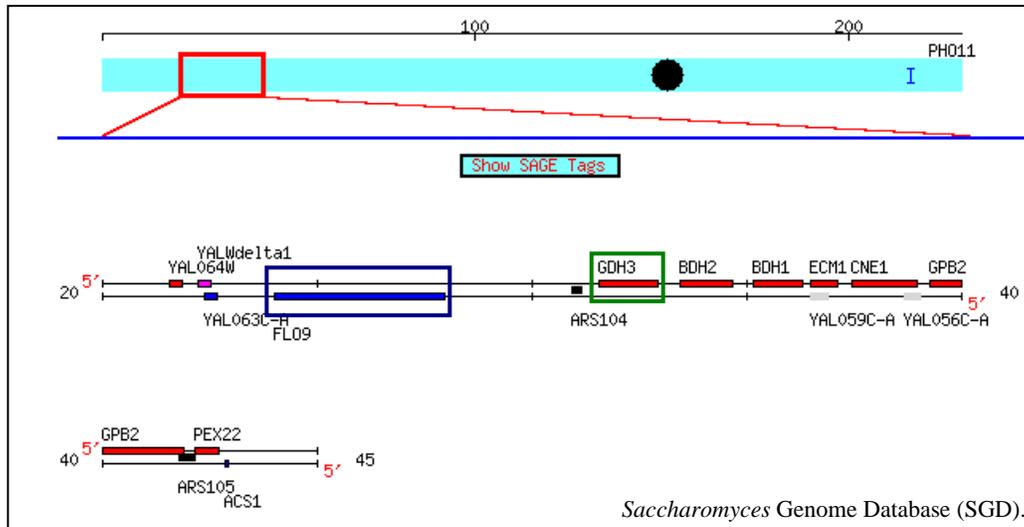


Figura 6.- Esquema del cromosoma 1 de *Saccharomyces cerevisiae*

En el recuadro verde se señala el gen de estudio; y en recuadro azul el gen vecino de la región 5'. La región entre estos dos genes fue la que se utilizó para hacer el análisis.

Posteriormente, se buscaron los genes ortólogos para cada gen duplicado en especies cercanas a *S. cerevisiae* (*S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevi*), las cuales pertenecen al clado de *Saccharomyces sensu stricto* y se descargó la secuencia intergénica de éstos genes y la delimitación de estas secuencias se hizo de acuerdo al tamaño de la región intergénica del gen de *S. cerevisiae*.

En la tabla 2 se muestran las distancias a partir del codón de inicio de la región intergénica utilizada para hacer el análisis en los genes duplicados. Esa distancia fue la misma para la región intergénica de los genes ortólogos de *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*.

Tabla 2.- Distancia de la región intergénica utilizada para hacer el análisis

Gen	Distancia (pb)
<i>BAT1</i>	1000pb
<i>BAT2</i>	472pb
<i>GDH1</i>	1000pb
<i>GDH3</i>	1000pb
<i>LEU4</i>	1000pb
<i>LEU9</i>	745pb
<i>LYS20</i>	1000pb
<i>LYS21</i>	642pb
<i>SAM1</i>	1000pb
<i>SAM2</i>	578pb
<i>SER3</i>	840pb
<i>SER33</i>	447pb

Todas las secuencias se descargaron de la base de datos de *Saccharomyces* (SGD). El alineamiento se hizo en “JalView v2.2.1” (Clamp et al, 2004) utilizando el algoritmo ClustalW v1.8 (alineamiento múltiple) (Thompson et al, 1994).

Búsqueda de secuencias consenso.

Utilizamos 3 criterios para buscar secuencias consenso específicas para factores de transcripción, i) que sea una secuencia consenso reportada específica para factores de transcripción en *S. cerevisiae*, ii) que la secuencia esté conservada entre las especies cercanas y, iii) que las secuencias consenso encontradas conserven una distancia semejante entre estas y el inicio de la traducción.

Para hacer este análisis se utilizó la base de datos “YEASTRACT” (Teixeira et al, 2006; Monteiro et al, 2008), que almacena información de factores

transcripcionales y secuencias consenso reconocidas por estas proteínas de unión al DNA.

Divergencia funcional de la región codificante

Análisis del cambio en la tasa de sustitución de aminoácidos en sitios específicos

Se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias de residuos de aminoácidos con los ortólogos de especies cercanas a *S. cerevisiae* derivadas del linaje del ancestro tetraploide usando el modelo de sustitución BLOSUM62. Posteriormente se inferió un árbol filogenético usando el algoritmo “neighbor-joining”. Los datos obtenidos del alineamiento fueron analizados en el software DIVERGE v2.0 (Gu X., 1999, 2001) para calcular el coeficiente de divergencia funcional y la posición en donde la tasa de sustitución de aminoácidos ha cambiado. Después, estos sitios fueron mapeados en un alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las proteínas de los genes parálogos de *S. cerevisiae* y la proteína del organismo más cercano a esta levadura al que se le haya inferido la estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen ortólogo. El objetivo de esta aproximación es ver en qué regiones de la proteína caen los sitios donde se observa divergencia funcional.

Ensayos de complementación

Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo relevante
WT control	<i>ura3-1</i> W303-1A (Avendaño et al, 1997)
<i>bat1</i> Δ	<i>ura3-1 bat1</i> Δ:: <i>KANMX</i>
<i>bat2</i> Δ	<i>ura3-1 bat2</i> Δ:: <i>KANMX</i>
<i>bat1</i> Δ <i>bat2</i> Δ	<i>ura3-1 bat1</i> Δ:: <i>KANMX bat2</i> Δ:: <i>NAT</i>

Amplificación de los genes *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BAT* de *Saccharomyces kluyveri* y clonación en el vector pRS416.

Los genes fueron amplificados desde la región intergénica 5´ hasta la región 3´; la distancia de la región 5´ fue delimitada de acuerdo a lo establecido en el análisis bioinformático de la región intergénica. En la delimitación de la región 3´ se utilizaron los mismos criterios que en el caso de la región 5´. Los genes se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos con sitios de restricción para insertarlos en un vector de clonación para levadura con bajo número de copias (pRS416) (Sikorski et al, 1989). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en dirección 5´ a 3´ en la tabla 3.

Tabla 3.- Primers utilizados para amplificar los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* y el gen *BAT* de *S. kluyveri*

Gen	Oligonucleótidos
<i>ScerBAT1</i>	GTGGGATCCTCTGCTCAAGTAGACAAG Fwd CCAGAGCTCATTGCCCCCTTTAGTTCG Rev
<i>ScerBAT2</i>	GCCGGATCCCAACACAACCTTATAACGC Fwd GCACTCGAGAAGATGTCCTTGATACCG Rev
<i>ScluBAT</i>	CGGGATCCGTCCGTTTCGTATTC Fwd GCTGAGCTCCACAGGAATGGGTTGC Rev

Los oligonucleótidos para amplificar el gen *BAT1* de *S. cerevisiae* y el gen *BAT* de *S. kluyveri* se diseñaron con el sitio *Bam*HI para el oligonucleótido sentido y *Sac*I; para el oligonucleótido antisentido. Para la amplificación del gen *BAT2* de *S. cerevisiae* se diseñaron los oligonucleótidos con el sitio *Bam*HI para el sentido y *Xho*I para el antisentido

Estos genes amplificados fueron clonados en el vector pRS416 que se muestra en la figura 7.

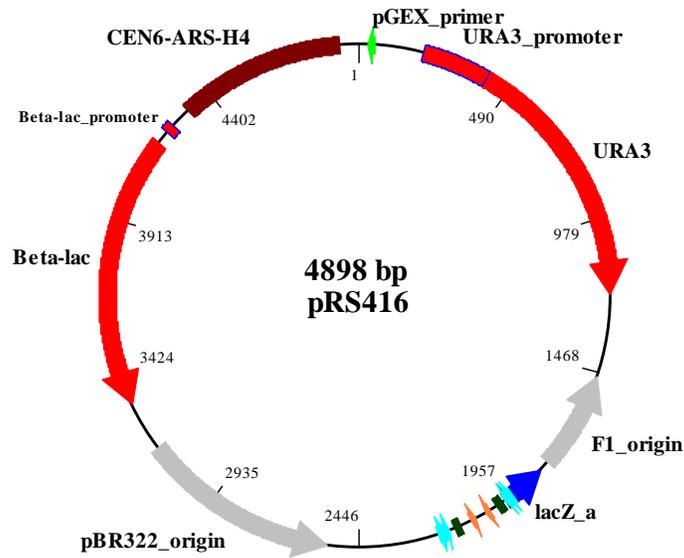


Figura 7.- Esquema del vector pRS416

Las construcciones se muestran en la figura 8, la región 5' no transcribible para el gen *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* y el gen *BAT* de *S. kluyveri* mide 827 pb, 524 pb, 302 pb respectivamente; la región codificante mide 1182 pb, 1131 pb, 1194 pb, respectivamente; y la región 3' mide 667 pb, 240 pb, 687 pb respectivamente.

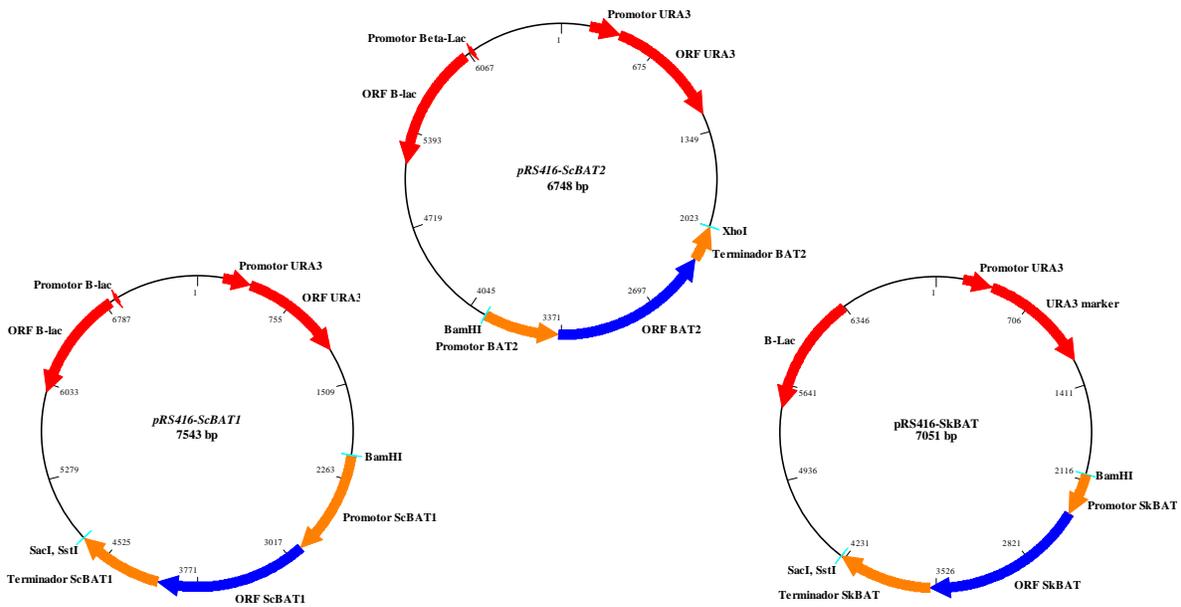


Figura 8.- Construcciones con los genes *BAT1* (*pRS416-ScBAT1*) y *BAT2* (*pRS416-ScBAT2*) de *S.cerevisiae* y el gen *BAT* (*pRS416-SkBAT*) de *S. kluyveri*

Transformación de las levaduras

La transformación de las levaduras se llevó a cabo por el método de transformación por cationes alcalinos (Ito et al, 1983)

A partir de un pre-inóculo de 16 – 18 horas se recolectaron las células por centrifugación y fueron lavadas 2 veces y resuspendidas en agua estéril, posteriormente se utilizaron alícuotas de 500 μ L para transformarlas con las construcciones descritas anteriormente. Después fueron recolectadas nuevamente y el sobrenadante se desechó, se agregó el ADN transformante (1 μ g) y el ADN de esperma de salmón “ADN carrier” (50 μ g). Posteriormente se agregaron 500 μ L de una mezcla de polietilenglicol 45%, acetato de litio 1M, Tris-HCl 1M pH 8.0, EDTA 0.5M en una relación (9 : 1 : 0.1 : 0.02). Por último se mezcló con vortex y se dejó reposar mínimo 8 horas.

Por cada levadura a transformar se utilizaron dos controles negativos uno sin ADN transformante pero con “ADN carrier”, y otro control sin ADN transformante y sin “ADN carrier”.

Selección de las levaduras transformantes

Las levaduras transformadas fueron seleccionadas en medio mínimo sin uracilo con amonio o aminoácidos (L-valina, L-leucina, L-isoleucina) como fuente de nitrógeno, ya que las cepas utilizadas son *ura3* y la construcción con la que se transformó tiene el marcador de selección *URA3* (Fig. 7).

Medio mínimo + dextrosa + amonio

Los siguientes componentes fueron agregados y disueltos para hacer 1L de medio mínimo.

Base para medio mínimo de levadura*	1.7g (Vitaminas, Trazas y Sales.)
Dextrosa anhidra	20g
Sulfato de amonio	5g
H ₂ O	aforar a 1000mL

Agar	20g
------	-----

*Composición de la base para medio mínimo de levadura aproximada por litro.

Fosfato diácido de potasio	1g
Sulfato de magnesio	0.5g
Cloruro de sodio	0.1g
Cloruro de calcio	0.1g
Inositol	2mg
Ácido bórico	0.5mg
Niacina	0.4mg
Sulfato de manganeso	0.4mg
Piridoxina-HCl	0.4mg
Sulfato de Zinc	0.4mg
Tiamina-HCl	0.4mg
Pantotenato de calcio	0.4mg
Cloruro férrico	0.2mg
Molibdato de sódio	0.2mg
Riboflavina	0.2mg
Ácido p-aminobenzoico	0.2mg
Ioduro de potasio	0.1mg
Sulfato de cobre	0.04mg
Ácido fólico	0.002mg
Biotina	0.002mg

Medio mínimo + dextrosa + aminoácidos (L-valina, L-leucina, L-isoleucina)

Los siguientes componentes fueron agregados y disueltos para hacer 1L de medio mínimo.

Base para medio mínimo de levadura*	1.7g (Vitaminas, Trazas y Sales.)
-------------------------------------	-----------------------------------

Dextrosa anhidra	20g
------------------	-----

L-valina	5mL (stock 30mg/mL)
----------	---------------------

L-isoleucina	3mL (stock 10mg/mL)
L-leucina	10mL (stock 10mg/mL)
H ₂ O	aforar a 1000mL
Agar	20g

RESULTADOS

Análisis de la región intergénica de los genes duplicados

Se hizo un análisis de la región intergénica de cada gen buscando elementos regulatorios en *cis* conservados en *Saccharomyces cerevisiae* y especies cercanas, dicha región se delimitó por el gen vecino. A continuación se muestran los resultados de éste análisis para cada una de las parejas de los genes seleccionados.

Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina: *BAT1* y *BAT2*

En el último paso de la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina se necesita catalizar la transferencia de un grupo amino a los precursores (α -cetoácidos) α -cetoisovalerato, α -cetoisocaproato y α -ceto- β -metilvalerato, respectivamente. Este paso lo cataliza la enzima transaminasa de aminoácidos ramificados dependiente de piridoxal 5-fosfato (PLP). Esta enzima transfiere un grupo amino a partir de glutamato (donador de grupos amino) para sintetizar el aminoácido y liberar α -cetoglutarato; sin embargo, éstas reacciones pueden ser catalizadas de forma reversible.

En *S. cerevisiae* estas reacciones las llevan a cabo dos isoenzimas Bat1p/Bat2p codificadas por los genes *BAT1* y *BAT2* los cuales son producto de la duplicación completa del genoma del ancestro de esta levadura.

En la figura 9 se muestra el resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* y el gen *BAT* de *S. kluyveri*. Ahí se observa que *BAT1* conserva elementos *cis* – reguladores que podrían ser reconocidos por factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Bas1p, Gcn4p y Leu3) y en la comunicación interorganelo (Rtg1p y Rtg3p), estos también están presentes en el gen *BAT* de *S. kluyveri* (Fig. 9).

Por otro lado el gen *BAT2* de *S. cerevisiae* no conserva el elemento regulador que pudiera ser reconocido por el factor transcripcional maestro de

genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p); por el contrario, este promotor sí presenta elementos reguladores que se han asociado a factores transcripcionales involucrados en el catabolismo de aminoácidos. Estos elementos asociados al catabolismo de aminoácidos no se encuentran en la región intergénica de *BAT* de *S. kluyveri*.

Sin embargo, el gen *BAT2* conserva los elementos a los cuales se unirían Mot3p y Yrr1p que se ha observado están involucrados en la represión de genes por hipoxia y en la respuesta al estrés, respectivamente.

	<i>S. cer BAT1</i>	<i>S. cer BAT2</i>	<i>S. klu BAT</i>
<i>S. klu BAT</i>	1. Biosíntesis de aminoácidos.		Bas1p
	2. Respiración.		Gcn4p
	3. Regulación por glucosa.	Leu3p	Leu3p
	4. Comunicación entre organelos.	Hap2, 3, 4 y 5p	Hap2, 3, 4 y 5p
<i>S. cer BAT1m</i>	1. Biosíntesis de aminoácidos.	Gln3p, Gat1p, Gzf3p	
	2. Respiración.	Put3p	
	3. Comunicación entre organelos.	Stp1p	
		Stp2p	
<i>S. cer BAT2c</i>	1. Biosíntesis de leucina.	Cha4p	Cha4p
	2. Respiración.	Nrg1p	Nrg1p
	3. Catabolismo de aminoácidos.	Rgt1p	Rgt1p
	4. Regulación por glucosa.	Rtg1p	Rtg1p
	5. Comunicación entre organelos.	Rtg3p	Rtg3p
		Mot3p	Mot3p
	Yrr1p	Yrr1p	

Figura 9. Resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *BAT* de *Saccharomyces kluyveri*

En la figura 10 se muestra la disposición de éstos elementos identificados en las regiones analizadas. Se puede observar que el elemento regulador Leu3 siempre está cerca de los elementos Rtg1, Rtg3 y Stb5, en la región intergénica tanto de *BAT1* como de *BAT2* de *S. cerevisiae*.

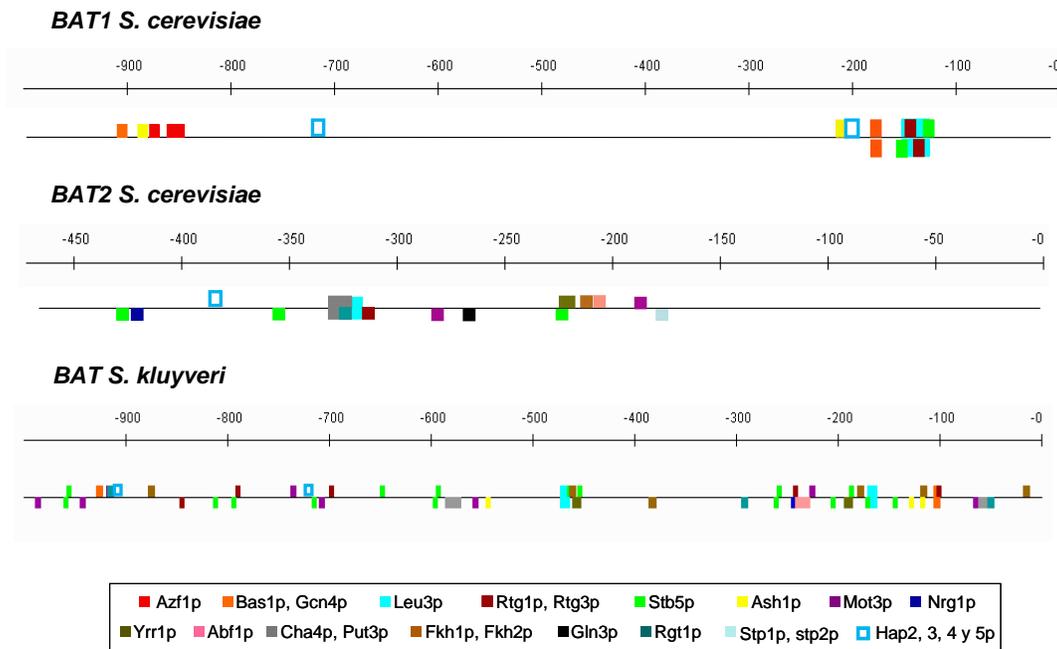


Figura 10.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *BAT1* y *BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *BAT* de *Saccharomyces kluyveri*

Biosíntesis de glutamato: *GDH1* y *GDH3*

GDH1 y *GDH3* de *S. cerevisiae* que codifican para las enzimas NADP⁺ dependientes Gdh1p/Gdh3p, respectivamente. Estas enzimas catalizan la adición de un grupo amino a su precursor α -cetoglutarato para formar glutamato. La reacción reversible es catalizada por Gdh2p la cual es una enzima NAD⁺ dependiente. La formación de glutamato es muy importante para el metabolismo del nitrógeno ya que en *S. cerevisiae* ésta es una de las vías para la asimilación del amonio y además se encuentra en un nodo que comunica el catabolismo de la glucosa y la biosíntesis de aminoácidos.

El análisis de la región intergénica de estos genes y del gen *GDH* de *S. kluyveri* se resume en la figura 11. Ahí se puede observar que *GDH1* comparte una mayor cantidad de elementos reguladores en *cis* con el gen *GDH* de *S.*

kluyveri. Entre los elementos compartidos se encuentran aquellos que son reconocidos por factores transcripcionales involucrados en el catabolismo de aminoácidos (Gln3p, Gat1p y Gzf3p), en la biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p), en el metabolismo energético y de respiración (Hap2, 3, 4 y 5p, Mot3p y Gis1p), en la regulación dependiente de glucosa (Nrg1p y Rgt1p), en la comunicación entre organelos (Rtg1p y Rtg3p) y en la respuesta al estrés (Msn2p y Msn4p). *GDH3* de *S. cerevisiae* solo conserva con el gen *GDH* de *S. kluyveri* algunos de los elementos que se visto pueden unir factores transcripcionales involucrados en el catabolismo de los aminoácidos, en el metabolismo de la respiración y en la regulación por glucosa (Fig. 11).

	1. Catabolismo de aminoácidos.	2. Respiración.	3. Represión en hipoxia.	4. Inducción en fase diáuxica.	5. Represión por glucosa.	6. Biosíntesis de aminoácidos.	7. Comunicación entre organelos.
<i>S. kluyveri</i> GDH							
<i>S. cerevisiae</i> GDH1							
<i>S. cerevisiae</i> GDH3							

	<i>S. cer GDH1</i>	<i>S. cer GDH3</i>	<i>S. klu GDH</i>
Gln3p	Gln3p	Gln3p	Gln3p
Gat1p	Gat1p	Gat1p	Gat1p
Gzf3p	Gzf3p	Gzf3p	Gzf3p
Hap1, 2, 3, 4 y 5p	Hap1, 2, 3, 4 y 5p	Hap1, 2, 3, 4 y 5p	Hap1, 2, 3, 4 y 5p
Mot3p			Mot3p
Gis1p			Gis1p
Nrg1p	Nrg1p	Nrg1p	Nrg1p
Rgt1p	Rgt1p	Rgt1p	Rgt1p
Gcn4p			Gcn4p
Leu3p			
Bas1p			
Rtg1p			Rtg1p
Rtg3p			Rtg3p
Msn2			
Msn4			

Figura 11.- Resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *GDH1* y *GDH3* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *GDH* de *Saccharomyces kluyveri*

En la figura 12 se muestra la disposición de estos elementos en las regiones intergénicas analizadas. Se observa que el gen *GDH1* de *S. cerevisiae* presenta un mayor número de elementos reguladores en *cis* que el gen *GDH3*. El

gen *GDH* de *S. kluyveri* comparte con *GDH1* la mayoría de los elementos *cis*-reguladores que se encontraron en su promotor.

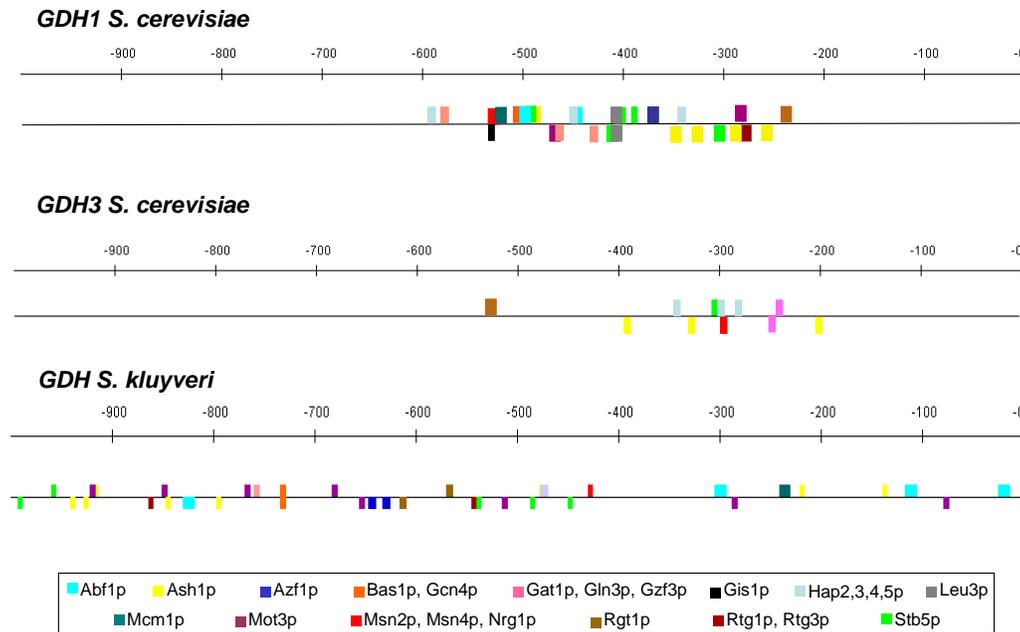


Figura 12.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *GDH1* y *GDH3* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *GDH* de *Saccharomyces kluyveri*

Biosíntesis de leucina: *LEU4* y *LEU9*

En la biosíntesis de leucina las enzimas Leu4p y Leu9p de *S. cerevisiae* conservan un metabolito precursor en común con las enzimas Bat1p y Bat2p, el α -cetoisovalerato. Usando este metabolito precursor por medio de una reacción de condensación con acetilCoA catalizado por Leu4p/Leu9p dará lugar al α -isopropilmalato que es un intermediario de la biosíntesis de leucina. En *S. cerevisiae* estas proteínas son codificadas por los genes duplicados *LEU4* y *LEU9*.

El análisis de la región intergénica de este par de genes duplicados se resume en la figura 13. Ahí se puede observar que el gen *LEU4* comparte una mayor cantidad de elementos reguladores que el gen *LEU9* de *S. cerevisiae* al compararlas con el gen *LEU* de *S. kluyveri*.

Tanto *LEU4* como *LEU9* de *S. cerevisiae*, comparten elementos reguladores que reconocen factores transcripcionales involucrados en biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p), en la regulación dependiente de glucosa (Gcr1p) y en la regulación positiva en la fermentación de maltosa (Mal63p). Por otra parte el gen *LEU4* de *S. cerevisiae* y el gen *LEU* de *S. kluyveri* comparten elementos reguladores en *cis* que son reconocidos por factores transcripcionales involucrados en biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p), en la regulación negativa en hipoxia (Mot3p), en la respiración (Hap2, 3, 4 y 5p), en la comunicación entre organelos (Rtg1p y Rtg3p) y en la respuesta al estrés (Hsf1p, Yap1p, Hac1p). A excepción de Gcn4p y Mot3p, estos elementos no se conservan en el gen *LEU9*.

	S. cer LEU4	S. cer LEU9	S. Klu LEU
S. klu LEU	Gcn4p	Gcn4p	Gcn4p
	Bas1p		Bas1p
	Met4p		
		Leu3p	
	Gcr1p	Gcr1p	
	Hap2, 3, 4 y 5p		Hap2, 3, 4 y 5p
S. cer LEU4	Mot3p	Mot3p	Mot3p
	Rtg1p		Rtg1p
	Rtg3p		Rtg3p
	Hsf1p		Hsf1p
	Yap1p		Yap1p
	Hac1p		Hac1p
	Mal63p	Mal63p	Mal63p
S. cer LEU9			

<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de aminoácidos. 2. Regulación negativa en hipoxia. 3. Respiración. 4. Comunicación entre organelos. 5. Respuesta a estrés. 6. Regulación positiva en la fermentación de maltosa. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de aminoácidos. 2. Regulación dependiente de glucosa. 3. Regulación negativa en hipoxia. 4. Respiración. 5. Comunicación entre organelos. 6. Respuesta a estrés 7. Regulación positiva en la fermentación de maltosa.
<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de aminoácidos. 2. Regulación dependiente de glucosa. 3. Regulación positiva en la fermentación de maltosa. 	

Figura 13.- Resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *LEU4* y *LEU9* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *LEU* de *Saccharomyces kluyveri*

En la figura 14 se muestra la disposición de estos elementos encontrados en la región intergénica de los genes *LEU4* y *LEU9* de *S. cerevisiae* y *LEU* de *S. kluyveri*. Observamos que *LEU4* comparte una mayor cantidad de elementos

reguladores en *cis* que *LEU9* de *S. cerevisiae* al compararlos con el gen *LEU* de *S. kluyveri*.

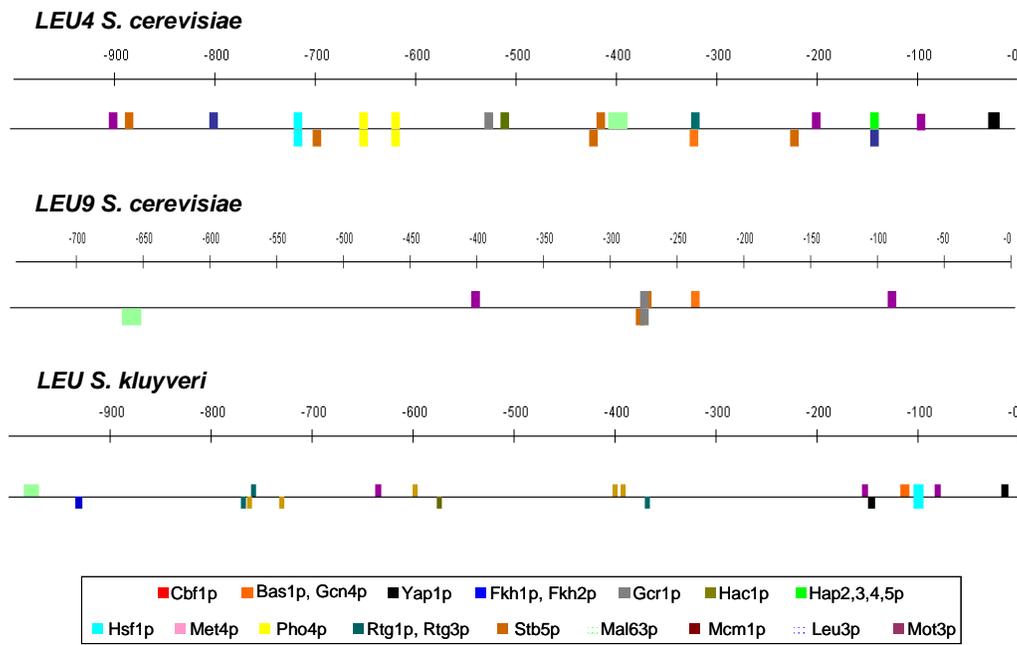


Figura 14.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *LEU4* y *LEU9* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *LEU* de *Saccharomyces kluyveri*

Biosíntesis de lisina: *LYS20* y *LYS21*

Otro nodo que comunica el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la biosíntesis de aminoácidos es la reacción que catalizan las isoenzimas Lys20p/Lys21p en la condensación del oxaloacetato con acetilCoA para sintetizar homocitrato, siendo este el primer paso de la biosíntesis de lisina. Estas isoenzimas son codificadas por dos genes parálogos en *S. cerevisiae* *LYS20* y *LYS21*.

El análisis de la región intergénica de los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* y del gen *LYS* de *S. kluyveri*, se muestra en la figura 15. Se observa que *LYS20* y *LYS21* presentan algunos elementos reguladores compartidos con *LYS* de *S. kluyveri*. Es decir, algunos de los elementos que se encuentran en el gen *LYS* de *S. kluyveri* no se presentan en el gen *LYS20* de *S. cerevisiae*, pero sí se observan en el gen *LYS21*. Por ejemplo, elementos reguladores encontrados en el gen *LYS* de *S. kluyveri* que son reconocidos por factores transcripcionales involucrados en la regulación dependiente de glucosa (Gcr1p) y en la comunicación entre organelos (Rtg1p y Rtg3p) no están en el gen *LYS20* de *S. cerevisiae*, pero sí se encuentran en el gen *LYS21* de *S. cerevisiae*.

De manera contrastante, elementos reguladores encontrados en el gen *LYS* de *S. kluyveri* que son reconocidos por factores transcripcionales involucrados en regulación de genes en fase diáuxica (Gis1p) y en la regulación de genes que participan en el metabolismo de la respiración (Hap2, 3, 4 y 5p), no se encuentran en el gen *LYS21* de *S. cerevisiae*, pero sí están presentes en el gen *LYS20*.

Por otro lado los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* al igual que el gen *LYS* de *S. kluyveri* comparten elementos reguladores para factores involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p) y respuesta al estrés (Yap1p).

Los elementos reguladores encontrados en el gen *LYS20* de *S. cerevisiae* que pudieran ser reconocidos por factores transcripcionales del tipo "GATA" (Gln3p, Gat1p, Gzf3p) no se encuentran presentes en los promotores de los genes *LYS21* de *S. cerevisiae* y *LYS* de *S. kluyveri*.

	S. cer LYS20	S. cer LYS21	S. klu LYS
S. klu LYS	1. Biosíntesis de aminoácidos.	Gcn4p	Gcn4p
	2. Regulación por glucosa.	Gcn4p	Gcn4p
	3. Respiración.	Lys14p	
	4. Inducción en fase diáuxica.	Lys14p	
	5. Represión por hipoxia.		Gcr1p
	6. Comunicación entre organelos.	Gcr1p	Gcr1p
	7. Respuesta a estrés.	Hap1, 2, 3, 4 y 5p	Hap1, 2, 3, 4 y 5p
S. cer LYS20	1. Biosíntesis de aminoácidos.	Gis1p	Gis1p
	2. Biosíntesis de lisina.		
	3. Respiración.	Mot3p	Mot3p
	4. Inducción en fase diáuxica.	Mot3p	Mot3p
	5. Represión en hipoxia.	Gln3p	
	6. Catabolismo de aminoácidos.	Gat1p	
	7. Respuesta a estrés.	Gzf3p	
S. cer LYS21	1. Biosíntesis de aminoácidos.	Arg81p	
	2. Biosíntesis de lisina.		
	3. Regulación por glucosa.		Rtg1p
	4. Represión en hipoxia.		Rtg3p
	5. Comunicación entre organelos.	Hsf1p	
	6. Respuesta a estrés.		Cup2p
	Hac1p	Hac1p	Hac1p
	Yap1p	Yap1p	Yap1p

Figura 15.- Resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *LYS20* y *LYS21* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *LYS* de *Saccharomyces kluyveri*

En la figura 16 se muestra la disposición espacial de los elementos encontrados en la región intergénica analizada de los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* y el gen *LYS* de *S. kluyveri*.

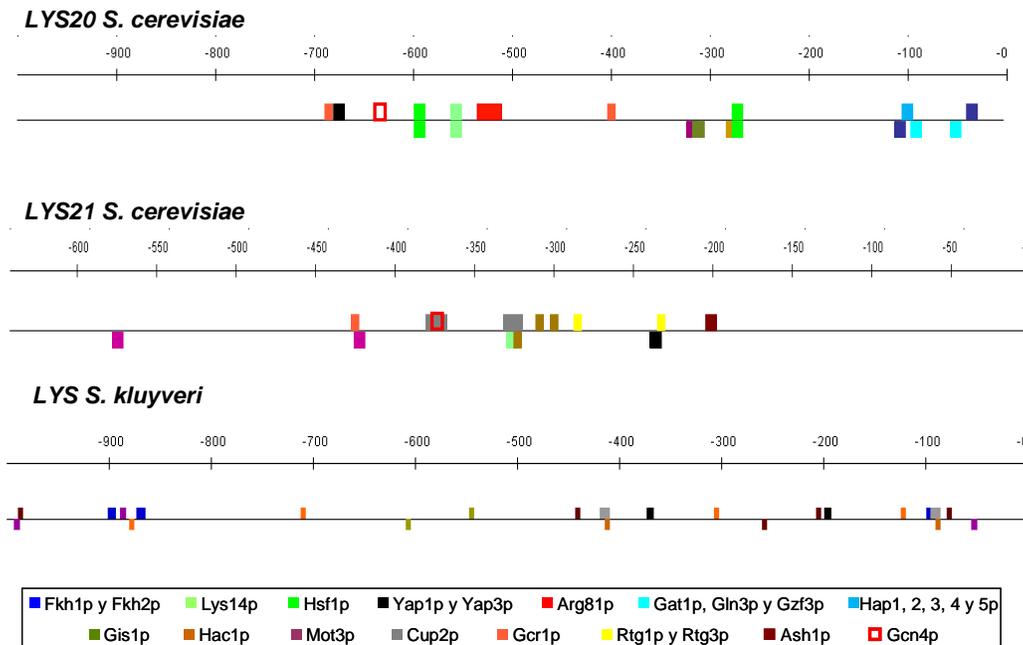


Figura 16.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *LYS20* y *LYS21* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *LYS* de *Saccharomyces kluyveri*

Biosíntesis de serina: *SER3* y *SER33*

El precursor de la biosíntesis de serina es el 3-fosfoglicerato un intermediario del catabolismo de la glucosa. El primer paso de la síntesis de serina se encuentra en el nodo que comunica la glucólisis con la biosíntesis de aminoácidos, esta reacción es catalizada por dos isoenzimas Ser3p/Ser33p, codificadas por dos loci en el genoma de *S. cerevisiae* *SER3* y *SER33*, respectivamente.

El análisis de la región intergénica mostró que ambos genes *SER3* y *SER33* de *S. cerevisiae* pudieron haber perdido una forma de regulación diferente; sin embargo, se complementarían las funciones entre ambos genes. Por ejemplo, el promotor del gen *SER* de *S. kluyveri* puede ser reconocido por factores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Bas1p, Gcn4p y Met4p), represión por glucosa (Nrg1p), comunicación entre organelos (Rtg1p y Rtg3p) y respuesta a estrés (Yrr1p). Así, el gen *SER3* de *S. cerevisiae* sólo

conserva elementos reguladores que reconocen factores de transcripción involucrados en la regulación por glucosa (Nrg1p y Rgt1p) y en la respuesta a estrés (Yrr1p); sin embargo, no conserva los que están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y en la comunicación inter organelo. Por otro lado, el gen *SER33* de *S. cerevisiae* puede ser regulado por factores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y la comunicación inter organelo, pero no conservan los que están involucrados en la regulación dependiente de glucosa y en la respuesta a estrés (Fig. 17).

	<i>S. cer SER3</i>	<i>S. cer SER33</i>	<i>S. klu SER</i>
<i>S. klu SER</i>		Bas1p	Bas1p
		Gcn4p	Gcn4p
		Met4p	Met4p
<i>S. cer SER3</i>	Nrg1p		Nrg1p
	Rgt1p		
<i>S. cer SER33</i>		Rtg1p	Rtg1p
		Rtg3p	Rtg3p
	Yrr1		Yrr1p

Figura 17.- Resumen de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica de los genes *SER3* y *SER33* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *SER* de *Saccharomyces kluyveri*

En la figura 18 se muestra la disposición de estos elementos encontrados en la región intergénica de los genes *SER3* y *SER33* de *S. cerevisiae* además de *SER* de *S. kluyveri*.

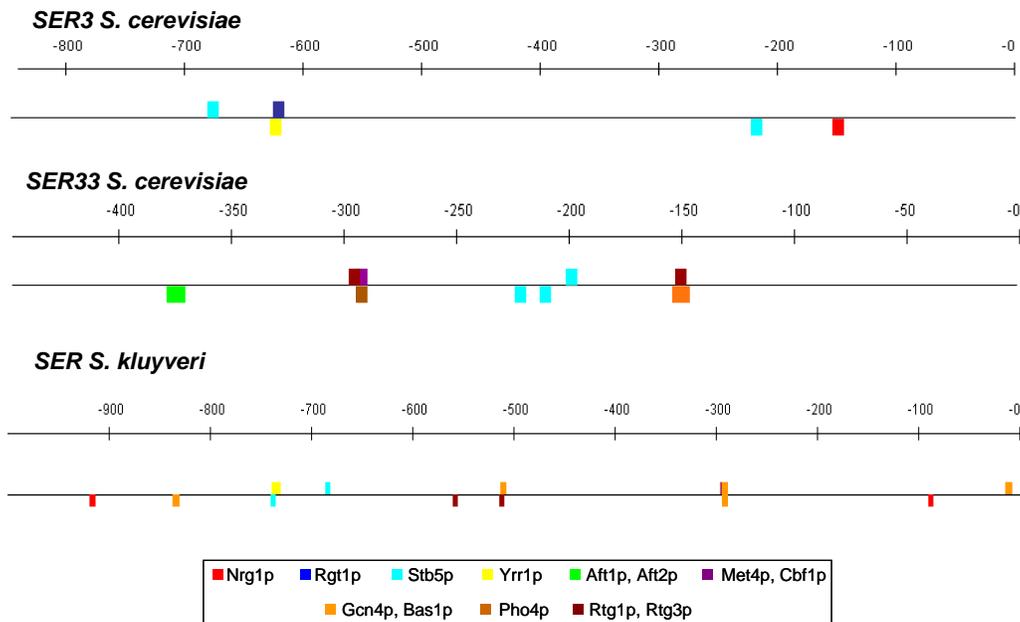


Figura 18.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *SER3* y *SER33* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *SER* de *Saccharomyces kluyveri*

Biosíntesis de metionina: *SAM1* y *SAM2*

Otro par de genes analizado es *SAM1* y *SAM2* de *S. cerevisiae*. Realmente existe una gran cantidad de reacciones que necesitan la transferencia de un grupo metilo, como la metilación del ADN y la biosíntesis de fosfolípidos entre otras, en el cual se ven involucrados tres tipos de donadores de grupos metilo: biotina, tetrahidrofolato y S-adenosilmetionina. De estos tres donadores de grupos metilo, el más usado en estas reacciones es el S-adenosilmetionina (AdoMet). Este compuesto es sintetizado a partir de metionina y ATP por medio de la catálisis de la enzima metionin adenosil transferasa (MAT). Esta enzima es un miembro de la familia de las MAT y está muy conservada en todos los reinos. *S. cerevisiae* tiene un par de isoenzimas que tienen la función (MAT) y están codificadas en dos loci *SAM1* y *SAM2*.

En la figura 19 se resume el análisis de la región intergénica de los genes *SAM1* y *SAM2* de *S. cerevisiae* y del gen *SAM* de *S. kluyveri*, y las funciones en las que están involucrados los factores transcripcionales que presumiblemente se podrían unir a éstas regiones intergénicas.

	S. cer SAM1	S. cer SAM2	S. klu SAM
S. klu SAM		Gcn4p	Gcn4p
	Met31p	Met31p	
	Met32p	Met32p	
		Met4p	Met4p
	Gcr1p		Gcr1p
	Gsm1p		Gsm1p
S. cer SAM1	Rtg1p	Rtg1p	Rtg1p
	Rtg3p	Rtg3p	Rtg3p
	Mal63p		Mal63p
S. cer SAM2			

S. klu SAM	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de aminoácidos. 2. Biosíntesis de metionina. 3. Regulación dependiente de glucosa. 4. Regulación en respuesta a limitación de glucosa. 5. Comunicación entre organelos. 6. Inducción en la fermentación de maltosa.
S. cer SAM1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de metionina. 2. Regulación dependiente de glucosa. 3. Regulación en respuesta a limitación de glucosa. 4. Comunicación entre organelos. 5. Inducción en la fermentación de maltosa.
S. cer SAM2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biosíntesis de aminoácidos. 2. Biosíntesis de metionina. 3. Comunicación entre organelos.

Figura 19.- Resumen de los elementos reguladores en cis encontrados en la región intergénica de los genes *SAM1* y *SAM2* de *Saccharomyces cerevisiae* y del gen *SAM* de *Saccharomyces kluyveri*

El análisis de la región intergénica mostró que el gen *SAM* de *S. kluyveri* y el gen *SAM1* de *S. cerevisiae* comparten la mayoría de los elementos reguladores en *cis* que se encontraron en la región intergénica; sin embargo, el gen *SAM2* de *S. cerevisiae* solo conserva algunos.

Esto es, que el gen *SAM* de *S. kluyveri* puede ser regulado por factores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p y Met4p), en la regulación dependiente de glucosa y en la regulación de genes en la limitación de glucosa (Gcr1p y Gsm1p), y en la comunicación entre organelos (Rtg1p y Rtg3p) así como en la regulación positiva en la fermentación de maltosa (Mal63p). El gen *SAM1* de *S. cerevisiae* solo conserva elementos reguladores

para los factores transcripcionales Met31p, Met32p, Gcr1p, Gsm1p, Rtg1p, Rtg3p y Mal63. En este caso el gen *SAM1* es probable que haya perdido la función de inducirse en un medio carente de aminoácidos, ya que no conserva el elemento Gcn4p.

Por otro lado el gen *SAM2* de *S. cerevisiae* es probable que pueda inducirse en medios en donde se necesite biosintetizar aminoácidos, ya que conserva elementos reguladores en “*cis*” que reconocen factores transcripcionales involucrados en biosíntesis general de aminoácidos (Gcn4p) y más específicos que están involucrados en la biosíntesis de metionina (Met31p, Met32p y Met4); sin embargo, no se puede regular por factores transcripcionales involucrados en la regulación dependiente de glucosa o en la limitación del mismo sustrato, ya que no conserva elementos reguladores para Gcr1p y Gsm1p.

En la figura 20 se muestra la disposición de éstos elementos encontrados en las regiones intergénicas analizadas de los genes *SAM1* y *SAM2* de *S. cerevisiae* y el gen *SAM* de *S. kluyveri*. Se observa que algunos elementos reguladores como Ino2p e Ino4p que están involucrados en la biosíntesis de fosfolípidos en respuesta a inositol, al parecer es una adquisición del gen *SAM2* de *S. cerevisiae*, ya que no se encuentra en el gen *SAM1* de *S. cerevisiae* y *SAM* de *S. kluyveri*.

Por otro lado también está presente en el gen *SAM1* de *S. cerevisiae* un elemento regulador que reconoce al factor transcripcional Xbp1p que también lo comparte con el gen *SAM* de *S. kluyveri*; este factor está involucrado en la represión de ciclinas.

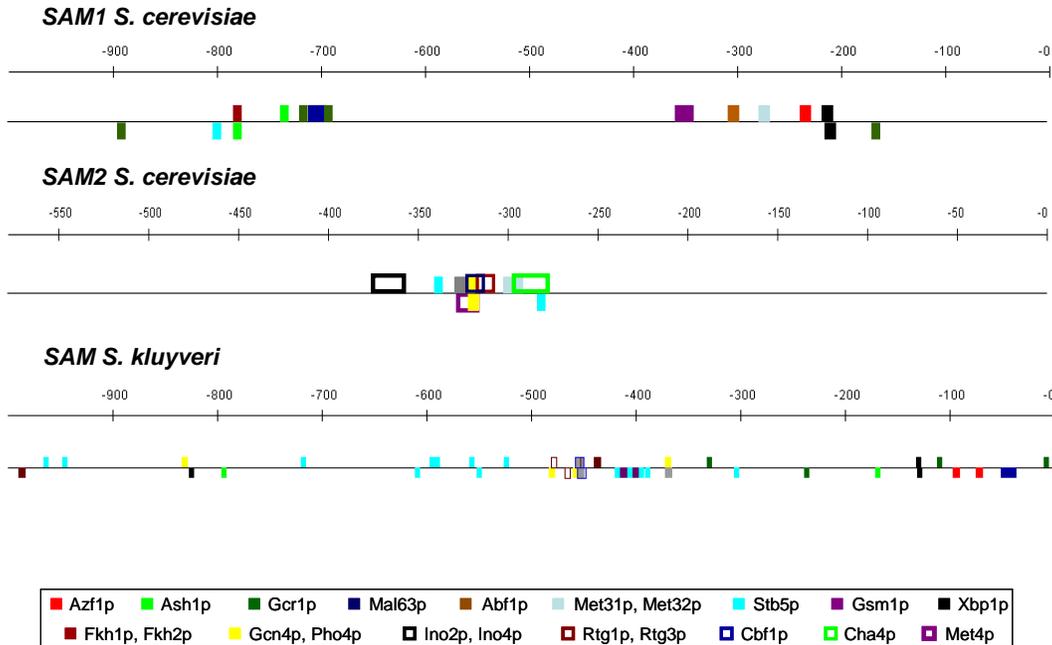


Figura 20.- Representación de la disposición de los elementos reguladores en *cis* encontrados en la región intergénica analizada de los genes *SAM1* y *SAM2* de *Saccharomyces cerevisiae* y el gen *SAM* de *Saccharomyces kluyveri*

En el análisis que realizamos de la región intergénica de los genes duplicados encontramos elementos en *cis* que pueden ser reconocidos por factores de transcripción que se ha visto que regulan genes que codifican para proteínas asociadas a varios procesos celulares. Podemos agrupar en varias clases a los factores de transcripción que potencialmente se unirían a las regiones promotoras de los genes duplicados estudiados en este trabajo. El total de las clases y el porcentaje que cada una de ellas representa en el total de los factores de transcripción que pudieran regular a los duplicados que estamos analizando se muestran en la figura 21. En una de las clases que cuentan con un mayor número de miembros (23.1% del total de factores de transcripción que pueden regular al grupo de genes duplicados que estamos analizando) se encuentran aquellos factores de transcripción que regulan genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de aminoácidos (Bas1p, Gcn4p, Leu3p, Lys14p, Put3p, Met4p, Met31 y 32p, Arg81p) (Fig. 1). De forma contrastante, también hay una clase que

representa el 15.4% (Gln3p, Gat1p, Gzf3p, Stp1p, Stp2p, Cha4p) que regula genes cuyos productos están involucrados en el catabolismo de los aminoácidos. Adicionalmente, el 15.4% (Yrr1p, Stb5p, Msn2p, Msn4p, Yap1p, Hsf1p) y el 10.25% (Mot3p, Hap2, 3, 4 y 5p, Gis1p, Gsm1p) de los factores transcripcionales que posiblemente se unirían a sitios en los promotores de los genes estudiados, se han asociado al control de genes cuyos productos participan en la respuesta a estrés y en el metabolismo energético y respiratorio, respectivamente. Finalmente en la clase que contiene el 12.8% del total de los factores de transcripción se agrupan aquellas proteínas de unión al DNA que regulan genes que participan en la reorganización de la cromatina y el silenciamiento (Abf1p, Fkh1 y 2p, Cbf1p, Arr1p) (Figura 21),

Procesos en donde están implicados los factores transcripcionales

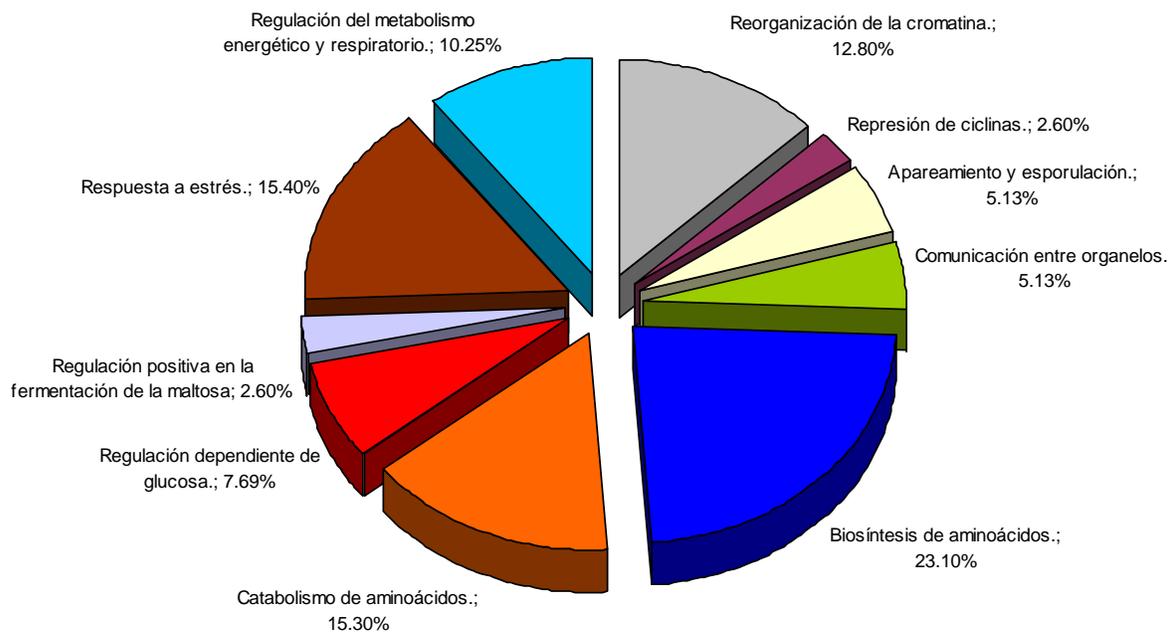


Figura 21.- Procesos celulares en donde se ha visto que los factores transcripcionales, que posiblemente se unirían a los promotores de los genes duplicados, están involucrados.

Divergencia funcional

Como se ha aceptado ampliamente, después de la duplicación de un gen, una copia muta a una tasa más elevada que la otra copia, así una copia mantiene la función original y la otra copia acumula cambios como resultado de redundancia funcional o por selección positiva (Ohno, 1970)

Muchos datos empíricos sugieren que el modelo clásico no puede explicar por qué ciertos genes son mantenidos en el genoma, ya que las mutaciones ventajosas son menos probables que las mutaciones deletéreas. Por ejemplo los genes *Eng1* y *Eng1b* en el pez zebra, *ZAG1* y *ZMM2* en Maíz, *Hoxa1* y *Hoxb1* en ratón, estos genes muestran patrones de expresión tejido-específico, sin embargo el gen ortólogo de la especie más cercana que no duplicó su genoma tiende a expresarse en ambos tejidos. (Force et al, 1999).

El modelo que podría explicar el porqué estos genes son mantenidos por duplicado en el genoma, es el modelo Duplicación, Degeneración y Complementación (DDC) propuesto por Force (1999). Este modelo menciona que un gen que tiene dos o más funciones después de duplicarse ambas copias pierden una función; así, para que los genes lleven a cabo la función cabal del gen ancestro se tienen que mantener en el genoma las dos copias del gen duplicado que ahora son complementarias.

Sin embargo una pregunta interesante es, ¿podemos identificar los residuos de aminoácidos en donde han ocurrido cambios importantes que resulten en cambios funcionales en las proteínas codificadas por los genes duplicados? En 1999, Gu desarrolló un método para tratar de identificar esos sitios. La idea fundamental se basa en la observación de cambios radicales conservados en grupos de genes ortólogos de una copia del gen duplicado y en cambios en la tasa de sustitución de aminoácidos en sitios específico.

Si después de que un gen se duplica y en estadios tempranos post-duplicación ocurre la divergencia funcional en un sitio, ese sitio para una copia del gen estará bajo presión selectiva. A tiempo tardío, la tasa de mutación observada en uno de los genes duplicados será baja al compararla con el mismo sitio en la otra copia del gen duplicado. En otras palabras, ha ocurrido un cambio en la tasa

de sustitución (de aminoácidos para proteínas, o de nucleótidos para secuencias de ADN) en un sitio específico dado (Gu, 1999; 2001)

Por otro lado, se dice que un residuo puede tener una función importante en el contexto del polipéptido si este residuo se encuentra conservado evolutivamente. Si en estadíos tempranos a la duplicación ambas copias presentan sustitución de aminoácidos en un sitio dado y este cambio les confiere funciones diferentes y ventajosas, estos residuos estarán bajo presión selectiva. Por lo que, la diferencia en la tasa de sustitución entre los genes parálogos será relativamente nula, ya que estos residuos se conservarán evolutivamente hasta estadíos tardíos de la duplicación. Esto quiere decir que al analizar los bloques de secuencias alineados de los genes ortólogos, para cada parólogo se encontrarán sitios en donde se observará un cambio radical en el tipo de aminoácido presente pero esos mismos sitios se conservarán sin variación entre el conjunto de genes ortólogos para la otra copia del gen duplicado. En la figura 22 se muestra un ejemplo hipotético de los tipos de divergencia en un alineamiento (Gu, 2001; 2006).

	Sequence	Type 0	Type 1	Type 2	Type-U
Gene 1	1	CR	WQLV	RV	KTLI
	2	CR	WQIV	RV	RVLI
	3	CR	WQVG	RV	KIIV
	4	CR	WQVG	RV	NVLL
	5	CR	WQAT	RV	DMLL
	6	CR	WQAT	RV	IKIL
	7	CL	WQVI	RV	EKLI
	8	CR	WQIT	RV	DLVL
Gene 2	9	CR	LTFD	DR	LKLM
	10	CR	ITFD	DR	QLLV
	11	CR	ITFD	ER	RLVV
	12	CR	YSFD	DK	LHVV
	13	CR	LEFD	DR	KMAL
	14	CL	LEFE	DR	KLLI
	15	CR	LEFD	DR	KLLL
	16	CR	VGFD	DK	ELII
	17	CR	VTFD	DR	RLII

Figura 22.- Alineamiento hipotético de un conjunto de secuencias de genes ortólogos de los genes parálogos. Gene 1 y Gene 2 son los genes duplicados

Tomado de Gu (2001)

En la figura 22 se observan los diferentes tipos de divergencia funcional descritos por Gu (1999). La divergencia funcional de tipo-0 se refiere a los sitios donde no se observan cambios radicales de aminoácidos ni cambios en la sustitución de aminoácidos en un sitio específico. Dado que son sitios universalmente conservados, estos pueden ser residuos indispensables en la catálisis que lleva a cabo la enzima, por ejemplo. En el tipo-1 de divergencia funcional, se observa un cambio en la tasa de sustitución de aminoácidos en un sitio específico, esto nos está informando que ha ocurrido divergencia funcional en ese sitio. En la divergencia funcional de tipo-2 se observa un cambio radical de aminoácido en un sitio dado pero este cambio se conserva entre los ortólogos de un gen parálogo, por lo que la diferencia en la tasa de sustitución es prácticamente nula. Por último, la divergencia de tipo-U se refiere a sitios en donde no se puede identificar el tipo de divergencia, y aunque estos sitios tienen baja probabilidad de presentar divergencia funcional, no se pueden descartar (Gu, 2001).

Supongamos que en el alineamiento hipotético (Fig. 22) la secuencia 1 del gene 1 representa la secuencia del gen en estudio, y la secuencia 9 es el gen parálogo, y las demás secuencias son los genes ortólogos de los genes parálogos de las especies cercanas al organismo en estudio. Ahora en el alineamiento podemos ver sitios que casi no cambian, por lo general esos sitios posiblemente participen en la reacción, por otro lado también podemos ver sitios en donde para un gen parálogo y sus ortólogos no varía, sin embargo en ese mismo sitio para el otro gen parálogo si varía a través de las especies cercanas al organismo, en este caso, los residuos WQ permanecen constantes para los genes ortólogos del gene 1, sin embargo en ese mismo sitio, la variación es mayor a través de las especies, eso es significativo de divergencia funcional tipo-1. En el caso contrario, los genes ortólogos del gene 2 conservan los residuos FD; sin embargo, en el mismo sitio los residuos varían a través de las especies para el gen parálogo 2.

También se observa en el alineamiento hipotético, que los genes ortólogos para el gene 1 conservan los residuos de aminoácidos RV, y en el mismo sitio

existe una substitución de aminoácidos pero se conserva entre los genes ortólogos para le gene 2 (D[K/R])

Basándonos en estas ideas, analizamos las secuencias de residuos de aminoácidos que codifican los genes duplicados de *S. cerevisiae* implicados en la biosíntesis de aminoácidos (*BAT1/BAT2*, *GDH1/GDH3*, *LEU4/LEU9*, *SAM1/SAM2*, *SER3/SER33*) para detectar sitios que nos indiquen divergencia funcional entre los genes parálogos.

Transaminasa de valina, leucina e isoleucina: Bat1p y Bat2p

La transaminasa de valina, leucina e isoleucina consiste de un dominio pequeño que va desde el residuo amino terminal al residuo G189, un loop intermedio (P190 – F196) y un dominio grande de comprende el residuo K197 al carboxilo terminal, en Bat1p. Y en Bat2p, el dominio pequeño comprende desde el amino terminal al residuo G172, el loop intermedio de la prolina 173 a la fenilalanina 179 y el dominio grande del residuo K180 al carboxilo terminal. El dominio pequeño se pliega en una forma α/β abierta y el dominio grande en forma de un pseudobarril (Yennawar et al, 2006; Goto et al, 2005).

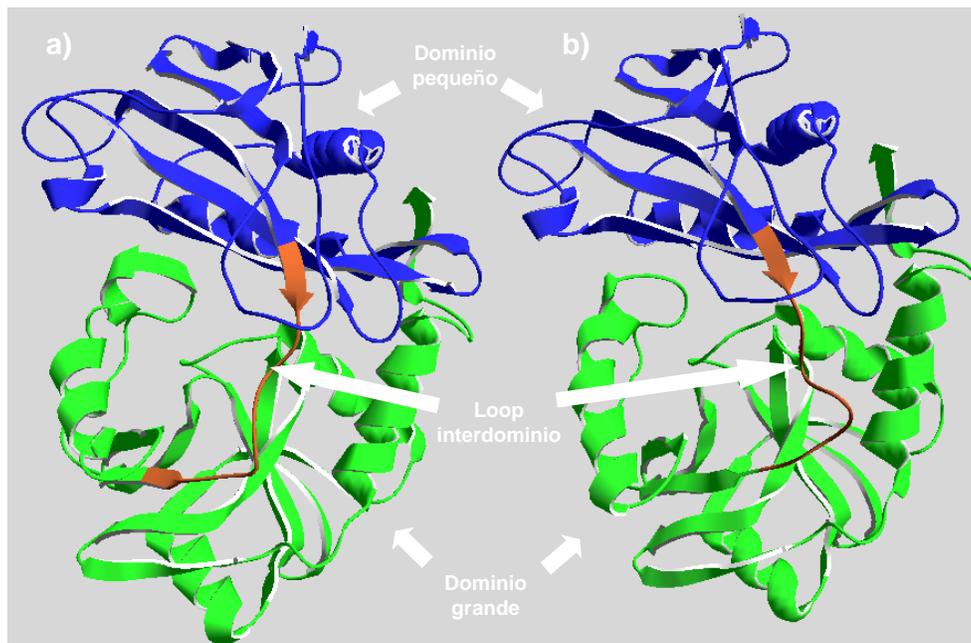


Figura 23.- Estructura tridimensional de las proteínas (transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada) Bat1p y Bat2p de *Saccharomyces cerevisiae* inferidas por homología a partir de la estructura inferida por rayos X de las proteínas hBCAT mitocondrial y hBCAT citosólica de humano

La figura 23 muestra la imagen de la estructura tridimensional de las proteínas Bat1p Bat2p de *S. cerevisiae*, ahí se observan los dos dominios principales, el pequeño y el grande de color azul y verde respectivamente, y de color café se muestra el loop interdominio.

La forma activa de la enzima es en forma de dímero y el sitio activo se forma en la interfase de los dominios y en la interfase de las subunidades del dímero (Yennawar et al, 2006; Goto et al, 2005). En la figura 24 se muestra un alineamiento de los residuos de aminoácidos de las proteínas Bat1p y Bat2p tanto de humano como de *S. cerevisiae*. Se señalan con puntos rojos los residuos que están involucrados en la interacción y estabilización del dímero. Los puntos negros indican los residuos involucrados en la estabilización de los sustratos y el cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP). Se observa que el residuo Y91 y el residuo R164 del alineamiento están involucrados tanto en la formación del dímero como en la actividad catalítica estabilizando al sustrato (α -cetoácido). (Goto et al, 2005; Yennawar et al, 2001; Yennawar et al, 2006).

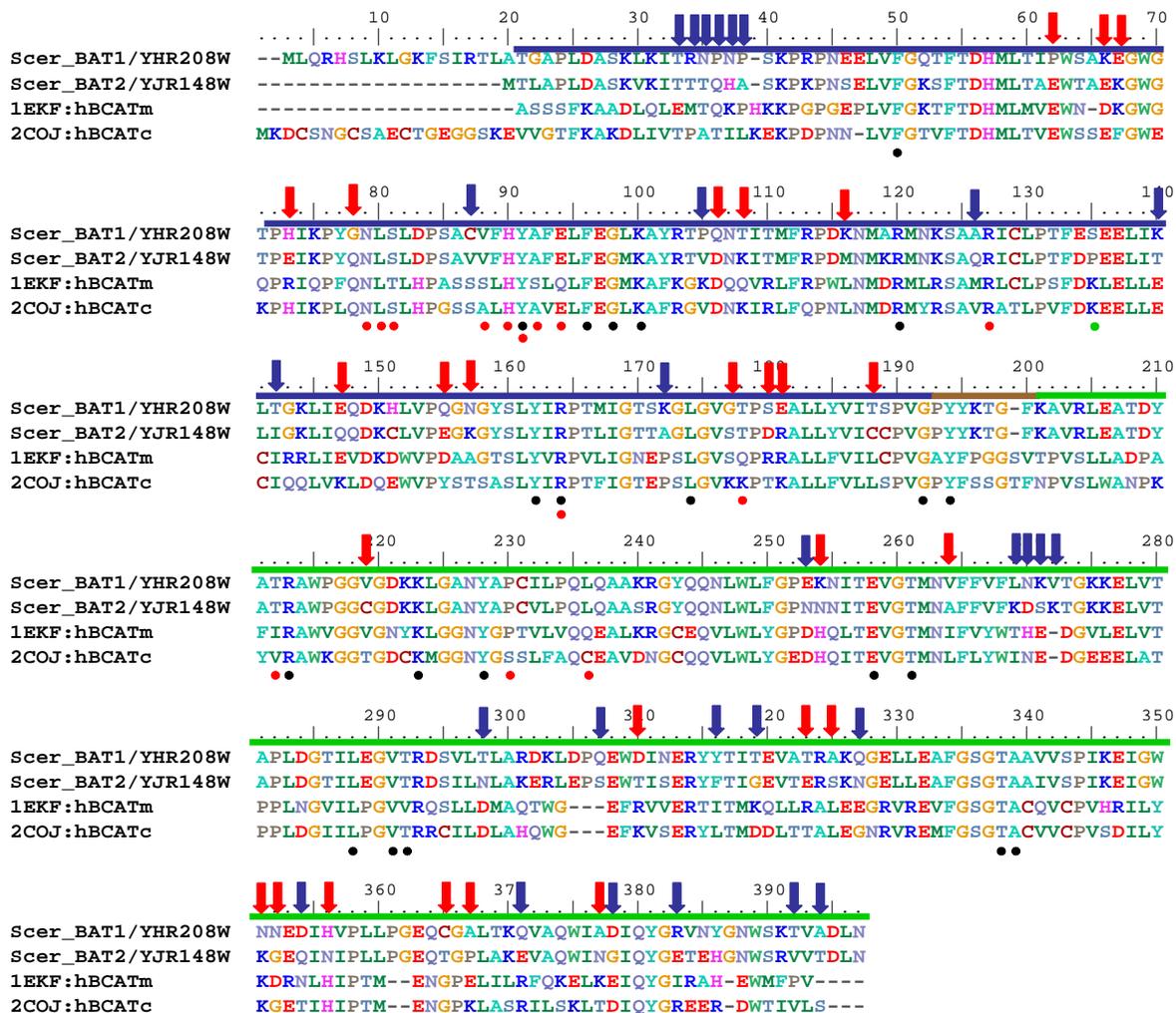


Figura 24.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las transaminasas de aminoácidos ramificados mitocondrial (1EKf:hBCATm) y citosólica (2COJ:hBCATc) de humano, y Bat1p (Scer_BAT1/YHR208W) y Bat2p (Scer_BAT2/YJR148W) de *Saccharomyces cerevisiae*

Puntos rojos, residuos involucrados en la interacción y estabilización del dímero. Puntos negros, residuos involucrados en la estabilización de los sustratos y el cofactor piridoxal 5-fosfato (PLP). Flechas azules, divergencia funcional tipo 1. Flechas rojas, divergencia funcional tipo 2.

El cofactor piridoxal 5-fosfato por lo general siempre se encuentra formando una base de Schiff con el grupo ϵ -amino del residuo lisina 223 (posición en alineamiento).

Las flechas rojas en la figura 24 indican los sitios en donde se detectó divergencia funcional del tipo-2, y las flechas azules son los sitios donde se detectó divergencia funcional tipo-1. En casi la totalidad de los sitios en donde se detectó divergencia funcional tipo-1 la proteína Bat2p muestra una mayor tasa de sustitución de aminoácidos en el sitio específico que la proteína Bat1p de *S. cerevisiae*.

Estas proteínas Bat1p y Bat2p muestran el grado de divergencia mayor entre las demás proteínas, y se observan sitios en donde es posible que haya ocurrido divergencia funcional a lo largo de toda la secuencia. Estos sitios detectados pueden ser el reflejo de la especialización de cada isoenzima; esto es, que Bat1p dirige la catálisis hacia la biosíntesis y Bat2p dirige la reacción hacia el catabolismo.

Otro dato interesante es que los sitios donde se detectó divergencia funcional tipo-1 el residuo de aminoácido en el sitio siempre se conservó en la proteína Bat1p y por el contrario, en el mismo sitio el residuo varió en la proteína Bat2p de *S. cerevisiae*.

Glutamato deshidrogenasa Gdh1p/Gdh3p de *S. cerevisiae*

La forma activa de la glutamato deshidrogenasa es un hexámero y cada monómero se subdivide en dos dominios. El dominio I en Gdh1p comprende del amino terminal al triptófano 183 y de la cisteína 414 al carboxilo terminal; para Gdh3p, éste comprende del amino terminal al triptófano W184 y de la cisteína 415 al carboxilo terminal. El dominio II comprende del residuo G184 al E413 para Gdh1p y para Gdh3p del residuo G185 al D414 (Peterson and Smith, 1999; Stillman et al, 1993; Werner et al, 2005).

El dominio II tiene una conformación clásica de unión a dinucleótido, ahí se une el cofactor NADP⁺, mientras que en el dominio I se encuentra la región en donde el α -cetoglutarato es estabilizado. Cuando los dos compuestos (substrato y cofactor) están unidos en los dominios I y II, respectivamente, la molécula presenta un cambio conformacional debido a un motivo (α -hélice) que se

encuentra en el dominio II en el extremo C-terminal (Peterson and Smith, 1999). En la figura 26 se muestra el alineamiento de las secuencias de Gdh1p/Gdh3p de *S. cerevisiae*, y de la proteína Gdh de *Bos taurus*, *Clostridium symbiosum* y *Plasmodium falciparum*. Se señalan con flechas rojas y azules los sitios donde se detectó divergencia funcional tipo-2 y tipo-1, respectivamente.

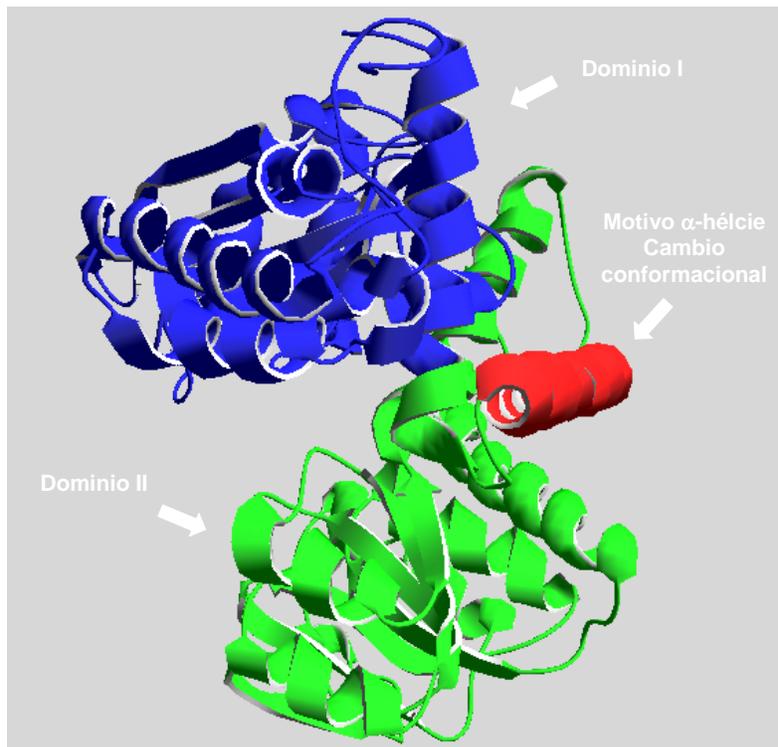


Figura 25.- Estructura tridimensional de la proteína glutamato deshidrogenasa de *Plasmodium falciparum*
(Werner et al, 2005)

En la figura 25 se describen los dominios de la proteína glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺. De color azul se muestra el dominio I en donde el sustrato α – cetoglutarato es reconocido y estabilizado, el dominio II se muestra de color verde y es en donde se une el cofactor NADP⁺. El motivo α -hélice que se presenta de color rojo está involucrado en los cambios conformacionales.

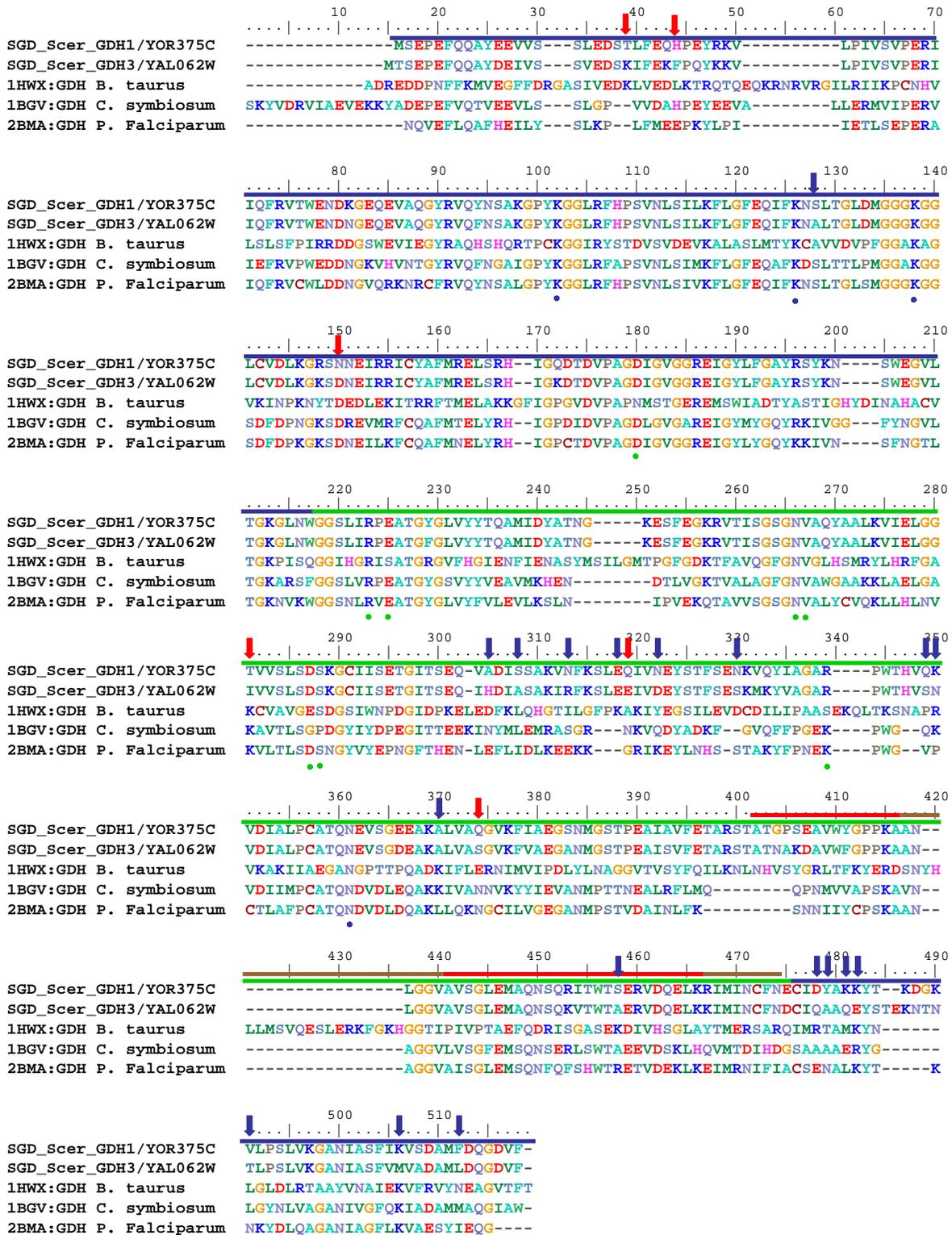


Figura 26.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las enzimas glutamato deshidrogenasa de *Bos taurus*, *Clostridium symbiosum*, *Plasmodium falciparum* y *Gdh1p/Gdh3p* de *Saccharomyces cerevisiae*

Las barras que se extienden a lo largo de la secuencia indican los dominios de la enzima, dominio I (azul) y dominio II (verde). Las barras rojas y de color café indican todos los motivos involucrados en el cambio conformacional. En el alineamiento, en la región comprendida entre los residuos 441 a 446 se muestra el motivo α -hélice que rota para que los dos dominios de la proteína puedan acercarse.

Los puntos azules indican los residuos involucrados en la estabilización del sustrato y los puntos verdes indican los residuos involucrados en la estabilización del cofactor. También se observó que a partir de la región central de la molécula hasta el carboxilo terminal hay una mayor cantidad de sitios que se identificaron como sitios de divergencia funcional, y éstos se encuentran en el dominio II en donde se une el cofactor NADP⁺.

En el motivo involucrado en el cambio conformacional solo se observa un sitio en donde se presume ha ocurrido divergencia funcional tipo-1, este es un cambio de una serina por una alanina en la posición 458 del alineamiento; sin embargo, la tasa de sustitución de aminoácidos en Gdh3p es mayor que la tasa de sustitución en Gdh1p en ese sitio específico.

Por lo general, en donde se detectó divergencia funcional tipo-1 siempre se observa que Gdh1p tiene una menor tasa de sustitución de aminoácidos que la proteína Gdh3p.

α -Isopropil-malato sintasa Leu4p/Leu9p de *S. cerevisiae*

Los genes *LEU4* y *LEU9* de *S. cerevisiae* llevan a cabo la catálisis de la condensación de α -cetoisovalerato y acetil-CoA para formar α -isopropil-malato. Estas enzimas son activas en forma dimérica y cada monómero está subdividido en 4 dominios. Un dominio en forma de barril (a/b)₈ comprende del residuo F42 al F365) en Leu4p, y del residuo A42 al F364 en Leu9p. Dos dominios pequeños se encuentran entre los residuos S366 a A409 y V410 a Y472 en Leu4p y, del residuo S365 a A408 y V409 a Y471 en Leu9p (Koon et al, 2004). Esta sintasa contiene además un dominio regulador que va desde el residuo N473 al carboxilo terminal

en Leu4p y del residuo N472 al carboxilo terminal en Leu9p (Koon et al, 2004) (Fig. 27).

En la estructura de barril se encuentra el sitio activo y se caracteriza por tener el motivo de la familia de α -isopropilmalato sintetasa (HxH[N/D]D) que está involucrado en la catálisis en el sitio activo (Wang et al, 1991). En este dominio 3 estructuras α -hélices (α_6 , α_7 y α_8) son las que están involucradas en la interacción de los monómeros para la formación del dímero y también la extensión amino terminal que no forma parte de la estructura de barril (Koon et al, 2004).

El primer dominio de los dos dominios pequeños de unión tiene un residuo de histidina (posición 369 en Leu4p y posición 368 en Leu9p) y un residuo de tirosina (posición 395 en Leu4p y posición 394 en Leu9p) que forman parte del sitio activo. Así que cuando el dímero se forma, estos residuos del monómero A se acercan al sitio activo del monómero B y el monómero B acerca esos residuos al sitio activo del monómero A (Koon et al, 2004).

El dominio regulador tiene una estructura característica de dos unidades similares de $\beta\beta\beta\alpha$ dispuestas de forma anti-paralela. Este dominio tiene la función de regular alostéricamente a la enzima cuando el producto final (L-leucina) se une en ese sitio (Koon et al, 2004). La figura 25 muestra una estructura tridimensional de Leu4p de *S. cerevisiae* marcando los dominios y sitios de interacción entre monómeros. En rojo se muestran las estructuras α -hélices y la extensión amino-terminal involucradas en la dimerización; en azul se muestra la estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ que se sobrelapa con los sitios de dimerización. En amarillo y café se muestran los dominios de unión, y en verde el dominio de regulación, en donde se encuentra el sitio alostérico que regula negativamente a la enzima cuando se une el producto final (L-leucina).

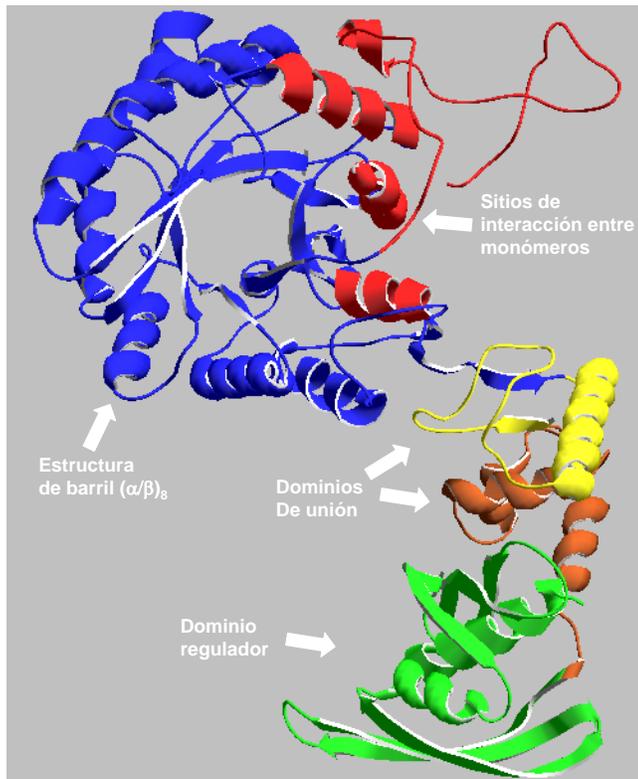


Figura 27.- Estructura tridimensional de la proteína Leu4p de *Saccharomyces cerevisiae* inferida por homología

Se señalan con flechas los diferentes dominios de la proteína (Koon et al, 2004).

La estructura de barril no mostró divergencia funcional sitio específico; de manera contrastante, a partir de los dominios de unión hasta el dominio regulador hay un incremento en el número de residuos que mostraron divergencia funcional (Fig. 28).

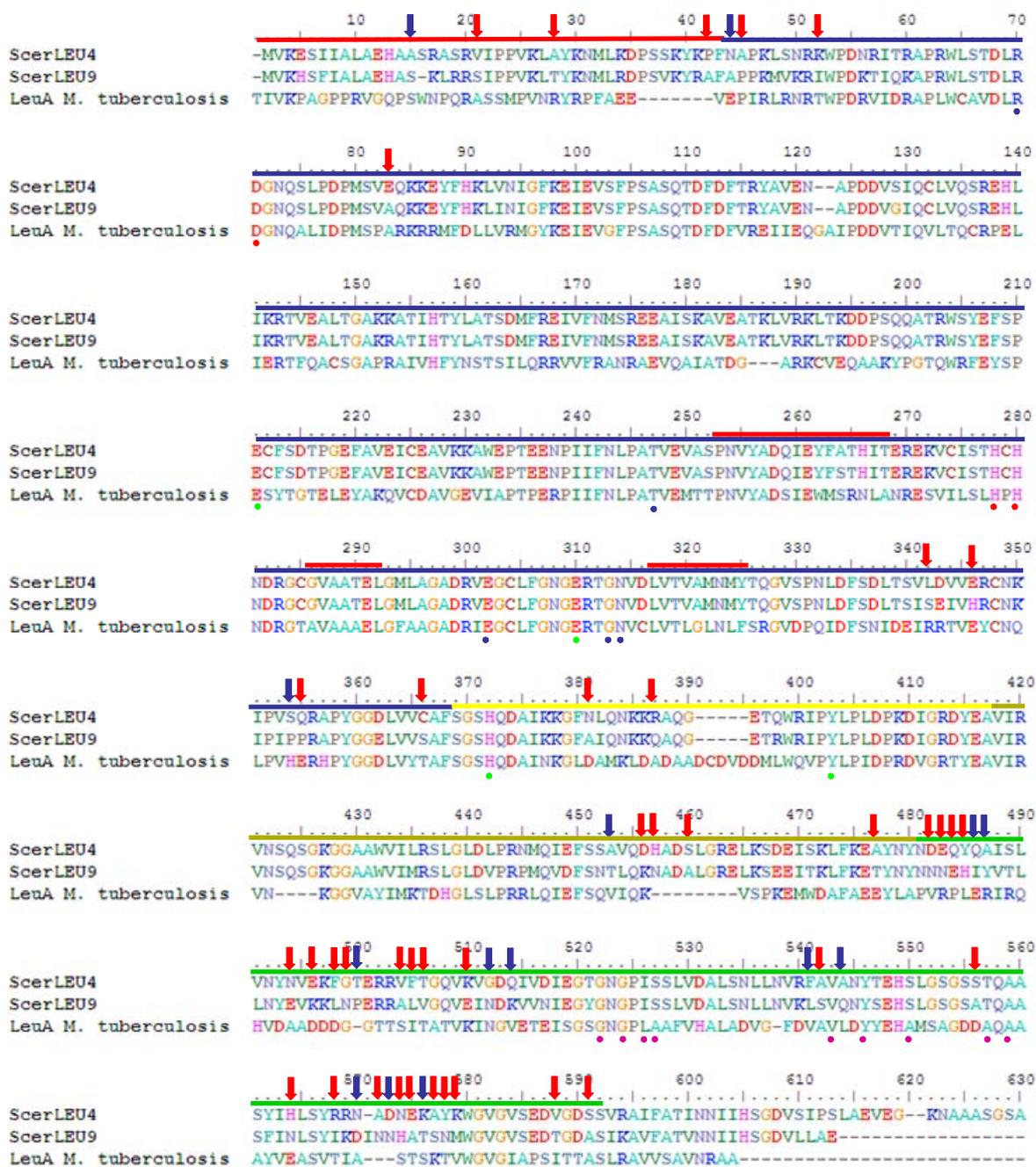


Figura 28.- Alineamiento de las secuencias de residuos de aminoácidos de las proteínas Leu4p/Leu9p de *Saccharomyces cerevisiae* y LeuA de *Mycobacterium tuberculosis*

En la figura 28 se muestra el alineamiento de las enzimas Leu4p/Leu9p de *S. cerevisiae* y LeuA de *Mycobacterium tuberculosis*. Los puntos rojos son los residuos que coordinan al ion cinc, los puntos azules indican los residuos que estabilizan al α -cetoisovalerato, los puntos verdes indican los residuos que forman la cavidad que sostiene y estabiliza al acetilCoA. Los puntos en morado indican los residuos importantes en el reconocimiento y estabilización de L-leucina que se une al sitio alostérico en el dominio de regulación.

Las barras de color que se extienden a lo largo del alineamiento de la figura 28 indican los dominios que se describieron previamente en la figura. 27. La barra azul indica la estructura de barril; la amarilla y la café indican los dominios de unión y la verde representa el dominio de regulación, las barras rojas son los sitios que participan en la interacción entre monómeros.

Hay dos observaciones importantes en este análisis, 1) la divergencia funcional que se observa en la mayoría de los sitios es del tipo-2 y todos estos cambios en esos sitios son radicales; esto es, que se substituye por un aminoácido con propiedades fisicoquímicas diferentes y, 2) en los pocos sitios donde se observa divergencia funcional tipo 1, los cambios en la tasa de substitución no son gen específico, esto quiere decir que hay sitios en la proteína Leu4p en donde se observa incremento en la tasa de substitución de aminoácidos, pero hay otros sitios en donde el incremento en la tasa de substitución es observado en la proteína Leu9p de *S. cerevisiae*.

Entre especies cercanas a *S. cerevisiae*, los residuos de aminoácidos en los sitios 44, 354, 500, 541, 544, 570, 573, 576 del alineamiento están conservados para Leu4p pero son variables en Leu9p (Fig. 28). En contraste, los residuos en los sitios 453, 486, 487, 512, 514 del mismo alineamiento son variables para la proteína Leu4p pero están conservados en Leu9p entre especies cercanas a *S. cerevisiae*.

3-fosfoglicerato deshidrogenasa Ser3p/Ser33p de *S. cerevisiae*

Otro claro ejemplo de enzimas que se inhiben alostéricamente por el producto final en este caso L-serina, son las isoenzimas Ser3p/Ser33p de *S. cerevisiae*

(Thompson et al, 2005). Estas enzimas catalizan el primer paso de la biosíntesis de serina (Albers et al, 2003).

Estas oxidoreductasas catalizan la transferencia de un ión hidrógeno del grupo OH del C β del 3-fosfoglicerato para oxidarlo a la forma 3-fosfo-oxipiruvato. Las isoenzimas Ser3p/Ser33p utilizan NAD⁺ o NADP⁺ como cofactor para llevar a cabo la transferencia del ión hidrogeno (Albers et al, 2003).

La forma activa de la enzima es un tetrámero y cada monómero está conformado por 3 dominios: 1) el dominio de unión a dinucleótido, 2) el dominio de unión a sustrato y 3) el dominio de regulación en donde se encuentra el sitio alostérico donde se une el producto final (L-serina) e inhibe a la enzima (Bell et al, 2004, Schuller et al, 1995, Thompson et al, 2005).

Los dominios de unión a nucleótido interactúan para formar una interacción monómero-monómero. El dominio de unión a sustrato consiste de una serie de hebras β que interconectan una serie de α -hélices. Mientras que la interacción entre el dominio de unión a sustrato y el dominio de unión a nucleótido se conserva en otras deshidrogenasas (glicerato deshidrogenasa, formato deshidrogenasa), el dominio regulador es único en la familia 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y consiste en cuatro hebras β conectadas a dos α -hélices (Bell et al, 2004, Schuller et al, 1995) (Figura 30).

Ya se describió la estructura tridimensional de la enzima 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de *E. coli* inferida por rayos X y se identificaron los residuos que forman el sitio activo (R60, S61, K141, N108, Q301, R240) (Thompson et al, 2005). Estos residuos fueron mapeados en las secuencias de aminoácidos de Ser3p y Ser33p en *S. cerevisiae* (R107, S108, N155, K188, R287, Q356). Existen dos residuos que son importantes para el movimiento del protón en *E. coli* (H292, E269) y en *S. cerevisiae* en ambas isoenzimas estos residuos se mapearon en las posiciones 347 y 316, respectivamente.

En *E. coli*, los dominios reguladores de dos monómeros interactúan formando 8 hebras β y los residuos H344, N346 y N364 interactúan con la L-serina, estos residuos están conservados en *S. cerevisiae*. Además, los residuos G294 y G295 en *E. coli* contribuyen en la flexibilidad entre el dominio de unión a

nucleótido y el dominio de unión a sustrato, y también estos residuos están conservados en *S. cerevisiae* (Schuller et al, 1995).

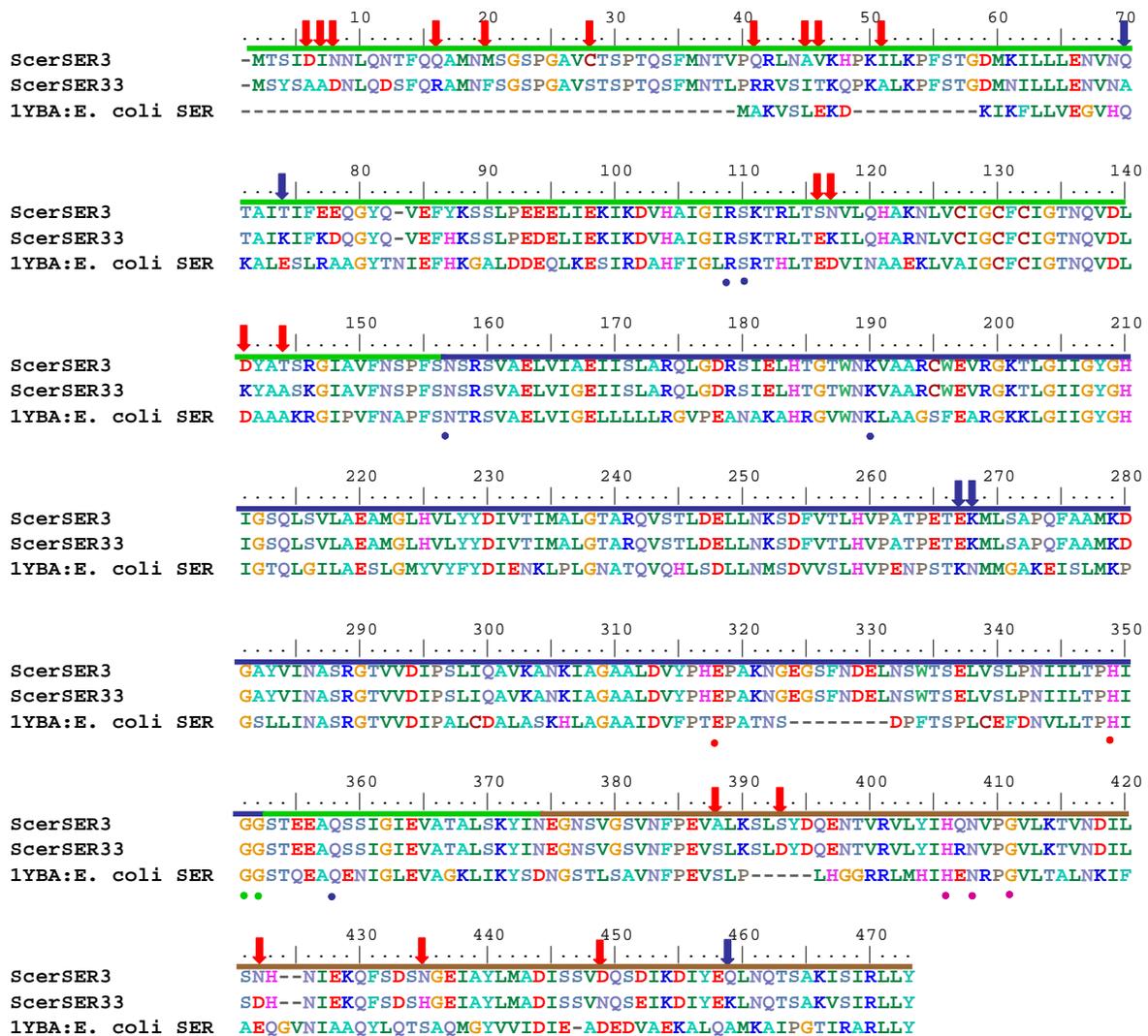


Figura 29.- Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Ser3p/Ser33p de *Saccharomyces cerevisiae* y SerA de *Escherichia coli*

En la figura 29 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las isoenzimas Ser3p y Ser33p de *S. cerevisiae* y la enzima SerA de *E. coli*. Las barras que se extienden identifican a los residuos como miembros del dominio, de color azul se muestra el dominio de unión a dinucleótido, de color

verde se muestra el dominio de unión a sustrato, y la barra de color café muestra el dominio regulador.

Los puntos azules indican los residuos en donde el sustrato y cofactor se unen, los puntos en color rojo indican los residuos que están involucrados en la transferencia del protón. Los puntos de color morado indican los residuos que interaccionan directamente con la L-serina (inhibidor) en el dominio regulador. Las flechas azules y rojas indican sitios en donde se detectó divergencia funcional tipo-1 y tipo-2, respectivamente.

El análisis presentado de manera resumida en la figura 29 mostró que la mayoría de los sitios donde se detectó divergencia funcional, ésta fue del tipo-2. Es decir, los residuos cambian entre genes parálogos, pero se conservan entre genes ortólogos. También se ve que la mayoría de los sitios divergentes probables se encuentran en una región amino terminal en las secuencias de las isoenzimas de *S. cerevisiae* que no se alinea con la secuencia de *E. coli*. Esta zona no fue modelada, por lo tanto no se sabe cómo está dispuesta en la estructura tridimensional, o si realmente forma parte del dominio de unión al sustrato.

En el dominio de unión a nucleótido sólo se observan dos sitios que presentan divergencia funcional tipo-1, y en el dominio regulador es en donde se ve un incremento en sitios donde se detectó divergencia funcional tipo-1 y tipo-2.

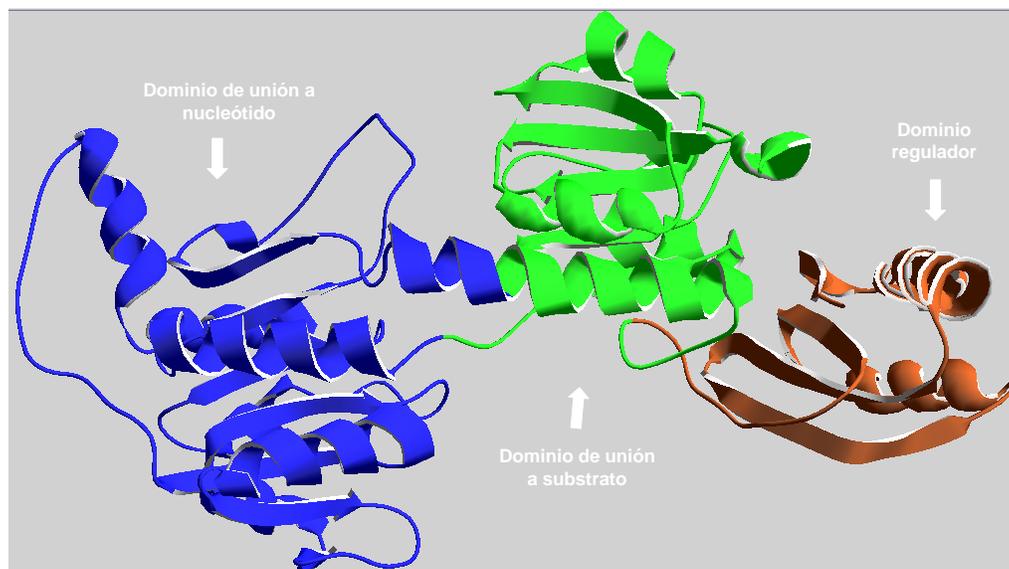


Figura 30.- Estructura tridimensional de la proteína Ser3p de *Saccharomyces cerevisiae* inferida por homología a partir de las coordenadas reportadas para *Escherichia coli*

Se muestran en distintos colores los dominios de la enzima (Thompson et al, 2005).

S- adenosil-metionin sintetasa Sam1p y Sam2p de *S. cerevisiae*

Como se mencionó anteriormente, existen una gran variedad de reacciones que necesitan grupos metilo, y el compuesto donador principal es el S-adenosil-metionina (AdoMet) que es sintetizado por la metionin adenosiltransferasa (MAT) a partir de L-metionina y ATP. En *S. cerevisiae* hay dos genes, producto de la duplicación completa del genoma, que codifican para dos isoenzimas con actividad MAT, *SAM1/SAM2*. (Cherest and Surdin-Kerjan, 1978) Los productos codificados por estos genes transfieren el grupo adenosil del ATP al aminoácido L-metionina. Esto hace que el grupo trifosfato del ATP sufra dos cortes uno entre el grupo adenosil y el grupo α -fosfato y el otro entre el β -fosfato y el γ -fosfato liberando pirofosfato y ortofosfato (Cantoni, 1953, Parry and Minta, 1982, Markham et al, 1987).

La enzima activa se encuentra en forma de tetrámero, y cada monómero está constituido por 3 dominios: 1) el dominio N-terminal, 2) dominio central y 3) el dominio C-terminal. Cada dominio se constituye de dos α -hélices que están sobre una hoja β de tres o cuatro hebras β que tienen un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos. La principal interacción entre monómeros se da entre las hojas β de cada dominio y las principales interacciones son hidrofóbicas (Fig. 32).

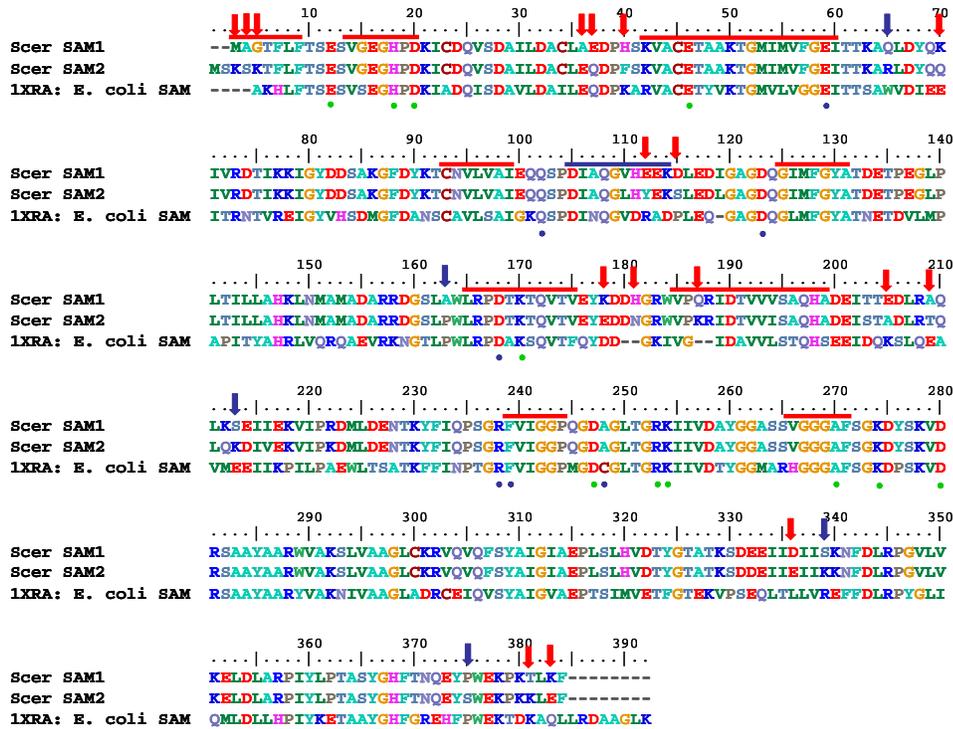


Figura 31.- Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Sam1p/Sam2p de *S. cerevisiae* y Sam de *E. coli*

En la figura 31 se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las isoenzimas Sam1p/Sam2p de *S. cerevisiae* y Sam de *E. coli*. Los puntos verdes indican los residuos que están involucrados en la estabilización del grupo trifosfato, y los puntos azules indican los residuos involucrados en la unión del grupo adenosil y la L-metionina. Las barras rojas son estructuras de hojas β que tienen que ver con la interacción monómero-monómero, y la barra azul identifica el loop que puede tener varias conformaciones en la estructura tridimensional y que se ha propuesto como la puerta de acceso de los substratos en la forma tetramérica. Las flechas rojas y las azules indican los sitios donde se observó divergencia funcional tipo-2 y tipo-1, respectivamente. En este análisis se observa que hay más sitios en donde se observa divergencia funcional tipo-2, y estos sitios se encuentran generalmente flanqueando las hebras β , por encima de las hojas β , y en las estructuras α -hélices.

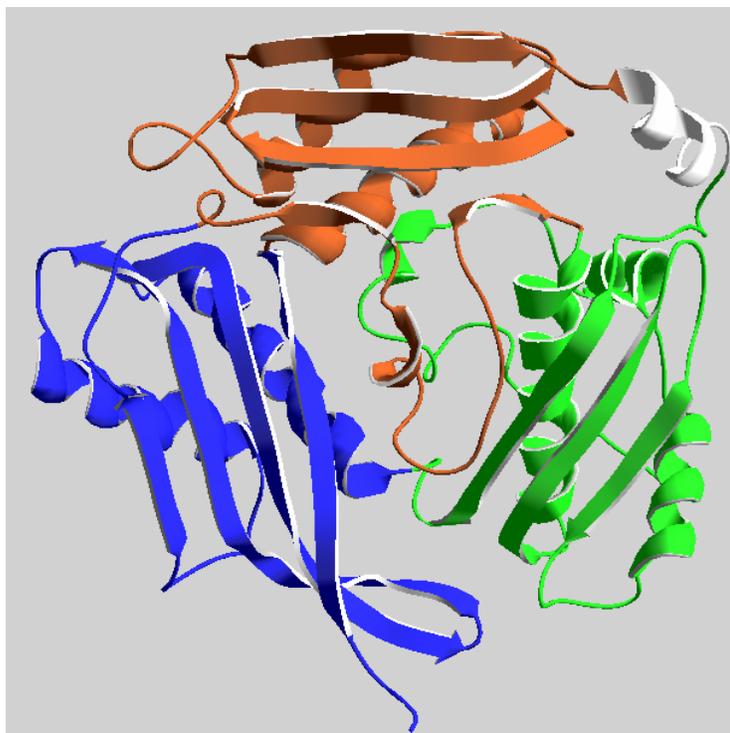


Figura 32.- Estructura tridimensional de la proteína Sam1p de *Saccharomyces cerevisiae* inferida por homología

En colores se muestran los dominios, en azul el dominio N-terminal, en café el dominio central y en verde el dominio C-terminal, además en color blanco se muestra el loop flexible (González, 2003).

Ensayos de complementación

Se tiene evidencia de que *Saccharomyces cerevisiae* duplicó su genoma y posteriormente perdió la gran mayoría de los genes duplicados conservando solo algunos de ellos (Wolfe and Shields 1997). Antes de ese evento hubo eventos de especiación que dieron origen al clado de *Kluyveromyces* y al linaje de *Saccharomyces kluyveri* que no pasaron por la duplicación del genoma completo reciente (Kellis et al, 2004). Además se ha observado que el 95% de los casos de los genes parálogos, productos de la duplicación completa del genoma, solo una copia ha evolucionado de forma acelerada, y esto apoya al modelo en donde una copia retiene la función ancestral y la otra copia, debido a la redundancia génica, evolucionó a una tasa más elevada (Kellis et al 2004).

Sin embargo, una aproximación experimental sería ver si el gen de *Saccharomyces kluyveri* o de organismos cercanos a *S. cerevisiae* que divergieron

antes de la duplicación del genoma completo, que se piensa que tienen la función ancestral, puede complementar la función de una copia o de la otra de los genes duplicados o de ambas copias para entender cómo han evolucionado estos genes duplicados que se mantuvieron en el genoma.

En este trabajo se muestran los ensayos de complementación del gen *BAT* de *S. kluyveri* en cepas mutantes sencillas en el gen *BAT1*, *BAT2* o en mutantes dobles de *S. cerevisiae*.

Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416 vacío.

Después de transformar con el vector vacío las levaduras WT, mutantes sencillas y doble mutante en los genes *BAT* de *S. cerevisiae* se hicieron crecer en medios mínimos sin uracilo con amonio o aminoácidos (L-valina, L- isoleucina y L- leucina) (VIL) como única fuente de nitrógeno. En este ensayo se evaluó el tamaño de la colonia como respuesta al crecimiento en ambos medios, y se presentan las fotos de las cajas en donde se inocularon éstas cepas transformadas.

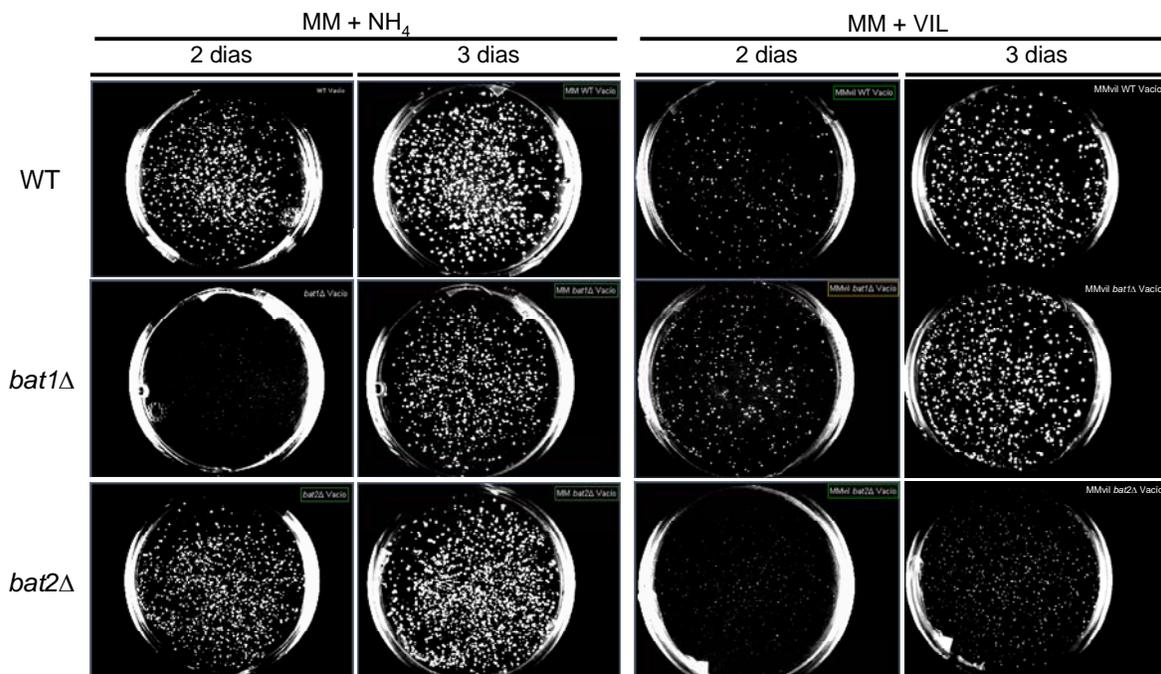


Figura 33.- Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416 vacío en medios mínimos con amonio o VIL como única fuente de nitrógeno.

En la figura 33 se presentan los crecimientos en ambos medios a los 2 y 3 días de incubación, ahí se observa que la mutante *bat1*Δ en medio mínimo con amonio rinde colonias muy pequeñas a los 2 días de incubación, y lo mismo sucede con la mutante *bat2*Δ en medio mínimo con aminoácidos (VIL), ambos casos cuando se les compara con la cepa WT y las mutantes sencillas.

Crecimiento de levaduras transformadas con el vector pRS416-ScBAT1 que tiene insertado el gen *BAT1* de *S. cerevisiae*

Después de la transformación de las levaduras se inocularon en medios mínimos con amonio o aminoácidos (VIL) como únicas fuentes de nitrógeno, y la figura 34 muestra los crecimientos a los 2 y 3 días de incubación.

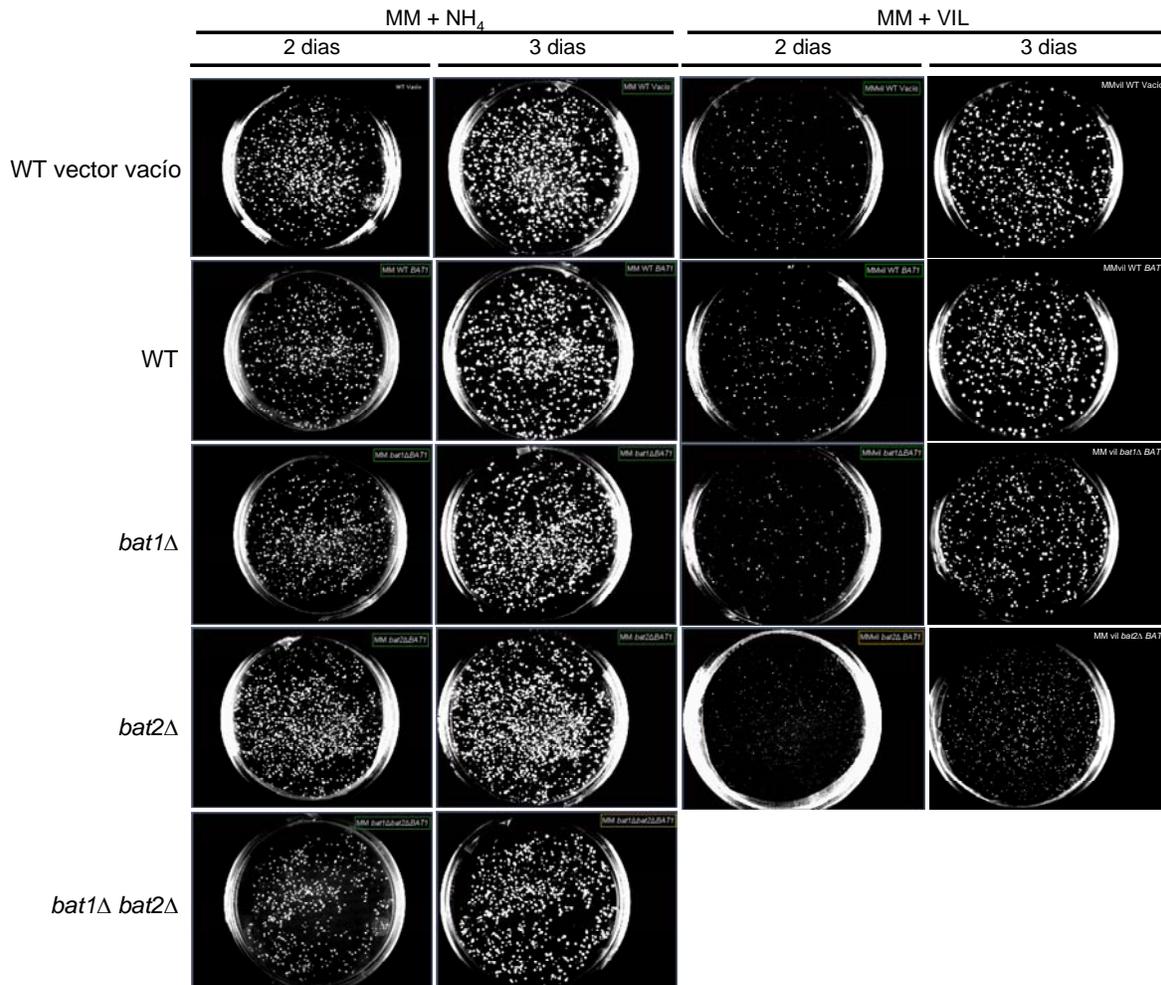


Figura 34.- Crecimiento de levaduras transformadas con el plásmido pRS416-ScBAT1 que contiene el gen *BAT1* de *S. cerevisiae* en medios mínimos con amonio o VIL

Las cepas que fueron transformadas por el vector pRS416-ScBAT1 rinden colonias de tamaños semejantes a los 2 y 3 días de incubación, en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno, cuando se les compara con la cepa WT con el vector vacío. Sin embargo, la cepa mutante *bat2Δ* rinde colonias pequeñas a los 2 y 3 días de incubación en medio mínimo con (VIL) como única fuente de nitrógeno, esto significa que la carencia del gen *BAT2* de *S. cerevisiae* no es substituida por el gen *BAT1*.

Crecimiento de las levaduras transformadas con el vector pRS416-ScBAT2 que lleva el gen *BAT2* de *S. cerevisiae*

Las levaduras que fueron transformadas con el gen *BAT2* se hicieron crecer en medios mínimos ya sea con amonio o aminoácidos (VIL) como única fuente de nitrógeno, y en la figura 35 se presentan los crecimientos en los medios mínimos durante 2 y 3 días.

Lo interesante de este ensayo es que la mutante *bat1Δ* y la doble mutante en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno rinden colonias muy pequeñas a los dos días de incubación cuando se compara con la mutante *bat2Δ* y la cepa silvestre con el vector vacío. Esta observación sugiere que el gen *BAT2* de *S. cerevisiae* no complementó funcionalmente al gen *BAT1*. Por otro lado, en medio mínimo con aminoácido (VIL) como fuente de nitrógeno, la cepa silvestre y la mutante *bat1Δ* ambas transformadas con el vector pRS416-ScBAT2 rinden colonias ligeramente más grandes que las que se observan en la mutante *bat2Δ* y en la cepa silvestre con vector vacío

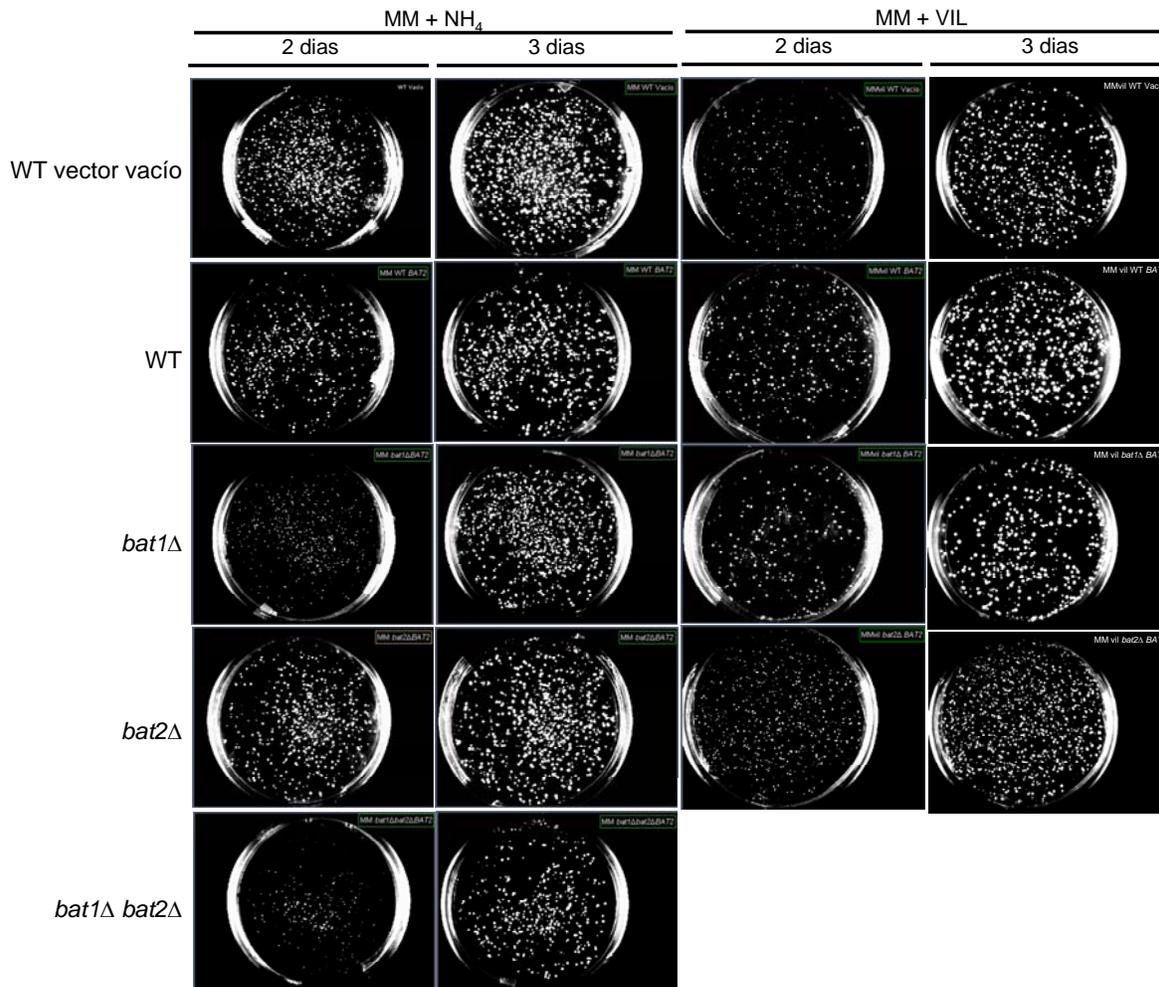


Figura 35.- Crecimiento de las levaduras transformadas con pRS416-ScBAT2 que contiene el gen *BAT2* de *S. cerevisiae* en medios con amonio o VIL como fuente de nitrógeno

Crecimiento en medios mínimos de las levaduras transformadas con el vector que tiene el gen *BAT* de *S. kluyveri*

El vector pRS416-SkBAT que contiene el gen *BAT* de *S. kluyveri* fue utilizado para transformar las levaduras WT y mutantes sencillas así como la doble mutante de los genes *BAT* de *S. cerevisiae*, luego se hicieron crecer en medios mínimos con amonio o (VIL) como fuente de nitrógeno y en la figura 36 se muestran los resultados del crecimiento, ahí se observa que las cepas transformadas con el vector que tiene el gen *BAT* de *S. kluyveri* presentan colonias de un tamaño semejante a las observadas en la cepa WT con el vector vacío. De manera semejante, las cepas mutantes sencillas *bat1*Δ y *bat2*Δ en medio mínimo con (VIL) presentan colonias de tamaño semejante a las observadas en la cepa silvestre

con el vector vacío, pero por otro lado, la cepa WT transformada con el plásmido pRS416-*SkBAT* tiene el tamaño de las colonias un poco más grandes que las que se observan en las demás cepas a los 2 días de incubación.

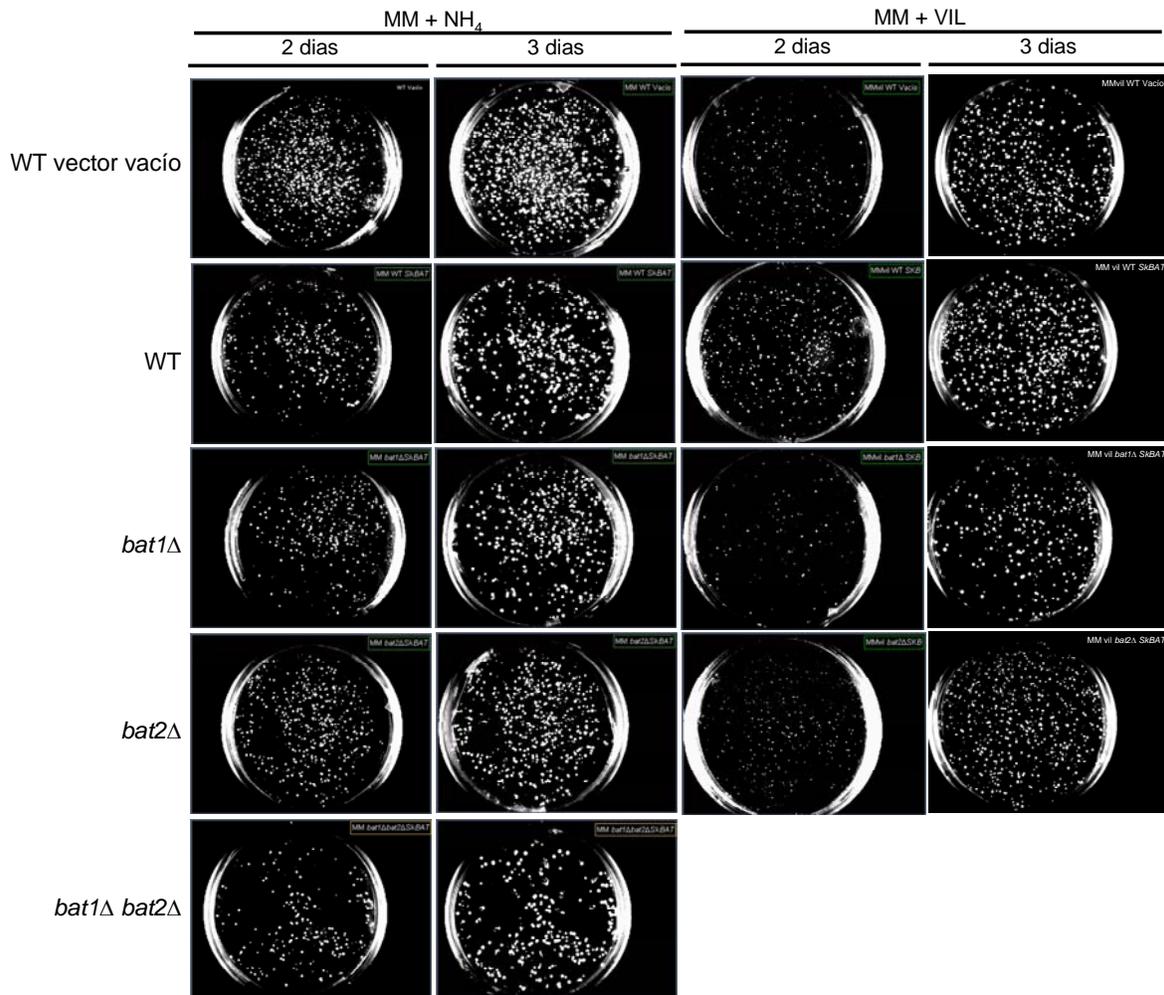


Figura 36.- Crecimiento de levaduras transformadas con el plásmido pRS416-*SkBAT* que tiene el gen *BAT* de *S. kluyveri* en medios mínimos con amonio o VIL como fuente de nitrógeno

DISCUSIÓN

Las isoenzimas Bat1p y Bat2p de *Saccharomyces cerevisiae* se han especializado.

Saccharomyces cerevisiae tiene dos isoenzimas que están involucradas en el metabolismo de los aminoácidos, estas enzimas tienen la actividad de transaminasas de aminoácidos valina, isoleucina y leucina, y la reacción de transaminación es reversible. Bat1p es una isoenzima mitocondrial y Bat2p es citosólica. La expresión del gen que codifica para la isoenzima mitocondrial se induce en fase logarítmica y se reprime en fase estacionaria. Por el contrario, el gen que codifica para la isoenzima citosólica muestra patrones de expresión inverso, expresándose en fase estacionaria y reprimiéndose en fase logarítmica (Eden et al, 1996; Kispal et al, 1996).

Se ha demostrado que una cepa mutante en *bat1Δ* presenta una disminución en la tasa de crecimiento en medios ricos con glucosa o en medios mínimos con dextrosa en comparación con la cepa silvestre. Este defecto en el crecimiento es reestablecido por la adición de valina, leucina e isoleucina al medio. Mientras que la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* mostró un crecimiento lento en medios ricos con dextrosa, pero no con glicerol; sin embargo, en medios mínimos es necesario la adición de aminoácidos valina, leucina e isoleucina para que esta doble mutante pueda crecer (Kispal et al, 1996).

Por otro lado, se sabe que los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) son substratos claves para la producción de alcoholes tipo “fusel”, alcoholes superiores de más de dos carbonos, por medio del catabolismo de estos aminoácidos (Ehrlich, 1907, Sentheshanmuganathan, 1960).

El primer paso del catabolismo es la desaminación y esta reacción se lleva a cabo por la transaminasa de aminoácidos ramificados. (Schoondermark-Stolk et al 2005) observaron que una cepa mutante en *bat2Δ*, al igual que la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* no pueden producir 3-metil-1-butanol (alcohol superior “fusel) cuando se hacían crecer en etanol como única fuente de carbono (Schoondermark-Stolk, 2005).

Todas estas observaciones sugieren que las proteínas Bat1p y Bat2p se han especializado; esto es, Bat1p dirige la reacción hacia la biosíntesis de estos aminoácidos ramificados mientras que Bat2p la dirige hacia el catabolismo.

El análisis de la región intergénica de los genes *BAT1/BAT2* de *Saccharomyces cerevisiae* y *BAT* de *Saccharomyces kluyveri* mostró que en el promotor del gen *BAT1* se conservan elementos reguladores para los factores Gcn4p, Bas1p y Leu3p los cuales regulan genes de la biosíntesis de aminoácidos. Y aunque el promotor de *BAT2* conserva el elemento Leu3p no presenta el elemento regulador que reconoce a Gcn4p que es un activador maestro de genes involucrados en la biosíntesis general de aminoácidos. Por el contrario, la región intergénica de *BAT2* conserva elementos reguladores en “*cis*” que se ha visto que se encuentran presentes en los promotores de genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos (Gln3p, Gat1p, Gzf3p, Put3p, Stp1p, Stp2p y Cha4p). A excepción de Cha4p ninguno de estos elementos se conserva en el gen *BAT* de *S. kluyveri*. Estas observaciones obtenidas a partir del análisis de secuencias también nos está sugiriendo la especialización en la regulación transcripcional de estos genes *BAT1/BAT2* de *S. cerevisiae*.

El análisis de divergencia funcional detectó una gran cantidad de sitios que tienen una alta probabilidad de significar divergencia funcional, estos sitios se distribuyen a lo largo de toda la proteína (Fig. 24), y esto puede ser el reflejo de la especialización de estas isoenzimas Bat1p/Bat2p de *S. cerevisiae* entre el catabolismo y el anabolismo; sin embargo, es necesario evidencia experimental para confirmar si estos sitios divergentes son los que confieren la especialización de cada proteína.

El gen *GDH3* de *S. cerevisiae* ha perdido elementos reguladores en *cis*.

El hecho de que el promotor del gen *GDH1* de *S. cerevisiae* conserve cajas consenso específicas para factores transcripcionales que regulan genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo respiratorio, fase diáuxica, regulación dependiente de glucosa, comunicación entre organelos y respuesta a estrés, y que la mayoría de estos elementos reguladores en “*cis*” los comparte con el gen *GDH* de *S. kluyveri*, sugiere que el gen *GDH1* de *S. cerevisiae* conserva la función cabal del gen ancestro, y el gen *GDH3* de *S. cerevisiae* solo conserva algunos de estos elementos reguladores encontrados en *GDH1*.

DeLuna et al (2001) demostraron que *GDH1* de *S. cerevisiae* es inducido en glucosa o en etanol como única fuente de carbono y el gen *GDH3* sólo es inducido en etanol como fuente de carbono. Esta regulación característica del gen *GDH3* se debe principalmente, a la compactación de la cromatina ya que el locus de *GDH3* está silenciado y la inducción del gen es dependiente del complejo remodelador de la cromatina Swi/SNF-*GCN5* (Avedaño et al, 2005).

En la figura 37 se muestra que Gdh1p está presente en glucosa y en etanol, mientras que la isoenzima Gdh3p solo está presente en etanol. Abajo de cada carril en el ensayo de western blot se muestran las actividades específicas de glutamato deshidrogenasa NADP⁺ dependiente medidas en cada condición (DeLuna et al, 2001).

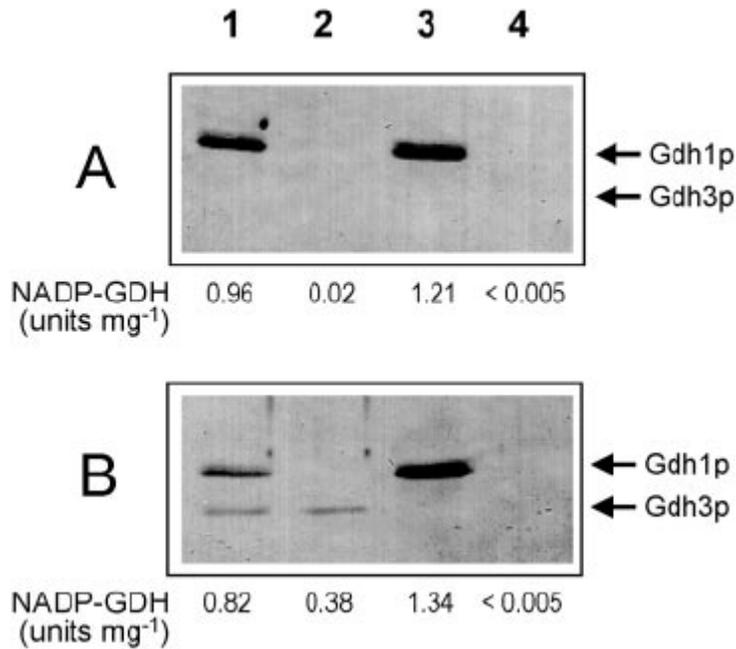


Figura 37.- Gdh1p y Gdh3p son reguladas diferencialmente por la fuente de carbono

(A) glucosa, (B) etanol. Inmunoensayo usando anti-Gdh1p con extracto proteico de células que crecieron en etanol o glucosa. Carril 1) Cepa silvestre, carril 2) mutante *gdh1Δ*, carril3) mutante *gdh3Δ* y carril 4) mutante *gdh1Δ gdh3Δ*

Tomado de DeLuna et al (2001)

Se ha estudiado la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ de *Kluyveromyces marxianus*, que es una levadura que divergió del ancestro de *S. cerevisiae* antes de que duplicara su genoma. De Morais (2003) encontró que esta enzima dirige la reacción preferencialmente hacia la biosíntesis de glutamato, y cuando *K. marxianus* crece en glucosa y etanol encuentra un valor muy semejante de actividad específica de glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺. Estas observaciones nos hacen pensar que el transcrito *GDH* de *K. marxianus* se expresa tanto en glucosa como en etanol (Tabla 4).

Tabla 4.- Actividad específica de Gdh dependiente de NADP⁺ de *K. marxianus* en diferentes fuentes de carbono

Fuente de Carbono	
Medio mineral + 40mM (NH ₄) ₂ SO ₄	
1%	Actividad específica NADP ⁺ -Gdh
Glucosa	0.32 +/- 0.03 U*mg ⁻¹
Lactosa	0.31 +/- 0.02 U*mg ⁻¹
Etanol	0.33 +/- 0.03 U*mg ⁻¹
Acetato	0.02 +/- 0.01 U*mg ⁻¹

Modificado de Morais M, 2003

Se sabe que estos genes no solo han divergido en los patrones de expresión, también han divergido en la región codificante lo que se traduce en diferentes propiedades de las isoenzimas (DeLuna et al, 2001)

El análisis de divergencia funcional mostró que el dominio de unión a dinucleótido presenta un mayor número de sitios que tienen una alta probabilidad de divergencia funcional (Fig. 26). Es posible que estos sitios sean los responsables de las diferencias en la afinidad por el cofactor y sustrato entre Gdh1p y Gdh3p (Tabla 5).

También se ha observado divergencia en la regulación alostérica y en la afinidad por inhibición debido al sustrato (α -cetoglutarato), y Gdh3p es mas sensible a la inhibición por el fosfato que Gdh1p. (DeLuna A et al, 2001).

Tabla 5.- Parámetros de Km para Gdh1p y Gdh3p

Proteína	NADPH	NH ₄	NADP	Glutamato	α -cetoglutarato
Gdh1p	11.3 μ M	5.96mM	14.1 μ M	9.79mM	0.29mM
Gdh3p	33.1 μ M	5.00mM	10.5 μ M	6.36mM	1.27mM

Modificado de DeLuna et al (2001)

K. marxianus es un miembro del clado *Kluyveromyces*, esta levadura es aerobia estricta, por lo que, si se hace crecer en glucosa este organismo la oxida hasta CO₂ y H₂O. En el metabolismo respiratorio la mayor parte del flujo de glucosa pasa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos por lo que la enzima glutamato deshidrogenasa de *K. marxianus* asimila el amonio transfiriéndolo al α -cetoglutarato, y el consumo de este compuesto para la biosíntesis de aminoácidos no compromete la integridad del ciclo de Krebs (Morais, 2003)

En *S. cerevisiae* la degeneración de *GDH3* permitió que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos no se viera comprometido en el metabolismo respiratorio, ya que cuando *S. cerevisiae* crece en glucosa la mayor parte del flujo se dirige a la fermentación y el rendimiento energético es mantenido por el metabolismo fermentativo. Por lo que la asimilación de amonio a través de la glutamato deshidrogenasa codificada por el gen *GDH1*, que tiene una alta afinidad por el sustrato, no compromete la integridad del ciclo de Krebs (DeLuna, 2001). Por otro lado, cuando la fuente de carbono es completamente respirable, el flujo se dirige hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que la utilización de α -cetoglutarato en la asimilación de amonio compromete el rendimiento energético. Sin embargo, en condiciones respiratorias, las dos isoenzimas están presentes y la forma heterohexamérica tiene una baja afinidad por el sustrato al compararlo con el homohexamero de Gdh1p. Al formarse los heterohexameros, disminuye la tasa de consumo de α -cetoglutarato y la integridad del ciclo de Krebs se mantiene (DeLuna et al, 2001).

El gen *LEU9* de *S. cerevisiae* ha perdido elementos reguladores en *cis*

La transcripción del gen *LEU4* de *S. cerevisiae* está regulada en varias condiciones. Se ha visto, por ejemplo, que se regula en deficiencia de aminoácidos, bajo el control de regulación específico de leucina, también se han observado niveles de transcripción basales y regulación negativa mediada por aminoácidos de cadena ramificada (Peters et al, 1990).

En el promotor del gen *LEU4* se conservan cajas consenso específicas para factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de aminoácidos (Gcn4p,

Bas1p Met4p), en la regulación por glucosa (Gcr1p), en el metabolismo respiratorio y en hipoxia (Hap2, 3, 4, y 5p, y Mot3p), en la comunicación de organelos (Rtg1p, Rtg3p) y en la regulación positiva en la fermentación de maltosa (Mal63p). Muchos de estos elementos están compartidos con el gen *LEU* de *S. kluyveri* (ver figura 13), y el gen *LEU9* de *S. cerevisiae* sólo conserva pocos de ellos. Estas observaciones sugieren que el gen *LEU9* se ha degenerado perdiendo algunas de las posibles funciones de regulación transcripcional que tenía el gen ancestro.

Las isoenzimas Leu4p y Leu9p de *S. cerevisiae* que tienen actividad α -isopropil-malato sintasa tienden a inhibirse por el producto final de la ruta metabólica, L-leucina (Casalone et al, 2000; Chang et al, 1984).

En *Mycobacterium tuberculosis* la inhibición se debe a que el compuesto L-leucina se une a un sitio alostérico en el dominio regulador y los cambios conformacionales ocurridos por esta unión se comunican hasta el sitio activo inhibiendo a la enzima (Koon et al, 2004)

En el alineamiento de la figura 28 se observa que la extensión N-terminal que no pertenece a la estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ y toda la estructura barril tienen pocos sitios en donde se presume hay divergencia funcional. En contraste, en el dominio regulador identificado en el alineamiento por la barra verde y en el segundo dominio de unión se observa un incremento en los sitios donde hay una alta probabilidad de divergencia funcional. Esto sugiere que las proteínas Leu4p y Leu9p de *S. cerevisiae* han divergido en su regulación alostérica.

***LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* presentan una regulación diferencial que es dependiente de la fuente de carbono.**

LYS20 y *LYS21* de *S. cerevisiae* son dos genes que codifican para la homocitrato sintasa a partir de acetilCoA y oxaloacetato, ambos intermediarios del ciclo de Krebs. Este es el primer paso de la biosíntesis de lisina y se encuentra en el nodo que comunica el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la biosíntesis de aminoácidos (Feller et al, 1999).

Este aminoácido L-leucina en *S. cerevisiae* es mantenido en vacuola y no puede ser utilizado como fuente de nitrógeno ni de carbono; sin embargo, tiene un papel muy importante en la respuesta a estrés, prevención de la apoptosis dependiente de carencia de aminoácidos y en la criopreservación (Watson, 1976).

Los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* son regulados positivamente en una limitación de aminoácidos a través de Gcn4p (Natarajan et al, 2001). También Lys14p regula positivamente a estos genes (Ramos et al, 1988).

De manera adicional se ha observado que los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* en glucosa se encuentran en niveles de expresión muy semejantes; sin embargo, *LYS20* es inducido en condiciones respiratorias, pero la isoforma Lys21p es la predominante en el metabolismo respiratorio (Quezada et al, 2008). Lys20p es menos sensible a la inhibición por lisina que Lys21p. Se observó recientemente que este efecto inhibitorio resulta en la inducción positiva de cooperatividad con respecto a la utilización de α -cetoglutarato, e la reducción en el parámetro V_{max} y en una reducción en la afinidad de Lys21p por el substrato (Quezada et al, 2008). Estas propiedades de las isoenzimas, como la baja sensibilidad a inhibición por lisina de Lys20p permite una alta producción de homocitrato, y como Lys21p tiene una alta sensibilidad a la inhibición por lisina permite que exista un balance en la utilización de α -cetoglutarato para no comprometer el rendimiento energético (Quezada et al, 2008).

Con base en las cajas consenso que se encontraron en la región reguladora de los genes *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* y el gen *LYS* de *S. kluyveri* (Figura 15), y como ya se mencionó antes que *LYS20* y *LYS21* de *S. cerevisiae* su regulación es dependiente de Gcn4p en una deficiencia de aminoácidos, estos genes también pueden regularse positivamente en respuesta a estrés y regulación negativa en hipoxia, puesto que se encontraron cajas específicas para Hac1p, Yap1p y Mot3p en los tres genes analizados.

El hecho de encontrar elementos *cis* reguladores que reconocen factores de transcripción que regulan genes involucrados en el metabolismo respiratorio y en el cambio a la fase diáuxica pueda tal vez explicar el porqué el gen *LYS20* de *S. cerevisiae* se induce en ambientes donde se utilizan fuentes de carbono

respirables. El porqué Lys21p es la isoforma predominante en respiración sugiere una regulación por modificaciones postraduccionales de Lys20p.

Por otro lado, el gen *LYS20* tiene cajas específicas para factores transcripcionales que regulan positivamente genes involucrados en el catabolismo de aminoácidos y esto parece ser una adquisición ya que en el gen *LYS21* de *S. cerevisiae* y en el gen *LYS* de *S. kluyveri* no se encontraron, y por el contrario, *LYS21* conserva cajas reguladoras específicas para factores transcripcionales involucrados en la comunicación entre organelos y estos los comparte con el gen *LYS*; sin embargo no los conserva el gen *LYS20*.

***SER3* y *SER33* de *Saccharomyces cerevisiae* se expresan de manera diferencial bajo las mismas condiciones**

SER3 y *SER33* son genes de *S. cerevisiae* que codifican para dos enzimas con función redundante (3-fosfoglicerato deshidrogenasa dependientes de NAD⁺). La biosíntesis de serina en glucosa depende de la vía 3-fosfoglicerato; sin embargo, en crecimiento en etanol como única fuente de carbono, la vía principal para la biosíntesis de serina y glicina es por el ciclo del glioxalato, esto lo sugiere el hecho de que una mutante *ser3*Δ *ser33*Δ crece bien en etanol y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente (Albers et al, 2003).

Ambas isoenzimas son requeridas para el óptimo crecimiento; sin embargo, el mRNA de *SER33* parece ser el transcrito predominante en la biosíntesis de serina y glicina por la vía del 3-fosfoglicerato en el crecimiento fermentativo. La expresión de *SER3* en glucosa no es tan fuerte como la expresión de *SER33* en la misma condición (Albers et al, 2003), esto concuerda con lo que se observa en el análisis de la región intergénica realizado en este trabajo (figura 17). El gen *SER3* conserva elementos reguladores en *cis* que reconocen factores transcripcionales involucrados en la regulación y represión de genes dependientes de glucosa, y posiblemente Rgt1p puede estar funcionando como represor. Sin embargo, *SER33* no conserva estos elementos Rgt1p y Nrg1p, lo que puede explicar por

qué los transcritos de *SER33* son abundantes cuando *S. cerevisiae* crece en presencia de glucosa. La caja consenso específica para el factor transcripcional Nrg1p también la comparte con el gen *SER* de *S. kluyveri*.

Por otro lado, también se puede ver en la figura 17 que la región intergénica del gen *SER33* de *S. cerevisiae* conserva elementos “*cis*”-reguladores específicos para Bas1p, Gcn4p y Met4p y estos también los comparte con el gen *SER* de *S. kluyveri*, aunque en el gen *SER3* de *S. cerevisiae* estos elementos no están presentes.

Nuestros datos sugieren que los genes *SER3* y *SER33* de *S. cerevisiae* se han subfuncionalizado en su regulación transcripcional ya que todas las cajas consenso específicas para factores de transcripción Gcn4p, Bas1p, Met4p, Nrg1p, Rtg1p, Rtg3p y Yrr1p encontradas entre los dos genes (*SER3/SER33*) las conserva también el gen *SER* de *S. kluyveri*. Sin embargo, el gen *SER3* no conserva las cajas consenso de Gcn4p, Bas1p, Met4p, Rtg1p, Rtg3p, pero el gen *SER33* si las conserva. Por otro lado, el gen *SER33* no conserva los elementos reguladores en *cis* específicos para los factores de transcripción Nrg1p, Rgt1p y Yrr1p, pero el gen *SER3* si los conserva.

Las isoenzimas Ser3p/Ser33p son 3-fosfoglicerato deshidrogenadas, y estas enzimas están muy conservadas a través de los reinos. La forma activa de la enzima es un tetrámero, y cada monómero está conformado por tres dominios 1) dominio de unión a substrato, 2) dominio de unión a dinucleótido NAD⁺ y 3) dominio regulador (Thompson et al, 2005, Schuller et al, 1995).

En el dominio regulador es el lugar en donde está el sitio alostérico para la unión de L-serina y la inhibición de la reacción enzimática. Por estudios cristalográficos de la enzima se ha observado que en la catálisis ocurre isomerización del complejo terciario de la enzima antes y después de hacer la transferencia del ión hidrógeno; sin embargo, la unión de L-serina en el dominio regulador impide ésta isomerización del complejo terciario (Schuller et al, 1995).

La interacción entre monómeros se da entre los dominios de unión a dinucleótido y en parte entre los dominios reguladores. En la figura 29 se muestran los sitios que se piensa han divergido funcionalmente, estos sitios son pocos y no

caen en residuos que llevan a cabo funciones importantes en la catálisis de la enzima; sin embargo, el hecho de que la mayor parte de estos sitios divergentes se encuentren en el dominio de unión a sustrato y en el dominio de regulación sugiere que estas dos enzimas han divergido en la afinidad por el sustrato 3-fosfoglicerato y en su inhibición alostérica por el producto final.

***SAM1* y *SAM2* de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Los loci *SAM1* y *SAM2* de *S. cerevisiae* codifican para enzimas que tienen actividad Metionin-adenosiltransferasa (MAT), las cuales catalizan la síntesis de S-adenosil-metionin (AdoMet) que es utilizado como principal donador de grupos metilo en una gran variedad de reacciones de biosíntesis o de regulación (metilación de ADN) (Cherest and Surdin-Kerjan, 1978).

Estas isoenzimas son producto de la duplicación completa del genoma de *S. cerevisiae* (Wolfe and Shields, 1997), y están muy bien conservadas a través de la evolución. Se ha visto que en *S. cerevisiae* son reguladas diferencialmente bajo diferentes condiciones, la expresión de *SAM1* es idéntica a la expresión de otros genes que están involucrados en el metabolismo de AdoMet y la expresión de *SAM2* muestra un patrón específico de regulación diferente a *SAM1* (Thomas and Surdin-Kerjan, 1991).

AdoMet es el donador principal de grupos metilos en la biosíntesis de fosfolípidos y, genes involucrados en la biosíntesis de fosfolípidos son regulados negativamente por inositol y colina. *SAM2* es reprimido por este tipo de regulación; sin embargo, la expresión de *SAM1* no se afecta por la presencia de inositol o colina. Esto sugiere que *SAM2* está fisiológicamente involucrado en la biosíntesis de fosfolípidos y *SAM1* tiene un papel fisiológico diferente (Kodaki et al, 2003)

El análisis de la región intergénica de los genes *SAM1* y *SAM2* de *S. cerevisiae* y del gen *SAM* de *S. kluyveri* sugiere que los genes de *S. cerevisiae* han perdido funciones. Sin embargo, ambas copias pueden complementarse en las funciones que han perdido. Esto es, que el gen *SAM2* conserva la caja consenso específica para Gcn4p que regula genes involucrados en la biosíntesis

de aminoácidos cuando hay una limitación general de aminoácidos y este elemento regulador lo comparte con el gen *SAM* de *S. kluyveri* pero no lo conserva el gen *SAM1*. Esta evidencia también sugiere que *SAM2* se inducirá cuando hay deficiencia general de aminoácidos y *SAM1* no lo hará. Estas suposiciones a nivel de secuencia de nucleótidos pueden ser confirmadas en los datos de microarreglos de Gasch A. P., en donde *SAM2* es inducido en una deficiencia de aminoácidos y *SAM1* no es afectado (Gasch et al, 2000).

Por otro lado, el gen *SAM1* conserva elementos reguladores en “*cis*” en donde se unen factores transcripcionales que regulan genes involucrados en la glucólisis y en el metabolismo energético, y estos elementos están conservados también en el gen *SAM* de *S. kluyveri*; sin embargo, el gen *SAM2* no los conserva.

La enzima de Sam1p/Sam2p de *S. cerevisiae* anteriormente descrita se encuentra muy conservada entre los genes parálogos y entre la proteína Sam de *S. kluyveri*. Los resultados mostraron que la mayoría de los sitios divergentes fueron de tipo-2 y estos se encuentran en las estructuras α -hélices que están por encima de las hojas β . Existen también 2 sitios divergentes tipo-2 que se encuentran en el asa flexible que tiene la función de puerta para la entrada del sustrato ya que en el tetrámero no existiría otro espacio del tamaño apropiado para que el sustrato pueda acceder al sitio activo. Se piensa que esa asa, que al parecer no interactúa con las demás subunidades del tetrámero, puede variar su conformación permitiendo así la entrada del ATP y la metionina. Esta observación sugiere que las isoenzimas Sam1p/Sam2p han divergido en la utilización del sustrato.

El gen *BAT* de *Saccharomyces kluyveri* re-establece el fenotipo silvestre de las mutantes *bat1* Δ en medio mínimo con amonio y la mutante *bat2* Δ en medio mínimo con aminoácidos (L-valina, L-isoleucina y L-leucina) en *Saccharomyces cerevisiae*

Desde que se aislaron e identificaron los loci *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* se ha observado que las proteínas que codifican estos genes tienen actividades especializadas en la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos, aunque estas enzimas catalizan la transaminación en ambas direcciones, algunos estudios

sugieren que la enzima Bat1p se ha especializado para involucrarse en la biosíntesis de aminoácidos y la enzima Bat2p su actividad se ha especializado en el catabolismo de los aminoácidos (Kispal et al, 1996, Schoondermark-Stolk et al 2005).

En la figura 33 se observa que la mutante *bat1Δ* rinde colonias más pequeñas a los 2 días de incubación que las que se observan en la cepa WT en el mismo tiempo, pero la mutante *bat2Δ* tiene un fenotipo semejante que la cepa silvestre cuando se les hace crecer en un medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno. Por el contrario, la mutante *bat2Δ* tiene problemas en crecer, ya que presenta colonias pequeñas a los 2 días de incubación en medio mínimo con aminoácidos (L-valina, L-isoleucina y L-leucina (VIL)) cuando se compara con la cepa silvestre, y la mutante *bat1Δ* en las mismas condiciones tiene un fenotipo semejante a la cepa WT con vector vacío.

Estos resultados sugieren que el gen *BAT1* es requerido para el crecimiento óptimo cuando se requiere biosintetizar aminoácidos, y el gen *BAT2* es necesario para que la levadura crezca de forma óptima cuando se requiere catabolizar los aminoácidos (VIL).

En la figura 34 y 35 se observa que el gen *BAT1* no complementa la función del gen *BAT2* y el gen *BAT2* no complementa la función de *BAT1* en *S. cerevisiae*. Esta falla en la complementación puede ser explicada por la localización de éstas enzimas, ya que una es mitocondrial (Bat1p) y la otra es citosólica (Bat2p), o porque ambas enzimas se han especializado.

Por otro lado es interesante observar que el gen *BAT* de *Saccharomyces kluyveri* re-establece el fenotipo de la cepa silvestre de la mutante *bat1Δ* en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno y de la mutante *bat2Δ* en medio mínimo con (VIL) Figura 36. Estos resultados sugieren que el gen *BAT* de *S. kluyveri* tiene las dos funciones de biosintetizar como de catabolizar estos aminoácidos.

CONCLUSIONES

- Los genes *BAT1/BAT2* se han especializado entre el catabolismo y anabolismo de los aminoácidos L-valina, L-leucina e L-isoleucina.
- El gen *BAT* de *Saccharomyces kluyveri* re-establece el fenotipo silvestre de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes sencillas *bat1Δ* y *bat2Δ*
- *GDH3* y *LEU9* se han degenerado perdiendo elementos reguladores en *cis*; sin embargo, la otra copia de cada gen (*GDH1* y *LEU4*) conservan la mayoría de los elementos *cis* – reguladores.
- Los genes *LYS20/LYS21*, *SER3/SER33* y *SAM1/SAM2* han perdido elementos reguladores de forma complementaria.
- Las proteínas Leu4/Leu9 y Ser3p/Ser33p han divergido en su regulación negativa alostérica.
- Las proteínas Gdh1p/Gdh3p y Ser3p/Ser33p han divergido en la función del reconocimiento y estabilización del cofactor NADP⁺ y NAD⁺, respectivamente.
- Sam1p/Sam2p pueden tener diferentes afinidades por el sustrato, ATP y metionina.

REFERENCIAS.

- Albers E, Laizé V, Blomberg A, Hohmann S, Gustafsson L** (2003) Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 278:10264 - 10272
- Avendaño A, Riego L, DeLuna A, Aranda C, Romero G, Ishida C, Recillas-Targa F, Valenzuela L, Zonszein S, González A** (2005) Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of GDH3, one of the paralogous genes responsables for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology 57:291 – 305
- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L, González A** (1997) *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 179:5594 - 5597
- Baker PJ, Waugh ML, Wang X-G, Stillman TJ, Turnbull AP, Engel PC, Rice DW** (1997) Determinants of substrate specificity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. Biochemistry 36:16109 - 16115
- Bell JK, Grant GA, Banaszak LJ** (2004) Multifunctional states in phosphoglycerate dehydrogenase. Biochemistry 43:2350 - 3458
- Bridges BC** (1935) Salivary chromosome maps. J. Hered. 26:60-64
- Cantoni GL** (1953) S-adenosylmethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. J. Biol. Chem. 204:403 - 416
- Casalone E, Barberio C, Cavalieri D, Polsinelli M** (2000) Identification by functional analysis of the gene encoding α - isopropilmalato synthase II (*LEU9*) in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16:539 - 545
- Chang L-FL, Cunningham TS, Gatzek PR, Chen W-J, Kohlhaw GB** (1984) Cloning and characterization of yeast *LEU4*, one of two genes responsables for α - isopropilmalate synthesis. Genetics 108:91 - 106
- Cherest H, Surdin-Kerjan Y** (1978) S-adenosyl methionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. Mol. Gen. Genet. 163:153 - 167

- Cherry JM, Ball C, Weng S, Juvik G, Schmidt R, Alder C, Dunn B, Dwight S, Riles L, Mortimer RK, Botstein D** (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 387:67 – 73
- Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ** (2004) The Jalview java alignment editor. *Bioinformatics* 20:426 - 427
- Conant GC, Wolfe KH** (2007) Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication. *Molecular Systems Biology* 3:129 - 140
- DeLuna A, Avedaño A, Riego L, González A** (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*: purification, kinetics properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276:43775 - 43783
- Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, Montigny Jd, Marck C, Neuvéglise C, Souciet J-L** (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35 - 44
- Eden A, Simchen G, Benvenisty N** (1996) Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 271:20245 - 20245
- Ehrlich F** (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte Deutsch. Chem. Gesellschaft* 40:1027 - 1047
- 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
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G** (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined. *BMC Evolutionary Biology* 6:99
- Force A, Lynch M, Pickett F, Amores A, Yan Y, Postlethwait J** (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531 – 1545
- Gasch AP, Spellman PT, Camilla MK, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO** (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 11:4241 - 4257
- González B, Pajares MA, A. HJ, Guillerm D, Guillerm G, Sanz-Aparicio J** (2003) Crystal structures of methionine adenosyltransferase complexed with

substrates and products reveal the methionine-ATP recognition and give insights into the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 331:407 - 416

Goto M, Miyahara I, Hirotsu K, Conway M, Yennawar N, Islam MM, Hutson S (2005) Structural determinants for branched-chain aminotransferase isoenzyme-specific inhibition by the anticonvulsant drug gabapentin. *J. Biol. Chem.* 280:37246 - 37256

Gu X (1999) Statistical methods for testing functional divergence after gene duplication. *Mol. Biol. Evol.* 16:1664 - 1674

Gu X (2001) Maximum-likelihood approach for gene family evolution under functional divergence. *Mol. Biol. Evol.* 18:453 - 464

Gu X (2006) A simple statistical method for estimating type-II (Cluster-specific) functional divergence of protein sequences. *Mol. Biol. Evol.* 23:1937 - 1945

Ambro van Hoof (2005) Conserved functions of yeast genes support the duplication, degeneration and complementation. *Genetics* 171:1455 - 1461

Hu L-Y, Boxer P, Kesten S, Lei HJ, Wustrow DJ, Moreland DW, Zhang L, Ahn K, Ryder TR, Liu X, Rubin JR, Fahnoe K, Carroll RT, Dutta S, Fahnoe DC, Probert AW, Roof RL, Rafferty MF, Kostlan CR, Scholten JD, Hood M, Ren XD, Schielke GP, Su T-Z, Taylor CP, Mistry A, McConnell P, Hasemann C, Ohren J (2005) The design and synthesis of human branched-chain amino acid aminotransferase inhibitor for treatment of neurodegenerative diseases. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters* 16:2337 - 2340

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cell treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* 153:163 - 168

Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:617 - 624

Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of myc oncogen-regulated Eca39p protein. *J. Biol. Chem.* 271:24458 - 24464

Kodaki T, Tsuji S, Otani N, Yamamoto D, Sreenivasa R, Watanabe S, Tsukatsune M, Makino K (2003) Differential transcriptional regulation of two distinct S-adenosylmethionine synthetase genes (*SAM1* and *SAM2*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research Supplement* N^o 3 Supplement N^o 3:303 - 304

- Komoto J, Yamada T, Takata Y, Markham GD, Takusagawa F** (2004) Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met. *Biochemistry* 43:1821 - 1831
- Koon N, Squire CJ, Baker EN** (2004) Crystal structure of *LeuA* from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *PNAS* 101:8295 - 8300
- Long M** (2001) Evolution of novel genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:673 - 680
- Markham GD, Parkin DW, Mentch F, Schramm VL** (1987) A kinetic isotope effect study and transition state analysis of the S-adenosylmethionine synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* 262:5609 - 5615
- Monteiro P, Mendes N, Teixeira MC, d'Orey S, Tenreiro S, Mira NP, Pais H, Francisco A, Carvalho A, Lourenco A, Sá-Correia I, Oliveira AL, Freitas AT** (2008) YEASTRACT-DISCOVERER: new tool to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 36:D132 - D136
- Morais MA** (2003) The NADP-dependent glutamate dehydrogenase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* respond to nitrogen repression similarly to *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:334 - 338
- Moye WS, Amuro N, Rao JKM, Zalkin H** (1985) Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 260:8502 - 8508
- Mukhopadhyay R, Zhou Y, Rosen BP** (2003) Directed evolution of a yeast arsenate reductase into a protein-tyrosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 278:24476 - 24480
- Muller HJ** (1936) Bar duplication. *Science* 83:528 - 530
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ** (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular Cell and Biology* 21:4347 - 4368
- Ohno S** (1970) *Evolution by gene duplication*, Berlin
- Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Stahlberg A, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L** (2004) Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO* 5:532 - 537

- Otto SP, Yong P** (2002) The evolution of gene duplicates. *Advances in Genetics* 46:451 - 483
- Parry RJ, Minta A** (1982) Studies of enzyme stereochemistry. Elucidation of the stereochemistry of S-adenosylmethionine formation by yeast methionine adenosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* 104:871 - 872
- Peters MH, Beltzer JP, Kohlhaw GB** (1990) Expression of the Yeast LEU4 gene is subject to four different modes of control. *Arch. Biochem. Biophys.* 276:294 - 298
- Peterson PE, Smith TJ** (1999) The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure* 7:769 - 782
- Quezada H, Aranda C, DeLuna A, Hernández H, Calcagno ML, Marín-Hernández Á, González A** (2008) Specialization of the paralogue *LYS21* determines lysine biosynthesis under respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 154:1656 - 1667
- 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
- Ramos F, Verhasselt P, Feller A, Peeters P, Wach A, Dubois E, Volckaert G** (1996) Identification of a gene encoding a homocitrato syntase isoenzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12:1315 - 1320
- Schoondermark-Stolk SA, Taberner M, Chapman J, Schure EGt, Verrips CT, Verkleij AJ, Boonstra J** (2005) Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Research* 5:757 - 766
- Schuller DJ, Grant GA, Banaszak LJ** (1995) The allosteric ligands site in the V_{max} -type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nature* 2:69 - 76
- Sentheshanmuganathan S** (1960) The mechanism of the formation of higher alcohols from amino acids by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 74:568 - 576
- Smith TJ, Peterson PE, Schmidt T, Fang J, Stanley CA** (2001) Structures of Bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation. *J. Mol. Biol.* 307:707 - 720

- Stillman TJ, Baker PJ, L. BK** (1993) Conformational flexibility in glutamate dehydrogenase: role of water in substrate recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 234:1131 - 1139
- Takusagawa F, Kamitori S, Markham GD** (1996) Structure and function of S-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of S-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and PPI at 2.8 Å resolution. *Biochemistry* 35:2586 - 2596
- Takusagawa F, Kamitori S, Misaki S, Markham GD** (1996) Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.* 271:136 - 147
- Teixeira MC, Monteiro P, Jain P, Tenreiro S, Fernandes AR, Mira NP, Alenquer M, Freitas AT, Oliveira AL, Sá-Correia I** (2006) The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 34:D446 - D451
- Thomas D, Surdin-Kerjan Y** (1991) The synthesis of the two S-adenosylmethionine synthetases is differently regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 226:224 - 232
- Thompson JR, Bell JK, Bratt J, Grant GA, Banaszak LJ** (2005) V_{max} regulation through domain and subunit changes. The active form of phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry* 44:5763 - 5773
- Wang S, Dean DR, Chen JS, Johnson JL** (1991) The N-terminal and C-terminal portions of NifV are encoded by two different genes in *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* 173:3041 - 3046
- Watson TG** (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
- Werner C, Stubbs MT, Krauth-Siegel L, Klebe G** (2005) The crystal structure of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase, a putative target for novel antimalarial drugs. *J. Mol. Biol.* 349:597 - 607
- Wolfe KH, Shields DC** (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708 - 713
- Wong S, Wolfe KH** (2005) Duplication of genes and genomes in yeasts. *Topics in Current Genetics* 15:79 - 99
- Yennawar N, Dunbar J, Conway M, Hutson S, Farber G** (2001) The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Cryst.* D57:506 - 515

Yennawar N, Islam MM, Conway M, Wallin R, Hutson S (2006) Human mitochondrial branched-chain aminotransferase isoenzyme: structural role of the CXXC center in catalysis. *J. Biol. Chem.* 281:39660 - 39671

Yip KSP, Stillman TJ, Britton KL, Artymiuk PJ, Baker PJ, Sedelnikova SE, Engel PC, Pasquo A, Chiaraluce R, Consalvi V, Scandurra R, Rice DW (1995) The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3:1147 - 1158

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

Zhang J, Rosenberg HF, Nei M (1998) Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *PNAS* 95:3708 - 3713