



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

***“Generación y caracterización de cepas mutantes en
BAT1, GDH1 y ALT1 en Saccharomyces kluyveri: un
modelo para el análisis de la divergencia funcional de
genes duplicados”***

Tesis que presenta

José Ángel Jiménez Benítez

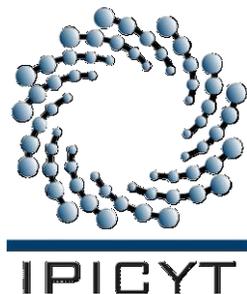
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., Junio- 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “***Generación y caracterización de cepas mutantes en BAT1, GDH1 y ALT1 en Saccharomyces kluyveri: un modelo para el análisis de la divergencia funcional de genes duplicados***” presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Ángel Jiménez Benítez** y aprobada el **de** **de** 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.

Dra. Lina Raquel Riego Ruíz
(Directora de la tesis)

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Miembro del Comité Tutoral)

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Miembro del Comité Tutoral)

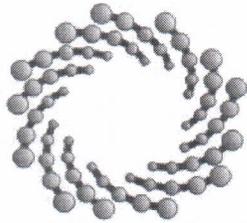


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa 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 fue parcialmente financiado con los proyectos SEP-CONACYT Ciencia Básica-2009-01 No. 132377 e ICGEB-2010 "Paralogues Evolution: Relocalization and Expression Profiles"

Durante la realización del trabajo, el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 375977).



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 096 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 4 días del mes de julio del año 2012, 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. Alejandro De Las Peñas Nava

Presidente

IPICYT

Dr. J. Sergio Casas Flores

Secretario

IPICYT

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Sinodal

IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Ángel Jiménez Benítez

sobre la Tesis intitulada:

Generación y caracterización de cepas mutantes en los genes BAT1, GDH1 y ALT1 en Saccharomyces kluyveri: un modelo para el análisis de la divergencia funcional de genes duplicados

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 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

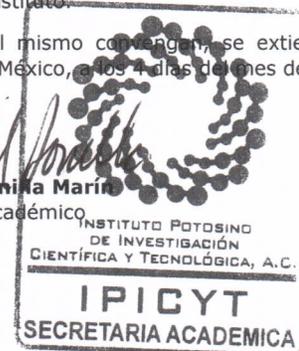
A petición del interesado y para los fines que al mismo conlleva, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de julio de 2012.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonina Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Esta tesis la dedico principalmente a mi familia, pues sin su apoyo no podría haber llegado hasta este punto de mi vida y sin duda se que estarán conmigo en lo que está por venir... los amo.

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Agradecimientos

Mi gratitud a ti Jesucristo por conceder las peticiones de mi corazón y todo lo que eso implica, por darme fortaleza para seguir y ver más allá de mi primer tropiezo confiando que eres tú la fuente de toda ciencia y sabiduría.

Al IPICYT por creer en mí al darme oportunidad de incorporarme a una institución de tal renombre para probarme como investigador y como ser humano libre pensante.

Al CONACYT por el apoyo económico que me hace creer en las instituciones de gobierno para brindar las tan anheladas becas económicas a un pueblo joven con hambre de saber.

A mis amigos: jefes, personal y compañeros del laboratorio 8, por compartir sus conocimientos y sobre todo su experiencia en los momentos indicados y no tan indicados ya que siempre me ayudaron a entender y aprender a pesar de sus muchas ocupaciones. Lina, Claudia, Javier, Paco, Edith, Chuy, Claudita, Tania, Gema, Sergio y Mayte muchas gracias.

A mi esposa Dody por ser siempre tolerante en mis ausencias y por su incondicional apoyo que espero compensarle en vísperas de su titulación.

A Isabel Isordia Jasso por su asistencia técnica.

A mis sinodales por sus observaciones, comentarios, correcciones y firmas les doy gracias.

XXXXXXXXXXXXXXXXXX

XXXXXXXXXX

XXXXXX

X

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Resultados	3
Discusión	16
Materiales y Métodos	21
Referencias	25
Material suplementario	28

Resumen

Generación y caracterización de cepas mutantes en los genes *BAT1*, *GDH1* y *ALT1* en *Saccharomyces kluyveri*: un modelo para el análisis de la divergencia funcional de genes duplicados

En *Saccharomyces cerevisiae*, *BAT1* y *BAT2*, *GDH1* y *GDH3*, *ALT1* y *ALT2* son genes duplicados que se originaron como resultado del evento de duplicación ancestral del genoma completo (WGD por sus siglas en inglés). En este estudio usamos a *Saccharomyces kluyveri* como organismo modelo de una levadura "ancestral" para estudiar el destino evolutivo de los genes duplicados en *S. cerevisiae*. Nos centramos en genes que codifican enzimas que participan en los nodos de la glucólisis que comunican la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos. Los genes *BAT1* y *BAT2* codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada como valina, isoleucina y leucina (VIL), y catalizan la biosíntesis y el catabolismo de estos aminoácidos. *GDH1* y *GDH3* catalizan la síntesis de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato. Y los genes *ALT1* y *ALT2* están involucrados en la biosíntesis y catabolismo de alanina. En este trabajo, se estandarizó un método para la transformación de *S. kluyveri* para generar las cepas mutantes *bat1* Δ , *gdh1* Δ y *alt1* Δ , y se determinó la velocidad de crecimiento de estas mutantes en distintas fuentes de nitrógeno. Nuestros resultados muestran que la proteína codificada por *BAT1* en *S. kluyveri* participa tanto en la síntesis como en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. Por otro lado, la cepa *gdh1* Δ no es auxótrofa de glutamato; sin embargo, su velocidad de crecimiento disminuye con respecto a la cepa silvestre en todas las condiciones ensayadas. Finalmente; la cepa *alt1* Δ no es auxótrofa de alanina pero su crecimiento se ve severamente afectado en presencia de alanina como única fuente de nitrógeno. Con estas mutantes, podremos hacer ensayos de complementación heteróloga que nos permitan demostrar si existe una divergencia funcional de las parejas de genes duplicados *BAT1* y *BAT2*, *GDH1* y *GDH3*, *ALT1* y *ALT2* en *S. cerevisiae*.

Palabras clave: *S. kluyveri*, metabolismo de aminoácidos, *BAT1*, *GDH1*, *ALT1*

Abstract

Generation and characterization of *Saccharomyces kluyveri* mutant strains in the *BAT1*, *GDH1* and *ALT1* genes: a model for the analysis of the functional divergence of duplicated genes

In *Saccharomyces cerevisiae*, *BAT1* and *BAT2*, *GDH1* and *GDH3*, *ALT1* and *ALT2* are duplicated genes that originated as a result of the ancestral whole genome duplication event (WGD). In this study, we use *Saccharomyces kluyveri* as a model of “ancestral” yeast to study the evolutionary fate of duplicated genes in *S. cerevisiae*. We focused on genes encoding enzymes involved in glycolysis nodes that communicate biosynthesis and catabolism of amino acids. *BAT1* and *BAT2* genes encode for transaminases of branched chain amino acids like valine, isoleucine and leucine (VIL), and catalyze the biosynthesis and catabolism of these amino acids. *GDH1* and *GDH3* encode enzymes that catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and alpha-ketoglutarate. Finally, the *ALT1* and *ALT2* genes encode enzymes that are involved in the biosynthesis and catabolism of alanine. In this work, we standardized a transformation protocol for *S. kluyveri* that was used to generate the mutant strains *bat1* Δ , *gdh1* Δ and *alt1* Δ . We calculated the specific growth rate for these mutants when grown under different nitrogen sources. Our results show that the protein encoded by *BAT1* is involved in the synthesis and catabolism of branched chain amino acids. On the other hand, *gdh1* Δ strain is not a glutamate auxotroph; however, its growth rate decreases in all the conditions tested. Finally, the mutant strain *alt1* Δ is not an alanine auxotroph but its growth rate is severely compromised in the presence of alanine as sole nitrogen source. These mutants will be used to perform heterologous complementation assays in *S. cerevisiae* in order to determine if there is a functional divergence between the duplicated genes *BAT1* and *BAT2*, *GDH1* and *GDH3*, *ALT1* and *ALT2*.

Keywords: *S. kluyveri*, amino acid metabolism, *BAT1*, *GDH1*, *ALT1*.

Introducción

Saccharomyces kluyveri es una levadura que se aisló por primera vez del canal intestinal de *Drosophila*, y se describió como *S. kluyveri* en 1956 (Phaff *et al.*, 1956). Como *S. kluyveri* tiene estrecha relación filogenética con varias especies de otros géneros de levaduras como *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*, se propuso asignar a esta especie en el género *Lachancea* (Kurtzman, 2003) que inclusive, algunos autores se refieren a esta levadura como *Lachancea kluyveri*. Sin embargo, su hábitat no ha sido ampliamente caracterizado. Se han descrito hasta la fecha sólo 30 aislados de esta levadura recolectada de especies de *Drosophila* en el norte de América, del suelo en Europa, y de varias especies de árboles en la India y América del Norte.

En contraste con *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura fermentadora por excelencia, *S. kluyveri* utiliza la fermentación en condiciones limitantes de oxígeno y degrada los azúcares tiempo después de la adición de glucosa al medio; es decir, es menos fermentativa. Debido a esta característica sobre el uso de la glucosa, *S. kluyveri* se está convirtiendo en un organismo modelo para aplicaciones industriales, tales como la producción de proteínas en condiciones limitadas de glucosa (Møller *et al.*, 2004). Otro aspecto interesante del metabolismo de *S. kluyveri* es que, a diferencia de otras especies de la familia *Saccharomycetaceae*, puede utilizar pirimidinas y sus productos de degradación como su única fuente de nitrógeno (Gojkovic *et al.*, 1998). Además, los análisis filogenéticos de Fitzpatrick y colaboradores en el 2006 demostraron que este organismo está relacionado con un grupo de levaduras que no pasó por el evento de duplicación del genoma completo (WGD), como *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces waltii* (Fitzpatrick *et al.*, 2006).

En el presente estudio usamos a *S. kluyveri* como organismo modelo de una levadura "ancestral" para estudiar el destino evolutivo de los genes duplicados en *S. cerevisiae*, ya que alrededor del 16% del genoma de *S. cerevisiae* está constituido por genes presentes en dos copias. Este fenómeno deriva de un evento de duplicación de todo el genoma ocurrido hace

aproximadamente 150 millones de años. Este evento de duplicación fue precedido por la pérdida masiva de algunos de los genes duplicados (Kellis *et al.*, 2004; Wolfe y Shields, 1997). En particular, nos centramos en genes duplicados que codifican enzimas que participan en los nodos de la glucólisis que comunican la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos. En *S. cerevisiae*, *BAT1* y *BAT2*, *GDH1* y *GDH3*, *ALT1* y *ALT2* son parejas de genes duplicados que se originaron como resultado del evento de duplicación ancestral del genoma completo (WGD por sus siglas en inglés) (Kellis *et al.*, 2004; Wolfe y Shields, 1997). Los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* codifican transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada como valina, isoleucina y leucina (VIL), y catalizan el último paso en la biosíntesis y el primer paso en el catabolismo de estos aminoácidos. *GDH1* y *GDH3* catalizan la síntesis de glutamato a partir de amonio y α -cetoglutarato, y los genes *ALT1* y *ALT2* están involucrados en el proceso de biosíntesis y catabolismo de alanina.

En este trabajo, estandarizamos un método de transformación eficiente para *S. kluyveri* utilizando diferentes plásmidos de *S. cerevisiae*, *S. kluyveri* y *Kluyveromyces lactis*, y analizamos la expresión heteróloga del gen *URA3* como evidencia de células transformantes crecidas en medio mínimo sin uracilo. También analizamos la funcionalidad y estabilidad de las secuencias *ARS4* y *CEN6* de *S. cerevisiae* presentes en el plásmido pRS416-HPH-*URA3*.

Ya con el protocolo de transformación para *S. kluyveri*, obtuvimos y caracterizamos las cepas mutantes en los genes *BAT1*, *GDH1* y *ALT1*. Con estas mutantes, se analizará el posible carácter bifuncional de los genes ortólogos en *S. kluyveri* y si la función de estos ha sido redistribuida en los genes parálogos de *S. cerevisiae*.

Resultados

Transformación de *Saccharomyces kluyveri* por electroporación.

La técnica de transformación por acetato de litio, empleada en nuestro laboratorio para transformar a *S. cerevisiae*, resultó ineficiente para transformar la cepa de *S. kluyveri* con DNA plasmídico episomal, ya que no se obtuvieron células transformantes con este método. Con el fin de encontrar un mejor protocolo de transformación para *S. kluyveri* realizamos la estandarización del método de electroporación descrito para la transformación de *Hansenula polymorpha* (Faber *et al.*, 1994) (Ver Materiales y Métodos). Se probaron dos condiciones (Tabla 1), las cuales fueron seleccionadas con base en las características de resistencia de *H. polymorpha* para sobrevivir a un pulso de voltaje de hasta 9 milisegundos (ms) (Faber *et al.*, 1994).

Como se observa en la Tabla 2, la cepa Y156 de *S. kluyveri* transformada con el plásmido pRS416-HPH-*URA3* construido en este trabajo (ver Tabla S1) presenta una eficiencia de transformación de 29,133 (0.1%) células transformantes por μg de DNA a 1.5 kV; 25 mF; 500 Ω (condición 2). En las mismas condiciones, la cepa W303 de *S. cerevisiae* muestra una menor eficiencia de transformación con 1,800 (0.003%) colonias por μg de DNA (Tabla 2).

Una vez establecidas las condiciones de electroporación, con la finalidad de confirmar nuestro protocolo, decidimos probar dos plásmidos adicionales. Con el plásmido P1018 (diseñado para la expresión de proteínas en *S. kluyveri*) (Rasmussen *et al.*, 2011) y el plásmido YEpKD352 de *K. lactis* (Laboratorio Roberto Coria), obtuvimos 1.2×10^6 y 5.5×10^4 colonias transformantes por μg de DNA, respectivamente (Tabla 2).

Con las transformantes de *S. kluyveri* con el plásmido pRS416-HPH-*URA3* nos propusimos evaluar la estabilidad del plásmido y determinar la probabilidad de que este plásmido se mantuviera en las células en ausencia de presión selectiva del medio. Analizamos la funcionalidad de las secuencias de

replicación autónoma (*ARS4*) y centromérica (*CEN6*) de *S. cerevisiae* que contiene el plásmido pRS416-HPH-*URA3* en *S. kluyveri* (ver Materiales y Métodos). El 62.3% de las células de *S. cerevisiae* W303 mantienen el pRS416-HPH-*URA3* mientras que sólo el 0.08 % de las células de *S. kluyveri* Y156 lo retiene (Tabla 3). Esto indica que las secuencias *CEN6-ARS4* de *S. cerevisiae* presentes en pRS416-HPH-*URA3* no le proporcionan estabilidad al plásmido en *S. kluyveri*, por lo que se pierde después de quitar la presión selectiva del medio con una mayor facilidad que en *S. cerevisiae*.

Estos resultados fueron parte de una estrategia para generar las mutantes en *S. kluyveri*, donde se pretendía establecer qué elementos contenidos en los plásmidos nos serían útiles en futuros experimentos ya que no se sabe con exactitud qué elementos de *S. cerevisiae* funcionan correctamente en *S. kluyveri*, por lo cual una vez estandarizado el método de electroporación y decida la estrategia de delección de genes se procedió a construir los módulos knock-out para hacer las mutantes nulas en los genes *BAT1*, *GDH1* y *ALT1* de *S. kluyveri*.

Tabla 1. Condiciones de electroporación evaluadas para la cepa *S. kluyveri* Y156.

Condición	DNA (1 µg)
0.9 kV; 25 µF; 500 Ω	pRS416-HPH- <i>URA3</i>
1.5 kV; 25 µF; 500 Ω	

Condiciones de transformación evaluadas con pRS416-HPH-*URA3*. Estas condiciones se evaluaron en Gene Pulser Xcell™. *kV: kilovoltios, µF: microfaradios, Ω: Ohms.

Tabla 2. Eficiencia de transformación de las cepas Y156 de *S. kluyveri* y W303 de *S. cerevisiae*.

Plásmido (1 µg)	<i>S. kluyveri</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	Nº de células iniciales	Nº de transformantes (UFC)	% de células transformadas	Nº de células iniciales	Nº de transformantes (UFC)	% de células transformadas
pRS416-HPH- <i>URA3</i>	2.3 x 10 ⁷	29,133	0.1	5.1 x 10 ⁷	1800	0.0003
P1018	5.32 x 10 ⁷	1,210,000	2.2	2.08 x 10 ⁷	350	0.0016
pPKD352	1.45 x 10 ⁷	55,333	0.3	1.6 x 10 ⁷	160	0.0010

Las células se electroporaron con la condición a 1.5 kV descrita en la Tabla 1. La eficiencia de transformación se determinó con base en el número de células seleccionadas en medio sin uracilo. Las UFC (unidades formadoras de colonias) se estimaron basadas en diluciones logarítmicas sembradas en medio mínimo sin uracilo (colonias transformantes por µg de DNA) y en medio rico YPD (número de células que sobreviven al pulso eléctrico (número de células inicial)).

Tabla 3. Estabilidad del plásmido pRS416-HPH-URA3 en las cepas Y156 de *S. kluyveri* (Sk) y W303 de *S. cerevisiae* (Sc).

Colonia	Diluciones logarítmicas seriadas			Porcentaje de células que retienen el plásmido pRS416-HPH-URA3
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
Sk1	30	3	-	0.08 %
Sk2	40	4	-	
Sk3	50	5	-	
Sk4	30	3	-	
Sk5	10	1	-	
Sc1	940	94	4	62.3 %
Sc2	770	77	14	

El porcentaje de células que retienen el plásmido está calculado con respecto a: 4.7×10^8 células para *S. kluyveri* Y156 y 1.5×10^8 células de *S. cerevisiae* W303 como el 100 % de células. Las células se crecieron en YPD + Higromicina 200 µg/ml, se sembraron dos veces consecutivas en medio YPD sin antibiótico y se resembraron en diluciones logarítmicas seriadas en YPD + Higromicina 200 µg/ml donde se determinaron las UFC y se calculó el porcentaje de células que retuvieron el plásmido con respecto al 100% de células estimadas en un control sin antibiótico.

Construcción de las mutantes *bat1* Δ , *gdh1* Δ y *alt1* Δ de *S. kluyveri*.

La cepa mutante *bat1* Δ de *Saccharomyces kluyveri* se construyó mediante reemplazo por doble recombinación homóloga del gen *BAT1* con el módulo KanMX4 (Wach *et al.*, 1994) que confiere resistencia al antibiótico geneticina/G418 (Tabla S1) (ver Materiales y Métodos). Las transformantes se seleccionaron en YPD + geneticina (200 μ g/ml) (Tabla S1).

La cepa mutante *gdh1* Δ y la cepa mutante *alt1* Δ de *S. kluyveri* se construyeron mediante reemplazo por doble recombinación homóloga del gen *GDH1* y *ALT1* respectivamente por el módulo *URA3* que restaura la prototrofia a uracilo (Tabla S1) (ver Materiales y Métodos). Las transformantes se seleccionaron en medio mínimo con amonio sin uracilo (Tabla S1).

Todas las mutantes aisladas se purificaron en medio selectivo de acuerdo al marcador de selección con el cual fueron generadas para su posterior caracterización en los medios correspondientes. Se verificó la correcta inserción de los módulos por PCR con deoxioligonucleótidos dentro del constructo y con deoxioligonucleótidos externos dirigidos al genoma de *S. kluyveri* (Tabla S2).

Caracterización fisiológica de las mutantes

Saccharomyces kluyveri bat1Δ

Las aminotransferasas son enzimas que catalizan reacciones reversibles, que participan tanto en la síntesis como en el catabolismo de aminoácidos. Las aminotransferasas Bat1 y Bat2 de *Saccharomyces cerevisiae* participan en el metabolismo de valina, isoleucina y leucina (VIL) (Colón *et al.*, 2011). Para analizar el papel fisiológico del gen *BAT1* en *S. kluyveri*, determinamos la velocidad específica de crecimiento en medios que promueven la síntesis o el catabolismo de VIL en la cepa mutante *bat1Δ*. La cepa silvestre y la cepa mutante se crecieron en medio rico YPD y en medio mínimo con diversas fuentes de nitrógeno. Para esto se realizaron curvas de crecimiento con el equipo Bioscreen C MBR (ver Materiales y Métodos).

Como se observa en la Figura 1, la mutante *bat1Δ* en YPD tiene una velocidad específica de crecimiento (μ) ligeramente menor que la cepa silvestre (WT). En medio mínimo con amonio (NH_4^+) (0.2% peso/volumen) la mutante *bat1Δ* fue incapaz de crecer (Fig. 1). Esto nos indica que la cepa *S. kluyveri* mutante *bat1Δ* no puede biosintetizar los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, puesto que una cepa de *S. cerevisiae* doble mutante *bat1Δ bat2Δ* es auxótrofa de VIL y crece solo con la adición exógena de los tres aminoácidos juntos (Colón *et al.*, 2011), asumimos que el fenotipo de *S. kluyveri bat1Δ* es debido a la incapacidad de biosíntesis de VIL. Por otra parte, cuando crecemos a estas cepas en medio mínimo con VIL como única fuente de nitrógeno vemos que la velocidad específica de crecimiento de la mutante *bat1Δ* es 50% menor que la de la cepa silvestre. Dado que la cepa mutante puede crecer en presencia de VIL como fuente de nitrógeno, esto significa que existen otra vía (o vías) para la degradación de VIL independiente de *BAT1*. Finalmente, al crecer a estas cepas en medio mínimo con NH_4^+ y VIL, la mutante *bat1Δ* crece igual que la cepa silvestre. Estos resultados indican que la enzima codificada por el gen

BAT1 de *S. kluyveri* participa principalmente en la biosíntesis de VIL, sin embargo también tiene una participación catabólica para la degradación de VIL.

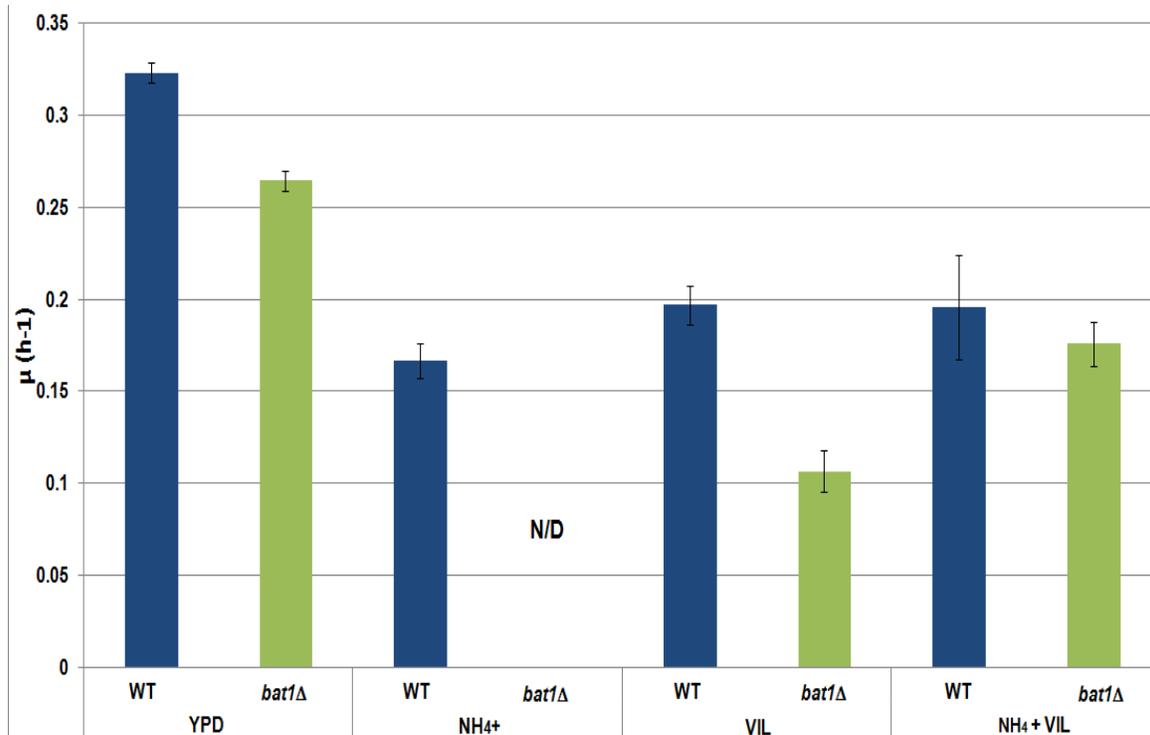


Figura 1. Velocidad de crecimiento de las cepas WT y *bat1* Δ de *S. kluyveri* en diferentes fuentes de nitrógeno. La cepa mutante *bat1* Δ y la cepa WT se cultivaron en medio rico YPD, en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno (NH₄⁺), en medio mínimo en presencia de Valina, Leucina e Isoleucina (VIL) y en medio mínimo con amonio más VIL (NH₄⁺ + VIL). Las células se incubaron a 28 °C en el lector de placas Bioscreen C, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. A partir de las curvas de crecimiento, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ). La gráfica muestra las velocidades de crecimiento específicas de las cepas en el eje de la X (parte superior), en los medios respectivos indicados en el mismo eje (parte inferior). La barra de error indica la desviación estándar del error ($DE/\sqrt{n} \times 3$) de las cuatro muestras por duplicado analizadas, se graficó el promedio de todas las curvas. (**N/D**: No Detectable).

Saccharomyces kluyveri gdh1Δ

S. cerevisiae tiene dos vías para llevar a cabo la síntesis de glutamato; de las cuales una de ellas está mediada por dos isoformas de la glutamato deshidrogenasa, codificadas por *GDH1* y *GDH3* (Avendaño *et al.*, 1997; Moye *et al.*, 1985). Los estudios de regulación realizados para caracterizar a *GDH1* y *GDH3* indican que la célula utiliza las isoformas codificadas por estos genes bajo diferentes condiciones de crecimiento (DeLuna *et al.*, 2001). Esta expresión diferencial es útil en nuestro estudio para establecer la relación de divergencia funcional del gen ortólogo *GDH1* de *S. kluyveri* (Byrne y Wolfe, 2005). Para determinar si existe una bifuncionalidad adquirida en *GDH1* posterior al WGD en *S. cerevisiae*, se evaluó el crecimiento de la cepa mutante en el gen *gdh1Δ* de *S. kluyveri* en medio rico o en medio mínimo en presencia de amonio, glutámico y amonio más glutámico como únicas fuentes de nitrógeno (Fig. 2),.

Tanto la cepa silvestre como la mutante *gdh1Δ* presentan la misma velocidad de crecimiento en medio rico YPD. En cambio, tanto en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno como en medio mínimo con 0.1% de glutamato como única fuente de nitrógeno, en ambos medios se reduce la velocidad de crecimiento de la mutante *gdh1Δ*. Finalmente, en el medio mínimo con amonio y 0.1% de glutamato hay un ligero incremento en la velocidad de crecimiento comparado con la velocidad de crecimiento con solo amonio o glutamato. Estos datos sugieren que *GDH1* se requiere para la biosíntesis y catabolismo de glutamato, sin embargo, no es el único gen que participa en la biosíntesis y catabolismo de este aminoácido.

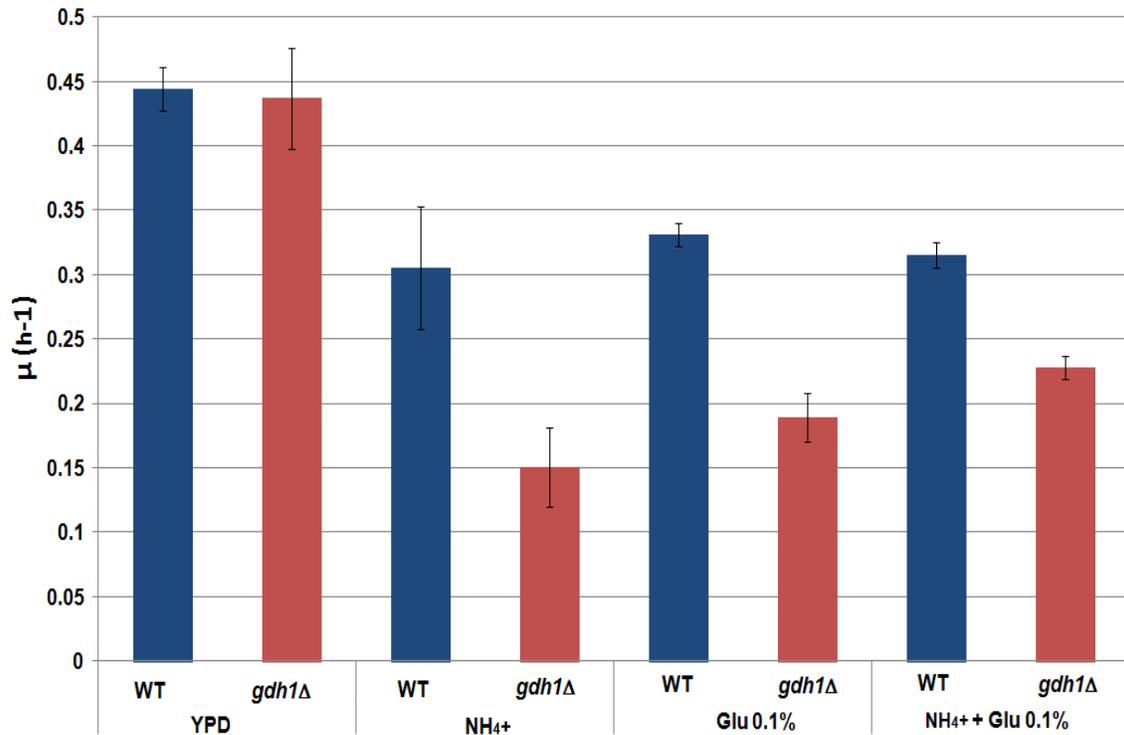


Figura 2. Velocidad de crecimiento de las cepas WT y *gdh1* Δ de *S. kluyveri* en diferentes fuentes de nitrógeno.. La cepa mutante *gdh1* Δ y la cepa WT se crecieron en YPD y en medio mínimo como esta descrito en la leyenda de la Figura 2 pero se utilizó amonio, glutámico o amonio más glutámico como únicas fuentes de nitrógeno.

Saccharomyces kluyveri alt1Δ

Para determinar si *Alt1* en *S. kluyveri* presenta la función de alanina aminotransferasas, como se ha reportado para *S. cerevisiae* (García-Campusano *et al.*, 2009) se evaluó la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante *alt1Δ* en YPD y en medio mínimo con amonio, alanina y amonio + alanina como únicas fuentes de nitrógeno (Fig. 3). La cepa mutante *alt1Δ* en YPD crece casi a la misma velocidad que la cepa silvestre. Por otro lado, en medio mínimo con NH_4^+ la cepa mutante *alt1Δ* disminuye ligeramente su velocidad de crecimiento comparada con la silvestre. En cambio, en medio con alanina como única fuente de nitrógeno la cepa mutante *alt1Δ* tiene una dramática disminución en su velocidad de crecimiento hasta una cuarta parte comparada con la silvestre, indicando que la actividad de *Alt1* en *S. kluyveri* tiene un papel principalmente catabólico en la utilización de alanina como fuente de nitrógeno (Fig. 3). En presencia de NH_4^+ y alanina la mutante crece mejor pero no recupera los niveles de crecimiento que tiene la cepa silvestre. Estos resultados indican que *ALT1* codifica para una enzima que tiene una participación principalmente catabólica en *S. kluyveri* y sugieren también la presencia de una vía biosintética independiente de *ALT1*.

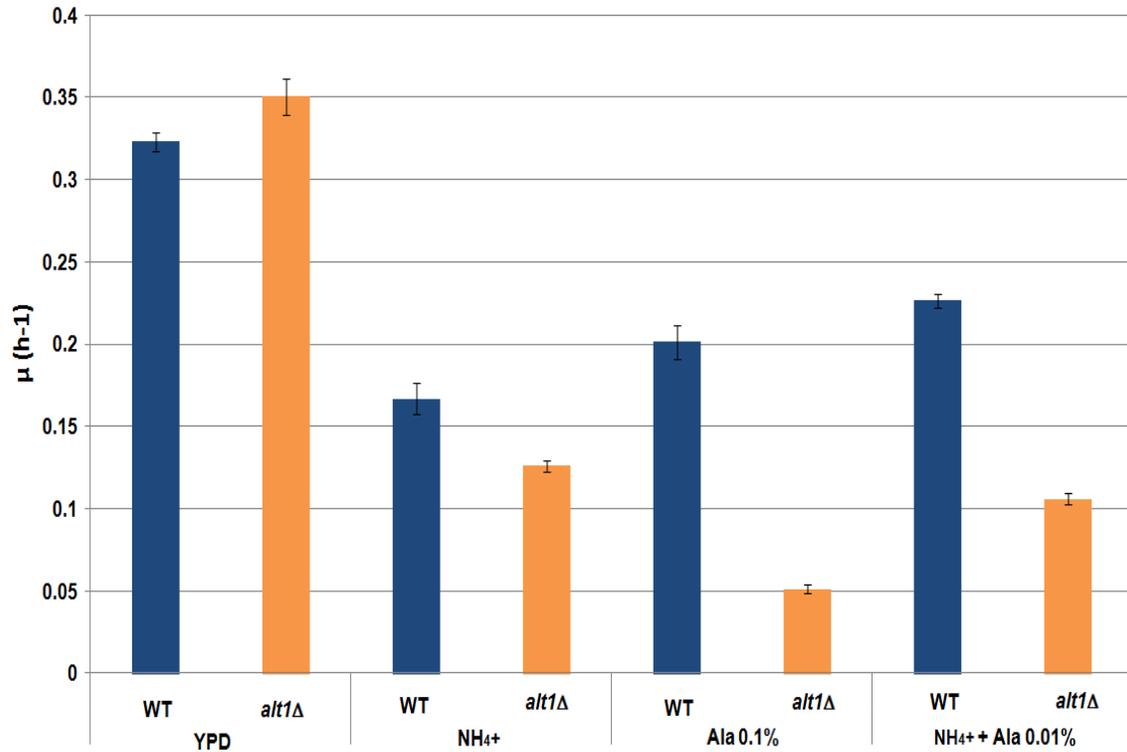


Figura 3. Velocidad de crecimiento de las cepas WT y *alt1Δ* de *S. Kluyveri* en diferentes fuentes de Nitrógeno. La cepa mutante *alt1Δ* y la cepa WT se cultivaron en YPD y en medio mínimo como esta descrito en la leyenda de la Figura 2, pero se utilizó amonio, alanina o amonio más alanina como únicas fuentes de nitrógeno.

Discusión

Estandarización del método de electroporación.

En este trabajo estandarizamos el método de transformación por electroporación de *S. kluyveri*. Transformar esta levadura es un paso crítico para la obtención de mutantes. Además, establecimos las condiciones de transformación para poder construir mutantes nulas de los genes de interés.

Los ensayos de transformación nos proporcionaron también información sobre la expresión heteróloga del gen *URA3* de *S. cerevisiae*, el cual complementa eficientemente la auxotrofía a uracilo en las cepas transformadas. Esto nos permite usar plásmidos o casetes que lleven el gen de *S. cerevisiae* *.URA3* como una herramienta útil para la generación de mutantes en *S. kluyveri*. Además, el marcador de resistencia a higromicina, *hph* de *Klebsiella pneumoniae*, que se expresa a partir del promotor *PGK1* de *S. cerevisiae* y con un terminador 3'UTR del gen *HIS3* de *Candida glabrata* (incluido en pRS416-HPH-URA3), nos permitió saber que estos elementos son funcionales en *S. kluyveri* ya que las colonias transformantes son higromicina resistentes.

Por otro lado, al evaluar la estabilidad del plásmido pRS416-HPH-URA3 en *S. kluyveri* determinamos que las secuencias ARS4 y CEN6 de *S. cerevisiae* presentes en el este plásmido no son funcionales en *S. kluyveri* ya que el plásmido se pierde en ausencia de la presión selectiva. Estos resultados confirman que las secuencias ARS de *S. kluyveri* no son funcionalmente iguales a las secuencias ARS en *S. cerevisiae*. Nuestros datos concuerdan con lo descrito sobre las secuencias ARS de *S. kluyveri*, ya que se ha observado que se requieren de secuencias en *cis* mucho más grandes para que funcionen como secuencias de replicación autónoma, una característica muy diferente con lo que sucede en *S. cerevisiae* (Liachko *et al.*, 2011).

Caracterización fisiológica de las cepas mutantes

La caracterización fisiológica de la mutante *bat1*Δ de *S. kluyveri* sugiere, de acuerdo a las velocidades de crecimiento observadas, que la enzima codificada por este gen tiene un papel de carácter biosintético en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno y de tipo catabólico para el medio adicionado con VIL. Sin embargo, la degradación de VIL no es completamente dependiente de *BAT1* ya que la mutante *bat1*Δ, puede aún crecer en presencia de estos aminoácidos. Proponemos que esta capacidad de crecer en VIL como única fuente de nitrógeno se debe a una ruta alterna para la degradación de estos aminoácidos la cual no se ha descrito hasta el momento. En cambio, se sabe que para *Kluyveromyces lactis*, otra levadura que no pasó por el evento de duplicación completa del genoma, la mutante en el gen *KIBAT1* es auxótrofa de aminoácidos de cadena ramificada y tampoco puede degradar VIL (Colón *et al.*, 2011). Es decir que en *K. lactis* no existe una ruta alterna para la degradación VIL como lo observamos para *S. kluyveri*. En *S. cerevisiae* se sabe que la biosíntesis y el catabolismo de VIL están regulados por *BAT1* y *BAT2* ya que una doble mutante en estos genes no es capaz de crecer en un medio con VIL o con amonio como únicas fuentes de nitrógeno. Estas funciones en *S. cerevisiae* se han dividido entre las dos enzimas Bat1 y Bat2, sin embargo, Bat1 es principalmente biosintética mientras que Bat2 es principalmente catabólica (Colón *et al.*, 2011). Será interesante saber si el gen *BAT1* de *S. kluyveri* puede complementar en *S. cerevisiae* tanto la función catabólica como la función biosintética en mutantes sencillas *bat1*Δ y *bat2*Δ y en la doble mutante *bat1*Δ *bat2*Δ. Dado que ya contamos también con la mutante *bat1*Δ de *S. kluyveri*, podemos hacer ensayos de complementación heteróloga con los genes *BAT1* y *BAT2* de *S. cerevisiae* (Montalvo, 2012).

Por otra parte, la mutante *gdh1*Δ de *S. kluyveri* no es auxótrofa de glutamato, aunque la velocidad de crecimiento disminuye considerablemente con respecto a la cepa silvestre, por lo que nuestro resultado indica que existe una segunda vía que compensa la ausencia de *GDH1* en *S. kluyveri*. Es

probable que esta segunda vía sea, como en el caso en *S. cerevisiae*, la acción concertada de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT), codificadas por los genes *GLN1* y *GLT1*, respectivamente. En *S. cerevisiae* se sabe que en condiciones de limitación de amonio, la actividad de GS y GOGAT compensan la ausencia de *GDH1* en una cepa que carece de este gen (Avendaño *et al*, 1997). Sin embargo, una doble mutante que carece de *GDH1* y *GLT1* es todavía capaz de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, dado que puede sintetizar glutamato a través de *GDH3*, el parálogo del gen *GDH1*. Para obtener una cepa auxótrofa de glutámico se requiere una triple mutante *gdh1Δ gdh3Δ glt1Δ* (Avendaño *et al.*, 1997). En el genoma de *S. kluyveri* hay solamente un gen *GDH1*. El crecimiento de la mutante *gdh1Δ* tanto en amonio como en glutámico, puede deberse a la presencia del sistema *GLN1-GLT1*. Sabemos que *S. kluyveri* cuenta con ortólogos sinténicos para ambos genes aunque hasta la fecha no han sido caracterizados (Byrne y Wolfe, 2005). Sin embargo, aún con la existencia de *GLT1* no podemos explicar por qué una mutante *gdh1Δ* crecida en presencia de amonio y glutámico no recupera la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre. Se sabe que en *K. lactis*, mutantes sencillas *gdh1Δ* o *glt1Δ* pueden crecer en glucosa y amonio como única fuente de nitrógeno. Esto sugiere que para obtener una cepa auxótrofa de glutámico se requiera la doble mutante *gdh1Δ glt1Δ* (Romero *et al.*, 2000). Necesitamos por lo tanto realizar más estudios sobre la asimilación de amonio y la degradación de glutámico en esta levadura no convencional. Una primera aproximación sería la obtención de una mutante *glt1Δ* así como la doble mutante *gdh1Δ glt1Δ*, la cual esperaríamos que fuese auxótrofa de glutámico.

Por último, la mutante *alt1Δ* de *S. kluyveri* presenta una menor velocidad de crecimiento respecto a la cepa silvestre tanto en amonio, en alanina y en amonio con alanina. Observamos que la cepa mutante *alt1Δ* tiene una velocidad de crecimiento casi del 30% menor con respecto a la WT en el medio con amonio, lo que sugiere un papel biosintético para *ALT1* en esta condición. Sin embargo, no es la única vía que tiene la célula para sintetizar alanina en

presencia de glucosa como fuente de carbono. Este resultado es distinto a lo que se ha observado para *S. cerevisiae* en donde las mutantes sencillas *alt1Δ* y *alt2Δ* así como la doble mutante *alt1Δ alt2Δ* no tienen fenotipo cuando se crecen en glucosa y amonio como única fuente de nitrógeno (García-Campusano *et al.*, 2009). Se ha propuesto que bajo estas condiciones de fermentación y respiración, la biosíntesis de alanina probablemente pueda llevarse a cabo a través de la vía de la glutamina aminotransferasa y la ω -amidasa (Soberon *et al.*, 1989). Sin embargo, aunque se ha demostrado de manera enzimática de la existencia de esta vía, actualmente se desconoce cuáles son los genes que codifican para estas enzimas. Un experimento interesante, ahora que contamos con un método de transformación para *S. kluyveri*, es de aislar una cepa auxótrofa de alanina a partir de la cepa *alt1Δ* mediante un escrutinio de mutantes generadas al azar por recombinación no homóloga con un plásmido.

La velocidad de crecimiento de una cepa *alt1Δ* crecida en medio con alanina como única fuente de nitrógeno es cuatro veces menor respecto a la cepa silvestre. Este resultado sugiere que la actividad principal de la enzima Alt1 es para degradar alanina. Existe todavía en esta condición un poco de crecimiento en la mutante *alt1Δ*, lo que sugiere que deben de existir una o más vías para degradar alanina. Estos datos son diferentes con lo que se ha observado en *S. cerevisiae* en donde una mutante *alt1Δ* es incapaz de crecer en alanina como única fuente de nitrógeno (García-Campusano *et al.*, 2009).

Una observación interesante derivada de nuestros datos es que la vía alterna para la biosíntesis de alanina cuando las células se crecen en amonio como única fuente de nitrógeno, parece reprimirse en presencia de una baja concentración de alanina. En medio mínimo con amonio y 0.01% de alanina, el crecimiento de la cepa mutante es la mitad de lo observado para la cepa silvestre, lo cual es menor a lo observado en amonio como única fuente de nitrógeno (la reducción es de menos del 30%), además; la mutante *bat1Δ* no se recupera a pesar de la adición de alanina a mayor concentración (Ala 0.1%) en un medio con amonio (datos no mostrados), por lo que puede haber un mal

transporte del aminoácido o bien Alt1 está involucrado en rutas metabólicas independientes al metabolismo de alanina. Esto nos puede indicar que la vía por la cual se sintetiza alanina en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno se encuentra regulado por la presencia de alanina en el medio. Por lo tanto, encontramos que para *S. kluyveri* el gen *ALT1* puede biosintetizar alanina en presencia de amonio como fuente de nitrógeno así como degradar alanina cuando ésta es la única fuente de nitrógeno disponible. Sin embargo, no son las únicas vías que tiene esta levadura para producir o usar la alanina.

En conclusión, desarrollamos un protocolo de transformación eficiente para poder introducir DNA superenrollado y lineal para generar mutantes por recombinación homóloga en *S. kluyveri*. Con la obtención y caracterización de las mutantes *alt1Δ*, *gdh1Δ*, y *bat1Δ* tenemos el material para poder estudiar con mayor detalle la divergencia funcional de estos genes duplicados en *S. cerevisiae*. Podemos realizar con estas mutantes ensayos de complementación heteróloga funcional con los genes ortólogos de *S. cerevisiae* en *S. kluyveri*. Podremos demostrar si hay especialización de funciones en los genes de un organismo que evolucionó a través de la duplicación completa de su genoma.

Materiales y Métodos

Transformación de *Saccharomyces kluyveri* por electroporación.

Se creció toda la noche un cultivo en YPD de la cepa a electroporar, al día siguiente se inoculó un matraz con 25 ml de medio fresco YPD a una $OD_{600nm}=0.25$. Después de entre 3 a 4 horas, cuando las células alcanzaron una OD_{600nm} entre 0.8-1.0, éstas se recuperaron por centrifugación (4000 G/ 10 min) y fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 que contenía dithiothreitol (DTT) 25 mM. Las células se incubaron 15 minutos a 37 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con buffer de electroporación STM (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y $MgCl_2$ 1 mM). Primero se lavaron con un volumen de 25 ml de STM y después con 12.5 ml de STM. Se recuperaron las células por centrifugación (4000 G/ 10 min) y se desechó el buffer STM, las células fueron resuspendidas en 190 μ l de STM. Se transfirieron 60 μ l de la suspensión de células a tubos eppendorf de 1.5 μ l, se adicionó 1 μ g de DNA por cada tubo y se transfirió la mezcla a una celda para electroporación de 2 mm pre-enfriada para su pulso eléctrico en el Electroporador "Gene Pulser Xcell™" usando 1.5 kV; 25 μ F; 500 Ω . Las células fueron recuperadas en 1 ml de YPD y transferidas a tubos Falcón para incubar 1:30 h a 30 °C a 200 rpm. Posteriormente, la suspensión de células se llevó a tubos eppendorf y se resuspendió en 100 ml de agua miliQ estéril. El total de células se sembraron en los medios selectivos correspondientes. Las colonias aparecieron entre los 3 a 4 días.

Se realizaron ensayos de eficiencia de transformación con el plásmido pRS416-HPH-URA3 (Ver Tabla S1) bajo dos condiciones de electroporación. Las células transformadas se seleccionaron en MM + NH_4^+ sin uracilo ya que las cepas Y156 de *S. kluyveri* y W303 de *S. cerevisiae*, son auxótrofas de uracilo. Las células transformadas con pRS416-HPH-URA3 se crecieron también en medio rico, YPD Hig 200 [200 μ g/ml de higromicina], para evaluar la expresión en *S. kluyveri* del gen HPH regulado por el promotor *PGK1* de *S. cerevisiae* y con el terminador del gen *HIS3* de *Candida glabrata*.

Análisis de la estabilidad del plásmido pRS416-HPH-URA3 en *S. kluyveri* Y156

La cepa Y156 de *S. kluyveri* transformada con el plásmido pRS416-HPH-URA3, se creció por varias generaciones en ausencia de presión selectiva en el medio y posteriormente se determinó la frecuencia con la que el plásmido se perdió.

Se tomaron 5 colonias de la cepa Y156 de *S. kluyveri* transformada con el plásmido pRS416-HPH-URA3 y 2 colonias de la cepa de *S. cerevisiae* W303 transformada también con el plásmido pRS416-HPH-URA3 como control (Tabla 3). Las cepas se estriaron en cajas de medio YPD sin selección y se incubaron durante tres días a 28°C. Después de este periodo de incubación, se volvió a estriar en cajas de YPD. Posteriormente, colectamos las células de las cajas y lavamos a las células con agua destilada estéril y ajustamos la concentración de las mismas a una OD_{600nm} de 0.8 en 1 ml de agua destilada estéril ($4.7 \cdot 10^8$ células para la cepa Y156 de *S. kluyveri* y $1.5 \cdot 10^8$ células para la cepa W303 de *S. cerevisiae*, estos números los consideramos como el 100 % de las células). Para contar las unidades formadoras de colonia (UFC) para cada transformante, realizamos diluciones seriadas y sembramos 100 µl de la suspensión de células de cada dilución en cajas de YPD y YPD Hig 200 [200 µg/ml de higromicina] (Tabla 4).

Construcción de mutantes

La cepa mutante de *S. kluyveri* *bat1*Δ se construyó mediante reemplazo por recombinación homóloga del gen de interés por el módulo KanMX4 (Wach et al., 1994) que confiere resistencia al antibiótico geneticina/G418. Para generar la mutante sencilla *bat1*Δ se amplificó el casete KanMX4 con los deoxioligonucleótidos 84 y 85 utilizando como molde al plásmido pKanMX (Tablas S1 y S2). El módulo amplificado contiene al casete KanMX4 flanqueado en el extremo 5' por 1000 pb del UTR 5' del gen *BAT1* y en el extremo 3' está flanqueado por 963 pb del UTR 3' del gen *BAT1*. El módulo (3431 pb) se

amplificó del plásmido pJB3 por PCR usando los oligos 95 y 98, se purificó mediante el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en gel “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se transformó a la cepa silvestre *S. kluyveri* Y156 con 1 µg del constructo, usando el protocolo de transformación de levadura por electroporación descrito en este trabajo. Las transformantes se seleccionaron en YPD geneticina (200 µg/ml).

La cepa mutante *S. kluyveri gdh1Δ* se construyó mediante reemplazo por doble recombinación homóloga del gen de interés por el módulo *URA3* que restaura la prototrofia por uracilo en las cepas mutantes. El módulo amplificado contiene el casete *URA3* flanqueado en el extremo 5' por 1kb del 5' UTR del gen *GDH1* y en el extremo 3' está flanqueado por 1 kb del 3' UTR del gen *GDH1*. El módulo se amplificó por PCR de fusión usando como molde los tres módulos básicos amplificados con los desoxioligonucleótidos 133 y 136, 137 y 138 (Tabla S2). El fragmento amplificado se purificó mediante el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en gel “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se transformó a la cepa silvestre *S. kluyveri* Y156 con 1 µg del constructo, usando el protocolo de transformación de levadura por electroporación descrito en este trabajo. Las transformantes se seleccionaron en medio mínimo con amonio sin uracilo.

La cepa mutante de *S. kluyveri alt1Δ* se construyó de forma similar a la construcción descrita anteriormente, reemplazando el ORF del gen *ALT1* con el módulo *URA3*, el módulo amplificado contiene al casete *URA3* flanqueado en el extremo 5' por 1 kb del 5' UTR del gen *ALT1* y en el extremo 3' está flanqueado por 1 kb del 3' UTR del gen *ALT1*. El módulo se amplificó por PCR de fusión usando como molde los tres módulos básicos amplificados con los oligos 117 y 121, 122 y 123 (Tabla S2). El fragmento se purificó mediante el protocolo para purificación de fragmentos de DNA en gel “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado, se transformó a la cepa silvestre *S. kluyveri* Y156 con 1 µg del constructo, usando

el protocolo de transformación de levadura por electroporación descrito en este trabajo. Las transformantes se seleccionaron en medio mínimo con amonio sin uracilo.

Las cepas mutantes fueron verificadas por PCR para la correcta inserción 5'UTR y 3'UTR, así como de un PCR con deoxioligonucleótidos externos a los módulos de la mutante con patrones de peso molecular diferenciables con respecto a una cepa silvestre (Tabla S2).

Condiciones de crecimiento

Las cepas se crecieron en medio mínimo (MM), usando como fuente de carbono dextrosa 2% (peso/volumen). De acuerdo al experimento la fuente de nitrógeno usada fue sulfato de amonio (NH_4^+) (40 mM), valina (150 mg/ml), isoleucina (30 mg/ml), leucina (100 mg/ml), glutamato 0.1% (peso/volumen), alanina 0.1% (peso/volumen) y alanina 0.01% (peso/volumen). Cuando se requirió se adicionó valina, isoleucina, leucina (en las concentraciones indicadas anteriormente para la cepa *S. kluyveri bat1* Δ) o uracilo (2 mg/ml) para complementar los requerimientos auxotróficos de las cepas. Todos los cultivos se incubaron en el lector de placas Bioscreen C a 28°C con agitación constante, usando 300 μ l de cultivo por cada muestra. A partir de las curvas de salida del equipo, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada condición. Los resultados se muestran como el promedio de al menos tres repeticiones de dos duplicados biológicos. Para determinar la velocidad específica de crecimiento, primero se calculó el valor de la pendiente en la fase exponencial de la curva de crecimiento.

Referencias

1. Avendaño, A., Deluna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., y and Gonzalez, A. (1997) GDH3 Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* No. 17:, Sept., p. 5594–5597 Vol. 179,.
2. Byrne, K.P., Wolfe, K.H. (2005) The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research* 15: 1456-1461.
3. Colón, M., Hernández, F., López, K., Quezada, H., González, J., López, G., Aranda, C., and González, A. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS One*. 18;6; 6(1):e16099.
4. DeLuna, A., Avendaño, A., Riego, L., and González, A. (2001) NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J Biol Chem* 276(47):43775-83
5. Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., and Butler, G. (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol* . 6,: 99.
6. García-Campusano, F., Anaya, VH., Robledo-Arratia, L., Quezada, H., Hernández, H., Riego, L., and González, A. (2009). *ALT1*-encoded alanine aminotransferase plays a central role in the metabolism of alanine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 55(4):368-74.
7. Gojkovic, Z., Paracchini, S., Piskur, J. (1998) A new model organism for studying the catabolism of pyrimidines and purines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 431:475-479.
8. Kellis, M., Birren, B., W., andy Lander, E. S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428:, 617-24.

9. Klaas, N.F., Haima P., Harder, W., Veenhuis, M., Geert, A.B. (1994) Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* 25:305-310.
10. Kurtzman, C.P. (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research* 4(3):233-245.
11. Liachko, I., Tanaka, E., Cox, K., Chung, S.C., Yang, L., Seher, A., Hallas, L., Cha, E., Kang, G., Pace, H., Barrow, J., Inada, M., Tye, BK., Keich, U. (2011) Novel features of ARS selection in budding yeast *Lachancea kluyveri*. *BMC Genomics*. 28; 12:633.
12. Møller, K., Sharif, M.Z., Olsson, L. (2004) Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *J. Biotechnol.* 111(3):311-318.
13. Moye, W.S., Amuro, N., Rao, J.K., Zalkin, H. (1985) Nucleotide sequence of yeast GDH1 encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 260(14):8502-8.
14. Phaff, H.J., Miller, M.W., Shifrine, M. (1956) The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie Van Leeuwenhoek* 22(2):145-61.
15. Rasmussen, A., Lv, Y., Schnackerz, K. D. and Piškur, J. (2011) A New Expression Vector for Production of Enzymes in the Yeast *Saccharomyces (Lachancea) kluyveri*. , *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30:(12):, 1227-1232.
16. Riego, L., Avendaño, A., DeLuna, A., Rodriguez, E., González, A. (2002) *GDH1* expression is regulated by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1):79-85.
17. Romero, M., Guzman-Leon, S., Aranda, C., Gonzalez-Halphen, D., Valenzuela, L., and Gonzalez, A., (2000) Pathways for glutamate

- biosynthesis in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 146, : 239–245.
18. Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, : 19–27.
 19. Soberon, M., Olamendi, J., Rodríguez, L., and González, A. (1989) Role of glutamine aminotransferase in glutamine catabolism by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 135(10): 2693–2697.
 20. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., y Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, : 1793-808.
 21. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58, pp. : 409–419.
 22. Weinstock, K. G., and Strathern, J. N. (1993) Molecular genetics in *Saccharomyces kluyveri*: the *HIS3* homolog and its use as selectable marker gene in *S. kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9:351–361.
 23. Wolfe, K. H., Shields, D. C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:, 708-13.

Material suplementario

Tabla S1. Lista de plásmidos y cepas utilizados.

Plásmidos	Genotipo relevante	Fuente o Referencia
pRS416	<i>URA3, CEN6-ARS4</i>	Sikorski, R. S. and Hieter, P; 1989.
P1018	<i>2 μ URA3</i>	A. Rasmussen <i>et al</i> , 2011.
YEpkD352	<i>pKD1 URA3</i>	Laboratorio Roberto Coria
pKanMX	Derivado pRS416 <i>URA3 CEN6-ARS4</i> geneticina resistente	Este trabajo
pRS416-HPH- <i>URA3</i>	Derivado del pRS416 <i>P_{PGK1}::hph::3'UTR_{HIS3} URA3 CEN6-ARS4</i> Higromicina resistente	Este trabajo
pJB3	Un fragmento de PCR de 3.431 Kb generado con los oligos 94 y 98 que lleva el marcador <i>KanMx</i> que se digirió con <i>EcoRI</i> y <i>BamHI</i> y se clonó en el pRS416 cortado con <i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> . <i>URA3 CEN6-ARS4</i> Geneticina resistente.	Este trabajo
Cepas	Genotipo relevante	Fuente o referencia
<i>S. kluyveri</i> Y156	<i>MAT α ura3</i>	Weinstock, K. G., and J. N. Strathern, 1993
<i>S. cerevisiae</i> W303	<i>MAT α ura3</i>	Wallis <i>et al</i> , 1989
<i>S. kluyveri bat1Δ</i>	<i>MAT α ura3 bat1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>S. kluyveri gdh1Δ</i>	<i>MAT α gdh1Δ::URA3</i>	Este trabajo
<i>S. kluyveri alt1Δ</i>	<i>MAT α alt1Δ::URA3</i>	Este trabajo

Tabla S2. Lista de desoxioligonucleótidos utilizados.

Nº	Secuencia	Sitio de restricción	Coordenadas respecto al ATG del gen <i>BAT</i> (pb)
95	CCGGAATTCCTACCCGTCTACCTGTAAACC	<i>EcoRI</i>	-998 a -976
96	CCGGAATTCAGAAACGGAAGAAAGGAGCC	<i>EcoRI</i>	-61 a -41
97	CCGGGATCCGGTGAACCAAAGATAAATGGG	<i>BamHI</i>	+1225 a +1244
98	CCGGGATCCCGATGGGTCCTCGAAATTTGG	<i>BamHI</i>	+2223 a +2244

Nº	Secuencias	Sitio de restricción	Módulo que amplifica
85	CCGGAATTCAGATCTGTTTAGCTTGCCTCG	<i>EcoRI</i>	KanMX
86	CCGGGATCCTTTTCGACACTGGATGGC	<i>BamHI</i>	
Desoxioligonucleótidos utilizados en el PCR de fusión			
133	CTCTACCGTTGGTCTTGGTATGTTG		1 kb del 5'UTR de <i>GDH1</i> de <i>S. kluyveri</i>
136	CGAATTCAGGAACTTGATATTTTTAGGTGACGTCTGGGAATAAGCTCC		
137	ATCACGGCTACCACATCGTCTTTGATTGTGCGTATCTACAGATGCTTGTGG		1 kb del 3'UTR de <i>GDH1</i> de <i>S. kluyveri</i>
138	AACTGGAATTACACCCTTGGCTGAC		
117	ATTCATCTCACTTTCTTCTCGCAACACC		1 kb del 5'UTR de

120	CGAATTCAGGAACCTTGATATTTTTAAAGGAGTGACTAGGGAAACGAAGGGG	<i>ALT1</i> de <i>S. kluyveri</i>
121	ATCACGGCTACCACATCGTCTTTGAGTCTCAGAACCTTTTTTTAAGACGCTTG	1 kb del 3'UTR de <i>ALT1</i> de <i>S. kluyveri</i>
122	AATTCCTACTATCCCTGCCTAGACTGC	
604	AAAAAATATCAAGTTCCTGAATTCG	Casete <i>URA3</i>
605	CAAAGACGATGTGGTAGCCGTG	
Desoxioligonucleótidos utilizados para verificar las mutantes		
94	CCGGAATTCTACAAGTTCACCGTTAGCC	Verificación de inserción del casete KanMX en el ORF de <i>BAT1</i> .
99	CCGGGATCCGTAAATACGTTGGGGTGCTGG	
135	CCTCGTTGGCTGTTTCAGATGG	Verificación de inserción del casete <i>URA3</i> en el ORF de <i>Gdh1</i> .
140	GGAAGGCGTTGCAAGAAGCTGTTG	
119	AAACCCTCCACCAGCATAAGTTC	Verificación de inserción del casete <i>URA3</i> en el ORF de <i>Gdh1</i>
124	CTCTAGATTTGTGTGGTTGTCACCC	