BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

TESIS

Importancia de la compartimentalización subcelular en la diversificación funcional de las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 en *Saccharomyces cerevisiae*

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. Daniela Trejo Zambrano

DIRECTOR

D.C. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ

ASESOR

D.C. LAURA MORALES LARA

Puebla, Pue. Marzo 2020

BUAP

Puebla, Pue. a 13 de Junio de 2019

C. TREJO ZAMBRANO DANIELA
P R E S E N T E

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Bioquímica y Alimentos,

DC. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ, Director de Tesis,

DC. LAURA MORALES LARA, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

Importancia de la compartimentalización subcelular en la diversificacion funcional de las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 en Saccharomyces cerevisiae.

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

BUAP

OFICIO C.Q./CT 011CR/2020

D.C. ARMANDO MENA CONTLA
D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA
D.C. IVONNE PÉREZ XOCHIPA

Con toda atención comunico a ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) pasante de la Carrera de QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

Daniela Trejo Zambrano

cuyo título es:

"Importancia de la compartimentalización subcelular en la diversificación funcional de las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 en Saccharomyces cerevisiae"

realizada en el área de Bioquímica-alimentos.

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 14 de febrero de 2020

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas

c.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

BUAP

OFICIO C.Q./CT 008A/2020

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno(a) de la Carrera de Químico Farmacobiólogo

DANIELA TREJO ZAMBRANO

realizada en el área de Bioquímica-Alimentos, comunican a usted la autorización para su impresión del Trabajo de Tesis, con el siguiente título:

"Importancia de la compartimentalización subcelular en la diversificación funcional de las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 en Saccharomyces cerevisiae"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 25 de febrero de 2020.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 25 de febrero de 2020

D.C. ARMANDO MENA CONTLA

D.C. NORA HILDA ROSAS MURRIETA

D.C. IVONNE PÉREZ XOCHIPA

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA · 1578 · FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

c.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se elaboró bajo la dirección de la Dra. María Alicia González Manjarrez, en el laboratorio 301- Oriente en el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La tesis se desarrolló bajo la asesoría de la Dra. Laura Morales Lara, que pertenece al Departamento de Bioquímica-Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Se reconoce el apoyo técnico de la M. en C. Jaqueline Hersch González, la Q.F.B. Beatriz Aguirre López y el M. en C. Dariel Márquez Gutiérrez en la realización de este trabajo.

Se reconoce el gran apoyo de Cristina Jardínez Godínez en el mantenimiento del material de laboratorio utilizado en este proyecto y la indispensable ayuda secretarial de María del Rocío Romualdo Martínez, del departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce la disposición y los aportes del Dr. Armando Mena Contla, la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta y la Dra. Ivonne Pérez Xochipa, integrantes de la comisión revisora de tesis.

Se reconoce la asesoría y el apoyo técnico del Dr. Abraham Rosas Arellano y la Dra. Ruth Rincón Heredia en el uso de los servicios de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce a la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabrera y la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta por los servicios de secuenciación, síntesis de oligonucleótidos y la disposición de los equipos de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce a la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular por el mantenimiento de la red inalámbrica y los equipos del instituto, así como al Ing. Aurey Galván Lobato y al Ing. Manuel Ortínez Benavides, personal del taller de mantenimiento del Instituto de Fisiología Celular.

Dar el ejemplo no es la principal manera de influir sobre los demás, es la única. – Albert Einstein

A mi hermana y a mis padres

Por enseñarme tanto con su ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

A Alicia, por recibirme en tu laboratorio y hacerme sentir parte de él desde el día 1. Por compartir tu experiencia y tu pasión por la ciencia todos los días del año. Por contagiar tu entusiasmo en las mañanas y por tantas anécdotas. Por preguntar siempre por los avances del proyecto, por confiar en mi trabajo. Gracias por enseñarme que la ciencia te puede salvar en los momentos más difíciles.

A Jacky, mi sensei del laboratorio, sin ti no lo habría logrado. Gracias por guiarme en este largo camino, por darme siempre los mejores consejos, académicos y personales. Por acompañarme en los días más duros de trabajo, la hora de *Maroon 5*, capítulos de *Friends*, una Magnum para un mal día. Por tu humor Chandleresco, ¡gracias!

A Cecy, por compartir esta experiencia conmigo desde la primera semana, gracias por la escucha y la confianza. A Sheyla, por tu inteligencia y por tu disposición para ayudar a los demás, sé que lograrás todo lo que te propongas. A la maestra Yamilé, por aceptar los retos con la mejor actitud, por apoyarme en las buenas y en las malas. A Angie, por las pláticas de comida y por esa gran anécdota de murciélagos que hizo posible mi hazaña de correr 6 km. A Brenda, por alegrar el laboratorio con tu llegada, te admiro por tu valentía. A Eren, por salvarme de una crisis nerviosa con tu sabiduría en el tema de proteínas.

A Dariel, por tu disposición para contestar todas mis preguntas, tu apoyo en la planificación del proyecto y tus aportes en los seminarios, gracias por los buenos consejos. A Bety, por darme la bienvenida al laboratorio, por aportar tanto a mi proyecto en el tema de proteínas y apoyarme en todo momento, muchas gracias. A Ara, por tu apoyo y compañía en el laboratorio, por esas pláticas de películas y recetas de cocina.

A Juan, por acompañarme los primeros meses, por explicarme la dinámica de todo y por hacerme reír tanto, se te extraña amigo. A Estefy, por su valiosa ayuda al inicio de mi proyecto. A Cristy y a Chío, por las pláticas mañaneras a las 7am, gracias por las porras.

A mis alumnos de verano, Sheyla, Karen y Kevin, gracias por su esfuerzo y colaboración, aprendí mucho de ustedes.

Gracias a Adrián, Raful, y a “Los Julianes”, Brandon, Martí y Daniel, por las risas a la hora de la comida y por su compañía dentro y fuera del laboratorio. Sin ustedes no habría sido lo mismo.

A mi papá, por compartir a diario su amor por la ciencia y despertar en mí esa vocación científica. A mi mamá por sus sabios consejos, y a mi hermana, por ser mi ejemplo a seguir.

A Marco, por apoyarme en esta decisión y por darme un respiro cada fin de semana. Gracias por esas largas llamadas a distancia para desahogarme en los peores momentos.

A mi abuela, por recibirme en tu casa y por escucharme todas esas noches en las que tuve un mal día, ¡gracias por tu paciencia!

Finalmente, gracias Laura por tu apoyo y eficiencia en el seguimiento de este proyecto. Gracias por despertar en mí el interés por la bioquímica y la genética, tus clases fueron y seguirán siendo de mucha ayuda.

ÍNDICE

RESUMEN **1**

LISTA DE ABREVIATURAS **2**

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS **3**

ANTECEDENTES **4**

Evolución por duplicación genética 4

Destino de los genes duplicados 5

Clasificación de genes duplicados 7

Saccharomyces cerevisiae como modelo genético de estudio 7

Metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* 8

Diversificación funcional de los genes de *S. cerevisiae* 10

Bat1 y Bat2 en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada 11

Divergencia funcional en las isoenzimas Bat1 y Bat2 13

La enzima Bat1 es principalmente biosintética 14

La enzima Bat2 es principalmente catabólica 15

La enzima KlBat1 es biosintética y catabólica 15

La actividad enzimática de Bat1 y Bat2 correlaciona con su fenotipo 15

Parámetros cinéticos de KlBat1, Bat1 y Bat2 16

Regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2* 17

Regulación transcripcional de *BAT1* 19

Regulación transcripcional de *BAT2* 20

Localización subcelular de Bat1 y Bat2 20

JUSTIFICACIÓN **23**

OBJETIVOS **24**

Objetivo general 24

Objetivos específicos 24

DIAGRAMA DE TRABAJO **25**

MATERIALES Y MÉTODOS **26**

Material 26

Material biológico 26

Equipos 28

Métodos 29

METODOLOGÍA **30**

Análisis de los fenotipos de las mutantes control 30

Construcción de mutantes 30

Descripción de la mutante *BAT1-yECit BAT2* 30

Predicción de la secuencia de translocación mitocondrial de Bat1 31

Construcción de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* 32

Comprobación de mutantes 34

Determinación de fenotipos de mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* 34

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **36**

Bat1 posee un carácter biosintético y Bat2 uno catabólico 36

Relocalización de Bat1 en el citosol 37

Bat1 es biosintética también en el citosol 39

Bat1 en el citosol suple por completo la función catabólica de Bat2 42

En amonio VIL se revierte la deficiencia de crecimiento de las mutantes 45

CONCLUSIONES **47**

PERSPECTIVAS **48**

ANEXOS **50**

REFERENCIAS **60**

RESUMEN

El estudio de los genes duplicados en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* contribuye a entender el proceso evolutivo que llevó a la levadura a adquirir un metabolismo fermentativo. Un ejemplo de esto son los parálogos *BAT1* y *BAT2* que codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada. Los estudios fisiológicos realizados a este par de genes demuestran que la enzima Bat1, localizada en la mitocondria, tiene un carácter más biosintético que Bat2. Por el contrario, la enzima citosólica Bat2 posee un perfil catabólico. Esta divergencia funcional correlaciona con los perfiles de expresión opuestos de los genes: *BAT1* se expresa mejor en condiciones biosintéticas y *BAT2* en condiciones catabólicas. El propósito de este trabajo es determinar la importancia de la localización de Bat1 en la divergencia funcional de ambas enzimas. Para analizar la relación entre la función biológica de Bat1 y su localización subcelular se relocalizó a Bat1 en el citosol en presencia y en ausencia de su paráloga Bat2. Los resultados indican que cuando Bat1 se encuentra en el citosol conserva su función biosintética y mejora su capacidad catabólica. Con los resultados obtenidos y la bibliografía consultada se concluye que la compartimentación subcelular juega un papel relevante en la función biológica de Bat1, y posiblemente de Bat2.

LISTA DE ABREVIATURAS

WGD	Duplicación completa del genoma (del inglés *Whole Genome Duplication*)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
gADN	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN	ARN mensajero
KLE	Clado *Kluyveromyces- Lachancea- Eremothecium*
ZT	Clado *Zygosaccharomyces- Torulaspora*
VIL	Valina, isoleucina y leucina
α-KIV	α-cetoisovalerato
α-KMV	α-cetometilvalerato
α-KIC	α-cetoisocaproato
α-IPM	α-isopropil malato
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
GS	Glutamina sintetasa
GOGAT	Glutamato sintasa
μ	Velocidad específica de crecimiento
CO_2	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
Δ	Deleción de gen
NFR	Región libre de nucleosomas (del inglés *Nucleosome Free Region*)
MATα	Tipo sexual o *mating type* Alpha
::	Inserción de gen
DO	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
MM	Medio mínimo
xg	Fuerza centrífuga relativa (del inglés *G-force*)
pb	Pares de bases
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés *Open Reading Frame*)
UTR	Región no traducida de un gen (del inglés *Untranslated Region*)
DIC	Microscopía de contraste de interferencia diferencial (del inglés *Differential Interference Contrast microscopy*)

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Destino de los genes duplicados.
Figura 2. Clasificación de los genes duplicados.
Figura 3. Árbol filogenético de los clados KLE y ZT.
Figura 4. Hipótesis del origen del genoma actual de *S. cerevisiae*.
Figura 5. Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada en *Saccharomyces cerevisiae.*
Figura 6. Actividad de transaminasa de Bat1 y Bat2 en glucosa amonio y/o VIL.
Figura 7. Perfiles de expresión de *BAT1* y *BAT2* en diferentes fuentes de nitrógeno.
Figura 8. Configuración de la cromatina en los promotores de *BAT1* y *BAT2.*
Figura 9. Localización subcelular de las enzimas que participan en la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada y sus sustratos en *S. cerevisiae*.
Figura 10. Mapa del plásmido pKT0175.
Figura 11. Predicción del servidor *TargetP-2.0.*
Figura 12. PCRs para la obtención del módulo de interés.
Figura 13. Velocidad específica de crecimiento de las mutantes control.
Figura 14. Comprobación de la remoción de la MTS por PCR.
Figura 15. Comprobación de la localización subcelular de Bat1 y Bat2 por microscopía confocal.
Figura 16. Fenotipo de las mutantes en condiciones biosintéticas (glucosa amonio).
Figura 17. Fenotipo de las mutantes en condiciones catabólicas (glucosa VIL).
Figura 18. Fenotipo de las mutantes en condiciones biosintéticas y catabólicas (glucosa amonio + VIL).
Figura 19. Curvas de crecimiento control de yECitrine.
Figura 20. Modelos de la proteína Bat1 con *I-TASSER*.
Figura 21. Modelos de la proteína Bat1 con *SWISS MODEL*.
Figura 22. Alineamiento de las secuencias de Bat1 y Bat2.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.
Tabla 3. Características de los equipos.
Tabla 4. Métodos empleados para las diferentes determinaciones.
Tabla 5. Predicción de las modificaciones postraduccionales de Bat1 y Bat2.

1. ANTECEDENTES

1.1. Evolución por duplicación genética

Cuando Darwin publicó su libro *El origen de las especies* (1859), describió a la evolución como la *descendencia con modificación*. El mecanismo propuesto para alcanzar dicha evolución es la selección natural. Es a través de la selección natural que las poblaciones sobreviven y se adaptan a su medio ambiente. Sin embargo, si la evolución hubiese dependido únicamente del proceso de selección natural, la aparición de organismos superiores a partir de organismos unicelulares sería prácticamente imposible. Esos saltos tan grandes en la historia de la evolución fueron posibles gracias a la duplicación de genes, donde la redundancia del gen duplicado permite sobrevivir a la presión de la selección natural y acumular con el tiempo mutaciones que le confieren nuevas funciones (Ohno, 1970).

El papel que juega la duplicación de genes en la evolución se ha ido dilucidando con el avance de las técnicas en biología molecular. *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado. Cuando se publicó el genoma completo de la levadura en 1996, los patrones en las secuencias indicaron duplicaciones en el genoma bastante antiguas que sugerían un evento de *duplicación completa del genoma* (WGD, por sus siglas en inglés) (Wolfe, 2015).

Las WGD son fenómenos frecuentes en la mayoría de las especies. Los pares de genes que resultan de una duplicación completa del genoma adquieren funciones nuevas que contribuyen de diferentes maneras a la adaptación de un ser vivo al medio ambiente en el que se encuentra. En plantas, por ejemplo, mejoró su producción de estructuras florales, tiempo de floración, calidad del grano y forma de la fruta (Panchy *et al.*, 2016); en vertebrados, su morfología, fisiología, comportamiento y diversificación (Voldoire *et al.*, 2017); y en hongos, la retención selectiva de genes duplicados les ha permitido a algunas levaduras desarrollar un metabolismo fermentativo (Escalera-Fanjul *et al.*, 2019).

1.2. Destino de los genes duplicados

Los genes duplicados pueden surgir a partir de cuatro mecanismos diferentes: (a) entrecruzamiento no equivalente, (b) retrotranscripción o retrotransposición, (c) transposición de ADN duplicado, y (d) poliploidización (Magadum *et al*., 2013). Los primeros tres mecanismos son formas de duplicación parcial donde sólo un segmento del genoma total se duplica. La poliploidización, en cambio, conlleva una duplicación completa del genoma. Si la duplicación resulta de la fusión de dos células de la misma especie (WGD intraespecie), se trata de una autopoliploidización; cuando dos sets de cromosomas de especies diferentes se fusionan (hibridación interespecie), es una alopoliploidización (Del Pozo *et al.*, 2015; Peer *et al*., 2017).

El genoma de muchas levaduras como *Candida glabrata, Vanderwaltozyma polyspora* y *Saccharomyces cerevisiae*, proviene de una WGD (Marcet-Houben, *et al.,* 2015). El linaje de esta última es el resultado de una hibridación interespecie entre una cepa proveniente del clado *Kluyveromyces, Lachancea* y *Eremothecium* (KLE) y otra cepa relacionada con el clado *Zygosaccharomyces* y *Torulaspora* (ZT). *S. cerevisiae* es entonces resultado de un evento de alopoliploidización.

Una vez que los genes se encuentran duplicados, su destino varía con el paso del tiempo. En la mayoría de los casos, conservar dos genes idénticos no representa una ventaja para las especies, por lo que los genes redundantes acumulan mutaciones degenerativas durante millones de años hasta convertirse en pseudogenes que nunca se expresan o que pierden su función y eventualmente sufren deleciones (Figura 1) (Magadum *et al*., 2013).

Por otro lado, si los genes duplicados sobreviven a una pseudogenización, las copias de esos genes pueden experimentar eventos de diversificación funcional. El modelo clásico de Ohno (1970) plantea que cuando un gen se duplica se vuelve redundante, sin embargo, uno de los genes duplicados evoluciona rápidamente adquiriendo una nueva función, mientras que el otro permanece con la función original (Ohno, 1970). La *robustez* se define como la capacidad de mantener la función ante una perturbación y la *plasticidad* permite mejorar el rendimiento ante cambios ambientales. El modelo de Ohno, conocido como modelo de *neofuncionalización,* permite la retención del par duplicado y constituye, por lo tanto, una ventaja evolutiva para las especies al

conferirles, entre muchas cosas, mayor robustez y plasticidad (Escalera-Fanjul *et al.*, 2019).

Un modelo alternativo, el modelo de *subfuncionalización*, propone que la función original del gen que se duplicó se encuentra ahora repartida en ambas copias, por lo tanto, la presencia de ambos genes es necesaria para llevar a cabo la función ancestral (Conant *et al.*, 2008). Este modelo también es conocido como modelo DDC (Duplicación-Degeneración- Complementación) porque después de *duplicarse*, cada copia comienza a perder subfunciones del gen original por un proceso de *degeneración*, y dado que cada copia pierde subfunciones diferentes, ambos genes deben permanecer para *complementarse* y poder cumplir con la función original del gen ancestral (Panchy *et al.,* 2016).

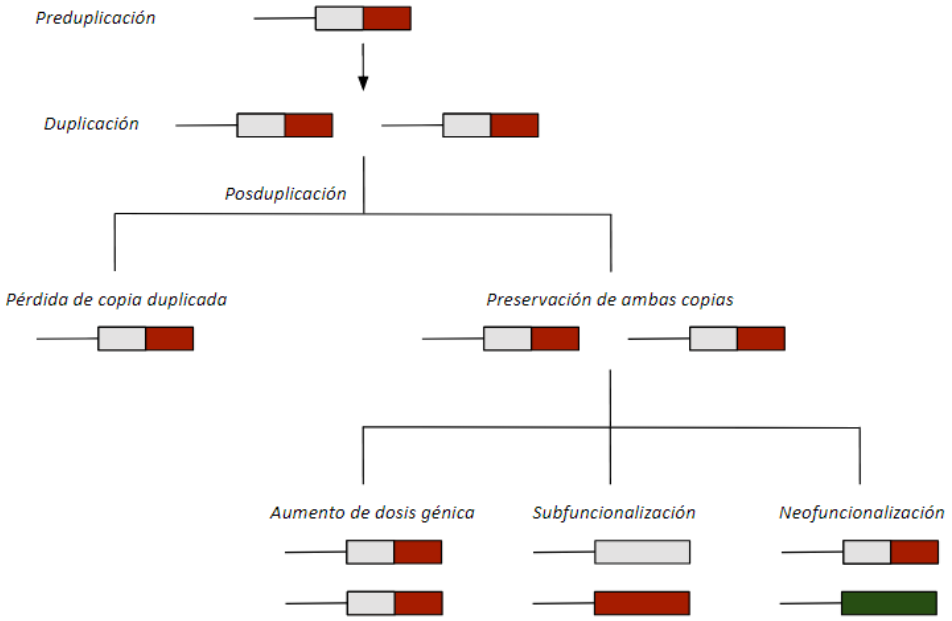


Figura 1. Destino de los genes duplicados. Los genes duplicados pueden tener diferentes destinos. Si los genes resultan redundantes, con el paso del tiempo acumulan mutaciones hasta perder su función. Uno de los genes duplicados puede evolucionar más rápidamente que el otro y adquirir una nueva función, mientras que el otro permanece con la misma función (neofuncionalización) o cada copia del gen original pierde funciones diferentes para poder especializarse (subfuncionalización) (modificado de Voordeckers *et al.,* 2015).

1.3. Clasificación de genes duplicados

Todos los genes que resultan de una duplicación, es decir, que provienen de un ancestro común, se les conoce como genes *homólogos* (Figura 2).

Si la homología es resultado de un evento de especiación, por ejemplo, α-hemoglobina en humano y en ratón, los genes son llamados ortólogos (orto- latín *ortus*-nacer). En cambio, cuando la homología proviene de un evento de duplicación (parcial o total) del genoma donde ambas copias evolucionaron a la par en un mismo organismo, por ejemplo, α y β hemoglobina, los genes son parálogos (para- griego *parallelos*- junto a otro) (Opperdoes, 1997; Fitch, 1979).

Los genes parálogos a su vez se clasifican en ohnólogos y homeólogos según su origen de duplicación. Los genes ohnólogos (por Susumu Ohno), provienen de una autopoliploidización, mientras que los homeólogos de una alopoliploidización (Escalera-Fanjul *et al.*, 2019).

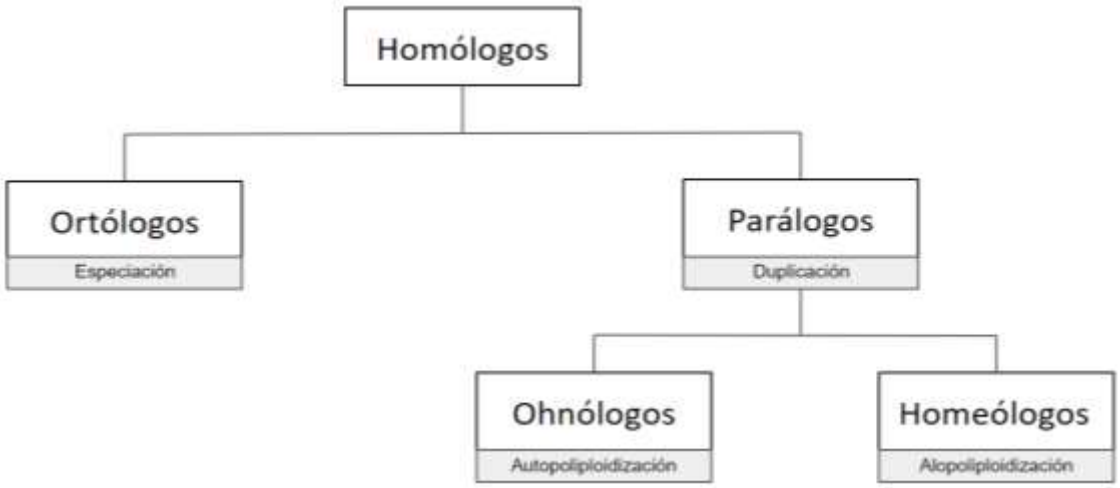


Figura 2. Clasificación de los genes duplicados. Todos los genes que resultan de una duplicación son *homólogos.* Aquellos que provienen de un evento de especiación son *ortólogos* y los que surgen de un evento de duplicación son *parálogos*. Los parálogos se clasifican en *ohnólogos* cuando provienen de una autopoliploidización y en *homeólogos* cuando surgen de una alopoliploidización (elaboración propia).

1.4. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo genético de estudio

Saccharomyces cerevisiae es el organismo modelo en genética por excelencia, al tratarse de una célula eucariota, realiza procesos complejos como replicación,

transcripción y traducción, división celular, transporte de membrana, metabolismo energético, señalización intracelular, entre otros, que son también llevados a cabo por todas las eucariotas.

Además de ser un sistema bien desarrollado y simple de estudiar, *S. cerevisiae* tiene un ciclo de vida relativamente corto. Es capaz de crecer en un medio sólido donde forma colonias bien definidas, o en un medio líquido donde presenta un crecimiento logarítmico dependiente de la calidad de los nutrientes en el medio. También tiene una alta tasa de recombinación homóloga, lo que facilita el diseño y construcción de mutantes para estudios genéticos.

Otra ventaja que presenta este organismo es que puede hacer mitosis tanto en su forma haploide como en la diploide. Esto permite hacer cultivos grandes de individuos genéticamente idénticos en el laboratorio para analizar sus fenotipos (Michels, C. 2002).

1.5. Metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*

El metabolismo característico de *Saccharomyces cerevisiae*, a diferencia de su ancestro, le permite crecer en presencia y ausencia de oxígeno. Al ser un *anaerobio facultativo*, la levadura es capaz de seguir rutas metabólicas distintas de acuerdo con las condiciones de crecimiento en las que se encuentra. En presencia de glucosa, *S. cerevisiae* obtiene su energía a través de la glucólisis. Cuando la glucosa se termina, se activan las vías de oxidación aerobias, como el ciclo de Krebs y el ciclo del glioxilato, donde la levadura utiliza fuentes de carbono no fermentables (Lehninger *et al.,* 2015).

Se ha planteado que la adquisición del metabolismo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* proviene de un evento de duplicación completa de su genoma. En el cretáceo tardío, la evolución de las angiospermas en la diversidad de sus frutos cada vez más azucarados pudo haber influido en la retención selectiva de aquellos genes duplicados involucrados en la adaptación de la levadura a condiciones anaerobias estrictas (Escalera-Fanjul *et al.*, 2019). Sin embargo, aunque la mayoría de las secuencias genómicas en eucariotas muestran evidencias de WGD, las causas y el plazo de los pasos intermedios no han sido fáciles de discernir (Wolfe, K., 2015).

Varios análisis bioinformáticos demuestran evidencia a favor de un evento de alopoliploidización en *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo una hibridación

interespecie entre cepas del clado KLE y cepas del clado ZT (Figura 3). Una hipótesis propone que primero se fusionaron dos células haploides, provenientes de especies diferentes, para formar una célula diploide que posteriormente pasó por un evento de WGD. La otra hipótesis plantea que la fusión de dos células diploides de especies diferentes fue lo que dio origen al ancestro de *S. cerevisiae* (Marcet-Houben, M. and Gabaldón, T. 2015) (Figura 4).

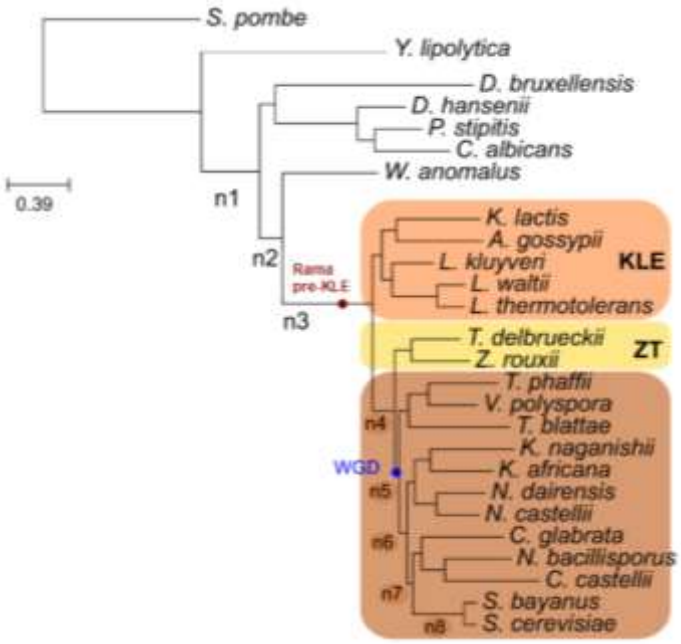


Figura 3. Árbol filogenético de los clados KLE y ZT. El híbrido entre las cepas del clado *Kluyveromyces, Lachancea* y *Eremothecium* (KLE) y cepas del clado *Zygosaccharomyces* y *Torulaspora* (ZT) dio origen al linaje de *Saccharomyces cerevisiae* (modificado de Marcet-Houben, M. & Gabaldón, T. 2015).

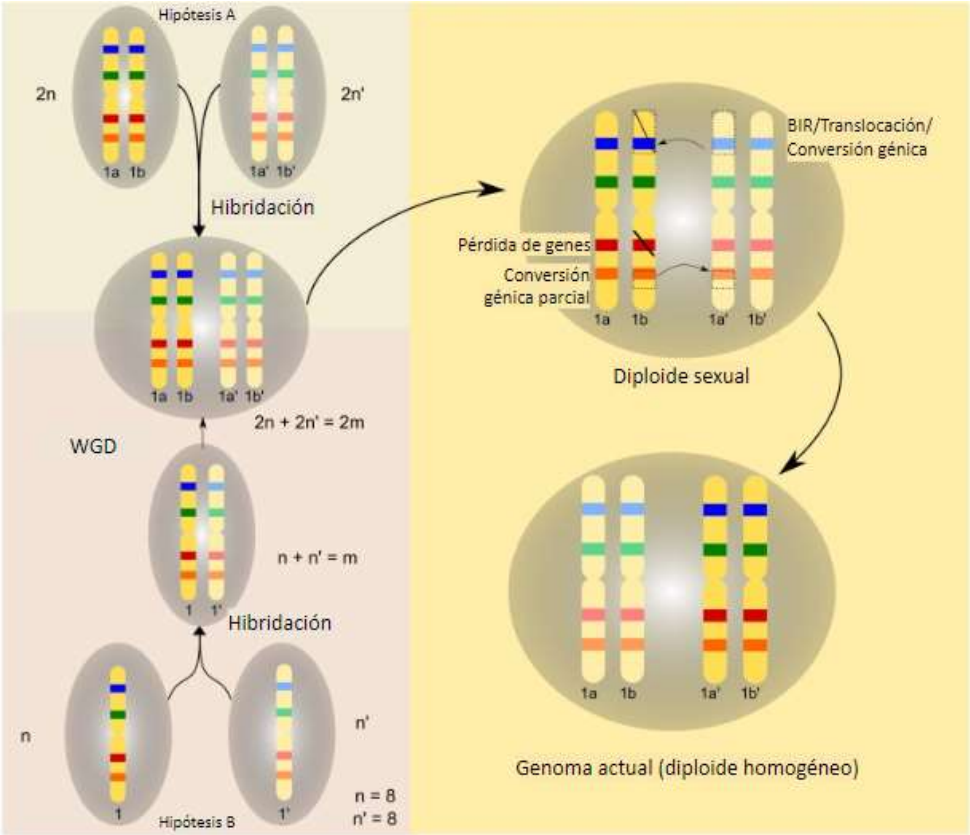


Figura 4. Hipótesis del origen del genoma actual de *S. cerevisiae*. La hipótesis A muestra la fusión de dos diploides y la formación del alotetraploide. La hipótesis B plantea el apareamiento entre dos haploides y la posterior WGD que lleva a la formación del alotetraploide (modificado de Marcet-Houben, M. and Gabaldón, T. 2015).

1.6. Diversificación funcional de los genes de *S. cerevisiae*

El estudio detallado de los genes parálogos de *Saccharomyces cerevisiae* contribuye a determinar los mecanismos de diversificación funcional que se llevaron a cabo en la levadura para adquirir un metabolismo fermentativo. Uno de los fenómenos en este metabolismo es la utilización de compuestos nitrogenados para reacciones de biosíntesis y catabolismo de aminoácidos en la levadura.

Las reacciones de algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de nitrógeno comparten intermediarios con el ciclo del ácido cítrico, por lo tanto, los genes que codifican para estas enzimas deben coordinarse con los que participan en el metabolismo del carbono (glucólisis, ciclo de Krebs y vía de las pentosas-fosfato) (Colón, 2011). Probablemente por esta razón es que alrededor del 44% de los genes asociados

al metabolismo del nitrógeno se encuentran duplicados, para lograr una regulación más sofisticada, optimizar las funciones y así aumentar la productividad del sistema.

De este porcentaje de genes asociados al metabolismo de nitrógeno, sólo algunos pasaron por un evento de poliploidización, es decir, solo algunos son genes parálogos. Entre los pares parálogos más estudiados a la fecha, se encuentran *ENO1/ENO2* que codifican para fosfopiruvato hidratasas, *GDH1/GDH3* que codifican para glutamato deshidrogenasas, *LEU4/LEU9* que codifican para isopropilmalato sintasas, *LYS20/LYS21* que codifican para homocitrato sintetasas, *BAT1/BAT2* que codifican para transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada, *ALT1/ALT2* que codifican para transaminasas de alanina, y *COX5A/COX5B* y *CYC1/CYC7* que codifican para proteínas del complejo citocromo C oxidasa (Escalera-Fanjul et al., 2019).

Los estudios fisiológicos realizados a estos pares parálogos demuestran que sus funciones no son redundantes. En todos los casos, existieron mecanismos de subfuncionalización que resultaron en la divergencia a nivel estructural, organizacional, cinético, transcripcional o de localización subcelular entre los pares, haciendo necesaria la presencia de ambas enzimas para suplir la función de la enzima ancestral (Escalera-Fanjul et al., 2019).

1.7. Bat1 y Bat2 en el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada

Saccharomyces cerevisiae es capaz de metabolizar alrededor de 30 compuestos nitrogenados diferentes y regular su crecimiento de acuerdo con la calidad y cantidad de estos nutrientes. Las fuentes de nitrógeno son introducidas a la levadura a través de permeasas y utilizadas: (1) en reacciones biosintéticas cuando hay una deficiencia de aminoácidos en la célula y suficiente amonio para transaminar a los α-cetoácidos (2) o en procesos catabólicos cuando se requiere nitrógeno para la síntesis de glutamato y/o glutamina (Colón, 2011).

Bat1 y Bat2 tienen una identidad aminoacídica del 73.6% (Anexo 3). Son aminotransferasas de los aminoácidos de cadena ramificada: Valina, Isoleucina y Leucina (VIL). Ambas catalizan la reacción reversible de transaminación, es decir, transfieren un grupo amino de un aminoácido a un α-cetoácido usando como donador/receptor de amonio al glutamato/α-cetoglutarato; y como cofactor al piridoxal 5'-

fosfato (Eden et al., 2001). El α-cetoácido de valina es el α-cetoisovalerato (α-KIV), el de leucina es el α-cetoisocaproato (α-KIC), y el de isoleucina es el α-cetometilvalerato (α-KMV) (Figura 5). Dado que se trata de una reacción reversible, estas enzimas catalizan el último paso de la biosíntesis y el primer paso del catabolismo de VIL a través de un solo sitio activo, es decir, siguiendo el mecanismo ping-pong o de doble desplazamiento para enzimas con más de un sustrato (Hammer et al., 2017; Lehninger *et al.,* 2015).

Las biosíntesis de los tres aminoácidos se relacionan entre sí de diferentes maneras. La vía de síntesis de isoleucina se encuentra interconectada con la vía de valina por las enzimas que comparten. Ambas rutas tienen tres enzimas en común: Ilv2, Ilv5 e Ilv3 (dihidroxiácido deshidratasas). Por otro lado, las rutas biosintéticas de valina y leucina comparten las primeras reacciones dentro de la mitocondria. A partir del piruvato, precursor inicial de valina, se desencadenan una serie de reacciones que producen α-cetoisovalerato (α-KIV). Este último intermediario en la síntesis de valina se vuelve el precursor de la síntesis de leucina cuando pasa de α-KIV a α-isopropil malato (α-IPM) por acción de las enzimas parálogas Leu4 y Leu9. El α-IPM sale de la mitocondria, usando su transportador Oac1, hacia el citosol donde es finalmente convertido a leucina a partir de α-KIC (Prohl, 2000; Kohlhaw, 2003; Marobbio *et al.,* 2008).

Durante el catabolismo, los aminoácidos de cadena ramificada son desaminados por acción de las transaminasas. Ese amonio es incorporado posteriormente al α-cetoglutarato para formar glutamato, reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP. El glutamato a su vez es utilizado, junto con el amonio, como sustrato para la síntesis de glutamina por medio de la glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). Esta ruta, conocida como vía GS/GOGAT, juega un papel fundamental en la asimilación de nitrógeno de la levadura (Kumada et al., 1993).

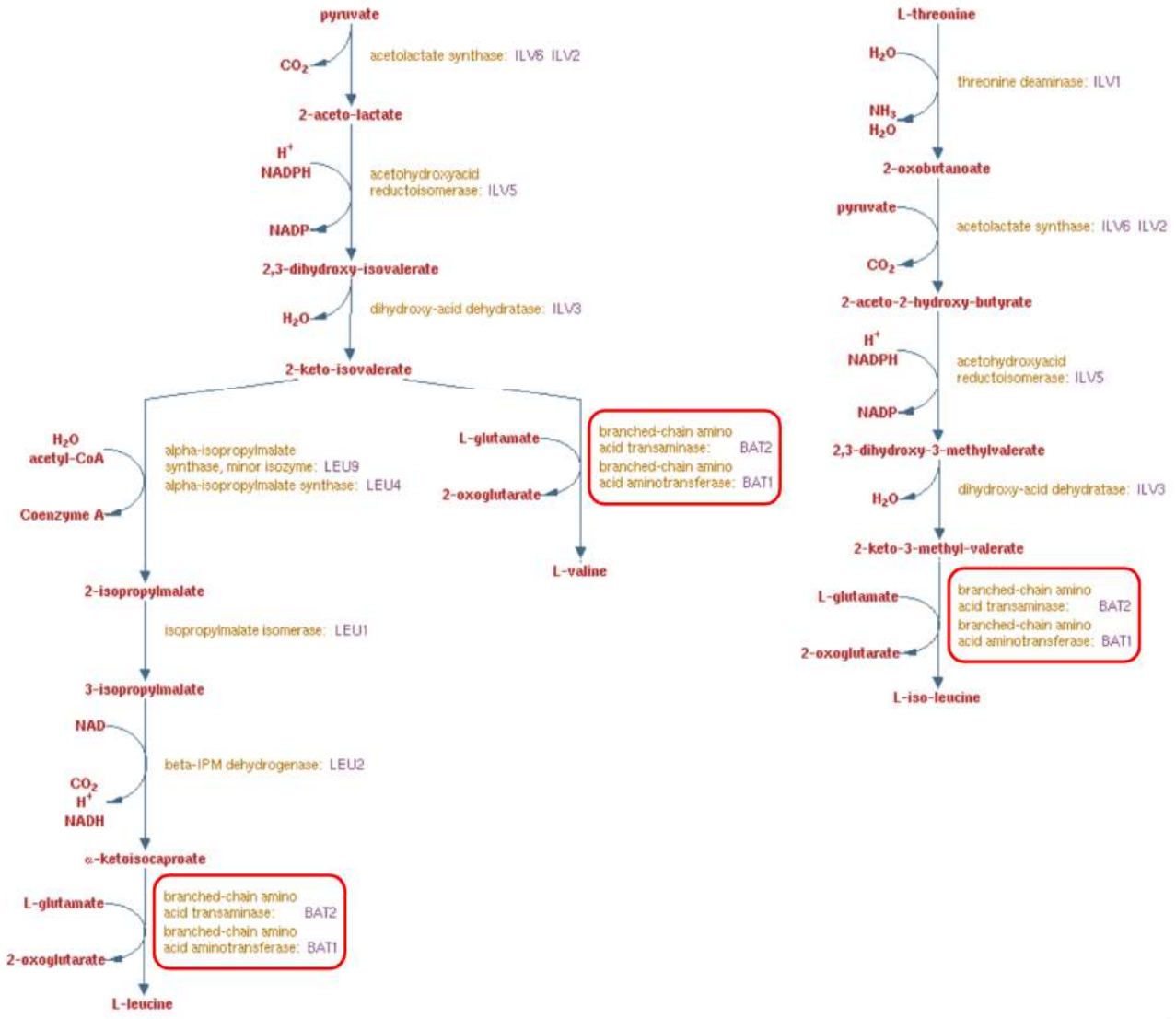


Figura 5. Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada en *Saccharomyces cerevisiae.* Bat1 y Bat2 son transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada que participan en la biosíntesis y el catabolismo de valina, isoleucina y leucina. En los recuadros rojos se resalta la reacción que catalizan las enzimas dentro de las vías (modificado de Saccharomyces Genome Database: https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2&detail-level=3&detail-level).

1.8. Divergencia funcional en las isoenzimas Bat1 y Bat2

Como se mencionó anteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* pasó por un evento de alopoliploidización que fue resultado de una hibridación interespecie entre las cepas relacionadas con el clado KLE y el clado ZT. El linaje que dio origen a *Kluyveromyces*

lactis divergió antes del evento de WGD y no experimentó posteriormente duplicaciones masivas en su genoma (Colón, 2011), por lo tanto *K. lactis* puede ser considerada como una de las cepas tipo ancestral de *Saccharomyces cerevisiae* y es utilizada en el estudio de genes ortólogos.

El gen *KlBAT1* codifica para la única transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (BCAT, por sus siglas en inglés) en *K. lactis.* La proteína comparte un 82% de identidad aminoacídica con Bat1 y un 79% con Bat2. Para entender si las enzimas Bat1 y Bat2 de *S. cerevisiae* son redundantes en la célula o si la función de la enzima tipo ancestral KlBat1 se encuentra distribuida entre estas dos enzimas, en el artículo publicado por Colón *et al.,* 2011, se evaluó la función fisiológica tanto de Bat1 y Bat2 como de KlBat1 y se compararon los resultados.

Para determinar el papel fisiológico de las enzimas Bat1 y Bat2 en el metabolismo de VIL, se construyeron dos mutantes sencillas *bat1Δ BAT2* y *BAT1 bat2Δ,* y una doble mutante *bat1Δ bat2Δ,* y se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada una en condiciones biosintéticas (amonio como única fuente de nitrógeno) y catabólicas (valina, leucina e isoleucina como únicas fuentes de nitrógeno). Los resultados demostraron una diversificación funcional en la actividad metabólica de las isoenzimas Bat1 y Bat2.

1.8.1. La enzima Bat1 es principalmente biosintética

El amonio es una fuente primaria de nitrógeno en *Saccharomyces cerevisiae.* Si hay suficiente amonio en el medio, la levadura lo asimila a través de la síntesis de aminoácidos. En la mutante *bat1Δ BAT2,* es decir, en ausencia de Bat1, la cepa fue deficiente en crecimiento cuando se cultivó en un medio que promueve la síntesis de VIL. Por el contrario, la mutante *BAT1 bat2Δ* conservó un fenotipo silvestre.

Al adicionar valina al medio, la mutante *bat1Δ BAT2* restauró su crecimiento, demostrando su auxotrofía a valina. Estos resultados sugieren que Bat1 tiene un rol principalmente biosintético, sobre todo en la síntesis de valina. La doble mutante, en cambio, requirió de la adición de valina, leucina e isoleucina simultáneamente para mostrar un fenotipo similar a la cepa silvestre (WT, por sus siglas en inglés), lo que implica que Bat2 es capaz de sintetizar parcialmente leucina e isoleucina en ausencia de

Bat1 (Colón *et al.,* 2011).

1.8.2. La enzima Bat2 es principalmente catabólica

Cuando las levaduras crecen en glucosa y VIL, es decir, en ausencia de amonio, la acumulación de aminoácidos en el citosol estimula el catabolismo de estos, produciéndose glutamato que, a través de su degradación vía Gdh2, sintetiza amonio que es reasimilado, para dar glutámico y glutamina. La mutante *BAT1 bat2Δ* redujo su velocidad de crecimiento en un 30% cuando se cultivó en un medio con VIL como única fuente de nitrógeno, es decir, en condiciones catabólicas. La mutante *bat1Δ BAT2,* en cambio, presentó un fenotipo silvestre en las mismas condiciones. Estos resultados indican que la enzima Bat2 tiene un carácter mayoritariamente catabólico en el metabolismo de los VIL (Colón, 2011).

Al agregar únicamente valina o isoleucina al medio de crecimiento, la *bat1Δ BAT2* continuó creciendo igual que la WT y la *BAT1 bat2Δ* creció deficientemente. Fue al agregar leucina como única fuente de nitrógeno que los fenotipos de las mutantes cambiaron: la *BAT1 bat2Δ* recuperó el fenotipo silvestre mientras que la *bat1Δ BAT2* decreció en un 20% (Colón, 2011).

1.8.3. La enzima KlBat1 es biosintética y catabólica

Por otro lado, se construyó una mutante *klbat1Δ* y se incubó en condiciones biosintéticas y luego catabólicas. En presencia de amonio como única fuente de nitrógeno, la mutante mostró auxotrofía a valina, isoleucina y leucina. Solo al agregar los tres aminoácidos simultáneamente, fue que la mutante restauró su crecimiento, demostrando el carácter biosintético de KlBat1 (Colón, *et al.,* 2011). La mutante tampoco creció al cultivarla en un medio con VIL sin amonio. Por ende, además de ser una enzima biosintética, KlBat1 participa en el catabolismo de los VIL.

1.8.4. La actividad enzimática de Bat1 y Bat2 correlaciona con su fenotipo

Para complementar estos datos, también se midió la actividad enzimática de los extractos proteicos obtenidos de las cepas WT, *bat1Δ BAT2* y *BAT1 bat2Δ* de *S. cerevisiae* y de la cepa WT de *K. lactis (Kl*WT) en glucosa amonio y/o VIL. Los resultados

coinciden con los fenotipos observados previamente. Se encontró que la actividad de transaminasa de Bat1 es mayor que la de Bat2 en glucosa amonio, mientras que en glucosa VIL, la actividad enzimática de Bat2 es superior con respecto a la de Bat1. Sorprendentemente, la actividad aminotransferasa de *Kl*WT fue 10 veces mayor en glucosa amonio que en glucosa VIL (Figura 6).

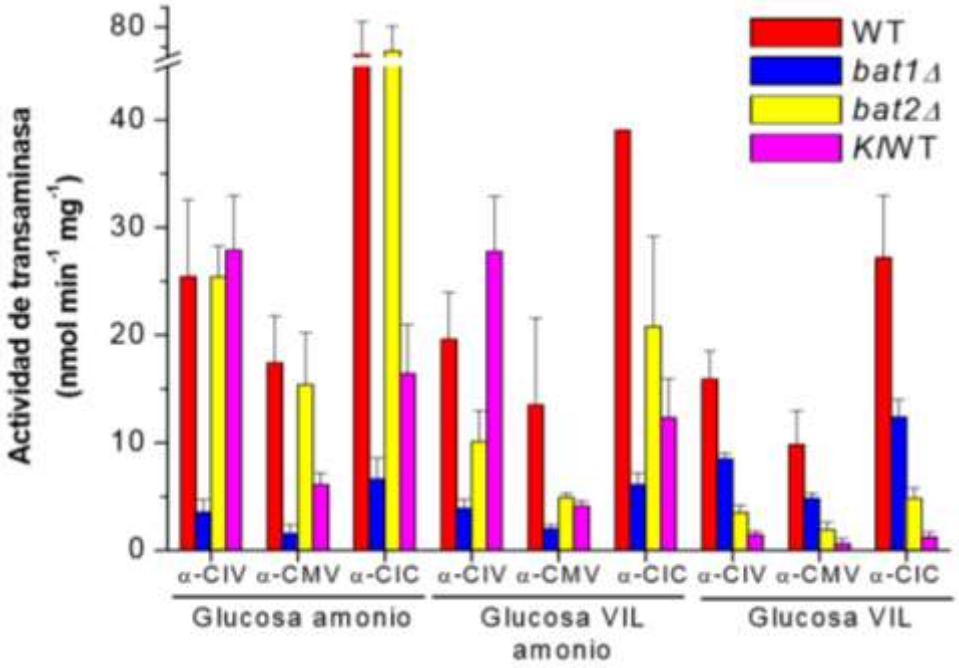


Figura 6. Actividad de transaminasa de Bat1 y Bat2 en glucosa amonio y/o VIL. Resultados de la medición de la actividad enzimática de Bat1 y Bat2 usando los tres sustratos de las enzimas (α-KIV, α-KIC y α-KMV) en condiciones biosintéticas y/o catabólicas. Para la determinación de la actividad de los extractos proteicos se realizó un ensayo acoplado al complejo enzimático de la α-cetoglutarato deshidrogenasa. En la gráfica se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres repeticiones (Colón, 2011).

Tomando en cuenta estos resultados, se puede asegurar que los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* pasaron por un proceso de subfuncionalización a partir del ortólogo de tipo ancestral. No obstante, el tipo de diversificación que llevaron a cabo pudo haber sido a nivel **cinético**, **transcripcional** o de **localización subcelular**.

1.9. Parámetros cinéticos de KlBat1, Bat1 y Bat2

Para determinar si la divergencia en los parálogos *BAT1* y *BAT2* se encontraba en las propiedades cinéticas de sus proteínas, se midió la actividad de transaminasa de KlBat1,

Bat1 y Bat2 utilizando los sustratos de estas enzimas. Resultados preliminares del laboratorio de la Dra. Alicia González demuestran que las enzimas KlBat1, Bat1 y Bat2 se comportan de manera muy similar en ensayos *in vitro*.

Los productos de las reacciones de transaminación son VIL y α-cetoglutarato. Al hacer un ensayo acoplado a la reacción de la α-cetoglutarato deshidrogenasa, el α-cetoglutarato es usado como sustrato junto con Coenzima A y NAD^+ para producir succinil-CoA, CO_2 y NADH. De esta manera, es posible seguir directamente la reacción que catalizan las transaminasas midiendo la reducción de NAD^+ a NADH en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm durante determinado tiempo (Colón, *et al.,* 2011).

Con los datos obtenidos del ensayo acoplado, se calculó la velocidad máxima (V_{max}) y la afinidad por sustratos (K_m) de las proteínas purificadas y se observó que no existen diferencias significativas en la capacidad catalítica de las enzimas (datos no publicados). El comportamiento de las enzimas con respecto a sus sustratos es muy similar, por lo tanto, a nivel cinético, KlBat1, Bat1 y Bat2 no diversificaron.

1.10. Regulación transcripcional de *BAT1* y *BAT2*

En cuanto a su regulación transcripcional, los genes *BAT1* y *BAT2* sí diversificaron. En un ensayo tipo Northern, *BAT1* aumentó su expresión en condiciones biosintéticas y *BAT2* en condiciones catabólicas (Figura 7). Estos resultados coinciden con la actividad enzimática de las mutantes *bat1Δ BAT2* y *BAT1 bat2Δ*, de tal forma que los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* tienen perfiles de expresión opuestos. Es importante mencionar que *BAT2* aumentó su expresión hasta cinco veces en una mutante *bat1Δ BAT2* en un medio con glucosa y amonio, lo que podría significar que Bat2 compensa parcialmente la ausencia de Bat1 estando en un medio biosintético (Colón, 2011).

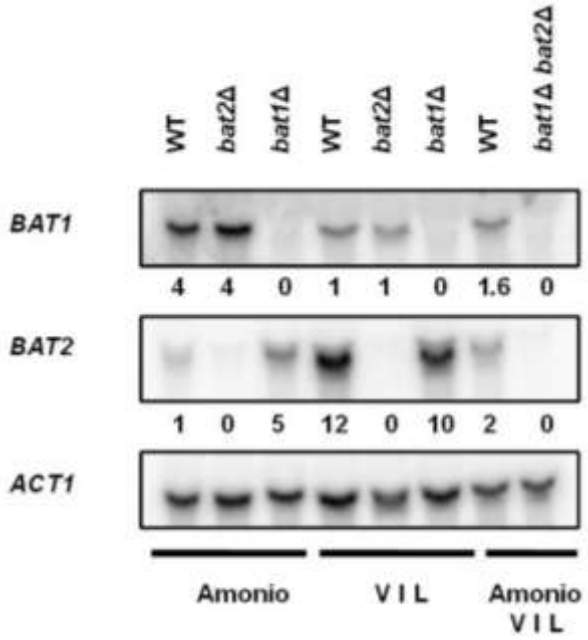


Figura 7. Perfiles de expresión de *BAT1* y *BAT2* en diferentes fuentes de nitrógeno. Ensayo tipo Northern de extractos de ARN a partir de cultivos de las cepas en fase exponencial crecidos en glucosa amonio y/o glucosa VIL. Se utilizó el gen *ACT1* (actina) como control de carga. Los números indican el nivel de expresión con respecto a la cepa silvestre (WT) en VIL, para el carril de *BAT1* o de la WT en Amonio, para el carril de *BAT2* (Colón, 2011).

Para analizar los mecanismos específicos de regulación que permitieron la subfuncionalización de los parálogos *BAT1* y *BAT2* se realizó un análisis más a fondo de la regulación transcripcional de los genes. En el artículo publicado por González-Flores *et al.,* 2017, se identificaron los cambios en la estructura de la cromatina y la configuración de los elementos de cada promotor involucrados en la expresión opuesta de los genes parálogos. En el caso de *BAT1,* la organización de la cromatina no es determinante en su expresión debido a que, tanto en glutamina como en VIL, los nucleosomas están posicionados de manera similar en su región promotora (Figura 8A). En *BAT2* en cambio, la caja *TATA* está protegida por un nucleosoma cuando se cultiva en glutamina, mientras que en VIL la caja *TATA* se encuentra libre de nucleosomas permitiendo la unión de factores de transcripción (Figura 8B).

Para determinar si los factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) que se unen a las regiones promotoras de *BAT1* y *BAT2* repercuten en la expresión de los parálogos, se construyeron mutantes nulas de los genes que conforman los sitios de unión a estos TFs. Aquellas mutantes que sí mostraron un efecto en el perfil de expresión

de *BAT1* y *BAT2* fueron: *gln3Δ, gcn4Δ, leu3Δ* y *put3Δ.* A partir de estos resultados se realizaron ensayos cuantitativos de inmunoprecipitación de la cromatina para determinar si los factores actúan de manera directa o indirecta en los promotores de los parálogos (González-Flores, 2017).

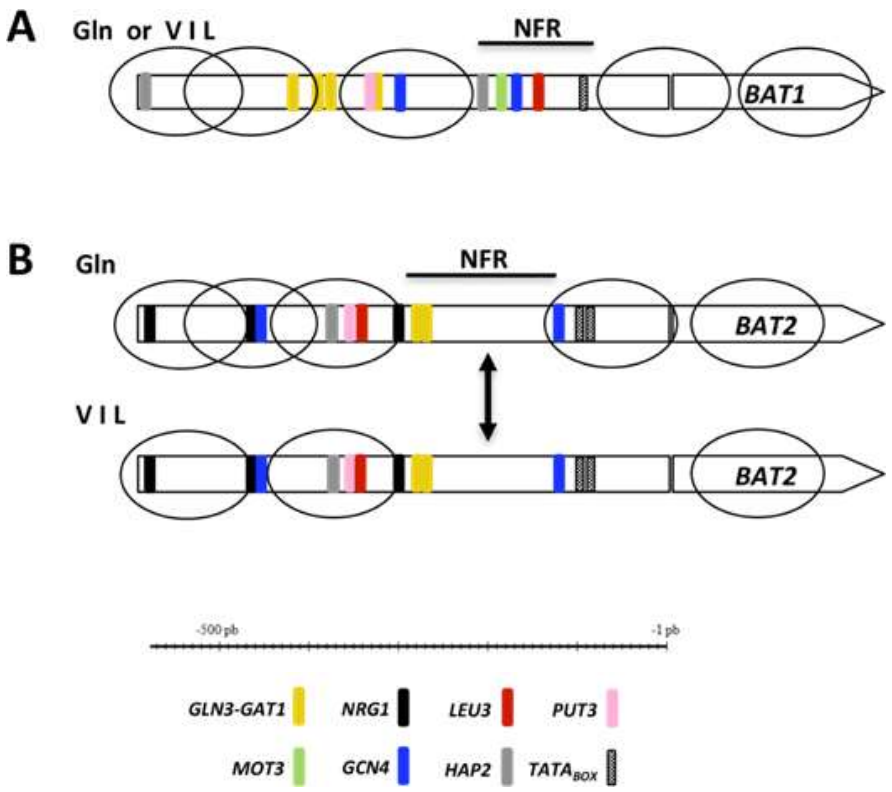


Figura 8. Configuración de la cromatina en los promotores de *BAT1* y *BAT2.* Los óvalos corresponden a los nucleosomas posicionados en los promotores. La estructura de la cromatina de *BAT1* no cambia al variar la fuente de nitrógeno. En *BAT2* en cambio, existe una remodelación de la cromatina cuando la fuente de nitrógeno cambia de glutamina a VIL. Se denota con NFR a la región libre de nucleosomas. Los sitios de unión a factores de transcripción se muestran en rectángulos coloreados (González-Flores, 2017).

1.10.1. Regulación transcripcional de BAT1

La concentración intracelular del α-isopropil malato (α-IPM) determina la función activadora o represora del factor de transcripción Leu3 sobre el promotor de *BAT1*.

El α-IPM tiene dos vías de biosíntesis: (1) en presencia de glutamina, se lleva a cabo la vía sensible a leucina Leu4/Leu9 que genera altas concentraciones de α-IPM permitiendo la formación del complejo Leu3-α-IPM que se une al promotor de *BAT1* e induce su expresión (2) en una mutante *put3Δ* en presencia de VIL, actúa la vía

insensible a leucina Bat2-Leu2-Leu1. Esta vía hace que disminuya la concentración intracelular de α-IPM inhibiendo la activación de Leu3 y por lo tanto reprimiendo la expresión de *BAT1*. Estos datos coinciden con el carácter biosintético observado en la enzima Bat1, que en presencia de VIL disminuye su velocidad de crecimiento y reprime la expresión de su gen (González-Flores et al., 2017).

1.10.2. Regulación transcripcional de BAT2

La calidad de la fuente de nitrógeno y la cantidad de aminoácidos disponibles determinan la acción de los reguladores Gln3 y Gcn4 sobre el promotor de *BAT2*.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de *BAT2* el posicionamiento de los nucleosomas cambia de acuerdo con la fuente de nitrógeno disponible. En presencia de fuentes primarias de nitrógeno (glutamina o amonio), los sitios de unión a Gln3 y Gcn4 se encuentran protegidos por nucleosomas, mientras que en fuentes secundarias de nitrógeno (VIL), GLN3 y GCN4 se encuentran en la región libre de nucleosomas (NFR, por sus siglas en inglés), lo que permite la activación transcripcional de *BAT2* a través de estos factores.

Gln3 se rige por la calidad de la fuente de nitrógeno. Cuando la fuente de nitrógeno es VIL, Gln3 se localiza en el núcleo y estando ahí activa a genes como *BAT2*, que están sujetos a la regulación negativa dependiente de glutamina. En cambio, Gcn4 actúa de acuerdo con la concentración intracelular de aminoácidos. Cuando existe una deprivación de aminoácidos generada por la ausencia de Leu3, la concentración de Gcn4 incrementa induciendo de esta manera la expresión de *BAT2* en condiciones biosintéticas.

1.11. Localización subcelular de Bat1 y Bat2

Además de diversificar en la regulación transcripcional de sus genes, las isoenzimas Bat1 y Bat2 divergieron en su localización subcelular.

Los genes *BAT1* y *BAT2* de S. cerevisiae se encuentran en cromosomas diferentes. *BAT1* está ubicado en el cromosoma VIII, mientras que *BAT2* se localiza en el cromosoma X. Las enzimas codificadas por estos genes también se localizan en compartimentos subcelulares distintos. Bat1 contiene una secuencia de translocación

mitocondrial (MTS, por sus siglas en inglés), en el extremo N-terminal que la localiza en la matriz mitocondrial en cambio Bat2 no contiene una secuencia señal que la ubique en algún organelo, por lo que permanece en el citosol de la levadura (Kispal et al., 1996).

La relocalización subcelular de proteínas es un evento recurrente durante las etapas tempranas de duplicación de un genoma. Dado que los péptidos señal no contienen secuencias consenso, la sola sustitución de un aminoácido en el extremo N-terminal de una proteína puede resultar en su relocalización (Byun-McKay & Geeta, 2007). Por lo tanto, una simple mutación puntual durante la duplicación del genoma es suficiente para modificar la localización de una proteína y es esa relocalización la que puede finalmente alterar su función como consecuencia de su adaptación a un nuevo ambiente metabólico.

En el citosol de S. cerevisiae, por ejemplo, se acumulan los aminoácidos, mientras que en la mitocondria se acumulan los precursores de estos aminoácidos (Colón, 2011). Por lo tanto, es posible que el carácter catabólico de Bat2 (ubicada en el citosol) se deba a la disponibilidad de valina, leucina e isoleucina en el citosol, que son los sustratos de la enzima; y que el perfil biosintético de Bat1 (localizada en la mitocondria) sea resultado de la acumulación de α-cetoácidos en la red mitocondrial (Figura 9).

Para analizar esto, es importante tomar en cuenta que en S. cerevisiae, el transporte de VIL es llevado a cabo por la permeasa general de aminoácidos Gap1, y las permeasas de aminoácidos de cadena ramificada Bap2 y Bap3 (Grauslund et al., 1995; Didion et al., 1996). El carácter diferencial dependiente de la disponibilidad de sustratos de las aminotransferasas, por lo tanto, podría variar al cambiar su localización subcelular o permanecer igual si estas permeasas de VIL mantienen los sustratos cerca de sus respectivas enzimas, compensando su relocalización.

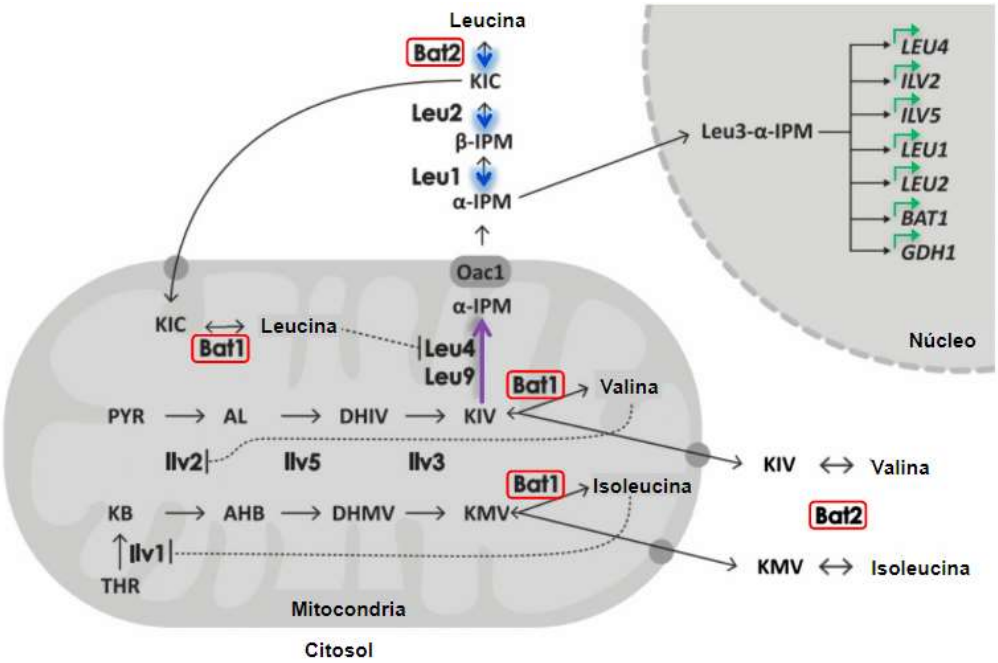


Figura 9. Localización subcelular de las enzimas que participan en la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada y sus sustratos en *S. cerevisiae*. Las enzimas Bat1 y Bat2 de *S. cerevisiae* se encuentran en compartimentos subcelulares diferentes. En la mitocondria la disponibilidad de α-cetoácidos es mayor, mientras que en el citosol se acumulan los aminoácidos de cadena ramificada (modificado de González-Flores, 2017).

Para estudiar el rol de las aminotransferasas en la biosíntesis de valina, Takpho *et al.,* 2018 relocalizaron a la enzima Bat2 de *S. cerevisiae* en mitocondria en un fondo genético *bat1Δ bat2Δ* y observaron que la presencia de la enzima logró restaurar el crecimiento de la doble mutante al mismo nivel que una cepa silvestre. La relocalización de la Bat1 al citosol, en cambio, resultó en un fenotipo *bat1Δ BAT2* que disminuyó el crecimiento celular vía síntesis de valina. Los resultados demuestran que la levadura requiere de una transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada dentro de la mitocondria, ya sea Bat1 o Bat2, para lograr una síntesis efectiva de valina.

Por último, es importante mencionar que la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada de la cepa tipo ancestral, *Kl*Bat1, se encuentra localizada en el núcleo (López, 2011). Esta enzima tiene la doble función, biosintética y catabólica, que se encuentra distribuida en Bat1 y Bat2, respectivamente, lo que sugiere que la localización diferencial de las isoenzimas de *S. cerevisiae* contribuyó a su subfuncionalización.

2. JUSTIFICACIÓN

El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* proviene de un evento de duplicación completa del genoma (WGD), de los pares de genes duplicados conservados, algunos divergieron funcionalmente logrando una regulación metabólica más sofisticada, permitiendo un metabolismo fermentativo. Uno de los mecanismos de diversificación más común en los pares duplicados fue la relocalización subcelular de proteínas, que puede estar relacionada con nuevas funciones a raíz de su exposición a un contexto metabólico distinto.

Las aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada codificadas por los genes parálogos *BAT1* y *BAT2* son un ejemplo de este fenómeno. Si bien, las enzimas Bat1 de localización mitocondrial, y Bat2 de localización citosólica se generaron por un evento de duplicación, favorecen un comportamiento biosintético y catabólico, respectivamente. Esto sugiere que su localización subcelular podría estar relacionada con su función biológica, por lo que el objetivo de este proyecto es determinar la implicación fisiológica que genera la relocalización subcelular al citosol de la enzima paráloga Bat1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Los cambios fisiológicos que se observen en las cepas resultantes permitirán establecer una relación entre la relocalización subcelular de las proteínas parálogas y su diversificación funcional.

3. OBJETIVOS

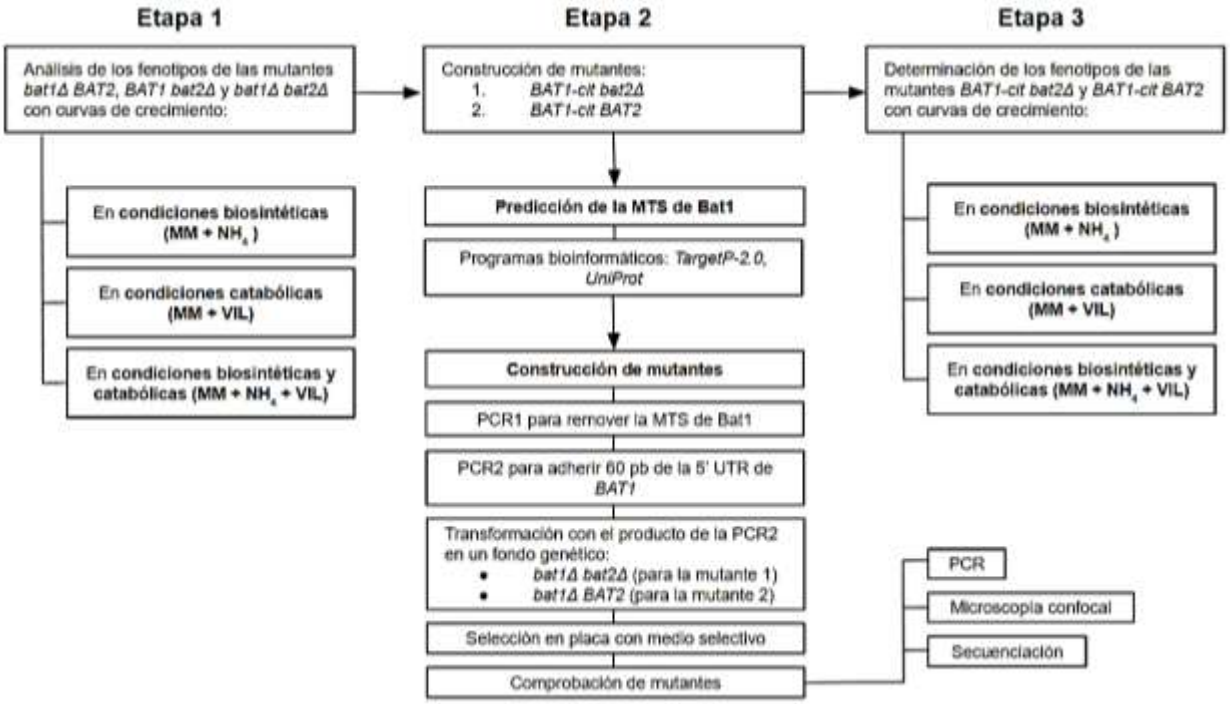
3.1. Objetivo general

Determinar la importancia de la compartimentación subcelular de Bat1 en la divergencia funcional de enzimas parálogas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos específicos

- Analizar el fenotipo de las mutantes *bat1Δ BAT2, BAT1 bat2Δ* y *bat1Δ bat2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* construidas por Colón *et al.,*2011.
- Relocalizar a la proteína mitocondrial Bat1 en el citosol, en un fondo genético *bat1Δ bat2Δ* y en un fondo genético *bat1Δ BAT2* de *S. cerevisiae* para obtener las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2.*
- Estudiar el fenotipo de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2*, en las condiciones pertinentes a su función, y compararlo con el fenotipo de las cepas que mantienen la localización autóctona de sus enzimas.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico para cada determinación.

5.2. Material biológico

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y sus mutantes utilizadas en este trabajo se describen a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

CÓDIGO Y REFERENCIA	GENOTIPO	DESCRIPCIÓN Y USO
BAT1 BAT2 (CLA 1-2) - Quezada *et al.,* 2008	*MATα BAT1 BAT2 ura3 leu2::LEU2*	Cepa silvestre de *S. cerevisiae* con auxotrofía a uracilo. Utilizada como control en la determinación de los fenotipos de las mutantes.
bat1Δ BAT2 (CLA31) - Colón *et al.,* 2011	*MATα bat1Δ:: kanMX4 BAT2 ura3 leu2::LEU2*	Mutante sencilla con deleción en el gen de Bat1. Utilizada como fondo genético en la transformación para obtener la mutante *BAT1-cit BAT2* y como control en la determinación de los fenotipos de las mutantes.
BAT1 bat2Δ (CLA32) - Colón *et al.,* 2011	*MATα BAT1 bat2Δ:: kanMX4 ura3 leu2::LEU2*	Mutante sencilla con deleción en el gen de Bat2. Utilizada como control en la determinación de los fenotipos de las mutantes.
bat1Δ bat2Δ (CLA33) - Colón *et al.,* 2011	*MATα bat1Δ::NAT bat2Δ:: kanMX4 ura3 leu2::LEU2*	Mutante doble con deleción en los genes de Bat1 y Bat2. Utilizada como fondo genético en la transformación para obtener la mutante *BAT1-cit bat2Δ* y como control en la determinación de los fenotipos de las mutantes.
BAT1-yECit BAT2 - Flores, 2012	*MATα BAT1*-yECitrine-URA3 *BAT2 leu2::LEU2*	Cepa silvestre con la proteína Bat1 etiquetada con yECitrine. Utilizada como ADN molde en la construcción de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y

		BAT1-cit BAT2 y como control en la observación de localización de proteínas en microscopio confocal.
BAT1 BAT2-yECit - Flores, 2012	*MATα BAT1 BAT2*-yECitrine-URA3 *leu2::LEU2*	Cepa silvestre con la proteína Bat2 etiquetada con yECitrine. Utilizada como control en la observación de localización de proteínas en microscopio confocal.
BAT1-cit bat2Δ - Este trabajo	*MATα BAT1*(-18aa)-yECitrine-URA3 *bat2Δ::kanMX4 leu2::LEU2*	Mutante con la proteína Bat1 etiquetada con yECitrine y relocalizada en el citosol, en un fondo genético *BAT1 bat2Δ.*
BAT1-cit BAT2 - Este trabajo	*MATα BAT1*(-18aa)-yECitrine-URA3 *BAT2 leu2::LEU2*	Mutante con la proteína Bat1 etiquetada con yECitrine y relocalizada en el citosol.

Los oligonucleótidos empleados para la construcción y comprobación de las mutantes se describen en la Tabla 2 en el orden en que fueron usados:

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

CÓDIGO Y REFERENCIA	SECUENCIA (5' ⟶ 3')	DESCRIPCIÓN
D1: FwBAT1-MTS - Este trabajo	ACTGGTGCCCCATTAGATGCATCC	Contiene la secuencia que recombina 54 pb río abajo del codón de inicio de *BAT1.*
D16: Rv-3UB1Int - Este trabajo	GGATTCTTCCATTGACAGAAGAC	Contiene la secuencia que se une a la 3' UTR de *BAT1.*
D2: FwBAT1-MTS+5'BAT1 - Este trabajo	ttcgttagaataaatcaccctataaacgcaaaatc agctagaaccttagcatactaaaacATGACT GGTGCCCCATTAGATGCATCC	Contiene la secuencia que recombina río arriba del codón de inicio de *BAT1* (minúsculas), y la secuencia que se une 54 pb río abajo del codón de inicio de *BAT1* (mayúsculas); más el condón de inicio de *BAT1* (ATG).
D1, D16 y **D2** amplifican el módulo de *BAT1* (sin secuencia señal) unido a yECitrine-URA3 que se utilizó para construir a las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2.*		
D5: FwBAT1citConf - Este trabajo	ATGATCTTACTGATAGAGGC	Contiene la secuencia que recombina 298 pb río arriba del codón de inicio de BAT1.

D6: RvBAT1citConf - Este trabajo	GTTCTGTAGGCTTTCAAACC	Contiene la secuencia que recombina 302 pb río abajo del codón de inicio de BAT1.
D5 y **D6** amplifican la región cercana a la MTS de *BAT1* (54 pb) para comprobar, por diferencia de número de bases, que se eliminó dicha secuencia de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2.*		

5.3. Equipos

Los equipos utilizados para llevar a cabo la metodología de este trabajo se describen a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los equipos.

EQUIPO	MARCA	MODELO
Balanza	OHAUS	ADVENTURER PRO AV412
Balanza	OHAUS	DIAL-O-GRAM
Autoclave	TOMY	SS-325E
Autoclave	LAB MEDO	UNO
Incubadora	NEW BRUNSWICK SC	G-25
Incubadora	GENERAL ELECTRIC	805
Incubadora con agitación	EPPENDORF	HAMBURG 22331
Refrigerador	AMERICAN	RC-600
Congelador	GS LABORATORY	REF2117A14
Ultracongelador	PUFFER HUBBARD	ICF9007A14
Ultracongelador	SANYO	ULTRA LOW
Peachímetro	THERMO SCIENTIFIC	ORION STAR A111
Vórtex	SCIENTIFIC INDUSTRIES	VORTEX-GENIE 2
Agitador	NEW BRUNSWICK	G10
Centrífuga	BECKMAN COULTER	AVANTI J-26 XPI
Centrífuga	BECKMAN COULTER	GS- 6KR
Centrífuga	EPPENDORF	5415 D
Espectrofotómetro	THERMO SCIENTIFIC	GENESYS 20
Espectofotómetro Nanodrop	THERMO SCIENTIFIC	NANODROP 2000

Termociclador	BIO RAD	T100 THERMAL CYCLER
Cámara de electroforesis	ACCESOLAB	PHU13
Fuente de alimentación para electroforesis	BIO RAD	POWERPAC HC
Transiluminador	UVP	BENCHTOP UV
Microscopio confocal	ZEISS	LSM 800

5.4. Métodos

Los métodos que se siguieron para llevar a cabo la metodología de este trabajo se muestran a continuación en el orden en que fueron realizados (Tabla 4).

Tabla 4. Métodos empleados para las diferentes determinaciones.

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Cálculo de la velocidad de crecimiento de levaduras a partir de sus curvas de crecimiento.	Turbidimetría: medición de la absorbancia (DO) del cultivo de levaduras durante 24 horas.	Colón *et al.,* 2011
Extracción de ADN genómico	Fenol- cloroformo- alcohol isoamílico	Sambrook *et al.,* 2001
Amplificación de fragmentos de ADN	PCR	Storici *et al.,* 2001
Cuantificación de ADN	Espectrofotometría de microvolumen	NanoDrop Technologies, 2012
Separación y análisis de moléculas de ADN (gADN y fragmentos de PCR)	Electroforesis en gel de agarosa	Sharp *et al.,* 1973
Purificación de ADN de PCRs	Desnaturalización de proteínas, adsorción de ADN a la membrana de la columna, lavado de etanol para remover sales y otros contaminantes, elución del ADN con Tris-HCl.	Vogelstein & Gillespie, 1979; Marko *et al.,* 1982
Construcción de mutantes por recombinación homóloga	Transformación de levaduras con acetato de litio	Storici *et al.,* 2001
Selección de mutantes en placa	Selección por auxotrofía a aminoácidos	Colón *et al.,* 2011
Observación de mutantes marcadas con proteínas fluorescentes	Microscopía confocal	Pemberton, 2014

6. METODOLOGÍA

ETAPA 1

6.1. Análisis de los fenotipos de las mutantes control

Las mutantes construidas por Colón, *et al.*, 2011 (Tabla 1), fueron utilizadas en la construcción de las nuevas mutantes. Fue por eso necesario realizar curvas de crecimiento y verificar que el comportamiento fisiológico de las mutantes coincidiera con el fenotipo reportado.

Para realizar las curvas de crecimiento, las cepas se crecieron en medio mínimo (MM) con sales, elementos traza y vitaminas (Anexo 4). Se adicionó uracilo (20mg/L) para complementar la auxotrofía de las cepas, además de glucosa 2% como fuente de carbono y sulfato de amonio (40mM) y/o valina (150mg/L), isoleucina (30mg/L) y leucina (100mg/L) como fuente de nitrógeno según fue el caso:

- En condiciones biosintéticas: MM ura glucosa + **amonio**
- En condiciones catabólicas: MM ura glucosa + **VIL**
- En condiciones biosintéticas y catabólicas: MM ura glucosa + **amonio + VIL**

Todos los cultivos se incubaron a 30°C, 560xg. Se midió la densidad óptica (DO) de cada cepa a 600 nm cada dos horas durante 24 horas para trazar su curva de crecimiento en una escala semilogarítmica. Posteriormente, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ), a partir del valor de la pendiente (m) en la fase exponencial de la curva de crecimiento y el tiempo de duplicación (td) en horas, con las siguientes fórmulas:

$$td = \frac{log2}{m} \mu = \frac{ln2}{td}$$

ETAPA 2

6.2. Construcción de mutantes

6.2.1. Descripción de la mutante *BAT1-yECit BAT2*

Las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2,* que contienen a la proteína Bat1

relocalizada en el citosol, se construyeron a partir de la mutante *BAT1-yECit BAT2* (Tabla 1, Anexo 1). Esta mutante fue utilizada en el proyecto porque contiene a la proteína Bat1 etiquetada con yECitrine, una proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) utilizada como marcador de localización de Bat1 al observarse en microscopio confocal.

La cepa *BAT1-yECit BAT2,* se construyó a partir del plásmido pKT0175 que contiene al gen *URA3* (gen que cura la auxotrofía a uracilo) como marcador de selección (Figura 10). La mutante se construyó amplificando la región del pKT0175 que contiene el casete de *yECitrine-URA3* flanqueado por 60 pb del ORF de *BAT1* y 60 pb del 3' UTR de *BAT1.* El producto de PCR fue purificado y utilizado en la transformación de la cepa silvestre CLA1-2. Las transformantes se seleccionaron en MM con sulfato de amonio y VIL.

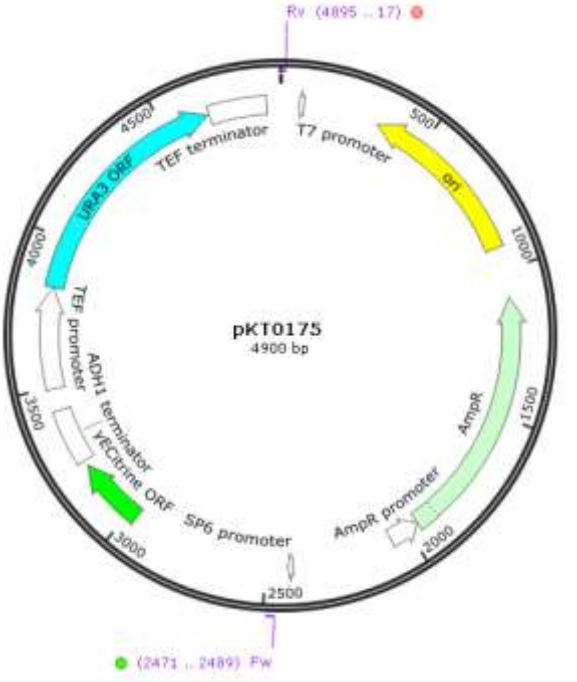


Figura 10. Mapa del plásmido pKT0175. La mutante *BAT1-yECit BAT2* se etiquetó con la proteína fluorescente verde obtenida del plásmido pKT0175. Los oligonucleótidos *Fw* y *Rv* (en morado) fueron utilizados para amplificar el casete de *yECitrine-URA3* empleado en la transformación de la cepa silvestre (SnapGene software de GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

6.2.2. Predicción de la secuencia de translocación mitocondrial de Bat1

Para relocalizar a la proteína Bat1 en el citosol, primero fue necesario establecer la secuencia de translocación mitocondrial de la proteína. Las MTS suelen ser péptidos de

10 a 90 residuos aminoacídicos de longitud que se encuentran en el extremo N-terminal de la secuencia proteica. Generalmente tienen un alto contenido de arginina y una clara ausencia de residuos aminoacídicos cargados negativamente. Se caracterizan por formar estructuras en α-hélice con residuos hidrofóbicos de un lado y residuos con carga positiva del otro (Fukasawa *et al.,* 2015).

Se usó el programa bioinformático *TargetP-2.0*, un servidor que predice los péptidos señal del extremo N-terminal y su posible sitio de corte basándose en las características antes mencionadas. La predicción mostró una MTS de 17 residuos aminoacídicos para Bat1, con un sitio de corte en el aminoácido leucina (Figura 11). Adicionalmente, se utilizó el programa de base de datos de secuencias proteicas *UniProt* que arrojó resultados similares.

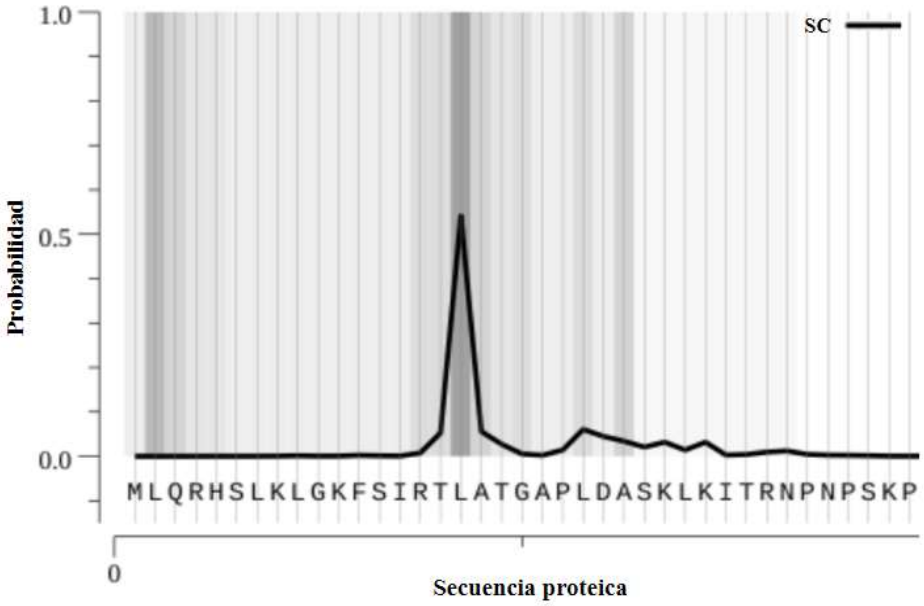


Figura 11. Predicción del servidor *TargetP-2.0.* La gráfica muestra una mayor probabilidad de sitio de corte (**SC**) en el aminoácido número 17, indicando que la MTS es de 17 aminoácidos (modificado de TargetP: http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/).

6.2.3. Construcción de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2*

La construcción de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* se llevó a cabo mediante mutagénesis de sitio dirigido. Para obtener el módulo que se utilizó en la transformación de las cepas, fue necesario realizar dos PCRs. En la PCR1 se usó la mutante *BAT1-yECit BAT2* como molde de gADN (Anexo 5), para conservar el casete de

yECitrine-URA3; y los oligonucleótidos D1 y D16, con la finalidad de eliminar la secuencia de translocación mitocondrial que localiza a Bat1 en la matriz mitocondrial (Figura 12A). Los análisis de predicción de la MTS para Bat1 indicaron una secuencia de entre 16 y 17 residuos aminoacídicos de longitud. Estudios previos han reportado la relocalización exitosa de Bat1 en el citosol con la remoción de 18 residuos aminoacídicos (Takpho *et al.,* 2018), por lo que en este trabajo se removieron 18 (54 pb) para asegurar la relocalización de la proteína.

Se llevó a cabo una segunda PCR usando como molde el producto de la PCR1 (4286 pb) con el objetivo de adherir la 5' UTR de *BAT1* (60 pb). Para ello se usaron los oligonucleótidos D2 (que contiene la región homóloga a la 5' UTR de *BAT1)* y D16 (Figura 12B). El producto de la PCR2 (4346 pb) fue purificado y utilizado en la transformación de la cepa ***bat1Δ bat2Δ*** para obtener la mutante *BAT1-cit bat2Δ* y de la cepa ***bat1Δ BAT2*** para obtener la mutante *BAT1-cit BAT2*. La transformación con acetato de litio (Anexo 6) permitió la inserción por recombinación homóloga del módulo de interés. Las colonias transformadas se seleccionaron creciendo en ausencia de uracilo en un MM con sulfato de amonio y VIL. Se realizaron tres pases por colonia cada tercer día en el medio selectivo para asegurar la prevalencia de la mutación.

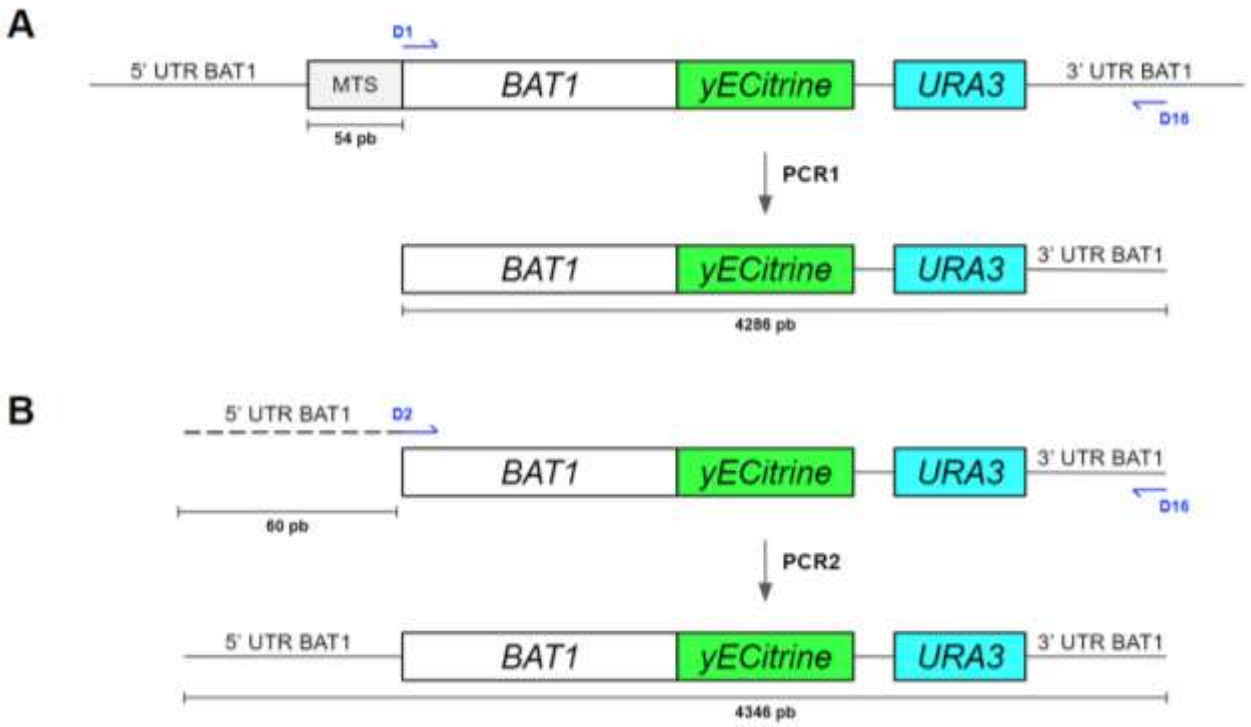


Figura 12. PCRs para la obtención del módulo de interés. (A) Se utilizó la mutante *BAT1-yECit BAT2* como ADN molde en la PCR1. Con los oligonucleótidos D1 y D16 (en azul) se amplificó el gen de *BAT1* sin su MTS (54 pb). **(B)** Para la PCR2 se utilizó el producto de la PCR1 como molde de ADN. El oligonucleótido D2 se usó para adherir 60 pb complementarias a la región 5' UTR de *BAT1* al módulo de interés (4346 pb) que finalmente fue utilizado en la transformación de las cepas (elaboración propia).

6.2.4. Comprobación de mutantes

Para asegurar la correcta construcción de las mutantes, antes de determinar sus fenotipos, se llevaron a cabo PCRs de confirmación utilizando los oligonucleótidos de comprobación D5 y D6 descritos en la Tabla 2. A continuación, se realizó microscopía confocal para verificar la fluorescencia emitida por las proteínas etiquetadas de las cepas *BAT1-yECit BAT2* y *BAT1 BAT2-yECit* (Tabla 1). La obtención de estas imágenes permitió comparar la localización en mitocondria y citosol de Bat1 y Bat2, respectivamente, con la nueva localización de Bat1 en las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2*. Finalmente se mandó a secuenciar el ORF completo de *BAT1* para descartar mutaciones adicionales.

6.3. Determinación de fenotipos de mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2*

Por último, se realizaron curvas de crecimiento de las mutantes construidas empleando

la misma metodología descrita en el apartado 6.1 y se compararon los fenotipos resultantes con las cepas control para determinar el significado funcional de la localización de la proteína Bat1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Bat1 posee un carácter biosintético y Bat2 uno catabólico

Para comprobar el fenotipo de las mutantes control, se realizaron curvas de crecimiento de las mutantes isogénicas *bat1Δ BAT2* y *BAT1 bat2Δ,* y de la doble mutante *bat1Δ bat2Δ* en medios que promueven la biosíntesis o el catabolismo de VIL y se calculó su velocidad específica de crecimiento (μ).

Los resultados concuerdan con los datos reportados por Colón *et al,* 2011. Como se observa en la Figura 13, en glucosa amonio, la mutante *bat1Δ BAT2* disminuye su velocidad específica de crecimiento en un 50% con respecto a la cepa silvestre, y la *BAT1 bat2Δ.* En cambio, en glucosa VIL, la mutante *BAT1 bat2Δ* es la que se ve afectada hasta en un 40% en comparación con la *BAT1 BAT2* y la *bat1Δ BAT2.* Por otro lado, la doble mutante requiere de ambas fuentes de nitrógeno para mostrar crecimiento, lo que demuestra que no hay vías de biosíntesis o catabolismo alternas que compensen la falta de Bat1 y Bat2 en el metabolismo de VIL.

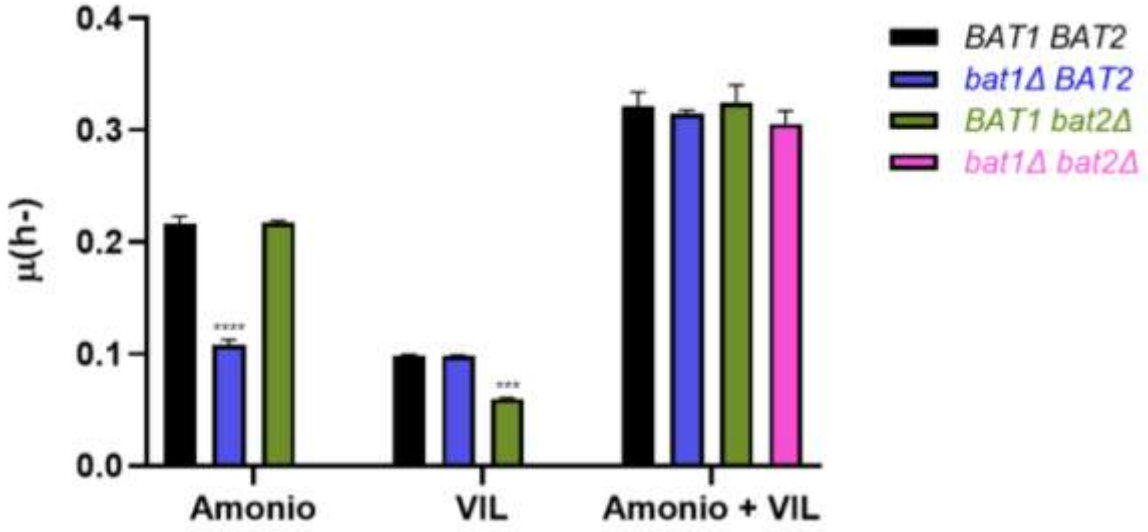


Figura 13. Velocidad específica de crecimiento de las mutantes control. La deficiencia en crecimiento que se observa en la mutante *bat1Δ BAT2* en glucosa amonio demuestra el papel principal de Bat1 en la biosíntesis de aminoácidos. La mutante *BAT1 bat2Δ,* en cambio, disminuye su μ al encontrarse en condiciones catabólicas, indicando el rol fundamental de Bat2 en el catabolismo de VIL. En la gráfica se presenta el promedio y desviación estándar de dos replicas. [****]= P<0.0001, [***]= P<0.001.

Estos datos confirman lo antes mencionado. La única BCAT de *K. lactis* es una

enzima bifuncional que participa tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de VIL. En *S. cerevisiae,* en cambio, la función doble del gen ancestral se repartió en las proteínas parálogas Bat1 y Bat2, haciendo a Bat1 más biosintética y a Bat2 más catabólica.

7.2. Relocalización de Bat1 en el citosol

La remoción de los 18 residuos aminoacídicos (54 pb) de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* se comprobó primero por PCR (Figura 14). Posteriormente, se mandó a secuenciar el ORF completo del gen de *BAT1* en ambas cepas para confirmar lo observado en el gel.

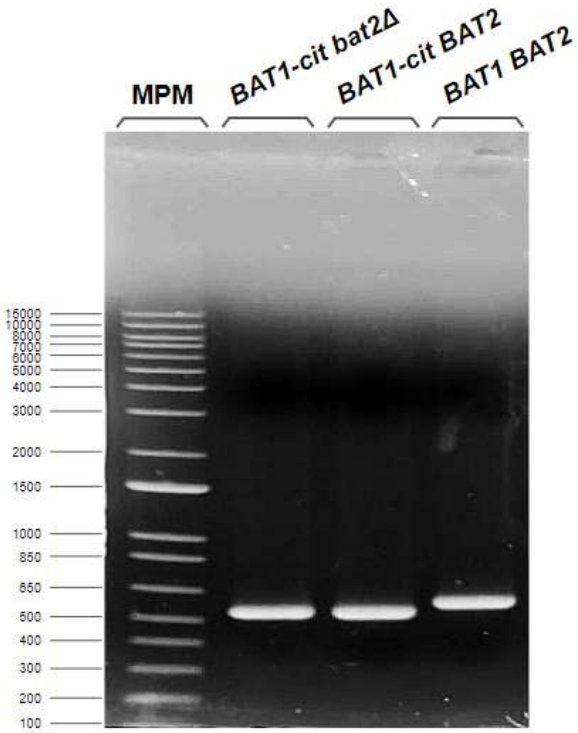


Figura 14. Comprobación de la remoción de la MTS por PCR. Basándose en los pares de bases delimitados por el marcador de peso molecular (MPM), las bandas de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* muestran una clara diferencia de 54 pb menos en comparación con la banda de la cepa silvestre. Se utilizaron los oligonucleótidos de comprobación D5 y D6 descritos en la Tabla 2. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

A continuación, se hizo uso del microscopio confocal LSM800 (Tabla 3). Las imágenes obtenidas, tanto de las nuevas mutantes como de los controles, coincidieron

con los resultados esperados (Figura 15).

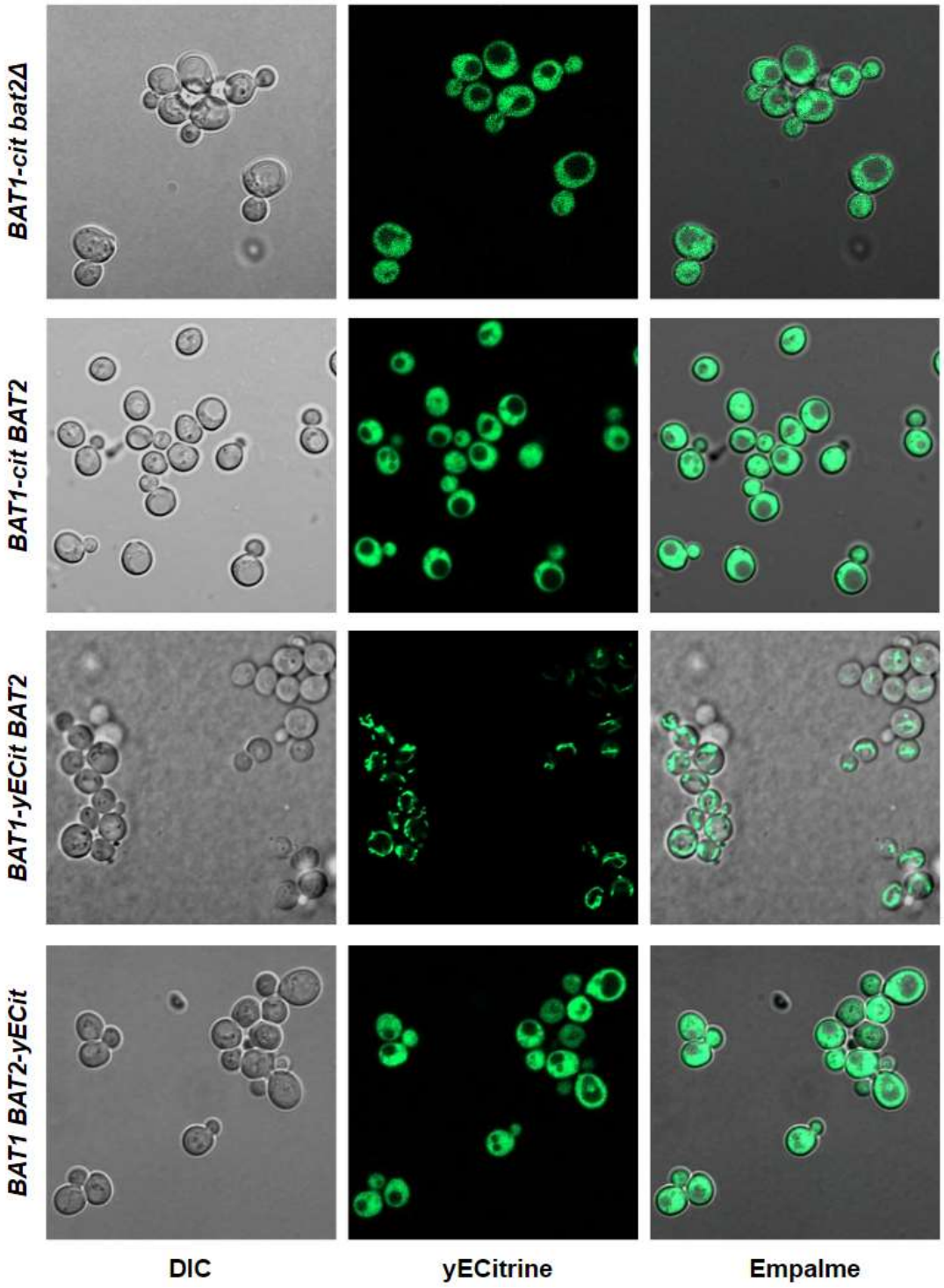


Figura 15. Comprobación de la localización subcelular de Bat1 y Bat2 por microscopía confocal. Las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2,* que contienen a la proteína Bat1 sin MTS y etiquetada con yECitrine, emiten fluorescencia en el citosol de la célula. El patrón de fluorescencia es el mismo que el

observado en la mutante *BAT1 BAT2-yECit,* donde la proteína etiquetada con yECitrine (Bat2) se encuentra en el citosol. La mutante *BAT1-yECit BAT2* solo emite fluorescencia en la red mitocondrial de la levadura, lugar donde se ubica Bat1 en una WT. Las muestras fueron tomadas de cultivos crecidos en MM glucosa amonio en fase exponencial (Anexo 7).

La relocalización de Bat1 al citosol se logró removiendo los primeros 18 residuos aminoacídicos de la proteína. Esto reafirma lo predicho por los servidores bioinformáticos y abre la posibilidad de adherir esos 54 pb de Bat1 en el extremo N-terminal de Bat2 para relocalizar ahora a Bat2 en la mitocondria.

Es importante mencionar que se utilizó el servidor en línea *I-TASSER* para realizar las predicciones estructurales de la proteína con y sin los 18 residuos de aminoácidos. Los modelos sugieren que es poco probable que la remoción de la secuencia de translocación mitocondrial haya afectado el plegamiento de la proteína y por lo tanto su función (Anexo 2).

7.3. Bat1 es biosintética también en el citosol

Para analizar el rol fisiológico de Bat1 en el citosol, se determinó la velocidad específica de crecimiento de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* en diferentes medios.

En glucosa amonio, ambas mutantes crecieron igual a una WT (Figura 16A, B). Si se comparan con las cepas control, las nuevas mutantes *BAT1-cit bat2Δ* ($\mu = 0.293\ h^{-1}$) y *BAT1-cit BAT2* ($\mu = 0.315\ h^{-1}$) tienen una velocidad de crecimiento similar a la cepa silvestre *BAT1 BAT2* ($\mu = 0.314\ h^{-1}$). El mismo fenotipo silvestre se observa en una mutante *BAT1 bat2Δ* ($\mu = 0.301\ h^{-1}$). Es decir, la biosíntesis de VIL, llevada a cabo principalmente por Bat1 en la mitocondria, se mantuvo tras su relocalización en el citosol, aun en ausencia de Bat2. En este sentido, vale la pena considerar que, si la localización citosólica de Bat1 resultara en un incremento de la capacidad enzimática de esta proteína, esto no podría ser valorado utilizando como criterio la velocidad de crecimiento de la *BAT1-cit bat2Δ*, comparada con la desplegada por la cepa WT, ya que ambas presentan la misma velocidad de crecimiento. En este caso sería necesario determinar la concentración intracelular de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

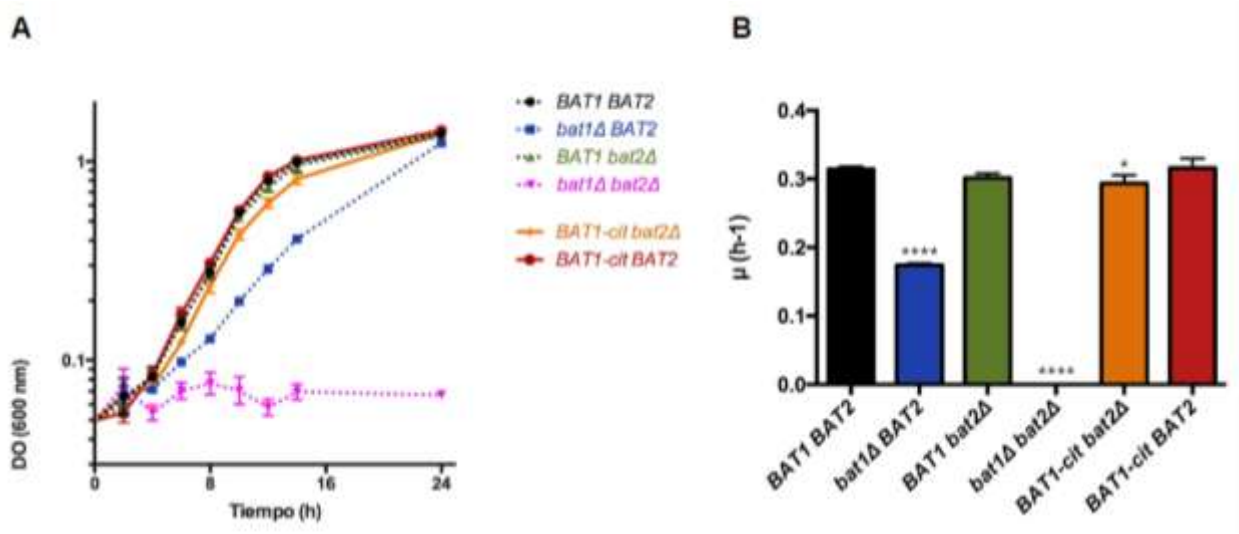


Figura 16. Fenotipo de las mutantes en condiciones biosintéticas (glucosa amonio). (A) Curvas de crecimiento de las mutantes. Las mutantes control se muestran en líneas punteadas y las mutantes de interés en líneas continuas. **(B)** Velocidad específica de crecimiento de las mutantes. En las gráficas se presenta el promedio y desviación estándar de dos repeticiones. [****]= P<0.0001, [*]= P<0.1.

Pareciera que Bat1 por sí sola, sin importar el compartimento subcelular que ocupe, mantiene su capacidad biosintética, a diferencia de Bat2, que estando en el citosol no logra compensar la falta de Bat1. Una mutante *bat1Δ BAT2* ($\mu = 0.174\ h^{-1}$), por ejemplo, disminuye su velocidad de crecimiento casi a la mitad en comparación con la cepa silvestre y la *BAT1-cit BAT2.* Esto indica que la enzima Bat2 en el citosol requiere la presencia de Bat1, ya sea en la mitocondria o en el citosol, para restablecer el crecimiento de la levadura en condiciones biosintéticas. Tomando en cuenta estos datos, el fenotipo casi idéntico de *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* se logra únicamente gracias a la capacidad de biosíntesis de Bat1 y no de Bat2.

La función biosintética de Bat1 en el citosol se hace más evidente al comparar a la mutante control *bat1Δ bat2Δ* con la *BAT1-cit bat2Δ*. La doble mutante es incapaz de crecer en glucosa amonio, pero con Bat1 en el citosol la auxotrofía de la célula a VIL se revierte por completo.

En conjunto, los datos anteriores sugieren que la localización de Bat1 en *S. cerevisiae* no es fundamental para llevar a cabo su función biosintética. Siendo una enzima que cataliza una reacción reversible, sería lógico pensar que la dirección de la reacción de Bat1 estaría determinada por la concentración intracelular de sus sustratos. Pero contrario a lo esperado, en glucosa amonio la Bat1 citosólica es tan biosintética

como la Bat1 mitocondrial, es decir, la acumulación de α-cetoácidos en la mitocondria no necesariamente favorece el perfil biosintético de la enzima. Es posible que la capacidad de biosíntesis de Bat1 se deba únicamente a su regulación transcripcional y por ende a la concentración intracelular de ciertos metabolitos que funcionan como reguladores del gen.

Como se mencionó en los antecedentes, la activación transcripcional de *BAT1* depende del complejo Leu3-α-IPM en glucosa amonio. Bajo estas condiciones, el α-IPM es sintetizado en la mitocondria por las α-isopropil malato sintasas Leu4 y Leu9. Cuando se generan altas concentraciones de α-IPM, la molécula entra al núcleo y forma el complejo activo con Leu3 que finalmente se une al promotor de *BAT1* e induce su expresión. De esta manera, en una mutante *BAT1-cit,* el gen *BAT1* se transcribe y su ARNm se traduce tantas veces como en una WT, manteniendo la función de la proteína incluso al modificar su localización.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta a los transportadores de los aminoácidos de cadena ramificada y a sus α-cetoácidos. En cuanto al transporte mitocondrial en *S. cerevisiae*, no existen datos suficientes que describan el paso de VIL desde la mitocondria hacia el citosol, tampoco de sus α-cetoácidos correspondientes. El único descrito hasta el momento, es el acarreador de oxalacetato Oac1, que transporta al α-IPM, un intermediario en la síntesis de leucina, al citosol. La síntesis del α-IPM es mitocondrial, pero dado que las próximas reacciones para producir KIC son catalizadas por dos enzimas citosólicas (IMP isomerasa e IPM deshidrogenasa), el α-IPM debe ser exportado al citosol para completar la síntesis de leucina (Marobbio *et al.*, 2008).

En cambio, los precursores de valina (KIV) e isoleucina (KMV) permanecen en la mitocondria porque la enzima encargada de sintetizarlos (Ilv3) es mitocondrial (Velasco *et al.,* 1993). Hasta ahora no se han reportado transportadores mitocondriales de KIV ni de KMV, en general los mecanismos de transporte de aminoácidos de la mitocondria al citosol y viceversa permanecen poco claros. Para analizar su papel en la biosíntesis de VIL, sería interesante medir los niveles mitocondriales y citosólicos de los tres aminoácidos y α-cetoácidos en las mutantes obtenidas y compararlos con los de las mutantes control.

Independientemente de la concentración de precursores de VIL en el citosol, los

resultados muestran que la Bat1 citosólica no disminuyó su función biosintética al modificar su localización. Si Bat1 puede realizar su función en cualquier recinto subcelular, ¿por qué se mantuvo en la mitocondria? Posiblemente porque (1) en glucosa VIL, la presencia de Bat1 en el citosol afecta la capacidad catabólica de Bat2 y altera el crecimiento normal de la levadura, o (2) Bat1 es una proteína “moonlighting”, es decir, es multifuncional y podría participar en alguna otra reacción, diferente de la estudiada, que es exclusiva de la mitocondria.

La primera alternativa queda descartada en el siguiente apartado donde se determinan los fenotipos de las mutantes en glucosa VIL. En cuanto a la posible propiedad “moonlighting” de la enzima, Kingsbury *et al.* encontraron que Bat1 interactúa con la aconitasa, una enzima mitocondrial importante en el ciclo de Krebs. En un ensayo de co-inmunoprecipitación, se identificaron también otras enzimas mitocondriales que interactúan con Bat1, algunas responsables de la síntesis de leucina como Ilv3, Ilv5 y Leu4, y otras involucradas en el ciclo del ácido cítrico. El estudio propone un modelo donde Bat1 y Bat2 coordinan el metabolismo de leucina con el metabolismo del ciclo de Krebs para controlar la vía de señalización de TORC1.

La vía del complejo 1 de la diana de rapamicina (TORC1) es un complejo proteico que integra señales para regular el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de los nutrientes. Ambas transaminasas son necesarias para el funcionamiento óptimo de TORC1 debido a la actividad enzimática que presentan en el metabolismo de VIL. Sin embargo, es Bat1 quien además juega un papel estructural al interactuar físicamente con enzimas del ciclo de Krebs y formar un complejo con la aconitasa que posiblemente contribuye al flujo de metabolitos al ciclo (Kingsbury *et al.* 2015).

7.4 Bat1 en el citosol suple por completo la función catabólica de Bat2

Las mutantes también se crecieron en glucosa VIL para analizar su fenotipo en condiciones catabólicas (Figura 17A, B). La *BAT1-cit bat2Δ* (μ = 0.177 h^{-1}) mostró un comportamiento casi idéntico al de la cepa silvestre *BAT1 BAT2* (μ = 0.185 h^{-1}) y al de la *bat1Δ BAT2* (μ = 0.185 h^{-1}). Además, el nulo crecimiento de una doble mutante en VIL cambia a un crecimiento de tipo silvestre con la sola presencia de una Bat1 citosólica. Por lo tanto, a pesar de que en una cepa silvestre la expresión de *BAT2* es 12 veces

mayor que la de *BAT1* en glucosa VIL (Colón *et al.,* 2011), Bat1 es capaz de cubrir por completo las necesidades catabólicas de la célula cuando se relocaliza en el citosol.

La comparación más interesante es la μ de la mutante control *BAT1 bat2Δ* (μ = 0.119 h^{-1}) con la mutante *BAT1-cit bat2Δ* (μ = 0.177 h^{-1}). Como se observa en la Figura 17B, la primera crece 30% menos que la segunda en las mismas condiciones. Ambas son *bat2Δ,* la única diferencia está en la localización de Bat1. En la mitocondria Bat1 cumple con la función catabólica parcialmente, pero al relocalizarla en el citosol la enzima logró catabolizar tan eficientemente como Bat2. Esto sugiere que cuando cualquiera de las dos aminotransferasas se encuentra en el citosol, el catabolismo de VIL se mantiene igual al de una WT.

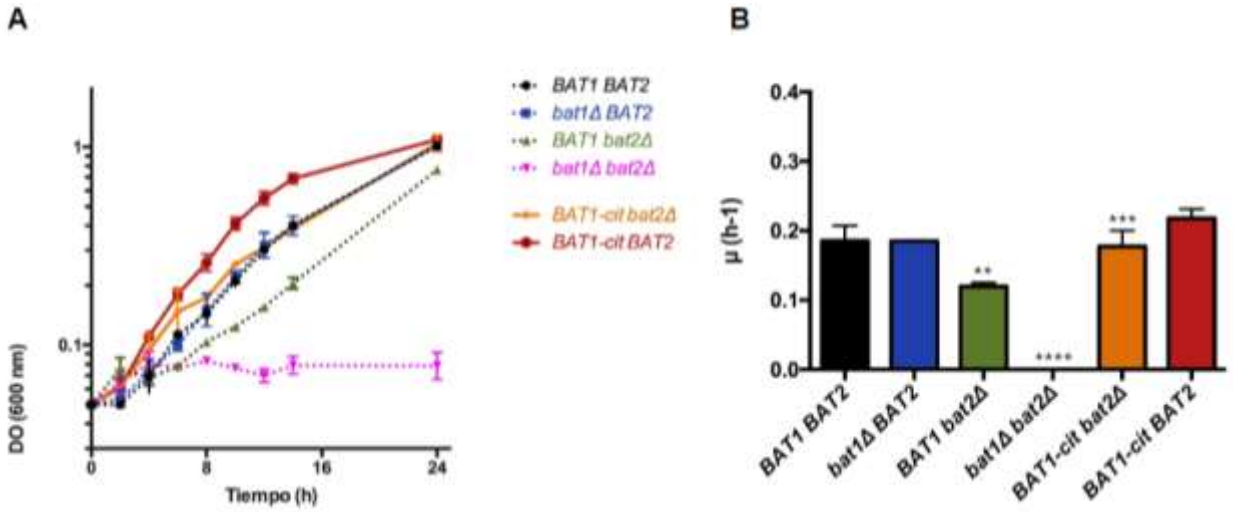


Figura 17. Fenotipo de las mutantes en condiciones catabólicas (glucosa VIL). (A) Curvas de crecimiento de las mutantes. Las mutantes control se muestran en líneas punteadas y las mutantes de interés en líneas continuas. **(B)** Velocidad específica de crecimiento de las mutantes. Se presenta el promedio y desviación estándar de los resultados realizados por duplicado. [****]= P<0.0001, [***]= P<0.001, [**]= P<0.01.

También es necesario resaltar que la mutante *BAT1-cit BAT2* (μ = 0.217 h^{-1}) crece al menos 15% más que la cepa silvestre (μ = 0.185 h^{-1}) y que las mutantes *bat1Δ BAT2* (μ = 0.185 h^{-1}) y *BAT1-cit bat2Δ* (μ = 0.177 h^{-1}). De esta manera, si ambas transaminasas se encuentran juntas en el citosol, posiblemente sus funciones se suman y la capacidad catabólica de la levadura aumenta.

En resumen, los resultados anteriores demuestran que (1) Bat1 en el citosol, mas no en la mitocondria, sustituye el rol catabólico de Bat2, (2) la función catabólica de la levadura se incrementa cuando ambas aminotransferasas se encuentran en el citosol.

Si la primera premisa es cierta, la localización citosólica de Bat1 estimula su carácter catabólico. En un medio sintético con galactosa, la abundancia relativa de isoleucina y leucina en una WT es diez veces mayor en el citosol que en la mitocondria, y de valina es ocho veces mayor (Pan *et al.,* 2018). En un medio glucosa VIL, los aminoácidos exógenos entran a la vía catabólica en el citosol a través de transportadores transmembranales. Entre los transportadores de VIL reportados hasta ahora se encuentra la permeasa general de aminoácidos Gap1, y las permeasas de aminoácidos de cadena ramificada Bap2 y Bap3, ubicadas en la membrana celular. La permeasa de aminoácidos aromáticos Tat1, con una alta afinidad por valina, y la Agt1 (permeasa de asparagina y glutamina) también transportan aminoácidos a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Ljungdahl *et al.,* 2012, YMDB, 2017).

En este contexto, la actividad enzimática de Bat1 podría depender de la disponibilidad de sustratos en el citosol. Dado que las transaminasas catalizan reacciones reversibles cuya constante de equilibrio es cercana a uno, el sentido de la reacción está determinado por las concentraciones de reactivos y productos. La afinidad de la enzima por sus sustratos catabólicos (VIL) no puede cambiar, pero la velocidad de reacción sí. A mayor concentración de aminoácidos, la velocidad inicial de transaminación aumenta y desplaza el equilibrio de la reacción hacia los productos, en este caso, hacia los α-cetoácidos.

De esta manera, se podría inferir que en un medio glucosa-VIL la cantidad de aminoácidos en la mitocondria no es suficiente para que Bat1 alcance una velocidad de reacción que no afecte su velocidad de crecimiento. En cambio, en el citosol la capacidad catalítica de la enzima aumenta a raíz de su exposición a más sustratos catabólicos, al grado de mostrar una velocidad de crecimiento similar a la de una cepa silvestre. De ser cierto esto, si se compararan las actividades enzimáticas de *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1 bat2Δ* en glucosa VIL, la actividad de la primera sería mayor.

Una alternativa menos probable es que la enzima *per se* sufra algún cambio químico o conformacional en el citosol que le permita catabolizar VIL con mayor eficiencia

que en la mitocondria. Hasta ahora se han predicho 11 modificaciones postraduccionales en Bat1, principalmente metilaciones y amidaciones, y 18 en Bat2, en su mayoría cortes proteolíticos (ModPred, 2014, Anexo 3). Estos cortes pueden resultar en una activación, inactivación o alteración en la función de la proteína (Rogers *et al.* 2013). Debido a la alta identidad aminoacídica que presentan estas transaminasas, es posible que Bat1 sufra la mayoría de las modificaciones de Bat2 cuando es relocalizada en el citosol, sin embargo, a la fecha no hay evidencia que confirme que las modificaciones postraduccionales alteren la actividad de estas enzimas en *S. cerevisiae.*

Otro factor que interviene en el comportamiento de las enzimas es el pH. En cultivos en fase exponencial de *S. cerevisiae* crecidos en glucosa, el pH mitocondrial es de 7.5, mientras que en el citosol disminuye a 7.2 (Orij *et al.,* 2008). Tomando en cuenta que la conformación de las enzimas depende, en parte, de su carga eléctrica, ligeras desviaciones por encima o por debajo del pH óptimo pueden resultar en un cambio en la actividad catalítica de la enzima. Como se muestra en los resultados, la mutante *BAT1-cit bat2Δ* muestra una velocidad de crecimiento similar a la de una WT tanto en condiciones biosintéticas como en condiciones catabólicas. De este modo, se puede hipotetizar que Bat1 responde mejor a un pH citosólico de 7.2, y debido a que la enzima tiene un solo sitio catalítico, si mejora la actividad catabólica de Bat1, también mejora su capacidad biosintética.

Por otro lado, cuando las proteínas comparten localización en el citosol, pareciera que la actividad enzimática de ambas se sumara, al grado de mejorar la μ de la célula en un 15%. Cabe mencionar que Bat1 y Bat2 son proteínas diméricas, es decir, en una WT se forma el homodímero Bat1-Bat1 en la mitocondria y Bat2-Bat2 en el citosol (Prohl *et al.,* 2000) (Anexo 2). La presencia de ambas enzimas en un mismo compartimento subcelular podría favorecer la formación de un heterodímero Bat1-Bat2 con mayor actividad enzimática. De ser así, la función catabólica superior en la mutante *BAT1-cit BAT2* se podría atribuir a este fenómeno.

7.5. En amonio VIL se revierte la deficiencia de crecimiento de las mutantes

Por último, se realizaron las curvas de crecimiento de las mutantes en glucosa amonio VIL. La adición simultánea de fuentes primarias y secundarias de nitrógeno fue suficiente

para revertir la deficiencia de crecimiento de todas las mutantes (Figura 18A, B). De esta manera, se comprueba que los fenotipos mostrados por las mutantes en condiciones biosintéticas o catabólicas reflejan únicamente el funcionamiento de las aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada en el metabolismo de nitrógeno.

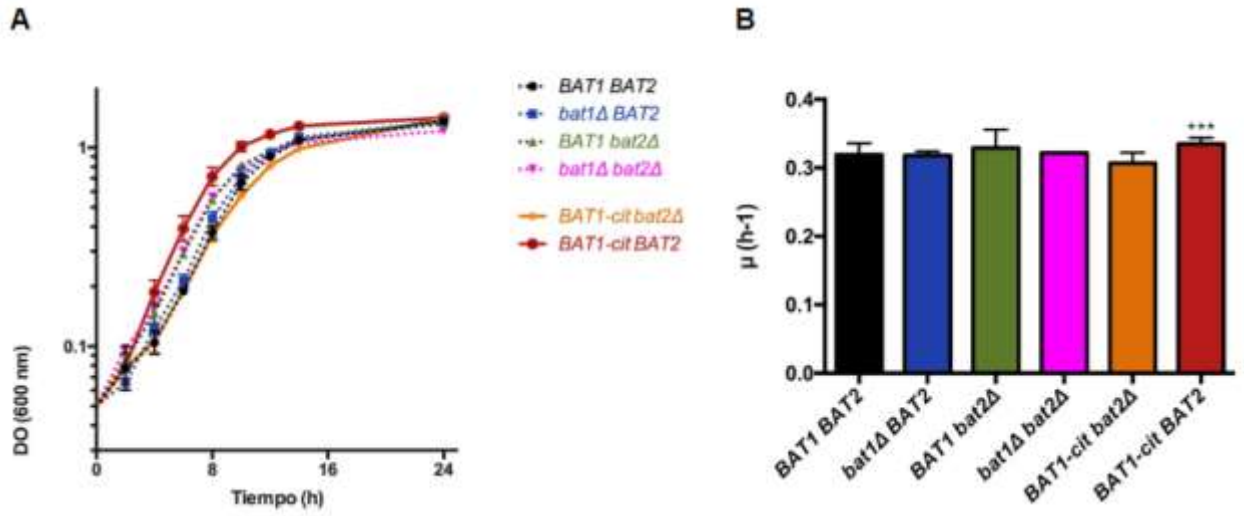


Figura 18. Fenotipo de las mutantes en condiciones biosintéticas y catabólicas (glucosa amonio + VIL). (A) Curvas de crecimiento de las mutantes. Las mutantes control se muestran en líneas punteadas y las mutantes de interés en líneas continuas. **(B)** Velocidad específica de crecimiento de las mutantes. En las gráficas se muestra el promedio y desviación estándar de los resultados que se realizaron por duplicado. [***]= P<0.001.

8. CONCLUSIONES

En el proceso evolutivo de *Saccharomyces cerevisiae* existieron mecanismos de subfuncionalización que, en el caso de *BAT1* y *BAT2*, resultaron en la divergencia de localización y regulación transcripcional de sus enzimas, confiriéndole a Bat1 una función principalmente biosintética y a Bat2 una catabólica; funciones que en el ancestro de la levadura se lograban por la acción de una sola enzima bifuncional.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, está claro que el comportamiento opuesto que presentan Bat1 y Bat2 se debe, por un lado, a su regulación transcripcional, y por otro, a la compartimentación diferencial de metabolitos en la mitocondria y en el citosol. La relocalización de Bat1 en el citosol, por ejemplo, le confirió a la enzima una capacidad catabólica que en la mitocondria no tenía. En cambio, el perfil biosintético que presenta Bat1 mitocondrial no cambió al relocalizar a la proteína en el citosol, sugiriendo que la regulación transcripcional de *BAT1* es suficiente para mantener la función biosintética de la enzima.

Tomando en cuenta estos resultados, pareciera que la capacidad biosintética y catabólica de Bat1 en el citosol es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de la célula durante su crecimiento fermentativo. De ser así, ¿por qué la levadura conservó ambos genes y en compartimentos subcelulares distintos?

Por un lado, Bat1 cumple otra función no enzimática en la mitocondria que involucra la interacción directa de la proteína con la aconitasa y otras enzimas mitocondriales. Asimismo, se ha propuesto que la actividad enzimática de las Bats altera los niveles mitocondriales y citosólicos de VIL y otros metabolitos centrales como el glutamato y el α-cetoglutarato durante las distintas fases del crecimiento celular (Kingsbury *et al.,* 2015). En particular, la señalización de TORC1 depende en alguna medida del equilibrio en el flujo de metabolitos que van de la mitocondria al citosol, y viceversa.

De esta manera, la localización diferencial de las enzimas parálogas Bat1 y Bat2 contribuye a que estas no sean redundantes en la célula. La participación de ambas proteínas desde distintos compartimentos subcelulares favorece por un lado el flujo de metabolitos en el ciclo del ácido cítrico, y por otro lado el metabolismo de leucina y KIC, que son indispensables en la activación de TORC1.

9. PERSPECTIVAS

9.1. Relocalización de Bat2 en la mitocondria

Los resultados obtenidos hasta este punto demuestran que Bat1 mantiene su función biosintética y mejora su capacidad catabólica cuando se encuentra en el citosol. Sería interesante relocalizar a Bat2 para observar si también conserva su función catabólica y aumenta la biosintética al localizarse en la mitocondria.

9.2. Medición de la actividad enzimática de Bat1 en el citosol

Para analizar más a fondo los fenotipos de las mutantes, se propone determinar la actividad de transaminasa de extractos proteicos de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* obtenidos a partir de cultivos crecidos en condiciones biosintéticas y catabólicas.

9.3. Cuantificación de niveles mitocondriales y citosólicos de VIL y sus α-cetoácidos

Las reservas de metabolitos cambian en cada compartimento subcelular. Los niveles de VIL y sus intermediarios en la mitocondria y citosol son un buen parámetro para definir la relación entre la disponibilidad de sustratos y la actividad enzimática de las transaminasas con relación a su localización.

9.4. Análisis de expresión de los genes *BAT1* y *BAT2*

Resultaría interesante analizar la expresión de *BAT1* y *BAT2* en las mutantes relocalizadas en condiciones biosintéticas y catabólicas mediante un ensayo tipo Northern para ver si el nivel de expresión de los genes correlaciona con los fenotipos observados. También sería de utilidad construir quimeras donde se intercambien las secuencias promotoras de *BAT1* y *BAT2* y observar si Bat1 mejora su capacidad catabólica en la mitocondria con el promotor de Bat2, o si Bat2 se vuelve biosintética en el citosol con el promotor de Bat1. En conjunto, estos datos contribuirían a interpretar la relación que existe entre la localización de las enzimas y el nivel de expresión de sus genes.

9.5. Determinación de la formación de heterodímeros Bat1-Bat2

Para demostrar si la relocalización de Bat1 en el citosol permite la formación del heterodímero Bat1-Bat2, sería necesario realizar un isoelectroenfoque cargando el extracto crudo de las proteínas en un gel nativo de agarosa. Un análisis de complementación de fragmentos fluorescentes (BiFC, por sus siglas en inglés) también permitiría determinar la interacción proteína-proteína de las transaminasas mediante el uso de microscopía (López *et al.,* 2015).

9.6. Medición de la velocidad específica de crecimiento de las mutantes en condiciones respiratorias

Según los datos obtenidos hasta el momento, la enzima Bat1 puede ser biosintética y catabólica en el citosol. Se propone que su localización en la mitocondria se debe a que es una proteína "moonlighting" que además de tener una función enzimática cumple una función estructural donde interactúa con enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs. Para probar esta hipótesis, se sugiere determinar la velocidad específica de crecimiento de las mutantes *BAT1-cit bat2Δ* y *BAT1-cit BAT2* en condiciones de crecimiento respiratorio, es decir, usando etanol como única fuente de carbono. La disminución en la velocidad específica de crecimiento de las mutantes en comparación con la μ de las cepas control confirmaría la participación fundamental que tiene Bat1 en el metabolismo respiratorio de la levadura.

ANEXOS

Anexo 1: Curvas de crecimiento control de cepas etiquetadas con yECitrine

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento de las mutantes etiquetadas con yECitrine: *BAT1-yECit BAT2* y *BAT1 BAT2-yECit,* con el objetivo de verificar que la presencia de la proteína fluorescente no afectara el crecimiento de las cepas.

Como se muestra en la Figura 19, las dos cepas con yECitrine presentan un fenotipo de crecimiento silvestre, lo que confirma que el etiquetado no altera su comportamiento.

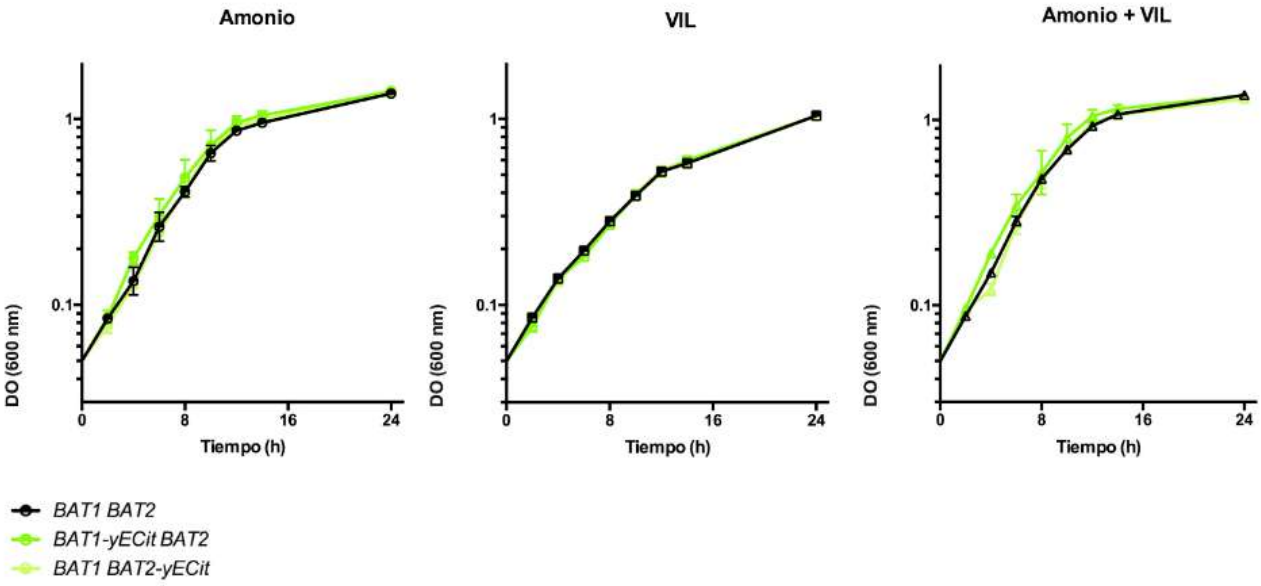


Figura 19. Curvas de crecimiento control de yECitrine. Las mutantes *BAT1-yECit BAT2* y *BAT1 BAT2-yECit* se crecieron en condiciones biosintéticas y/o catabólicas. En las gráficas se presenta el promedio y desviación estándar de dos repeticiones.

Anexo 2: Modelado de la proteína Bat1 con los servidores *I-TASSER* y *SWISS-MODEL*

Se realizó la predicción de la estructura proteica de Bat1 con el servidor *I-TASSER* (Yang *et al.,* 2015) para visualizar la remoción de la MTS y su posible repercusión en el plegamiento de la proteína. Como se observa en la Figura 20, la secuencia de translocación mitocondrial (naranja) no parece tener una participación importante en la estructura de la enzima y se encuentra lo suficientemente alejada del sitio activo (amarillo). De igual forma, se utilizó el programa de modelado de proteínas *SWISS MODEL* (Waterhouse *et al.,* 2018) para obtener el modelo de Bat1 en su forma homodimérica y para distinguir las interacciones del cofactor piridoxal 5'-fosfato con los residuos aminoacídicos de la proteína (Figura 21).

Ambos servidores emplearon como modelo de referencia a la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial de humanos (hBCATm), recientemente se determinó su estructura mediante cristalografía de rayos X (Herbert *et al.,* 2020). Esta proteína tiene un 44% de identidad aminoacídica con Bat1 y forma homodímeros en la mitocondria.

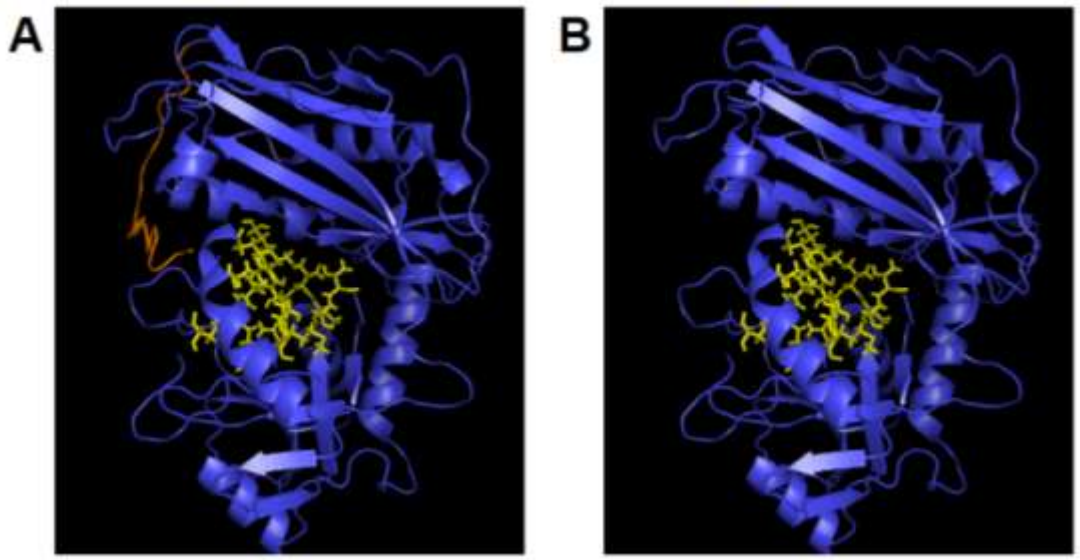


Figura 20. Modelos de la proteína Bat1 con *I-TASSER*. (A) Predicción estructural de Bat1 por homología con la proteína hBCATm. El sitio activo se muestra en amarillo y la secuencia de translocación mitocondrial en naranja. **(B)** Predicción estructural de Bat1 sin su MTS.

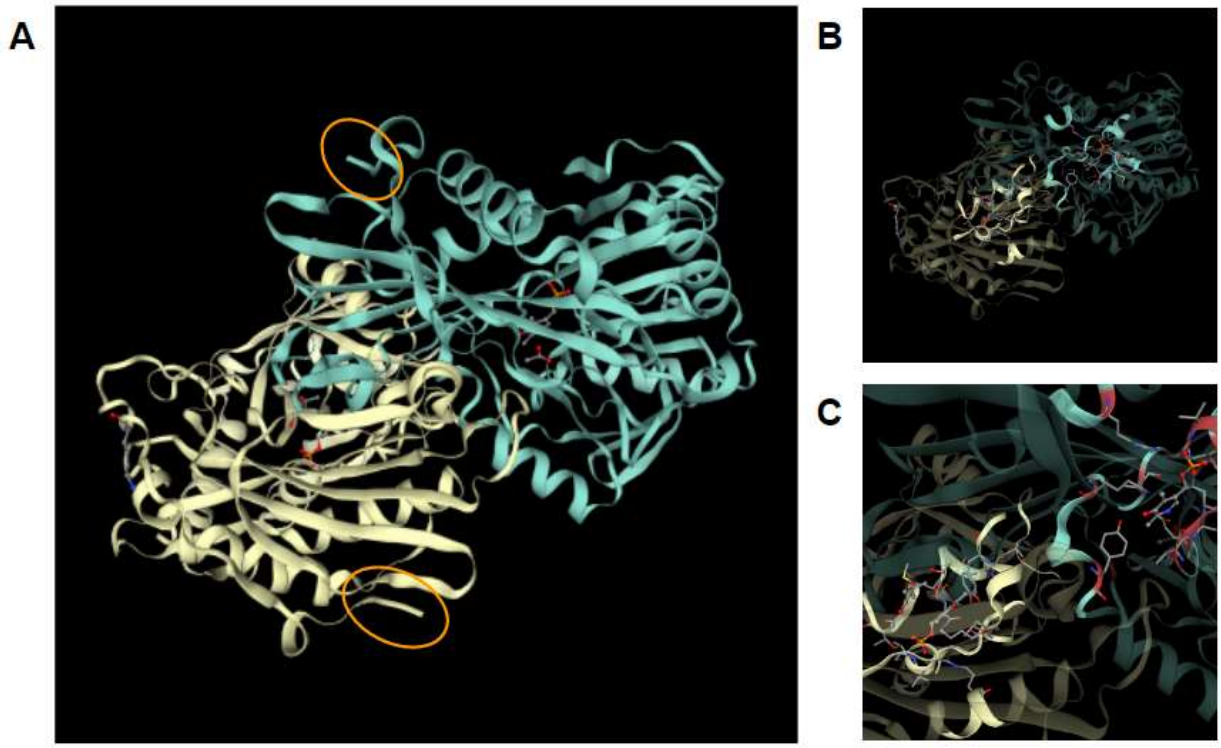


Figura 21. Modelos de la proteína Bat1 con *SWISS MODEL*. (A) Predicción de la estructura dimérica de Bat1 por homología con la proteína hBCATm. Los círculos naranjas indican en dónde se encuentra la MTS de cada monómero. **(B)** Homodímero de Bat1 donde se resaltan las regiones de interacción con moléculas de piridoxal 5'-fosfato, el cofactor de la enzima. **(C)** Acercamiento de la Figura B.

Anexo 3: Alineamiento de secuencias de Bat1 y Bat2

La identidad aminoacídica de las transaminasas se determinó realizando un alineamiento de las secuencias proteicas con el servidor en línea *Needle* (Figura 22). Los resultados arrojaron una identidad de aminoácidos del 73.6% y una similitud del 81.2% entre las proteínas, con un espacio de 17 residuos aminoacídicos de diferencia al inicio de Bat2 correspondientes a la MTS de Bat1.

Además, se realizó un análisis *in silico* de las modificaciones postraduccionales en ambas proteinas (Tabla 5, Figura 22). Solo la predicción de modificación postraduccional en la R209 de Bat1 y en la R192 de Bat2 coinciden con el sitio activo (en naranja) de las transaminasas. Los datos se obtuvieron con el programa de predicción *ModPred* y el sitio activo con el servidor *I-TASSER.*

Tabla 5. Predicción de las modificaciones postraduccionales de Bat1 y Bat2.

Bat1			**Bat2**		
RESIDUO	**MODIFICACIÓN**	**PUNTAJE**	**RESIDUO**	**MODIFICACIÓN**	**PUNTAJE**
K27	Metilación	0.80	T2	O-glicosilación	0.84
T31	O-glicosilación	0.82	K10	Metilación	0.82
K169	Metilación	0.83	T14	O-glicosilación	0.82
K197	Sumoilación	0.87	T16	O-glicosilación	0.85
R209	Corte proteolítico	0.82	V29	Corte proteolítico	0.83
K219	Sumoilación	0.84	K32	Corte proteolítico	0.83
N347	Amidación	0.83	V85	Amidación	0.90
Y377	Corte proteolítico	0.80	R144	ADP-ribosilación	0.83
R379	ADP-ribosilación	0.90	I167	Amidación	0.80
Y382	Amidación	0.90	K180	Sumoilación	0.89
K387	Metilación	0.84	R192	Corte proteolítico	0.83
			A243	Corte proteolítico	0.80
			F244	Corte proteolítico	0.93
			K248	Corte proteolítico	0.85
			D249	Corte proteolítico	0.84
			R282	ADP-ribosilación	0.80
			Y294	Corte proteolítico	0.81
			R303	ADP-ribosilación	0.87

```
# Length: 394
# Identity:     290/394 (73.6%)
# Similarity:   320/394 (81.2%)
# Gaps:          17/394 ( 4.3%)

BAT1                1 MLQRHSLKLGKFSIRTLATGAPLDASKLKITRNPNPSKPRPNEELVFGQT
                                     .|.|||||||:|||...:.|||:||.|||||::
BAT2                1 -----------------MTLAPLDASKVKITTTQHASKPKPNSELVFGKS

BAT1               51 FTDHMLTIPWSAKEGWGTPHIKPYGNLSLDPSACVFHYAFELFEGLKAYR
                      |||||||..|:|::|||||.||||.||||||||.||||||||||||:||||
BAT2               34 FTDHMLTAEWTAEKGWGTPEIKPYQNLSLDPSAVVFHYAFELFEGMKAYR

BAT1              101 TPQNTITMFRPDKNMARMNKSAARICLPTFESEELIKLTGKLIEQDKHLV
                      |..|.|||||||.||.||||||.|||||||:.||||.|.||||:|||.||
BAT2               84 TVDNKITMFRPDMNMKRMNKSAQRICLPTFDPEELITLIGKLIQQDKCLV

BAT1              151 PQGNGYSLYIRPTMIGTSKGLGVGTPSEALLYVITSPVGPYYKTGFKAVR
                      |:|.|||||||||:|||:.||||.||..||||||..||||||||||||||
BAT2              134 PEGKGYSLYIRPTLIGTTAGLGVSTPDRALLYVICCPVGPYYKTGFKAVR

BAT1              201 LEATDYATRAWPGGVGDKKLGANYAPCILPQLQAAKRGYQQNLWLFGPEK
                      ||||||||||||||.||||||||||||:|||||||.||||||||||||..
BAT2              184 LEATDYATRAWPGGCGDKKLGANYAPCVLPQLQAASRGYQQNLWLFGPNN

BAT1              251 NITEVGTMNVFFVFLNKVTGKKELVTAPLDGTILEGVTRDSVLTLARDKL
                      ||||||||||.||||.:..||||||||||||||||||||||:|.||:::|
BAT2              234 NITEVGTMNAFFVFKDSKTGKKELVTAPLDGTILEGVTRDSILNLAKERL

BAT1              301 DPQEWDINERYYTITEVATRAKQGELLEAFGSGTAAVVSPIKEIGWNNED
                      :|.||.|:|||:||.||..|:|.||||||||||||:|||||||||..|.
BAT2              284 EPSEWTISERYFTIGEVTERSKNGELLEAFGSGTAAIVSPIKEIGWKGEQ

BAT1              351 IHVPLLPGEQCGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN*    394
                      |::|||||||.|.|.|:|||||..||||...:||||:.|.|||
BAT2              334 INIPLLPGEQTGPLAKEVAQWINGIQYGETEHGNWSRVVTDLN*    377
```

Figura 22. Alineamiento de las secuencias de Bat1 y Bat2. Para alinear las secuencias de las proteinas se utilizó el programa *Needle* que usa el algoritmo de alineación *Needleman-Wunsch* (Madeira *et al.,* 2019). La predicción de las modificaciones postraduccionales se realizó en el servidor en línea *ModPred* que reúne predicciones de distintas bases de datos como *UniProt* y *PDB* (Pejaver *et al.,* 2014). Los residuos aminoacídicos con posibles modificaciones postraduccionales se muestran en el alineamiento de las secuencias de Bat1 y Bat2 subrayados con color azul. Solo se muestran las modificaciones que tienen un puntaje de sensibilidad y especificidad igual o mayor a 0.8 (entre 0 y 1). En naranja se señalan los residuos aminoacídicos que conforman el sitio activo de las transaminasas.

Anexo 4: Medios de cultivo

YPD (medio de cultivo rico)

		[final]
Extracto de levadura	10g	1%
Peptona de caseína	20g	2%
Dextrosa anhidra	20g	2%
Agar (sólo medio sólido)	20g	2%
Agua bidestilada	Aforar a 1L	

YPAD glicerol (medio para crioconservación)

		[final]
Extracto de levadura	10g	1%
Peptona de caseína	20g	2%
Dextrosa anhidra	20g	2%
Adenina	0.8g	0.008%
Glicerol	300mL	30%
Agua bidestilada	Aforar a 1L	

MM

		[final]
Stock vitaminas 1000x	1mL	1x
Stock trazas 1000x	1mL	1x
Stock sales 50x	20mL	1x
Dextrosa anhidra o etanol	20g o mL	2%
Sulfato de amonio	5g	0.5%
Agar (sólo medio sólido)	25g	2.5%
Agua bidestilada	Aforar a 1L	

Anexo 5: Obtención de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae*

- Inocular 10mL de YPD con una asada de la cepa. Incubar a 30ºC toda la noche a 560xg.
- Centrifugar a 80,640xg por 2-5 min a temperatura ambiente para colectar las células. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 1mL de H_2O bidestilada que haya sido estéril y transferir a un tubo de 1.5mL (que haya sido estéril).
- Centrifugar a 1,756,160xg por 5 s. Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 200µL de una solución de: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 8, 1mM Na-EDTA (romper membranas).
- Agregar 300µL de Fenol (pH 8):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), ésta debe ser preparada al momento (limpiar ADN).
- Agregar 0.3 g de perlas de vidrio (de ~0.5 mm) a cada muestra.
- Mezclar con vórtex (máxima velocidad) por 5 min. Adicionar 200µL de buffer TE (10mM Tris-HCl 1mN EDTA . NA_2) pH 8.
- Centrifugar a 1,756,160xg por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5mL.
- Agregar 400µL de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Centrifugar a 1,756,160 x g por 5 min. Transferir la fase acuosa a un tubo de 1.5mL. Repetir pasos 10 y 11.
- Agregar 1mL de etanol al 100% + 10µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 1,756,160xg por 2 min. Eliminar el sobrenadante con pipeta hasta dejar completamente seco.
- Resuspender la pastilla de células en 400µL de TE + 10µL de RNasa A (10 mg/mL). Incubar a 37ºC por 30 min.
- Agregar 1mL de etanol al 100% + 10µL de acetato de amonio 4M. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 1,756,160 x g por 2 min. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 200µL de etanol al 70% frío y dejar secar la pastilla de células a temperatura ambiente por 30 min (o hasta que esté completamente seco).
- Resuspender en un volumen adecuado (50-100µL) de H_2O bidestilada que haya sido estéril.
  - Cuantificar y mantener a -20ºC.

Anexo 6: Transformación de *S. cerevisiae* con acetato de litio

* Todo en esterilidad

- Inocular 10mL de YPD con una colonia de la cepa a transformar. Incubar a 30ºC, 560xg toda la noche.
- Inocular 50mL de YPD a una densidad óptica a 600nm (DO_{600}nm) de 0.2 - 0.25.
- Incubar a 30ºC, 560xg hasta alcanzar una DO_{600}nm de 0.5 - 0.6.
- Colectar las células en un tubo de 50mL y centrifugar a 80,640 x g por 2-3 min a temperatura ambiente. Resuspender en 40mL de H_2O estéril, mezclar con vórtex (máxima velocidad) y volver a centrifugar para colectar.
- Resuspender en 1mL de H_2O estéril y transferir a un tubo de 1.5mL.
- Recuperar células (1,756,160xg por 15 s) y descartar el sobrenadante.
- Lavar con 1mL de TE/LiOAc recién preparado. Recuperar células y descartar sobrenadante.
- Resuspender las células en 200µL de TE/LiOAc (Resuspender con pipeta y 3 s en vórtex).
- Colocar 70µL de células en 3 tubos de 1.5mL (células a transformar + 2 controles).
- Agregar 1 µg del producto de purificado de PCR y 100 µg de ADN acarreador.
    - ADN acarreador: ADN de esperma de salmón, previamente sonicado. Hervir por 5 min e incubar en hielo por 5 min antes de utilizar.
- Mezclar con vórtex.
- Adicionar 300µL de PEG/TE/LiOAc al 50% recién preparado y mezclar con vórtex.
- Incubar a 30ºC, 560-806xg, 30 min.
- Someter a choque térmico a 42ºC por 15 min (sin agitación).
- Para selección por auxotrofía:
    - Colectar las células y resuspender en 200µL de H_2O estéril.
    - Plaquear 100µL de células en las cajas con medio (suplementado si es el caso).
    - Poner aproximadamente 20 perlas de vidrio (de ~2 mm) estériles para dispersar las células. Removerlas cuando se haya secado la caja.
    - Incubar a 30ºC.
- Para selección por antibiótico:
    - Preparar tubos falcon de 50mL con 3mL de YPD.
    - Centrifugar células a 1,756,160xg, 30 s. Eliminar el sobrenadante con pipeta.
    - Resuspender el botón celular en 1mL de YPD y transferir al tubo con 3mL de YPD.
    - Incubar a 30ºC por 3 horas a 560xg.
    - Colectar células por centrifugación y resuspender en 400µL de YPD.
    - Plaquear 100µL de células en las cajas con medio (suplementado si es el caso).
    - Poner aproximadamente 20 perlas de vidrio (de ~2 mm) estériles para dispersar las células. Removerlas cuando se haya secado la caja.
    - Incubar a 30ºC.

Reactivos:

TE/LiOAc	Vol.	[Concentración final]
H_2O	1.8mL	-
LiOAc 1 M pH 7.5	200µL	100mM
Tris-HCl 1 M pH 7.5	20µL	10mM
EDTA 0.5 M	4µL	1mM

PEG/TE/LiOAc	Vol.	[Concentración final]
PEG 50%	1.8mL	-
LiOAc 1 M pH 7.5	200µL	100mM
Tris-HCl 1 M pH 7.5	20µL	10mM
EDTA 0.5 M	4µL	1mM

Anexo 7: Preparación de muestras para observar en microscopio

- Inocular con una colonia de cada cepa 10mL de medio YPD. Incubar a 30ºC, 560xg toda la noche.
- Inocular un matraz con 50mL de medio mínimo con glucosa o etanol como fuente de carbono a una DO_{600}nm de 0.05 - 0.3.
- Incubar a 30ºC, 560xg hasta alcanzar una DO_{600}nm de 0.7 - 1.
- Centrifugar las células a 1,290,240 x g por 3 min. Descartar sobrenadante.
- Resuspender en 1mL de agua estéril y centrifugar a 1,290,240xg por 3 minutos. Repetir este paso una vez más.
- Resuspender células en 200µL de agua.
- Preparar agarosa al 1% y mantenerla fundida a 95°C.
  - Colocar cinta alrededor de los extremos de un portaobjetos.
  - Agregar 30µL de agarosa 1% fundida en el centro del portaobjetos.
  - Colocar inmediatamente otro portaobjetos encima de la agarosa y presionar ligeramente para extenderla.
  - Colocar los portaobjetos unidos en un bloque metálico frío.
  - Dejar solidificar durante 1:45 minutos.
  - Separar los portaobjetos deslizando uno sobre otro, cuidando que no se rompa la cama de agarosa formada.
  - Colocar 7µL de la muestra sobre la cama de agarosa.
  - Dejar secar la muestra durante 2 minutos.
  - Cubrir preparación con un cubreobjetos.

10. REFERENCIAS

Byun-McKay, S.A. & Geeta, R. (2007). Protein subcellular relocalization: a new perspective on the origin of novel genes. *TRENDS in Ecology and Evolution, 22*(7), 338-344.

Colón-González, M. (2011). *Las aminotransferasas Bat1 y Bat2 de Saccharomyces cerevisiae divergieron funcionalmente del ortólogo tipo ancestral K/Bat1 de Kluyveromyces lactis* (tesis doctoral). Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.

Conant, G. & Wolfe, K. (2008). Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. *Nature Reviews Genetics, 9*, 938-950.

Del Pozo, J. & Ramírez-Parra, E. (2015). Whole genome duplications in plants: an overview from Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany, 66*(22), 6991-7003.

Didion, T., Grauslund, M., Morten, C. & Andersen, H. (1996). Amino Acids Induce Expression of Bap2, a Branched-Chain Amino Acid Permease Gene in *Saccharomyces cerevisiae. Journal of Bacteriology 178*(7), 2025-2029.

Eden, A., Van Nedervelde, L., Drukker, M. & Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast*. Appl Microbiol Biotechnol, 55*(3), 296-300.

Escalera-Fanjul, X., Quezada, H., Riego-Ruiz, L., & González, A. (2019). Whole-Genome Duplication and Yeast's Fruitful Way of Life. *Trends in genetics, 35*(1), 42-54.

Fitch, W. (1979). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic Biology, 19*(2), 99-113.

Flores-Villegas, C. (2012). *Análisis de la compartimentación diferencial entre productos de genes parálogos* (tesis de maestría). Facultad de Química, UNAM. México.

Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S., Tomii, K., Horton, P. & Imai, K. (2015). MitoFates: Improved Prediction of Mitochondrial Targeting Sequences and Their Cleavage Sites. *ASBMB: Molecular and Cellular Proteomics, 14*(4), 1113-1126.

González, J. (2017). *Regulación transcripcional: su papel en la diversificación funcional de los parálogos BAT1 y BAT2.* (tesis de maestría y doctorado). Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.

González-Flores, J., López, G., Argueta, S., Escalera-Fanjul, X., el Hafidi, M., Campero-Basaldua, C., Strauss, J., Riego-Ruiz, L., González, A. (2017). Diversification of Transcriptional Regulation Determines Subfunctionalization of Paralogous Branched Chain Aminotransferases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 207,* 975- 991.

Grauslund, M., Didion, T., Morten, C. & Andersen, H. (1995). *BAP2,* a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta 1269,* 275-280.

Hammer, S.K. & Avalos, J.L. (2017). Uncovering the role of branched-chain amino acid transaminases in *Saccharomyces cerevisiae* isobutanol biosynthesis. *Metabolic Engineering, 44,* 302-312.

Herbert, D., Gibbs, S., Riddick, A., Conway, M. and Dong, M. (2020). Crystal structure of an oxidized mutant of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Structural Biology Communications, 76*(Pt. 1), 14-19.

Kispal G., Steiner, H., Court, DA., Rolinsky, B. & Lill R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem 271*(40), 24458-24464.

Kumada, Y., Benson, D., Hillemann, D., Hosted, T., Rochefort, D., Thompson, C., Wohlleben, W. & Tateno, Y. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90*(7), 3009-3013.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2015). *Principios de bioquímica*. España: Omega.

Ljungdahl, PO. & Daignan-Fornier, B. (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics, 190*(3), 885-929.

López, G., Quezada, H., Duhne, M., González, J., Lezama, M., El-Hafidi, M., Colón, M., Martínez de la Escalera, X., Flores-Villegas, MC., Scazzocchio, C., DeLuna, A., and González, A. (2015). Diversification of Paralogous α-Isopropylmalate Synthases by Modulation of Feedback Control and Hetero-Oligomerization in *Saccharomyces cerevisiae. Eukaryotic c*

López-Pacheco, K.C. (2011). *Análisis de la expresión y regulación transcripcional del gen KlBAT1 de la levadura Kluyveromyces lactis* (tesis de maestría). Facultad de Química, UNAM. México.

Lynch, M. & Conery, J. (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science, 290*(5494), 1151-2254.

Madeira, F., Park, Y., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A., Potter, S., Finn, R. and Lopez, R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research 47*, W636-W641.

Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D. & Ravikesavan, R. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *Journal of Genetics, 92*(1), 155-161.

Marcet-Houben, M. & Gabaldón, T. (2015). Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLoS Biol, 13*(8).

Marko, M., Chipperfield, R., & Birnboim, H. (1982). A Procedure for the Large-Scale isolation of Highly Purified Plasmid DNA Using Alkaline Extraction and Binding to Glass Powder. *Analytical Biochemistry, 121,* 382-387.

Marobbio, C., Giannuzzi, G., Paradies, E., Pierri, C. & Palmieri, F. (2008). α-Isopropylmalate, a Leucine Biosynthesis Intermediate in Yeast, Is Transported by the Mitochondrial Oxalacetate Carrier. *The Journal of Biological Chemistry, ASBMB, 283*(42), 28445-28453.

Michels, C. (2002). *Genetic Techniques for Biological Research: A Case Study Approach*. New York, USA: John Wiley & Sons, Ltd.

Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. Springer Science: USA.

Opperdoes, F. (September 1997). What are orthologous and what are paralogous genes. *Molecular evolution and phylogenetic analysis of proteins.* A graduate course compiled by Fred R. Opperdoes, “Christian de Duve” Institute of Cellular Pathology and Laboratory of Biochemistry, Université Catholique de Louvain Belgium.

Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S. and Smits, G. (2008). *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology, 155,* 268-278.

Panchy, N., Lehti-Shiu, M. & Shiu, S. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiology, 171*, 2294- 2316.

Pejaver, V., Hsu, W-L., Xin, F., Dunker, A. K., Uversky, V. N., and Radivojac, P. (2014). The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification *Protein Science. 23*(8),1077-1093.

Pemberton, L.F. (2014). *Preparation of Yeast Cells for Live-Cell Imaging and Indirect Immunofluorescence.* USA: New York. In: Smith J.,Burke D. (eds) Yeast Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 1205. Humana Press.

Prohl, C., Kispal, G. & Lill, R. (2000). Branched-Chain-Amino-Acid Transaminases of Yeast *Saccharomyces cerevisiae. Methods in Enzymology, 324,* 365-375.

Pan, D., Lindau, C., Lagies, S., Wiedemann, N. and Kammerer, B. (2018). Metabolic profiling of isolated mitochondria and cytoplasm reveals compartment-specific metabolic responses. *Metabolomics, 14,* 59.

Quezada-Pablo, H. (2008). *Estudio bioquímico y fisiológico de las homocitrato sintasas de Saccharomyces cerevisiae durante el metabolismo respiratorio y fermentativo* (tesis doctoral): Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México.

Ramirez-Guana, M., Marcu, A., Pon, A., Guo, A., Sajed, T., Wishart, N., Karu, N., Djoumbou, Y., Arndt, D. and Wishart, D. (2017) YMDB 2.0: A Significantly Expanded Version of the Yeast Metabolome Database. *Nucleic Acids Res. 45*, 440-445.

Rogers, L. and Overall, C. (2013). Proteolytic Post-translational Modification of Proteins: Proteomic Tools and Methodology. *Molecular and Cellular Proteomics 12*(12), 3532-3542.

Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York, USA: CSHL Press.

Storici, F., Lewis, L. & Resnick, M. (2001). *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology 19,* 773-776.

Takpho, N., Watanabe, D., & Takagi, H. (2018). Valine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae is regulated by the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase Bat1. *Microbial Cell*, *5*(6), 293-299.

Velasco, J., Cansado, J, Peña, M., Kawakami, T., Laborda, J. & Notario, V. (1993). Cloning of the dihydroxyacid dehydratase enconding gene (*ILV3*) from *Saccharomyces cerevisiae. Gene 137*(2), 179-185.

Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76*(2), 615-619.

Voldoire E., Brunet F., Naville M., Volff JN. & Galiana D. (2017) Expansion by whole genome duplication and evolution of the sox gene family in teleost fish. *Plos One 12*(7): e0180936.

Voordeckers, K. & Verstrepen, K. (2015). Experimental evolution of the model eukaryote Saccharomyces cerevisiae yields insight into the molecular mechanisms underlying adaptation. *Current Opinion in Microbiology, 28,* 1-9.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res. 46*(W1), W296-W303.

Wolfe, KH. (2015) Origin of the Yeast Whole-Genome Duplication. *PLoS Biol, 13*(8): e1002221.

Yang, J. and Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research 43*, W174-W181.