



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudios genéticos de las mutantes de los genes  
*BATs de *Lachancea kluyveri****

Tesis que presenta

**Javier Montalvo Arredondo**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Biología Molecular**

Directora de tesis

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

San Luis Potosí, S.L.P., 29 de enero de 2016



IPICYT

## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudios genéticos de las mutantes de los genes BATs de *Lachancea kluyveri***” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Javier Israel Montalvo Arredondo** y aprobada el **veintinueve de enero del dos mil quince** 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 Ruiz**  
Directora de la tesis

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Alejandro De Las Peñas Nava**  
Miembro del Comité Tutorial

**Dr. Alexander de Luna Fors**  
Miembro del Comité Tutorial



## **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.

La investigación fue parcialmente financiada por los proyectos SEP-CONACYT CB\_2005-1\_49039, CB\_2009\_132377 y CB\_2014-239492-B. Y también por el proyecto “International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology” (ICGEB) CRP/MEX10-03.

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



# 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 082 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de enero del año 2016, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alejandro De Las Peñas Nava</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Alexander de Luna Fors</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>LANGEBIO</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Javier Israel Montalvo Arredondo**

sobre la Tesis intitulada:

*Estudios genéticos de las mutantes de los genes BATs de Lachancea kluyveri*

que se desarrolló bajo la dirección de

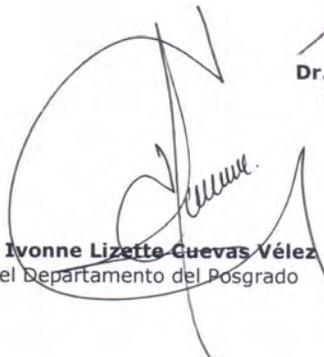
**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**

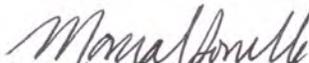
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:55 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 convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de enero de 2016.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatoria**

Dedico esta obra a mi familia: a mis padres, Blanca y Javier por enseñarme el buen sendero y por darme el apoyo y la libertad de decidir tomarlo. A mi hermana Tania por brindarme compañía y apoyo durante esta travesía. Le agradezco tanto a mi familia por esperarme todo este tiempo, y yo espero no decepcionarlos.

## Agradecimientos

Agradezco profundamente la asesoría de la Dra. Lina Riego Ruiz porque fue indispensable para llevar a cabo este trabajo de investigación. También aprecio mucho y le estoy tan agradecido por toda la enseñanza que me brindó durante el posgrado.

Agradezco los comentarios y sugerencias de este manuscrito hechas por el comité tutorial conformado por los doctores Gerardo Argüello Astorga, Alejandro de las Peñas Nava, Alexander DeLuna Fors y Roberto Sanchez Olea así como Lina Riego Ruiz porque realmente mejoraron mucho esta obra.

Agradezco la valiosa donación de la cepa de la levadura *Lachancea kluyveri*, que el Dr. Jure Piskur nos hizo, con la cual hemos trabajado en el laboratorio y con la que produce este trabajo de investigación.

Este trabajo no pudo haberse realizado sin la ayuda de Dr. Nicolás Gómez, técnico del Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa. Así que, por tal motivo le agradezco mucho por su labor técnica aportada.

El material biológico (DNA) que se secuenció, se hizo en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA). Por este motivo agradezco la aportación técnica de la L.P. Verónica Zárate.

Agradezco el apoyo económico que me brindó el CONACYT (N° registro 209255) y el IPICYT durante la realización de los estudios de doctorado este trabajo.

A todas estas personas e instituciones; a mis amigos y compañeros de toda la maestría y el doctorado; a mis amigos y compañeros de este instituto; les dedico mi admiración y estoy eternamente agradecido.

## Tabla de contenidos

Constancia de aprobación de tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta de examen.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas.....	x
Lista de figuras.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1 Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.2 Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada.....	3
1.3 Relación del metabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina con el mantenimiento de la mitocondria y la homeostasis del hierro.....	4
1.4 La levadura <i>Lachancea kluyveri</i> como modelo de estudio y sus aplicaciones.....	7
2. Materiales y métodos.....	9
2.1 Cepas.....	9
2.2 Vectores.....	11
2.3 Construcción de la cepa que expresa LkBat1 etiquetada con yECitrine.....	12
2.4 Condiciones de cultivo.....	12
2.5 Análisis <i>in silico</i> de los promotores.....	13
2.6 Análisis de la expresión genica por “Northern blot”.....	14
2.7 Ensayos de actividad enzimática.....	15
2.8 Microscopía de fluorescencia.....	15
2.9 Tablas.....	16
Tabla 1. Lista de cepas y genotipos.....	16
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para hacer la mutante <i>Lkbat1</i> de <i>L. kluyveri</i> .....	18
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para generar la mutante <i>L. kluyveri bat1bis</i> .....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de <i>L. kluyveri</i> complementadas con los genes <i>BAT</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	20
Table 5. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de <i>L. kluyveri</i> complementadas con el gen <i>ScBAT2</i> .....	21
Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la construcción de las cepas de	

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ScMA1 y ScMA2.....	22
Table 7. Lista de vectores.....	24
Table 8. Oligonucleótidos usados para construir los vectores.....	26
Table 9. Oligonucleótidos usados para construir la cepa etiquetada con <i>LkBAT1-yECitrine</i> .....	29
Table 10. Oligonucleótidos usados para sintetizar la sonda <i>LkBAT1bis</i> para el “Northern blot” y oligonucleótidos usados para los ensayos de RT-PCR.....	30
3. Resultados.....	31
3.1 Caracterización de las mutantes sencillas <i>Lkbat1</i> y <i>Lkbat1bis</i> y la doble mutante de <i>Lachancea kluyveri</i> .....	31
3.1.1 Descripción de los genes parálogos <i>LkBAT1</i> y <i>LkBAT1bis</i> de <i>L. kluyveri</i> .....	31
3.1.2 El gen <i>LkBAT1</i> tiene un papel funcional en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.....	32
3.1.3 La transcripción del gen <i>LkBAT1</i> se indujo tanto en condiciones biosintéticas como en condiciones catabólicas.....	36
3.1.4 La enzima codificada en <i>LkBAT1</i> se localiza en la mitocondria.....	38
3.1.5 El gen parálogo <i>LkBAT1bis</i> tiene características que sugieren que no es un pseudogen.....	40
3.2 Ensayos de complementación funcional.....	42
3.2.1 El gen <i>LkBAT1</i> complementó funcionalmente a <i>ScBAT1</i> y <i>ScBAT2</i> en la biosíntesis de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina.....	42
3.2.2 <i>ScBAT1</i> y <i>ScBAT2</i> complementaron a la mutante <i>Lkbat1</i> de <i>L. kluyveri</i> .....	47
3.3 Liga entre el metabolismo de valina, isoleucina y leucina con la asimilación de una fuente de carbono no fermentable.....	48
3.3.1 La cepa doble mutante <i>Lkbat1 Lkbat1bis</i> de <i>L. kluyveri</i> creció ineficientemente en una fuente de carbono no fermentable.....	48
3.4 Contribución de la expresión y localización de las transaminasas ScBat1 y ScBat2 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la asimilación de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina.....	53
3.4.1 Sobreexpresar constitutivamente a ScBat2 complementó a la mutante <i>Scbat1</i> de <i>S. cerevisiae</i> en la condición de crecimiento biosintética.....	53
3.4.3 La proteína ScBat1 expresada constitutivamente y relocalizada a citoplasma, complementó a la mutante Scbat2 de <i>S. cerevisiae</i> en la asimilación de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina.....	56
4. Discusión y conclusión.....	58
4.1 El gen <i>LkBAT1</i> de <i>L. kluyveri</i> codifica una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada.....	58
4.2 El gen <i>LkBAT1bis</i> es una copia degenerada del gen <i>LkBAT1</i> .....	61
4.3 La función redundante de los genes <i>LkBAT1</i> y <i>LkBAT1bis</i> en la asimilación de etanol como fuente de carbono.....	63
4.4 Contribución de la localización de ScBat2 y ScBat1 en la asimilación de valina, isoleucina y leucina como fuente de nitrógeno.....	64
4.5 Escape al conflicto adaptativo (EAC): propuesta de un modelo primitivo que	

explica la divergencia funcional de los genes <i>LkBAT1</i> y <i>LkBAT1bis</i> .....	66
5. Perspectivas.....	68
6. Referencias.....	70
7. Anexos.....	80

## Lista de tablas

Tabla 1. Lista de cepas y genotipos.....	16
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para hacer la mutante <i>Lkbat1</i> de <i>L. kluyveri</i> .....	18
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para generar la mutante <i>L. kluyveri bat1bis</i> .....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de <i>L. kluyveri</i> complementadas con los genes <i>BAT</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	20
Table 5. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de <i>L. kluyveri</i> complementadas con el gen <i>ScBAT2</i> .....	21
Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la construcción de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae ScMA1</i> y <i>ScMA2</i> .....	22
Table 7. Lista de vectores.....	24
Table 8. Oligonucleótidos usados para construir los vectores.....	26
Table 9. Oligonucleótidos usados para construir la cepa etiquetada con <i>LkBAT1-yECitrine</i> .....	29
Table 10. Oligonucleótidos usados para sintetizar la sonda <i>LkBAT1bis</i> para el “Northern blot” y oligonucleótidos usados para los ensayos de RT-PCR.....	30

## Lista de figuras

Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de residuos de aminoácidos de las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada de diferentes especies de levadura. ....	34
Figura 2. El gen <i>LkBAT1</i> de <i>L. kluyveri</i> está involucrado en el metabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina.....	35
Figura 3. Perfil transcripcional del gen <i>LkBAT1</i> en respuesta a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.....	38
Figura 4. La proteína quimérica LkBat1-yECitrine se localiza en la mitocondria en <i>L. kluyveri</i> .....	40
Figura 5. Análisis de PCR punto final (RT-PCR) muestra que el gen <i>LkBAT1bis</i> sí se transcribe.....	42
Figura 6. <i>LkBAT1</i> substituye funcionalmente a <i>ScBAT1</i> en <i>S. cerevisiae</i> .....	46
Figura 7. El gen <i>ScBAT1</i> substituyó completamente al gen <i>LkBAT1</i> en <i>L. kluyveri</i> en SD + NH <sub>4</sub> y SD + VIL.....	48
Figura 8. Tasa de crecimiento específica de la cepa tipo silvestre de <i>L. kluyveri</i> y la mutante sencilla <i>Lkbat1bis</i> en amonio, glutamina y GABA.....	51
Figura 9. La cepa doble mutante <i>Lkbat1 Lkbat1bis</i> muestra una fase de crecimiento “lag” extendida bajo una condición de crecimiento respiratorio.....	52
Figura 10. Ensayos de complementación en <i>S. cerevisiae</i> con el vector <i>pExp-ScBAT2</i> .....	54
Figura 11.- Ensayos de complementación en <i>S. cerevisiae</i> sobre expresando el gen <i>ScBAT1</i> . ....	55
Figura 12.- Micrografías de levaduras transformadas con vectores que expresan proteínas quiméricas fusionadas a la proteína verde fluorescente (Gfp).....	57
Figura 13.- Ruta metabólica de la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada.....	80

## Resumen

### Estudios genéticos de las mutantes en los genes *BATs* de *Lachancea kluyveri*

Las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAT), de L-valina, L-isoleucina y L-leucina (VIL) participan en la biosíntesis y degradación de VIL. Los genes y mecanismos del metabolismo de VIL en la levadura *Lachancea kluyveri* no se han identificado funcionalmente. Para elucidar los elementos involucrados en ese metabolismo en *L. kluyveri* analizamos su genoma e identificamos el gen (*LkBAT1*) ortólogo al gen *ScBAT1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, encontramos otro gen (*LkBAT1bis*) que es muy similar en secuencia a *LkBAT1* y *ScBAT1*, y si codificara una proteína, ésta estaría trunca en el carboxilo terminal. Para caracterizar funcionalmente estos genes, se generaron las mutantes sencillas y la doble mutante en los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis*, y se hicieron ensayos para probar el papel funcional de los genes en el metabolismo de VIL. Encontramos que el gen *LkBAT1* es necesario para el metabolismo de VIL, y actividad de BCAAT en la cepa que expresa *LkBAT1* pero no en la cepa mutante *Lkbat1*. La complementación heteróloga de genes entre *S. cerevisiae* y *L. kluyveri* confirmó que *LkBAT1* y *ScBAT1* son ortólogos funcionales. Se determinó que *LkBat1* se localiza principalmente en mitocondria, y la regulación transcripcional de *LkBAT1* no depende de la calidad de la fuente de nitrógeno. *LkBAT1bis* no parece participar en el metabolismo de VIL, pero ambos genes (*LkBAT1* y *LkBAT1bis*) son necesarios para asimilar etanol, una fuente de carbono no fermentable. Estos resultados sugieren que el gen *LkBAT1* codifica para una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y *LkBAT1* y *LkBAT1bis* participan en el metabolismo respiratorio.

**Palabras clave:** Valina; isoleucina; leucina; transaminasa; *Lachancea kluyveri*; metabolismo respiratorio.

## Abstract

### **Genetic studies in mutant strains lacking *BAT* genes of *Lachancea kluyveri***

Branched chain aminoacid transaminases (BCAAT) have a functional role on the biosynthesis and catabolism of L-valine, L-isoleucine and L-leucine (VIL). In *Lachancea kluyveri*, the genes and mechanisms for VIL metabolism have not been identified. To elucidate the elements involved in the biosynthesis and catabolism of VIL in *L. kluyveri*, we survey the genome of this yeast and we found the orthologous gene (*LkBAT1*) to the *S. cerevisiae ScBAT1* gene. In addition, we found another ORF (*LkBAT1bis*) which is highly similar to *LkBAT1* and this gene encodes for a hypothetical protein which is truncated at its C-terminus. To assess the function of these genes, we constructed the single mutants and the double mutant in the *Lkbat1* and *Lkbat1bis* genes. We found that *LkBAT1* is needed in the VIL metabolism and that *Lkbat1* null mutant did not show transaminase activity. Heterologous complementation assays between *S. cerevisiae* and *L. kluyveri* confirmed that *LkBAT1* and *ScBAT1* are functional orthologous genes. Furthermore, LkBat1 is localized in the mitochondria, and the transcriptional regulation of *LkBAT1* does not depend on the nitrogen source quality. *LkBAT1bis* has no role in VIL metabolism, however, both genes (*LkBAT1* and *LkBAT1bis*) are needed for the assimilation of ethanol, a non-fermentable carbon source. These results suggest that *LkBAT1* encodes for a BCAAT and that both genes (*LkBAT1* and *LkBAT1bis*) have a role in the respiratory metabolism.

**Keywords:** Valine; isoleucine; leucine; transaminase; *Lachancea kluyveri*; respiratory metabolism.

# **1. Introducción**

## **1.1 Metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Los aminoácidos de cadena ramificada L-valina, L-isoleucina y L-leucina (VIL) son aminoácidos proteínogénicos necesarios para la biosíntesis de proteínas. Éstos también pueden ser asimilados como fuente de nitrógeno, al donar grupos amino, y su degradación produce un tipo de alcoholes llamados “fusel” que le dan sabor agradable a las bebidas alcohólicas fermentadas. También este tipo de alcoholes ayuda a mantener la homeostasis del potencial redox intracelular y a reciclar el NADH producido por la glucólisis (Dickinson, 2000; Lilly *et al.*, 2006; Hazelwood *et al.*, 2008; Nelson and Cox, 2008).

Los aminoácidos VIL tienen un grupo R no polar y alifático, y como todos los aminoácidos, sus precursores de la ruta metabólica provienen de los metabolitos intermediarios de la glucólisis. En perspectiva amplia, el metabolito precursor de valina e isoleucina es el piruvato, y para la leucina, es el  $\alpha$ -cetobutirato. La mayor parte de la ruta biosintética se lleva a cabo en la matriz mitocondrial. Esta ruta termina en el proceso de transaminación que también es el primer paso de la asimilación de estos aminoácidos como fuente de nitrógeno. En *Saccharomyces cerevisiae*, la degradación sucede principalmente en el citosol y los productos finales de esta ruta son los alcoholes tipo “fusel” (ver Figura 13 en la sección de anexos) (Nelson and Cox, 2008; Hazelwood *et al.*, 2008).

En la biosíntesis, parte del flujo metabólico que llega hasta el piruvato es direccionado hacia la producción de valina, isoleucina y leucina. Primero, el

piruvato es descarboxilado y activado a la forma de hidroxietil tiamina pirofosfato, y luego es condensado con otra molécula de piruvato (en el caso de la ruta de la valina) o con una molécula de  $\alpha$ -cetobutirato (en el caso de la ruta de la isoleucina). Este paso lo cataliza la enzima acetolactato sintasa. A partir de aquí se comparten las mismas enzimas para ambas rutas metabólicas, y el intermediario de la ruta de valina ( $\alpha$ -acetolactato) así como el de la ruta de isoleucina ( $\alpha$ -acetolactato) sufren modificaciones químicas de reacciones de reducción e isomerización por la enzima isomero-reductasa del acetohidroxiácido. Los intermediarios producidos en este paso son:  $\alpha,\beta$ -dihidroxi- $\beta$ -metilvalerato (ruta de isoleucina) y  $\alpha,\beta$ -dihidroxi- $\beta$ -isovalerato (ruta de valina), que subsecuentemente son deshidratados por la enzima dihidroxi-deshidratasa para formar los  $\alpha$ -cetoácidos precursores para la isoleucina ( $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato) y valina ( $\alpha$ -cetoisovalerato).

El compuesto precursor inmediato de la valina ( $\alpha$ -cetoisovalerato) es también precursor para la biosíntesis de leucina, que mediante reacciones subsecuentes como de acetilación, catalizado por la enzima  $\alpha$ -isopropilmalato sintasa, isomerización, catalizado por la enzima isopropilmalato isomerasa, y reducción que se lleva a cabo por la enzima  $\beta$ -isopropil deshidrogenasa, se produce el intermediario  $\alpha$ -cetoisocaproato precursor directo de la leucina.

Los tres  $\alpha$ -cetoácidos producidos en estas rutas metabólicas son transaminados por las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificante para producir los tres aminoácidos valina, isoleucina y leucina (Nelson and Cox, 2008).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la degradación y asimilación de estos aminoácidos se lleva a cabo por la ruta de Ehrlich. Esta ruta metabólica se puede describir a grandes rasgos en 3 reacciones (transaminación, descarboxilación, y oxidación o reducción) que sufren estos aminoácidos y subsecuentemente los intermediarios que se van formando. El **primer** paso es la desaminación por transaminación, este paso es catalizado por las transaminasas dependientes de piridoxal 5'-fosfato (PLP) como la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y la de los aminoácidos aromáticos. En este paso el grupo amino del

aminoácido es transportado al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato (este paso es importante para asimilar estos aminoácidos como fuente de nitrógeno). El **segundo** paso es la descarboxilación: el  $\alpha$ -cetoácido producido en el paso anterior es descarboxilado principalmente por alguna piruvato descarboxilasa para producir el aldehído tipo “fusel” que, en el **tercer** paso, puede ser reducido a alcohol tipo “fusel” por las alcohol deshidrogenasas o aril-alcohol deshidrogenasas, o puede ser oxidado hasta ácido tipo “fusel” por las enzimas aldehído deshidrogenasas (Dickinson, 2000; Hazelwood *et al.*, 2008; Lilly *et al.*, 2006).

Las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada juegan un papel muy importante en el metabolismo de estos aminoácidos porque se encuentran en un nodo que conecta tanto la biosíntesis como la asimilación de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina en levadura.

## 1.2 Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada

Las transaminasas dependientes de PLP son miembros de una familia de proteínas que están involucradas en la transferencia de grupos amino hacia compuestos  $\alpha$ -cetoácidos precursores de los aminoácidos. Esta familia se divide en 4 subfamilias, y las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada pertenecen a una de éstas. La categorización de estas transaminasas está dada por homología en secuencia de residuos de aminoácidos y por las similitudes entre sus substratos (Metha *et al.*, 1993).

A partir de trabajos como los de Churchich y Farrelly (1969), Ichihara y Koyama (1966) y Lis *et al.* (1960) se ha podido elucidar el mecanismo de acción de las transaminasas dependientes de piridoxal 5-fosfato. Se sabe que el grupo amino del radical del residuo de lisina de la transaminasa se une covalentemente con el carbono del grupo ceto del piridoxal 5'-fosfato (PLP). Una vez que sucede esto, el glutamato (compuesto donador del grupo amino) entra a la bolsa catalítica y reemplaza la unión del carbono del PLP con el grupo amino de la lisina y une su

grupo amino a ese carbono del PLP. El complejo forma una base de *Schiff* que se rompe por un proceso de hidratación el cual produce la piridoxamina 5'-fosfato y sólo el  $\alpha$ -cetoglutarato es liberado al medio. Después un  $\alpha$ -cetoácido (compuesto aceptor) entra a la bolsa catalítica y reacciona con la piridoxamina para formar nuevamente la base de *Schiff* entre la piridoxamina 5'-fosfato y el  $\alpha$ -cetoácido que es posteriormente descompuesta por el grupo amino del radical del residuo lisina de la transaminasa que vuelve a formar una base de Schiff. Al reaccionar la piridoxamina 5'-fosfato, ésta cede el grupo amino al  $\alpha$ -cetoácido y se produce el aminoácido. En este punto, la enzima está en condiciones de volver a catalizar la transaminación desde el inicio otra vez.

La cristalización y resolución de la estructura tridimensional de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de humano ha dado evidencias acerca del mecanismo de acción en la actividad enzimática. A partir de estos datos se sugiere que la forma activa de esta enzima en humano es cuando se encuentra dimerizada. Cada monómero de esta enzima se compone de dos dominios, el pequeño (1-175) y el grande (176-365). La interfase de dimerización se compone de 37 residuos del dominio 1 y 19 residuos del dominio 2 mientras que la bolsa catalítica se forma cuando se han dimerizado los monómeros (Yennawar *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2003).

### **1.3 Relación del metabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina con el mantenimiento de la mitocondria y la homeostasis del hierro.**

La mitocondria juega un papel muy importante en el ensamblaje y la maduración de los agregados de Fe-S en mitocondria (ISC) y en citosol (CIA) (Labbebois, 1990; Roland, 2009). El ensamblaje de los agregados de Fe-S en citosol (CIA) requiere totalmente de la maquinaria del sistema ISC de ensamblaje y de exporte.

La maduración se lleva a cabo en citoplasma por la maquinaria de ensamblado CIA que está presente en la mayoría de los eucariotas (Kispal *et al.*, 1999; Lill, 2009; Lill y Mühlenhoff, 2006; Lill y Mühlenhoff, 2008).

La maquinaria ISC mitocondrial produce un componente X que se exporta desde la matriz mitocondrial al citosol donde se piensa que lleva a cabo una función esencial en el proceso de maduración de los agregados de Fe-S en el citosol. Se ha propuesto que este compuesto X quela el hierro, un precursor del agregado de Fe-S o un péptido con residuos tiol reducidos (como el glutatión GSH). El proceso de exporte del compuesto X es mediado por la proteína Atm1 que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria.

Se ha sugerido que existen otros componentes implicados en el exporte eficiente del compuesto X, como la sulfidril-oxidasa Erv1 y las transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada Bat1 y Bat2. En el caso de las transaminasas no es muy clara la evidencia (Kispal *et al.*, 1996). El ensamblaje de los agregados de Fe-S en el citoplasma se lleva a cabo por las proteínas andamio Cfd1 y Nbp35, y la transferencia de estos agregados a las apoproteínas blanco se efectúa por las proteínas citosólicas Nar1 y Cia1 (Lill, 2009; Kuhnke *et al.*, 2006; Kispal *et al.*, 1997; Kispal *et al.*, 1999; Kispal *et al.*, 1996).

Cuando hay una afectación en la formación y maduración de los agregados de Fe-S en el citoplasma, el hierro se empieza a acumular en la mitocondria y produce daño al DNA mitocondrial que se traduce en la pérdida de la mitocondria y una disfunción en el metabolismo respiratorio. Este es un fenotipo que se ha observado en las mutantes que no tienen las proteínas Atm1 y Erv1 (Kispal *et al.*, 1997; Miao *et al.*, 2009).

Se han documentado evidencias de que procesos celulares como la biogénesis y maduración de los agregados de Fe-S, la homeostasis del hierro y el mantenimiento de la mitocondria están ligados en cierto grado con la ruta de la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada así como con algunas enzimas que participan en esta ruta (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995; Bateman *et al.*, 2002; Kispal *et al.*, 1996).

Por ejemplo, en *S. cerevisiae* Ilv5 (dihidroxiácido reductoisomerasa) es una

enzima tipo “moonlight” y está involucrada en dos funciones celulares: 1) cataliza un paso en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y 2) participa en el mantenimiento de la mitocondria. Se ha podido diseccionar a la enzima Ilv5 en su dominio catalítico y su dominio responsable del mantenimiento de la mitocondria. Si el dominio del mantenimiento de la mitocondria se afecta negativamente, la levadura carece de mitocondrias y no puede crecer en fuentes de carbono no fermentables; sin embargo, no es auxótrofa para los aminoácidos VIL. En cambio, si el dominio catalítico de la reductoisomerasa se afecta, la levadura se vuelve auxótrofa para estos aminoácidos. Además puede crecer en fuentes de carbono no fermentables y presenta mitocondrias en su citosol como las que presenta la cepa tipo silvestre (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995; Bateman *et al.*, 2002).

Las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada de *S. cerevisiae* son otro ejemplo claro de la liga de esta ruta biosintética con la biogénesis y maduración de los agregados de Fe-S y el mantenimiento de las mitocondrias. Se piensa que la transaminasa mitocondrial interacciona físicamente con Atm1 (transportador tipo ABC mitocondrial de la membrana interna) para darle estabilidad al transportador y ayudar a mediar el transporte de el compuesto X al citosol (Kispal *et al.*, 1996).

La cepa doble mutante de *S. cerevisiae bat1 bat2* no puede crecer en un medio de cultivo con una fuente de carbono no fermentable (etanol) aun en presencia de amonio, valina, isoleucina y leucina en el medio de cultivo; sin embargo ésta si puede crecer cuando se adiciona dextrosa al medio en lugar de etanol. Esta observación sugiere que la asimilación y degradación de estos aminoácidos es indispensable para crecer en una fuente de carbono no fermentable. También sugiere que el metabolismo respiratorio está afectado y es posible que se deba a un mal funcionamiento de la mitocondria. Esta evidencia es congruente con la hipótesis de la liga que existe entre Bat1 y Bat2, enzimas que participan en la biosíntesis de valina, isoleucina y leucina, y el mantenimiento de la mitocondria (Colón *et al.*, 2011).

Otro ejemplo que apoya la conexión entre los dos procesos celulares (biosíntesis de los aminoácidos VIL y mantenimiento de la mitocondria), son las

proteínas parálogas Yil051c (mitocondrial) y Yer057c (citosólica). Estas proteínas pertenecen a una familia muy grande de proteínas altamente conservada entre eucariontas, bacterias y archeas (familia *YER057c / Yigf / Uk114*). Las funciones de estas proteínas no son muy claras; sin embargo, se han visto involucradas en varios procesos metabólicos y el mantenimiento de la mitocondria. La mutante *yil051c* de *S. cerevisiae* presenta los siguientes fenotipos: auxotrofia por el aminoácido isoleucina, pérdida de mitocondrias y pérdida de la actividad de transaminasa específica para isoleucina. Estos resultados apuntan a que Yil051c (llamada Ibm1: Isoleucine **B**iosynthesis and **M**itochondria maintenance **1**) podría estar funcionando como un nodo que interactúa entre la biosíntesis específicamente de isoleucina y el mantenimiento de la mitocondria (Kim J-M *et al.*, 2001).

Éstos son algunos ejemplos en *S. cerevisiae* que sugieren la conexión de la homeostasis del hierro, la biogénesis de los agregados de Fe-S y el mantenimiento de la mitocondria con el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada; sin embargo, no es clara la forma de cómo está estructurada esta conexión.

## **1.4 La levadura *Lachancea kluyveri* como modelo de estudio y sus aplicaciones.**

*Lachancea kluyveri* es una levadura filogenéticamente relacionada con *Saccharomyces cerevisiae*. y se le conoce como una levadura “no *Saccharomyces*”. Entre las aplicaciones industriales en las que se usa esta levadura destacan: 1) co-cultivos en fermentaciones con *S. cerevisiae* con el objetivo de mejorar el sabor de la bebida con los compuestos volátiles que las levaduras no *Saccharomyces* (*L. kluyveri*) producen, u obtener un producto con una concentración baja de etanol (Jolly *et al.*, 2014). 2) Producción de compuestos de interés industrial como el ergosterol (He *et al.*, 2000) y los cerebrósidos

(Tamura *et al.*, 2005). 3) Expresión de proteínas heterólogas (Møller *et al.*, 2001; Møller *et al.*, 2004).

También *L. kluyveri* ha sido utilizada como un modelo eucarionte simple para estudiar el catabolismo de las pirimidinas ya que entre las levaduras, solo hay unas pocas especies que pueden degradarlas (Beck *et al.*, 2008). Recientemente, *L. kluyveri* se ha utilizado como un modelo ancestral en el estudio evolutivo del metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del carbono porque se piensa que conservó características tipo ancestrales (Cólon *et al.*, 2011; Fekete *et al.*, 2007; Conant and Wolfe, 2007; Otterstedt *et al.*, 2004).

En el laboratorio estamos interesados en estudiar el metabolismo del nitrógeno y su evolución en hemiascomicetos levaduriformes mediante análisis comparativos del metabolismo del nitrógeno entre especies de levaduras relacionadas filogenéticamente. Para este fin es necesario entender cómo las levaduras hemiascomicetos asimilan las diferentes fuentes de nitrógeno. En este trabajo nos propusimos entender cómo *L. kluyveri* puede biosintetizar y asimilar los aminoácidos de cadena ramificada.

*L. kluyveri* es una levadura que puede utilizar los aminoácidos de cadena ramificada como fuente de nitrógeno y además también los puede biosintetizar *de novo*. El paso catalítico de la transaminación es un nodo que conecta la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada con la asimilación de estos aminoácidos. Esta levadura conserva un gen que codifica para una transaminasa de estos aminoácidos, sin embargo no se ha descrito la función de este gen con respecto al metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada. Este trabajo está enfocado en el estudio funcional de los genes *LkBAT1* y su gen parálogo *LkBAT1bis* en el metabolismo de estos aminoácidos y en el metabolismo respiratorio.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Cepas

Las cepas usadas en este trabajo se describen en la **Tabla 1**. Las cepas mutantes fueron generadas por transformación con módulos de DNA diseñados para el reemplazo de genes blanco. La mutante sencilla *Lkbat1* de *L. kluyveri* fue obtenida por el remplazo del ORF de *LkBAT1* por el marcador de selección *KanMX6* (Longtine *et al.*, 1998). Los oligonucleótidos usados en la construcción del módulo están descritos en la **Tabla 2**. Los oligonucleótidos 84 y 85 fueron usados para amplificar el marcador de selección. Los oligonucleótidos 95 y 96 se usaron para amplificar la región intergénica 5' río arriba del ORF de *LkBAT1*. Los oligonucleótidos 97 y 98 fueron usados para amplificar la región intergénica 3' río abajo del mismo ORF. Los fragmentos fueron clonados secuencialmente en los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* en el vector *pRS416* (Sikorski and Hieter, 1989).

La cepa mutante sencilla *Lkbat1bis* de *L. kluyveri* fue generada por el remplazo del ORF del gen *LkBAT1bis* por el marcador de selección *KanMX6*. El módulo con el 5', el marcador de selección y el 3' se construyó por medio de PCR de fusión ("double-join PCR") como se describe en Yu *et al.*, (2004). Los oligonucleótidos usados para hacer este constructo de DNA se describen en la **Tabla 3**. Los oligonucleótidos 176 y 177 fueron usados para amplificar el marcador de selección *KanMX6* (Longtine *et al.*, 1998). Para amplificar las extensiones del vector, las regiones intergénicas de *LkBAT1bis* fueron amplificadas con los oligonucleótidos 157 y 213 para la región 5', y los oligonucleótidos 162 y 214 para amplificar la región 3'. Para generar la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis*, la cepa *L.*

*kluyveri* *Lkbat1::kanMX6* fue transformada con un módulo de DNA que se dirige al locus *LkBAT1bis* y lo reemplaza por el marcador de selección *NatMX4*. Los oligonucleótidos 176 y 177 (Tabla 3) fueron usados para amplificar el marcador de selección *natMX4* (Tong *et al.*, 2001).

Las cepas complementadas de *L. kluyveri* (*Lkbat1pro::LkBAT1*, *Lkbat1pro::ScBAT1* y *Lkbat1pro::ScBAT2*) se construyeron a partir de la cepa mutante sencilla de *L. kluyveri* (*Lkbat1::KanMX4*). Los módulos fueron diseñados para reemplazar el marcador de selección por los ORFs *LkBAT1*, *ScBAT1* o *ScBAT2*. Los módulos reemplazantes fueron construidos por PCR de fusión y los oligonucleótidos usados para esto, se describen en las **Tablas 4 y 5**, respectivamente. Las cepas complementadas de *S. cerevisiae* *Scbat1pro::LkBAT1* *Scbat2*, y *Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1*, en conjunto con las cepas control *Scbat1pro::ScBAT1 Scbat2* y *Scbat1 Scbat2pro::ScBAT2* fueron derivadas a partir de la doble mutante *Scbat1 Scbat2* de *S. cerevisiae*. Los módulos reemplazantes se construyeron de la siguiente manera: primero se amplificaron el promotor de *ScBAT1* y el ORF de *LkBAT1*, y estos fragmentos fueron fusionados por medio de PCR de fusión, por otro lado se amplificó el terminador *ScBAT1*. Segundo, el fragmento Promotor-*ScBAT1::ORF-LkBAT1* fue clonado en los sitios *SstI-XmaI*, y el terminador de *ScBAT1* se clonó en los sitios de restricción *Clal-XhoI* río abajo del fragmento Promotor-*ScBAT1::ORF-ScBAT2* ya clonado en *pRS416*, este constructo de DNA fue usado para dirigir el ORF *LkBAT1* hacia el locus de *ScBAT1*. De manera similar se hizo el módulo que dirige el ORF *LkBAT1* al locus *ScBAT2*.

Los módulos que se usaron para construir las cepas control se hicieron de manera similar, sin embargo se amplificó completamente el promotor junto con el ORF de cada gen y se clonaron en conjunto con el terminador correspondiente de tal manera que el ORF *ScBAT1* se dirigió al locus *ScBAT1* y el ORF *ScBAT2* se dirigió al locus *ScBAT1*. Los oligonucleótidos utilizados en estas construcciones de DNA se describen en la **Tabla 6**. Para transformar las levaduras se utilizó el protocolo anteriormente descrito en Gojkovic *et al.*, (2000).

## 2.2 Vectores

Los plásmidos usados en este trabajo están descritos en la **Tabla 7** (familias *pRS416*, *pExp* y *pGFP*), y los oligonucleótidos utilizados para construir los vectores se describen en la **Tabla 8**.

Para construir el vector *pRS416-LkBAT1* se amplificó este gen con su propio promotor (2151 pb) usando los oligonucleótidos 310 y 311 y se clonó en *pRS416* entre los sitios BamHI y SacI.

El vector de expresión (*pExp*) se construyó como sigue: el promotor del gen *ScPGK1* de *S. cerevisiae* en conjunto con el sitio de clonación múltiple (848 pb) se amplificó con los oligonucleótidos 316 y 317 y fue clonado en el vector *pRS416* en los sitios SacI y EcoRI. El terminador del gen *ScADH1* de la misma levadura se amplificó con los oligonucleótidos 318 y 83 produciendo un amplicón de 124 pb. Este producto de PCR del terminador de *ScADH1* fue clonado subsecuentemente en *pRS416-ScPGK1* en los sitios EcoRI y KpnI. Y para construir los vectores de expresión que lleva el ORF ya sea del gen *LkBAT1* (*pExp-LkBAT1*), *ScBAT1* (*pExp-ScBAT1*), *ScBAT2* (*pExp-ScBAT2*) o *NPScBAT1* (*pExp-NPScBAT1*), los ORFs se amplificaron con los pares de oligonucleótidos 112 / 114, 74 / 75, 110 / 111 y 76 / 75, respectivamente (**ver Tabla 8**). Los ORFs *LkBAT1* y *ScBAT2* fueron clonados en los sitios EcoRI en *pExp*, y los ORFs *ScBAT1* y *NPScBAT1* fueron clonados en los sitios XbaI – EcoRI en el mismo vector.

La familia de vectores *pGFP* se construyeron como se describe a continuación: para obtener el vector vacío *pGFP*, el promotor del gen *ScPGK1* en conjunto con el sitio de clonación múltiple fueron clonados en *pRS416* como se describió anteriormente. Después el fragmento que contiene el ORF del gen que codifica a la proteína verde fluorescente en conjunto con el terminador del gen *ScADH1*, amplificado con los oligonucleótidos 318 / 319, fue clonado río abajo del promotor del gen *ScPGK1* en los sitios EcoRI – KpnI en *pRS416*. El oligonucleótido 319 tiene una región en el extremo 5' que codifica para un “linker”

de 6 repeticiones de glicinas y alaninas (6xGA). Para construir los vectores *pGFP-ScBAT1*, *pGFP-ScBAT2* y *pGFP-NPScBAT1*, los ORFs de *ScBAT1*, *ScBAT2* y *NPScBAT1* se amplificaron con los siguientes oligonucleótidos: 74 / 75, 110 / 111, 76 / 75, respectivamente. Los ORFs amplificados *ScBAT1* y *NPScBAT1* se clonaron en los sitios XbaI – EcoRI en *pGFP* y el amplicón del ORF de *ScBAT2* se clonó en el sitio EcoRI en el mismo vector.

## 2.3 Construcción de la cepa que expresa LkBat1 etiquetada con yECitrine

Los cebadores utilizados para construir el módulo integrativo para substituir el gen *LkBAT1* por *LkBAT1-yECitrine* se describen en la **Tabla 9**. Los oligonucleótidos bat1\_T\_LkFw y bat1\_T\_LkRv se usaron para amplificar los módulos *yECitrine* y *URA3* a partir del vector pKT175 (Sheff y Thorn, 2004). Para amplificar las regiones que dirigen los módulos al gen blanco *LkBAT1* se utilizaron los oligonucleótidos bat1\_C\_LkFw y bat1LkRv2 para la región 5', y para amplificar la región 3' se usaron los oligonucleótidos bat1LkRv3 y bat1LkFw2. Para fusionar los fragmentos antes mencionados para la construcción del módulo integrativo se utilizó la técnica “double-join PCR” y los oligonucleótidos bat1\_C\_LkFw y bat1LkRv3.

## 2.4 Condiciones de cultivo

Como procedimiento rutinario para llevar a cabo experimentos con las levaduras, éstas se cultivan por 24 horas en medio rico (YPD) a 30 °C en rodillo de incubación. Después del preinóculo, las células son recolectadas y lavadas dos

veces en agua destilada estéril (10mL) y finalmente resuspendidas en 500  $\mu$ L de agua destilada estéril. Con esta suspensión celular se inoculan los medios experimentales.

Los medios de cultivos utilizados fueron: (YPD; 1% w/v extracto de levadura, 2% w/v peptona de caseína y 2% w/v dextrosa), (SD o SE; medio mínimo con 2% w/v dextrosa o 2% w/v etanol adicionado con Difco YNB (“yeast nitrogen base”, contiene sales y vitaminas traza para el crecimiento de levadura). Las fuentes de nitrógeno se usaron en las siguientes concentraciones: Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2% w/v ), valina (V; 0.015% w/v), leucina (L; 0.01% w/v), isoleucina (I; 0.003% w/v), glutamina (Glu; 0.033% w/v) y ácido  $\alpha$ -amino butírico (GABA; 0.033%). El uracilo fue usado a una concentración de 0.002% w/v.

La curva de crecimiento se monitoreo por mediciones automatizadas de la densidad óptica a 600nm a intervalos de 30 min en el equipo Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Las condiciones de crecimiento fueron las siguientes: máxima velocidad de agitación y temperatura constante de 30 °C. También se hicieron experimentos de crecimiento en cultivos en matraces, en este caso el volumen del medio fue 50mL contenido en matraces de 250mL, con agitación constante a 200rpm y a una temperatura de 30 °C. Las mediciones de la densidad óptica a 600nm se realizaron cada dos horas. La tasa de crecimiento específica está expresada en  $\mu_{\text{max}}(\text{h}^{-1})$ .

## **2.5 Análisis *in silico* de los promotores**

Se analizó la región intergénica río arriba (1500 pb) de los genes *ScBAT1* y *ScBAT2* de *S. cerevisiae* y *LkBAT1* de *L. kluyveri*, estas secuencias se descargaron de la base de datos de “YGOB” (Byrne and Wolfe, 2005). Para encontrar cajas reguladoras conservadas se compararon las secuencias de estas levaduras con las regiones homólogas de especies cercanas. Para la comparación de las secuencias de *S. cerevisiae*, se usaron las regiones homólogas de especies

como *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces kudriazevii*. En el caso de *L. kluyveri* se usaron las especies *Lachancea waltii*, y *Lachancea thermotolerans*.

Todas las secuencias se sometieron a una exploración de motivos usando el programa “Matrix-Scan” de la paquetería de “RSA Tools” (Van Helden 2003; Turatsinze *et al.*, 2008; Thomas-Chollier *et al.*, 2008, Thomas-Chollier *et al.*, 2011). Las matrices de motivos que se usaron para la exploración se descargaron de la base de datos “YETFASCO” (de Boer and Hughes, 2012).

Se consideraron como relevantes los motivos que obtuvieron un p-value igual o inferior a 1E-04 y que conservaran una posición relativa similar entre las especies cercanas.

## 2.6 Análisis de la expresión genica por “Northern blot”

El protocolo usado en este trabajo el que han descrito Struhl y Davis, (1981). El RNA total fue extraído de cultivos en fase de crecimiento exponencial en medios SD (dextrosa) o SD (etanol) con diferentes fuentes de nitrógeno: 0.2% sulfato de amonio o 0.015% valina, 0.003% isoleucina and 0.01% leucina, o 0.033% GABA o glutamina. Para detectar la presencia de los transcritos de los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis*, se amplificaron sondas con los pares de oligonucleótidos 112 y 114 para *LkBAT1* (tamaño de la sonda 1194 pb), y 358 con 359 para amplificar la sonda para *LkBAT1bis* (378 pb) (**ver Tabla 10**). Para fines de normalización, se amplificó una sonda para la subunidad del gen ribosomal *Lk18S* con los siguientes oligonucleótidos Lk18sFw (5'-AAGCTCGTAGTTGAACTTTGGGTC-3') y Lk18sRev (5'-AAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCG-3'). Las sondas fueron etiquetadas por medio de la incorporación de nucleótidos radioactivos (dCTP) con la enzima “Klenow”. Las imágenes fueron capturadas y analizadas con el software “ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics)”.

## 2.7 Ensayos de actividad enzimática

El protocolo que se usó en este trabajo para medir actividad específica de transaminasa de amino ácidos de cadena ramificada en extractos crudos se describió previamente por Colón *et al.* (2011). La actividad enzimática se midió indirectamente mediante una reacción acoplada que involucra la reducción del NAD<sup>+</sup> y esta reducción del compuesto fue monitoreada por mediciones de absorbancia a 340nm a intervalos de tiempo.

La reacción de transaminación toma ácido glutámico y  $\alpha$ -cetoisocaproato como substratos y transfiere el grupo amino, esto libera como producto el  $\alpha$ -cetoglutarato y L-leucina. Después el  $\alpha$ -cetoglutarato es descarboxilado por la cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH) y como producto de esta reacción se genera Succinil-CoA y NADH, y este último compuesto es medido por espectrofotometría.

## 2.8 Microscopía de fluorescencia

La levadura que expresa la proteína quimérica LkBat1-yECitrine se cultiva en un preinóculo de 14 horas en medio rico YPD. Después de lavar las células se inocularon a una OD<sub>600nm</sub> ~0.05 en medio mínimo con dextrosa como fuente de carbono y amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno. Se tomaron muestras del cultivo en la fase de crecimiento exponencial y fueron teñidas con “MitoTracker Red” (“Life Techonolgies”) y fueron inmovilizadas con 1.2% de agarosa de bajo punto de fusión (“Bio-Rad”). La etiqueta yECitrine y el colorante “MitoTracker Red” fueron observados con el microscopio de fluorescencia (“Olympus BX51”).

## 2.9 Tablas

**Tabla 1. Lista de cepas y genotipos**

ID	Nombre	Cepa y genotipo	Referencia
Y156	Y156-WT	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> BAT1 / BAT1bis</i>	Weinstock y Strathern 1993
68	<i>Lkbat1</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::KanMx / BAT1bis</i>	Este trabajo
46	<i>Lkbat1 Lkbat1bis</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::kanMX4 / bat1bis::natMX4</i>	Este trabajo
26	<i>Lkbat1bis</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> BAT1 / bat1bis::natMX4</i>	Este trabajo
72	<i>Lkbat1pro::LkBAT1</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::LkBAT1/ BAT1bis</i>	Este trabajo
76	<i>Lkbat1pro::ScBAT1</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::ScBAT1/ BAT1bis</i>	Este trabajo
80	<i>Lkbat1pro::ScBAT2</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::ScBAT2/ BAT1bis</i>	Este trabajo
Lk-Citr	<i>LkBAT1- yECitrine</i>	<i>L. kluyveri</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::LkBAT1-yECitrine</i>	Este trabajo
ScWT	<i>ScWT</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> BAT1 / BAT2</i>	Colón et al. 2011
ScB1	<i>Scbat1</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::kanMX4 / BAT2</i>	Colón et al. 2011
ScB2	<i>Scbat2</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> BAT1 / bat2::kanMX4</i>	Colón et al. 2011
ScB12	<i>Scbat1 Scbat2</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::natMX4 / bat2::kanMX4</i>	Colón et al. 2011
ScM2	<i>Scbat1 Scbat2pro::ScBAT2</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::natMX4 / bat2::ScBAT2</i>	Este trabajo
ScM1	<i>Scbat1pro::ScBAT1 Scbat2</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::ScBAT1 / bat2::kanMX4</i>	Este trabajo
ScMA5	<i>Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::natMX4 / bat2::LkBAT1</i>	Este trabajo

---

ScMA4	<i>Scbat1pro::LkBAT1</i> <i>Scbat2</i>	<i>S. cerevisiae ura3- MAT<math>\alpha</math> bat1::LkBAT1 /</i> <i>bat2::kanMX4</i>	Este trabajo
-------	---	---	--------------

---

**Tabla 2. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para hacer la mutante *Lkbat1* de *L. kluyveri*.**

ID	Nombre	Secuencia (5' to 3')	Descripción
95	SkB_P1_F	CCG <b>GAA TTC</b> CTA CCC GTC TAC CTG TTA ACC	Esos oligonucleótidos fueron usados para amplificar la región 5' de <i>LkBAT1</i> . Los sitios de restricción EcoRI se muestran en negritas.
96	SkB_P_R	CCG <b>GAA TTC</b> AGA AAC GGA AGA AAG GAG CC	
84	AMP MOD FW	CCG <b>GAA TTC</b> AGA TCT GTT TAG CTT GCC TCG	Estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar el módulo <i>kanMX4</i> . Oligonucleótido 84 tiene un sitio de EcoRI y el 85 tiene un sitio para BamHI.
85	AMP MOD RV	CCG <b>GGA TCC</b> TTT TCG ACA CTG GAT GGC	
97	SkB_T_F	CCG <b>GGA TCC</b> GGT GAA CCA AAG ATA AAT GGG	Estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar la región 3' del gen <i>LkBAT1</i> . Los sitios de restricción se muestran en negritas.
98	SkB_T1_R	CCG <b>GGA TCC</b> CGA TGG GTC CTC GAA ATT TGG	

**Tabla 3. Oligonucleótidos usados para construir el módulo “knock-out” para generar la mutante *L. kluyveri bat1bis*.**

ID	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Descripción
176	Mod_F	CGG GTT AAT TAA GGC GCG CCA G	Éstos fueron usados para amplificar los módulos <i>kanMX4</i> y <i>natMX4</i> . El tamaño de los amplicones son: 1207 pb para <i>natMX4</i> y 1442 pb para <i>kanMX4</i> .
177	Mod_R	CGA GCT CGT TTT CGA CAC	
157	SkBt5f_1F	ATG TTC GCT GGA ACT CGT AAG GC	Se usaron para amplificar la región 5' de <i>LkBAT1bis</i> . El oligonucleótido 213 tiene un fragmento en el extremo 5' ( <b>marcado en negritas</b> ) que es complementario al oligonucleótido 176.
213	SkBt5f_1R	<b>CTG GCG CGC CTT AAT TAA CCC GAC</b> CAA CCA TGA TTG GTA CCA CTC C	
214	SkBt3f_1F	<b>CCA GTG TCG AAA ACG AGC TCG</b> ATC ACA GAT TCT CGT AGG TTG GTC G	
162	SkBt3f_1R	ATA GGG CAC ACA CTC CAT CAC C	Se usaron para amplificar la región 3' de <i>LkBAT1bis</i> . El oligonucleótido 214 tiene un fragmento en el extremo 5' ( <b>marcado en negritas</b> ) que es complementario al oligonucleótido 177.
158	SkBt5f_2F	CGC CTT GTA TGA AGA GAC TTT CCC	Estos oligonucleótidos se usaron para amplificar el módulo “knock-out” completo para generar la mutante <i>Lkbat1bis</i> . El tamaño esperado del módulo es de 3472 pb.
163	SkBt3f_2R	GTT ATT CTT CAG TCT GGC GCT CTC	

**Tabla 4. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de *L. kluyveri* complementadas con los genes *BAT* de *S. cerevisiae*.**

ID	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Descripción
165	SkB5f_1F	ACA TGA TGC TTC TGT CCA TCC C	Se usaron para amplificar la región 5' intergénica el gen <i>LkBAT1</i> . El oligonucleótido 273 tiene una región que es complementaria a la región río arriba del ORF del gen <i>ScBAT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (esa región se muestra en negritas)
273	SkB_ScB15_R	<b>CCC CAA CTT CAA GGA ATG TCT</b> <b>CTG CAA CAT TTC GTG ATT GCT</b> GTT GGT TAT ATA CAA ATC	
274	SkB_ScB13_F	<b>GGT CAA AAA CTG TTG CCG ACT</b> <b>TGA ACT AAG CAT TGT AAA TTA</b> AAA GAC AAG AAA CAA G	Éstos se usaron para amplificar la región 3' intergénica del gen <i>LkBAT1</i> . El oligonucleótido 274 tiene una región complementaria a la parte río abajo del ORF del gen <i>ScBAT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (esta región complementaria se muestra en negritas).
170	SkB3f_1R	GGA GAG CTT GTC AGA GCA TCG G	
275	ScB1_F	GTT GCA GAG ACA TTC CTT GAA G	Se usaron para amplificar el ORF del gen <i>ScBAT1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
276	ScB1_R	TAG TTC AAG TCG GCA ACA GTT TTT G	
166	SkB5f_2F	GGA AAT CAT GAC TCT CCA TCG G	Estos oligonucleótidos fueron usados para fusionar los siguientes tres módulos: 5' <sub>LKBAT1</sub> – <i>ScBAT1</i> – 3' <sub>LKBAT1</sub> 5' <sub>LKBAT1</sub> – <i>ScBAT2</i> – 3' <sub>LKBAT1</sub> 5' <sub>LKBAT1</sub> – <i>LkBAT1</i> – 3' <sub>LKBAT1</sub>
171	SKB3f_2R	GGC AGC ACT ACT AAT ATC AGG CTC	

**Table 5. Oligonucleótidos usados para construir las cepas de *L. kluyveri* complementadas con el gen *ScBAT2*.**

ID	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Descripción
277	SkB_ScB25_R	<b>TGG AGG CGT CTA GGG GTG CCA</b> <b>AGG TCA</b> TTT CGT GAT TGC TGT TGG TTA TAT ACA AAT C	Este oligonucleótido en conjunto con el 165 fueron usados para amplificar la región 5' intergénica del gen <i>LkBAT1</i> . El oligonucleótido 277 tiene una región complementaria a la región río arriba del ORF de <i>ScBAT2</i> (dicha región complementaria se muestra en negritas en el oligonucleótido).
278	SkB_ScB23_F	<b>GGT CAA GGG TTG TTA CTG ATT</b> <b>TGA ACT GAG</b> CAT TGT AAA TTA AAA GAC AAG AAA CAA G	Este oligonucleótido en conjunto con el 170 fueron usados para amplificar la región 3' intergénica del gen <i>LkBAT1</i> . El oligonucleótido 278 tiene una región complementaria (mostrada en negritas) a la región río abajo del ORF de <i>ScBAT2</i> .
279	ScB2_F	GAC CTT GGC ACC CCT AGA G	Éstos fueron usados para amplificar el ORF de <i>ScBAT2</i> .
280	ScB2_R	CAG TTC AAA TCA GTAACA ACC CTT G	

**Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la construcción de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ScMA1 y ScMA2.**

ID	Nombre	Secuencia	Comentarios
1	SstI_PB1_F	CAC <b>GAG CTC</b> TGA AAT GCG CAC CAC AAG	Este oligonucleótido se usa con el oligonucleótido #5 para amplificar el promotor del gen <i>ScBAT1</i> . El producto de PCR contiene una región complementaria a la parte 5' terminal del ORF del gen <i>ScBAT2</i> . La región en negritas del oligonucleótido #5 es complementaria a la región 5' del ORF de <i>ScBAT2</i> . El oligonucleótido #1 tiene un sitio SstI marcado en negritas.
2	XmaI_OB1_R	TCC <b>CCC GGG</b> TTA GTT CAA GTC GGC AAC AG	Este oligonucleótido se usa con el #8 para amplificar el ORF del gen <i>ScBAT1</i> . El oligonucleótido #2 tiene un sitio de restricción para XmaI marcado en negritas.
3	SstI_PB2_F	CGC <b>GAG CTC</b> CTC CTT TCC AAA CAT CTT CG	Se usa en conjunto con el oligonucleótido #7; amplifican la región del promotor del gen <i>ScBAT2</i> . El oligonucleótido #7 tiene una región complementaria a la región terminal 5' del ORF <i>ScBAT1</i> (marcado en negritas), y el oligonucleótido #3 tiene un sitio de restricción de SstI marcado en negritas.
4	XmaI_OB2_R	AGC <b>CCC GGG</b> TCA GTT CAA ATC AGT AAC AAC CC	Se usa con el #6 para amplificar el ORF del gen <i>ScBAT2</i> . El oligonucleótido #4 tiene un sitio de restricción de XmaI marcado en negritas.
5	OB2_PB1_R	<b>CTA GGG GTG CCA AGG TCA</b> TGT TTT AGT ATG CTAAGG TTC TAG C	
6	OB2_F	ATG ACC TTG GCA CCC CTA G	
7	OB1_PB2_R	<b>TCA AGG AAT GTC TCT GCA</b> <b>ACA</b> TAT CGT TCT TAA AAC TCG TGG AG	
8	OB1_F	ATG TTG CAG AGA CAT TCC TTG AAG	
12	XhoI_TB1_R	CCT <b>CTC GAG</b> ATC AGG ATT ATG GAC CGG TG	Este oligonucleótido se usa con el #394 para amplificar la región del terminador del gen <i>ScBAT1</i> . El #12 tiene un sitio de restricción para XhoI, y el #394 tiene un

			sitio para Clal. Ambos sitios están en negritas.
64	<i>Xho</i> I_TB2_R	CAC <b>CTC GAG</b> CCT TTC TGA AGT CTAAGT GGG	Este oligonucleótido se usa con el #395 para amplificar la región del terminador del gen <i>ScBAT2</i> . El #64 tiene un sitio de restricción para <i>Xho</i> I (marcado en negritas).
394	TB1_F	CTT CAA GCT <b>TAT CGA</b> TAC CGT CGA CCT CGG TAA CTG GTC AAA AAC TGT TGC CG	Este oligonucleótido tiene un sitio para Clal mostrado en negritas.
395	TB2_F	CTT CAA GCT <b>TAT CGA</b> TAC CGT CGA CCT CGG TAA CTG GTC AAA AAC TGT TGC CG	Este oligonucleótido tiene un sitio para Clal mostrado en negritas.

---

**Table 7. Lista de vectores**

Nombre	Descripción	Referencia
<i>pRS416</i>	Vector diseñado para <i>S. cerevisiae</i> . Contiene el marcador de selección <i>ScURA3</i> .	Sikorski y Hieter, 1989
<i>pRS416-LkBAT1</i>	El locus <i>LkBAT1</i> fue clonado en los sitios <i>SacI</i> <i>BamHI</i> en el vector <i>pRS416</i> . El locus clonado se puede mapear desde el -279pb a +1872pb tomando como (+1) la adenina del codón de inicio.	Este trabajo.
<i>pExp</i>	Éste es un vector derivado del <i>pRS416</i> ; Éste contiene el promotor del gen <i>ScPGK1</i> y además contiene un sitio múltiple de clonación.	Este trabajo.
<i>pExp-LkBAT1</i>	Este vector es el <i>pExp</i> y lleva clonado el ORF del gen <i>LkBAT1</i> .	Este trabajo.
<i>pExp-ScBAT1</i>	Este vector, derivado de <i>pExp</i> , lleva clonado el ORF del gen <i>ScBAT1</i> .	Este trabajo
<i>pExp-ScBAT2</i>	Este vector, derivado de <i>pExp</i> , lleva clonado el ORF del gen <i>ScBAT2</i> .	Este trabajo
<i>pExp-NPScBAT1</i>	Este vector, derivado de <i>pExp</i> , lleva clonado el ORF del gen <i>ScBAT1</i> pero sin la región 5' que codifica el péptido líder que transporta a <i>ScBat1</i> a mitocondria.	Este trabajo
<i>pGFP</i>	Este vector, derivado del <i>pRS416</i> , contiene clonados los siguientes elementos: el promotor del gen <i>ScPGK1</i> , un sitio de clonación múltiple, un "linker" de 6xGA, el gen <i>GFP-(S65T)</i> (proteína verde fluorescente) y el terminador del gen <i>ScADH1</i> . Este vector es una herramienta para clonar un ORFx de interés y ver la localización celular de la proteína que codifica dicho ORFx.	Este trabajo
<i>pGFP-ScBAT1</i>	Vector derivado de <i>pGFP</i> que lleva clonado el ORF del gen <i>ScBAT1</i> .	Este trabajo

*pGFP-ScBAT2* Vector derivado de *pGFP* que lleva clonado el ORF del gen *ScBAT2*. Este trabajo

*pGFP-NPScBAT1* Vector derivado de *pGFP* que lleva clonado el ORF del gen *ScBAT1* sin la región en el extremo 5' que codifica para el péptido líder que transporta a ScBat1 a mitocondria. Este trabajo

**Table 8. Oligonucleótidos usados para construir los vectores.**

ID	Name	Sequence (5' to 3')	Description
310	SkB_BamHI_F	CGG <b>GGA TCC</b> GTC CGT TCG TAT TC	Para generar el vector <i>pRS416-LkBAT1</i> , estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar el gen <i>LkBAT1</i> desde el -279 al +1872 (tomando en cuenta a la adenina del codon de inicio como +1). El oligonucleótido 310 tiene un sitio de BamHI (marcado en negritas), y el oligonucleótido 311 tiene un sitio SacI (marcado en negritas). El fragmento amplificado fu clonado en el vector <i>pRS416</i> entre los sitios SacI – BamHI.
311	SkB_SacI_R2	GCT <b>GAG CTC</b> CAC AGG AAT GGG TTG C	
316	Ppgk1_F	GCC <b>GAG CTC</b> TTT TTA GTG TGC AAG TTT CTG TAAATC G	Para generar el vector <i>pExp-LkBAT1</i> , se usaron estos oligonucleótidos para amplificar el promotor del gen <i>ScPGK1</i> (848pb) de <i>S. cerevisiae</i> . El oligonucleótido 316 tiene un sitio SacI (marcado en negritas), y el oligonucleótido 317 tiene un sitio múltiple de clonación (marcado en negritas) que tiene los siguientes sitios ordenados por aparición: EcoRI, XmaI, HindIII, BamHI y XbaI. También se marca en negritas el codón de inicio que lo lleva el oligonucleótido 317.
317	Ppgk1II_R	GCC <b>GAA TTC CCC GGG AAG CTT</b> <b>GGA TCC TCT AGA CAT</b> TGT TTT ATA TTT GTT GTAAAA AGT AG	
318	GFP_R	GCC <b>GGT ACC</b> GGT GTG GTC AAT AAG AGC GAC CTC ATA CTA TAC CTG	Estos oligonucleótidos se usaron para amplificar el

83	Term_ADH1_ F	CCG <b>GAA TTC</b> CGG CGC GCC ACT TCT AAA TAA GCG	terminado de <i>ScADH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> usando como DNA molde el vector <i>pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6</i> (Longtine <i>et al.</i> , 1998). El oligonucleótido reverso 318 tiene un sitio KpnI (mostrado en negritas). El oligonucleótido en sentido 83 tiene un sitio EcoRI mostrado en negritas.
112	GFP_SkB_F	CCG <b>GAA TTC</b> ATG CTA AAA AGT TCT CTG AAA ACA TCT CTC	Estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar el ORF del gen <i>LkBAT1</i> . Ambos oligonucleótidos tienen un sitio de EcoRI (negritas).
114	GFP_SkB_R	CCG <b>GAA TTC</b> CTA GTT GTT TAG GTC AGC TAC AAC C	
74	B1- GFP_Fwd	GCC <b>TCT AGA</b> ATG TTG CAG AGA CAT TCC TTG AAG	Los oligonucleótidos 74 y 75 amplificaron el ORF del gen <i>ScBAT1</i> y los oligonucleótidos 76 y 75 se usaron para amplificar el ORF de <i>ScBAT1</i> sin la región que codifica para el péptido líder que dirige a la proteína a mitocondria (NPS <i>ScBAT1</i> ). El 74 y el 76 tienen un sitio de restricción para XbaI y el 75 tiene un sitio de restricción para EcoRI (mostrados en negritas). Los productos amplificados con estos oligonucleótidos se pueden usar para clonar en los vectores <i>pExp</i> y <i>pGFP</i>
75	B1-GFP_Rev	GCC <b>GAA TTC</b> GTT CAA GTC GGC AAC AGT TTT TGA CC	
76	NoSP-B1- GFPf_Fwd	GCC <b>TCT AGA</b> ATG GCC CCA TTA GAT GCA TCC AAA C	
110	GFP- BAT2_Fwd	CCG <b>GAA TTC</b> ATG ACC TTG GCA CCC CTA GAC	Estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar el ORF del gen <i>ScBAT2</i> , ambos tienen el sitio de restricción de EcoRI marcado en negritas.
111	GFP- BAT2_Rev	CCG <b>GAA TTC</b> TCA GTT CAA ATC ATG AAC AAC CCT TG	
318	GFP_Rev	GCC <u>GGT ACC</u> GGT GTG GTC AAT AAG AGC GAC CTC ATA CAT TAC CTG	Los oligonucleótidos 318 y 319 se usaron para amplificar

319 GFP\_Fwd    GCC GAA TTC **GGT GCA GGC GCT**  
**GGA GCT GGC GCC GGT GCT GGC**  
**GCA** TTA ATT AAC AGT AAA GGA GAA  
GAA C

el gen *GFP-(S65T)* en conjunto con el terminador de *ScADH1* a partir del vector *pFA6a-GFP-(S65T)-kanMX6* (Longtine *et al.*, 1998). El oligonucleótido 319 tiene un sitio de restricción para EcoRI y el 318 tiene uno para KpnI, éstos se muestran subrayados. Además, el 319 tiene una región en el extremo 5' que codifica para un linker que tiene 6 repeticiones de glicinas y alaninas (6xGA, mostrado en negritas). Para hacer el vector *pGFP* se clonó el promotor del gen *ScPGK1* (amplificado con 316 y 317) en *pRS416* en los sitios SacI – EcoRI, y después se clonó *GFP-(S65T)-TermScADH1* entre los sitios EcoRI – KpnI.

**Table 9. Oligonucleótidos usados para construir la cepa etiquetada con *LkBAT1-yECitrine*.**

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Descripción
bat1_T_LkFw	TTG CTT CTT GGA TCG CTG ATA TCC AAT ACG GTA GGG AAA AAC ACG GAA ACT GGT CCA AGG TTG TAG CTG ACC TAA ACA ACG GTG ACG GTG CTG GTT TA	Este oligonucleótido en conjunto con bat1_T_LkRv fueron usados para amplificar el "cassette" yECitrine y URA3 usando como DNA molde el vector pKT175.
bat1_T_LkRv	TTA AAT AAC TCT ATA CAA AAC GTT GTG GTT CCC ATT TAT CTT TGG TTC ACC TTG TTT CTT GTC TTT TAA TTT ACA ATG CTT CGA TGA ATT CGA GCT CG	
bat1LkFw2	AAG AAA CAA GGT GAA CCA AAG ATA AAT GGG AAC CAC AAC GTT TTG TAT AGA GTT ATT TAA	Este oligonucleótido en conjunto con Bat1LkRv3 fueron usados para amplificar la cola de 600pb del C-terminal del ORF <i>LkBAT1</i> .
bat1LkRv2	CCT TGG ACC AGT TTC CGT GTT TTT CCC TAC CGT ATT GGA TAT CAG CGA TCC AAG AAG CAA	
bat1_C_LkFw	TAT GTC AGC TTC GCT AGG CTC	Este oligonucleótido en conjunto con Bat1LkRv2 fueron usados para amplificar la cola de 600pb del N-terminal del gen <i>LkBAT1</i> . Este oligonucleótido y el bat1LkRv3 también fueron usados para unir los fragmentos de PCR por medio de la técnica "double-joint PCR".
bat1LkRv3	GAG GCT CTA TGA TTC ATC TGT CC	
bat1LkConfFw	TTC TCC AGT GGG TCC ATACTA C	bat1LkConfFw y bat1LkConfRv fueron usados para confirmar la inserción correcta del módulo en el genoma de <i>L. kluveri</i> .
bat1LkConfRv	GCA GCT CTT GCA TCC GTT TCT	

**Table 10. Oligonucleótidos usados para sintetizar la sonda *LkBAT1bis* para el “Northern blot” y oligonucleótidos usados para los ensayos de RT-PCR.**

ID	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Descripción
358	SkBTC1_Fwd	ATG TCA GCT TCG CTA GGC TC	Estos oligonucleótidos se usaron para amplificar la sonda <i>LkBAT1bis</i> (378pb). El oligonucleótido 358 se alinea al inicio del ORF y el 359 se alinea en la posición +378. El ORF de <i>LkBAT1bis</i> tiene un tamaño de 381pb.
359	SkBTC1_Rev	TTC TAT CAT CTT ACC GAT TAA	
25	SkBAT-t_RT_F	GGG TAC ACC AGA AAT AAG GC	Estos oligonucleótidos se usaron en los análisis de RT-PCR. Éstos alinean dentro del ORF de <i>LkBAT1bis</i> . El número 25 alinea en la posición +144 y el 26 en la posición +344 (se toma como +1 la adenina del codón de inicio).
26	SkBAT-t_RT_R	TCA GAG TCG AAA TTT GGC AG	

### **3. Resultados**

#### **3.1 Caracterización de las mutantes sencillas *Lkbat1* y *Lkbat1bis* y la doble mutante de *Lachancea kluyveri***

##### **3.1.1 Descripción de los genes parálogos *LkBAT1* y *LkBAT1bis* de *L. kluyveri***

En el genoma de *Lachancea kluyveri* identificamos dos genes putativos parálogos, similares en secuencia que llamamos *LkBAT1* (*SAKL0B12496g*, ChrB:1070225..1071418) y *LkBAT1bis* (*SAKLOG09064g*, ChrG:781359..781739).

La secuencia hipotética de residuos de aminoácidos de la proteína que codifica el gen *LkBAT1* es muy similar a las de transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAT) valina, isoleucina y leucina (BCAA) (**Figura 1**), y conserva el dominio característico de las transaminasas tipo IV (búsqueda en la base de datos CDD del NCBI). La secuencia hipotética proteínica de *LkBAT1bis*, si se tradujera, codificaría para una versión trunca en el carboxilo terminal de una transaminasa de BCAA. Este gen (*LkBAT1bis*), parece ser una copia completa del gen *LkBAT1* que se insertó río arriba de un gen tRNA en el cromosoma G y que con el paso del tiempo acumuló mutaciones deletéreas que resultaron en la presencia de 4 codones de paro (mostrados como X's en rojo enmarcadas con rectángulos azules en la **Figura 1**).

El locus *LkBAT1* conserva sintenia con genes ortólogos de otras especies como *Lachancea thermotolerans*, *Lachancea waltii*, *Saccharomyces castellii*,

*Candida glabrata*, *Kluyveromyces lactis*. También la secuencia de residuos de aminoácidos de la enzima LkBat1 es muy similar a la secuencia de transaminasas descritas en otros hongos como *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica* de las cuales se ha demostrado que son BCAAT funcionales (Bondar *et al.*, 2005; Collins and Wagner, 1973; Colón *et al.*, 2011; Eden and Benvenistry, 1998) (**Figura 1**). En contraste, *LkBAT1bis* ha perdido la sintenia ya que no existe ningún gen ortólogo en otros hongos que tengan una posición cromosómica relativa similar.

Adicionalmente, en la **Figura 1** se puede observar que los residuos del sitio catalítico (fondo gris), los residuos involucrados en la oligomerización (fondo negro) y el residuo lisina que une al cofactor PLP (flecha azul), se encuentran conservados en un alto porcentaje. Lo interesante de esta observación es que la conservación de residuos se observa tanto en la enzima LkBat1 como en LkBat1bis, en la cual la conservación se observa antes y después del primer codon de paro (**Figura 1**).

### **3.1.2 El gen *LkBAT1* tiene un papel funcional en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada**

Basados en los datos de similitud de la secuencia de residuos de nucleótidos y de aminoácidos, pensamos que *LkBAT1* codifica una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAT) y que *LkBAT1bis* codifica una versión trunca de ese tipo de transaminasa. Es probable que *LkBAT1* o ambos genes estén involucrados en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada.

Para someter a prueba esta hipótesis, comparamos el crecimiento de las cepas mutantes sencillas *Lkbat1* y *Lkbat1bis* así como la doble mutante en diferentes condiciones de crecimiento. Para evaluar la auxotrofia por los aminoácidos BCAA, las cepas mutantes y la tipo silvestre fueron cultivadas en medios mínimos con dextrosa (SD) y en diferentes fuentes de nitrógeno: el medio SD + NH<sub>4</sub>, fue usado como una condición de crecimiento biosintética, SD + NH<sub>4</sub> + VIL representa una condición de crecimiento de reabastecimiento y SD + VIL se usó como una condición de crecimiento catabólica. La tasa de crecimiento fue

medida en Bioscreen C MBR como se describe en la sección de materiales y métodos.

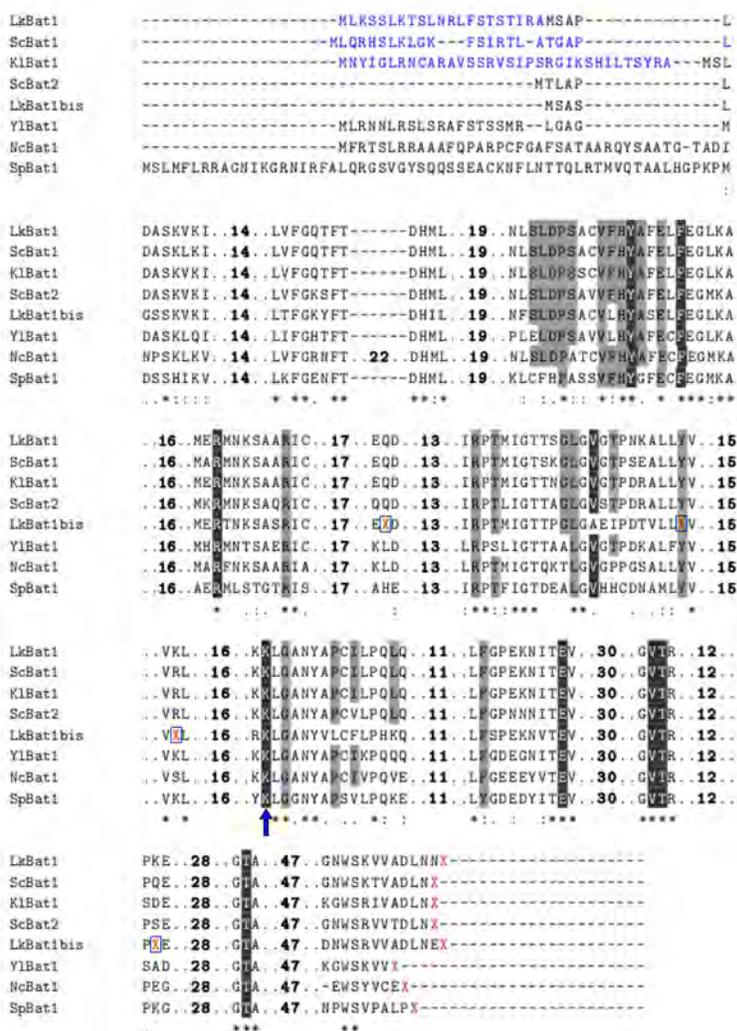
Encontramos que la cepa mutante *Lkbat1* y la doble mutante no crecieron en SD + NH<sub>4</sub> (**Figura 2A**), sin embargo, cuando los tres aminoácidos fueron añadidos al medio de cultivo SD + NH<sub>4</sub> + VIL, las dos cepas crecieron igual que la cepa tipo silvestre (**Figura 2B**). En estas condiciones de crecimiento las mutantes *Lkbat1bis* y *Lkbat1::LkBAT1* mostraron un fenotipo como el de la cepa tipo silvestre (**Figura 2A y 2B**). Las cepas *Lkbat1* y la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* no crecieron en los medios de cultivo SD + NH<sub>4</sub> + VL, SD + NH<sub>4</sub> + IL y SD + NH<sub>4</sub> + L, sólo crecieron cuando se utilizaron los aminoácidos valina e isoleucina como fuente adicional de nitrógeno en el medio SD + NH<sub>4</sub> + VI aunque la velocidad de crecimiento de estas cepas fue menor que la velocidad observada en la cepa tipo silvestre. Estas observaciones indican que en *L. kluyveri* existen otras formas de biosintetizar u obtener leucina y que las cepas que carecen del gen *LkBAT1* son auxótrofas para los aminoácidos valina e isoleucina pero son bradítrofas para leucina (**Figura 2C-F**).

Una vez más, aunque su crecimiento no fue nulo, las cepas *Lkbat1* y la doble mutante mostraron defectos en su crecimiento en (SD + VIL). En contraste, el crecimiento de la cepa mutante *Lkbat1bis* y la cepa complementada *Lkbat1pro::LkBAT1* fue similar a la de la tipo silvestre (**Figura 2G**). Observamos que la mutante de *L. kluyveri* que carece del gen *LkBAT1* también tiene deficiencias en el crecimiento en la condición donde se requiere asimilar a los aminoácidos de cadena ramificada como única fuente de nitrógeno.

Para ver si la proteína LkBat1 participa en el metabolismo de los aminoácidos BCAA como una transaminasa, evaluamos la actividad específica de transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada a partir de extractos celulares tanto de la cepa tipo silvestre como de la mutante sencilla *Lkbat1* de *L. kluyveri* que crecieron en las diferentes fuentes de nitrógeno anteriormente mencionadas.

En SD + NH<sub>4</sub> y SD + VIL, la actividad transaminasa de extractos celulares crudos de la mutante sencilla *Lkbat1* se abolió. En SD + NH<sub>4</sub> + VIL, la actividad transaminasa de la cepa *Lkbat1* fue significativamente menor ( $31.75 \pm 2.95$  nmol X

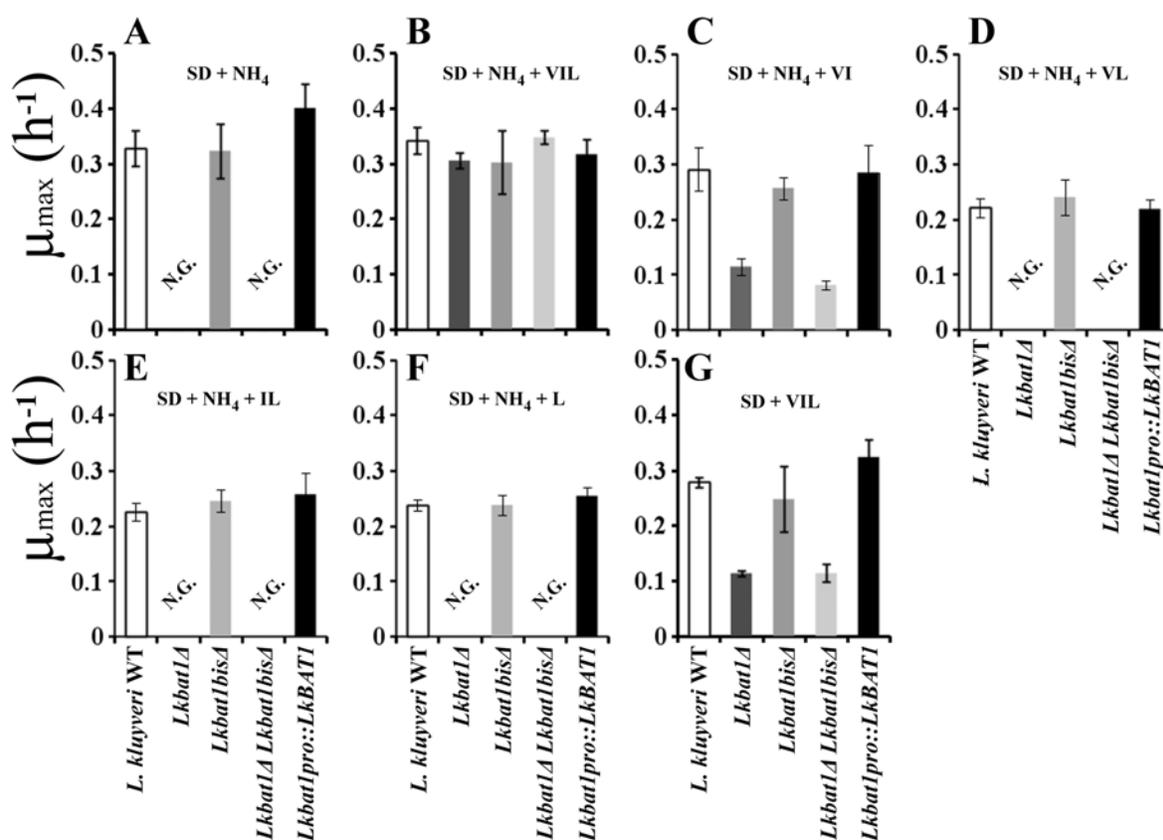
min<sup>-1</sup> X mg<sup>-1</sup>) comparada con la actividad observada en la cepa tipo silvestre (105.09 ± 18.27 nmol X min<sup>-1</sup> X mg<sup>-1</sup>).



**Figura 1. Alineamiento múltiple de secuencias de residuos de aminoácidos de las transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada de diferentes especies de levadura.** El alineamiento se realizó con el programa de “ClustalW” con secuencias de las transaminasas de: *L. kluyveri*, LkBat1 y LkBat1bis; *S. cerevisiae*, ScBat1 y ScBat2; *Kluyveromyces lactis*, KlBat1; *Yarrowia lipolytica*, YlBat1; *Neurospora crassa*, NcBat1; *Schizosaccharomyces pombe*, SpBat1. Los aminoácidos marcados en negro se encuentran en la bolsa catalítica. Los residuos marcados en gris están involucrados en la oligomerización de los monómeros. El residuo de lisina involucrado en la unión a PLP se marca con una flecha en azul. Los residuos de aminoácidos escritos en azul tienen un posible papel como péptido líder que dirige a las proteínas a la matriz mitocondrial. Las X

esmarcadas en azul son los codones prematuros que acumuló LkBat1bis. Los números que están entre las secuencias representan el número de residuos que fueron cortados en cada secuencia para optimizar el espacio. Esta figura fue tomada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.

Los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento y de la medición de actividad enzimática ofrecen pruebas convincentes de la importancia funcional del gen *LkBAT1* en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada, en *L. kluuyveri*. Además, estos datos sugieren que la enzima codificada por *LkBAT1* tiene actividad transaminasa.



**Figura 2.** El gen *LkBAT1* de *L. kluuyveri* está involucrado en el metabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina. Las cepas tipo silvestre; mutante sencillas *Lkbat1* y *Lkbat1bis*; la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis*; y la cepa *Lkbat1* sencilla complementada con el gen

*LkBAT1* se cultivaron en diferentes medios de cultivo (A) SD + NH<sub>4</sub>, (B) SD + NH<sub>4</sub> + VIL, (C) SD + NH<sub>4</sub> + VI, (D) SD + NH<sub>4</sub> + VL, (E) SD + NH<sub>4</sub> + IL, (F) SD + NH<sub>4</sub> + L y (G) VIL y se determinó la velocidad de crecimiento específica ( $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$ ) para cada caso. Esta figura fue tomada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.

### 3.1.3 La transcripción del gen *LkBAT1* se indujo tanto en condiciones biosintéticas como en condiciones catabólicas

Los resultados anteriores prueban la participación del producto de *LkBAT1* en el metabolismo de los aminoácidos BCAA por lo que a continuación, decidimos evaluar los perfiles transcripcionales en respuesta a diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono para entender cómo responde la función transcripcional de este gen a las diferentes condiciones de crecimiento evaluadas: SD + NH<sub>4</sub>, SD + VIL y SD + NH<sub>4</sub> + VIL, y también a la condición de crecimiento fermentativa (dextrosa) y respiratoria (etanol).

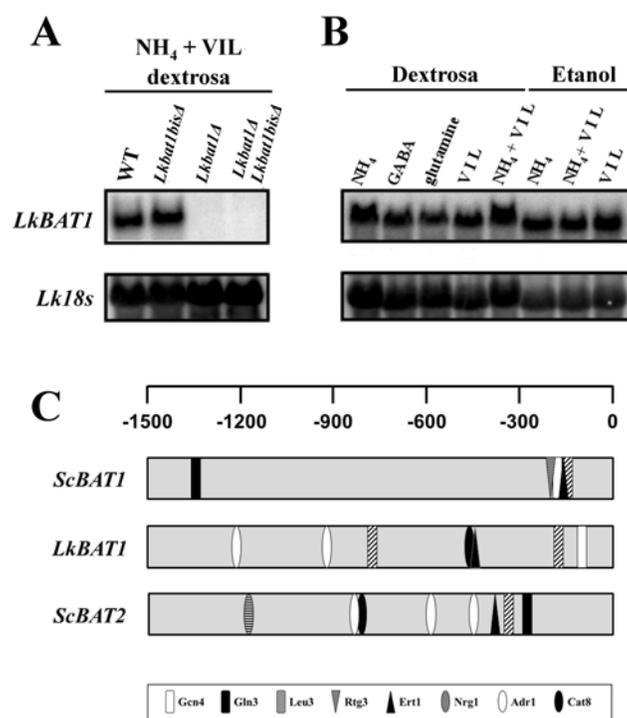
Para evaluar los niveles de transcrito se hizo un ensayo de Northern blot con sondas para los genes *LkBAT1*, *LkBAT1bis* y una subunidad del gen *Lk18s* ribosomal (control de carga) como se describe en la sección de materiales y métodos. La especificidad de la sonda *LkBAT1* se demuestra claramente a partir de la ausencia de señal en las muestras provenientes de cepas *L. kluyveri* que carecen del gen *LkBAT1* (**Figura 3A**).

Los transcritos del gen *LkBAT1bis* no se detectaron en estas condiciones de crecimiento (datos no mostrados). Para el caso del gen *LkBAT1*, los niveles de transcritos fueron similares en todas las condiciones de crecimiento probadas, también fueron similares en las condiciones donde se usaron fuentes de carbono fermentables (dextrosa) y no fermentables (etanol) (**Figura 3B**).

Con el objetivo de encontrar elementos reguladores entre esos genes que puedan explicar los perfiles transcripcionales observados, se llevó a cabo un análisis de la secuencia de los promotores de los genes *ScBAT1*, *ScBAT2* y *LkBAT1* (**Figura 3C**). El gen *ScBAT1* presenta en el promotor cajas reguladoras que son reconocidas por Gcn4 y Leu3 (factores transcripcionales que regulan genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos) (Hinnebusch y Fink, 1983;

Natarajan *et al.*, 2001), esto puede explicar el incremento de los niveles de la transcripción bajo la condición de crecimiento biosintética. Cat8 induce la transcripción de genes involucrados en la respiración (Young *et al.*, 2003; Hedges *et al.*, 1995), pero la caja reguladora encontrada en el promotor de *ScBAT1* se sobrelapa con la de Leu3, eso podría explicar por qué este gen se reprime en etanol. En contraste, *ScBAT2* presenta motivos conservados que reconocen Ert1, Adr1 y Cat8 los cuales regulan genes del metabolismo respiratorio (Turcotte *et al.*, 2010; Gasmi *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2003; Denis y Young, 1983). En el promotor del gen *ScBAT2*, también encontramos una caja reguladora que podría reconocer Nrg1, un factor transcripcional que media la represión por glucosa (Zhou and Winston, 2001); esto podría explicar por qué *ScBAT2* se induce en etanol y se reprime en glucosa.

El análisis del promotor del gen *LkBAT1* reveló que éste conserva elementos únicos de *ScBAT1* (Gcn4 y Leu3) y *ScBAT2* (Ert1 y Adr1); sin embargo, el motivo que reconoce Nrg1 no está presente en el promotor de *LkBAT1*. Esto podría dar un indicio de por qué *LkBAT1* se transcribe tanto en una fuente de carbono fermentable como una no fermentable.

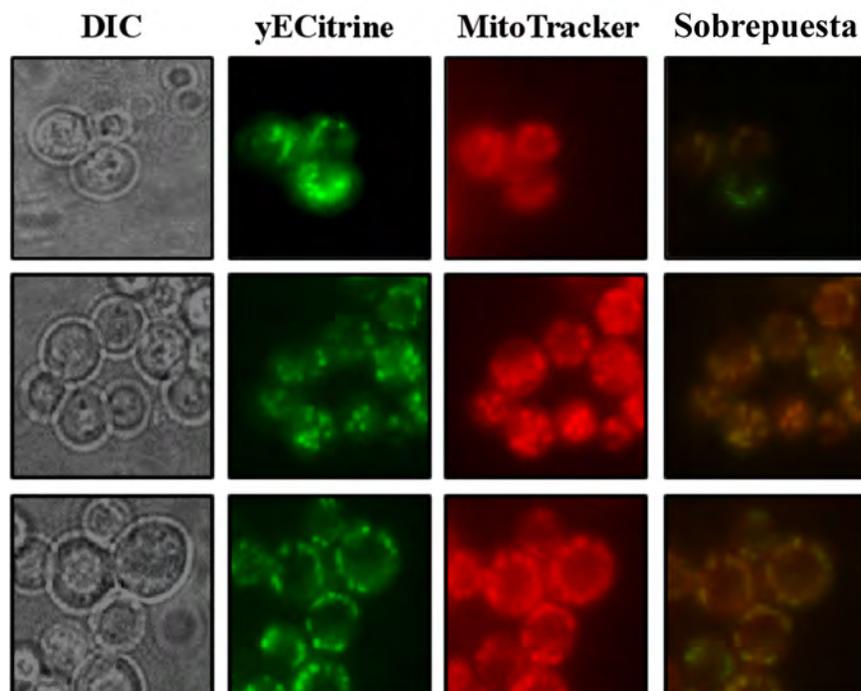


**Figura 3. Perfil transcripcional del gen *LkBAT1* en respuesta a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.** El RNA mensajero de *LkBAT1* se detectó con una sonda específica marcada radioactivamente a partir de RNA total de la cepa silvestre de *L. kluyveri* obtenida de las mutantes sencillas *Lkbat1*, *Lkbat1bis*, y la doble mutante. Los resultados del análisis de especificidad de la sonda *LkBAT1* y *Lk18S* se muestran en (A). En (B) se muestran los resultados del perfil transcripcional del gen *LkBAT1* en respuesta a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno obtenidos a partir de RNA total de la cepa tipo silvestre. En (C), Se muestra una representación esquemática de los elementos reguladores que se encontraron en el análisis de las regiones promotoras de los genes *LkBAT1*, *ScBAT1* y *ScBAT2* en los análisis *in silico*. La escala superior indica el total de nucleótidos analizados a partir del codon de inicio. En el recuadro se enlistan los elementos reguladores potencialmente relevantes. Esta figura fue modificada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>. Los experimentos de esta figura fueron hechos por James González, actual estudiante del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

### 3.1.4 La enzima codificada en *LkBAT1* se localiza en la mitocondria

En *S. cerevisiae* se ha propuesto que la localización de ScBat1 y ScBat2 contribuye a los diferentes papeles metabólicos en los que ambas enzimas están involucradas. Por ejemplo ScBat1 que se localiza en mitocondria, está principalmente involucrada en la biosíntesis de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina ya que la biosíntesis se lleva a cabo principalmente en mitocondria. En el caso de ScBat2 que se localiza en citosol, está involucrada en la asimilación de estos aminoácidos como una fuente de nitrógeno externa (Colón *et al.*, 2011).

Decidimos elucidar la localización de la proteína LkBat1 en *L. kluyveri* para entender si hay una relación entre la localización de esta enzima y el metabolismo de los aminoácidos BCAA. Para esto transformamos una levadura con una versión del gen *LkBAT1* que exprese una proteína quimérica LkBat1-yECitrine. Estas levaduras transformantes fueron teñidas con MitoTracker Red (colorante fluorescente específico para mitocondria) y observadas bajo el microscopio de fluorescencia como se describe en la sección de materiales y métodos. En este ensayo, observamos que la señal verde fluorescente de LkBat1-yECitrine se sobrelapó con la señal roja fluorescente del MitoTracker Red, lo cual sugiere que LkBat1 se encuentra principalmente a la mitocondria en *L. kluyveri* (**Figura 4**).



**Figura 4. La proteína quimérica LkBat1-yECitrine se localiza en la mitocondria en *L. kluyveri*.**

La cepa etiquetada LkBat1-yECitrine fue incubada en medio SD con amonio como única fuente de nitrógeno. Muestras de la fase exponencial del crecimiento se tiñeron con “MitoTracker Red” y la imagen se capturó con los filtros apropiados bajo el microscopio de fluorescencia. De izquierda a derecha se muestran imágenes de contraste de interferencia (DIC), fluorescencia de yECitrine, fluorescencia de “MitoTracker Red”, y la mezcla de imágenes de la fluorescencia de yECitrine y “MitoTracker Red”. En las imágenes mezcladas se observa que la fluorescencia de yECitrine co-localiza con la fluorescencia de “MitoTracker Red”. Se muestran tres campos de visualización independientes. Esta figura fue modificada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>. Los experimentos de esta figura fueron realizados por Mirelle Flores, actual estudiante del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### **3.1.5 El gen parálogo *LkBAT1bis* tiene características que sugieren que no es un pseudogen**

Se conoce muy poco sobre el mecanismo molecular que dió origen al gen parálogo *LkBAT1bis*. Lo que queda claro es que es una copia completa del gen *LkBAT1* que acumuló codones de paro y que dicha copia se insertó río arriba de un gen tRNA. Debido a esta observación sobre la localización de inserción, nosotros pensamos que el medio por el cual se copió este gen es por la retrotransposición de una retrocopia.

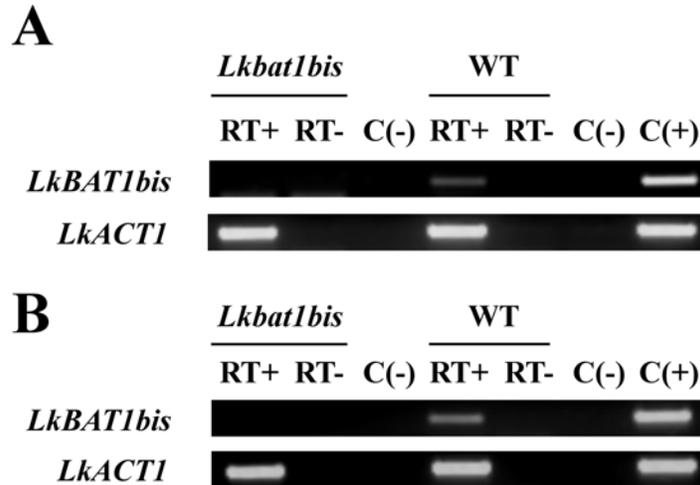
En *S. cerevisiae* se ha observado que los genes retrocopias generados por la actividad de los elementos Ty son integrados al genoma en regiones cercanas a genes tRNA o elementos genéticos que se transcriben por la RNA polimerasa III. Una característica adicional de estas retrocopias es la cola de poli-A remanente en el extremo 3' UTR. Además de esas características, se suelen encontrar secuencias LTR aledañas al sitio de inserción de la retrocopia.

Para determinar si *LkBAT1bis* es el producto de una retrotransposición, buscamos esas características en el gen. Primero buscamos una región rica en adeninas en la región 3' intergénica de *LkBAT1bis*; sin embargo no encontramos la cola de poli-A. Adicionalmente, buscamos secuencias LTR en regiones aledañas al

gen *LkBAT1bis* (20 kb río arriba y río abajo del gen) usando las bases de datos Gypsy (Llorens *et al.*, 2011), y la de nucleótidos no redundante ('nr') del NCBI; sin embargo no encontramos alguna secuencia LTR. Estos resultados en conjunto no apoyan la hipótesis de que la retrotransposición en el caso de *LkBAT1bis*, haya sido el mecanismo molecular que le dió origen.

Los pseudogenes tienen características muy notorias, entre estas se pueden citar: la acumulación de codones de paro, la pérdida de una región substancial de uno o varios dominios, y el coeficiente de sustituciones no sinónimas / sinónimas ( $Ka/Ks$ ), es cercano a 1, que indica una presión selectiva neutral. En algunas ocasiones el pseudogen pierde la capacidad de transcribirse (Khachane and Harrison, 2009).

Como las dos primeras características de pseudogen se observan claramente en *LkBAT1bis* decidimos calcular el coeficiente ( $Ka/Ks$ ) entre el ORF de *LkBAT1bis* y cada uno de los siguientes ORFs: *LkBAT1*, *ScBAT1* y *ScBAT2*. Para esto hicimos alineamientos pareados entre ORFs por codones y después calculamos los coeficientes ( $Ka/Ks$ ) en el paquete computacional estadístico R con la ayuda de la librería 'seqinr' (Charif and Lobry, 2007). En todas las comparaciones que hicimos el coeficiente cayó significativamente por debajo de 1 lo cual sugiere que *LkBAT1bis* ha estado bajo una presión selectiva purificadora. Otra propiedad de este gen, que apoya la idea de que no es un pseudogen, es que es transcripcionalmente activo en cultivos a saturación en medios SD + NH<sub>4</sub> y SD + VIL (**Figura 5**). Estos resultados sugieren que *LkBAT1bis* no es un pseudogen.



**Figura 5. Análisis de PCR punto final (RT-PCR) muestra que el gen *LkBAT1bis* sí se transcribe.** El RNA total extraído a partir de las cepas tipo silvestre y la mutante sencilla *Lkbat1* de *L. kluyveri* crecidas bajo las siguientes condiciones de crecimiento (**A**), (SD + NH<sub>4</sub>) y (**B**), (SD + VIL) fue usado para sintetizar cDNA. Se usaron muestras de cDNA de la cepa mutante *Lkbat1bis* como control negativo; cada muestra se dividió en dos submuestras, una se trató con transcriptasa reversa (RT+), y la otra no fue tratada (RT-). El DNA genómico de la cepa tipo silvestre de *L. kluyveri* se usó como un control positivo de la PCR (C+), y la mezcla de PCR sin DNA se usó como control negativo de la PCR (C-). El gen *LkACT1* es el control de la integridad del cDNA. Esta figura fue modificada de Montalvo-Arredondo et al., 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.

## 3.2 Ensayos de complementación funcional

### 3.2.1 El gen *LkBAT1* complementó funcionalmente a *ScBAT1* y *ScBAT2* en la biosíntesis de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina

Si *LkBAT1* codifica para una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y

es un gen ortólogo funcional de *ScBAT1* y *ScBAT2*, entonces el gen de *L. kluyveri* podrá complementar las mutantes sencillas *Scbat1* y *Scbat2* así como a la doble mutante de *S. cerevisiae*.

Para analizar la capacidad de *LkBAT1* de participar en el metabolismo de los aminoácidos BCAA en *S. cerevisiae*, expresamos el gen regulado bajo su propio promotor en contexto ectópico (*pRS416-LkBAT1*) en *S. cerevisiae* tanto en las mutantes sencillas *Scbat1* y *Scbat2* así como en la doble mutante. Evaluamos el crecimiento de la cepa silvestre y de las mutantes en diferentes condiciones de crecimiento: (SD + NH<sub>4</sub>), (SD + VIL) o (SD + NH<sub>4</sub> + VIL).

Al expresar el gen *LkBAT1* de esta manera en *S. cerevisiae* se rescató el fenotipo observado de la mutante sencilla *Scbat1* y de la doble mutante *Scbat1 Scbat2* en SD + NH<sub>4</sub> (**Figura 6A**); sin embargo no se rescató totalmente el fenotipo de la doble mutante y la mutante sencilla *Scbat2* en SD + VIL (**Figura 6B**). Estos resultados pueden ser atribuidos a una baja expresión de *LkBAT1* por un reconocimiento interespecie pobre del promotor de este gen. Otro posible escenario es que *ScBAT2* lleve a cabo una función celular que *LkBAT1* no puede llevar a cabo en *S. cerevisiae*. Por esta razón, decidimos expresar *LkBAT1* pero bajo la regulación fuerte y constitutiva del promotor del gen *ScPGK1* de *S. cerevisiae*.

Sobreexpresar constitutivamente *LkBAT1* no altera el crecimiento de la cepa tipo silvestre en las condiciones de crecimiento probadas (**Figura 6C y 6D**), y rescata el fenotipo de la mutante sencilla *Scbat1* y de la doble mutante en SD + NH<sub>4</sub> (**Figura 6C**). El fenotipo también se complementa en SD + VIL para la mutante sencilla *Scbat2* y la doble mutante (**Figura 6D**). En SD + NH<sub>4</sub> + VIL, todas las levaduras presentaron un crecimiento similar al observado en la cepa tipo silvestre (datos no mostrados). Estos resultados nos sugieren que sólo cuando *LkBAT1* es regulado por el promotor de *ScPGK1*, el cual ofrece una actividad transcripcional constitutiva y fuerte, puede complementar la mutante sencilla *Scbat2* y la doble mutante en SD + VIL. Sin embargo, la expresión artificial de este gen de *L. kluyveri* en *S. cerevisiae* probablemente no es fisiológicamente significativa. Por este motivo decidimos expresar el gen *LkBAT1* bajo la regulación

el promotor del gen *ScBAT1* (*Scbat1pro::LkBAT1 Scbat2*) o del gen *ScBAT2* (*Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1*) para averiguar si en condiciones fisiológicas *LkBAT1* puede substituir a *ScBAT1* en la biosíntesis o a *ScBAT2* en el catabolismo de los aminoácidos BCAA.

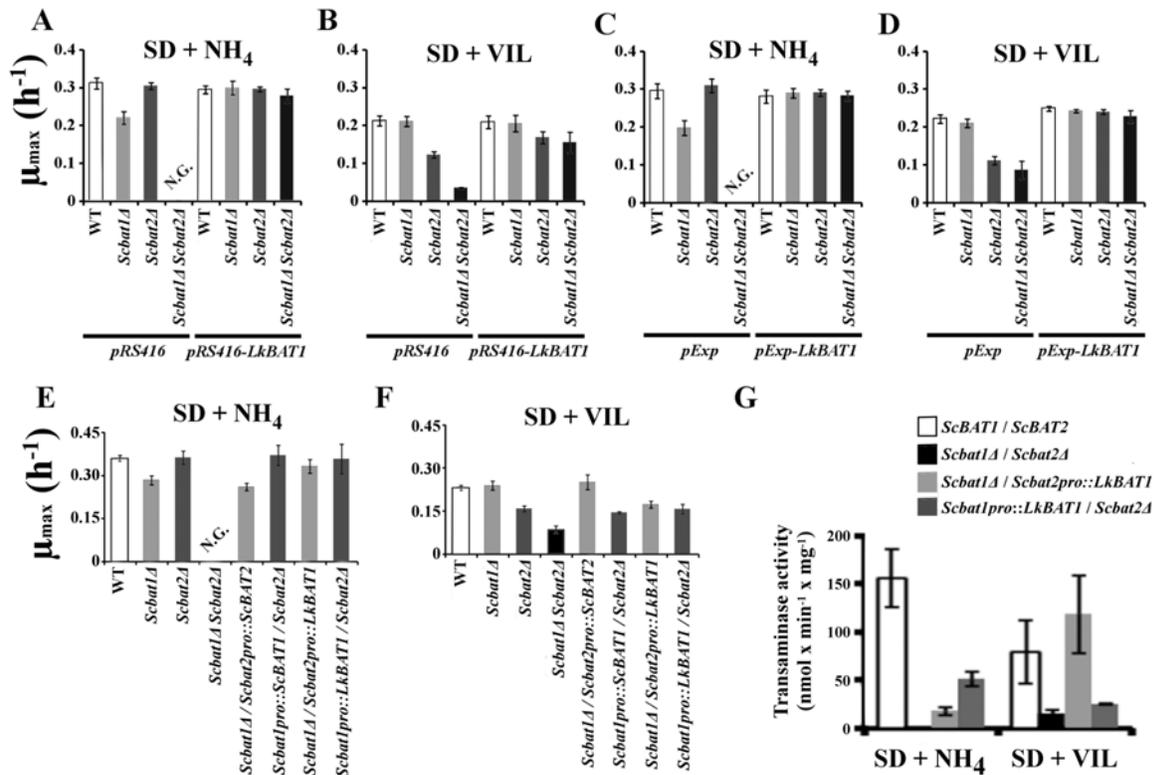
Como controles de cualquier artefacto potencial que provenga de las manipulaciones genéticas o por las mutaciones acumuladas en la cepa doble mutante de *S. cerevisiae*, se construyeron dos cepas en donde *ScBAT1* se posicionó bajo su propio promotor (*Scbat1pro::ScBAT1 Scbat2*), o en donde *ScBAT2*, de igual manera, se posicionó bajo la regulación de su propio promotor (*Scbat1 Scbat2pro::ScBAT2*). La cepa control *Scbat1 Scbat2::ScBAT2* mostró un fenotipo similar a la cepa mutante sencilla de *Scbat1* en todas las condiciones de crecimiento probadas. De manera equivalente la cepa control *Scbat1pro::ScBAT1 Scbat2* mostró un fenotipo muy similar a la cepa *Scbat2* en las condiciones de crecimiento probada (**Figura 6E y 6F**).

Previamente se ha reportado que *ScBAT1* se induce transcripcionalmente en la condición de crecimiento biosintética, y es reprimido en la condición de crecimiento catabólica. En contraste, el gen *ScBAT2* es reprimido en la condición biosintética e inducido en la condición catabólica. Nosotros decidimos evaluar la actividad específica de la transaminasa *LkBat1* en los extractos crudos de las cepas de *S. cerevisiae* transformantes que llevan el gen *LkBAT1* para estimar de manera indirecta la cantidad de enzima que se produce en las condiciones biosintética, catabólica y de reabastecimiento con el objetivo de conocer si este gen (*LkBAT1*) se está regulando como se estarían regulando *ScBAT1* o *ScBAT2* en *S. cerevisiae*.

Los datos obtenidos del ensayo enzimático sugieren que el gen *LkBAT1* es regulado de manera similar como si fuera *ScBAT1* o *ScBAT2*, cada uno en su respectivo promotor, porque en la condición de crecimiento biosintética se observa que la actividad enzimática de la cepa que lleva el gen *LkBAT1* regulado bajo el promotor de *ScBAT1* (*Scbat1pro::LkBAT1 Scbat2*) es mayor que la actividad del extracto crudo de la cepa que lleva *LkBAT1* regulado bajo el promotor de *ScBAT2* (*Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1*) (**Figura 6G (SD + NH<sub>4</sub>)**). En la condición de

crecimiento catabólica se observó que la actividad medida en la cepa que lleva *LkBAT1* bajo el promotor de *ScBAT1* es menor que la actividad observada en la cepa que lleva el gen de *L. kluyveri* bajo el promotor de *ScBAT2* (**Figura 6G (SD + VIL)**). Por último, en la condición de reabastecimiento, la actividad observada en las cepas mutantes fue menor que la observada en la cepa tipo silvestre (**Figura 6G (SD + NH4 + VIL)**).

Como observamos que la regulación de la expresión de *LkBAT1* correlacionó con la regulación transcripcional de *ScBAT1* y *ScBAT2* en *S. cerevisiae*, decidimos evaluar el crecimiento de las levaduras de *S. cerevisiae* que llevan el gen *LkBAT1* bajo la regulación del promotor de *ScBAT1* o *ScBAT2* en condición biosintética (**Figura 6E**) o catabólica (**Figura 6F**). En la primera condición de crecimiento, *LkBAT1* regulado bajo el promotor de *ScBAT1* o *ScBAT2* complementó la doble mutante de *S. cerevisiae Scbat1 Scbat2*, aunque la actividad transaminasa de estas cepas fuera menor que la observada en la cepa tipo silvestre (**Figura 6E y 6G (SD + NH4)**). Estos datos sugieren que para llevar a cabo la transaminación en la dirección biosintética, sólo es necesaria poca actividad transaminasa. En la condición de crecimiento catabólica, *LkBAT1* no complementó a la doble mutante de *S. cerevisiae* incluso cuando este gen era regulado bajo el promotor de *ScBAT2* (**Figura 6F y 6G (SD + VIL)**).



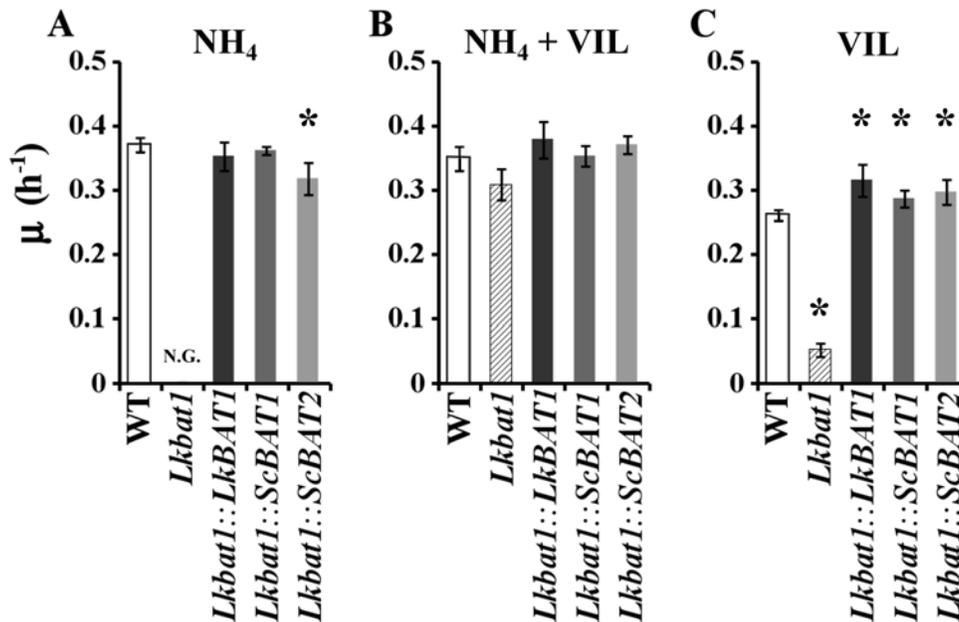
**Figura 6. *LkBAT1* substituye funcionalmente a *ScBAt1* en *S. cerevisiae*.** La tasa de crecimiento específica fue medida en cepas mutantes de *S. cerevisiae* que no llevan el gen *ScBAt1*, *ScBAt2* o ambos genes, con o sin el gen *LkBAT1*. El efecto del gen *LkBAT1* expresado en el vector *pRS416-LkBAT1* sobre la tasa de crecimiento en el medio SD con (A) NH<sub>4</sub> y (B) VIL es mostrado. Las cepas que llevan el vector *pRS416* vacío fueron usadas como controles. El efecto del gen *LkBAT1* expresado en el vector *pExp-LkBAT1* fue también medido en el medio de cultivo SD con (C) NH<sub>4</sub> y (D) VIL. El efecto de introducir el gen *LkBAT1* bajo la regulación del promotor del gen *ScBAt1* o *ScBAt2* en la cepa doble mutante de *S. cerevisiae* *Scbat1 Scbat2* es mostrado en: (E) SD + NH<sub>4</sub>, (F) SD + VIL. Como control, se construyeron cepas de *S. cerevisiae* en donde se introdujo el ORF *ScBAt1* o el ORF de *ScBAt2* en su propio locus a partir de la cepa doble mutante. Estas cepas control también se monitorearon en ambas condiciones de cultivo. En (G) las actividades específicas de transaminasa de extractos crudos celulares derivados a partir un conjunto de cepas de *S. cerevisiae*: la cepa tipo silvestre, la doble mutante *Scbat1 Scbat2*, la cepa *Scbat1 Scbat2* que lleva el gen *LkBAT1* en el locus *Scbat2* (*Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1*), y la cepa *Scbat1 Scbat2* que lleva el gen *LkBAT1* en el locus *Scbat1* (*Scbat1pro::LkBAT1 Scbat2*) fueron medidos después de crecer en medio SD con NH<sub>4</sub> o VIL. N.G., no se observó crecimiento. Esta figura fue tomada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.

Parte de los resultados mostrados en esta figura (actividad enzimática) fueron donados por Maritrini Colón, ex-estudiante del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### **3.2.2 ScBAT1 y ScBAT2 complementaron a la mutante *Lkbat1* de *L. kluyveri***

Para obtener más evidencias de que *LkBAT1* codifica una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada realizamos ensayos de complementación recíproca en donde se expresó *ScBAT1* (*Lkbat1pro::ScBAT1*) o *ScBAT2* (*Lkbat1pro::ScBAT2*) en *L. kluyveri* bajo la regulación del promotor del gen *LkBAT1*. Como control, construimos una cepa que expresa el mismo gen endógeno *LkBAT1* (*Lkbat1pro::LkBAT1*) bajo la regulación de su propio promotor.

Anteriormente mostramos que la cepa mutante sencilla *Lkbat1* de *L. kluyveri* es auxótrofa para los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, y cuando en esta cepa se expresa *ScBAT1* bajo el promotor del gen *LkBAT1* (*Lkbat1pro::ScBAT1*) observamos que recupera el fenotipo de la cepa tipo silvestre tanto en la condición de crecimiento biosintética como en la catabólica (**Figura 7A y 7C**). Sin embargo cuando la cepa mutante *Lkbat1* expresa *ScBAT2* bajo el promotor del gen de *L. kluyveri* recupera el fenotipo protótrofo para los aminoácidos BCAA. La disminución de la velocidad de crecimiento, comparada con la velocidad en la cepa tipo silvestre, es estadísticamente significativa. En la condición catabólica, *ScBAT2* regulado por el promotor de *LkBAT1*, puede complementar a la mutante *Lkbat1* de *L. kluyveri* (**Figura 7A y 7C**). En la condición de reabastecimiento, todas las cepas analizadas en este experimento mostraron velocidades de crecimiento muy similares entre sí (**Figura 7B**).



**Figura 7. El gen *ScBAT1* substituyó completamente al gen *LkBAT1* en *L. kluuyveri* en SD + NH<sub>4</sub> y SD + VIL.** Las tasas de crecimiento específica en diferentes medios de cultivos (A) SD + NH<sub>4</sub>, (B) SD + NH<sub>4</sub> + VIL (C) y SD + VIL fueron determinadas para las siguientes cepas de *L. kluuyveri*: tipo silvestre, mutante sencilla *Lkbat1*, y las cepas complementadas de *Lkbat1* por: *LkBAT1* (*Lkbat1pro::LKBAT1*), *ScBAT1* (*Lkbat1pro::ScBAT1*) y *ScBAT2* (*Lkbat1pro::ScBAT2*). La significancia estadística fue determinada por el test de Student (\*P<0.05, n= 4). N.G., no se observó crecimiento. Esta figura fue tomada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.

### 3.3 Liga entre el metabolismo de valina, isoleucina y leucina con la asimilación de una fuente de carbono no fermentable

#### 3.3.1 La cepa doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* de *L. kluuyveri* creció ineficientemente en una fuente de carbono no fermentable.

La levadura doble mutante *Scbat1 Scbat2* de *S. cerevisiae* es auxótrofa para los aminoácidos valina, isoleucina y leucina. En un medio con dextrosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, esta cepa no puede crecer hasta que los aminoácidos de cadena ramificada están presentes en el medio (Colón *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la cepa doble mutante no puede crecer en un medio que contiene etanol como única fuente de carbono aunque se agregue al medio de cultivo el sulfato de amonio y los aminoácidos antes mencionados como fuentes de nitrógeno, sugiriendo que la asimilación o degradación de ellos es necesaria para crecer en una fuente de carbono no fermentable (Colón *et al.*, 2011).

Nosotros decidimos evaluar el crecimiento del conjunto de levaduras mutantes (*Lkbat1*, *Lkbat1bis* y la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis*) de *L. kluyveri* en medios de cultivo con dextrosa o etanol como fuente de carbono y con diferentes fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4$ ,  $\text{NH}_4$  + VIL, VIL, Glutamina y GABA) y lo comparamos con el crecimiento de la cepa tipo silvestre con el objetivo de observar si la degradación de estos aminoácidos es necesario para crecer en una fuente de carbono no fermentable.

Con esta idea en mente, hipotetizamos que la mutante sencilla *Lkbat1* sería incapaz de crecer en un medio con etanol como única fuente de carbono aunque los aminoácidos y el sulfato de amonio estuvieran presentes en el medio, porque según los resultados de la caracterización de estas mutantes, sólo el gen *LkBAT1* está involucrado en el metabolismo de estos aminoácidos y no *LkBAT1bis*.

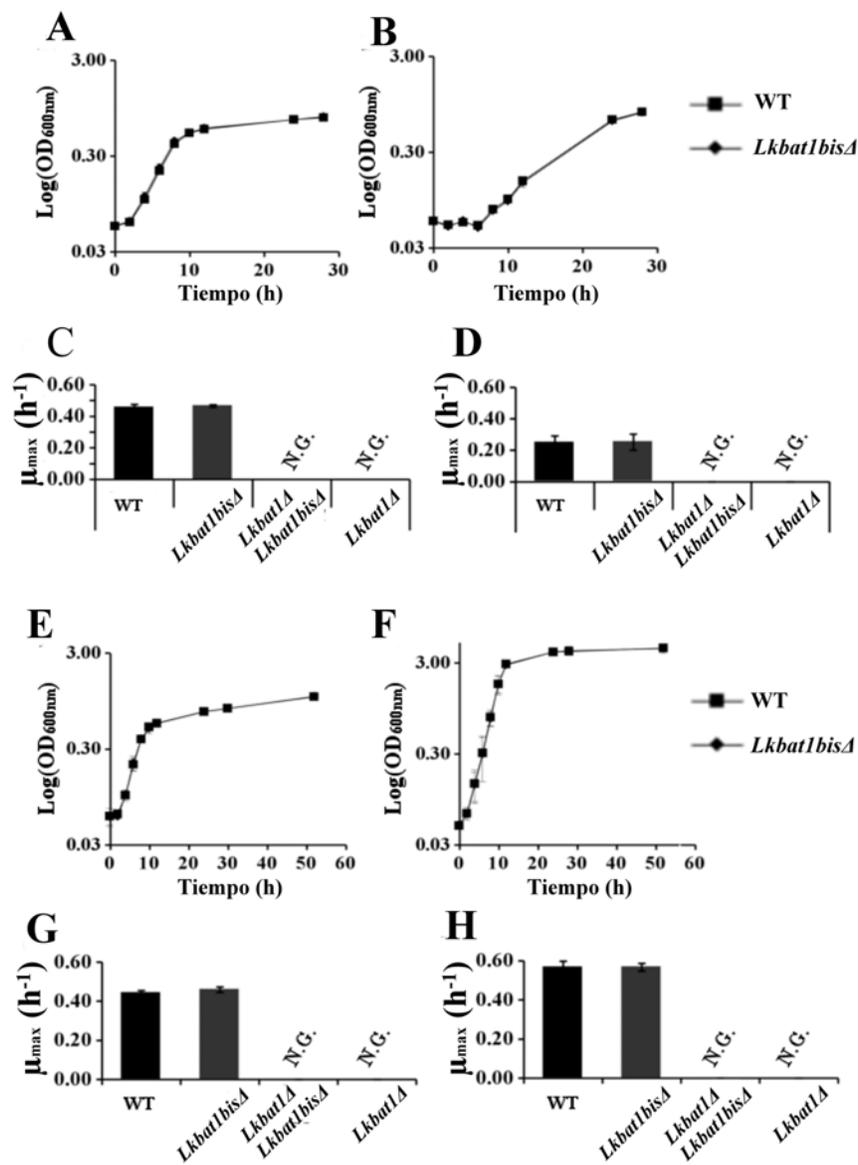
Los resultados de la evaluación del crecimiento de estas mutantes de *L. kluyveri* en dextrosa y etanol con  $\text{NH}_4$ , glutamina o GABA como fuente de nitrógeno, son consistentes con los datos que hemos obtenido, porque sólo las cepas de *L. kluyveri* que carecen del gen *LkBAT1* (*Lkbat1* y la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis*) son auxótrofas para los aminoácidos VIL. La cepa mutante sencilla *Lkbat1bis* mostró el mismo fenotipo de crecimiento que la cepa tipo silvestre en todos los medios de cultivo evaluados (**Figura 8**).

Cuando el amonio y los aminoácidos VIL estuvieron presentes en el medio, la tasa de crecimiento de la cepa doble mutante disminuyó comparada con la tasa

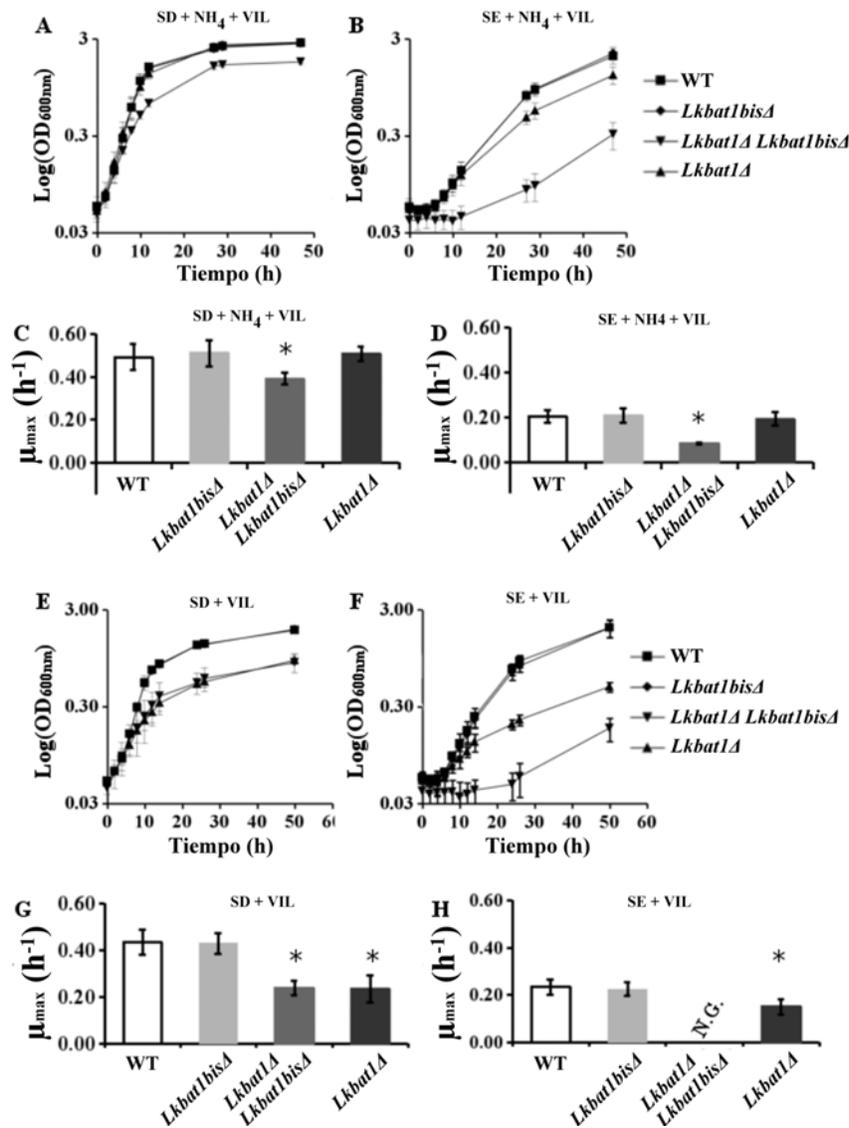
de crecimiento de todas las demás cepas cultivadas en medio con dextrosa (**Figura 9A y 9C**) o etanol (**Figura 9B y 9D**). Además de esto, la cepa doble mutante mostró un fenotipo adicional cuando creció en un medio que contenía etanol como única fuente de carbono: una fase de crecimiento “lag” muy extendida comparada con la extensión de tiempo de la misma fase de crecimiento y cepa pero cuando ésta creció en un medio que contenía dextrosa (**Figura 9B y 9F**).

Cuando se usaron los aminoácidos VIL como fuente de nitrógeno, la mutante sencilla y la doble mutante mostraron una velocidad de crecimiento disminuido comparado con la velocidad de crecimiento de la cepa tipo silvestre cultivadas en un medio que contiene dextrosa (**Figura 9G**). Cuando el etanol fue usado como única fuente de carbono, la cepa sencilla *Lkbat1* creció muy lentamente en comparación con la cepa parental y la doble mutante prácticamente no creció (**Figura 9H**).

Estos resultados sugieren que *LkBAT1* y *LkBAT1bis* tienen papeles funcionales complementarios en la asimilación de etanol como fuente de carbono no fermentable.



**Figura 8. Tasa de crecimiento específica de la cepa tipo silvestre de *L. kluyveri* y la mutante sencilla *Lkbat1bis* en amonio, glutamina y GABA.** La cepa tipo silvestre de *L. kluyveri*, las mutantes sencillas *Lkbat1* y *Lkbat1bis* así como la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* se crecieron en medio SD (dextrose) más  $\text{NH}_4$  (A y C), glutamina (E y G) o GABA (F y H); o en SE (ethanol) más  $\text{NH}_4$  (B y D). Las curvas de crecimiento (A, B, E y F) y las tasas de crecimiento específica (C, D, G y H) son mostradas. N.G., no se observó crecimiento. Esta figura fue modificada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>.



**Figura 9. La cepa doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* muestra una fase de crecimiento “lag” extendida bajo una condición de crecimiento respiratorio.** La tasa de crecimiento de cada una de las cepas de *L. kluyveri* fue medida bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Las curvas de crecimiento de los cultivos mantenidas en NH<sub>4</sub> + VIL con (A) dextrosa o (B) etanol son mostradas con sus gráficas correspondientes C y D, que expresan las tasas de crecimiento. Las curvas de crecimiento para los cultivos hechos en VIL con (E) dextrosa o (F) etanol se muestran con sus gráficas correspondientes G y H que expresan las tasas de crecimiento. La significancia estadística fue determinada por el test de la “t de Student” (\*P<0.05, n= 4). N.G., no se observó crecimiento. Esta figura fue modificada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015

### **3.4 Contribución de la expresión y localización de las transaminasas ScBat1 y ScBat2 de *Saccharomyces cerevisiae* en la asimilación de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina**

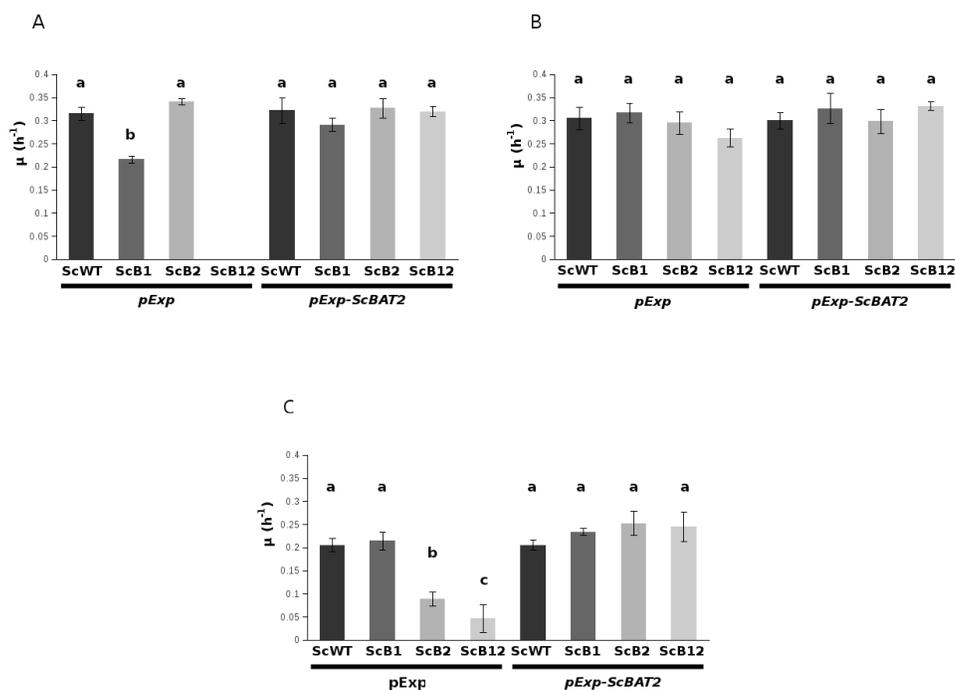
#### **3.4.1 Sobreexpresar constitutivamente a ScBat2 complementó a la mutante *Scbat1* de *S. cerevisiae* en la condición de crecimiento biosintética.**

Se ha reportado que la localización celular de las transaminasas parálogas ScBat1 y ScBat2 contribuyen en los diferentes papeles metabólicos que tienen respecto al metabolismo de los aminoácidos BCAA (Cólón *et al.*, 2011). Dicho de otra forma, como ScBat1 que está involucrada principalmente en la biosíntesis, es mitocondrial, y la biosíntesis de estos aminoácidos se lleva a cabo principalmente en la mitocondria, entonces se piensa que esta localización favorece a ScBat1 en sus funciones. Para el caso de ScBat2 que se localiza principalmente en citosol, la localización favorece a esta transaminasa en el catabolismo debido a que cuando se usan los aminoácidos BCAA como fuente de nitrógeno, el citoplasma va a recibir estos aminoácidos que provienen del medio de cultivo.

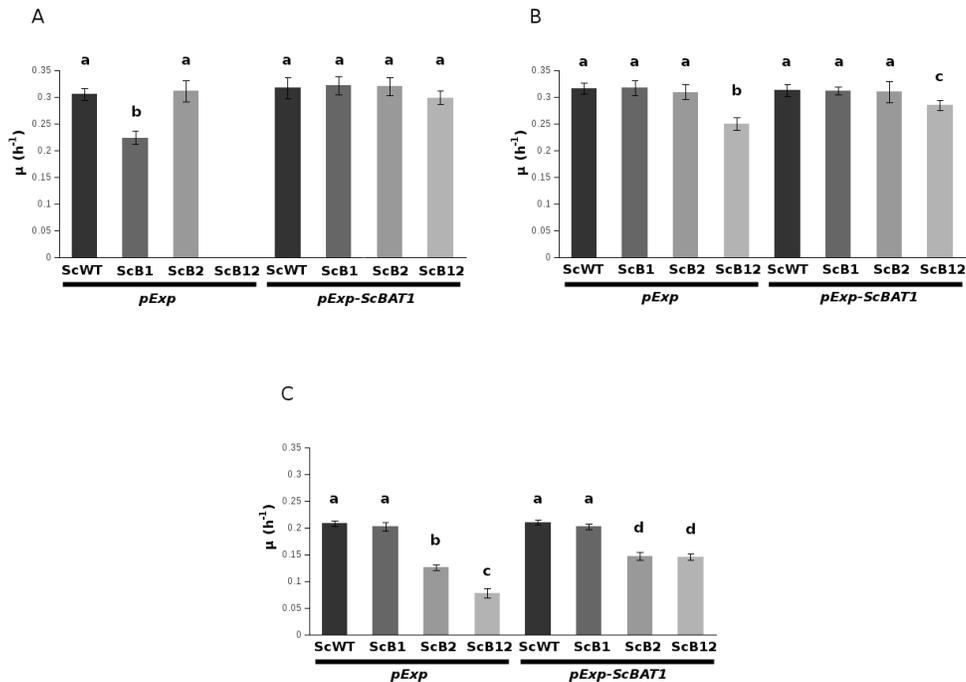
También se ha observado que la regulación transcripcional de estos genes contribuye en los papeles metabólicos de estas transaminasas debido a que *ScBAT1* se induce en condiciones de crecimiento biosintética y se reprime en condiciones de crecimiento catabólica. Con *ScBAT2* sucede lo contrario, en la condición biosintética (SD + NH<sub>4</sub>) se reprime y en la condición catabólica (SD + VIL) se induce.

Para analizar esta hipótesis, expresamos de manera constitutiva a *ScBAT1* y *ScBAT2* bajo el promotor del gen *ScPGK1* y evaluamos la complementación

funcional de cada gen en las mutantes sencillas *Scbat1* y *Scbat2*, así como en la doble mutante de *S. cerevisiae*. De esta forma ambos genes estarán expresados de manera constitutiva en las diferentes fuentes de nitrógeno.



**Figura 10. Ensayos de complementación en *S. cerevisiae* con el vector *pExp-ScBAT2*.** En las graficas se muestran las velocidades de crecimiento específicas de un conjunto de levaduras de *S. cerevisiae* (WT, ScWT; *Scbat1*, ScB1; *Scbat2*, ScB2 y la doble mutante *Scbat1 Scbat2*, ScB12), que fueron transformadas con el vector de expresión (vector que lleva el promotor constitutivo del gen *PGK1* de *S. cerevisiae*), tanto con el vacío como con el que lleva el ORF del gen *ScBAT2* de *S. cerevisiae*. El conjunto de levaduras que fueron transformadas con el vector vacío fueron usadas como controles en las cinéticas de crecimiento. Las velocidades de crecimiento específicas fueron medidas en la fase exponencial de la cinética de crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno que representan diferentes condiciones de crecimiento: (A) SD + NH<sub>4</sub>, (B) SD + NH<sub>4</sub> + VIL y (C) SD + VIL.



**Figura 11.- Ensayos de complementación en *S. cerevisiae* sobreexpresando el gen *ScBAT1*.** El conjunto de levaduras mutantes en los genes *BAT*, así como la cepa tipo silvestre (WT, ScWT; *Scbat1*, ScB1; *Scbat2*, ScB2 y la doble mutante *Scbat1 Scbat2*, ScB12), fueron transformadas con el vector *pExp* tanto con el vacío como con el que lleva el gen *ScBAT1* de *S. cerevisiae*. El primer set de levaduras transformadas con el vector *pExp* vacío fueron usadas como controles. Las velocidades de crecimiento específicas fueron evaluadas en diferentes condiciones de crecimiento: **(A)** SD + NH<sub>4</sub>, **(B)** SD + NH<sub>4</sub> + VIL, y **(C)** SD + VIL.

*ScBAT2* sobreexpresado pudo complementar a la mutante sencilla *Scbat1* y la doble mutante de *S. cerevisiae* en la condición de crecimiento biosintética **(Figura 10A)**. Este gen también pudo complementar a la mutante sencilla *Scbat2* y la doble mutante en la condición de crecimiento catabólica **(Figura 10C)**. Sin embargo, en el caso de *ScBAT1*, la sobreexpresión de este gen sólo pudo complementar a la mutante *Scbat1* y a la doble mutante de *S. cerevisiae* en la condición de crecimiento biosintética **(Figura 11A)**. En la condición catabólica no pudo complementar totalmente a la mutante sencilla *Scbat2* y a la doble mutante

(Figura 11C). Y en la condición de reabastecimiento, todas las cepas crecieron a una tasa muy similar entre ellas (Figura 10B y 11B).

### 3.4.3 La proteína ScBat1 expresada constitutivamente y relocalizada a citoplasma, complementó a la mutante Scbat2 de *S. cerevisiae* en la asimilación de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina

Nosotros hipotetizamos que *ScBAT1* no pudo llevar a cabo el catabolismo de los aminoácidos BCAA, aunque se sobreexpresara, porque estaba localizada en la matriz mitocondrial. Al estar recluida ahí, el transporte de los aminoácidos BCAA desde el medio de cultivo hasta el interior de la mitocondria pudo afectar la eficiencia del catabolismo de éstos para satisfacer la necesidad de fuente de nitrógeno a la célula.

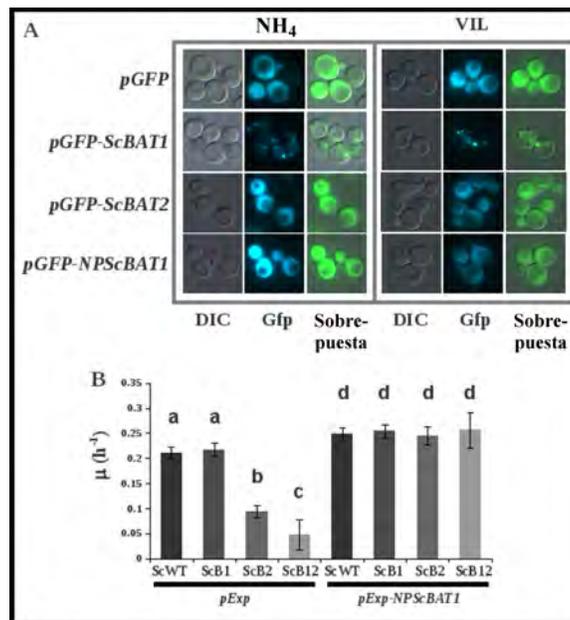
Para analizar esta hipótesis, modificamos el ORF del gen *ScBAT1* eliminando del mismo la región que codifica el péptido señal (*NPScBAT1*) y expresándolo bajo el promotor *ScPGK1*. Para saber si al quitarle el péptido señal a la enzima LkBat1 ésta se dirigirá a citoplasma, decidimos construir una cepa de *L. kluyveri* que expresara de manera ectópica la enzima quimérica NPScBat1-Gfp (*pExp-LkBAT1-GFP*; proteína ScBat1 sin el péptido líder que la dirige a mitocondria fusionada a Gfp) para ver la localización celular. Como controles se contruyeron cepas de *L. kluyveri* que expresaran proteínas quiméricas de ScBat1-Gfp, ScBat2-Gfp y Gfp sola.

En la **Figura 12A** se puede observar que el citoplasma de las levaduras que llevan el vector vacío que expresa la proteína Gfp sola, se tiñe de verde fluorescente. Como era de esperarse, la proteína quimérica ScBat1-Gfp es localizada en mitocondria y la proteína ScBat2-Gfp se observa principalmente en citosol (**Figura 12A**). En el caso de la proteína NPScBat1-Gfp, ésta se observa principalmente en citoplasma como en el caso de la proteína ScBat2-Gfp.

Estos datos sugieren que la proteína NPScBat1 ya no se puede translocar a la matriz mitocondrial, por lo que decidimos realizar experimentos de complementación funcional expresando constitutivamente esta proteína sin el

péptido señal que la dirige a mitocondria en las mutantes sencillas *Scbat1* y *Scbat2* así como la cepa doble mutante de *S. cerevisiae*, con el objetivo de evaluar si de esta manera ScBat1 puede substituir a ScBat2 en el catabolismo de los aminoácidos BCAA.

En la **Figura 12B** se puede observar que sobreexpresar *NPScBAT1* puede complementar a la mutante sencilla *Scbat2* y la doble mutante de *S. cerevisiae* en la condición de crecimiento catabólica



**Figura 12.- Micrografías de levaduras transformadas con vectores que expresan proteínas quiméricas fusionadas a la proteína verde fluorescente (Gfp).** En (A), La levadura *S. cerevisiae* tipo silvestre fue transformada con vectores que expresan las proteínas fusionadas a Gfp: *pGFP* (vector vacío: sólo expresa la proteína Gfp), *pGFP-ScBAT1* (vector que expresa la proteína quimérica ScBat1-Gfp), *pGFP-ScBAT2* (ScBat2-Gfp), *pGFP-NPScBAT1* (vector que expresa la proteína quimérica ScBat1 sin el péptido señal fusionada a Gfp) . Las levaduras fueron teñidas con “Mitotracker®” y las micrografías fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia. Los experimentos fueron hechos en medios mínimos con amonio ó VIL como única fuente de nitrógeno. En (B) se muestran las velocidades de crecimiento específica de levaduras que llevan el vector de expresión vacío (pExp), ó el vector *pExp-NPScBAT1*. El experimento fue hecho en medio de cultivo con VIL como única fuente de nitrógeno.

## **4. Discusión y conclusión**

### **4.1 El gen *LkBAT1* de *L. kluyveri* codifica una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada**

Las transaminasas de  $\alpha$ -aminoácidos forman una familia grande de proteínas y se encuentran conservadas en muchos organismos vivos de los tres grandes dominios de la vida. Estas enzimas catalizan la transferencia reversible de un grupo amino de una molécula donadora (principalmente glutamato o glutamina) a otra aceptora que generalmente es un  $\alpha$ -cetoácido precursor del aminoácido (Mehta *et al.*, 1993).

Una de las características de estas enzimas es que utilizan el piridoxal 5-fosfato (PLP) como cofactor para llevar a cabo la transferencia del grupo amino. Los miembros de esta familia se han clasificado en 4 subfamilias y la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (valina, isoleucina y leucina) pertenece a una de estas subfamilias (Mehta *et al.*, 1993).

Esta transaminasa está involucrada en la biosíntesis y degradación de los aminoácidos L-valina, L-isoleucina y L-leucina. El dominio característico así como los residuos involucrados en la catálisis y la oligomerización están muy bien conservados (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 2006). La proteína hipotética que está codificada en el gen *LkBAT1* de *Lachancea kluyveri* conserva el dominio de transaminasa, además de la lisina en donde se une el cofactor PLP y los residuos de aminoácidos involucrados en la catálisis y la oligomerización (**Figura 1**).

El análisis *in silico* de la secuencia hipotética de la proteína codificada en *LkBAT1* sugiere que ésta es una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada de valina, isoleucina y leucina. De manera consistente con esta

hipótesis hay una actividad específica de transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada en extractos crudos de la cepa silvestre de *L. kluyveri* y una ausencia de actividad en la cepa que carece del gen *LkBAT1* en cultivos mínimos con dextrosa como única fuente de carbono, y  $\text{NH}_4$  o VIL como única fuente de nitrógeno. También la actividad enzimática de los extractos crudos de la cepa *Lkbat1* que no tiene el gen muestra una actividad específica menor comparada con la actividad observada en los extractos crudos de la cepa tipo silvestre cuando fueron cultivadas en un medio con ambas fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4 + \text{VIL}$ ).

Adicionalmente, los resultados de los experimentos de la caracterización de las mutantes de *L. kluyveri* (mutantes sencillas *Lkbat1* y *Lkbat1bis*, la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* y la cepa complementada *Lkbat1pro::LkBAT1*) apoyan positivamente la hipótesis de que el gen *LkBAT1* codifica para una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada porque todas las cepas que carecen del gen *LkBAT1* (*Lkbat1* y la doble mutante) muestran un fenotipo de auxotrofia para los aminoácidos valina, isoleucina, y de braditrofia para leucina, y sólo crecen bien cuando estos aminoácidos están presentes en el medio de cultivo como una fuente de nitrógeno adicional al sulfato de amonio. También estas mutantes no pueden crecer eficientemente en un medio de cultivo donde se usan estos aminoácidos como única fuente de nitrógeno: una condición en donde se tienen que degradar para ser asimilados (**Figura 2A-G**).

En la **Figura 2C** se puede observar que las cepas mutantes que carecen del gen *LkBAT1* pueden crecer, aunque no muy bien, en un medio que sólo tiene valina e isoleucina como fuente de nitrógeno adicional al amonio. Esta observación sugiere que *L. kluyveri* puede producir la leucina por alguna ruta no canónica. También es posible que alguna otra transaminasa esté llevando a cabo la transaminación del  $\alpha$ -cetoisocaproato. Hay que destacar que la biosíntesis de leucina por este medio no es eficiente para satisfacer completamente las necesidades fisiológicas de la célula.

En la **Figura 2A-G** se puede observar que el fenotipo observado en las mutantes que carecen el gen *LkBAT1* es debido a la falta del gen y no por la manipulación genética de la cepa o a mutaciones que se hayan acumulado

cuando se generó la mutante sencilla *Lkbat1*, ya que la cepa complementada (*Lkbat1pro::LkBAT1*) crece eficientemente como lo hace la cepa tipo silvestre en SD + NH<sub>4</sub> y SD + VIL.

Como evidencias adicionales que apuntan a que *LkBAT1* codifica una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada son el hecho que este gen rescató las deficiencias de crecimiento de la cepa *Scbat1* y la doble mutante *Scbat1 Scbat2* en SD + NH<sub>4</sub> y SD + VIL (**Figura 6A - 6D**). Por otro lado, el gen *ScBAT1* revirtió el fenotipo de auxotrofia para los aminoácidos VIL de la cepas *Lkbat1* y la doble mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* de *L. kluyveri* (**Figura 7A y 7C**). Estos resultados sugieren que *LkBAT1* y *ScBAT1* son genes parálogos funcionales.

*S. cerevisiae* tiene dos genes parálogos que codifican para dos transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada *ScBAT1* y *ScBAT2*. Estos parálogos parecen haber divergido después del evento de la duplicación completa del genoma (WGD). Por ejemplo *Kluyveromyces lactis* que pertenece a un linaje derivado de un ancestro que no duplicó su genoma, tiene una sola copia del gen *KIBAT1*. La bifuncionalidad de la enzima que codifica *KIBAT1* que es necesaria para la biosíntesis y degradación parece haberse separado entre las isoenzimas de *S. cerevisiae*. *ScBat1* está principalmente involucrada en la biosíntesis de valina, isoleucina y leucina, y *ScBat2* está principalmente involucrada en mediar la asimilación de estos aminoácidos (Colón *et al.*, 2011).

De manera similar, el gen *LkBAT1* de *L. kluyveri* también participa en la biosíntesis y degradación de estos aminoácidos. Además, el gen *LkBAT1* expresado en contexto episomal no pudo substituir funcionalmente a *ScBAT2* en *S. cerevisiae* en el catabolismo de los aminoácidos VIL hasta que se sobrepresó constitutivamente mediante el promotor del gen *ScPGK1* de *S. cerevisiae*. Este gen de *L. kluyveri* tampoco pudo complementar a la mutante *S. cerevisiae bat2* cuando se expresó bajo el propio promotor de *ScBAT2* en el contexto genómico, incluso cuando la actividad enzimática en el extracto crudo era similar a la observada en la cepa tipo silvestre (**Figura 6F y 6G**).

Dos hipótesis pueden explicar estos resultados: en la primera, la enzima *LkBat1* no substituye funcionalmente a *ScBat2* en el catabolismo porque la enzima

de *L. kluyveri* tiene propiedades cinéticas que no se adecuan a asimilar los aminoácidos BCAA eficientemente como lo hace la transaminasa ScBat2 en *S. cerevisiae*. En la segunda hipótesis se visualiza a la enzima ScBat2 llevando a cabo otra función celular, necesaria para un eficiente crecimiento sólo en la condición del catabolismo de los aminoácidos VIL, y que LkBat1 no está adaptada para llevar, eficientemente a cabo, dicha catálisis.

Las observaciones que sugieren esta hipótesis se muestran en la (**Figura 6F y 6G**) en donde se observa que hay una actividad enzimática de LkBat1 similar a la observada en la cepa tipo silvestre en la levadura que lleva a *LkBAT1* bajo el promotor de *ScBAT2* (*Scbat1 Scbat2pro::LkBAT1*) y poca actividad enzimática de LkBat1 en la levadura que lleva *LkBAT1* regulado con el promotor de *ScBAT1* (*Scbat1pro::LkBAT1 Scbat2*) comparada con la cepa tipo silvestre (**Figura 6G (VIL)**). Aunque hay una discrepancia en las actividades enzimáticas entre estas dos cepas, ambas mejoraron su crecimiento a velocidades muy similares entre ellas, pero no complementaron totalmente la mutante *Lkbat1* (**Figura 6F**). Entonces es posible que LkBat1 haya satisfecho las necesidades de asimilación de aminoácidos VIL como fuente de nitrógeno, pero no haya podido llevar a cabo la segunda función.

## **4.2 El gen *LkBAT1bis* es una copia degenerada del gen *LkBAT1***

En el genoma de *L. kluyveri* se encuentra un gen que es muy similar en secuencia al gen *LkBAT1*, nosotros lo nombramos *LkBAT1bis*. Este gen está activo transcripcionalmente cuando la levadura ha crecido a saturación en (SD + NH<sub>4</sub>) y (SD + VIL) (**Figura 5A y 5B**), y codifica para una proteína muy similar a LkBat1 pero hay codones de paro que truncan el producto de la traducción y generan una versión corta de la región del amino terminal de la transaminasa. Esta versión corta de transaminasa ha perdido residuos importantes para la catálisis y la

oligomerización así como la lisina que une el cofactor PLP. Sin embargo, después del primer codón de paro, todos los residuos importantes para la catálisis de la enzima se conservan en un alto porcentaje, aunque no estarían presentes en la versión recortada. Esto sugiere que la duplicación es reciente y que después de la acumulación de codones de paro no ha habido una gran cantidad de sustituciones de residuos de aminoácidos (**Figura 1**).

Respecto al origen de la copia del gen *LkBAT1bis*, es aún una pregunta abierta ya que no tenemos suficientes evidencias para llegar a una conclusión. Lo que sabemos acerca de los loci *LkBAT1bis* y *LkBAT1* es que son los únicos elementos genéticos similares entre sí en la comparación de secuencias de regiones de 20 kb río arriba y abajo de estos loci. Además, el gen *LkBAT1bis* está insertado río arriba de un gen tRNA y *LkBAT1* conserva sintenia entre genes ortólogos que *LkBAT1bis* ha perdido.

Las observaciones de la pérdida de sintenia del gen *LkBAT1bis* y su inserción en regiones aledañas a un gen tRNA sugieren que este gen se retrocopió por medio de la maquinaria de los retrotransposones, posiblemente del tipo Ty. En *L. kluyveri* se han identificado elementos homólogos a los Ty1 y Ty2 de *S. cerevisiae* (Tsk1 y Tsk3, respectivamente) (Kim J-M. *et al.*, 1998; Neuvéglise *et al.*, 2002; Maxwell y Curcio, 2007; Kaessmann *et al.*, 2009). Sin embargo en la región 3' de *LkBAT1bis* no encontramos ningún indicio de la región poliadenilada característica del RNA mensajero que se retrocopió.

Por otro lado, observamos que *LkBAT1bis* parece no tener importancia en el metabolismo de los aminoácidos VIL porque la mutante sencilla *Lkbat1bis* mostró fenotipos similares a los de la cepa tipo silvestre en todas las condiciones de crecimiento probadas (**Figura 2A – 2G**). Todos estos hechos apuntan a que posiblemente *LkBAT1bis* está pasando por un proceso de pseudogenización, en donde la copia del gen ha perdido su función y su estructura se está desvaneciendo en la secuencia de residuos de nucleótidos de la hebra de DNA por obra de las mutaciones (Khachane and Harrison, 2009).

Aunque *LkBAT1bis* parece ser un pseudogen, los análisis posteriores que realizamos para evaluar el coeficiente de sustituciones no sinónimas sobre

substituciones sinónimas (Ka/Ks) en la secuencia de los ORFs de *LkBAT1*, *ScBAT1*, *ScBAT2* y *LkBAT1bis* nos mostraron que probablemente este no sea el caso. Los pseudogenes son idealizados como remanentes obsoletos de un gen anterior funcional: el resultado de la acumulación de mutaciones deletéreas. Una de las características de los pseudogenes es que tiene coeficientes Ka/Ks muy cercanos a 1. Sin embargo, las comparaciones entre el ORF *LkBAT1bis* con los ORFs de *LkBAT1*, *ScBAT1* o *ScBAT2* mostraron un coeficiente menor a 1 sugiriendo que el ORF del gen *LkBAT1bis* ha estado bajo una presión selectiva purificadora.

### **4.3 La función redundante de los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* en la asimilación de etanol como fuente de carbono.**

Se ha reportado que la ruta de la biosíntesis y de la asimilación de los aminoácidos VIL, así como algunas enzimas que están involucradas en esta ruta metabólica también tienen una participación en la estabilidad y mantenimiento de la mitocondria. Kispal *et al.*, (1996) reportaron que la transaminasa ScBat1 de *S. cerevisiae* posiblemente interacciona físicamente con el transportador ABC ScAtm1 para estabilizarlo. ScAtm1 media el transporte eficiente de pre-agregados de Fe-S que son utilizados en citoplasma para sintetizar los agregados completos y funcionar como cofactores de algunas enzimas en citoplasma (Kispal *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1997; Leighton and Schatz, 1995; Kispal *et al.*, 1999).

Si la levadura *S. cerevisiae* carece de esta proteína los pre-agregados de Fe-S no son translocados a citoplasma se sobreacumulan y se pierde la homeostasis del hierro-azufre en mitocondria provocando la desestabilización del DNA mitocondrial y subsecuentemente ocasiona la pérdida de la mitocondria

(Kispal *et al.*, 1997).

También se ha reportado que la cepa doble mutante de *S. cerevisiae* *Scbat1 Scbat2* presenta un fenotipo de auxotrofia por los aminoácidos VIL, y logra crecer adecuadamente cuando estos aminoácidos son agregados al medio de cultivo con dextrosa. Sin embargo, cuando se adicionan estos aminoácidos al medio de cultivo donde se usa etanol como única fuente de carbono, la doble mutante no logra crecer. Se ha hipotetizado que la degradación de estos compuestos y/o la presencia de una de las dos transaminasas es importante para crecer en una fuente de carbono no fermentable (Colón *et al.*, 2011).

De manera similar, observamos que la levadura *L. kluyveri* que carece de ambos genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* mostró una fase de crecimiento “lag” muy extendida sólo cuando se usó etanol como única fuente de carbono e independientemente de la fuente de nitrógeno (**Figura 9A, 9B, 9E y 9F**). Este fenotipo no fue observado en los cultivos donde se usó dextrosa como única fuente de carbono. En la asimilación del etanol, las funciones de los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* parecen ser redundantes porque la eliminación sólo del gen *LkBAT1* o sólo del gen *LkBAT1bis* no produjeron el fenotipo de la extensión de tiempo de la fase “lag” (**Figura 9A, 9B, 9E y 9F**).

Pensamos que al igual que en *S. cerevisiae*, los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* están interaccionando físicamente con el gen ortólogo *LkATM1* dándole estabilidad y por lo tanto promoviendo la homeostasis del hierro-azufre, la biogénesis y maduración de los agregados de Fe-S, y la estabilidad de la mitocondria. Por eso cuando no están presentes estos genes, la levadura de *L. kluyveri* no puede crecer en etanol, una fuente de carbono no fermentable.

#### **4.4 Contribución de la localización de ScBat2 y ScBat1 en la asimilación de valina, isoleucina y leucina como fuente de nitrógeno**

La biosíntesis de los aminoácidos principalmente se lleva a cabo en mitocondria. Los precursores de la ruta metabólica y de la mayoría de las enzimas que participan se localizan en mitocondria. Por otro lado, la asimilación de éstos aminoácidos se lleva principalmente en citosol; los precursores y la mayoría de las enzimas se encuentran en citosol y cuando los aminoácidos son agregados al medio como fuente de nitrógeno el compartimento celular más inmediato es el citosol (Nelson and Cox, 2008).

Existe una correlación entre la localización de las isoenzimas transaminasas de *S. cerevisiae* con los compartimentos en donde se lleva a cabo la biosíntesis y degradación de los aminoácidos VIL. En otras palabras, ScBat1 se localiza en donde se lleva a cabo principalmente la biosíntesis, y ScBat2 está presente en el compartimento en donde se favorece la degradación de estos aminoácidos (Kispal *et al.*, 1996; Cólón *et al.*, 2011).

También se ha observado que existe una correlación con la regulación transcripcional de estos genes y la condición donde se requiere biosintetizar o catabolizar los aminoácidos, ya que la transcripción del gen *ScBAT1* se induce en la condición donde se requiere biosintetizar los aminoácidos para poder crecer y *ScBAT2* se induce en la condición donde se requiere asimilarlos (Cólón *et al.*, 2011).

Se piensa que estas correlaciones favorecen a que el gen *ScBAT1* esté principalmente involucrado en la biosíntesis, y el gen *ScBAT2* se involucre en la asimilación de estos aminoácidos como fuente de nitrógeno. Si la localización de estas transaminasas no favoreciera el papel metabólico en el que están involucradas, entonces si *ScBAT2* se regula constitutivamente independiente de la fuente de nitrógeno, este gen podría substituir funcionalmente a *ScBAT1* en la biosíntesis. De una manera equivalente, sobreexpresar constitutivamente *ScBAT1* podría suplantar funcionalmente a *ScBAT2* en la asimilación de estos aminoácidos. Los resultados observados en la **Figura 10A** están de acuerdo con esta hipótesis, en donde al sobreexpresar *ScBAT2*, éste substituye totalmente a *ScBAT1* en la biosíntesis. Sin embargo, al sobreexpresar *ScBAT1*, éste no

substituyó funcionalmente al gen *ScBAT2* en la asimilación de estos aminoácidos (**Figura 11C**).

Estos resultados sugieren que en la biosíntesis, la localización de las transaminasas no tiene influencia; sin embargo, en el catabolismo, quitar la transaminasa citoplasmática afecta ese proceso posiblemente porque el flujo de los aminoácidos desde el medio de cultivo hasta la matriz mitocondrial puede ser muy reducido y disminuir la eficiencia de transaminación en la asimilación de estos aminoácidos. Esta hipótesis también está apoyada por los resultados que se muestran en la **Figura 12**: la enzima ScBat1 sin el péptido líder es dirigida a citoplasma (**Figura 12A, pGFP-NPScBAT1**) y cuando esta enzima es expresada constitutivamente en el citosol, ésta puede substituir funcionalmente a ScBat2 en la degradación y asimilación de los aminoácidos VIL (**Figura 12B, pExp-NPScBAT1**).

#### **4.5 Escape al conflicto adaptativo (EAC): propuesta de un modelo primitivo que explica la divergencia funcional de los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis***

En el modelo EAC la diversificación de las funciones de una enzima o gen precede el evento de la duplicación génica. Esta enzima multifuncional no puede especializarse hacia una función porque compromete la eficiencia de la otra función. El evento de la duplicación génica ofrece una oportunidad para que cada copia se especialice en una o la otra función (Conant and Wolfe, 2008; Hittinger and Carroll, 2007).

Este concepto de diversificación de la función antes de la duplicación ha sido ejemplificado por varios casos: por ejemplo las proteínas cristalinas en animales (Des Marais and Rausher, 2008; Piatigorsky y Wiston, 1991), la enzima “moonlight” *Ilv5* involucrada en la biosíntesis de aminoácidos VIL y en la

estabilidad de la mitocondria (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995; Bateman *et al.*, 2002).

Otro ejemplo es la evolución de las transaminasas de *S. cerevisiae*. La bifuncionalidad de la transaminasa parece haber aparecido antes de la duplicación de los genes *ScBAT1* y *ScBAT2* en *S. cerevisiae*. Una transaminasa en *K. lactis* (KIBat1) lleva a cabo eficientemente la transaminación en la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos VIL, y en *S. cerevisiae* esa bifuncionalidad se ha separado entre las isoenzimas ScBat1 y ScBat2 cada una especializándose hacia la biosíntesis o la asimilación (Cólón *et al.*, 2011).

Respecto al crecimiento de *L. kluyveri* en una fuente de carbono no fermentable, observamos que los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* tiene una función redundante que puede participar en un proceso celular que sea necesario para el crecimiento eficiente en esa condición. Nosotros hipotetizamos que el gen ancestral (una sola copia) llevaba a cabo las dos funciones celulares involucradas en el metabolismo de los aminoácidos VIL y la asimilación de etanol, que al duplicarse, el gen *LkBAT1* conservó ambas funciones y el gen *LkBAT1bis* esta en vías de especialización hacia la función involucrada en la asimilación de una fuente de carbono no fermentable de tal forma que ha perdido una parte de la región codificante generando una proteína tal que no participa en el metabolismo de VIL (**Figura 2 y Figura 9**).

## 5. Perspectivas

El descubrimiento de una copia del gen *LkBAT1* (*LkBAT1bis*) y su función ofrece la oportunidad de analizar rutas evolutivas menos obvias de genes y un mecanismo novedoso que ligue el metabolismo de los aminoácidos VIL con otros procesos celulares (por ejemplo la homeostasis del hierro, biogénesis de agregados de Fe-S y mantenimiento de la mitocondria). Sin embargo más experimentos son necesarios para confirmar estas hipótesis.

Estamos interesados en elucidar el mecanismo molecular de la función de los productos de los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* en relación a la liga del metabolismo de los aminoácidos VIL con el metabolismo respiratorio. Para este fin primero queremos observar si las levaduras que carecen de ambos genes pudene asimilar otras fuentes de carbono no fermentativas como: lactato, acetato, glicerol, entre otras, para descartar la idea de que estos fenotipos son específicos para la asimilación de etanol y no debido a defectos en el metabolismo respiratorio. Nos interesa llevar a cabo estudios enzimáticos de extractos puros de LkBat1 y LkBat1bis para entender su función y confirmar que tanto *LkBAT1* y *LkBAT1bis* son genes que codifican una proteína funcional. También estamos interesados en realizar estudios de microscopía elemental y de fluorescencia con tinciones fluorescentes específicas de mitocondria para observar la estabilidad de ésta, y para ver si en mitocondria se sobre acumulan pre-clústeres de Fe-S en la cepa doble mutante ocasionando la ruptura de la homeostasis del hierro. Pensamos que estos análisis nos pueden dar evidencias para poder confirmar la probable función que ambos genes tienen en la homeostasis del hierro.

Se ha reportado que en las mitocondrias de células de mamífero, la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada lleva acabo el paso de transaminación y también tiene la función de translocar el  $\alpha$ -cetoisocaproato del citoplasma a la matriz mitocondrial (Hutson y Hall, 1993). Además, experimentos *in vitro* sugieren que el  $\alpha$ -cetoisocaproato en concentraciones elevadas puede desacoplar la fosforilación oxidativa (Amaral *et al.*, 2010). Con estas premisas en

mente nosotros hipotetizamos que la cepa doble mutante de *L. kluyveri* no puede asimilar una fuente de carbono no fermentable por deficiencias en el metabolismo respiratorio (fosforilación oxidativa) ya que no tienen LkBat1 y LkBat1bis que tienen la función de transportar el  $\alpha$ -cetoisocaproato a la matriz mitocondrial, y el cetoácido se está acumulando en el espacio intermembranoso de la mitocondria. Esta acumulación hace que la fosforilación oxidativa se desacople y el metabolismo respiratorio se afecte.

Para confirmar esta hipótesis, estamos interesados en investigar si las proteínas codificadas en los genes *LkBAT1* y *LkBAT1bis* participan en el transporte de  $\alpha$ -cetoisocaproato llevando a cabo experimentos *in vitro* con las mitocondrias de las cepas mutantes de *L. kluyveri* que generamos en este trabajo así como la cepa tipo silvestre para confirmar la función de transportador de LkBat1 y/o LkBat1bis en *L. kluyveri*.

Otro experimento que pensamos que nos dará información es hacer la triple mutante *Lkbat1 Lkbat1bis* y *Lkleu2* en *L. kluyveri*. *LkLEU2* codifica para una enzima que cataliza el paso de la biosíntesis de  $\alpha$ -cetoisocaproato. Nosotros hipotetizamos que la triple mutante sí va a poder crecer en un medio con una fuente de carbono no fermentable, ya que no se estará produciendo  $\alpha$ -cetoisocaproato y no se acumulará en el espacio intermembranoso de la mitocondria por lo que la fosforilación oxidativa no se desacoplará, y el metabolismo respiratorio no se verá comprometido.

## 6. Referencias

1. Amaral AU, Leipnitz G, Fernandes CG, Seminotti B, Schuck PF, Wajner M, 2010. Alpha-ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain research* 1324: 75–84.
2. Bateman JM, Perlman PS, Butow RA, 2002. Mutational Bisection of the Mitochondrial DNA Stability and Amino Acid Biosynthetic Functions of Ilv5p of Budding Yeast. *Genetics* 161: 1043 – 1052.
3. Beck H, Dobritzsch D, Piskur J, 2008. *Saccharomyces kluyveri* as a model organism to study pyrimidine degradation. *FEMS yeast research* 8: 1209–1213.
4. Bondar DC, Beckerich JM, Bonnarne P, 2005. Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4585 – 4591.
5. Byrne KP, Wolfe KH, 2005. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome research* 15: 1456–1461.
6. Charif D, Lobry JR, 2007. Seqin R 1.0-2: project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In: Bastolla MU, Porto M, Roman HE, Vendruscolo M (Eds.), *Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations*, Springer Verlag, pp. 207 – 232.
7. Churchich JE, Farrelly JG, 1969. Mechanism of binding of pyridoxamine 5-

- phosphate to the apoenzyme aspartate aminotransferase. *Journal of Biological Chemistry* 244: 3685–3690.
8. Collins M, Wagner RP, 1973. Branched chain amino acid aminotransferases of *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 155: 184 – 193.
  9. Colón M, Hernández F, López K, Quezada H, González J, López G, Aranda C, González A, 2011. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PloS one* 6: e16099.
  10. Conant GC, Wolfe KH, 2007. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Molecular systems biology* 3: 129.
  11. de Boer CG, Hughes TR, 2012. YeTFaSCo: a database of evaluated yeast transcription factor sequence specificities. *Nucleic acids research*: 169–179.
  12. Denis C.L., and Young E.T., 1983. Isolation and characterization of the positive regulatory gene *ADR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 3:360-370.
  13. Dickinson JR, 2000. Pathways of leucine and valine catabolism in yeast. *Methods in Enzymology* 324: 80–92.
  14. Eden A, Benvenisty N, 1998. Characterization of branched-chain amino-acid aminotranferases of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14: 189 – 194.
  15. 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 Aminotransferases. *The Journal Of Biological Chemistry* 271: 20242–20245.

16. Fekete V, Cierna M, Poláková S, Piskur J, Sulo P, 2007. Transition of the ability to generate petites in the *Saccharomyces / Kluyveromyces* complex. *FEMS yeast research* 7: 1237–1247.
17. Gasmi N., Jacques P.E., Klimova N., Guo X., Ricciardi A., Robert F., Turcotte B., 2014. The switch from fermentation to respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the Ert1 transcriptional activator/repressor. *Genetics* 198:547-560.
18. Gojkovic Z, Jahnke K, Schnackerz KD, Piskur J, 2000. PYD2 encodes 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase, which participates in a novel fungal catabolic pathway. *Journal of Molecular Biology* 295: 1073–1087.
19. Goto M, Miyahara I, Hayashi H, Kagamiyama H, Hirotsu K, 2003. Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry* 42: 3725–3733.
20. Goto M, Miyahara I, Hirotsu K, Conway M, Yennawar N, Islam MM, Hutson SM, 2005. Structural determinants for branched-chain aminotransferase isozyme-specific inhibition by the anticonvulsant drug gabapentin. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 37246–37256.
21. Hazelwood L a, Daran J-M, Maris AJ a van, Pronk JT, Dickinson JR, 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2259–2266.

22. He X, Huai W, Tie C, Liu Y, Zhang B, 2000. Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 8: 3–8.
23. Hedges D., Proft M., Entian K.D., 1995. CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 15:1915-1922.
24. Hinnebusch A.G., and Fink G.R., 1983. Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 80:5374-5378.
25. Hittinger CT, Carroll SB, 2007. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449: R626–R628.
26. Hutson SM, Hall TR, 1993. Identification of the mitochondrial branched chain aminotransferase as a branched chain  $\alpha$ -keto acid transport Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 15: 3084 – 3091.
27. Ichihara A, Koyama E, 1966. Transaminase of branched chain amino acids. *Journal of Biochemistry* 59: 160–169.
28. Jolly NP, Varela C, Pretorius IS, 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS yeast research* 14: 215–237.
29. Kaessmann H, Vinckenbosch N, Long M, 2009. RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nature Reviews Genetics* 10: 19 – 31.
30. Khachane AN, Harrison PM, 2009. Strong association between pseudogenization mechanisms and gene sequence length. *Biology Direct* 4:

31. Kim JM, Vanguri S, Boeke JD, Gabriel A, Voytas DF, 1998. Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Research* 8: 464–478.
32. Kim JM, Yoshikawa H, Shirahige K, 2001. A member of the YER057c/yjgf/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells* 6: 507–517.
33. Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R, 1997. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Letters* 418: 346–350.
34. Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R, 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO journal* 18: 3981–3989.
35. Kispal G, Steiner H, Court D a, Rolinski B, Lill R, 1996. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 24458–24464.
36. Kuhnke G, Neumann K, Mühlenhoff U, Lill R, 2006. Stimulation of the ATPase activity of the yeast mitochondrial ABC transporter Atm1p by thiol compounds. *Molecular Membrane Biology* 23: 173–184.
37. Leighton J, Schatz G, 1995. An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *The EMBO journal* 14: 188–195.

38. Lill R, 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460: 831–838.
39. Lill R, Mühlenhoff U, 2006. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 457–486.
40. Lill R, Mühlenhoff U, 2008. Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annual Review of Biochemistry* 77: 669–700.
41. Lilly M, Bauer FF, Styger G, Lambrechts MG, Pretorius IS, 2006. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS yeast research* 6: 726–743.
42. Lis H, Fasella P, Turano C, Vecchini P, 1960. On the mechanism of action of glutamic-aspartic transaminase: Intermediate steps in the reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 45: 529–536.
43. Longtine M, McKenzielll A, Demarini D, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR, 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961.
44. Maxwell PH, Curcio MJ, 2007. Retrosequence formation restructures the yeast genome. *Genes & Development* 21: 3308–3318.
45. Mehta PK, Hale TI, Christen P, 1993. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *The FEBS Journal* 214:

549–561.

46. Miao R, Kim H, Koppolu UMK, Ellis EA, Scott RA, Lindahl PA, 2009. Biophysical characterization of the iron in mitochondria from Atm1p-depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 48: 9556 – 9568.
47. Møller K, Sharif MZ, Olsson L, 2004. Production of fungal alpha-amylase by *Saccharomyces kluyveri* in glucose-limited cultivations. *Journal of Biotechnology* 111: 311–318.
48. Møller K, Tidemand L, Winther J, Olsson L, Piškur J, Nielsen J, 2001. Production of a heterologous proteinase A by *Saccharomyces kluyveri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 216–219.
49. Natarajan K., Meyer M.R., Jackson B.M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A.G., Marton M.J., 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 21:4347-4368.
50. Nelson, D, and Cox, M; Lehninger Principles of Biochemistry (4th Ed.). W.H. Freeman and Company, New York, 2008, 1216 pp
51. Neuvéglise C, Feldmann H, Bon E, Gaillardin C, Casaregola S, 2002. Genomic Evolution of the Long Terminal Repeat Retrotransposons in *Hemiascomycetous* Yeasts. *Genome Research* 12: 930 – 943.
52. Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Ståhlberg A, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L, 2004. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports* 5: 532–537.
53. Piatigorsky J, Wistow G, 1991. The recruitment of crystallins: new functions

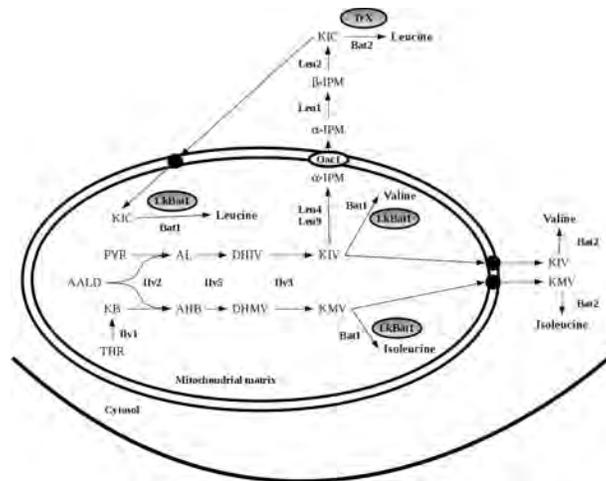
- precede gene duplication. *Science* 252: 1078–1079.
54. Sheff M, Thorn KS, 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 661 – 670.
  55. Sikorski RS, Hieter P, 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19 – 27.
  56. Struhl K, Davis RW, 1981. Transcription of the his3 gene region in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* 152: 535–552.
  57. Tamura M, Matsumoto O, Takakuwa N, Oda Y, Ohnishi M, 2005. Production of Cerebroside from Beet Molasses by the Yeast *Saccharomyces kluyveri*. *Food Biotechnology* 19: 95–105.
  58. Thomas-Chollier M, Defrance M, Medina-Rivera A, Sand O, Herrmann C, Thieffry D, Helden J van, 2011. RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 39: 86–91.
  59. Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze J-V, Janky R, Defrance M, Vervisch E, Brohée S, Helden J van, 2008. RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 36: 119–127.
  60. Tong A.H.Y., Evangelista M., Parsons A.B., Xu H., Bader G.D., Page N., Robinson M., Raghibizadeh S., Hogue C.W.V., Bussey H., Andrews B., Tyers M., Boone C., 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletions mutants. *Science* 294: 2364-2368.
  61. Turatsinze J-V, Thomas-Chollier M, Defrance M, Helden J van, 2008. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and

cis-regulatory modules. *Nature Protocols* 3: 1578 – 1588.

62. Turcotte B., Liang X.B., Robert F., Soontornngun N., 2010. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research* 10:2-13.
63. van Helden J, 2003. Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Research* 31: 3593–3596.
64. Weinstock KG, Strathern JN, 1993. Molecular genetics in *Saccharomyces kluyveri*: The HIS3 homolog and its use as a selectable marker gene in *S. kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9: 351–361.
65. Yennawar N, Dunbar J, Conway M, Hutson S, Farber G, 2001. The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 57: 506–515.
66. Young E.T., Dombek K.M., Tachibana C., Ideker T., 2003. Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *Journal of Biological Chemistry* 278:26146-26158.
67. Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, Seo J-A, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C, 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology* 41: 973–981.
68. Zelenaya-Troitskaya O, Perlman PS, Butow RA, 1995. An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *The EMBO journal* 14: 3268 – 3276.

69. Zhou H., and Winston F., 2001. *NRG1* is required for glucose repression of the *SUC2* and *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genetics* 2:5-13.

## 7. Anexos



**Figura 13. Ruta metabólica de la biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada.** Las enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* se muestran en negritas; los intermediarios y precursores están escritos en mayúsculas. Las enzimas de *Lachancea kluyveri* se muestran en óvalos grises. Oac1 es un transportador de  $\alpha$ -isopropilmalato. Los círculos negros en el espacio intermembranoso son transportadores hipotéticos. Figura tomada de Montalvo-Arredondo *et al.*, 2015

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>



## Functional roles of a predicted branched chain aminotransferase encoded by the *LkBAT1* gene of the yeast *Lachancea kluyveri*



Javier Montalvo-Arredondo<sup>a</sup>, Ángel Jiménez-Benítez<sup>a</sup>, Maritrini Colón-González<sup>b</sup>, James González-Flores<sup>b</sup>, Mirelle Flores-Villegas<sup>b</sup>, Alicia González<sup>b</sup>, Lina Riego-Ruiz<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>IPICYT, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José, no. 2055, Col. Lomas 4 Sección, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 June 2015

Revised 6 November 2015

Accepted 7 November 2015

Available online 10 November 2015

#### Keywords:

Branched chain amino acid metabolism

Aminotransferase

Respiration

Fermentation

*Lachancea kluyveri*

*Saccharomyces cerevisiae*

### ABSTRACT

Branched chain amino acid aminotransferases (BCATs) catalyze the last step of the biosynthesis and the first step of the catabolism of branched chain amino acids. In *Saccharomyces cerevisiae*, BCATs are encoded by the *ScBAT1* and *ScBAT2* paralogous genes. Analysis of *Lachancea kluyveri* genome sequence, allowed the identification of the *LkBAT1* locus, which could presumably encode a BCAT. A second unlinked locus (*LkBAT1bis*), exhibiting sequence similarity to *LkBAT1* was also identified. To determine the function of these putative BCATs, *L. kluyveri* mutant strains lacking *LkBAT1*, *LkBAT1bis* or both genes were generated and tested for VIL metabolism. *LkBat1* displayed branched chain aminotransferase activity and is required for VIL biosynthesis and catabolism. However, *Lkbat1Δ* mutant is a valine and isoleucine auxotroph and a leucine bradytroph indicating that *L. kluyveri* harbors an alternative enzyme(s) involved in leucine biosynthesis. Additionally, heterologous reciprocal gene complementation between *S. cerevisiae* and *L. kluyveri* orthologous *LkBAT1*, *ScBAT1* and *ScBAT2* genes, confirmed that the mitochondrial *LkBat1* functions as BCAT in *S. cerevisiae*, restoring wild type phenotype to the *ScBAT1* null mutant. Conversely, *LkBAT1bis* did not display a role in BCAAs metabolism. However, when ethanol was used as carbon source, deletion of *LkBAT1bis* in an *Lkbat1Δ* null strain resulted in an extended 'lag' growth phase, pointing to a potential function of *LkBAT1* and *LkBAT1bis* in the aerobic metabolism of *L. kluyveri*. These results confirm the BCAT function of *LkBAT1* in *L. kluyveri*, and further support the proposition that the BCAT function in ancestral-type yeasts has been distributed in the two paralogous genes present in *S. cerevisiae*.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2015.11.004>